



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Stabilisierung von Milchsäurebakterien in Matrixstrukturen

angestrebter akademischer Grad

Magister/Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser: Sunita Arpadzic

Matrikel-Nummer: 9607089

Studienrichtung /Studienzweig Pharmazie
(lt. Studienblatt):

Betreuerin / Betreuer: O.Univ.-Prof. Mag.pharm. Dr. Helmut Viernstein

Wien, am

24.11.2008

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn O. Univ-Prof. Dr. Helmut Viernstein für die wissenschaftliche Betreuung sowie für die Unterstützung bei der Korrektur der vorliegenden Diplomarbeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Milchsäurebakterien.....	2
2.1. Klassifikation.....	2
2.2. Wirkungen und Anwendung von Milchsäurebakterien.....	2
3. Material und Methoden.....	5
3.1. Material.....	5
3.1.1. Lactobacillus casei.....	5
3.1.2. Basenpulver.....	5
3.1.3. Hilfsstoffe.....	6
3.2. Methoden.....	8
3.2.1. Granulierung.....	8
3.2.1.1. Trockene Granulierung.....	8
3.2.1.2. Feuchte Granulierung.....	8
3.2.1.3. Granulatprüfungen.....	9
3.2.2. Tablettierung.....	10
3.2.2.1. Tablettenprüfungen.....	11
3.2.3. Keimzahlbestimmung nach dem Koch'schen Plattengussverfahren.....	11
4. Ergebnisse.....	12
4.1. Trockene Granulierung von Milchsäurebakterien-Lyophilisat.....	12
4.2. Brausegranulat aus Basenpulver Bioaktiv.....	16
4.3. Granulatmischung aus Brausegranulat und Lyophilisat-Granulat.....	17
4.4. Tablettierung von Lyophilisat-Granulat mit Brausegranulat.....	19
5. Zusammenfassung.....	22
6. Literaturverzeichnis.....	23

1. Einleitung

Gesundheitsbewusste Ernährung ist in der letzten Jahrzehnten zu einem wichtigen Faktor in den Industrieländern geworden.

Der tägliche traditionelle Speiseplan wird immer öfter mit Produkten ergänzt, von denen man sich eine besonders positive Wirkung auf den menschlichen Organismus erwartet.

Produkte, die mit Milchsäurebakterien angereichert sind, haben in den letzten Jahren wegen ihrer vielfachen gesundheitsfördernden Wirkungen, vor allem wegen positiver Beeinflussung der Darmflora, an Bedeutung gewonnen.

Eine Verbesserung des mikrobiellen Gleichgewichts im Gastrointestinaltrakt führt zu einer Verbesserung der Verdauung, des allgemeinen Wohlbefindens und der Immunlage des Körpers.

Der in diesem Zusammenhang gebrauchte Begriff „*Probiotica*“ bezieht sich auf Produkte mit lebenden Mikroorganismen, die vor allem die Lactobacillen und Bifidobakterien enthalten.

Dazu gehören eine Reihe an Handelsprodukten wie Joghurt und Sauermilchprodukte, die mit Milchsäurebakterien angereichert sind sowie eine Vielfalt an Spezialitäten im Bereich der Human- und Veterinärmedizin.

Ein weiterer Begriff bezieht sich auf „*Präbiotica*“.

Präbiotica sind unverdauliche Lebensmittelinhaltsstoffe, die den menschlichen Organismus positiv beeinflussen in dem sie das Wachstum bestimmter Bakterien im Dickdarm fördern d.h. sie dienen als Wachstumssubstrat für positiv wirkende Bakterien.

Die Gewinnung entsprechender Oligo- und Polysaccharide ist in zahlreichen Forschungsarbeiten mittlerweile näher untersucht worden [1].

Probiotica und Präbiotica zeigen eine günstige synergistische Wirkung auf die Besiedelung der Darmflora im Gastrointestinaltrakt.

Als „*Symbiotica*“ bezeichnet man Mischungen aus Pro- und Präbiotica, die den Wirt günstig beeinflussen, indem sie die Überlebensfähigkeit und die Besiedelung lebender Mikroorganismen (Probiotica) im Gastrointestinaltrakt fördern [2].

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist es ein milchsäurebakterien-hältiges Trockengranulat herzustellen, das zur Einlagerung und weiteren Verarbeitung mit Brausegranulat aus Basenpulver geeignet ist. Von besonderer Bedeutung ist einerseits der Zerfall der Granulate bzw. Tabletten im Wasser und andererseits genügende Stabilität der Produkte im Bezug auf Lebendkeimzahl sowohl bei der Herstellung als auch bei anschliessenden Lagerung.

2. Milchsäurebakterien

2.1. Klassifikation

Die am häufigsten eingesetzten Milchsäurebakterien gehören zur Familie der Lactobacteriaceae. Obwohl sie eine morphologisch nicht einheitliche Gruppe darstellen, sind sie sich in ihren Eigenschaften ähnlich.

Alle Milchsäurebakterien sind grampositiv, bilden keine Sporen, sind streng fermentativ, anaerob (wobei viele aerotolerant sind) und sind unbeweglich.

Nach der Art der Glucosegärung kann man sie in zwei Gruppen unterteilen:

- 1) homofermentative Milchsäurebakterien, die Glucose über den Fructosebiphosphat-Weg abbauen, wobei hauptsächlich Lactat entsteht;
- 2) heterofermentative Milchsäurebakterien, die wegen des Fehlens entsprechender Enzyme Glucose über den Pentosephosphat-Weg abbauen; die Endprodukte u.a. Milchsäure (50%), Kohlendioxid, Essigsäure und Ethanol. Zu dieser Gruppe gehört die *Lactobacillus casei*, die im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendet wurde [3].

Die wichtigsten Gattungen der Milchsäurebakterien sind: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* und *Bifidobacterium*.

2.2. Wirkungen und Anwendung der Milchsäurebakterien

Seit tausenden von Jahren wird die fermentative Eigenschaft von Milchsäurebakterien zur Lebensmittelkonservierung und zur Herstellung von Joghurt, Buttermilch, Käse, Sauermilch und weiteren Milchprodukten ausgenutzt, obwohl die wissenschaftliche Basis und Erforschung dazu fehlte.

Diese sind auch heute eine der bekanntesten und wichtigsten Anwendungsbereiche von Milchsäurebakterien.

Bei Menschen sind die Milchsäurebakterien ein Bestandteil der natürlichen Darmflora und als solches sind sie nicht pathogen und nicht toxisch.

Sie kommen auch auf der Haut, der Schleimhaut von Mund, Rachen, sowie auf Atmungsorganen und Geschlechtsorganen vor.

Darauf beruht auch die therapeutische Verwendung der Milchsäurebakterien, die eingesetzt werden bei:

- entzündlichen Darmerkrankungen
- chronischen Durchfällen, besonders bei Durchfällen viralen Ursprungs
- bei Verstopfungen
- bei einigen Formen von Dermatitis
- Infektionen im Hals-, Rachen- und Nasebereich.

In der Tabelle 1 sind auf dem Markt befindlichen probiotischen Mikroorganismenstämme mit entsprechenden Herstellerfirmen angeführt:

Tabelle 1: Bakterienstämme in probiotischen Produkten [4]

Stammbezeichnung		Kulturenlieferant
Bifidobacterium		
B.lactis	Bb 12	Hansen
B. longum	Bb 46	Hansen
B. bifidum	LB-H1	Symbiolact
B. sp.	CB 111	SKW Biosystems
B. longum	BB 536	Wiesby
B sp.	420	Wiesby
Lactobacilus acidophilus		
L. acidophilus	La-5	Hansen
L. acidophilus	LA-H3	Symbiolact
L. acidophilus	CLb A5	SKW Biosystems
L. acidophilus	74-2	Wiesby
L. acidophilus	1264	Wiesby
L. acidophilus	145	Wiesby
L. acidophilus	Gilliland	Campina AG
L. johnsonii	La 1	Nestle
Lactobacillus casei		
L.paracasei subsp. Paracasei	L. actimel	Danone
L.paracasei subsp. Paracasei	LC-H2	Symbiolact
L.paracasei subsp. Paracasei	L.Shirota (DSM 20312)	Yakult
L.paracasei subsp. Paracasei	CRL 431	Hansen
L.paracasei subsp. Paracasei	01	Hansen
L. rhamnosus	L. GG (ATCC 53013)	Valio
L. rhamnosus	LC 705	Wiesby
Andere Lactobazillien		
L. reuteri	SD 2112	Biogaia
L. reuteri	T1	Biogaia
Enterococcus		
E. faecium	K 77D	Gaio

Die primären Wirkungen der Milchsäurebakterien zeichnen sich durch

- Absenkung des pH-Werts durch Bildung von Milchsäure,
- Bildung bakteriostatischer Substanzen,
- kompetitive Verdrängung anderer Mikroorganismen von der Darmschleimhaut.

Die Beeinflussung des pH-Werts durch die Bildung von Milchsäure führt zu einer Hemmung des Wachstums pathogener Keime im Darm.

Ausserdem erleichtern die Milchsäurebakterien die Verdauung von Lactose was bei Lactose-intoleranten Patienten bzw. bei Lactosemalabsorption ausgenützt wird.

Weiters wirken Milchsäurebakterien antikarcinogen und werden unterstützend im Rahmen der Therapie von Darmkrebs eingesetzt.

Milchsäurebakterien werden auch cholesterinsenkende und immunstimulierende Wirkungen zugeschrieben, die durch einige Studien teilweise belegt werden konnten, obwohl die genauen Mechanismen der Wirkung weitgehend unbekannt sind.

Milchsäurebakterien haben in letzter Zeit auch an Bedeutung in der Landwirtschaft zur Haltbarmachung von Viehfutter und in der Futtermittelindustrie als gesundheitsfördernder Zusatz in Futtermitteln gewonnen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei ist mesophil, homofermentativ, produziert L-Milchsäure und wird oft in probiotischen Joghurts und Sauermilchprodukten verwendet. Es gibt zwei Unterarten dieses Bakteriums: *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* und *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus* [5].

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden Keime des Stammes *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* F-19 (Medifarm) verwendet.

Wachstumsbedingungen von *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei*:

Inkubation: anaerob/72h/37°C

Nährmedium: Rogosa-Agar

Lebendkeimzahl des Lyophilisats: $1,74 \times 10^{11}$ cfu/g

3.1.2. Basenpulver

Zur Herstellung einer geeigneten Matrix wurde das *Basenpulver* bzw. *Basenpulver Bioaktiv nach Dr. Auer* verwendet.

Den Grund zur Verwendung von Basenpulver als Nahrungsergänzung bietet der Ansatz, dass eine Übersäuerung des Körpers durch Nahrungsmittel bzw. deren Abbau eine Vielzahl an Krankheiten fördern kann.

Durch Einnahme einer Mischung basischer Mineralsalze als Teil einer ausgewogenen Ernährung kann man der Übersäuerung entgegenwirken.

Basenpulver Bioaktiv ist eine weitere Entwicklung des Basenpulvers nach Dr. Auer mit zusätzlichen Brausekomponenten und Inulin.

Diese zusätzlichen Komponenten haben sich als Vorteil bei der Verarbeitung des Basenpulvers Bioaktiv zu Granulaten bzw. Tabletten erwiesen, da sich durch das Vorhandensein erforderlicher Hilfsstoffe im Pulver ein Zusatz weiterer Hilfsstoffe erübrigte, so dass schließlich zur Verarbeitung im Rahmen dieser Diplomarbeit der Basenpulver Bioaktiv dem Basenpulver vorgezogen wurde.

3.1.3. Hilfsstoffe

Mikrokristalline Cellulose (Avicel)

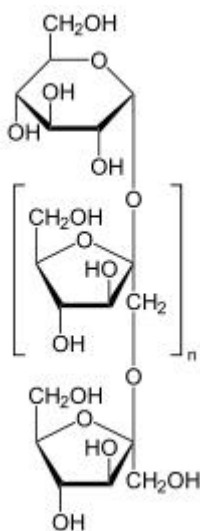
Für die trockene Granulierung von Milchsäurebakterien-Lyophilisat wurde mikrokristalline Cellulose, Avicel, verwendet.

Avicel ist eine teilweise depolymerisierte Cellulose (Polymerisationsgrad $n = 220$) die oft als Füll-, Binde-, Spreng-, Fließ- und Dispersionsmittel bei Tablettierung verwendet wird [6].

Inulin

Inulin ist ein Gemisch von Polysacchariden mit Fructose als Monosaccharid Grundbaustein.

Struktur des Inulins:



Es dient in vielen Pflanzen als Reservestoff. Bei Menschen wird es aber im Dünndarm nicht resorbiert, da das entsprechende Enzym fehlt. Es wird erst im Dickdarm durch die Darmflora abgebaut und kann als Stärke-Ersatz bei Diabetiker angewendet werden.

Außerdem wirkt sich Inulin positiv auf die Darmflora aus.

Inulin kann man als Prebioticum betrachten, da es das Wachstum einiger Stämme von Milchsäurebakterien fördert.

Deswegen wurde Inulin im Rahmen dieser Diplomarbeit als Hilfstoff bei der trockenen Granulierung von Milchsäurebakterien-Lyophilisat eingesetzt.

Weitere Wirkungen des Inulins sind:

- erhöhte Resorption von Mineralstoffen,
- erhöhte Resistenz gegen pathogene Keime im Darm
- und Förderung der Peristaltik des Dickdarms.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde *Inulin Frutafit IQ (Sensus)* verwendet.

Nährmedium

Als Nährmedium zur Überprüfung der Lebendkeimzahl milchsäurebakterien-hältiger Granulaten und Tabletten, die im Rahmen dieser Diplomarbeit hergestellt wurden, wurde das *Rogosa-Agar* (Fa. Merck), ein selektives Agar für Milchsäurebakterien, verwendet.

In der folgenden Tabelle 2 ist die Zusammensetzung des Rogosa-Agars angegeben:

Tabelle 2: Zusammensetzung des Rogosa-Agars

Pepton aus Casein	10,0
Hefeextrakt	5,0
D(+)-Glucose	20,0
K-dihydrogenphosphat	6,0
Ammoniumcitrat	2,0
Tween 80	1,0
Na-acetat	15,0
Magnesiumsulfat	0,575
Eisen(II)sulfat	0,034
Mangansulfat	0,12
Agar-Agar	15,0

Zubereitung des Agars:

Es wurden 74,5g Rogosa Agar in 1000,0ml destilliertem Wasser suspendiert und auf einer Ceran-Heizplatte auf 100°C zum Sieden erhitzt.

Die heiße Lösung wurde in Epruvetten (je 10ml) abgefüllt und sofort mit Cap-O-Test Kappen verschlossen. Danach wurde der Rogosa-Agar bei 103°C 15 min autoklaviert und anschliessend bei 5°C gelagert.

Vor dem Gebrauch wurde der Agar am Wasserbad bei 50°C wieder verflüssigt und in beimpfte Petrischalen ausgegossen.

Lösung zur Bestimmung der Lebendkeimzahl

Es wurde eine physiologische 0,9% NaCl-Lösung verwendet.

Dazu wurden 99,0ml 0,9% NaCl-Lösung in 150ml Braunglasflaschen abgefüllt und 20min bei 121°C autoklaviert.

3.2. Methoden

3.2.1. Granulierung

3.2.1.1. Trockene Granulierung

Es wurde ein Granulat mit 10%-igem Anteil an Milchsäurebakterien-Lyophilisat (F-19) hergestellt.

Dazu wurden 10T Lyophilisat mit 80T Avicel und 10T Inulin vermengt, 10 Minuten im Kubusmischer (Erweka AR 400) gemischt, zur Schülpen verarbeitet und anschliessend mittels Stachelwalzen zerkleinert.

Das Granulat wurde auf Pulveranteil, Zerfallszeit und Lebendkeimzahl geprüft. Zur Lagerung wurde das Granulat in Sachets eingefüllt, verschlossen und bei 4°C, 20°C und 30°C gelagert (Probe P1).

Die Keimzahlbestimmung erfolgte nach zwei, vier und acht Wochen.

Ausgangkeimzahl d. Lyophilisats	1,74x10 ¹¹ cfu/g
Keimzahl nach der Granulierung	4,03x10 ¹⁰ cfu/g
Lagerungstemperaturen	bei 4°C, 20°C, 30°C
Lebendkeimzahlbestimmung	nach 2 Wochen/4 Wochen/8 Wochen

Tabelle3: Angaben zu Lebendkeimzahl, Lagerungstemperaturen und Lagerungszeit der Probe P1

3.2.1.2. Feuchte Granulierung

Es wurde ein Brausegranulat aus Basenpulver Bioaktiv hergestellt.

Dazu wurde das Basenpulver Bioaktiv mit 70%-igem Ethanol (q.s.) als Anstoßflüssigkeit versetzt, durch ein Sieb der lichten Maschenweite 1,5mm gepresst, bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend auf Restfeuchtigkeit, Pulveranteil und Zerfallszeit geprüft.

Durch den schon vorhandenen Anteil an Brausekomponenten, stellt das Basenpulver Bioaktiv ein gut lösliches Brausepulver dar, der sich leicht zu einem Granulat verarbeiten lässt.

Die Herstellung des Granulats war notwendig weil eine Mischung aus Lyophilisat-Granulat und Brausepulver wegen der stark unterschiedlichen Korngröße ein ungleichmäßiges, sich leicht entmischendes Produkt darstellte. Außerdem war dadurch eine Tablettierung der Mischung des Basenpulvers mit Lyophilisat-Granulat (Kap. 3.2.2.) auch nicht möglich da die Tabletten einen sehr unterschiedlichen Gehalt an Milchsäurebakterien aufwiesen.

Einlagerung der Granulatmischung

Zur Prüfung der Stabilität wurden das Lyophilisat-Granulat und Basenpulver Bioaktiv Granulat im Verhältnis 1:1 leger artis gemischt, in Sachets eingefüllt und bei 4°C, 20°C und 30°C gelagert (Probe P2).

Keimzahl der Granulatmischung	4,03x10 ¹⁰ cfu/g
Lagerungstemperaturen	bei 4°C, 20°C, 30°C
Lebendkeimzahlbestimmung	nach 2 Wochen/4 Wochen/8 Wochen

Tabelle 4: Angaben zu Lebendkeimzahl, Lagerungstemperatur und Lagerungszeit der Probe P2

3.2.1.3. Granulatprüfungen

Die Granulate wurden auf Korngrößenverteilung, Pulveranteil, Zerfallszeit und Lebendkeimzahl geprüft.

Die Bestimmung der Korngrößenverteilung und des Pulveranteils erfolgte in einem Siebturm. Dazu wurden 15g Granulat 2 Minuten (bei Amplitude 2,00) geschüttelt und anschliessend die einzelnen Fraktionen gewogen.

Tabelle 5: Angaben zu Siebturm/Maschenweite

Siebnr.	lichte Maschenweite
1	0.25mm
2	0,4mm
3	0,8mm
4	1,0mm
5	1,4mm
6	2,0mm

Um die Zerfallszeit zu überprüfen wurden jeweils 1g Granulat der Probe P1 und Probe P2 in ein Becherglas mit 200ml Leitungswasser (Wassertemperatur 8°C) eingebracht.

Lebendkeimzahlbestimmung ist näher im *Kapitel 3.2.3.* erklärt.

3.2.2. Tablettierung

Für weitere Untersuchungen wurden Tabletten durch Verpressung von Lyophilisat-Granulat (P1) und Basenpulver Bioaktiv Granulat (P2) hergestellt.

Die beiden Granulate wurden vermengt, im Kubusmischer (Erweka AR 400) 2 Minuten gemischt und anschließend mittels instrumentierter Exzentertablettenpresse (Typ EKO, Fa. Korsch Pressen AG) ohne weiteren Zusatz von Hilfsstoffen direkt zu Tabletten gepresst. Zur Messung der Presskraft wurde die elastische Verformung beim Tablettiervorgang durch einen Dehnungsmessstreifen herangezogen.

Es wurden zwei verschiedene Proben hergestellt mit unterschiedlichem Anteil an Brausegranulat (30% Brause bzw. 40% Brause).

Probe P3: Tabletten aus Lyophilisat-Granulat (70%) und Brausegranulat (30%)

Probe P4: Tabletten aus Lyophilisat-Granulat (60%) und Brausegranulat (40%)

Tablettengewicht: 1g

Zur Lagerung wurden die Tabletten in Sachets eingepackt, verschlossen und bei 4°C, 20°C und 30°C gelagert.

Die Lebendkeimzahl wurde sowohl nach der Tablettierung als auch nach Einlagerung geprüft.

Keimzahl der Tabletten nach Verpressung	$2,55 \times 10^8$ cfu/g
Lagerungstemperaturen	bei 4°C, 20°C, 30°C
Lebendkeimzahlbestimmung	nach 2 Wochen/4 Wochen/8 Wochen

Tabelle6: Angaben zu Lebendkeimzahl nach Verpressung, Lagerungstemperaturen und Lagerungszeit der Probe P3

Keimzahl der Tabletten nach Verpressung	$2,13 \times 10^8$ cfu/g
Lagerungstemperaturen	bei 4°C, 20°C, 30°C
Lebendkeimzahlbestimmung	nach 2 Wochen/4 Wochen/8 Wochen

Tabelle7: Angaben zu Lebendkeimzahl nach Verpressung, Lagerungstemperaturen und Lagerungszeit der Probe P4

3.2.2.1. Tablettenprüfungen

Die Tabletten wurden auf Bruchfestigkeit, Zerfallszeit und Lebendkeimzahl überprüft.

Die Bruchfestigkeit wurde mittels *Bruchfestigkeitstester Pharma-Test PTB 311* gemessen.

Zur Überprüfung der Zerfallszeit wurden die Tabletten mit 200ml Leitungswasser in ein Becherglass eingebracht.

Die Lebendkeimzahlbestimmung ist im folgenden *Kapitel 3.2.3* beschrieben.

3.2.3. Keimzahlbestimmung nach dem Koch'schen Plattengussverfahren

Vorbereitung der Probe

Um eine Verdünnungsreihe herzustellen, wurde 1g Probe in einer sterilen 150ml Braunglasflasche in 99,0ml 0,9% physiologischer NaCl – Lösung suspendiert. Das ergibt die Verdünnungsstufe 2 (V2).

1ml der V2 Suspension wurden weiters in 99,0 ml 0,9%NaCl – Lösung in eine 150ml Braunglasflasche pipettiert um die Verdünnungsstufe V4 zu erhalten.

Es wurden insgesamt fünf Verdünnungstufen hergestellt (V2, V4, V6, V8 und V9).

Je drei sterile Petrischalen wurden, unter möglichst keimarmen Bedingungen, mit den entsprechenden Verdünnungstufen beimpft.

Eprouvetten mit Rogosa-Agar wurden auf einem temperierten Wasserbad bei 50°C verflüssigt, geöffnet, kurz am Bunsenbrenner abgeflammt und in bereits beimpfte Petrischalen ausgegossen, vorsichtig kreisförmig bewegt und nach dem Erstarren des Agars 72h bei 37°C inkubiert.

Danach wurden die koloniebildenden Einheiten ausgezählt.

Es wurden die Petrischalen mit 10-300 KbE zur Auswertung herangezogen. Die Keimzahl wurde dann auf 1,00g Probe genau berechnet (cfu/g).

4. Ergebnisse

4.1. Trockene Granulierung von Milchsäurebakterien-Lyophilisat

Das Ziel der trockenen Granulierung war ein, im Bezug auf mechanische Stabilität und Lebendkeimzahl, stabiles Milchsäurebakterien-Granulat herzustellen, das sich auch weiters zur Tabletten verarbeiten lässt.

Dass Granulat sollte weniger als 10% Pulveranteil und eine Korngössenverteilung im Bereich zwischen 0,25 und 2mm aufweisen, die der Kornverteilung des Brausegranulats entspricht.

Ausserdem sollte das Granulat ausreichende Zerfallszeit in Wasser haben, da es zur Anwendung in Kombination mit Brausegranulat gedacht ist.

Weiters soll der Keimzahl nach der Granulierung einen Verlust von max. 1 log-Einheit aufweisen.

Im Rahmen der durchgeführten Vorversuchen wurde eine optimale Zusammensetzung ermittelt. Es wurden 10T Bakterien-Lyophilisat mit 80T Avicel und 10T Inulin vermischt und nach bereits im Kapitel 3.2.1.1. beschriebenen Methode zu Granulat verarbeitet.

Nach der trockenen Granulierung wurde die Lebendkeimzahl im Granulat bestimmt.

Lebendkeimzahl des Lyophilisat-Granulats: $4,03 \times 10^{10}$ cfu/g.

Die Prüfung auf Zerfallszeit

1g Lyophilisat-Granulat wurde in ein Becherglas mit 200ml Leitungswasser (Wassertemperatur 8°C) eingebracht. Das Granulat ist innerhalb von 2 Minuten zerfallen.

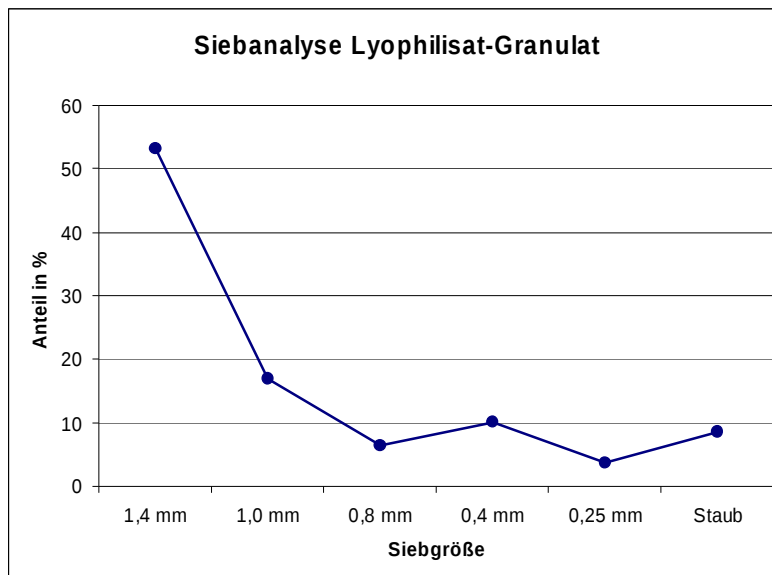


Abbildung 1 - Korngrößenverteilung der Probe P1
Prozentueller Anteil einzelner Fraktionen nach der Siebanalyse

Die Abb.1 zeigt, dass der Pulveranteil der Probe P1 (der Staubanteil unter 0,25mm), unter 10% liegt.

Die Verteilung einzelner Fraktionen entspricht der Verteilung des Brausegranulats (Kap. 4.2., Abb. 3). Die Hauptfraktion mit 53% Anteil ist die Korngröße zwischen 1,4mm und 2mm.

Das Granulat wurde in Sachets bei 4°C, 20°C und 30°C gelagert.

Die Lebendkeimzahl wurde nach bereits im *Kapitel 3.2.3.*beschriebenem Koch'schen Plattengußverfahren nach 2 Wochen, 4 Wochen und 8 Wochen bestimmt.

	4°C	20°C	30°C
Ausgangskeimzahl des Lyo-Granulats	$4,03 \times 10^{10}$ cfu/g	$4,03 \times 10^{10}$ cfu/g	$4,03 \times 10^{10}$ cfu/g
Keimzahl nach 2 Wochen	$3,95 \times 10^{10}$ cfu/g	$2,45 \times 10^{10}$ cfu/g	$4,01 \times 10^9$ cfu/g
Keimzahl nach 4 Wochen	$3,65 \times 10^{10}$ cfu/g	$8,19 \times 10^9$ cfu/g	$3,34 \times 10^8$ cfu/g
Keimzahl nach 8 Wochen	$9,39 \times 10^9$ cfu/g	$1,06 \times 10^9$ cfu/g	$8,77 \times 10^7$ cfu/g

Tabelle 8: Lebendkeimzahlbestimmung der Probe P1

Die Lebendkeimzahlbestimmung erfolgte sofort nach der Herstellung sowie nach 2 Wochen, 4 Wochen, und nach 8 Wochen jeweils bei 4°C, 20°C und 30°C Lagerungstemperatur.

Cfu/g: colony forming units/g , koloniebildende Einheiten pro Gramm Granulat.

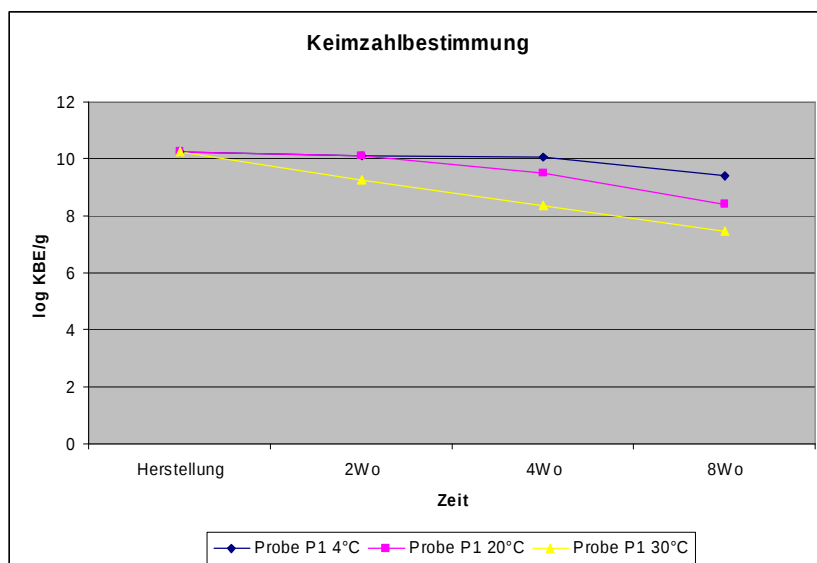


Abbildung 2: Lebendkeimzahlbestimmung der Probe P1

Die Lebendkeimzahlbestimmung erfolgte sofort nach der Herstellung sowie nach 2 Wochen, nach 4 Wochen und nach 8 Wochen jeweils bei 4°C, 20°C und 30°C

KBE/g : koloniebildende Einheiten pro Gramm Granulat

Aus der Tab. 8 und Abb. 2 ist ersichtlich dass das Granulat bei einer Lagerungstemperatur von 4°C eine weitgehend unveränderte Keimzahl während der ersten 4 Wochen aufweist. Nach 8 Wochen hat die Keimzahlbestimmung einen Keimzahlverlust um 0,46 log-Einheiten ergeben.

Die Lagerung bei 20°C hat nach 4 Wochen zu einem Keimzahlverlust von 0,6 log-Einheiten geführt. Nach 8 Wochen war ein Keimzahlverlust von 1,3 log-Einheiten zu verzeichnen.

Die Lagerung bei 30°C führte nach 8 Wochen zu einem Keimzahlverlust von 2,6 log-Einheiten.

Zusätzlich zur Lebendkeimzahlbestimmung wurden auch die Zerfallszeit und Korngrößenverteilung bestimmt, die sich aber während der Einlagerung des Granulats nicht verändert haben.

4.2. Brausegranulat aus Basenpulver Bioaktiv

Der Basenpulver Bioaktiv wurde mit 70%-igem Ethanol (q.s.) als Anstoßflüssigkeit versetzt, durch einen Sieb der lichten Maschenweite 1,5mm gepresst und bei Raumtemperatur getrocknet.

Nach der Trocknung wurde das Granulat auf Zerfallszeit geprüft.

Dazu wurde 1g Granulat in 200ml Leitungswasser (Temperatur 10°C) in ein Becherglas eingebracht und ist innerhalb von 1 Minute vollständig zerfallen.

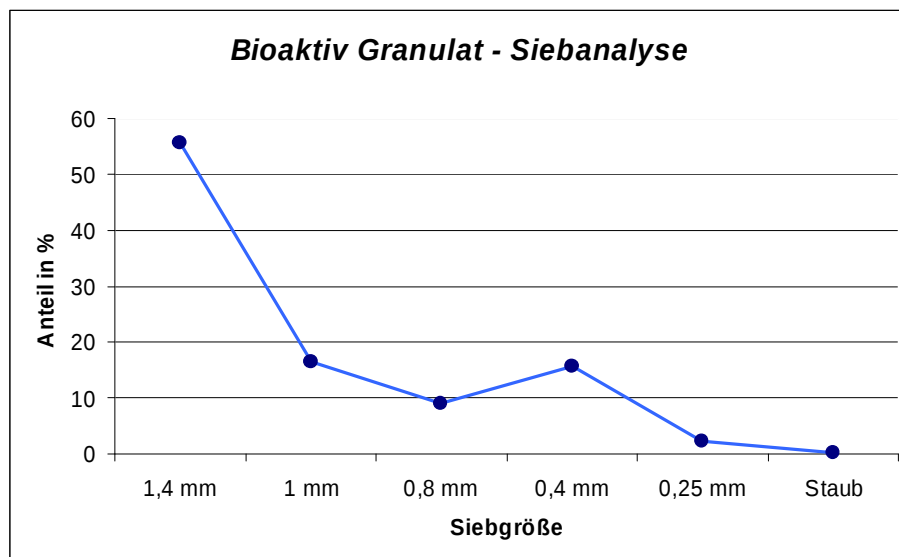


Abbildung 3: Korngrößenverteilung von Basenpulver Bioaktiv Granulat
Prozentueller Anteil einzelner Fraktionen nach der Siebanalyse

Aus der Abb.3 ist ersichtlich das der Pulveranteil (Staubfraktion unter 0,25mm) weniger als 1% beträgt. Die Hauptfraktion mit 55% ist die Korngrösse zwischen 1,4mm und 2mm. Die Korngrößenverteilung entspricht ungefähr der Verteilung der Probe P1 (Kap. 4.1. Abb. 1)

4.3. Granulatmischung aus Brausegranulat und Lyophilisat-Granulat

Für weitere Untersuchungen wurden die Granulate im Verhältnis 1:1 im Kubusmischer 5 Minuten lang gemischt. Anschliessend wurde die Lebendkeimzahl bestimmt, die aber keine Veränderungen im Vergleich zur Keimzahl des Lyophilisat-Granulats (Probe P1) aufwies.

Zur Prüfung der Zerfallszeit wurde 1g des Granulats in 200ml Leitungswasser (Temperatur 8°C) in ein Becherglas gegeben. Die Zerfallszeit betrug 2 Minuten.

Aus der *Abb.1* und der *Abb.3* ist ersichtlich, dass die beiden Granulate eine ähnliche Korngrößenverteilung aufweisen. Das hat die Herstellung sowohl einer Granulatmischung mit hoher Mischgüte als auch die Tablettierung der beiden Granulate nach pharmazeutisch-technologischen Anforderungen ermöglicht (die Ergebnisse der Tablettierung sind im Kap. 4.4. beschrieben).

Die Granulatmischung wurde zur Einlagerung in Sachets eingefüllt und bei drei unterschiedlichen Temperaturstufen, 4°C, 20°C und 30°C, gelagert.

Die Lebendkeimzahl wurde nach dem im *Kapitel 3.2.3.* beschriebenen Koch'schen Plattengussverfahren nach 2 Wochen, nach 4 Wochen und nach 8 Wochen bestimmt.

	4°C	20°C	30°C
Ausgangskeimzahl der Granulatmischung	$4,03 \times 10^{10}$ cfu/g	$4,03 \times 10^{10}$ cfu/g	$4,03 \times 10^{10}$ cfu/g
Keimzahl nach 2 Wochen	$4,75 \times 10^9$ cfu/g	$2,12 \times 10^9$ cfu/g	$2,79 \times 10^8$ cfu/g
Keimzahl nach 4 Wochen	$2,40 \times 10^9$ cfu/g	$9,70 \times 10^8$ cfu/g	$2,60 \times 10^7$ cfu/g
Keimzahl nach 8 Wochen	$7,98 \times 10^8$ cfu/g	$6,21 \times 10^7$ cfu/g	$1,17 \times 10^6$ cfu/g

Tabelle 9: Lebendkeimzahlbestimmung der Probe P2

Die Lebendkeimzahlbestimmung erfolgte sofort nach der Herstellung sowie nach 2 Wochen, 4 Wochen, und nach 8 Wochen jeweils bei 4°C, 20°C

und 30°C Lagerungstemperatur.

Cfu/g: colony forming units/g , koloniebildende Einheiten pro Gramm Granulat.

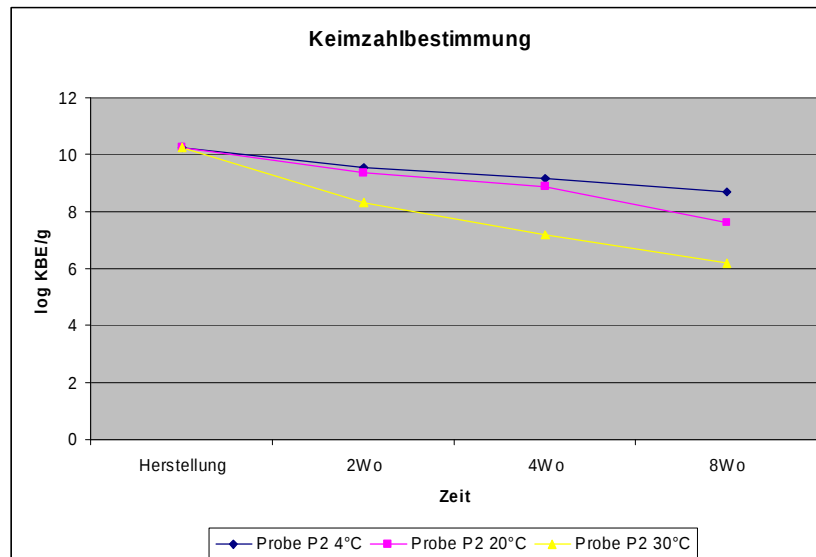


Abbildung 4: Lebendkeimzahlbestimmung der Probe P2

Die Lebendkeimzahlbestimmung erfolgte sofort nach der Herstellung sowie nach 2 Wochen, nach 4 Wochen und nach 8 Wochen

jeweils bei 4°C, 20°C und 30°C

KBE/g : koloniebildende Einheiten pro Gramm Granulat

Aus der Tab. 9 und Abb. 4 ist ersichtlich, dass das Granulat bei einer Lagerung bei 4°C nach 8 Wochen ein Keimzahlverlust von 1,4 log-Einheiten aufwies.

Bei der Lagerung bei 20°C war nach 4 Wochen der Keimzahlverlust von 1,6 log-Einheiten und nach 8 Wochen von 2,7 log-Einheiten zu verzeichnen.

Die Lagerung bei 30°C führte nach 8 Wochen zu einem Keimzahlverlust von 4,3 log-Einheiten.

4.4. Tablettierung von Lyophilisat-Granulat mit Brausegranulat

Die Tabletten wurden mit einer instrumentierten Exzentertablettenpresse (TypEKO, Fa Korsch Pressen AG) gepresst.

Die beiden Proben P3 und P4 wurden mit einem Pressdruck von 18kN gepresst, der auf Grund vorgegangener Untersuchungen als optimaler Pressdruck ermittelt wurde.

Eine Erhöhung des Pressdrucks hat, wegen erhöhter mechanischer Belastung des Tablettierguts, zu einem zu starken Keimzahlverlust geführt.

Zur Ermittlung der Zerfallszeit wurden die Tabletten in ein Becherglas in 200ml Leitungswasser gegeben. Es wurden je drei Tabletten der entsprechenden Proben P3 und P4 getestet.

Die Tabletten wiesen eine Zerfallszeit von zwei Minuten bei der Probe P3 und, entsprechend der Erhöhung des Brauseanteils, eine Minute bei Probe P4 auf.

Die Bruchfestigkeit der Tabletten wurde mit einem *Bruchfestigkeitstester Pharma-Test PTB 311* gemessen und beträgt bei Probe P3 *8,9kp* und bei Probe P4 *9,5kp*. Es wurden je drei Tabletten der Proben P3 und P4 getestet und ein Mittelwert berechnet.

Die Tabletten wurden in Sachets eingefüllt und bei 4°C, 20°C und 30°C gelagert.

Die Bestimmung der Lebendkeimzahl erfolgte nach dem Tablettieren sowie nach der Einlagerung nach bereits im *Kapitel 3.2.3.* beschriebenen Koch'schen Plattengussverfahren.

	4°C	20°C	30°C
Ausgangskeimzahl der Tabletten	$2,55 \times 10^8$ cfu/g	$2,55 \times 10^8$ cfu/g	$2,55 \times 10^8$ cfu/g
Keimzahl nach 2 Wochen	$2,05 \times 10^8$ cfu/g	$1,65 \times 10^8$ cfu/g	$6,44 \times 10^7$ cfu/g
Keimzahl nach 4 Wochen	$1,01 \times 10^8$ cfu/g	$2,33 \times 10^7$ cfu/g	$4,11 \times 10^6$ cfu/g
Keimzahl nach 8 Wochen	$2,21 \times 10^7$ cfu/g	$5,03 \times 10^6$ cfu/g	$1,19 \times 10^5$ cfu/g

Tabelle 10: Lebendkeimzahlbestimmung der Probe P3

Die Lebendkeimzahlbestimmung erfolgte sofort nach der Herstellung sowie nach 2 Wochen, 4 Wochen, und nach 8 Wochen jeweils bei 4°C, 20°C und 30°C Lagerungstemperatur.

Cfu/g: colony forming units/g , koloniebildende Einheiten pro Gramm Granulat.

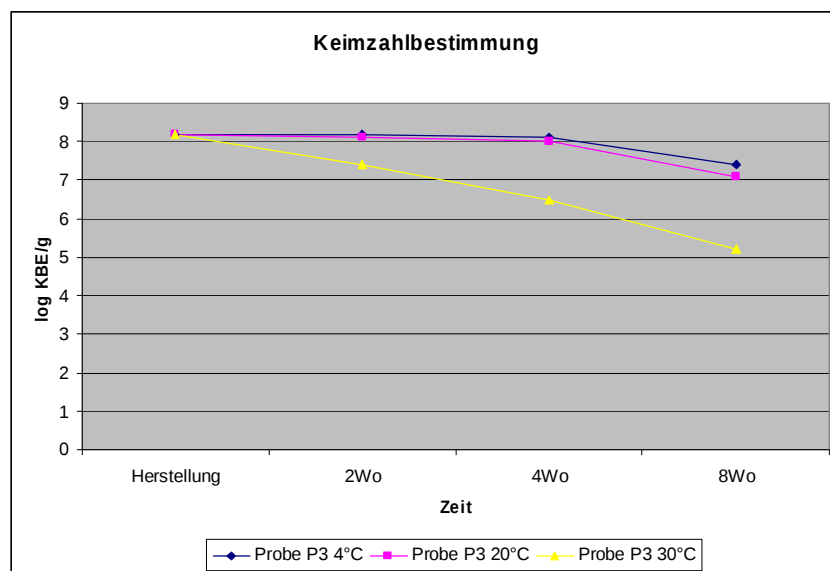


Abbildung 5: Lebendkeimzahlbestimmung der Probe P3

Die Lebendkeimzahlbestimmung erfolgte sofort nach der Herstellung sowie nach 2 Wochen, nach 4 Wochen und nach 8 Wochen jeweils bei 4°C, 20°C und 30°C

KBE/g : koloniebildende Einheiten pro Gramm Granulat

Aus der Tab. 10 und Abb. 5 ist ersichtlich, dass das Granulat bei einer Lagerung bei 4°C nach 8 Wochen ein Keimzahlverlust von 1,3 log-Einheiten aufwies.

Bei der Lagerung bei 20°C war nach 4 Wochen der Keimzahlverlust von 1,13 log-Einheiten und nach 8 Wochen von 1,7 log-Einheiten zu verzeichnen.

Die Lagerung bei 30°C führte nach 8 Wochen zu einem Keimzahlverlust von 3,4 log-Einheiten.

	4°C	20°C	30°C
Ausgangskeimzahl der Tabletten	$2,13 \times 10^8$ cfu/g	$2,13 \times 10^8$ cfu/g	$2,13 \times 10^8$ cfu/g
Keimzahl nach 2 Wochen	$2,01 \times 10^8$ cfu/g	$1,09 \times 10^8$ cfu/g	$4,16 \times 10^7$ cfu/g
Keimzahl nach 4 Wochen	$7,81 \times 10^7$ cfu/g	$1,03 \times 10^7$ cfu/g	$3,51 \times 10^6$ cfu/g
Keimzahl nach 8 Wochen	$8,49 \times 10^6$ cfu/g	$2,65 \times 10^6$ cfu/g	$8,91 \times 10^4$ cfu/g

Tabelle 11: Lebendkeimzahlbestimmung der Probe P4

Die Lebendkeimzahlbestimmung erfolgte sofort nach der Herstellung sowie nach 2 Wochen, 4 Wochen, und nach 8 Wochen jeweils bei 4°C, 20°C und 30°C Lagerungstemperatur.

Cfu/g: colony forming units/g , koloniebildende Einheiten pro Gramm Granulat.

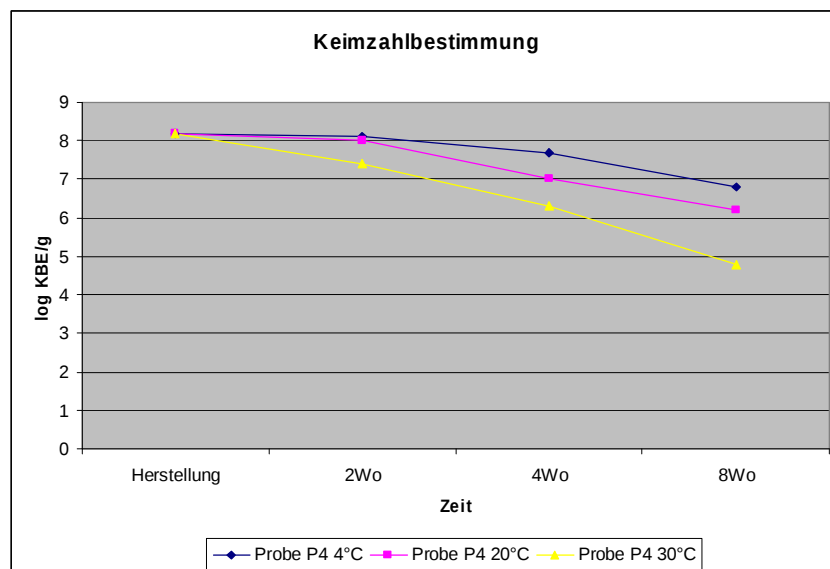


Abbildung 6: Lebendkeimzahlbestimmung der Probe P4

Die Lebendkeimzahlbestimmung erfolgte sofort nach der Herstellung sowie nach 2 Wochen, nach 4 Wochen und nach 8 Wochen jeweils bei 4°C, 20°C und 30°C

KBE/g : koloniebildende Einheiten pro Gramm Granulat

Aus der Tab. 11 und Abb. 6 ist ersichtlich, dass das Granulat bei einer Lagerung bei 4°C nach 8 Wochen ein Keimzahlverlust von 1,6 log-Einheiten aufwies.

Bei der Lagerung bei 20°C war nach 4 Wochen der Keimzahlverlust von 1,13 log-Einheiten und nach 8 Wochen von 2 log-Einheiten zu verzeichnen.

Die Lagerung bei 30°C führte nach 8 Wochen zu einem Keimzahlverlust von 3,6 log-Einheiten.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Diplomarbeit war einerseits die Herstellung eines stabilen Granulats mit Milchsäurebakterien-Lyophilisat das andererseits zur einer weiteren Verarbeitung mit Brausegranulat entsprechend geeignet war.

Die Stabilität des Lyophilisat-Granulats bezieht sich sowohl auf die vorgeschriebenen Granulatprüfungen (Kap.3.2.1.3.) bezüglich mechanischer Stabilität und Zerfallszeit als auch auf die Lebendkeimzahl des Granulats.

Es wurde eine Lebendkeimzahl des Produktes zwischen 10^{10} und 10^8 cfu/g angestrebt, die auch bei der Lagerung eine, entsprechend diesen Anforderungen genügende Stabilität aufweisen sollte.

Da es sich bei der Probe P2 um Brausegranulat bzw. Proben P3 und P4 um Brausetabletten handelte, waren von dem pharmazeutisch- technologischen Standpunkt die Zerfallszeit im Wasser sowie die mechanische Stabilität von Granulat und Tabletten von besonderer Bedeutung. Alle eingelagerten Proben haben diesen Anforderungen auch entsprochen. (Granulatprüfungen Kap. 4.3. , Tablettenprüfungen Kap. 4.4.)

Die optimale Lagerungstemperatur mit geringstem Keimzahlverlust lag bei 4°C für alle im Rahmen dieser Diplomarbeit eingelagerter Proben.

Die trockene Granulierung von Milchsäurebakterien-Lyophilisat hat ein nach bereits angeführten Anforderungen stabiles Produkt ergeben, das auch bei Einlagerung bei 20°C nach 8 Wochen nur einen geringen Keimzahlverlust von 1,3 log-Einheiten aufwies.

Die Mischung des Lyophilisat-Granulats mit Brausegranulat führte aber zu einem erhöhten Keimzahlverlust, der sich nach 8 Wochen nur bei Lagerungstemperatur von 4°C innerhalb der angestrebten Grenzen hielt.

Im Bezug auf die Lebendkeimzahl des Endproduktes hat sich die Tablettierung der Mischung als schwierig erwiesen. Der Pressdruck von 12kN, der zu einem geringen Keimzahlverlust führte (0,8 log-Einheiten), hat zu einem Endprodukt geführt, der den Anforderungen im Bezug auf Bruchfestigkeit nicht entsprach.

Eine Erhöhung des Pressdrucks über 22kN ergab ein mechanisch stabileres Produkt, das aber eine ungenügende Zerfallszeit (4min) und einen zu grossen Keimzahlverlust aufwies (3 log-Einheiten).

Schliesslich wurde der Pressdruck auf 20kN festgesetzt, bei dem der Keimzahlverlust 2,2 log-Einheiten betrug.

Anschliessende Lagerung der Tabletten hat bei allen Lagerungstemperaturen zu einem Keimzahlverlust geführt, der den angestrebten Anforderungen bezüglich der Lebendkeimzahl des Endproduktes nicht mehr entsprach.

Abschliessend kann man sagen, dass die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführte trockene Granulierung von Milchsäurebakterien-Lyophilisat einen guten Ansatz zur weiteren Erforschung bietet.

Die Mischungen des Lyophilisat-Granulats mit Basenpulver Bioaktiv Granulat, sowie die Tablettierung der Mischung, haben sich im Bezug auf Stabilität der Lebendkeimzahl als nicht geeignet erwiesen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] C. Bonaparte und W.Kneifel: Neue trends bei gesundheitlich relevanten Lebensmitteln: 2. Präbiotica und Symbiotica Ernährung/Nutrition Vol 23/Nr.4 1998 s152
- [2] C. Bonaparte und W.Kneifel: Neue trends bei gesundheitlich relevanten Lebensmitteln: 2. Präbiotica und Symbiotica Ernährung/Nutrition Vol 23/Nr.4 1998 s 155
- [3] Schlegel, H. G., Allgemeine Mikrobiologie, 7. Ausgabe, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/newYork, 1992
- [4] W. Kneifel und Chr.Bonaparte: Neue Trends bei gesundheitlich relevanten Lebensmitteln: 1. Probiotica. Ernährung/Nutrition (1998) 22, 9, s. 357-363
- [5] Schlegel, H.G., Allgemeine Mikrobiologie, 7. Ausgabe, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 1992
- [6] Fiedler Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete (Edition Cantor Verlag, 2002)
- [7] H. Feltkamp, P. Fuchs und H. Sucker, Arbeitstechniken d. Pharmazeutischen Industrie, Band 3, Georg Theime Verlag, Stuttgart/New York 1983
- [8] Voigt R., Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf, 8. Auflage, Berlin Ullstein Mosby, 1995
- [9] Holt, J.G., Bergey's Manulal of Determinative Bacteriology, 8. Ausgabe, Williams & Williams, Baltimore.HongKong.London.Sydney, 1977

Lebenslauf

28. Juni 1977	geboren in Tuzla, Bosnien und Herzegowina
1984 – 1992	Besuch der Grundschule in Tuzla
1992 – 1996	Besuch des Gymnasiums in Tuzla
1996	Imatrikulation an der Universität Wien
1996 – 1997	Besuch des Vorstudienlehrgangs der Universität Wien
März 1997	Begin des Studiums der Pharmazie
November 2002 – April 2003	praktische Arbeiten zu vorliegender Diplomarbeit