



SZERVES KÉMIA ÉS TECHNOLOGIA TANSZÉK

2012

OTDK dolgozat

**Új gyógyszer-technológiai eljárások fejlesztése
probiotikumok szilárd formulálására és stabilizálására**

Készítette: Tobak Teodóra

Témavezetők: Dr. Marosi György

Dr. Suhajda Ágnes

Konzulensek: Dr. Nagy Zsombor Kristóf

Wagner István

A dolgozat bemutatását a TÁMOP - 4.2.2. B-10/1--2010-0009

**"Új tehetséggondozó programok és kutatások a Műegyetem tudományos műhelyeiben"
című program támogatta**

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	4
2	Szakirodalmi áttekintés	5
2.1	Biohatóanyagok.....	5
2.2	Lactobacillus acidophilus.....	6
2.2.1	Bakteriális vaginosis	7
2.2.2	Beviteli módok	8
2.3	Baktériumok hosszú távú stabilizálása	9
2.4	Alternatív szárítási technológiák	14
2.4.1	Filmbevonás	14
2.4.1.1	Filmbevonó berendezés	14
2.4.1.2	Biotechnológiai alkalmazás.....	15
2.4.2	Elektrosztatikus szálképzés	16
2.4.2.1	Működési elv	16
2.4.2.2	Szálképzést befolyásoló paraméterek.....	18
2.4.2.3	Elektrosztatikus szálképzés biotechnológiai alkalmazása és méretnövelhetősége	18
3	Felhasznált anyagok, kísérleti módszerek	22
3.1	Felhasznált anyagok	22
3.1.1	Lactobacillus acidophilus.....	22
3.1.2	MRS Agar	22
3.1.3	Anaerocult®	23
3.1.4	Polimerek	23
3.1.4.1	Polivinil-alkohol (PVA)	23
3.1.5	Stabilitásjavító szerek	24
3.1.5.1	Trehalóz.....	24
3.1.5.2	Szacharóz.....	24
3.1.5.3	Sóvány tejpor.....	24

3.1.6	Tween® 80 (Polioxietilén- szorbitán- monooleát)	24
3.1.7	Placebo tabletta.....	25
3.1.8	Opadry II clear.....	25
3.2	Felhasznált eszközök, mintakészítés	25
3.2.1	Elektrosztatikus szálhúzó berendezés	25
3.2.2	Baktérium szuszpenzió készítése.....	26
3.2.3	Filmbevonás	26
3.2.4	Baktérium szuszpenzió beágyazása polimer nanoszálakba.....	27
3.2.5	Elektrosztatikus szálképzés méretnövelése	27
3.3	Vizsgálati módszerek.....	27
3.3.1	Baktérium telepek számlálása	27
3.3.2	Kioldódás vizsgálat.....	28
4	Eredmények és értékelésük.....	29
4.1	Lactobacillus acidophilus baktérium formulálása filmbevonással	29
4.1.1	Lactobacillus acidophilus baktériumot tartalmazó filmbevonat kialakítása.....	29
4.1.2	Stabilitásjavítók alkalmazása a filmbevonás során.....	32
4.2	A Lactobacillus acidophilusszal végzett elektrosztatikus szálképzési kísérletek eredményei.....	34
4.2.1	Elektrosztatikus szálképzéssel formulált LBA stabilitási eredményei.....	34
4.2.2	Elektrosztatikus szálképzéssel készített minták stabilitásvizsgálata.....	35
4.2.2.1	Trehalóz, szacharóz alkalmazásának hatása a csíraszám változására	37
4.2.2.2	Sovány tejpor alkalmazásának hatása a csíraszám változására.....	39
4.2.3	Az elektrosztatikus szálképzés méretnövelhetősége.....	44
4.3	Kioldódás vizsgálatok.....	44
5	Összefoglalás	46
6	Irodalomjegyzék	48

1 Bevezetés

Az elmúlt évszázadban a biotechnológia egyre nagyobb teret hódított, így a gyógyszeriparban is rohamosan nőtt a piacra került, biotechnológiai eredetű hatóanyagot tartalmazó gyógyszerkészítmények jelenléte. A biotechnológia jelenlegi és várhatóan tovább erősödő térnyerése a gyógyszer- formulálást is új kihívások elé állítja.

Munkám során a biotechnológiai eredetű hatóanyagok csoportján belül a probiotikumok szilárd formulálásának lehetőségeit vizsgáltam. Céлом, olyan új, kíméletes technológiák fejlesztése és vizsgálata volt, amelyek alkalmasak lehetnek az iparban leggyakrabban alkalmazott, azonban rendkívül idő- és energiaigényes fagyasztva szárítás kiváltására. A kísérletekhez használt biohatóanyag a *Lactobacillus acidophilus*, probiotikus baktérium volt.

Az általam vizsgált egyik technológia az iparban széles körben alkalmazott tablettá bevonási módszer a filmbevonás volt, melynek segítségével egy lépésben hozhatnánk létre élő baktérium tartalmú tablettákat anélkül, hogy a tablettázás során felmerülő jelentős csíraszám csökkenést szenvednének, így elkerülhető a tablettázás során felmerülő mechanikai és hő stressz okozta csíraszám csökkenés.

A másik alkalmazott módszer az elektrosztatikus nanoszálképzés volt, amely a gyógyszeriparban még nem alkalmazott módszer, azonban más iparágakban (pl.: textilipar) már a termékgyártás területén is alkalmazott nanotechnológiai eljárás. Az elektrosztatikus szálképzés rendkívül kíméletes szárítást tud biztosítani, emellett folyamatos üzemű gyártás is megvalósítható vele, és energiaigénye is nagyon alacsony. A technológia méretnövelése is megoldott, így a folyamatos üzemű gyártás ipari megvalósíthatóságának lehetőségei adóttak.

2 Szakirodalmi áttekintés

2.1 Biohatóanyagok

A biohatóanyag kifejezés egy sokszínű hatóanyagcsoportot takar, amely magában foglalja a fehérjéket, peptideket, nukleinsavakat, egész sejteket, virális részecskéket, vakcinákat [1].

A biotechnológia gyors fejlődésével a biohatóanyagok alkalmazása egyre nagyobb szerepet kapott. Ezen hatóanyagok alkalmazása drámai módon megnövekedett az elmúlt időszakban, becslések szerint 2010-ben már az újonnan elfogadott gyógyszerhatóanyagok fele biotechnológiai eredetű volt [2]. Ezt az is jól mutatja, hogy míg 2000-ben 28 fehérje alapú készítmény volt a piacon, azonban napjainkra már ez a szám meghaladja a kétszázat [3].

A látványos növekedés a biotechnológia fejlődésén kívül a biohatóanyagok kedvező terápiás tulajdonságaival magyarázható.

A specifikus hatás és az ebből származó alacsonyabb dózis együttes hatása kevesebb mellékhatást eredményez a páciens számára, valamint az eddig nehezen vagy egyáltalán nem kezelhető betegségekre megoldást jelentenek az újonnan megjelenő biohatóanyagok.

A biohatóanyagok csoportján belül nagy jelentőséggel bírnak a probiotikumok, melyek a WHO definíciója szerint olyan élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő alkalmazása jótékony hatást gyakorol a gazdaszervezetre [4]. Alkalmazásuk rendkívül széleskörű, segíti a gasztrointesztinális traktus, illetve az immunrendszer egészségének megőrzését. A probiotikus mikroorganizmusok csökkentik a hasmenéses megbetegedések gyakoriságát. Számos tanulmány mutatja, hogy ezen mikrobióták más gyakori gyomor-, bélrendszeri megbetegedés megelőzésére és kezelésére is alkalmasak, beleértve a *Helicobacter pylori* fertőzést, vagy gyulladásos bélbetegségeket, mint a Crohn- szindróma [5].

A bélben élő mikroorganizmusok néhány tagja képes a fellépő karcinogenezis enzimtermelésének befolyásolására is. Ilyen enzimek például glükózidáz, azoreduktáz, nitroreduktáz, β -glükuronidáz, melyek a rákkeltő anyagok aktiválását végzik [5-6]. Humán vizsgálatok bizonyítják, hogy a *Lactobacillus acidophilus*, illetve a *Lactobacillus casei* jelentősen csökkenti az említett enzimek koncentrációját a bélrendszerben [6].

In-vivo és in-vitro vizsgálatok eredményei utalnak arra, hogy a *Lactobacillus acidophilus* baktériumok képesek az immunválasz befolyásolására, a pontos mechanizmus azonban egyelőre ismeretlen [7].

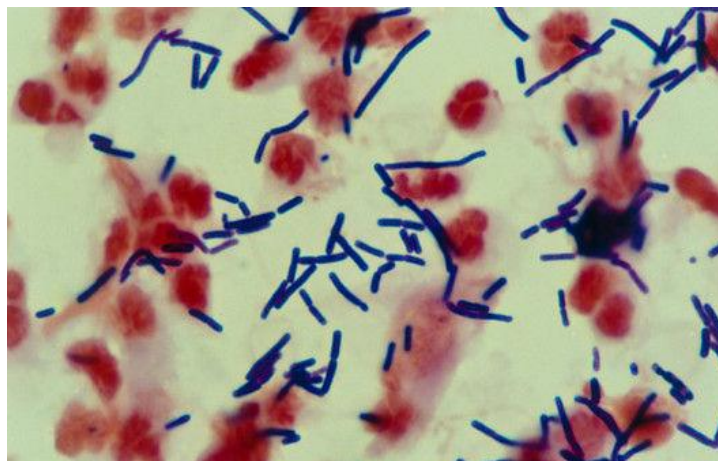
Tanulmányok bizonyítják, hogy a probiotikus baktériumok képesek módosítani az egyes immunparamétereket, beleértve a humorális, sejtes, illetve nem- specifikus immunitást [8-10]. Állandó alkalmazása hatásosan kezeli a húgyúti fertőzéseket, az allergiát. A rákos megbetegedések elleni pozitív hatása is ismert [11]. Mindemellett fontos szerepük van a hüvelyi traktus betegségeinek gyógyításában is. Helyi alkalmazása a probiotikus *Lactobacillus* fajoknak csökkenti a húgyúti fertőzések, bakteriális vaginosis és a *Candida* fertőzés kialakulásának valószínűségét [11-12].

Számos előnyös tulajdonságuknak köszönhetően napjainkban a probiotikumokat számos formában alkalmazzák. Gyakran vannak jelen élelmiszereinkben, joghurtban, fermentált tejben, fagylaltban, sajtokban, tápszerekben, emellett patikákban kapszula és tabletta formájában is beszerezhetők.

Formulálásukat és alkalmazásukat azonban nagyban megnehezíti, hogy stabilitásuk nem mindig megfelelő, igen érzékenyek a fizikai és kémiai paraméterek változásaira.

2.2 *Lactobacillus acidophilus*

A *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus* törzs egyik tagja, spórátlan Gram pozitív, pálcika alakú baktérium. Fontos részét képezi az emberi bakteriális flórának. Megtalálható a szájon, gyomor-, bélrendszeri traktusban illetve a női hüvelyi traktusban [13-15]. A *Lactobacillus* fajok legnagyobb része anaerob fermentáló mikroorganizmus, melyek az oxigént nem hasznosítják, de tolerálják jelenlétét. Ezek az organizmusok mind aerob, mind anaerob körülmények között képesek a tápanyagokat hasznosítani (aerob légzés, erjesztés). Fő anyagcsere termékük a tejsav. A *Lactobacillus* fajokat, így a *Lactobacillus acidophilus*-t is védő mikroorganizmusként tartják számon, tejsav és egyéb más metabolitok (pl.: hidrogén-peroxid, bakteriocinok) termelésével gátolják a patogén mikroorganizmusok elszaporodását [16].



1. ábra: *Lactobacillus acidophilus* hüvelyi kenete
(forrás: www.sciencephoto.com/media/294642/enlarge)

2.2.1 Bakteriális vaginosis

A bakteriális vaginosis (BV) egy gyakori nőgyógyászati megbetegedés, mely az egészséges hüvelyflóra egyensúlyának felborulásával jár. Tünetei közt szerepel az állandó hüvelyi irritáció és kellemetlen szagú hüvelyváladék [17].

Sok esetben a kismedence gyulladásával járhat együtt, ami fertőzés esetén nőgyógyászati műtétet [18], terhes nők esetén pedig koraszüléshez vezethet [19].

A bakteriális vaginosis növeli az immunhiány okozta vírusfertőzések kialakulását [20-21]. A nők 25%-a folyamatosan érintett, és negyedüknél a tünetek is jelentkeznek. Fontos közegészségügyi problémának tekinthető, az USA-ban évente több mint 10 millió beteget regisztrálnak [22].

A betegség kezelése hagyományosan antibiotikumokkal, metronidazollal illetve clindamycinnel történt, ami gyakran csak tüneti kezelést biztosított, a kezelés végeztével a betegség kiújult [23]. A vizsgálatok azt mutatják, hogy a helyi kezelések (metronidazol gél, clindamycin krém) csak 36%, illetve 55%-ban voltak hatásosak, míg az orális készítmények esetén ez az arány 66%, illetve 85%, de ebben az esetben is a páciensek 30%-ánál 3 hónapon belül, 50%-nál pedig 6 hónapon belül kiújultak a tünetek [24]. Amellett, hogy ezek a készítmények nem nyújtanak hosszú távú megoldást, a páciensek körében növekvő ellenérzés tapasztalható az antibiotikumokkal szemben, ezen kívül egyre gyorsabban nő az antibiotikum rezisztens törzsek száma. Ezen okok miatt a BV kezelésére alternatív terápiás lehetőségeket fejlesztettek.

Egyértelművé vált, hogy a normál hüvelyi flórához képest - mely főleg *Lactobacillus* törzseket tartalmaz - egy vaginosisal fertőzött nő hüvelyében kisebb számban vannak jelen a jótékony baktériumtörzsek, míg bizonyos patogén mikroorganizmusok, mint a *Gardnerella vaginalis* és a *Mycoplasma hominis* elszaporodnak a hüvelyi traktusban.

A *Lactobacillus* törzsek képesek, megakadályozni a patogén mikroorganizmusok kolonizációját a hüvelyi flórában. Ez több úton is megvalósulhat, ilyen például a speciális kötődés az epithel sejtek felszínéhez kiszorítva ezzel a többi baktériumot, vagy az antimikrobiális aktivitással rendelkező anyagok termelése, mint a hidrogén-peroxid illetve bizonyos szerves savak (tejsav) [25- 26]. A hidrogén-peroxid azáltal, hogy gátolja a katalázt nem termelő mikroorganizmusok szaporodását, nagy előnyt jelent a *Lactobacillus* fajok számára. Baktericid hatását oxidáns aktivitásának köszönheti. A reaktív szabadgyökök, mint az OH-gyökök roncsolják a celluláris DNS-t [26].

A hüvelyi pH 3,5- 4,5 között változik [27]. Az epitheliumban glikogén, mint szubsztrát segítségével a *Lactobacillus* törzsek szerves savakat termelnek, így őrizve meg a hüvelyi 4,5 közeli pH értéket. Ez tehát egy rendkívül hatékony módszer a nyálkahártya védelmére [28].

Számos klinikai vizsgálat igazolja, hogy a *Lactobacillus acidophilus* közvetlen helyi alkalmazása jelentősen növeli a hüvelyi *Lactobacillus* fajok számát [29].

Helyreállítja normál hüvelyi flórát, ezáltal hatékony terápiás módszernek bizonyul a bakteriális vaginosis kezelésében. A baktériumok hüvelybeli elterjedését két tényező befolyásolja: a bevitel módja és a baktériumok adhézioja a hüvelyhámhoz. A *Lactobacillus* fajok közül a *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus brevis*, és a *Lactobacillus acidophilus* hüvelyhámhoz való kötődése a legjobb, ezért ezeket a fajokat alkalmazzák a legelterjedtebben [28].

2.2.2 Beviteli módok

A baktériumok bevitelére számos formában van lehetőség. Egyes publikációk beszámolnak orális beviteli módokról, mely esetben azonban 1-2 hónap szükséges a hüvely flóra helyreállításához, míg helyi kezelés esetében ehhez néhány nap elegendő [30-31].

Helyi hatású készítmények számos különböző formában találhatók a piacon, ezek lehetnek krémek, gélek, kúpok, tamponok, betétek, tabletták, kapszulák és spray-k. Ezek adagonként 10^7 - 10^9 db baktériumot tartalmaznak. Az IDF (International Dairy Federation) ajánlása alapján a hatásos dózis minimum 10 millió aktív baktériumot jelent.

A nem szilárd készítmények előnye, hogy a baktériumok már a kezelés pillanatában nagyobb felületen oszlanak el, ezzel elősegítve a kezelés hatásosságát.

Hátrányok között említik, hogy a baktériumok jóval kevesebb ideig őrzik meg aktivitásukat folyékony formulában, mint szilárdban, és hogy alkalmazásuk nem praktikus. Egy lehetséges megoldás, hogy a baktériumot szilárd formában csomagolva a páciens közvetlenül az alkalmazás előtt oldja föl a vivőanyagban, így elkerülhető a folyadék halmazállapotbeli aktivitáscsökkenés.

A leggyakrabban azonban a bakteriális vaginitis probiotikus kezelését szilárd készítményekkel valósítják meg. Ezen tabletták és kapszulák könnyen alkalmazhatók, és számos tanulmány mutatja, hogy a kezelési időtartam elteltével (4-8 hét) lényegesen nagyobb arányban szüntette meg a páciensek panaszait, mint a hagyományos antibiotikumos kezelések.

Egy szintén szilárd formájú baktériumot tartalmazó készítmény a Lactobacillus törzseket tartalmazó úgynevezett probiotikus tampon. Ennek előnye, hogy a menstruációs időszakban is (amikor más formulák alkalmazása nem javasolt) alkalmazható, így ebben a fertőzésveszélyes időszakban is kezelhető, megelőzhető a BV.

2.3 Baktériumok hosszú távú stabilizálása

A különböző baktériumtörzsek hosszú távú eltarthatóságát régóta szárítással biztosítják. Emellett az élelmiszer- és a gyógyszeripar is előnyben részesíti ezeket az eljárásokat, nagyobb mennyiségű gyártás esetében.

A széleskörű alkalmazás azonban nem jelenti azt, hogy létezne általános szárítási technológia, számos különböző megvalósítás létezik, az adott célnak megfelelően.

Mivel a sejtek aktivitása a szilárd formában nem csak a szárítási technológiától függ, a hatékony formuláláshoz elengedhetetlen a szárítás előtti és az azt követő lépések ismerete (2. ábra).



2. ábra: Szilárd formulálás lépései

Nagyobb mennyiségű, illetve megfelelően tömény baktérium szuszpenzió fermentációs előállítására alapvetően befolyásolja a későbbi stabilitást. A baktériumok szaporodása négy, jól elkülöníthető fázisra osztható. A lag (vagy látens) fázisban csak kicsi a számbeli növekedés, mivel a baktériumok vizet vesznek fel, és riboszómális RNS-t, majd ezt követően enzimeket szintetizálnak, az új feltételekhez alkalmazkodva. A fázis hossza attól függ, hogy a vizsgálat előtt a baktérium tenyésztéséhez milyen táptalajt használtak, és a sejtek milyen fázisba jutottak.

A lag fázis végére az adaptálódott sejtek szaporodásnak indulnak, a sejtszám többszöröződik, a növekedés exponenciálissá válik. Ebben a fázisban becsülhetjük meg a maximális növekedési rátát.

Az idő előrehaladtával a populáció növekszik, és belép a stacionárius fázisba, ahol a sejtszám már gyakorlatilag nem változik, a szaporodás leáll (tipikusan valamelyik tápanyag elfogyása vagy metabolitok feldúsulása miatt). A regressziós (vagy pusztulási) fázis akkor következik be, amikor a baktériumok pusztulásának rátája meghaladja a keletkezésük rátáját, számuk exponenciális kinetika szerint csökken.

Az, hogy a szárítás mely fázisban lévő fermentumból optimális az egyes fajok esetében különbözik, azonban általában a stacionárius fázis a legmegfelelőbb, mivel a tápanyagok kimerülésére a sejtek különböző védekező mechanizmusokkal válaszolnak, így kevésbé lesznek érzékenyek a szárítási folyamatra, valamint hosszabb ideig őrzik meg aktivitásukat [32].

A megfelelő fázis kiválasztása mellett a baktériumok túlélésére a tápleves összetétele is jelentős hatással van.

Stabilizáló segédanyagként alkalmaznak különböző poliolokat, aminosavakat, illetve egyéb aminoszármazékokat (pl.: betain), melyeket a sejtek képesek nagy mennyiségben tárolni. Szerepük, hogy a szárítás során jelentkező ozmotikus stresszt csökkentsék, segítsenek fenntartani a megnövekedett koncentrációjú, sejten kívüli és az intracelluláris tér közötti ozmotikus egyensúlyt [33]. Egyes baktériumok esetében vizsgálták, hogy csökkentett pH-n történő fermentációnak van-e hatása a baktériumok toleranciájára a szárítás és a rehidratáció során. Számos tanulmány vizsgálja, hogy a különböző cukrok jelenléte a táplevesben milyen mértékben teszi ellenállóvá a különböző baktériumokat a szárítás és a hosszú-távú tárolás során. Kimutatható, hogy a trehalóz és/vagy a szacharóz jelenléte a fermentáció során (és nem közvetlenül a szárítást megelőzően alkalmazva) nagymértékben javítja a baktériumok tűrőképességét. Ennek oka, hogy a baktériumoknak így van idejük felhalmozni a cukrot a citoplazmában, ami képes stabilizálni a sejtmembránt a szárítás során [34]. Ezek a cukrok hidrogénkötésekkel stabilizálják a fehérjéket, melyek így képesek megőrizni negyedleges szerkezetüket víz hiányában is [35].

Megállapítható, hogy ennek hatására megváltozik a sejtmembrán zsírsav összetétele, valamint a sejt savas környezetre kevésbé érzékeny proteinek termel, ami ellenállóbbá teszi a baktériumot [36].

Mivel a fagyasztva szárítás széles körben elterjedt szárítási technológia, a szakirodalom kiemelten foglalkozik a fagyasztás denaturáló hatását enyhítő segédanyagokkal, melyek hasznosak lehetnek akkor is, ha más technológiával szárított baktériumokat fagyasztva tároljuk. Az úgy nevezett krioprotektív anyagokat két csoportra oszthatjuk. Az amorfizáló anyagok alkalmazásával elkerülhető az éles kristályok sejtfalkárosító hatása, mely a leginkább felelős a fagyasztás során tapasztalható halálozásnak [37]. A másik csoportba az eutektikus sók tartoznak. A fagyáspont elérésekor jégkristályok keletkeznek, a sók pedig oldatban maradnak a sejtek körül koncentrálnodva, ami jelentős károsodást okozhat a sejtmembránon. Az eutektikus sók alkalmazásával ez a hatás elkerülhető [38].

A szárított kultúrák hosszú távú eltarthatósága széles körű felhasználhatóságot jelent az ipar számára. Számos előnnyel rendelkeznek a folyékony kultúrákkal szemben, mint a könnyebb szállíthatóság illetve a jobb minőség ellenőrzés. A szilárd formula létrehozására számos módszer létezik. A leggyakrabban alkalmazott technológiák között említhetjük a fagyasztva szárítást, a porlasztva szárítást illetve a fluid ágyas szárítást.

A fagyasztva szárítás a mikrobiológiai ipar leginkább alkalmazott szárítási módszere, azonban a folyamat során mégis sok sejt veszíti el életképességét.

A technológia során maga a fagyasztás, különösképpen a mélyfagyasztás rontja a sejtek életképességét. Lassú fagyasztás során olyan jégkristály struktúrák keletkeznek, amelyek a szárított termék aktivitását jelentősen leronthatják. A képződő nagy kristályok károsítják az érzékeny sejtmembránt, amely a kiszáradás után már nem javítható, így jelentősen lecsökken az életképes sejtek száma [39]. A liofilizálás legnagyobb hátránya azonban a gazdaságtalan működés. Rendkívül idő- és energiaigényes technológia, valamint a szinte végtelen mennyiségű paraméter miatt nehezen tervezhető, hosszú és fáradságos a termelés beindítása.

Egy másik szárítási technológia, amely leginkább a tejiparban alkalmaznak, a porlasztva szárítás. Fontos előnye, hogy a fagyasztva szárításhoz képest kisebb költségek mellett nagy mennyiségek előállítása válik lehetségessé. Bizonyos törzsek (pl.: *Lactobacillus paracasei* NFBC 338) esetén sikerült 100%-os túlélést létrehozni 1 hét után 4°C illetve 15°C-on tárolva, annak ellenére, hogy a szárítás során igen magas a hőmérsékleti és mechanikai stressz. Azonban 4 hét után vizsgálva már 20-80%-os aktivitásvesztés volt tapasztalható mindkét hőmérsékleten [41,39]. Egy másik kísérlet azt mutatta, hogy 3 különböző porlasztva szárított törzsből 1 hónapos tárolás után mindössze 1 törzs maradt életképes [40].

Fluid ágyas szárítás esetén folyadékok szárítása nem lehetséges, csak szilárd szemcsés anyagoké ebben az esetben tehát a baktérium szuszpenziót előzetesen vízmegkötő anyaggal kell elkeverni, vagy szilárd hordozóra kell porlasztani [41].

Előnye, hogy igen gyors szárítást tesz lehetővé, és a szárítási hőmérséklet nem haladja meg a 30-40°C-t. Egy bizonyos baktérium törzs fluid ágyas szárítása után 30 napig 100%-os túlélést tapasztaltak, azonban ez az érték 60 nap után vizsgálva jelentősen, 40%-ra csökkent [42]. Tehát a hosszú távú stabilitás szempontjából ez a technológia sem mutatkozik megfelelőnek.

A szárítási lépés után a következő fontos feladat, hogy biztosítsuk a szilárd végtermék hosszú távú stabilitását. A főbb paraméterek, melyek változtatásával vizsgálható az előállított szilárd formájú baktériumok optimális tárolása: a hőmérséklet, nedvességtartalom, oxigén jelenlét illetve egyes esetekben a fényviszonyok. Kiemelt fontosságú a szárított termék aktivitására nézve a megfelelő tárolási hőmérséklet kiválasztása.

Magasabb hőmérsékleten (37°C) tárolt kultúrák esetében, jelentős csíraszám csökkenés a jellemző, míg alacsonyabb hőfokon (7°C) az aktivitásvesztés csak hosszabb idő elteltével következik be [43]. A sejtek életképességének csökkenése magasabb hőmérsékleten az esszenciális makromolekulák (lipidek, fehérjék) természetes degradációs mechanizmusaival magyarázható.

A termék nedvességtartalma is fontos szerepet játszik a mikroorganizmusok eltarthatósága szempontjából. Vizsgálatok mutatják, hogy a magasabb nedvességtartalom rontja, míg az alacsonyabb jelentősen javíthatja a sejtek életképességét [44].

A szilárd formulálás során az utolsó kritikus lépés a sejtek rehidratálása. A rehidratáció során könnyen előfordulhat a citoplazma membrán sérülése, ezáltal a celluláris tartalom szivárgása, ami következésképpen a sejtek magasabb mortalitását okozhatja. A folyamat során a sejteket először magasabb nedvességtartalomnak teszik ki (6-7 nap), hogy hozzászokjanak a fokozott víz aktivitáshoz, majd a végén ezt a nedvesített terméket fogják teljesen feloldani. Tehát fontos, hogy minél lassabban végezzük el ezt a lépést, hogy a baktériumok aktivitását megőrizzük. Azonban pont ez a lépés teszi baktériumok feloldását rendkívül gazdaságtalanná. Egy másik kritikus paraméter a rehidratációs közeg hőmérséklete. A túlságosan meleg vagy hideg közegek egyaránt hátrányosnak bizonyulnak a rehidratáció során. Kísérletek kimutatták, hogy az optimális hőmérséklet 20-30°C körül van [45].

Elmondható tehát, hogy a szilárd formulálás által növelhető a sejtenyészet stabilitása, életképessége, azonban a hatékonyságot mind a szárítás, mind a rehidratáció során számos paraméter befolyásolja, ezért a folyamat megtervezése nagy körültekintést igényel.

Fontos, hogy a körülményekhez legmegfelelőbb és legkíméletesebb szárítási technológiát alkalmazzuk [41].

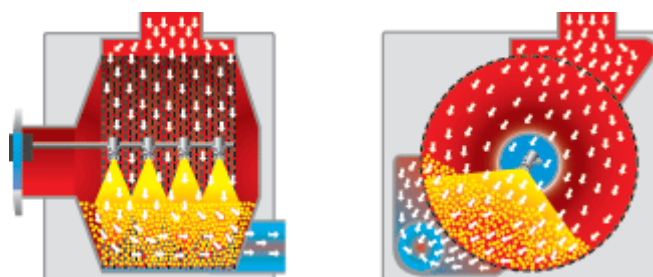
2.4 Alternatív szárítási technológiák

2.4.1 Filmbevonás

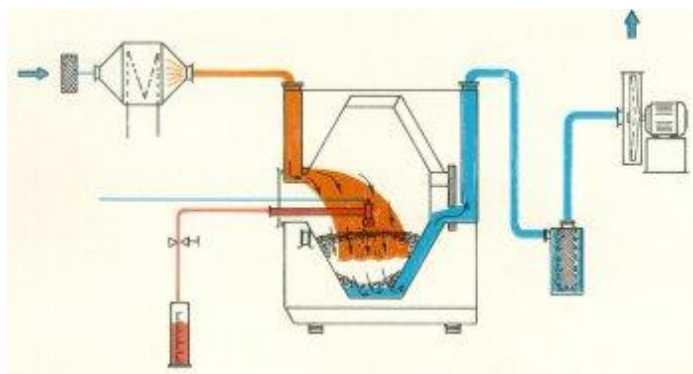
Munkám során *Lactobacillus acidophilus* tartalmú filmbevonott tablettákat állítottam elő. A gyógyszer-tabletták egyre nagyobb hányada filmbevonattal felületmódosított formában kerül forgalomba. A bevonás több célt szolgál: elfedi a kellemetlen ízt, illetve szagot, tetszetősebb külsőt ad, megkönnyíti az orális alkalmazást, javítja a hatóanyagok stabilitását fényre, levegőre, nedvességre érzékeny anyagok esetén; ha szükséges, megvédi a hatóanyagot a gyomornedv savas behatásától, és kívánt esetben nyújtott, illetve késleltetett hatóanyag-leadást biztosíthat. Az azonnali hatóanyag-leadású készítmények esetén a jól alkalmazható filmbevonatnak kellő védelmet kell nyújtania a külső behatásokkal szemben, de ugyanakkor gyorsan kell oldódnia a gyomorban, illetve a bélben.

2.4.1.1 Filmbevonó berendezés

A gyógyszeriparban a tabletták bevonására legelterjedtebben használt berendezések a perforált üstös bevonók. Ezeknél a bevonó berendezéseknél a meleg levegő befúvatását illetve elszívását az üst falán illetve a magágyon keresztül végzik. Ez a megoldás elősegíti a száradást, csökkentve ezzel a bevonási időt. A levegő áramlási profilt és a bevonó berendezés működési vázlatát a 3. illetve az 4. ábrák szemléltetik.



3. ábra: Levegőáramlási séma perforált falú üst esetén



4. ábra: A bevonóberendezés működési sémája

A filmbevonás minőségét több paraméter együttes hatása határozza meg. Fontos, hogy a porlasztófej helyzete az üstben olyan legyen, hogy a permet a lehető legnagyobb felületen érje a tablettákat, de ne jusson az üst falára. Optimális esetben a porlasztott folyadék cseppmérete kicsi, és a permetkúp szabályos. Az üst belsejében lévő nyomásnak alacsonyabbnak kell lennie, mint a környezetéé, hogy beszívja a porlasztott cseppeket a tabletták rétegébe. A bevonás szempontjából meghatározó még az üst forgási sebessége, a porlasztási sebesség (ml/perc), a szárító levegő belépési és kilépési hőmérséklete, a szárító levegő térfogatsebessége, a befűjt és elszívott levegő mennyisége [46-49].

2.4.1.2 Biotechnológiai alkalmazás

Napjainkban, a gyógyszeriparban a tabletták bevonását szinte teljes mértékben filmbevonással végzik. A technológiával akár baktériumok szilárd formulálása is lehetségessé válhat, ami az ipar számára is vonzó lehetőség lehet. Így akár egy lépésben is előállítható élő baktériumtartalmú tabletták, ami előrelépést jelentene a hagyományos, préseléssel előállított probiotikus tablettákhoz képest.

Hagyományos esetben tehát először elő kell állítani a tablettákat, amihez ~5-25 kN erővel préselik össze a baktériumokat is tartalmazó granulátumot. Ez komoly mechanikai stresszt jelent. Vizsgálták a préselés hatását baktériumok túlélésére. A tabletták direkt préselése során fellépő préselő káros hatást gyakorolt a baktériumok aktivitására, a művelet során majdnem két nagyságrendnyi csökkenés mutatkozott a csíraszámokban [50]. Az így kapott végterméket savrezisztens bevonattal látták el (15 m/m %), és azt tapasztalták, hogy a bevonás során a csíraszám nem változott [50].

Emellett fluidizációs berendezésben szilárd hordozóra porlasztott baktérium szuszpenzió esetében a megfelelő körülmények mellett 100%-os túlélést tudtak elérni [41], ahol viszont tabletta gyógyszerforma kialakításához préselésre van szükség, ami rendszerint csíraszám csökkenést okoz.

Mindezek alapján probiotikus tabletta gyógyszerforma kialakítására, a technológia során alacsony sejt elhalás elérése mellett, hatékony megoldásnak ígérkezett a baktérium szuszpenzió felvitele tablettára filmbevonás technológiájával. Így a korábban kíméletesnek talált technológiával történik a szárítás, és nincs szükség a kapott szilárd anyag préselésére. Az így előállított tablettára akár egy második savrezisztens bevonó réteg is felvihető, és így orális alkalmazásnál biztosítható a gyomorsav elleni védelem. Munkám során placebo tabletták filmbevonását végeztem úgy, hogy a bevonóanyag *Lactobacillus acidophilus* baktériumokat is tartalmazott nagy számban. Vizsgáltam a mikroorganizmusok stabilitását különböző segédanyagok jelenléte mellett.

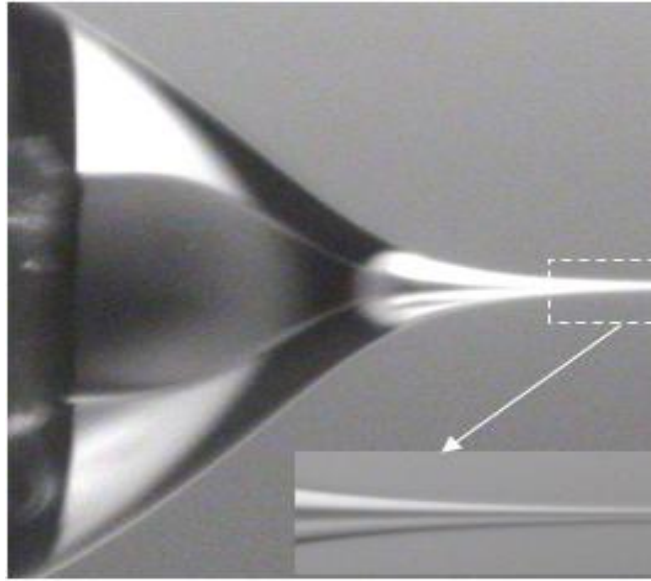
Későbbiekben felmerül annak a lehetősége is, hogy savrezisztens bevonat vizes szuszpenziójával együtt vigyük fel a baktériumokat, ami orális alkalmazás esetén a gyomorsav elleni védelmet is biztosíthatja.

2.4.2 Elektrosztatikus szálképzés

Az elektrosztatikus szálképzést napjainkban főleg a textil- és műanyagipar alkalmazza, félígáteresztő membránok, nanokompozitok, szűrők, védőbevonatok, védőruházatok készítésére [51].

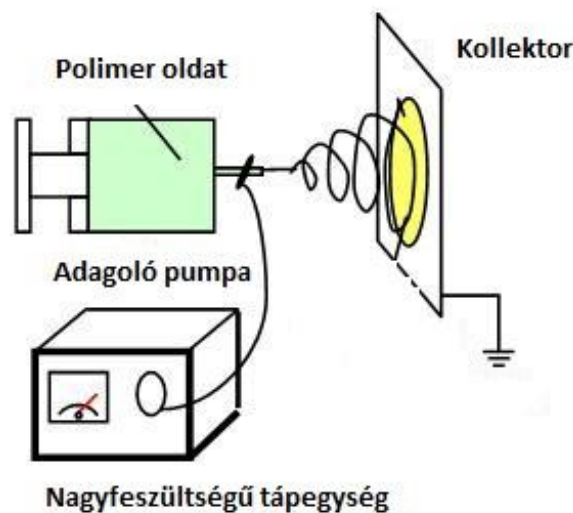
2.4.2.1 Működési elv

Az elektrosztatikus szálképzés elektromos erőter segítségével képez nanoszálakat. A berendezés egy kondenzátor, melynek fegyverzetei közé nagyfeszültséget kapcsolnak (10-40 kV). A szálképzésre alkalmas anyagot, polimer oldat cseppet az anódon helyezik el, ami feltöltődik, és az elektromos erőter hatására kúp alakot vesz fel. Amikor a Coulomb erő nagysága meghaladja folyadékcsepp felületi feszültségéből származó erőét a kúpból folyadéksugár lép ki, és spirális pályán indul a kollektor irányába. A jelenséget 1969-ben Taylor írta le, tiszteletére Taylor- kúpnak nevezték el [52]. (5. ábra)



5. ábra: Taylor kúp (forrás: <http://www.yflow.com/?q=node/3>)

A folyadéksugarak a két pólus közti részben megnyúlnak, elvékonyodnak, felületük megnő, ezzel párhuzamosan elpárolog az oldószer. A polimer megszilárdul, szál alakot vesz fel. A képződő szálak eltérő spirális pályáiknak megfelelően átfonják egymást.



6. ábra: Elektrosztatikus szálhúzó berendezés (forrás: ckpmac7.yz.yamagata-u.ac.jp)

2.4.2.2 Szálképzést befolyásoló paraméterek

Számos paraméter befolyásolja a szálhúzás geometriáját. Először Baumgarten kezdte vizsgálni, milyen hatással van a különböző paraméterek változtatása, a húzott szál szerkezetére. A változtatott paraméterek között szerepelt például a feszültség nagysága, a csepp és a kollektor távolsága, oldat felületi feszültsége, viszkozitása illetve vezetőképessége. Nagy sebességű kamerát alkalmazott, amivel meg tudta figyelni, ahogy a szál kirajzolódik egyetlen cseppből. Ezáltal azt is megfigyelte, hogy a szál átmérője egyenesen arányos a folyadék viszkozitásával. A koncentráció növelése a viszkozitás növekedésével jár, tehát vastagabb szálak keletkeznek. Hígítással az átmérő csökkenthető, túlzott hígítás elronthatja a szálképzést vagy dudoros szálak képződéséhez vezet [53-54].

Baumgarten azt is megfigyelte, hogy a szálátmérő az elektromos térerősség növelésével először elér egy minimumot, majd ha tovább nő a térerősség az átmérő is nőni fog. Baumgartner úttörő munkássága alapján Larrondo és Mandley képesek voltak szálakat húzni polietilén és polipropilén olvadékokból. Megfigyelték, hogy az olvadékból húzott szálak nagyobb átmérőjűek, mint az oldatból húzott szálak, és hogy a szálátmérő fordítottan arányos az olvadék hőmérsékletével. Ezután is számos kutatás foglalkozott a megfelelő gyártási paraméterek kiválasztásával [55].

A felületi feszültség csökkentésére, vezetőképesség növelésére különböző adalékanyagokat alkalmaznak az oldatban.

Fontos, hogy a megfelelő oldószert válasszuk ki. Alapvető, hogy oldja a polimert, másrészt időben elpárologjon a szálak megszilárdulása érdekében, ehhez az kell, hogy tenziója a megfelelő tartományba essen.

2.4.2.3 Elektrosztatikus szálképzés biotechnológiai alkalmazása és méretnövelhetősége

Az elektrosztatikus szálképzés hatékony és kíméletes szárítást tesz lehetővé, emiatt érdemes vizsgálni alkalmazhatóságát a biotechnológiai eredetű hatóanyagok feldolgozása során. A gyors szálképzés miatt a hirtelen megnövekedett felületről a víz elpárolog, és a kollektoron a polimer szilárd formában begyűjthető. A baktériumok és vírusok kezdetben diszpergálva vannak jelen az oldatban és nem orientáltak. Az elektrosztatikus szálképzés során azonban a pálcika alakú baktériumok, illetve más biohatóanyagok, a Taylor-kúpban lévő áramlás hatására orientálódnak a folyadéksugár irányában.

Így aztán a szálképzés során a mikroorganizmusokat körülveszi a polimer szál, (beágyazódnak a polimerbe) így nyújtva nagyobb védelmet a környezeti hatásokkal szemben [56].

Többféle mikroorganizmus beágyazását, illetve stabilitását is vizsgálták. Végeztek kísérleteket DNS-sel. Megfigyelték, hogy a plazmid DNS a szálból kioldódva is ép maradt, és képes volt a β -galaktozidáz enzim kódolására [57].

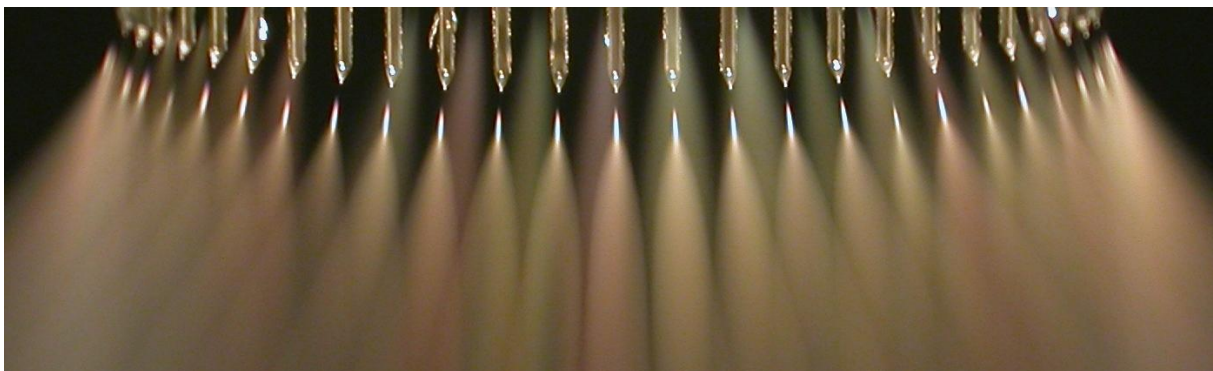
Egyes proteinek, enzimek illetve kis molekulák elektrosztatikus szálképzése is sikeresnek bizonyult [58].

További tanulmányok mutatják, hogy mind vírusok (T7, T4), mind baktériumok (*E.coli*; *Staphylococcus albus*) beágyazása is megvalósítható, ezek a szervezetek is életképesek maradnak [58].

Ezen kutatások azt bizonyítják, hogy az elektrosztatikus nanoszálképzéssel megvalósított beágyazás nagy valószínűséggel alkalmazható probiotikumok szárítására, szilárd formulálására, miközben az organizmusok megőrzik aktivitásukat, stabilitásukat.

További előnye az elektrosztatikus szálképzésnek, hogy méretnövelése már megoldott, a folyamatos gyártás ipari méretű megvalósításának lehetőségei is adóttak. Több technológia is létezik, ami képesnek bizonyult a méretnövelés megoldására.

A legegyszerűbb méretnövelési lehetőség a szórófejek megsokszorozása, amit számos ipari vállalatnál már alkalmaznak elsősorban szűrőbetétek gyártására (7. ábra).



7. ábra: Elektrosztatikus szálképzés méretnövelése sok szórófej alkalmazásával

A szórófej szám elérheti akár az 1000 db-ot is. Természetesen az elpárolgott oldószer elvitelét megfelelő levegőátvezetéssel biztosítani kell. A sok szórófejes megoldásnak az egyik nagy hátránya, hogy fejedugulás esetén, a többi fejen jön ki nagyobb mennyiségű anyag, ami zavart okozhat (pl. nem megfelelő száradás).

A fejedugulás sok esetben elkerülhető, ha minden fejhez külön pumpa tartozik, de ilyen nagyszámú külön pumpa ugyancsak hátrányokkal járna. Egy másik gyakran említett hátránya a sok szórófejes megoldásnak az igen nehézkes tisztíthatóság [60-61].

Egy másik elven alapuló méretnövelési lehetőséggel, a szabad folyadékfelszínről történő szálképzéssel a sok szórófejes esetben említett hátrányok (pl. fejedugulás, tisztíthatóság) nagyrészt kiküszöbölhetők, és egyben a nagy termelékenység is biztosítható [59]. A szabad folyadékfelszínen megfelelő görbületeket kell kialakítani ahhoz, hogy szálak tudjanak kilépni a felszínről.

Ennek az egyik megoldása, hogy a polimer oldatába gázt vezetnek, mely gáz buborékokat kelt, és a buborék felületén nagyszámú folyadék szál kiindulási hely tud kialakulni [62]. Ez ki tudja küszöbölni a sok szórófejes megoldás számos hibáját. A buborékos technológia egy továbbfejlesztett változata a golyós elektrosztatikus szálképzés (ball electrospinning) [63]. Itt a légbuborékok helyett szilárd „buborékokat”, azaz szilárd gömböket, golyókat használnak. Ezek felületére viszik fel az oldatot, valójában a golyók gördülése révén (8. ábra).



8. ábra: Gázbuborékos (baloldalon), golyós (középen) és forgó hengeres elektrosztatikus szálképzés (jobboldalon)

Szabad folyadékfelszínt használ a libereci egyetem kutatói által fejlesztett és szabadalmaztatott eljárás is [63]. Az ő megoldásuknál egy forgó elem, jellemzően henger merül egy kádban elhelyezkedő polimer oldatba, ami forgása révén saját felszínére felhordja az anyagot.

Ez a bemerülő, forgó elem funkcionál elektródként is, és így a felületére felvitt anyagból nagyszámú Taylor-kúp alakul ki, és azokból nagymennyiségű szál lép ki, és gyűjthető össze.

Ennek a megoldásnak a piacra vitelét egy cseh alapítású cég végzi (Elmarco). Napjainkban ez a legelterjedtebb méretnövelési technológia. Akár 1,6 méter hosszú hengerek is használhatók, és ezekből többet egymás után téve a termelés meghaladhatja a napi 10 kg-ot. Az így előállított anyagokat is elsősorban szűrők gyártására használják föl.

Az elektrosztatikus szálképzés tehát egy kíméletes, folytonos technológia, ahol könnyű kezelhetőség, alacsony költségek mellett állíthatunk elő légköri nyomáson, szobahőmérsékleten nano mérettartományú polimer szálakat.

3 Felhasznált anyagok, kísérleti módszerek

3.1 Felhasznált anyagok

3.1.1 *Lactobacillus acidophilus*

A *Lactobacillus acidophilus* (jelentése: savkedvelő tejbaktérium) egy, a *Lactobacillus* törzsbe tartozó, Gram pozitív, pálcika alakú baktérium (9. ábra). Optimális tenyésztése anaerob körülmények között, 37°C –on történik.

A Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti gyűjteményéből (MIMNG) két baktériumtörzs (a törzsszámaik: B1075, B2085) állt rendelkezésünkre, melyek között csak a baktérium hosszában volt különbség. A kísérletek során a rövidebb baktériumokat tartalmazó törzset alkalmaztam (B1075), abból a megfontolásból, hogy a szálképzés és a filmbevonás során fellépő a mechanikai stresszt a rövidebb típus jobban bírhatja.



9. ábra: *Lactobacillus acidophilus* (forrás: www.dairyscience.info)

3.1.2 MRS Agar

A baktériumokat a leoltások során MRS agar táptalajon tenyésztettem. A táptalajt a gyártó cég által megadott módon készítettem el. 66g MRS agart adtam 1 l desztillált vízhez, majd 10 perc kevertetés után 15 percre 121°C-os autoklávba helyeztem. Ezután 47°C-ra hűtöttem, és kémcsövekbe öntöttem. Később ezeket használtam fel ferde táptalajként, valamint lemezöntésnél is.

3.1.3 Anaerocult®

A lemezre öntés után a petri csészéket légmentesen zárható edénybe tettem. Az oxigén megkötésére a Merck® által gyártott Anaerocult® töltetet helyeztem az edénybe melyet az előírás szerint 30 ml desztillált vízzel nedvesítettem meg.

3.1.4 Polimerek

3.1.4.1 Polivinil-alkohol(PVA)

Összegképlet: $(C_2H_4O)_n$

Átlagos molekulatömeg: 130000 Da

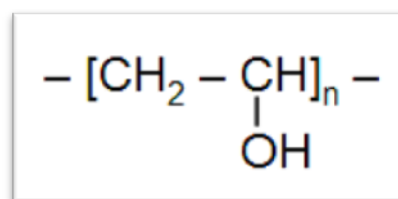
Megjelenése: fehér, granulátum

Üvegesedési hőmérséklet: 85°C

Olvadáspont: 230°C

Oldhatóság: vízben jól oldódik

A polimer gyógyszeripari alkalmazása engedélyezett.



3.1.5 Stabilitásjavító szerek

3.1.5.1 Trehalóz

Összegképlet: $C_{12}H_{22}O_{11}$

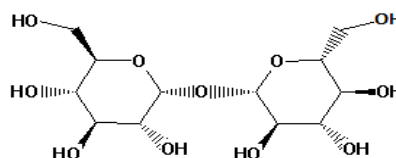
Molekulatömeg: 342 g/mol

Megjelenés: fehér, kristályos

Olvadáspont: 203°C (vízmentes)

Oldhatóság: vízben jól oldódik

Sűrűség: 0,6 g/cm³



3.1.5.2 Szacharóz

Összegképlet: $C_{12}H_{22}O_{11}$

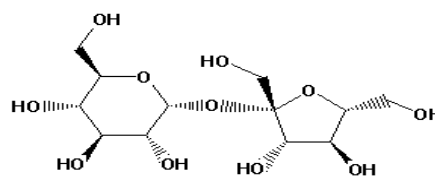
Molekulatömeg: 342 g/mol

Megjelenés: fehér, porszerű

Olvadáspont: 169 - 170°C

Oldhatóság: vízben jól oldódik

Sűrűség: 0,8 – 0,95 g/cm³



3.1.5.3 Sovány tejpor

Oldhatóság vízben: 700 g/l (20°C)

Sűrűség: 0,5 g/cm³

3.1.6 Tween® 80 (Polioxietilén- szorbitán- monooleát)

A kísérletek során minden alkalommal a polimer oldathoz 350-450 µl Tween-t adtam, attól függően, hogy milyen volt a kiinduló oldat összetétele. Alkalmazásának célja volt, hogy csökkentse az oldat felületi feszültségét, és ez által biztosítsa a hatékony szálképzést.

3.1.7 Placebo tabletta

A filmbevonás során 1 g-os placebo tablettákat használtam. A tabletták az alábbi összetevőkből készültek:

- 1000g Tablettose 80 (α -laktóz -monohidrát)
- 5 g Aerosil 200 (kolloid szilícium-dioxid)
- 5g magnézium –sztearát
- 250g Vivapur 102 (mikrokristályos cellulóz)

3.1.8 Opadry II clear

A filmbevonás során a Colorcon által gyártott Opadry II clear filmbevonószert alkalmaztam, mely hagyományos, vízben oldódó filmbevonatot ad. Az Opadry II clear komponensei: Polietilén-glikol (PEG), Polivinil-alkohol (PVA), talkum.

3.2 Felhasznált eszközök, mintakészítés

3.2.1 Elektrosztatikus szálhúzó berendezés

A baktériumok polimer oldatba történő beágyazását elektrosztatikus szálhúzó berendezés segítségével végeztem.

Az általam használt eszköz lényegében három fő részből áll: egy nagyfeszültségű tápegységből, az oldat bevezetéséből és egy kollektorból, ahol a szálakat összegyűjtöttem. Egy adagoló pumpa segítségével oldottam meg a polimer oldat adagolását, melyen nagy pontossággal (0,1 ml/h) beállítható a pumpa sebessége.

Az oldatot a fecskendőből egy szilikonszövön keresztül vezettem el, amelynek végére egy gumicsövet erősítettem. Kollektorként egy teflonborítású sík fémlapot alkalmaztam. A szálhúzás során alkalmazott tápegység egyenáramú, feszültsége 10 kV és 35 kV között változtatható. A feszültség mellett fontos paraméter a térerősség.

Ez legkönnyebben a feszültség mellett a folyadék és a kollektor távolságának változtatásával szabályozható. Az általam alkalmazott távolság kb. 12 cm volt.

Ezen elrendezés mellett, az elektrosztatikus szálhúzás folyamatos üzemben végezhető, 2-3 óra alatt megfelelő mennyiségű minta előállítása válik lehetővé.

3.2.2 Baktérium szuszpenzió készítése

A kiválasztott baktériumtörzset először leoltottam ferde táptalajra, majd 48 órás, 37°C- on történő tenyésztés után, további 10 ferde táptalajra oltottam át. Az átoltásokat a kiinduló törzs megőrzése érdekében többször ismételttem. A szükséges szuszpenziót úgy készítettem, hogy 3 ferde táptalajról a lehető legkevesebb vízzel lekapartam a baktériumokat, majd azt 250 ml MRS levesbe mostam. A levest 48 órán keresztül anaerob körülmények között, 37°C- on fermentáltuk. A fermentáció egy 750 ml-es Erlenmeyer lombikban történt. Ezt követően a levest centrifugáltam, hogy a lehető legtöményebb baktérium szuszpenziót kapjam. Az így kapott sűrű baktérium szuszpenzióhoz (3ml) először megfelelő arányban (trehalóz, szacharóz: 4%; sovány tejpor: 6%) hozzáadtam az egyes stabilitásjavító vegyületeket és így adagoltam a polimer oldathoz.

3.2.3 Filmbevonás

A baktériumokat 37°C-on történő fermentáció után centrifugáltam. A kapott szuszpenzióhoz hozzáadtam a stabilizáló szereket (sovány tejpor, trehalóz, szacharóz). Az előre elkészített bevonó oldathoz (40 g opadry II clear filmbevonószert oldottam 200 ml vízben, folyamatos kevertetés közben) hozzáadtam a baktérium szuszpenziót.

A Glatt típusú bevonó berendezésen először beállítottam az adagolási sebességet, beletöltöttem az üstbe 800 g placebo tablettát, és meleg levegő árammal előmelegítettem. Beállítottam a porlasztási nyomást (2,7 bar) és az üst fordulatszámát (5-ös). 40°C-os kilépő és 45°C -os belépő levegő hőmérséklet mellett elkezdtem a bevonó szuszpenzió porlasztását. Kezdetben alacsonyabb adagolási sebességet (5 g/perc) alkalmaztam, a bevonás alatt ezt 9 g/perc értékig növeltem. A filmbevonás alatt 5 percenként vizsgáltam a bevonószer fogyását és a tabletták felszínét. A filmbevonás 39 percig tartott, ekkor lemértem a tabletták össztömegét (834,2 g). A bevonás során több mint 4 %-os tömegnövekedést értem el. Ezután a maradék bevonó oldatból, a baktérium szuszpenzióból és 3 tablettából leoltást végeztem.

A kapott eredményeket hígítással korrigálva a törzsoldat 1 ml-ében lévő a csíraszámot kaptam (CFU/ml) (CFU: colony forming unit = csíraszám), ezután a törzsoldat térfogatával szorozva megkaptam az egy tablettában jelenlévő baktériumszámot (CFU/ tabletta).

3.2.4 Baktérium szuszpenzió beágyazása polimer nanoszálakba

A baktérium szuszpenziót (3 ml) automata pipettával az előzőleg elkészített polimer oldathoz mértem, hozzáadagoltam 350-450 μ l (a segédanyagok összetételétől függően) felületaktív anyagot (Tween®) és mágneses keverővel homogenizáltam. Ezután az etanollal átmosott fecskendővel felszívtam a keveréket. A fecskendőt az automata adagolóegységbe helyeztem és elindítottam az adagolást, melyet 1-1,5 ml/h-ra állítottam, attól függően, hogy mi szolgálta legjobban a szálképződést. Az első csepp megjelenésekor bekapcsoltam a nagyfeszültségű tápegységet, a feszültséget 25- 30 kV-ra állítottam. A folyamat végeztével (kb. 2-3 óra) 100-120 mg anyagot gyűjtöttem a stabilitásvizsgálat elvégzéséhez. A mintákat 7°C és -20°C-on tároltam.

3.2.5 Elektrosztatikus szálképzés méretnövelése

A méretnöveléses kísérletek során elsőként porlasztólevegővel segített szálképzést végeztünk. A kísérletek során, az egy szórófejes megoldásnál leírtakhoz hasonlóan készített fecskendőbe felszívott oldatból infúziós pumpával egy Schlick gyártmányú nagyfeszültségre kapcsolt (55 kV), két-fluidumos porlasztófej alkalmazásával képeztük a szálakat. A porlasztó levegő nyomásának értéke 0,75 bar volt. Az adagolási sebesség 15 ml/h volt.

A másik esetben egy a tanszéken újonnan fejlesztett elektrosztatikus szálképző berendezésen végeztük a méretnövelést, amely ötvözi a szabad folyadékfelszínes, illetve a szórófejes szálképzés előnyeit.

3.3 Vizsgálati módszerek

3.3.1 Baktérium telepek számlálása

A baktériumok számlálását minden lépés előtt és után is elvégeztem, hogy pontos képet kapjak a technológia hatásáról. Így tehát a centrifugált minta 1g-ját 9ml steril vízzel hígítottam (törzsoldat), és ebből készítettem hígítási sort.

Ugyanezt elvégeztem a polimer oldattal összekevert baktérium szuszpenzióval is, ami már a stabilitásjavítókat is tartalmazta. Az elektrosztatikus szálhúzással készített mintákból 3-5 mg-ot oldottam fel 9ml steril vízben, majd ebből készítettem el a hígítási sort. A hígítási sor megfelelő elemeit ezután lemezre öntöttem. Minden mintából 1ml-t pipettáztam a Petri csészékbe, majd ráöntöttem a kéz meleg MRS táptalajt.

A táptalaj megszilárdulása után a Petri csészéket fejjel lefelé (hogy a kondenzvíz, ne csepegjen vissza a táptalajra) légmentesen zárható tárolóba helyeztem és mellé raktam a megnedvesített anaerob töltetet (Anaerocult®). A Petri csészéket ezután 48 órára 37°C-os térbe helyeztük, az így kifejlődött telepeket nagyító alatt megszámláltam. Az eredményekből a hígítással korrigálva megállapítható, hogy a törzsoldat 1ml-ében mekkora volt a csíraszám (CFU/ml). Ez az eredmény ezután a törzsoldat térfogatával szorozva és a törzsoldatban feloldott minta tömegével osztva a minta mg-onkénti baktériumszámát adja (CFU/mg).

3.3.2 Kioldódás vizsgálat

Annak érdekében, hogy a baktériumok nanoszálakból való kioldódási idejét meg tudjam állapítani, először 100 mg szálhúzott terméket desztillált vízben oldottam. Ezután ebből 1 ml-t pipettáztam 1,2,3,5 és 10 percenként Petri csészékbe. A további lépések a fent említettekkel megegyező módon történtek.

4 Eredmények és értékelésük

4.1 *Lactobacillus acidophilus* baktérium formulálása filmbevonással

Napjainkban a gyógyszeriparban a tabletták bevonását szinte teljes mértékben filmbevonással végzik. Előnye, hogy kis energiaigényű, jól szabályozható folyamat, amellyel magas termelékenység érhető el. Munkám során azt vizsgáltam, hogy filmbevonással megvalósítható-e a baktériumok szilárd formulálása, ami több szempontból is vonzó lehet az ipar számára.

Ezzel az eljárással egy lépésben állíthatunk elő baktérium tartalmú tablettákat, ami nagy előrelépés a hagyományos baktériumtartalmú tabletták előállításához képest, ahol a szárításnál (лиофилизálás, porlasztva szárítás) jelentkező csíraszám csökkenést követően a tablettázásnál további aktivitáscsökkenés jelentkezik, aminek oka a mechanikai stressz és súrlódás miatt fellépő hőmérsékletnövekedés [50]. A másik, ipari szempontból jelentős előny, hogy a technológia általánosan alkalmazott, a gyártás bevezetéséhez nem szükséges új berendezés.

Amennyiben szükséges, úgy a filmbevonatban jelenlévő baktériumokat egy második védő bevonattal is elláthatjuk, attól függően, hogy milyen terápiás területen alkalmazzuk. Munkám során olyan filmbevonatot hoztam létre a tablettákon, amelyben jelen voltak a *Lactobacillus acidophilus* baktériumok, vizsgáltam, hogy a technológia milyen hatással volt aktivitásukra, és hogy a csíraszám milyen mértékben változott a tárolás során.

4.1.1 *Lactobacillus acidophilus* baktériumot tartalmazó filmbevonat kialakítása

A filmbevonást követően a tablettákból leoltást végeztem. Az eredmények alapján megállapítható volt, hogy a formulálás során milyen mértékben csökkent az aktív baktériumok száma, tehát hogy hány százalékos volt a túlélés.

1. táblázat: Filmbevonó tabletták baktérium tartalma

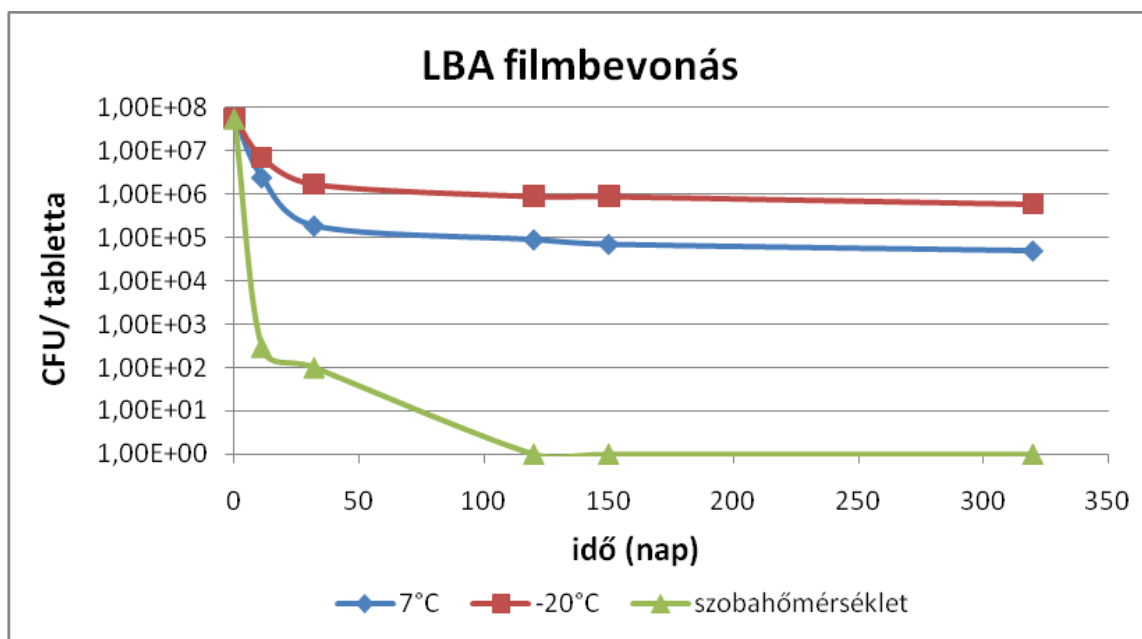
	Filmbevonó csíraszám CFU/ mg
A filmbevonó oldat baktériumtartalma a bevonás előtt (szárazanyag)	1,74E+07
A tablettán levő csíraszám a bevonat egy mg-jára vonatkoztatva	1,48E+06
Túlélés	8,49%

Az 1. táblázatban közölt eredmények alapján látható, hogy a folyamatot a kiindulási oldatban található baktériumok 8,49%-a élte túl. Mivel a tabletták tömegnövekedésének szórása alacsony volt, a számítás során úgy vettem, hogy a bevonás során a tabletták azonos mértékben lettek bevonva. A viszonylag alacsony túlélést okozhatja a 45°C-os szárító levegő és a porlasztófejnél fellépő mechanikai stressz. Ennek ellenére a filmbevonással előállított tabletták tartalmazták a hatásos dózisnak megfelelő számú baktériumot (10 millió élő baktérium).

Amennyiben töményebb szuszpenzióból indulunk ki, úgy a tabletták baktériumtartalma tovább növelhető. A túlélésen és az előállított formula baktériumtartalmán kívül fontos, hogy az aktív organizmusok száma hogyan változik az időben, mennyire stabil a készítmény. A stabilitásvizsgálat során tablettákat különböző hőmérsékleteken (szobahőmérséklet (20-25°C), 7°C, - 20°C) tároltam és a 2. táblázatban feltüntetett időközönként vizsgáltam a baktériumok túlélését.

2. táblázat: Filmbevonás stabilitásvizsgálatának eredményei

	0.nap (CFU/tabletta)	11. nap (CFU/tabletta)	32. nap (CFU/tabletta)	120. nap (CFU/tabletta)	150. nap (CFU/tabletta)	320. nap (CFU/tabletta)	Túlélés 320 nap után (%)
7°C	5,76E+07	2,49E+06	1,91E+05	9,18E+04	7,20E+04	5,10E+04	0,0885%
-20°C	5,76E+07	7,02E+06	1,71E+06	9,00E+05	9,00E+05	6,00E+05	1,0417%
szobahő	5,76E+07	3,00E+02	1,00E+02	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	0%



10. ábra: Különböző hőmérsékleteken tárolt, filmbevonott tabletták csíraszám változása az idő függvényében (szobahőmérséklet, 7°C, - 20°C)

A stabilitásvizsgálat eredményéből készített diagramon (10. ábra) jól látható, hogy a szobahőmérsékleten tárolt minták esetében a csíraszám csökkenés gyorsabban megy végbe, és 4 hónap elteltével a tabletták már nem tartalmaznak aktív baktériumot. Ez nem meglepő, hiszen a piacon levő a LBA-t tartalmazó készítményeket is hűtve kell tárolni. A hűtött minták csíraszám változása azt mutatja, hogy a csökkenés a 4. hónapig jelentős, ezt követően baktériumtartalom nem változik jelentősen. Látható, hogy a -20°C-on tárolt tabletták minden esetben több élő baktériumot tartalmaztak, mint a 7°C-on tároltak és az első hónaptól kezdve kialakul kb. egy nagyságrendnyi különbség a baktériumtartalomban, ami a közel 1 év után is megmarad.

A -20°C-os tárolás tehát előnyösebbnek bizonyult a stabilitás szempontjából, azonban 1 év elteltével a tabletták ezen a hőmérsékleten tárolva is csak a hatásos dózis 1%-át őrizték meg.

A megfelelő baktérium mennyiség hosszú távú biztosításához töményebb kiindulási szuszpenzió szükséges, vagy a csíraszám csökkenést kell lassítani. Munkám során ez utóbbi célt tűztem ki, az eredményeket a következő fejezetben tárgyalom.

4.1.2 Stabilitásjavítók alkalmazása a filmbevonás során

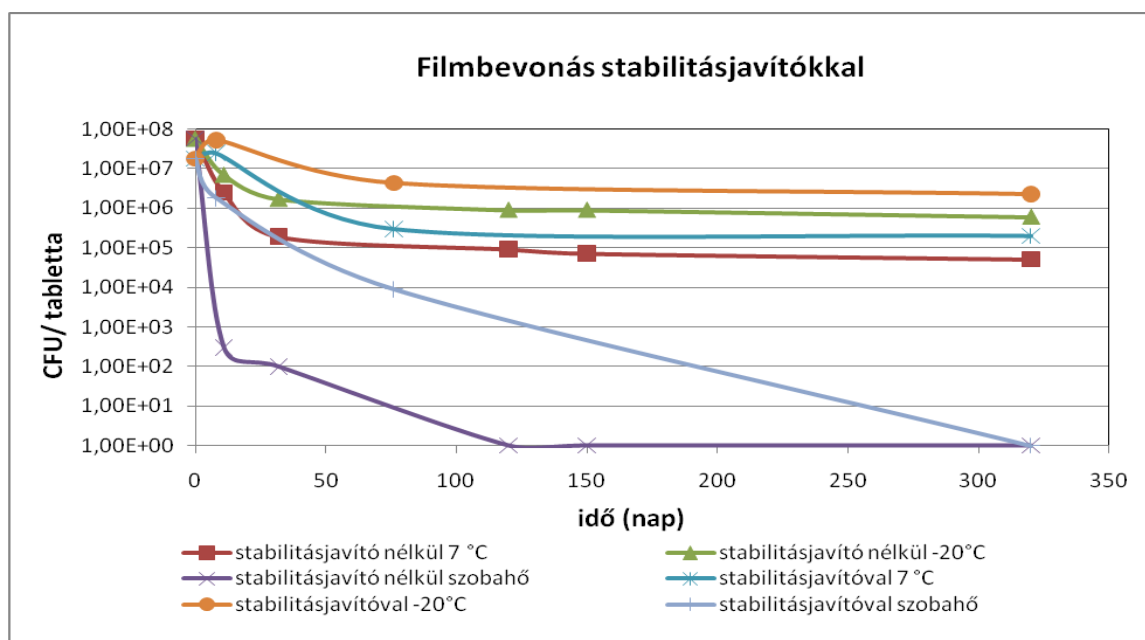
Az irodalmi részben említett stabilizáló szerek (szacharóz, trehalóz, sovány tejpor) közös alkalmazásával előállított filmbevont tabletták időbeli stabilitását vizsgáltam.

A 3. táblázat a kapott eredményeket mutatja, a diagramon összehasonlítóképp a stabilizáló nélküli filmbevonás eredményeit is feltüntettem.

3. táblázat: Stabilitásjavítók hatása a filmbevonás során

	0.nap (CFU/tabletta)	8. nap (CFU/tabletta)	76. nap (CFU/tabletta)	320. nap (CFU/tabletta)	Túlélés 320 nap után (%)
7°C	1,80E+07	2,49E+07	2,97E+05	1,98E+05	1,1%
-20°C	1,80E+07	5,31E+07	4,32E+06	2,24E+06	12,44%
szobahő	1,80E+07	1,80E+06	9,00E+03	1,00E+00	0%

Látható, hogy a stabilizáló szerek jelenléte nagymértékben megváltoztatta a korábban (stabilizáló szerek nélkül) tapasztalt 1 hetes csíraszám változást. Alkalmazásuk nélkül az első egy hétben csökkent a legnagyobb mértékben a baktériumtartalom.



11. ábra: Stabilitásjavítók hatása a filmbevonás során az idő függvényében

Stabilizáló szerek jelenlétében az első egy hétben a baktériumok kismértékű szaporodása volt tapasztalható 7 és -20°C-on, melynek következtében 1 hét után még mindig több mint 10 millió baktériumot tartalmaztak a filmbevonott tabletták. A szaporodás lehetséges oka, hogy a tabletták felületén, illetve a bevonatban kis mennyiségű víz volt jelen, így a tápanyag felvétele és ez által a szaporodás is lehetséges volt. A hűtött minták 2 hónap után kismértékű aktivitásvesztést szenvedtek, azonban ez után nem változott jelentősen a baktériumszám. A fagyasztott minták esetében még 1 év után is 12%-os túlélés mutatkozott.

A stabilizáló szerek pozitív hatását ezen kívül az is igazolja, hogy szobahőmérsékleten való tárolás során, 1 hét alatt kevésbé csökkent a csíraszám, mint a segédanyagok nélküli esetben. A szobahőmérsékleten tárolt minták 1 hét után 10%-os túlélést mutattak, ami jobbnak bizonyult a 7°C-on tárolt, stabilizálót nem tartalmazó minták 1 hetes túlélésénél.

A filmbevonás során stabil szilárd formulát hoztam létre, ami több mint tízmillió aktív baktériumot tartalmazott, stabilitásjavítók alkalmazásával pedig sikerült a baktériumok aktivitásvesztését csökkenteni, túlélésüket kb. tízszeresére javítani.

4.2 A *Lactobacillus acidophilus*sal végzett elektrosztatikus számképzési kísérletek eredményei

Munkám során azt vizsgáltam, hogy a gyógyszerformulálás területén újak számító elektrosztatikus nanoszámképzés valós alternatívája lehet-e a fagyasztva szárításnak. Amellett, hogy kíméletes szárítási technológia, folyamatos és alacsony energiaigényű, ami vonzóvá teszi az ipari alkalmazás szempontjából.

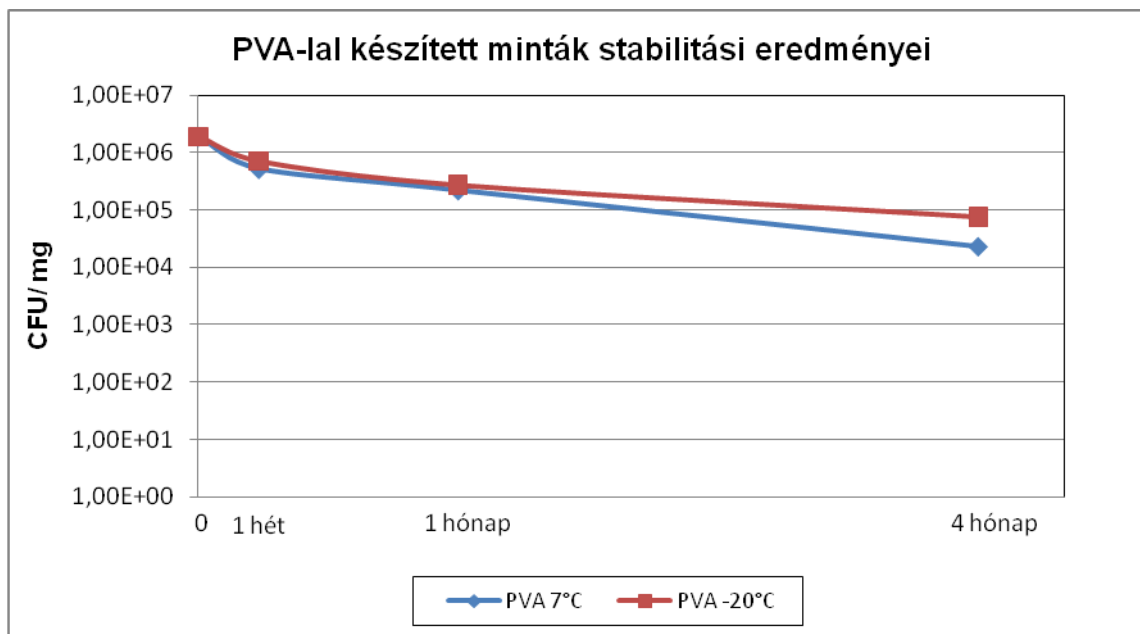
Vizsgáltam, hogy az általam alkalmazott eljárás segítségével létrehozható-e stabil szilárd formula, ami a hatásos dózishoz megfelelő élő csíraszámot tartalmazza, illetve, hogy a baktériumtartalom milyen mértékben változik az idő előrehaladtával.

4.2.1 Elektrosztatikus számképzéssel formulált LBA stabilitási eredményei

A polimerrel végzett (PVA) elektrosztatikus számképzési kísérletek során azt vizsgáltuk, hogy a technológia sikeresen alkalmazható-e LBA probiotikus baktériumok szilárd formulálására. Polivinil-alkohol polimer (PVA) esetében a számképzés során nagy mennyiségű baktériumot tartalmazó szilárd formát sikerült előállítani. A gyakorlati alkalmazhatóság igazolása érdekében további stabilitásvizsgálatok elvégzése volt szükséges. A következőkben a kapott eredményeket tárgyalom.

5. táblázat: Stabilitási eredmények PVA jelenlétében

	0.nap (CFU/mg)	7. nap (CFU/mg)	30. nap (CFU/mg)	120. nap (CFU/mg)	Túlélés (%)
PVA 7°C	1,90E+06	5,20E+05	2,20E+05	2,30E+04	1,2
PVA -20°C	1,90E+06	7,00E+05	2,70E+05	7,60E+04	4,0



12. ábra: PVA hatása a baktériumok stabilitására

A közölt eredményekből látszik, hogy ugyan sikerült előállítani megfelelő töménységű szilárd terméket, de a tárolás során a csíraszám gyors csökkenése volt jellemző.

4 hónap után vizsgálva 7°C-on már csak 1%-os, míg -20°C-on 4%-os túlélés mutatkozott, 1 év után pedig már nem maradt aktív baktérium a termékekben. A magas baktériumtartalom hosszú távú fenntartásának érdekében, vizsgáltam különböző stabilitásjavítók (trehalóz, szacharóz, sovány tejpor) alkalmazásának a lehetőségét.

4.2.2 Elektrosztatikus szálképzéssel készített minták stabilitásvizsgálata

A baktérium szuszpenzió beágyazását polimer oldatban végeztem (PVA), stabilizáló szerek jelenlétében.

A technológia kíméletességét, és a segédanyagok pozitív hatását mutatja, hogy a túlélés minden esetben közel 100%-os volt, ami azt jelenti, hogy a szobahőmérsékleten történő szálképzés és az ozmotikus viszonyok változásának esetleges negatív hatását ellensúlyozta a segédanyagok jelenléte.

A következőkben a stabilitásvizsgálati eredményeket tárgyalom a hozzáadott stabilizáló szer kombinációk szerint csoportosítva.

Az előállított mintákat két hőmérsékleten (7°C, -20°C) tároltam, mivel a korábbi kísérletek azt mutatták, hogy szobahőmérsékleten 1 hónap után a polimer szálak már nem tartalmaznak aktív baktériumot.

Az alábbi táblázat az összes kapott stabilitási eredményt foglalja össze (6. táblázat).

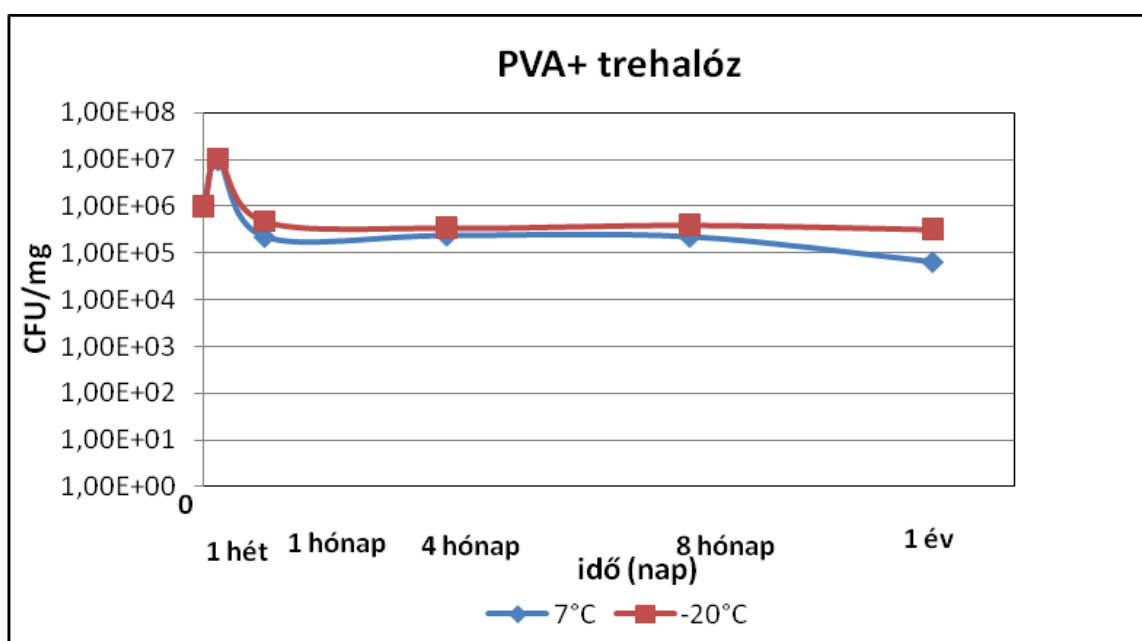
6. táblázat: Elektrosztatikus szálképzéssel készített minták stabilitási eredményei

	0. nap (CFU/mg)	1. hónap (CFU/mg)	4. hónap (CFU/mg)	8. hónap (CFU/mg)	1 év (CFU/mg)	Túlélés 1 év után (%)	10 millió baktériumot tartalmazó minta tömege (mg)
PVA 7°C	1,90E+06	5,20E+05	2,20E+05	0	0	0%	0
PVA -20°C	1,90E+06	7,00E+05	2,70E+05	2,20E+05	0	0%	0
PVA+trehalóz 7°C	1,01E+06	9,42E+06	2,35E+05	2,21E+05	6,34E+04	6%	157,7
PVA+trehalóz -20°C	1,01E+06	1,3E+07	3,45E+05	3,98E+05	3,2E+05	32%	31,25
PVA+ szacharóz 7°C	4,97E+06	5,27E+06	8,71E+05	7,43E+05	4,11E+05	8%	24,33
PVA+szacharóz -20°C	4,97E+06	1,02E+07	4,84E+06	4,71E+06	1,78E+06	36%	5,62
PVA+trehalóz+szacharóz 7°C	3,86E+06	6,34E+06	3,09E+06	-	6,53E+05	17%	15,31
PVA+trehalóz+szacharóz -20°C	3,86E+06	8,24E+06	5,30E+06	-	2,39E+06	62%	4,2
PVA+sovány tejpor 7°C	5,36E+06	1,56E+06	1,38E+05	1,01E+05	9,89E+04	2%	101,11
PVA+sovány tejpor -20°C	5,36E+06	2,63E+06	1,03E+06	2,03E+06	9,32E+05	17%	10,7
PVA+sovány tejpor+ trehalóz 7°C	3,21E+07	2,10E+07	9,89E+06	8,71E+06	4,14E+06	13%	2,42
PVA+sovány tejpor+ trehalóz -20°C	3,21E+07	3,86E+07	1,29E+06	1,22E+07	1,19E+07	37%	0,84
PVA+sovány tejpor+ szacharóz 7°C	3,43E+07	2,07E+07	8,6E+06	4,21E+06	3,94E+06	11%	2,5
PVA+sovány tejpor+ szacharóz -20°C	6,32E+07	3,26E+07	7,24E+07	2,36E+06	1,42E+07	41%	0,7
PVA+ Összes stabilitásjavító 7°C	3,02E+07	3,6E+07	1,32E+07	9,96E+07	8,5E+06	28%	1,18
PVA+ összes stabilitásjavító -20°C	3,02E+07	6,4E+07	2,95E+05	1,97E+07	2,79E+07	92%	0,3

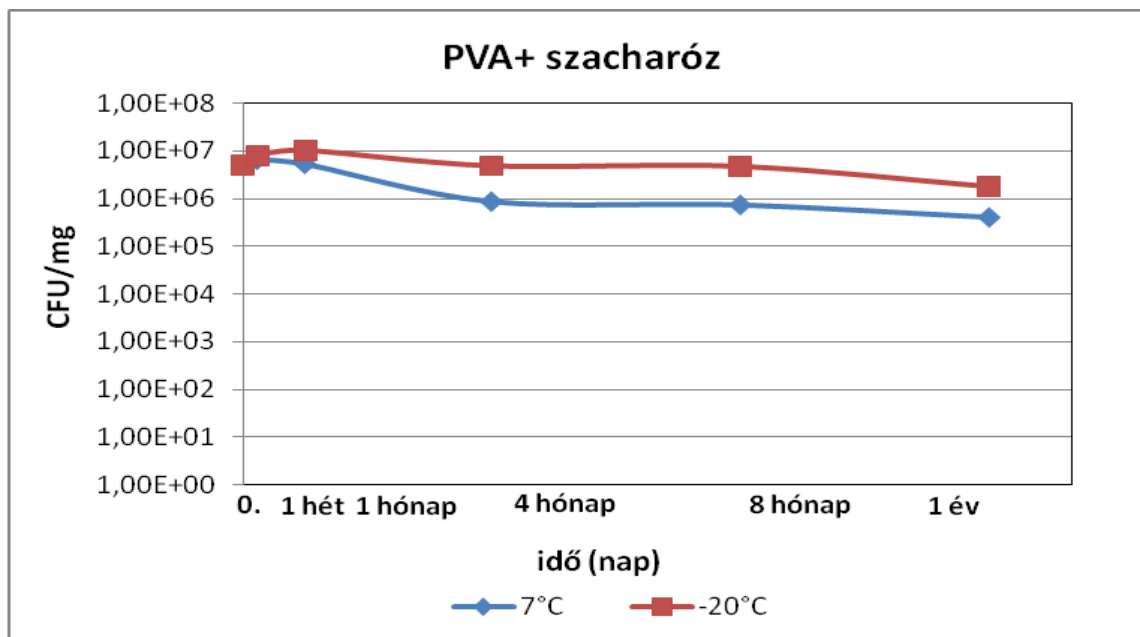
Látható, hogy az összes vizsgált stabilitásjavító kombináció esetében magasabb túlélést sikerült elérni, mint a stabilizáló szer nélküli esetekben. Az elektrosztatikus nanoszálképzés során az összes vizsgált esetben nagyszámú baktériumot tartalmazó végterméket hoztam létre, amelyek bizonyos esetben még 1 év után is jelentős mértékben megőrizték stabilitásukat. A következőkben a táblázatban közölt eredményeket részletesen tárgyalom.

4.2.2.1 Trehalóz, szacharóz alkalmazásának hatása a csíraszám változására

Az alábbi ábrák (13. - 14. ábra) a stabilitási eredményeket mutatják, trehalóz illetve szacharóz jelenlétében.



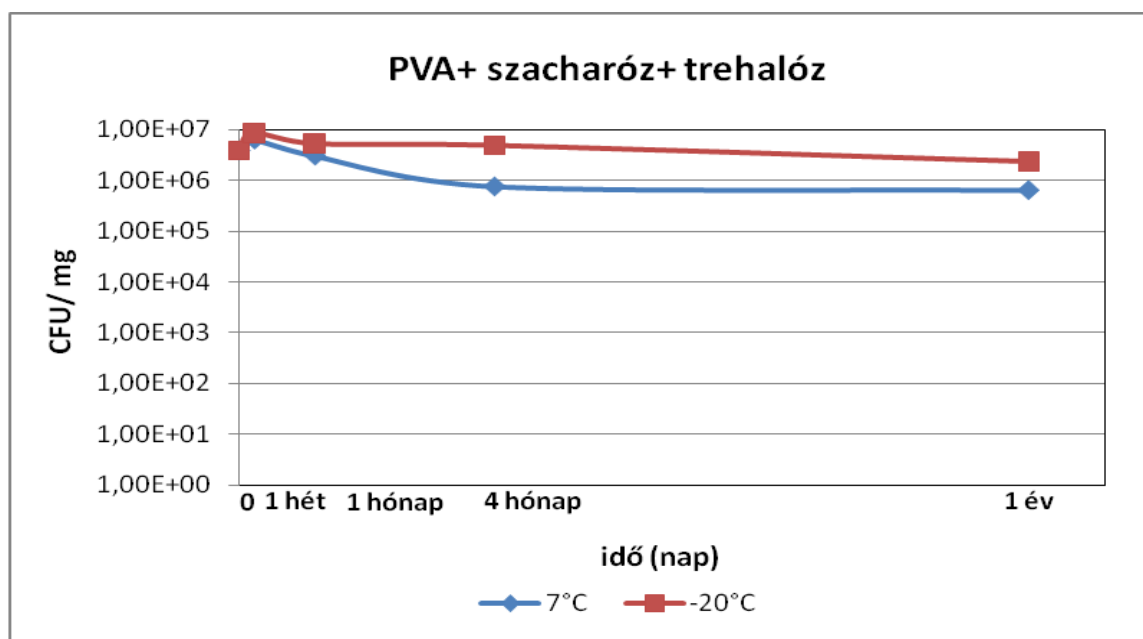
12. ábra: Trehalóz hatása a baktériumok stabilitására



14. ábra: Szacharóz hatása a baktériumok stabilitására

Az előállított minták közül a cukrok (trehalóz, szacharóz) egyedüli alkalmazásánál tapasztaltuk a legkisebb stabilitást, azonban már így jelentős javulás mutatkozott a stabilizáló szer nélküli eredményekhez képest. A trehalóz és szacharóz esetében is 1 hét után csíraszám növekedés volt tapasztalható. A szaporodás oka lehet, hogy a szálhúzott végtermékben kis mennyiségű víz volt jelen, ami lehetővé tette a tápanyagfelvételt és így a baktériumok szaporodását. Az eredményességet az is jól mutatja, hogy a fagyasztott minták esetében a túlélés 1 év után is 30 % körüli volt, míg a stabilizáló nélküli mintákban már nem volt élő baktérium.

A következő ábrán (15. ábra) a két cukor (trehalóz, szacharóz) közös alkalmazásának hatását vizsgálom.



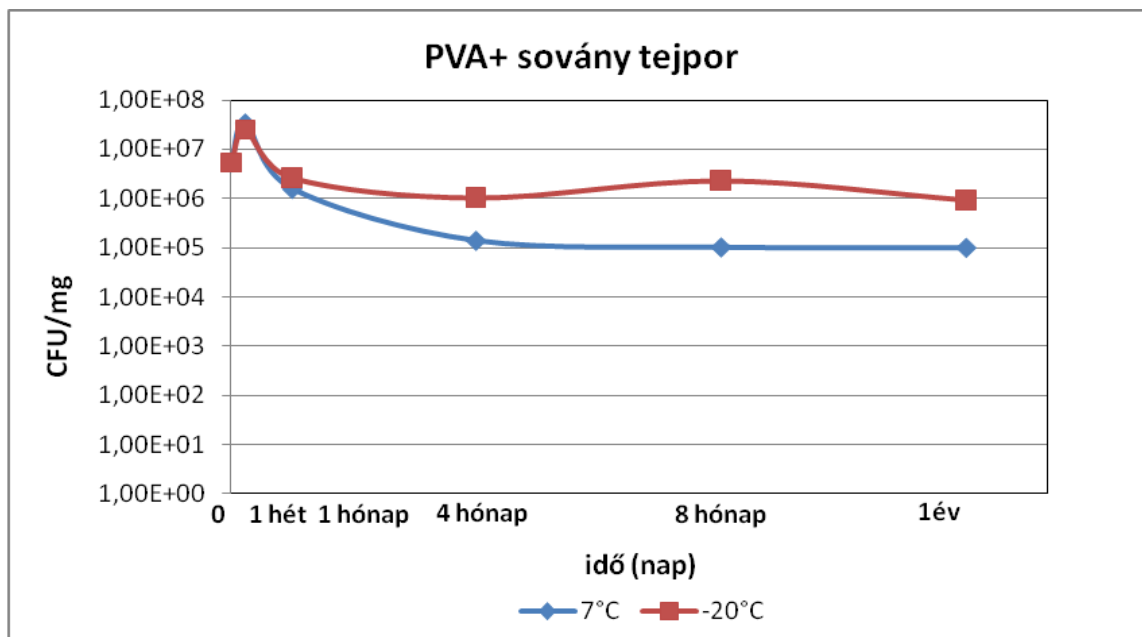
15. ábra: Szacharóz és trehalóz hatása a baktériumok stabilitására

A két cukor közös alkalmazása esetén sikerült javítanom a korábban tárgyalt eredményeken. Az 1 év után vizsgált túlélés nagyjából a duplájára növekedett mindkét hőfokon a cukrok egyedüli alkalmazásához képest. A 7°C-on tárolt minták esetében 17%-os, míg -20°C-on tároltak esetében már 62%-os túlélés volt megfigyelhető, ami megerősíti a cukrok pozitív hatását a baktériumok stabilitására.

4.2.2.2 Sovány tejpor alkalmazásának hatása a csíraszám változására

Egy másik általam használt stabilizálószer a sovány tejpor volt. Fagyasztva szárítás során gyakran alkalmazott segédanyagnak számít. Hatékony komponens lehet, hiszen a sejtmembrán alkotóinak stabilizálásával megakadályozza a celluláris sérülések kialakulását. Továbbá a tejfehérje tartalma védőbevonatot képez a sejtfal körül, így növeli a baktériumok túlélési esélyeit a szárítás során [22].

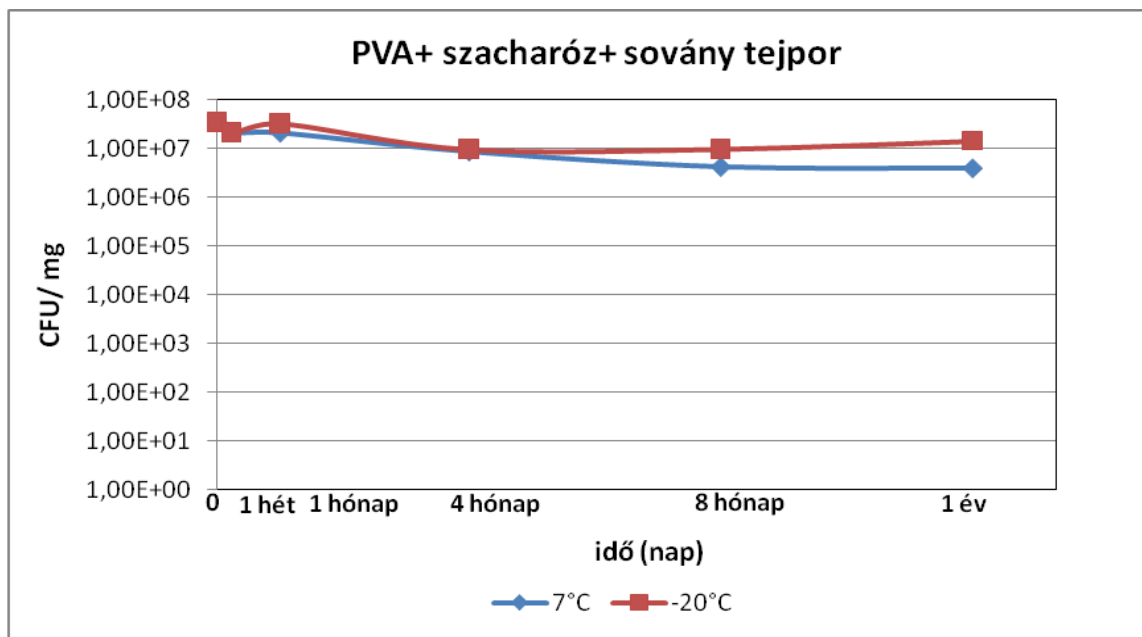
Munkám során vizsgáltam a sovány tejpor egyedüli illetve trehalózzal, szacharózzal közös alkalmazásának hatását is az elektrosztatikus szálképzés során. A 16. ábra a sovány tejpor egyedüli alkalmazásának hatását mutatja be.



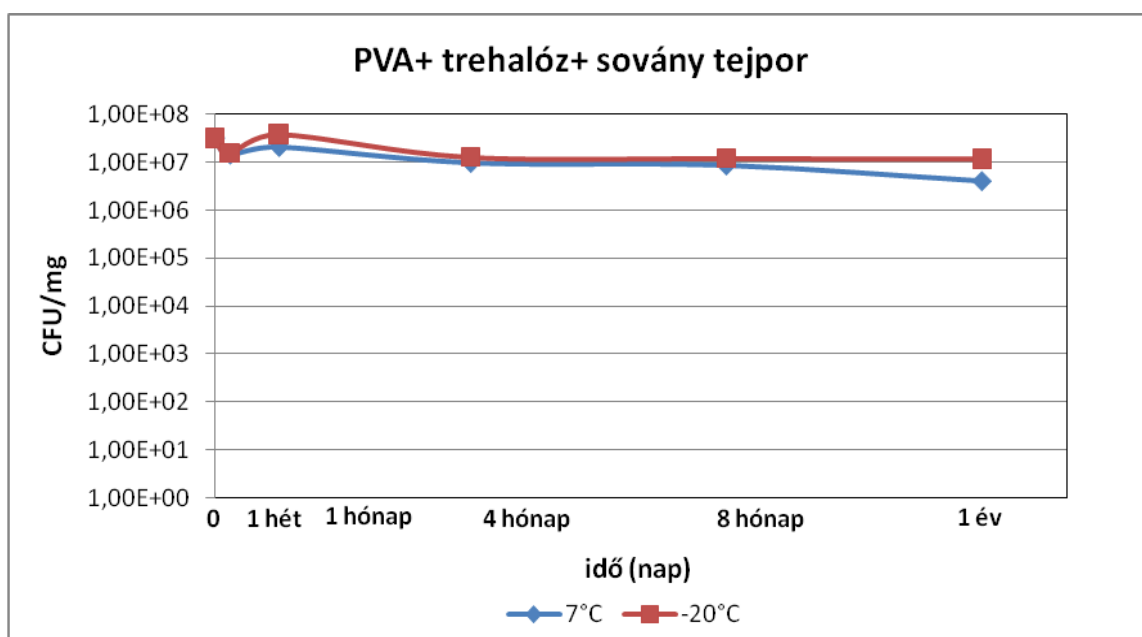
16. ábra: Sovány tejpor hatása a baktériumok stabilitására

A diagramon látható, hogy ebben az esetben is jelentős javulás mutatkozott a csíraszámban a stabilitásjavító nélküli eredményekhez képest. A sovány tejpor alkalmazása kevésbé volt hatékony, mint a stabilizáló cukrok jelenléte. 7°C-on 2%-os túlélés volt jellemző, ami a cukorral kezelt minták stabilitásának harmada, míg -20°C-on 17%-os túlélés volt jellemző, ami ugyancsak a cukorral kezelt minták stabilitásának már több mint a fele, ami a sovány tejpor krioprotektív tulajdonságával magyarázható.

A továbbiakban azt vizsgáltam, hogy a cukrok sovány tejjel közös alkalmazása javít-e ezen a tendencián. Két cukor esetében az eredmények nagyon hasonlóak voltak, ezért a két esetet közösen tárgyalom. A következő ábrák (17.-18. ábra) a kapott eredményeket mutatják.



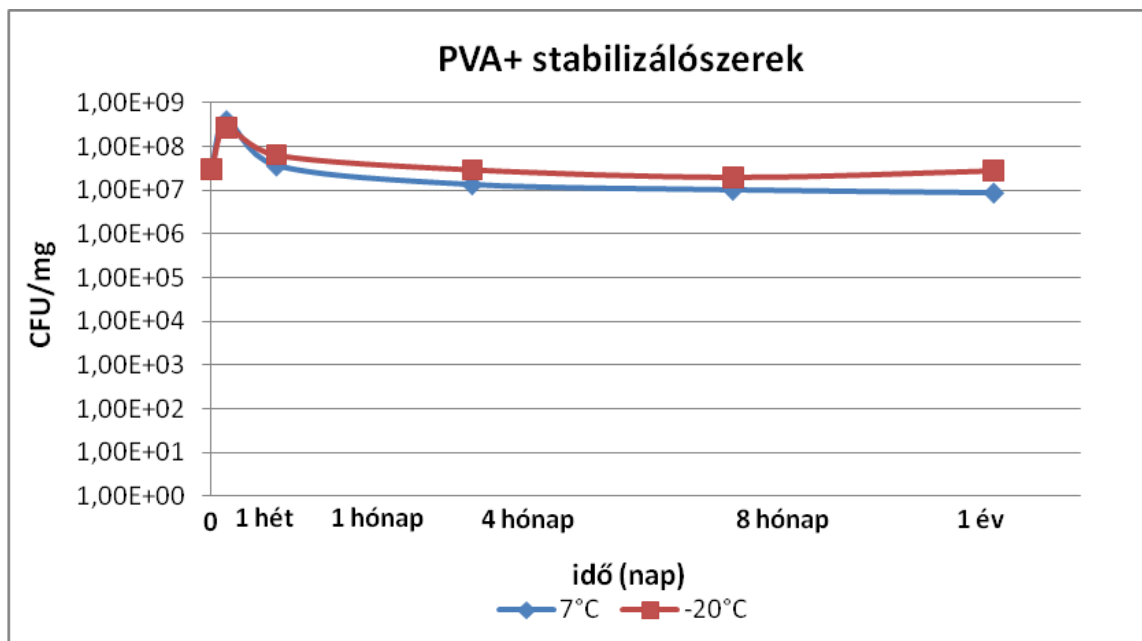
17. ábra Szacharóz és sovány tejpor hatása a baktériumok stabilitására



18. ábra: Trehalóz és sovány tejpor hatása a baktériumok stabilitására

Amint az várható volt, a trehalóz vagy szacharóz sovány tejporral közösen alkalmazva javulást mutat a hosszú távú tárolás során (7°C-on 15%, -20°C-on 40% körüli túlélés) a tejpor egyedüli alkalmazásához képest. Nagyjából igaz az, hogy a kombinált alkalmazás során, a csak cukorral, illetve csak sovány tejporral készített minták stabilitási értékeinek összegét kaptuk.

Az eddigi eredményekből jól látható, hogy a hosszú távú stabilitást leginkább a cukrok mennyisége befolyásolja, illetve a fagyasztva tárolt minták esetében jelentős hatása van a sovány tejpornak is. Ezért vizsgáltam, a három stabilizáló szer (trehalóz, szacharóz, sovány tejpor) közös alkalmazásának hatását is a stabilitásra nézve. A 19. ábra a kapott eredményeket mutatja be.



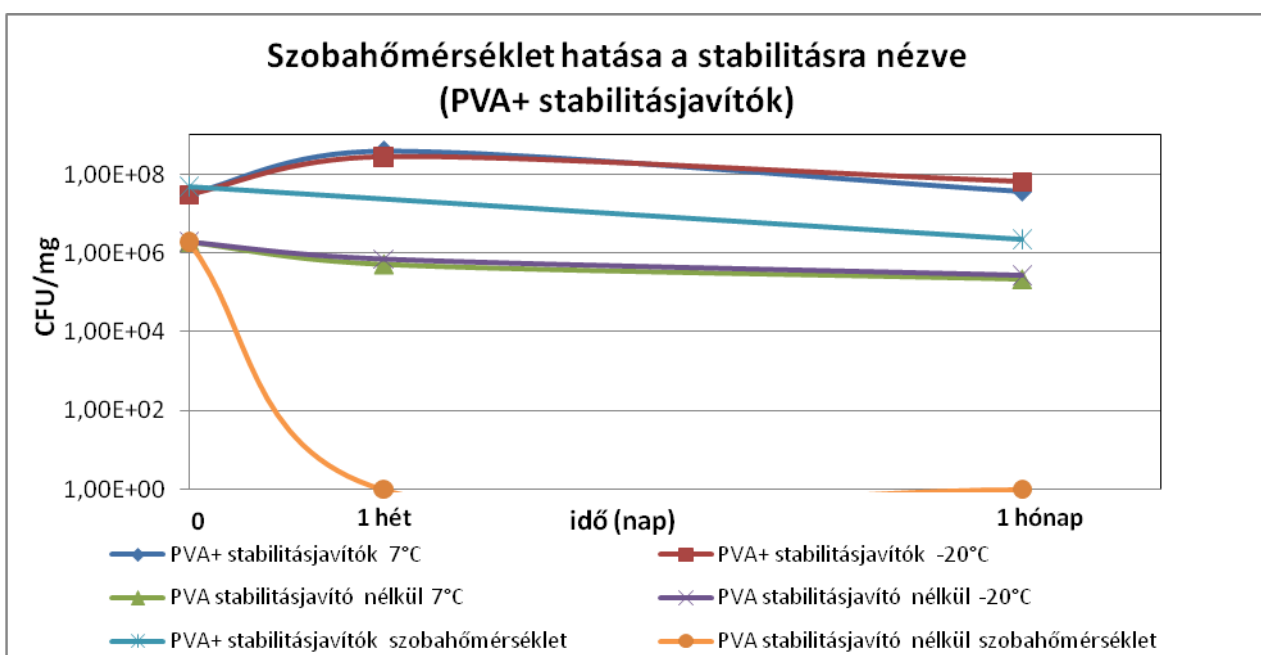
19. ábra: Szacharóz, trehalóz, sovány tejpor hatása a baktériumok stabilitására

Az összes stabilizáló anyag jelenléte mellett nagyon magas baktérium számot tudtam elérni. Elmondható tehát, hogy a stabilizálók együttes jelenléte rendkívül hatásosnak bizonyul a hosszú stabilitásra nézve. Hatékonyságát mutatja, hogy a végtermék a kiindulási 10 milliós nagyságrendű baktériumszámot 1 év után vizsgálva is közel 100%-ban (-20°C: 92%-os túlélés) tartalmazza.

A kapott eredmények következtében, felmerült a lehetőség, hogy akár szobahőmérsékleten is hosszútávon tartható lehetne a hatásos dózisnak megfelelő csíraszám. Az alábbi táblázat (7. táblázat) és diagram (20. ábra) a kapott eredményeket mutatja.

7. táblázat: PVA+ összes stabilizálószer jelenlétének hatása a stabilitásra

	0.nap (CFU/mg)	1 hónap (CFU/ mg)
PVA 7°C	3,2E+07	3,6E+07
PVA -20°C	3,2E+07	6,4E+07
Szobahőmérséklet	3,2E+07	3,02E+05



20. ábra: Szobahőmérséklet hatása a baktériumok stabilitására

A diagramon összehasonlításképp a PVA-val (stabilitásjavítók nélkül) végzett elektrosztatikus számképzés eredményeit is feltüntettem.

Látható, hogy az 1 hónapos stabilitásvizsgálat nagymértékű csíraszám csökkenést mutat a szobahőmérsékleten tárolt minta esetében, azonban közel sem pusztult el az összes baktérium. Mindez azt jelenti, hogy ha 1 hónap alatt közel a századára csökken a baktériumszám, akkor a baktériumot tartalmazó termék nem veszíti el hatékonyságát, ha egy ideig nem a hűtőben tárolják, ami a pácienseknek nagy könnyebbséget jelent a mindennapi alkalmazás során.

4.2.3 Az elektrosztatikus szálképzés méretnövelhetősége

A korábbiakban bemutatott technológia méretnövelhetősége kulcsfontosságú kérdés a későbbi ipari alkalmazások megvalósításához. Így munkám során számomra is fontos feladat volt a technológia méretnövelhetőségének vizsgálata. A kísérletek során két különböző elven megvalósított méretnövelés által magas termelékenység (10 ml/h, 15ml/h) mellett, folytonos szálképzést sikerült elérni, az eredeti kapacitást (1 ml/h) tízszeresére, illetve tizenötszörösére növelni. A kapott szálhúzott végtermék közel 100%-ban tartalmazta a kiindulási oldat csíraszámát, ami azt mutatja, hogy a módszer nagyobb méretben is megfelelően kíméletes. Az alábbi táblázat (8. táblázat) a kapott eredményeket mutatja.

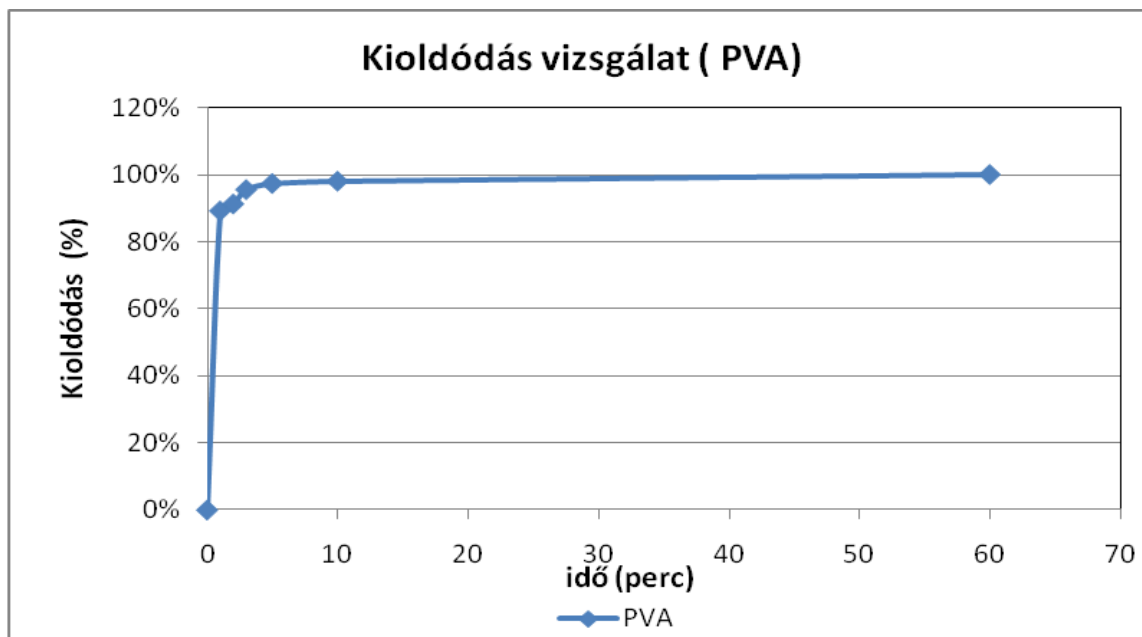
8. táblázat: Méretnövelési eredmények

	Méretnövelés során előállított végtermék (CFU/ mg)
Újonnan fejlesztett berendezés	1,63E+07
Méretnövelés porlasztó levegővel	5,76E+07

A korábban feltüntetett összefoglaló táblázatban (6. táblázat) látható, hogy 1 év után vizsgálva már 0,3 mg végtermék is tartalmazza a hatásos dózist. Elektrosztatikus szálképzéssel pedig ipari léptékben napi 10 kg-os termelés már megoldott, ami azt jelenti, hogy napi több mint 30 millió hatásos dózist tartalmazó végterméket is elő lehetne állítani. Továbbá ha tárolás során a baktériumoknak megfelelő körülményeket (stabilizáló anyagok) biztosítunk, a technológiával előállított végtermék hosszú ideig tartalmazza a hatásos dózistnak megfelelő baktérium mennyiséget.

4.3 Kioldódás vizsgálatok

A szárítási folyamat utolsó lépése az élő sejtek visszanyerése. A kioldódás vizsgálatoknál a szálak szinte pillanatszerűen feloldódtak, ahogy a folyadékfelszínnel érintkezett, így a polimerbe ágyazott baktériumok szinte azonnal, oldatba kerültek. Az alábbi diagramok (21. ábra) a közölt eredményeket mutatja.



21. ábra: Kioldódás vizsgálatok eredményei

A szilárd formájú baktérium, amely képes pillanatszerű oldódásra lehetőséget nyújt olyan alkalmazásra, amely ötvözi a szilárd gyógyszerformák előnyeit (pl. stabilitás) a folyadék gyógyszerformák előnyeivel (pl. gyors hatás), hiszen a stabilan tárolható szilárd formát elég közvetlenül az alkalmazás előtt a vivőanyagban feloldani. Az ilyen új, gyógyszerbejuttató rendszer, nögyógyászati megbetegedések során javíthatja a terápia hatékonyságát.

Egy lehetséges megvalósítás, ami a jól oldódó szálak és egy folyadék felszívásra alkalmas cső kombinációján alapul, miszerint a csőben elhelyezett hatóanyag tartalmú szálak azonnal oldódnak akkor, amikor a kezelendő személy folyadékot szív fel, és így a hatóanyag oldat formában juttatható célba.

5 Összefoglalás

Munkám során olyan gyógyszer technológiai eljárások fejlesztésével foglalkoztam, amelyekkel lehetséges biohatóanyagok stabil szilárd formáját előállítani, és hatékony alternatívájaként szolgálhatnak az iparban általánosan alkalmazott fagyasztva szárításnak. Az egyik ilyen technológia a filmbevonás volt, amellyel hatékonyan egy lépésben állíthatunk elő nagy élőbaktérium-tartalmú tablettákat, és így elkerülhető a hagyományosan a szárítási lépést (fagyasztva, porlasztva szárítást) követő tablettázási módszernél fellépő mechanikai stressz illetve a sűrűlódás miatti hőmérsékletnövekedés okozta további csíraszám csökkenés.

A másik alkalmazott módszer egy ígéretes nanotechnológiai eljárás az elektrosztatikus nanoszálképzés volt. A kísérletek során alkalmazott modellhatóanyag egy fontos probiotikum, a *Lactobacillus acidophilus* volt.

Sikeresen alkalmaztam a filmbevonást a *Lactobacillus acidophilus* szilárd formulálására. A technológia során sikerült stabil szilárd formát létrehoznom, ami tartalmazta a hatásos dózisnak megfelelő csíraszámot. A filmbevonás során alkalmazott stabilitásjavítók (trehalóz, szacharóz, sovány tejpor) jelenlétében sikerült a tárolás során tapasztalt csíraszám csökkenést tizedére csökkenteni.

Az elektrosztatikus szálképzés során is sikerült a baktérium polimer nanoszálakba építése. A technológia kíméletességét mutatja, hogy már igen kis mennyiségű szálhúzott végtermék is minden esetben tartalmazta a hatásos dózisnak (10 millió élő baktérium) megfelelő baktériumszámot. A baktériumok korábbi stabilitási eredményein stabilitásjavító segédanyagok alkalmazásával javítani tudtam. Egyes esetekben 1 év után is közel 100%-os túlélést sikerült elérnem.

A technológia ipari alkalmazhatóságának bizonyítására méretnövelési kísérleteket végeztem. A folyamat során folytonos szálképzést sikerült elérni, ahol a végtermék a hatásos dózisnak megfelelő csíraszámot 100%-ban tartalmazta, ami azt jelenti, hogy az elvégzett méretnövelés nem volt negatív hatással a baktériumok túlélésére.

A kioldódási vizsgálatok során a szálhúzott végtermék pillanatszerű oldódása volt jellemző. Mindez lehetőséget nyújt olyan új gyógyszerbejuttató rendszerek fejlesztésére, amelyek nőgyógyászati megbetegedések során jelentősen javíthatják a terápiás hatékonyságot.

Végül megállapítható, hogy az elektrosztatikus nanoszálképzés kíméletes szárítást tesz lehetővé, alacsony energiafelhasználással, gyors és folytonos termelést biztosítva, valamint méretnövelése is megoldott. Így az elektrosztatikus szálképzés hatékony és gazdaságos megoldást jelenthet a probiotikumok szilárd formulálására.

6 Irodalomjegyzék

- [1] Dave A. Parkins and Ulla T. Lashmar The formulation of biopharmaceutical products; PSTT Vol. 3, No. 4 April (2000)
- [2] Huub Schellekens Follow-on biologics: challenges of the 'next generation; Nephrol Dial Transplant 20 [Suppl 4]: iv31–iv36 (2005)
- [3] Ginsberg, P. L., Bhatia, S., & McMinn, R. L. The Road Ahead for Biologics Manufacturing, U.S. Bancorp Piper Jaffray Equity Research, NY. (2002)
- [4] FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, 1–34. (2001)
- [5] A. C. Senok, A. Y. Ismaeel and G. A. Botta¹, Probiotics: facts and myths; Clin Microbiol Infect; 11: 958–966 (2005)
- [6] Nalini N, Manju V, Menon Vp. Effect of coconut cake on the bacterial enzyme activity in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon cancer. Clin Chim Acta; 342: 203–210. (2004)
- [7] Reid G, Jass J, Sebulsky Mt, McCormick Jk. Potential uses of probiotics in clinical practice. Clin Microbiol Rev; 16: 658–672. (2003)
- [8] Matsuzaki T, Chin J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. Immunol Cell Biol; 78: 67–73. (2000)
- [9] Madsen K, Cornish A., Soper P et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. Gastroenterology; 121: 580–591. (2001)
- [10] Chiang Bl, Sheih Yh, Wang Lh, Liao Ck, Gill Hs. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. Eur J Clin Nutr; 54: 849–855. (2000)
- [11] Gorbach Sl, Goldin Br. The intestinal microflora and the colon cancer connection. Rev Infect Dis; 12 (suppl 2): S252–S261. (1990)
- [12] R. Vidhyalakshmi, R. Bhagyaraj and R. S. Subhasree Encapsulation “The Future of Probiotics”-A Review Advances in Biological Research 3 (3-4): 96-103, (2009)
- [13] Cannon, J. P. et al. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24:31-40.(2005)
- [14] Madigan, M.T. et al. Prokaryotic diversity: the bacteria, p 329-418. In M.T. Madigan and J. M. Martinko (ed.), Brock: biology of microorganisms. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. (2006)
- [15] Kononen, E. and W. G. Wade Propionibacterium, Lactobacillus, Actinomyces, and other non sporeforming anaerobic gram-positive rods, p. 872-888. In P.R. Murray (ed.), Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington, DC. (2007)
- [16] Madigan, M.T. et al. Prokaryotic diversity: the bacteria, In M.T. Madigan and J. M. Martinko (ed.), Brock: biology of microorganisms p. 329-418 (2006)

- [17] Ness Rb, Kip Ke, Hillier Sl et al. A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease. *Am J Epidemiol* 162: 585–590; (2005)
- [18] Champagne, C.P., C. Lacroix and I. Sodini-Gallot, Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Crit. Rev. Biochem.*, 14: 109-134. (1994)
- [19] King, A. H., Encapsulation of Food Ingredients: A review of available technology, focussing on hydrocolloids, In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, ACS Symposium Series 590, Ed. By Sara J. Risch and Gary A. Reineccius. American Chemical Society, Washington DC. pp: 26-39.(1995)
- [20] Shah, N. The exopolysaccharides production by starter cultures and their influence on textural characteristics of fermented milks. Symposium on New Developments in Technology of Fermented Milks. Int. Dairy Federation, 3rd June, Comwell Scanticon, Kolding, Denmark. Abstract, pp: 5. (2002)
- [21] Franjione, J. and N. Vasishta, The Art and Science of microencapsulation, *Technol. Today*. B.F. Gibbs, S. Kermasha, I. Ali, C.H. Mulligan, Encapsulation in the food industry: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 50: 213-224 (1995)
- [22] Boldizsár Horváth, Ferenc Hadarits, László Szabó, Péter Serényi, György Godó, Probiotic treatment of vaginal infections. A prospective study of the treatment of 144 patients with Gynoflor vaginal tablets. *Journal of Hungarian Association for Obstetrics and Gynecology [Magyar Nőorv.Labj]*. 67: 85-91 (2004)
- [23] Shahidi, F. and X. Q. Han, Encapsulation of food ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 33: 501-547 (2003)
- [24] Wilson J. , Managing recurrent bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect.* ; 80: 8-11 (2004)
- [25] Livengood, C. H. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*, New York, v. 2, no. 1, p. 28-37, Dec. (2009)
- [26] Martin, R. et al. Vaginal microbiota: composition, protective role, associated pathologies, and therapeutic perspectives. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Barcelona, v. 26, no. 3, p. 160-167, Mar. (2008)
- [27] Watts, D. H. et al. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 191, no. 7, p. 1129-1139, Apr. (2005)
- [28] Didier Silveira, Castellano Filho, Cláudio Galuppo Diniz, Vânia Lúcia da Silva Bacterial vaginosis: clinical, epidemiologic and microbiological features. *HU Revista*, Juiz de Fora, v. 36, n. 3, p. 223-230, jul./set. (2010)
- [29] Shalev E, Battino S, Weiner E, Colodner R, Keness Y. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* compared with pasteurized yogurt as prophylaxis for recurrent candidal vaginitis and bacterial vaginosis. *Arch Fam Med*, 5: 593–596 (1996)
- [30] Reid G. , Buron J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.* ; 4: 319-324 (2002)

- [31] Reid G. , Beuermann D., Heinemann C., Bruce AW. , Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* ; 32: 37-41 (2001)
- [32] Corcoran, B.M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. , Stanton C., *Journal of Applied Microbiology*, 96: 1024–1039 (2004)
- [33] Kets, E. P. W., de Bont, J. A. M., *FEMS Microbiology Letters*, 116: 251–256 (1994)
- [34] Streeter, J. G. , *Journal of Applied Microbiology*, 95: 484–491 (2004)
- [35] Leslie, S. B., Israeli, E. , Lighthart, B., Crowe, J. H., Crowe, L.M., *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (10): 3592–3597 (1995)
- [36] Maus, J. E. , Ingham, S. C., *Journal of Applied Microbiology*, 95: 146–154 (2005)
- [37] Lodato, P., Segovia de Huergo, M. Buera, M.P., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 215–220 (1999)
- [38] Orndorff, G.R., MacKenzie, A. P., *Cryobiology*, 10: 475–487 (1973)
- [39] Desmond, C., Ross, R. P, O'Callaghan, E. , Fitzgerald, G., Stanton, C., Improved survival of *Lactobacillus paracasei* in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 1003–1011 (2002)
- [40] Silva J., Carvalho, A. S., Teixeira P., Gibbs, P. A., Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 77–81 (2002)
- [41] C. A. Morgan N. Herman, P. A. White, G. Vesey, Preservation of micro-organisms by drying- A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66: 183–193 (2006)
- [42] Larena I., Melgarejo P., De Cal, A., Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against fusarium wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, 151: 600–606 (2003)
- [43] Strasser S., Neureiter M., Gepp M., Braun R., Danner H., Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 167–177 (2009)
- [44] Ying D. Y., Phoon M. C., Sanguansri L., Weerakkody R., Bugar I., Angustin M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: Relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *Journal of Food Science*, 75: E588–E595 (2010)
- [45] Wang Y. C., Yu R., Chou C., Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 209–217 (2004)
- [46] Juslin, L., Antikainen, O., Merkkü, P. and Yliruusi, J., Droplet size measurement: Effect of three independent variables on droplet size distribution and spray angle from a pneumatic nozzle. *Int. J. Pharm.* 123, 247-256. (1995)
- [47] Kara, M. A. K., Leaver, T.M. and Rowe, R.C., Material carryover and process efficiency during tablet film coating in a side-vented perforated drum (Accela-Cota). *J. Pharm. Pharmacol.* 34, 469-470 (1982)

- [48] Leaver, T. M., Shannon, H. D. and Rowe, R. C., Photometric analysis of tablet movement in a side vented perforated drum (Accela-Cota). *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 17-21. (1985)
- [49] Poukavoos, N. and Peck, G. E., Effect of aqueous film coating conditions on water removal efficiency and physical properties of coated tablet cores containing superdisintegrants. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20, 1535-1554. (1994)
- [50] Mariya I. Brachkova, Aida Duarte, João F. Pinto, Evaluation of the viability of *Lactobacillus* spp. after the production of different solid dosage forms *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 98, Issue 9, pages 3329–3339, September (2009)
- [51] Zheng-Ming Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotakic, S. Ramakrishna, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63: 2223–2253 (2003)
- [52] Taylor G. Electrically driven jets. *Proc Natl Acad Sci London* A313 (1515): 453 e75 (1969)
- [53] Baumgarten P. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *J Colloid Interface Sci* 36 (1):71 e9. (1971)
- [54] Travis J. Sill, Horst A. von Recum Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. Department of Biomedical Engineering, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106, USA accepted 9 January (2008)
- [55] Larrondo, L.; Mandley, R. St. J. *J Polym Sci: Polymer Physics Edn*, 909,921 (1981)
- [56] Dror Y., Salalha W., Khalfin R. L., Cohen Y, Yarin A. L. and Zussman E. *Langmuir* 19: 7012–20 (2003)
- [57] Luu Y. K., Kim K, Hsiao B. S., Chu B and Hadjiargyrou M. J. *Controll. Release* 89: 341–53 (2003)
- [58] Lee S. W. and Belcher A. M. *Nano Lett.* 4: 387–90 (2004)
- [59] A. L. Yarin and E. Zussman, Upward needleless electrospinning of multiple nanofibers. *Polymer*, 45: 92977-2980 (2004)
- [60] S. A. Theron, A. L. Yarin, E. Zussman, and E. Kroll, Multiple jets in electrospinning: experiment and modeling. *Polymer*, 46 (9): 2889-2899 (2005)
- [61] W. Tomaszewski and M. Szadkowski, Investigation of electrospinning with the use of a multi-jet electrospinning head. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 13 (4): 22-26. (2005)
- [63] Yong Liu, Ji-Huan He, Bubble Electrospinning for Mass Production of Nanofibers. Freund Publishing House Ltd. *International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation*, 8 (3): 393-396 (2007)