

Разработка способа капсулирования симбиотических бактерий

В.Д.Похиленко, И.А.Дунайцев, Т.А.Калмантаев, В.П.Левчук, А.Н.Сомов, И.А.Чукина

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Теоретически и экспериментально обоснованы подходы по выбору метода капсулирования живых симбиотических бактерий – продуцентов антимикробных субстанций и обладающих свойствами пробиотиков. Разработаны метод капсулирования бактерий в Са-альгинатные гранулы разного размера и способ раскрытия капсул для количественной оценки жизнеспособности и антагонистической активности бактерий. Определены условия лиофилизации гранул, обеспечивающей сохранение рекомендованного количества жизнеспособных бактерий, и исследована сохраняемость микроорганизмов в составе суспензии гранул и лиофилизированных гранул в течение года. Показана возможность использования Са-альгинатных гранул с пробиотиками в виде суспензии по типу швейцарского пробиотика BioGaia® со сроком хранения всего 2,5 мес. Это открывает возможности для создания жидкой функционально активной формы капсулированного пробиотика, дешевле известных прототипов.

Область применения результатов – препаратостроение: новые формы капсулированных про- и метабиотиков с улучшенными возможностями по функциональному составу и дозировке, спектру активности против кишечных патогенов, целевой доставке, пролонгированной жизнеспособности и персональному использованию.

Область применения продукта – медицина, ветеринария и пищевая индустрия.

Ключевые слова: капсулирование, альгинат, гранулы, пробиотики, свойства

Для цитирования: Похиленко В.Д., Дунайцев И.А., Калмантаев Т.А., Левчук В.П., Сомов А.Н., Чукина И.А. Разработка способа капсулирования симбиотических бактерий. Бактериология. 2023; 8(3): 16–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-16-25

Development of a method for symbiotic bacteria encapsulation

V.D.Pokhilenko, I.A.Dunaytsev, T.A.Kalmantaev, V.P.Levchuk, A.N.Somov, I.A.Chukina

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow region, Russian Federation

The approaches were substantiated both theoretically and experimentally for the choice of the method of encapsulation of live symbiotic bacteria having the properties of probiotics and capable of producing of antimicrobial substances. A technique has been developed for encapsulation of probiotic bacteria in Ca-alginate granules of different sizes and a technique for the capsules opening developed in order to quantify their viability and antagonistic activity. The conditions of dehydration of the obtained granules were determined using lyophilization, which ensures the preservation of recommended amounts of viable bacteria. The persistence of microorganisms in the suspension of granules and freeze-dried granules was studied for the period of one year. The possibility of using Ca-alginate granules with probiotics in the form of a suspension similar to the Swiss probiotic BioGaia® with a shelf life of only 2.5 months was shown. This opens up opportunities for creating a liquid functionally active form of encapsulated probiotic, cheaper than known prototypes. The scope of the results is drug engineering: new forms of encapsulated pro- and metabiotics with improved capabilities in terms of functional composition and dosage, spectrum of activity against intestinal pathogens, targeted delivery, prolonged viability and personal use.

Key words: encapsulation, alginate, granules, probiotics, properties

For citation: Pokhilenko V.D., Dunaytsev I.A., Kalmantaev T.A., Levchuk V.P., Somov A.N., Chukina I.A. Development of a method for symbiotic bacteria encapsulation. Bacteriology. 2023; 8(3): 16–25. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-16-25

Для корреспонденции:

Похиленко Виктор Данилович, доктор технических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, р.п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0027

Статья поступила 15.02.2023, принята к печати 29.09.2023

For correspondence:

Viktor D. Pokhilenko, PhD, DSc (Technical Sciences), Leading Researcher of Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0027

The article was received 15.02.2023, accepted for publication 29.09.2023

Разработка новых лекарственных средств и методов борьбы с вредными микроорганизмами является парадигмой, связанной с улучшением среды обитания человека и животных. Антибиотики, как важнейшие лекарственные препараты в борьбе с возбудителями инфекционных заболеваний, действуют без разбора как на патогенные, так и на полезные микроорганизмы. В результате бесконтрольного применения антибиотиков патогенные бактерии выработали эффективные механизмы устойчивости к ним, что превратилось в общемировую проблему [1]. Нарушение микробиома, в т.ч. вызванное приемом антибиотиков, плохими экологическими условиями, приводит к развитию разнообразных патологических состояний организма человека: аллергических и аутоиммунных заболеваний, инсультов, сахарного диабета, ожирения, онкологии, остеопороза, катаракт, болезни Альцгеймера, паркинсонизма и пр. [2, 3]. На восстановление и поддержание микробиома направлена пробиотическая терапия с более чем 70-летней историей, не утратившая свою актуальность и по сей день. Однако для усиления функциональной эффективности препаратов пробиотиков в условиях возросшего экологического прессинга необходимо дальнейшее их совершенствование с учетом современной обстановки.

Поэтому актуальными являются исследования, направленные на получение новых рецептурных форм, позволяющих доставлять функционально активные пробиотические бактерии в нижние отделы кишечного тракта для восстановления и поддержания индигенной микрофлоры. Распространенным способом защиты живых клеток пробиотических бактерий от разрушения пищеварительными системами желудка, 12-перстной и тонкой кишки является покрытие таблетированных форм препаратов полимерными оболочками, а также помещение порошковых форм в устойчивые к биологическим средам капсулы. Для этого концентрат клеточной массы бактерий вначале обезвоживают с помощью метода замораживания-высушивания (*freeze-drying*), затем измельчают до порошковидного состояния, смешивают с наполнителями, гранулируют, фасуют в желатиновые капсулы или же прессуют в таблетки. Однако лишь некоторые виды пробиотических бактерий способны пережить все эти манипуляции без потери значительного числа живых клеток, составляющих основу действующего начала сухих твердых и порошковых форм препаратов. Распылительное высушивание (*spray drying*), несмотря на возможность получения с его помощью однородных по структуре и легко диспергируемых в воде порошков, пробиотические бактерии переносят еще хуже [4, 5], поэтому этот метод в основном применяется для изготовления пробиотиков на основе лишь наиболее термоустойчивых видов, например *Enterococcus* и *Bacillus*.

В то же время существуют и другие интересные решения по конструированию и целевой доставке пробиотических микроорганизмов. Это, прежде всего, капсулирование (инкапсуляция/иммобилизация) живых клеток с использованием биосовместимых и биodeградируемых полимеров природного происхождения [6–8]. Инкапсуляция – процесс формирования непрерывного покрытия вокруг внутренней матрицы – ядра гранулы с микроорганизмами. В этой структуре предполагается двунаправленная диффузия молекул: приток кислорода, питательных веществ и факторов роста, а также отток продуктов метаболизма.

Вкратце, иммобилизация направлена на защиту живых клеток от экстремальных физико-химических воздействий, таких как экстремальные pH, температура, соли желчи [9–12]; достижение высоких удельных концентраций микробов [13]; снижение микробной контаминации посторонней микрофлорой, а также на более быстрые темпы роста и биосинтеза штаммами полезных метаболитов [14].

Для капсулирования различных видов лечебных средств часто используются липосомы, которые способны полно и безопасно контактировать с тканями и клетками организма, доставляя им лекарственную субстанцию. Однако заключать в липосомы сходные по размерам микробные клетки не имеет смысла. Для микробов более приемлемы подходы по иммобилизации в полимерные матрицы, например на основе натриевой соли альгиновой кислоты, с последующей сшивкой в моносферы при помощи ионов Ca^{++} и получением на выходе т.н. Са-альгинатных гранул [6, 14, 15]. Альгинаты представляют собой природные полисахариды – линейные сополимеры 1,4-связанных остатков β-D-маннуроносовой (M) и α-L-гулууроносовой (G) кислоты.

Если при получении классических пробиотиков, согласно давно устоявшимся критериям, должны быть использованы только строго отобранные микроорганизмы (табл. 1), то при изготовлении ферментированной продукции такой строгости нет. Однако, чтобы ферментированные молочные продукты обладали достаточным пробиотическим потенциалом, в пищевой промышленности установлен уровень концентрации пробиотических бактерий на момент потребления: не ниже 10^6 КОЕ/г [6]. В качестве пробиотиков в них чаще всего используются различные виды и штаммы лактобацилл, бифидобактерий, а также другие микроорганизмы, включая некоторые расы дрожжей, штаммы *Enterococcus*, *Streptococcus* и *Propionibacterium* [6, 16].

Табл. 1. Критерии для определения и выбора пробиотических бактерий
Table 1. Criteria for the determination and selection of probiotic bacteria

Критерий / <i>Criteria</i>	Требования / <i>Requirements</i>
Безопасность / <i>Safety</i>	Бактерии выделены от человека, не патогенны, безопасны (GRAS) / <i>Bacteria isolated from humans, not pathogenic, safe</i>
Функциональность / <i>Functionality</i>	Устойчивость к разрушению соляной кислотой желудка и солями желчи тонкого кишечника. Прилипаемость к эпителиальной ткани кишечника. Способность колонизировать желудочно-кишечный тракт. Модуляция иммунных реакций. Производители антимикробных веществ. Влияние на метаболическую активность человека (усвоение холестерина, активность лактазы, выработку витаминов и т.д.) / <i>Resistance to destruction by hydrochloric acid of the stomach and bile salts of the small intestine. Adhesion to intestinal epithelial tissue. The ability to colonize the gastrointestinal tract. Modulation of immune responses. Producers of antimicrobial substances. Influence on human metabolic activity (cholesterol absorption, lactase activity, vitamin production, etc.).</i>
Технологичность / <i>Technological effectiveness</i>	Устойчивость к процессам технологической переработки. Масштабируемость от лабораторного к промышленному уровню. / <i>Resistance to technological processing. Scalability from laboratory to industrial level.</i>

Применение методов капсулирования клеток в Са-альгинатные гранулы открывает следующие возможности: дозирование микробов по видам и штаммам в своем микроконтейнере-носителе, комбинирование препаратов из нескольких носителей, использование микроконтейнера как биореактора, наполненного как самими микроорганизмами, так продуцируемыми ими метаболитами в т.ч. и с антибиотическими свойствами. Хорошим подспорьем в разработке технологии капсулирования живых клеток является наличие серийно выпускаемых лабораторных инкапсуляторов, которые дают возможность оптимизировать и масштабировать процесс приготовления удобных для персонализированного применения рецептурных форм пробиотиков, а также различных заквасок на основе симбиотических бактерий при получении ферментированной молочной продукции с пробиотическим потенциалом для ежедневного потребления [17].

Цель исследования: разработка способа капсулирования клеток симбиотических бактерий для создания новых форм пробиотических препаратов с лучшими возможностями по составлению смесей штаммов и пролонгированию их функциональной активности.

Материалы и методы

Микроорганизмы и условия их культивирования

В экспериментах использовали имеющиеся в лабораторной и учрежденческой коллекции «ГКПМ-Оболенск» культуры симбиотических микроорганизмов со статусом GRAS и выделенные нами из пищевых продуктов и отобранные по критерию антагонизма к кишечным патогенам: *Enterococcus faecium* 760 и 1073, *Enterococcus mundtii* B-7424 и 28, *Lactobacillus brevis* 917 и 1073, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* 1020, *Lactobacillus plantarum* Угн3а и 1351, *Lactobacillus helveticus* ВФ, *Lactobacillus salivarius* Оп7/21, 1090 и Оп7/14, *Lactobacillus rhamnosus* EGO, *Propionibacterium freudenreichii* ПКБ_21, *Paenibacillus jamilae* B602, *Bacillus subtilis* СС-1 и ПСФ-19, *Bacillus amyloliquefaciens* 3-5 и ssp. *plantarum* ЛВП-20, *Bacillus mojavensis* 2-11, *Bacillus vallismortis* 3-3, *Bacillus lentus* B-7147 и др.

Лактобациллы и энтерококки культивировали на среде МРС (MRS, HiMedia, Индия) или на лактобакагаре (Лактобакагар, ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), бациллы – на гидролизате рыбной муки с 0,5% дрожжевого экстракта (ГРМ-агар, производство ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) при 30–37°C. При этом лактобациллы в зависимости от вида выращивали в микроаэрофильных либо анаэробных условиях. При выращивании в колбах использовали те же среды, но в виде бульона.

Определение антагонистической активности бактерий проводили методом отсроченного антагонизма и методом агаровых блоков (Фредерика) [18]. В качестве тестовых культур использовали бактерии из коллекции «ГКПМ-Оболенск».

Идентификацию перспективных штаммов осуществляли на основе фенотипических характеристик с использованием набора биохимических тестов API 50CHL, API rapid ID 2 STREP V2.0 и API 50CHB (bioMerieux, France), а чаще – по профилю рибосомальных белков с помощью системы Bruker

Daltonik MALDI TOF Biotyper. Обращалось внимание в первую очередь на микроорганизмы из группы молочнокислый бактерий, энтерококков и энтеробактерий.

Бактерии для опытов по высушиванию и капсулированию получали из биомассы, смытой с плотных питательных сред или же сконцентрированной из питательных бульонов на центрифуге, затем гомогенизированной до показателей оптической плотности не ниже 1 млрд взвеси по стандарту Л.А.Тарасевича.

Методы высушивания

Для целей сохранения штаммов и пополнения коллекций новыми изолятами использовали метод сублимационного высушивания с применением сахарозо-желатиновой защитной среды М.М.Файбича [19], а также экспериментальных вариантов, включающих лактозу, трегалозу, пептон, поливинилпирролидон, декстран, глутамат, тиомочевину и др. Сублимационное высушивание проводили на лиофилизаторе ВТ-4к Virtis (США), а распылительное – на лабораторной установке Mini Spray Dryer B-190 (Büchi, Швейцария). Остаточную влажность сухих образцов определяли на влагомере AND MF-50 (Япония).

Капсулирование микроорганизмов проводили как на лабораторном стенде, состоящем из инжектора, расходной и приемной емкости с мешалкой на штативе, так и с использованием профессиональной установки Encapsulator B-395 Pro (Büchi Labortechnik AG, Швейцария) (рис. 1) согласно ин-



Рис. 1. Лабораторная полуавтоматическая установка B-395 Pro Encapsulator швейцарской фирмы Büchi. Внешний вид в рабочем состоянии.

Fig. 1. Laboratory semi-automatic installation B-395 Pro Encapsulator of the Swiss company Büchi. Appearance in working order.

струкции и разработанным нами методическим рекомендациям [20]. Установка снабжена набором форсунок с диаметром сопла от 80 мкм до 1 мм. Принцип метода заключается во внесении смеси бактериальных клеток с альгинатом натрия (AlgNa) через иголку шприца либо форсунку по каплям в полимеризующий раствор – 0,9% (0,1 М) CaCl₂ с добавлением Твин20, где и формируются капсулы (гранулы) сферической формы. Для приготовления технологических растворов использовали безводные CaCl₂ и NaCl (хч), неионный ПАВ Твин20 («Сигма») и альгиновокислый натрий («Реахим»). Все растворы готовили на деионизованной воде с удельным сопротивлением 18,2 МОм•см и дополнительно фильтровали. Стерилизовали растворы автоклавированием в стандартных условиях. Водные растворы альгината натрия после автоклавирования очищали от деструктурированных фракций центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин, осадок удаляли. После очистки для 3%-го раствора сухой остаток вещества составлял 2,6 ± 0,2%. Через 8–10 мин после окончания процесса полимеризации капсулы/гранулы вынимали из полимеризующего раствора и переносили в стерильный физраствор с 10 мМ CaCl₂. Полученную взвесь отмытых капсул переносили в пластиковую пробирку с закручивающейся крышкой и хранили при температуре 4°C до использования. Все эксперименты проводили в асептических условиях.

Для определения размеров капсул применяли линейку и лазерный дифракционный гранулометр MicroTec Plus фирмы «Фрич» (Германия). При измерении с помощью линейки гранулы выкладывали по 10 штук на стороне шкалы со штрихами от нулевой отметки, фиксировали суммарное значение и его делением на 10 определяли средний диаметр. Морфологию капсул оценивали просмотром в световом микроскопе Eclipse E200 (Nikon, Китай) при минимальном увеличении и с помощью цифрового микроскопа MSZ-APO-V (Correct, Япония).

В качестве способа **микрогранулирования** живых бактерий использовали метод распылительного высушивания на BUCHI Mini Spray Dryer B-190 (Швеция) в ручном экспериментальном режиме.

Декапсулирование образцов

Определение количества живых клеток в гранулах проводили после их раскрытия (декапсулирования). Для этого из пластиковых пробирок миниатюрной ложечкой отбирали по 200 мкл взвеси капсул, переносили в пробирку с 1 мл 1–2%-го раствора цитрата натрия (в зависимости от размера капсул) и выдерживали 30–60 мин для растворения оболочек [21].

Пробы после высушивания вначале регидратировали в физрастворе. Из декапсулированных образцов отбирали по 0,5 мл суспензии, серийно разводили в пробирках с физраствором и высевали на чашки с подходящим питательным агаром. Чашки с посевами выращивали в термостате при 30–37° в течение 24–48 ч с последующим подсчетом числа КОЕ.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами корреляционного и дисперсионного анализа [22].

Результаты исследования и их обсуждение

Для исследований по разработке новых форм капсулированных пробиотиков были использованы различные виды симбиотических микроорганизмов – лактобацилл (*L. brevis*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* и др.), лакто-, энтерококков (*Lactococcus lactis*, *E. faecium*, *E. mundtii* и др.), *Escherichia coli*, пропионовокислых бактерий (*P. freudenreichii*) и спорообразующих бацилл (*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. lentus*).

На распылительной установке Mini Spray Dryer B-190 и в лиофилизаторе ВТ-4к Virtis в сравнительном эксперименте было высушено по 2 образца свежеприготовленной взвеси *L. plantarum*, приготовленной с использованием различающихся по составу защитных сред.

Сухие образцы, высушенные методом распыления, имели вид мелких (1,0–1,5 мм) рассыпчатых гранул, хорошо растворимых в воде. Сухие образцы, высушенные лиофилизацией, имели вид капиллярно-пористой массы. Для определения концентрации живых клеток из них на физрастворе были приготовлены взвеси, соответствующие примерно 10 млрд КОЕ по стандарту мутности Л.И.Тарасевича, разведены в 10⁹ раз и посеяны на чашки с лактобакагаром. Данные по концентрации живых клеток в образцах после распылительного и сублимационного высушивания представлены в табл. 2.

Выживаемость клеток после распылительного высушивания (табл. 2) была крайне мала, что неприемлемо для препаратов пробиотиков, в которых концентрация живых клеток должна быть не ниже 1,0 × 10⁶⁻⁷ на единицу массы или объема. Лиофилизация, как и следовало ожидать, дала существенно более высокие результаты по выживаемости. Однако в результате получения таблеток из лиофилизатов, где задействуются такие технологические процессы, как измельчение сухой массы, влажное гранулирование, смешение с наполнителями, прессование, сопровождающиеся

Табл. 2. Концентрация живых клеток штамма *Lactobacillus plantarum* после распылительного и сублимационного высушивания проб

Table 2. Concentration of live cells of *Lactobacillus plantarum* strain after spray and freeze drying of samples

Пробы и защитные среды / Samples and protective media	Количество КОЕ/мл в пробах до после высушивания / The amount of CFU/ml in samples before and after drying				
	До сушки / Before drying	После сушки / After drying		Выживаемость, % / Survival rate, %	
		Распылом / Sprayer	Сублимацией / Sublimation	Распылом / Sprayer	Сублимацией / Sublimation
№5 (ТГ)*	2,6 × 10 ⁹	9,5 × 10 ⁵	1,45 × 10 ⁹	0,04	55,7
№6 (ТГПе)*	2,4 × 10 ⁹	6,8 × 10 ⁵	1,22 × 10 ⁹	0,03	50,4

*Т – трегалоза, Г – глутамат, Пе – пептон / *T – trehalose, G – glutamate, Pe – peptone.

Табл. 3. Характеристики Са-альгинатных гранул, полученных на лабораторном стенде
 Table 3. Characteristics of Ca-alginate granules obtained at the laboratory stand

Культуры бактерий включенных в гранулы / Cultures of bacteria included in the granules	Средний диаметр гранул, мм / Average diameter of granules, mm	Средний объем гранул, мкл* / Average volume of granules, μl^*	КОЕ**/ гранулу / CFU**/ granule
<i>P. freudenreichii</i> ПКБ_21	2,9	12,8	$1,1 \times 10^5$
<i>E. coli</i> M17	4,6	50,8	$2,0 \times 10^8$
<i>E. mundtii</i> 28	4,4	44,5	$9,2 \times 10^5$
<i>B. lentus</i> ПС-1	2,8	11,5	$1,3 \times 10^5$
<i>L. plantarum</i> Урл3а	2,95	13,4	$3,4 \times 10^5$
<i>L. rhamnosus</i> EGO	3,2	17,2	$2,7 \times 10^5$
<i>L. helveticus</i> ВФ1	3,3	18,8	$2,8 \times 10^5$
<i>L. fermentum</i> П21	3,25	17,9	$5,6 \times 10^5$
<i>L. acidophilus</i> АВ	3,6	24,4	$6,1 \times 10^5$

* Расчет объема гранул проводили по формуле: $V = 4/3 \times \pi \times R^3$; ** колониеобразующие единицы определяли высевом пробы из 10 распущенных с помощью цитрата натрия гранул на питательный агар (для лакто- и пропионовокислых бактерий – на МРС-агар, для остальных – на ГРМ-агар) с пересчетом на объем единичной гранулы.
 *The calculation of the volume of granules was carried out according to the formula: $V = 4/3 \times \pi \times R^3$; ** colony-forming units were determined by seeding a sample of 10 granules dissolved with sodium citrate on nutrient agar (for lacto- and propionic acid bacteria – on MRS-agar, for the rest – on GRM-agar) with conversion to volume of single granule.

воздействиями экстремальных факторов, в т.ч. и кислорода, потери в живых клетках могут быть десятикратными. Поэтому было важно определить практические возможности метода микрокапсулирования живых микроорганизмов – продуцентов антимикробных субстанций и обладающих свойствами пробиотиков – как альтернативного использования многостадийной обработки живых клеток.

В результате проведенных экспериментов был разработан метод капсулирования штаммов симбиотических бактерий в Са-альгинатные гранулы заданного размера и определены их основные свойства.

Метод состоит в смешивании свежеполученной микробной суспензии (не менее 1 млрд живых клеток/мл) с 3%-м раствором альгината натрия (1:1 по объему), гомогенизации смеси и введении ее по каплям через диспенсер (форсунку) в емкость с раствором 0,9% CaCl_2 при непрерывном помешивании. В опытах на модельном стенде внутренний диаметр иглы был 0,3 и 0,7 мм, а на Encapsulator В-395 использовали форсунки с отверстием 80, 150 и 300 мкм.

Было установлено, что полученные на модельном стенде образцы Са-альгинатных гранул отличаются механической прочностью, упругостью, имеют средний объем 23,3 мкл и в них может содержаться от 105 до 108 клеток, в среднем $(4 \pm 2) \times 10^5$ (табл. 3, рис. 2). Морфологически капсулы с пробиотиками (независимо от того, получены они на модельном стенде или на профессиональном инкапсуляторе) представляют собой округлые, почти сферические частицы с визуально неопределяемой оболочкой, «нафаршированные» равномерно распределенными по объему бактериальными клетками (рис. 2, 3).

Результаты выполненных исследований по изготовлению на Encapsulator В-395 лабораторных образцов Са-альгинатных гранул с пробиотиками и определению их свойств представлены в табл. 4 и на рис. 3.

При исследовании антагонистической активности Са-альгинатных гранул с иммобилизованными бактериями установлено следующее. В большинстве случаев гранулы, будучи непосредственно наложенными на газоны тест-штаммов, не давали антимикробной активности. Ее отсут-

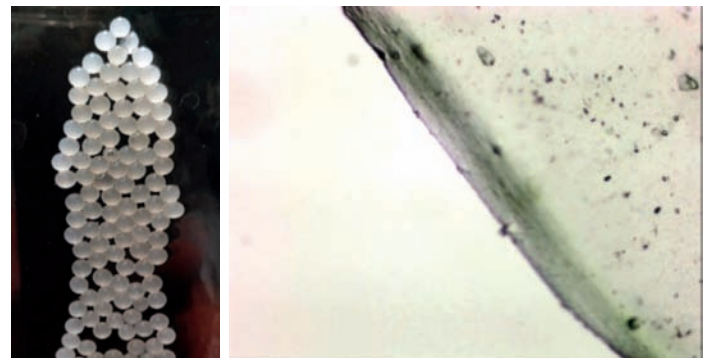


Рис. 2. Внешний вид препарата Са-альгинатных гранул с пропионовокислыми бактериями, полученных на лабораторном стенде (слева, увеличение $\times 2$), и край гранулы, внутри которой видны клетки бактерий (справа, увеличение $\times 600$).
 Fig. 2. Appearance of the preparation of Ca-alginate granules with propionic acid bacteria, obtained on the laboratory stand (left, magnification $2 \times$) and the edge of the granule, inside which bacterial cells are visible (right, magnification $600 \times$).

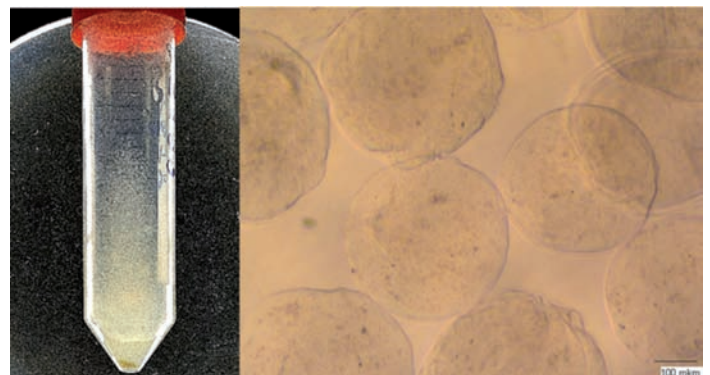


Рис. 3. Внешний вид препарата Са-альгинатных гранул с пропионовокислыми бактериями, полученных на Encapsulator В-395 с форсункой 150 мкм: пробирка с препаратом (слева), микрофотография гранул с *P. freudenreichii* (справа, снято на цифровом микроскопе MSZ-APO-V).
 Fig. 3. Appearance of the preparation Ca-alginate granules with propionic acid bacteria obtained on the Encapsulator В-395 with a 150 μm nozzle: a test tube with the preparation (left), The micrograph of granules with *Pr. freudenreichii* (on the right, taken with a digital microscope MSZ-APO-V).

Табл. 4. Показатели образцов Са-альгинатных гранул с пропионовокислыми бактериями и лактобациллами, приготовленных на Encapsulator B-395

Диаметр сопла фор-сунки, мкм / Fore nozzle diameter, micron	Содержание альгината вес./ об.% / Alginate content w/v%	Культура микроорганизма / Culture of microorganism	Характеристики образцов гранул / Characteristics of pellet samples		
			Значение КОЕ, $T \times 10^{-7}$ в 1 мл капсул / CFU value, $T \times 10^{-7}$ in 1 ml of capsules	Размер основной фракции (мода), мкм / Main fraction size (mode), μm	Средний выход из одного опыта, мл / Average output from one experiment, ml
80	1,5	<i>P. freudenreichii</i>	30,8 ± 10	155 ± 5	20
		<i>L. helveticus</i>	13,9 ± 12,1	154 ± 15	18
	3	<i>P. freudenreichii</i>	26,5 ± 5,5	160 ± 3	19
		<i>L. helveticus</i>	6,5 ± 6,1	154 ± 15	20
150	1,5	<i>P. freudenreichii</i>	57 ± 30	340 ± 30	18
		<i>L. helveticus</i>	39,5 ± 32	320 ± 20	20
	3	<i>P. freudenreichii</i>	25 ± 23	411 ± 20	20
		<i>L. helveticus</i>	35,8 ± 30	405 ± 5	20
300	1,5	<i>P. freudenreichii</i>	26 ± 20	800 ± 20	15
		<i>L. helveticus</i>	25,8 ± 21	885 ± 15	20
	3	<i>P. freudenreichii</i>	13,6 ± 4,1	812 ± 40	20
		<i>L. helveticus</i>	14,5 ± 7	843 ± 20	20

ствие могло быть связано с тем, что бактерии в гранулах находились в состоянии дефицита питания. Если это так, то предварительная инкубация гранул в питательном бульоне должна активировать клеточный метаболизм, результатом которого могло быть появление антимикробной активности.

Действительно, после прединкубации образцов гранул, содержащих пропионовокислые бактерии (ПКБ), *B. lentus* (BL), *E. mundtii* (Em 28) и *L. plantarum* (Lp), вокруг них на питательной среде наблюдалась заметная зона отсутствия роста тест-штаммов (рис. 4 а, б).

Еще одна интересная особенность была свойственна гранулам с *B. lentus*. Если исходная смесь (клетки в растворе натриевой соли альгиновой кислоты) была активна против *Listeria monocytogenes* и *E. coli*, то полученные из нее грану-

лы подавляли лишь листерии (рис. 4 б, в). Это можно объяснить тем, что в микроаэрофильных условиях строгие аэробы *B. lentus* не могли производить метаболиты, ингибирующие рост грамотрицательных эшерихий, либо их было мало.

Выявленная закономерность свидетельствует о возможности использования гранул с иммобилизованными полезными бактериями в качестве микробиореакторов. Они, достигнув нижних отделов кишечника, способны инициировать продукцию антимикробных видоспецифических метаболитов.

Проведены эксперименты по обезвоживанию Са-альгинатных гранул с использованием методов сублимационного и конвективного высушивания. После сушки наблю-

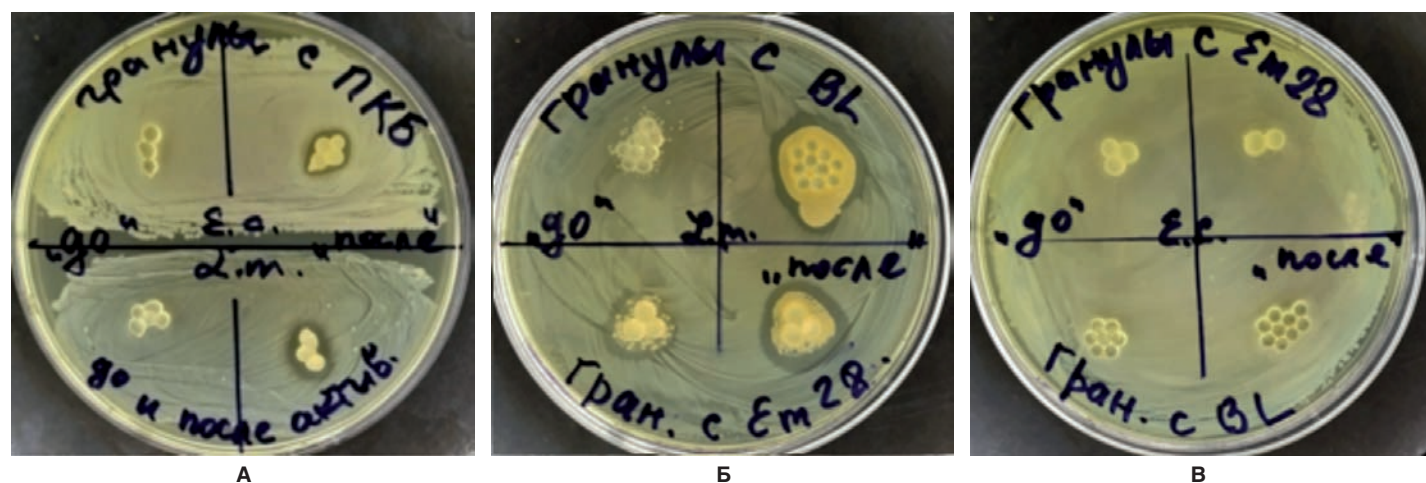


Рис. 4. Результаты тестирования антимикробной активности Са-альгинатных гранул с монокультурами бактерий.

Fig. 4. Results of testing the antimicrobial activity of Ca-alginate granules with bacterial monocultures.

* А – гранулы с пропионовокислыми бактериями (ПКБ), наложенные на газоны тест-штамма *E. coli* (E.c.) и *L. monocytogenes* (L.m.); Б – гранулы с *B. lentus* (BL) и *E. mundtii* 28 (Em 28), наложенные на газон тест-штамма *L. monocytogenes*; В – то же, как в Б, но с тест-штаммом *E. coli*. Во всех чашках: «до» – исходные гранулы; «после» – гранулы, активированные путем 5 мин инкубации в питательном бульоне.

*A – granules with propionic acid bacteria (PBC) applied to the lawns of the *Escherichia coli* (E.c.) and *Listeria monocytogenes* (L.m) test strains; B – granules with *Bacillus lentus* (BL) and *Enterococcus mundtii* 28 (E.m 28) applied to the lawns of the *L. m.* test strain; C – the same as in B, but with the test strain E.c. In all cups: “before” – the initial granules; “after” – activated granules by 5 min. incubation in nutrient broth.

Табл. 5. Сохраняемость влажных Са-альгинатных гранул при температуре 4–7°C и влияние способа раскрытия гранул
 Tab. 5. Preservation of wet Ca-alginate granules at a temperature of 4–7°C and the influence of the method of opening the granules

№№	Активное начало и дата получения / Active start and date of receiving	Способ раскрытия гранул / Granule opening method	Количество живых клеток, КОЕ/мл в 10 гранулах / The number of living cells, CFU / ml in 10 granules	
			Исходное Initial	Конечное final
1	<i>E. coli</i> M17 01.09.21	Обработка цитратом натрия* / Treatment with sodium citrate*	6 × 10 ⁹	7 × 10 ⁴
		Обработка Полисорбом** / Treatment with Polysorb**		5 × 10 ⁶
2	<i>Lb. plantarum</i> 27.08.21	Обработка цитратом натрия / Treatment with sodium citrate*	2,9 × 10 ⁸	3 × 10 ³
		Обработка Полисорбом / Treatment with Polysorb**		1 × 10 ⁵
3	<i>Ent. mundtii</i> 28 14.09.21	Обработка цитратом натрия / Treatment with sodium citrate*	3,1 × 10 ⁸	1 × 10 ⁶
		Обработка Полисорбом / Treatment with Polysorb**		6 × 10 ⁷

*по методике МЛ 78095326-082-2022 (на 10 гранул во флаконе на 10 мл добавить 2 мл 2%-го раствора цитрата натрия, перемешать до полного их растворения);
 **на 10 гранул во флаконе добавить «Полисорб МП» (Россия, Челябинск) до покрытия слоем, не менее чем в 2 раза по высоте превышающим их диаметр и встряхивать не менее 60 мин до полного распада.

*according to the method ML 78095326-082-2022 (for 10 granules in a 10 ml vial, add 2 ml of 2% sodium citrate solution, stir until they are completely dissolved);

** add Polysorb MP (Russia, Chelyabinsk) to 10 granules in vial until coated with a layer of at least 2 times their diameter in height and shake for at least 60 minutes. until complete collapse.

дается изменение формы и размера гранул: из сферических они становятся угловатыми, напоминающими семена пшеницы, мака и в 1,35 ± 0,2 раза (на 26% в среднем) уменьшаясь в диаметре. Однако эти изменения были не критичными для жизнеспособности инкапсулированных культур: потери по живым клеткам варьировали в пределах порядка.

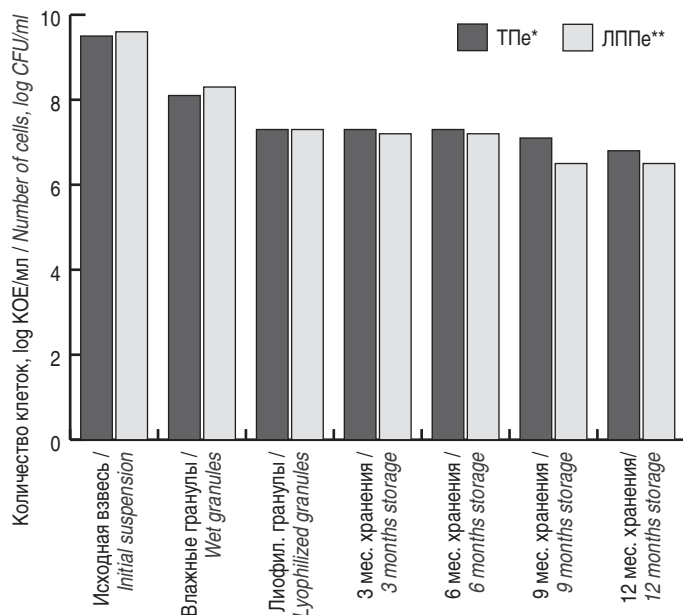


Рис. 5. Изменение количества живых клеток в процессе получения на лабораторном стенде Са-альгинатных гранул с *Propionibacterium freudenreichii*, их лиофилизации и последующего хранения.

Fig. 5. Change in the number of living cells in the process of obtaining Ca-alginate granules with *Propionibacterium freudenreichii* on the laboratory stand, the lyophilization and subsequent storage.

№6* – образец гранул, высушенных с использованием защитной среды на основе трегалозы (Т) и пептона (Пе); №7** – то же основе лактозы (Л), поливинилпирролидона 90000 (П) и пептона (Пе).

No 6* – the sample of granules dried using a protective medium based on trehalose (T) and peptone (Pe); No 7** – the same based on lactose (L), polyvinylpyrrolidone 90000 (P) and peptone (Pe).

Наблюдение за выживаемостью образцов лиофилизированных гранул после года хранения при температуре 6 ± 2°C, как видно из рис. 5, показало, что концентрация живых клеток пропионовокислых бактерий была выше в пробах, где в качестве стабилизатора использовалась трегалоза (№6), а не лактоза (№7).

На хранение были оставлены и влажные Са-альгинатные гранулы с живыми бактериями в дистиллированной воде. Вопреки ожиданиям, микроорганизмы в них весьма неплохо сохранились (рис. 6). Наиболее высокие показатели по количеству живых клеток были у гранул, содержащих бациллы, энтерококки и пропионовокислые бактерии. Далее, по убыванию, следовали кишечная палочка и лактобациллы.

Установлено, что на величину оценки жизнеспособности бактерий во влажных гранулах имеет значение и способ ее определения. Так, в сравнительных экспериментах, где наряду с цитратом натрия, известным «разрушителем» Са-альгинатных гранул, применение в этих же целях препарата «Полисорб ПМ», представляющего собой дисперсный диоксид кремния, приводило к более высоким показателям жизнеспособности бактерий (табл. 5).

Но как раскрыть Са-альгинатные гранулы для выхода из них бактерий? При смешивании влажных гранул с фармпрепаратом «Полисорб ПМ» (дисперсный диоксид кремния, который используется для купирования детоксикаций при отравлениях и аллергиях) происходил их постепенный распад с высвобождением клеток. По сравнению с известным «разрушителем» Са-альгинатных гранул, применение в этих же целях Полисорба приводило к более высоким показателям по оценке количества жизнеспособных клеток в образцах (табл. 5). Полученные данные по удовлетворительной сохраняемости бактерий в Са-альгинатных гранулах дают основания для разработки инновационной формы пробиотического препарата с живыми функционально-активными штаммами симбиотических бактерий. Например, жидкая форма пробиотика BioGaia® (Швеция) на основе *Lactobacillus reuteri*

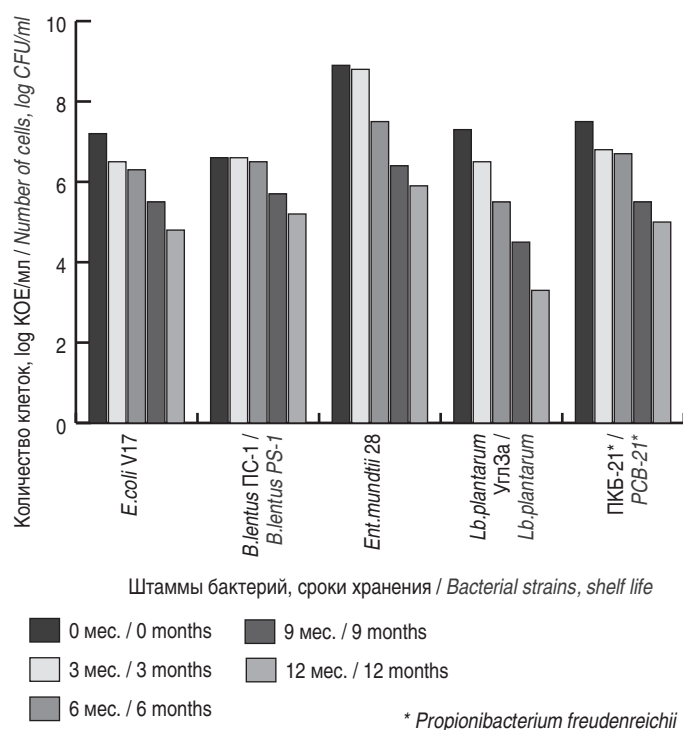


Рис. 6. Сравнительная динамика изменения концентрации живых бактерий во влажных Са-альгинатных гранулах после хранения при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$ в зависимости от вида штамма.

Fig. 6. Comparative dynamics of changes in the concentration of live bacteria in wet Ca-alginate granules after storage at a temperature of $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$, depending on the type of strain.

имеет срок хранения всего 2,5 мес. В наших же экспериментах срок годности большинства образцов препаратов с живыми капсулированными бактериями достигает полугодия (рис. 6, табл. 5). Технические решения, требующиеся для доведения такого препарата до готовой лекарственной формы, не составят существенной проблемы.

Результаты исследования и их обсуждение

Более чем 70-летняя история применения пробиотиков свидетельствует о несомненной их пользе для здоровья, поскольку они обеспечивают естественную защиту организма от желудочно-кишечных расстройств и воспалительных процессов, вызываемых бактериальными патогенами [1, 6]. Пробиотики для медицинского применения согласно Государственной фармакопее выпускают в различных лекарственных формах: лиофилизаты во флаконе, суспензии, таблетки, капсулы, порошки, суппозитории [18]. Если первые подвергаются воздействию лишь факторов замораживания и высушивания, то для получения таблеток сухую биомассу затем еще измельчают, смешивают с наполнителями, гранулируют с частичным увлажнением и прессуют. Немного короче технологическая цепочка при получении капсулированных форм, заканчивающаяся фасовкой порошков в пластиковые емкости. Эти технологические процессы сопровождаются действиями кислорода, механических сдвиговых усилий, что приводят к потерям жизнеспособности клеток бактерий, порой существенным. Все это, а также необходимость регидратации, сказывается на эффективности сухих форм препаратов при целевом применении.

На этом фоне более выигрышной является суспензионная форма, представляющая собой взвесь бактерий, слитой с ферментера и стабилизированной разбавителями. Однако к ее минусам следует отнести весьма ограниченные сроки хранения. Поэтому актуальным остается поиск новых форм пробиотиков с лучшими возможностями по составлению штаммовых композиций, защите клеток от внешних воздействий, а также с более высокой их жизнеспособностью, в применении не требующих дополнительной реактивации. Все эти преимущества могли бы быть реализованы при создании форм пробиотиков, иммобилизованных на биосовместимых носителях, таких как, например, природные полисахариды – альгинаты [6, 14, 15, 23, 24].

Технология микрокапсулирования живых микроорганизмов дает возможность использовать не только строго отобранные по всем правилам штаммы пробиотиков (табл. 1), но и другие, с более широкими возможностями по продукции полезных метаболитов. Примером может быть использование штаммов *B. subtilis*, хорошо известных в ветеринарии благодаря высокой эффективности за счет продукции множества ферментов и бактериоцинов [25–27]. Благодаря этому пробиотик на основе *B. subtilis* под названием «Биоспорин» стали выпускать и для людей с кодом «A07FA Антидиарейные микроорганизмы» [28].

Исследована сохраняемость микроорганизмов в составе влажных и лиофилизированных гранул в течение года в условиях бытового холодильника, что дает надежду на создание жидкой функционально активной формы капсулированного пробиотика с ценой ниже известных аналогов.

В перспективе для повышения стабильности Са-альгинатных гранул с живыми симбионтами при прохождении через желудочно-кишечный тракт можно создавать вокруг них дополнительные оболочки, используя, например, хитозан и полилизин [29–31].

Заключение

В результате проведенных экспериментов был разработан метод капсулирования штаммов симбиотических бактерий в Са-альгинатные гранулы заданного диапазона размеров и определены их основные свойства. Объектами капсулирования были представители различных видов молочнокислых микроорганизмов, кишечные эшерихии, пропионовокислые бактерии и бациллы.

Определены условия обезвоживания влажных гранул с использованием лиофилизации, обеспечивающей сохранение рекомендованного количества жизнеспособных бактерий – не менее 10^6 КОЕ в дозе.

Показано, что гранулы с иммобилизованными бактериями способны производить в них антимикробные видоспецифические метаболиты.

В целом проведенные исследования указывают на следующие перспективы, которая предоставляет технология Са-альгинатных гранул с живыми симбионтами: 1) получение оригинальных рецептур из перспективных заготовок штаммов в виде монопрепаратов под конкретную симптоматику и с учетом индивидуальных особенностей пациентов; 2) доступность и высокая достоверность контроля биологической активности монопрепаратов как основы для составления

композиций «в одном флаконе»; 3) применение в комплексном препарате набора гранул, наполненных как живыми бактериями, так и метаболитами – ферментами, короткоцепочечными жирными кислотами, бактериоцинами; 4) высокая сохраняемость клеток как во влажных, так и в высушенных гранулах, что будет способствовать доставке функционально активного препарата в нижние отделы кишечного тракта, где локализуются ключевые представители микробиома и разворачивается основное «поле битвы» за пищу. Наконец, такого рода препараты толерантны и удобны в применении – «положи в рот и запей».

Намечены подходы по раскрытию гранул с освобождением бактерий *in vivo* в случае необходимости.

Область применения результатов – препаратостроение: новые формы инкапсулированных про- и метаболитов с улучшенными возможностями по функциональному составу и дозировке, спектру активности против кишечных патогенов, целевой доставке, пролонгированной жизнеспособности и персональному использованию.

Область применения продукта – медицина, ветеринария и пищевая индустрия.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора по теме №080 «Получение инкапсулированных препаратов для борьбы с бактериальными патогенами на основе штаммов, обладающих пробиотическими свойствами».

Financial support

The work was carried out within the framework of the industry program of Federal service on the topic No 080 «Obtaining encapsulated drugs to combat bacterial pathogens based on strains with probiotic properties».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Кайбышева ВО, Никонов ЕЛ. Пробиотики с позиции доказательной медицины. Доказательная гастроэнтерология. 2019;8(3):45-54. / Kaibysheva VO, Nikonov EL. Probiotics from the standpoint of evidence-based medicine. Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterology. 2019;8(3):45-54. DOI: 10.17116/dokgastro2019803145 (In Russian).
2. Kaplan Y, Reich S, Oster E, Maoz S, Levin-Reisman I, Ronin I, et al. Observation of universal ageing dynamics in antibiotic persistence. Nature. 2021 Dec;600(7888):290-294. DOI: 10.1038/s41586-021-04114-w
3. Halloran K, Underwood MA. Probiotic mechanisms of action. Early Hum Dev. 2019 Aug;135:58-65. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2019.05.010
4. Gardiner GE, O'Sullivan E, Kelly J, Auty MA, Fitzgerald GF, Collins JK, et al. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. Appl Environ Microbiol. 2000 Jun;66(6):2605-12. DOI: 10.1128/AEM.66.6.2605-2612.2000
5. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. Biotechnol Prog. 2007 Mar-Apr;23(2):302-15. DOI: 10.1021/bp060268f
6. Mitropoulou G, Nedovic V, Goyal A, Kourkoutas Y. Immobilization technologies in probiotic food production. J Nutr Metab. 2013;2013:716861. DOI: 10.1155/2013/716861
7. Orive G, Hernández RM, Rodríguez Gascón A, Calafiore R, Chang TM, de Vos P, et al. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. Trends Biotechnol. 2004 Feb;22(2):87-92. DOI: 10.1016/j.tibtech.2003.11.004
8. Rajam R, Subramanian P. Encapsulation of probiotics: past, present and future. J Basic Appl Sci (2022)11. DOI: 10.1186/s43088-022-00228-w
9. Sidira M, Galanis A, Ypsilantis P, Karapetsas A, Progiaki Z, Simopoulos C, et al. Effect of probiotic-fermented milk administration on gastrointestinal survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 and modulation of intestinal microbial flora. J Mol Microbiol Biotechnol. 2010;19(4):224-30. DOI: 10.1159/000321115
10. Heidebach T, Först P, Kulozik U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. Crit Rev Food Sci Nutr. 2012;52(4):291-311. DOI: 10.1080/10408398.2010.499801
11. Heidebach T, Först P, Kulozik U. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. International Dairy Journal. 2009; 19(2):77–84.
12. Doherty SB, Gee VL, Ross RP, Stanton C, Fitzgerald GF, Brodkorb A. Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. J Microbiol Methods. 2010 Mar;80(3):231-41. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.12.009
13. Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B. An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia Food Science. 2011.1806–1815.
14. Afzaal M, Saeed F, Ateeq H, Akhtar MN, Imran A, Ahmed A, et al. Probiotics encapsulated gastroprotective cross-linked microgels: Enhanced viability under stressed conditions with dried apple carrier. Food Sci Nutr. 2022 Nov 4;11(2):817-827. DOI: 10.1002/fsn3.3116
15. Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial application. Journal of Food Engineering. 2011;104(4):467-483.
16. Ouwehand C, Bianchi Salvadori B, Fondén R, Mogensen G, Salminen S, Sellars R. Health effects of probiotics and culture-containing dairy products in humans. Bulletin International Dairy Federation. 2003;380:4-19.
17. Encapsulator B-395 Pro. Operation Manual (www.buchi.com/PB_11593484_B-395_en.pdf).
18. Общая фармакопейная статья «Пробиотики» ОФС.1.7.1.0008.15 Министерства здравоохранения РФ (<http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>). / Obshchaya farmakopeinaya stat'ya «Probiotiki» OFS.1.7.1.0008.15 Ministerstva zdravookhraneniya RF (<http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>). (In Russian).
19. Файбич ММ. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1968;2:59-66. / Faibich MM. Stabilizatsiya vaktsinnykh preparatov v protsesse vysushivaniya i khraneniya. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1968;2:59-66. (In Russian).
20. Методические рекомендации «Инкапсулирование клеток пробиотических микроорганизмов в альгинатную матрицу с использованием установки В-395 Pro Encapsulator (Buchi, Швейцария)». ФБУН ГНЦ ПМБ. 2022. / Metodicheskie rekomendatsii «Inkapsulirovanie kletok probioticheskikh mikroorganizmov v al'ginatnyuyu matritsu s ispol'zovaniem ustanovki B-395 Pro Encapsulator (Buchi, Shveysariya)». FBUN GNTs PMB. 2022. (In Russian).
21. МЛ 78095326-082-2022. Методика лабораторная «Раскрытие кальций-альгинатных капсул с иммобилизованными микроорганизмами». ФБУН ГНЦ ПМБ. 2022. / ML 78095326-082-2022. Metodika laboratornaya «Raskrytie kal'tsii-al'ginatnykh kapsul s immobilizovannymi mikroorganizmami». FBUN GNTs PMB. 2022. (In Russian).
22. Гордиенко МГ. Статистическая обработка результатов пассивного и активного экспериментов в биотехнологии. Изд. РГХТУ им. Менделеева. Москва.

2015. / Gordienko MG. Statisticheskaya obrabotka rezul'tatov passivnogo i aktivnogo eksperimentov v biotekhnologii. Izd. RGKhtU im. Mendeleeva. Moscow. 2015. (In Russian).
23. Похиленко ВД, Левчук ВП, Калмантаев ТА, Лиховидов ВЕ, Сахаров БВ. Микробиом и здоровье человека. Сборник научных трудов. Специальный выпуск: по материалам межрегиональной научно-практической конференции. Нижний Новгород. 2022; 403-408. / Pokhilenko VD, Levchuk VP, Kalmantaev TA, Likhovidov VE, Sakharov BV. Mikrobiom i zdorov'e cheloveka. Sbornik nauchnykh trudov. Spetsial'nyi vypusk: po materialam mezhhregional'noi nauchno-prakticheskoi konferentsii. Nizhnii Novgorod. 2022; 403-408.
24. Сомов АН, Похиленко ВД, Дунайцев ИА, Клыкова МВ, Чукина ИА. Капсулированные в альгинат пробиотики: получение и некоторые свойства. Биотехнология. 2022;38(5):44-52. / Somov AN, Pokhilenko VD, Dunaitsev IA, Klykova MV, Chukina IA. Kapsulirovannye v al'ginat probiotiki: poluchenie i nekotorye svoistva. Russian Journal of Biotechnology. 2022;38(5):44-52. (In Russian).
25. Похиленко ВД, Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность. Химическая и биологическая безопасность. 2007;2-3:20-41. / Pokhilenko VD, Perelygin VV. Probiotiki na osnove sporoobrazuyushchikh bakterii i ikh bezopasnost'. Khimicheskaya i biologicheskaya bezopasnost'. 2007;2-3:20-41. (In Russian).
26. Parisot J, Carey S, Breukink E, Chan WC, Narbad A, Bonev B. Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Feb;52(2):612-8. DOI: 10.1128/AAC.00836-07
27. Сидорова ТМ, Асатурова АМ, Хомяк АИ. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов. Сельскохозяйственная биология. 2018;53(1):29-37. / Sidorova TM, Asaturova AM, Homyak AI. Biologically active metabolites of *Bacillus subtilis* and their role in the control of phytopathogenic microorganisms. Agricultural Biology. 2018;53(1):29-37. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.29rus (In Russian).
28. <https://www.gastroscan.ru/handbook/118/5648>
29. Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. J Control Release. 2012 Aug 20;162(1):56-67. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.06.003
30. Yeung TW, Üçök EF, Tiani KA, McClements DJ, Sela DA. Microencapsulation in Alginate and Chitosan Microgels to Enhance Viability of *Bifidobacterium longum* for Oral Delivery. Front Microbiol. 2016 Apr 19;7:494. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00494
31. Ta LP, Bujna E, Antal O, Ladányi M, Juhász R, Szécsi A, et al. Effects of various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. Int J Biol Macromol. 2021 Jul 31;183:1136-1144. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.170

Информация о соавторах:

Дунайцев Игорь Анатольевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Калмантаев Тимур Ахмерович, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Левчук Владимир Павлович, научный сотрудник отдела биотехнологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Сомов Алексей Николаевич, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Чукина Ирина Анатольевна, инженер отдела биотехнологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Igor A. Dunaitsev, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Timur A. Kalmantaev, PhD in Biological Sciences, Researcher of Department of biological technologies State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Vladimir P. Levchuk, Scientific Researcher of the Biotechnological's Technology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

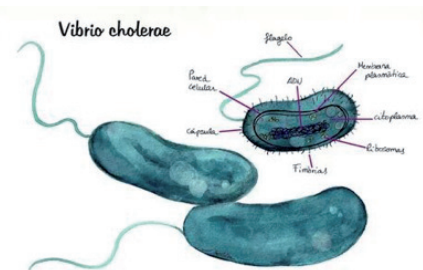
Alexey N. Somov, PhD (Physical-Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Anthrax Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Irina A. Chukina, Engineer of Department of Biological Technologies State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

НОВОСТИ НАУКИ

Роль D-аминокислот в стресс-индуцированном ответе у бактерий холеры

Чтобы исследовать благоприятные ниши, избегая при этом угроз, многие бактерии используют систему навигации по хемотаксису. Несмотря на десятилетия исследований хемотаксиса, большинство сигналов и сенсорных белков до сих пор неизвестны. Многие виды бактерий выделяют D-аминокислоты в окружающую среду; однако их функция остается в значительной степени непризнанной. Показано, что D-аргинин и D-лизин являются хемотаксическими репеллентными сигналами для возбудителя холеры *Vibrio cholerae*. Эти D-аминокислоты воспринимаются одним хеморецептором MCPDRK, транскрибируемым совместно с ферментом рацемазой, который синтезирует их под контролем сигма-фактора реакции на стресс RpoS. Структурная характеристика этого хеморецептора, связанного либо с D-аргинином, либо с D-лизином, позволила точно определить остатки, определяющие его специфичность. Специфичность этих D-аминокислот, по-видимому, ограничена теми ортологами MCPDRK, которые транскрипционно связаны с рацемазой. Эти результаты показывают, что D-аминокислоты могут формировать биоразнообразие и структуру сложных микробных сообществ в неблагоприятных условиях.



Irazoki O, Ter Beek J, Alvarez L, et al.

D-amino acids signal a stress-dependent run-away response in *Vibrio cholerae*.
Nat Microbiol. 2023 Aug;8(8):1549-1560. DOI: 10.1038/s41564-023-01419-6