

УДК 57.083.133

КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФОРМЫ ЖИДКОГО ПРОБИОТИКА

© 2012 г.

*И.В. Соловьева, А.Г. Точилина, И.В. Белова, Е.И. Ефимов,
Н.А. Новикова, Т.П. Иванова*

Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной

lab-lb@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.04.2012

Представлен первый этап работы по созданию нового жидкого иммобилизованного пробиотика. В результате проведенных исследований отобраны штаммы продуценты, удовлетворяющие всем требованиям, предъявляемым к стартерным культурам, выбран минеральный сорбент-носитель из группы цеолитов, сконструирована питательная основа жидкого пробиотика. Разработан оптимальный способ иммобилизации штаммов на матрице.

Ключевые слова: иммобилизованный пробиотик, сорбенты, цеолиты, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*.

Введение

В медицине и биотехнологии давно известны и активно применяется принцип иммобилизации (закрепления) субстанций – ферментов, гормонов, антибиотиков – на органических и неорганических сополимерах (носителях). Использование этого принципа позволяет создать комплексные препараты, обладающие высокой стабильностью и эффективностью [1].

Иммобилизованные биопрепараты содержат биологические вещества или биологические агенты (бактерии, вирусы и др.), адсорбированные различными физико-химическими методами на твердых носителях (матрицах) или связанные с твердыми носителями химическими связями [1].

Создание такого рода препаратов является актуальной задачей в России и за рубежом [2].

Иммобилизованные пробиотики имеют ряд принципиальных положительных отличий от традиционных форм. Микроорганизмы, связанные с твердым носителем, лучше сохраняются в кислой среде желудка, что позволяет им беспрепятственно достигать нижних отделов пищеварительного тракта. При поступлении сорбента в кишечник формируется репродукционная доза, которая образует в химусе отдельные микроколонии, интенсивно взаимодействующие с пристеночным слоем слизистой оболочки кишечника за счет химических и электростатических сил и активно адгезирующиеся на ней. Увеличение концентрации активных микроколоний бактерий на стенках кишечника усилива-

ет скорость колонизации, обеспечивает выраженный антагонистический и репаративный эффект и последующую вегетацию вводимых микроорганизмов. Сорбент, кроме функции матрицы, способствует также адгезии микроколоний на слизистой кишечника и концентрации метаболитов. По мере освобождения от бактерий сорбент-носитель реализует и детоксицирующую функцию, адсорбируя и выводя из кишечника токсины, продукты незавершенного метаболизма, патогенные и условно-патогенные бактерии, аллергены [3].

Сорбенты, входящие в состав препаратов-пробиотиков, активно «собирают» токсические продукты при движении в просвете кишечника. Так, процесс естественного вывода токсикантов из организма носит циклический характер, то есть они, прежде чем покинуть организм, многократно всасываются и вновь экскретируются кишечником. Идея использования сорбирующих веществ заключается в прерывании этого «порочного» круга, фиксации ауто- и экзотоксинов на их поверхности с последующей эвакуацией [4].

Имеет место и другая особенность поведения энтеросорбентов в просвете кишечника – при его контакте с живой биологической тканью возникает новая уникальная биоминеральная среда с характерной архитектурой. Лимфоидные клетки группируются вокруг его гранул и образуют ассоциации, напоминающие солитарные лимфатические фолликулы или фрагменты пейеровых бляшек, и принимают на себя их дренажно-детоксикационную и иммунную функции [4].

За счет комплексного действия высвободившихся пробиотических микроорганизмов и реализации собственных свойств сорбента-носителя инициируется репарация слизистой кишечника [5].

При разработке иммобилизованных форм биологических препаратов важнейшим моментом является выбор сорбента-носителя. Современные энтеросорбенты должны соответствовать следующим критериям [6]:

1) нетоксичность; препараты в процессе прохождения по желудочно-кишечному тракту (ЖКТ) не должны разрушаться до компонентов, которые при всасывании способны оказывать прямое или опосредованное действие на органы и системы;

2) нетравматичность для слизистых оболочек; должны быть устранены механические, химические и другие виды неблагоприятного взаимодействия со слизистой оболочкой полости рта, пищевода, желудка и кишечника, приводящие к повреждению органов;

3) хорошая эвакуация из кишечника и отсутствие обратных эффектов – усиления процессов, вызывающих диспептические нарушения;

4) высокая сорбционная емкость;

5) отсутствие десорбции веществ в процессе эвакуации и изменения pH среды, способных привести к неблагоприятным проявлениям;

6) удобная фармацевтическая форма препарата, отсутствие отрицательных органолептических свойств сорбента:

7) благоприятное влияние или отсутствие воздействия на процессы секреции и биоценоз микрофлоры ЖКТ.

Согласно классификации сорбентов по химической структуре выделяют: активированные угли (углеродные адсорбенты); силикагели; цеолиты; алюмогели; алюмосиликаты; окисные и другие неорганические сорбенты; пищевые волокна; органоминеральные и композиционные сорбенты [6].

Можно выделить минеральные (цеолиты, алюмосиликаты) и органические сорбенты (растительные волокна), сорбенты природного происхождения (хитозан, пектин, перлит, диатомит, кокосовое волокно и др.) и искусственно синтезированные, например СУМС-1 (сферический углеродно-минеральный сорбент), Сфероцелл [5, 7].

Наиболее удовлетворяют всем медицинским требованиям следующие группы: различные виды активированных углей, углеродоминеральные сорбенты, пищевые волокна, цеолиты.

За рубежом активно используется технология микрокапсулирования – иммобилизация

пробиотических бактерий в геле на основе альгината кальция, каппа-каррагинана, желатина, хитозана, агарозы и на пищевых растительных волокнах [8].

В России создан ряд сухих иммобилизованных пробиотиков: «Бифидумбактерин форте», «Флорин-форте», «Пробифор», «Экофлор» и др. В качестве сорбционной составляющей в основном используются активированные угли и углеродоминеральный сорбент СУМС-1 [5].

Препараты в сухой форме имеют ряд положительных черт, например длительный срок годности, удобство хранения и реализации. Но процесс лиофилизации бактерий оказывает негативное влияние на структуру их поверхностных белков, активность адгезии, а также приводит к разрушению ценных бактериальных метаболитов. Жидкая форма пробиотиков, напротив, способствует реализации положительных свойств штаммов-продуцентов в полной мере, так как их клетки находятся в активном физиологическом состоянии, эффективно взаимодействуют со слизистой кишечника; кроме того, в жидкой среде сохраняются все бактериальные метаболиты [9].

Цель данной работы – теоретическое и экспериментальное подтверждение возможности создания иммобилизованного пробиотика в жидкой форме.

Экспериментальная часть

Антагонистическую активность бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* в отношении условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) изучали методом отсроченного антагонизма [10, 11].

Изучение выживаемости штаммов-продуцентов пробиотиков в кислой среде проводили *in vitro* следующим образом: приготавливали растворы с pH 1.0 и 2.0 путем смешивания жидкой питательной среды и 0.1 М HCl. В 9 мл приготовленного раствора вносили по 1 мл I генерации изучаемой культуры и выдерживали в течение 30 минут и 1 часа. По 1 мл культуры до начала исследования (контроль) и после экспозиций раститровывали на стандартной питательной среде до разведения 10^{-12} для определения количества живых микроорганизмов после стрессового воздействия.

Следует отметить, что наша модель является предельно упрощенной, т.к. не учитывает многих сопутствующих факторов (например, слизь, вырабатываемая в ЖКТ, в некоторой мере защищает бактерии от воздействия соляной кислоты желудочного сока).

Антибиотикорезистентность штаммов изучалась методом серийных разведений в жидкой среде с чистыми субстанциями антибиотиков согласно МУК 4.2.1890-04 [12].

Антибиотики отбирались с учетом групповой принадлежности – по одному антибиотику из каждой группы (всего четырнадцать групп): группа пенициллинов – ампициллин, аминогликозиды – гентамицин, тетрациклин, макролиды – эритромицин, хлорамфеникол, линкозамиды – клиндамицин, цефалоспорины первого поколения – цефалотин, второго поколения – цефаклор, третьего поколения – цефотаксим, четвертого поколения – цефепим, нитроимидазолы – метронидазол, фторхинолоны – цiproфлоксацин, гликопептиды – ванкомицин, полипептиды – полимиксин, сульфаниламид и рифампицин, нитрофураны – фуразолидон.

Биосовместимость микроорганизмов изучали методом наложенных капель на твердой среде МРС-4 для лактобацилл и агаризованной ГМС для бифидобактерий [13].

Иммобилизация штаммов проводилась по способу, разработанному авторами [14].

Изучение сохранности штаммов-продуцентов в составе опытных серий иммобилизованных пробиотиков и в контроле проводили в соответствии с МУК 4.2.1847-04 [15].

Результаты и их обсуждение

На данный момент разработано и используется большое количество сорбентов различных групп как природного происхождения (цеолиты, алюмосиликаты, растительные волокна и т.д.), так и искусственно созданных (СУМС-1, Сфероцелл и др.). Наиболее целесообразным представляется использование при конструировании иммобилизованного пробиотика природных минеральных сорбентов, способных не только освобождать среду от балластных и токсичных веществ, но и обогащать ее полезными веществами и ионами.

Использование активированных углей и СУМС-1 для создания жидких форм пробиотиков мы сочли нецелесообразным, так как введение субстанции в питательную основу препарата отрицательно влияет на внешний вид конечного продукта, который приобретает грязно-серый цвет с черным осадком.

Органические энтеросорбенты на основе природных компонентов (таких как хитин, хитозан, пищевые растительные волокна) обладают низкой адсорбционной способностью и, кроме того, их адсорбция достаточно специфична [16]. Также они являются биологически

нестабильными: в процессе переваривания в ЖКТ могут разрушаться до компонентов, которые в дальнейшем используются в метаболизме макроорганизма. Эти сорбенты не способны осуществлять сорбирующий эффект в полной мере, поэтому использование их в составе жидкого иммобилизованного пробиотика неоправдано.

Использование гелей на основе альгинатов, каррагинана, безусловно, повышает эффективность штаммов продуцентов и их выживаемость, но не отвечает задаче по созданию жидкого препарата, оказывающего комплексное воздействие за счет положительного влияния сорбционной составляющей и пробиотических культур.

Таким образом, для создания жидкого иммобилизованного пробиотика наиболее целесообразным представляется использовать минеральный сорбент, мы остановились на природном цеолите. Природные цеолиты не изменяют внешний вид жидкого препарата, обладают выраженными сорбционными свойствами, способностью не разрушаться и не претерпевать изменения в организме человека. Кроме того, они оказывают благоприятное воздействие на штаммы-продуценты пробиотиков. Эта группа минералов хорошо изучена в Японии, в России и в других странах и допущена к использованию в качестве лекарственных препаратов [17].

Цеолиты относятся к породам вулканически-осадочного происхождения, представляют собой каркасные алюмосиликаты щелочных и щелочноземельных металлов. В медицинской практике рекомендовано использование цеолита Холинского месторождения, по структурному признаку относящегося к группе гейландита (клиноптилолит).

Кристаллическая структура этого вида цеолитов состоит из тетраэдров оксида кремния и оксида алюминия, соединенных вершинами в ажурные каналы, в полостях и каналах которых находятся катионы и молекулы воды (рис. 1).

В природе цеолиты образуют хорошо ограниченные кристаллы различной симметрии, размерами от доли микрона до 10 см, не имеющие острых граней, обычно белого цвета.

В структуре клиноптилолита имеется три типа каналов, образующих двухмерную систему. 1 – размеры окон 4.0–4.6 ангстрем – параллельно оси *a* в 8-членных кольцах, 2 – размеры окон 4.4–7.2 ангстрем – параллельно оси *c* в 10-членных кольцах, 3 – размеры окон 4.1–4.7 ангстрем – 50° к оси *a* в 8-членных кольцах (рис. 1).

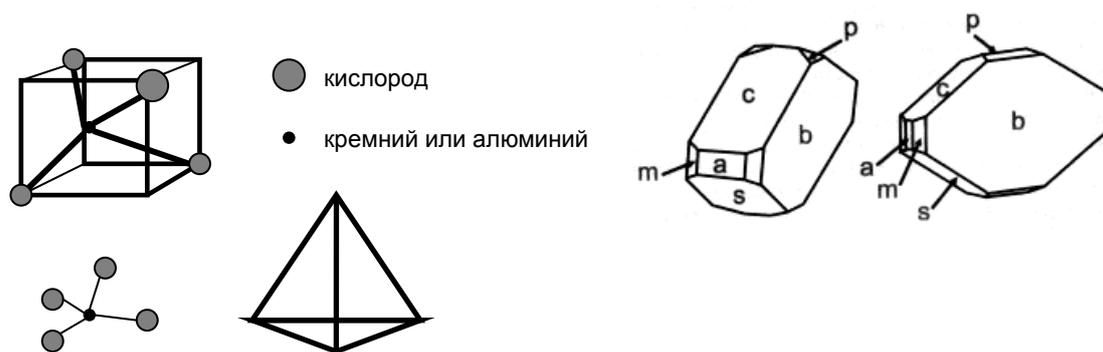


Рис. 1. Структура и морфология кристалла клиноптилолита

Катионы локализуются в трех типах мест – два на стенках каналов и один в пересечении 8-членных колец.

Цеолит обладает строго калиброванным размером пор (около четырех ангстрем), способен проявлять сорбционные свойства по отношению к ионам макро- и микроэлементов и соединениям с небольшими размерами молекул (метану, сероводороду, аммиаку и др.). Адсорбционный объем клиноптилолита составляет от 0.28 до 0.54 см³/г за счет ажурности кристаллической структуры. Кристаллохимическая формула клиноптилолита: (Na,K)₆[Al₆Si₃₀O₇₂] × 24H₂O.

Химический состав цеолита:

- Al₂O₃ – (12.9–13.2)%;
- SiO₂ – (66.2–78.3)%;
- K₂O – (4.0–4.8)%;
- Na₂O – (1.8–2.2)%;
- CaO – (1.8–2.4)%;
- Fe₂O₃ – (0.8–1.2)%;
- Mn – 0.001%;
- H₂O – (10–12)%.

Соединения хрома, кобальта, молибдена, никеля и сурьмы не обнаружены. Плотность цеолита – (2.2–2.6) г/см³, насыпной вес (1.02–1.2) г/см³ [17].

Особенности сорбции на цеолитах связаны с тем, что ажурность кристаллической структуры создает большой адсорбционный объем, а его геометрия определяет молекулярно-ситовые свойства. Сильное взаимодействие молекул с адсорбентом обусловлено наличием акцепторных центров, прочно удерживающих доноры электронов, или ОН-групп, удерживающих основания [18].

Клиноптилолит используется в медицинской практике с 80-х годов прошлого века, обладает уникальными свойствами селективного ионного обмена, поставляет в организм недостающие макро-, микро- и ультрамикроэлементы, если их не хватает, и убирает их из организма, если они находятся в избытке [17].

Важным также является каталитическое свойство цеолита, что способствует нормализации всех биохимических процессов в организме. Доказано, что использование клиноптилолита дает целый ряд положительных эффектов, таких как антиоксидантный, иммуномодулирующий, антианемический, гепатопротекторный, способствует выведению из организма тяжелых металлов, нормализует липидный, белковый и углеводный обмены, оптимизирует работу ферментных систем [19].

Таким образом, данный сорбент обладает характеристиками, обеспечивающими перспективность его использования в качестве матрицы для иммобилизации пробиотических штаммов микроорганизмов.

Для создания жидкого иммобилизованного мультиштаммового препарата были изучены свойства более 50 штаммов лакто- и бифидобактерий, удовлетворяющих требованиям, предъявляемым к производственно-перспективным штаммам [20].

Внимание было уделено таким свойствам как антагонистическая активность к УПП, циркулирующим на территории Приволжского федерального округа, антибиотикорезистентность, кислотоустойчивость и биосовместимость. В результате ранее проведенных исследований нами были отобраны три штамма рода *Lactobacillus* и три штамма рода *Bifidobacterium*. Они обладают высокой или очень высокой степенью антагонистической активности в отношении представителей родов *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* и группы неферментирующих грамотрицательных бактерий [21].

Принимаемые перорально препараты-пробиотики, прежде чем достигнуть непосредственного места действия (толстый кишечник), подвергаются в желудке жесткому воздействию кислой среды, которая является основным фак-

тором, снижающим эффективность препаратов данной группы. Устойчивость пробиотических микроорганизмов к агрессивному воздействию желудочного сока увеличит эффективность пробиотиков. При гипоацидных состояниях выживаемость зубактерий-составляющих препаратов-пробиотиков находится на относительно высоком уровне, поэтому наибольший интерес представляли гиперацидность и нормацидность. Разброс значений рН гиперацидности и нормацидности находится в пределах от 1.0 до 2.0. Модель данного опыта имитирует прием препарата натощак перед едой, при этом время нахождения в желудке сокращается до 30–60 минут.

Установлено, что штаммы, предполагаемые для использования при конструировании нового синбиотика, обладают относительно высоким уровнем кислотоустойчивости: при воздействии кислой рН, соответствующей состоянию нормацидности (рН 2.0), количество живых микроорганизмов в пробиотике снижается незначительно – на 1 порядок и меньше (7.6–7.8 lg КОЕ/мл). Иммобилизация бактерий на сорбенте, как сказано выше, оказывает дополнительное протективное действие на клетки бактерий, что позволяет предположить, что штаммы-продуценты поступят в кишечник в достаточном количестве и эффективность нового синбиотика останется на высоком уровне.

Штаммы-продуценты нового пробиотика должны обладать также высоким уровнем антибиотикорезистентности, что является залогом успешного применения этого препарата совместно с антибиотикотерапией. Показано, что все шесть штаммов обладают различным уровнем антибиотикорезистентности (табл. 1).

Также установлено, что из отобранных штаммов всегда два-три штамма разных родов устойчивы к действию конкретного антибиотика. Например, к действию цефалоспоринов четвертого поколения устойчивы штаммы *L. fermentum* 2 и *B. longum* 1, а к хлорамфениколу – *B. bifidum* 1, 2 и *L. plantarum* 1.

Необходимо отметить, что ранее были детально изучены плазмидные профили используемых штаммов и показано, что устойчивость используемых штаммов к антибиотикам не детерминирована плазмидами [22]. Это подтверждает теоретическую возможность использования данной композиции на фоне антибиотикотерапии.

Важным свойством штаммов-продуцентов многокомпонентных жидких пробиотиков является их биосовместимость, то есть способность к совместному культивированию или хранению.

Создатели однокомпонентных препаратов не сталкиваются с проблемой биосовместимости стартерных культур. Не всегда учитывается биосовместимость и при создании многокомпонентных сухих препаратов, особенно когда по технологии смешивают уже высушенные монокультуры. В этом случае невозможно прогнозировать поведение культур в организме хозяина. Разработчики же мультиштаммовых жидких композиций сталкиваются с проблемой отбора штаммов, испытанных на симбиотичность, т.е. биосовместимость, уже на этапе конструирования пробиотиков. В связи с этим была изучена биосовместимость штаммов лакто- и бифидобактерий.

Ранее нами была выделена группа штаммов бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, обладающих высокой степенью биосовместимости и перспективных к использованию в составе многокомпонентного пробиотика [23]. В рамках данной работы была изучена межродовая биосовместимость этих штаммов (табл. 2).

Установлено, что штаммы *B. bifidum* 1, *B. bifidum* 2, *B. longum* 1, *L. plantarum* 1, *L. fermentum* 1, *L. fermentum* 2 биосовместимы друг с другом и пригодны для использования в одной композиции.

В ходе дальнейших исследований нами была сконструирована новая питательная среда, удовлетворяющая потребность как бифидобактерий, так и лактобацилл в питательных веществах. В качестве источника аминокислот и олигопептидов был использован гидролизат пищевого казеина. Основа не обладает иммуногенностью, что обеспечивает хорошую переносимость препарата и имеет большое значение, особенно в педиатрической практике [24, 25].

Необходимо отметить, что малый размер пор цеолита (около четырех ангстрем) препятствует проникновению компонентов среды во внутреннюю структуру сорбента, что обеспечивает реализацию его сорбционной активности после попадания в кишечник.

Таким образом, в ходе работы создана гипоаллергенная питательная основа, обеспечивающая потребности микроорганизмов в питательных веществах и образующая оптимальную систему с сорбционным компонентом.

Далее был разработан оптимальный способ иммобилизации бактерий, защищенный патентом № 2441907 [14] и произведена серия модельных экспериментов по сорбции на твердом носителе каждого штамма из группы отобранных. Установлено, что выход биомассы в контроле (культура выращена на основе без носителя) и в опыте (культура выращена на

Таблица 1

Уровни антибиотикорезистентности штаммов-продуцентов

С _{пвх} *, мг/мл Антибиотик Штамм	1.5-9	10	3-10	0.2-24	12-18	1.4-40	15.4	5.3	15.4	0.164	6-40	2-2.9	н.д.	25-40	1-8	80-100	16.3
	<i>Amp</i>	<i>Gen</i>	<i>Tet</i>	<i>Ery</i>	<i>Chl</i>	<i>Cli</i>	<i>Cfl</i>	<i>Cfn</i>	<i>Cfp</i>	<i>Met</i>	<i>Cip</i>	<i>Fur</i>	<i>Van</i>	<i>Pol</i>	<i>Sul</i>	<i>Rif</i>	
Минимальные ингибирующие концентрации антибиотиков (МИС), мг/мл																	
<i>L. plantarum 1</i>	<5	<50	25	1	<8	≤1	8	32	128	≤0.032	500	>500	500	>256	4	>12800	<12.5
<i>L. fermentum 1</i>	2.5	<50	25	2.5	<4	0.125	16	64	64	0.1	200	>500	500	>256	32	>12800	<12.5
<i>L. fermentum 2</i>	2.5	<50	25	2.5	<4	0.125	8	64	64	16	200	>500	500	>256	>64	>12800	<12.5
<i>B. bifidum 1</i>	0.063	32	0.5	>8	4	≤0.032	12.5	8	64	≤0.032	100	16	50	2	>64	>1024	33.3
<i>B. bifidum 2</i>	0.063	64	1	>8	4	≤0.032	12.5	8	64	≤0.032	300	16	50	4	>64	>1024	26.7
<i>B. longum 1</i>	1	64	2	0.5	2	≤0.125	25	64	64	1	300	32	300	4	>64	>1024	>6.4

* Максимальная концентрация антибиотика, создающаяся в плазме крови при приеме терапевтических доз препарата: *Amp* – ампициллин, *Gen* – гентамицин, *Tet* – тетрациклин, *Chl* – хлорамфеникол, *Cli* – клиндамицин, *Cfl* – цефалор, *Cfn* – цефотаксим, *Cfp* – цефепим, *Met* – метронидазол, *Cip* – ципрофлоксацин, *Fur* – фурадонин, *Van* – ванкомицин, *Pol* – полимиксин, *Sul* – сульфаниламид, *Rif* – рифампицин.

Таблица 2

Биосовместимость штаммов бифидобактерий и лактобацилл

Исследуемый штамм	Тест-штамм		<i>L. fermentum 1</i>		<i>L. acidophilus 1</i>		<i>L. casei 1</i>	
	<i>L. plantarum 1</i>	<i>L. fermentum 2</i>	<i>L. fermentum 1</i>	<i>L. fermentum 2</i>	<i>L. acidophilus 1</i>	<i>L. casei 1</i>	<i>L. acidophilus 2</i>	
<i>B. bifidum 1</i>	+	+	+	+	-	±	+	
<i>B. bifidum 2</i>	+	+	+	+	+	+	-	
<i>B. longum 1</i>	+	+	+	+	+	+	+	

+ – Наличие биосовместимости.

Таблица 3

Количество живых клеток *L. plantarum* и *B. bifidum* при раздельном культивировании на цеолите

Время экспозиции	Контроль (усредненная проба), Ig КОЕ/мл		Иммобилизованный препарат (усредненная проба), Ig КОЕ/мл			
	<i>L. plantarum</i> 1	<i>B. bifidum</i> 1	<i>L. plantarum</i> 1		<i>B. bifidum</i> 1	
			осадок	надосадок	осадок	надосадок
24 часа	11	11	11	10	11	11
60 суток	11	10	10	10	11	11
70 суток	10	10	10	10	10	10

Таблица 4

Количество живых клеток *L. plantarum* и *B. bifidum* при совместном культивировании на цеолите

Время экспозиции	Контроль (усредненная проба), Ig КОЕ/мл		Иммобилизованный препарат (усредненная проба), Ig КОЕ/мл			
	<i>L. plantarum</i> 1 + <i>B. bifidum</i> 1		<i>L. plantarum</i> 1 + <i>B. bifidum</i> 1			
	<i>L. plantarum</i> 1	<i>B. bifidum</i> 1	надосадок		осадок	
<i>L. plantarum</i> 1			<i>B. bifidum</i> 1	<i>L. plantarum</i> 1	<i>B. bifidum</i> 1	
24 часа	11	11	11	10	11	11
60 суток	11	10	11	10	10	11
70 суток	10	10	10	10	10	11

основе с добавлением носителя), не отличается и составляет 10–11 Ig КОЕ/мл. Серия опытов по изучению сохранности иммобилизованных форм показала, что титры клеток оставались на высоком уровне в течение 70 суток (табл. 3).

Полученные результаты позволили сделать вывод, что цеолит не оказывает отрицательного влияния на жизнеспособность клеток микроорганизмов – продуцентов пробиотиков.

Затем была изучена возможность иммобилизации на цеолите одновременно двух штаммов различных родов – *L. plantarum* 1 и *B. bifidum* 1 – и сроки сохранности полученной ассоциации. По результатам серии опытов установлено, что количество живых клеток лакто- и бифидобактерий как свободных (контроль), так и связанных с матрицей достоверно не отличается на протяжении 70 суток и составляет 10–11 Ig КОЕ/мл (табл. 4).

То есть отобранные нами с учетом биосовместимости бактерии двух родов способны к длительному сосуществованию в процессе хранения и составляют устойчивую систему с сорбирующим компонентом. Сохранность всех штаммов продуцентов многокомпонентного иммобилизованного пробиотика в достаточном для биологических концентратов титре позволяет предположить его высокую клиническую эффективность.

Заключение

Таким образом, в ходе работы сконструирован новый жидкий иммобилизованный синбиотик. В качестве стартерных культур использованы штаммы лакто- и бифидобактерий, культивированные на гипоаллергенной питательной основе, иммобилизованные на сорбентеносителе из группы цеолитов.

Список литературы

1. Макаров К.А., Кибардин С.А. Иммобилизованные биопрепараты в медицине. М.: Медицина, 1980. 128 с.
2. Захарова И.Н., Мазанкова Л.Н., Дмитриева Ю.А. Современные пробиотики для коррекции микробиоценоза кишечника у детей // Вопросы современной педиатрии. 2009. Т. 8. № 2. С. 113–117.
3. Феклисова Л.В., Мацулевич Т.В. Отечественные бифидосодержащие пробиотики в педиатрической практике. Лекция // Альманах клинической медицины. 2002. № 5. С. 296–300.
4. Римарчук Г.В., Урсова Н.И., Щеплягина Л.А. и др. Энтеросорбция в терапевтических программах различных заболеваний у детей // Альманах клинической медицины. 1999. № 2. С. 283–292.
5. Иванова В.В. Комплексный подход к восстановлению микрофлоры. Современный взгляд на коррекцию дисбиозов / Под ред. А.В. Молокеева. Новосибирск: Изд-во «Вектор-БиАльгам», 2007. 48 с.

6. Беляков Н.А. Энтеросорбция. Л.: Наука, 1991. 336 с.
7. Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В., Болдырев А.Г. и др. Использование сорбента Сфероцелл при конструировании иммобилизованного пробиотика // ЖМЭИ. 2009. № 5. С. 66–69.
8. Tsen J.H., Huang H.Y., Lin Y.P. et al. Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization // J. Microbiol. Methods. 2007. V. 70. № 3. P. 561–564.
9. Бондаренко В.М., Шапошникова Л.И. Клинический эффект жидких симбиотических биокомплексов, содержащих физиологически активные клетки бифидобактерий и лактобацилл. М.: Триада, 2007. 95 с.
10. Фармакопейная статья ФС 0054-00. Лактобактерин сухой. Утверждена 01.11.2000.
11. Ленцнер А.А., Таллмейстер Э.Т., Тоом М.А., Микельсаар М.Э., Воронина М.Н. Об антагонистической активности различных видов лактобацилл по отношению к энтеропатогенной кишечной палочке серологического типа O₁₁₁V₄ // Материалы V научн. конф. Таллинского ИЭМиГ. Таллин, 1964. С. 8–9.
12. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания № 4.2.1890-04. Утверждены 04.03.2004.
13. Глушанова Н.А. Экспериментальное обоснование новых подходов к коррекции микробиоценоза кишечника. Автореферат. дис. ... д-ра мед. наук. М.: ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 2005. 56 с.
14. Пат. № 2441907 Россия, МПК C12N 1/20, A61K 35/74, A23C 9/127. Способ приготовления лечебно-профилактического препарата из живых штаммов микроорганизмов лакто- и бифидобактерий «ЛВ-комплекс Л» / Соловьева И.В., Белова И.В., Точилина А.Г., Ефимов Е.И., Иванова Т.П., Новикова Н.А., Новоселова Т.И., Новоселов Я.Б. (Россия). № 2010132024/10; заявлено 29.07.2010, опубл. 10.02.2012, Бюл. № 4. С. 2.
15. Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов: методические указания № 4.2.1847-04. Утверждены 20.06.2004.
16. Комаров В.С. Адсорбенты и их свойства. Минск: Наука и техника, 1977. 248 с.
17. Веретенина О.А., Костина Н.В., Новоселова Т.И. и др. Литовит. Новосибирск: Сибирский центр оздоровительного питания; НГАЭиУ, 2003. 104 с.
18. Бгатов В.И. Подходы к экогеологии. Новосибирск: Изд-во НГУ, 1993. 70 с.
19. Агаджанян Н.А. Природные минералы на службе человека. Новосибирск: Изд-во НГУ, 2002. 30 с.
20. Ouwehand A. Использование новых штаммов в медицине // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2009. № 4. С. А19.
21. Белова И.В. Конструирование нового многокомпонентного пробиотика и использование его в комплексной терапии хеликобактер-ассоциированных заболеваний Дис. ... канд. мед. наук. Н. Новгород: ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 2005. 144 с.
22. Леванова Г.Ф., Кашников С.Ю., Трошкина Д.М. и др. Использование методов изучения хромосомной и плазмидной ДНК для оценки производственно-перспективных штаммов молочно-кислых бактерий, нормализующих микрофлору кишечника // Регуляция биологических систем: межвузовский тематический сборник научных трудов под ред. И.Н. Блохиной. Горький: Изд-во ГГУ, 1990. 80 с.
23. Соловьева И.В., Точилина А.Г., Новикова Н.А. и др. Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus* // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2010. № 2 (2). С. 462–468.
24. Боровик Т.Э., Макарова С.Г., Дарчия С.Н. и др. Роль смесей – гидролизатов белка в профилактике и диетотерапии пищевой аллергии у детей раннего возраста // Вопросы современной педиатрии. 2010. Т. 9. № 1. С. 150–156.
25. Макарова С.Г., Боровик Т.Э., Шихов С.Н. и др. Использование продуктов на основе гидролизата молочного белка при пищевой аллергии у детей раннего возраста // Лечащий врач. 2008. № 1. С. 23–29.

CONSTRUCTION OF AN IMMOBILIZED FORM OF THE LIQUID PROBIOTIC

I.V. Solovyeva, A.G. Tochilina, I.V. Belova, E.I. Efimov, N.A. Novikova, T.P. Ivanova

This paper presents the first phase of the work on a new liquid immobilized probiotic. As a result of the study, the producer strains of probiotics meeting all requirements to starter cultures have been selected. A mineral sorbent carrier has been chosen from the group of zeolites, the nutrient base for a liquid probiotic has been constructed. The optimum way for immobilizing strains on the matrix has been developed.

Keywords: immobilized probiotic, sorbents, zeolites, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*.