АННОТАЦИЯ

Диссертации на соискание степени доктора философии (PhD)

По специальности «8D05101-Биология»

Жантлесовой Сирины Дуйсеновны

Способы использования адсорбционной и пространственной иммобилизации пробиотиков для их защиты и доставки в желудочно-кишечный тракт

Общая характеристика диссертационной работы. Проведены комплексные исследования, направленные на создание новой полисахаридной пребиотической матрицы с иммобилизованной в ней биопленкой пробиотика. В результате получены и охарактеризованы синбиотические микрогранулы на основе бактериальной целлюлозы (БЦ), пребиотика – пуллулана (ПУЛ) и биопленки *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Актуальность темы исследования. Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при потреблении в адекватных количествах полезны для организма человека. Идея их использования состоит в том, что прием пробиотиков может помочь восстановить и укрепить местную кишечную микробиоту. Для этого экзогенные пробиотики должны успешно, т. е. без значительных потерь, достичь толстого кишечника и хотя бы транзиторно колонизировать его слизистую оболочку, чтобы «поработать» в нем. В процессе доставки в целевой сайт пробиотики подвергаются негативному воздействию соляной кислоты желудка, желчи и пищеварительных ферментов. Следовательно, создание способа защиты клеток пробиотиков от стрессовых воздействий в процессе транспортировки представляет актуальную задачу, которая реализована в данном диссертационном исследовании.

В последние годы все больший интерес проявляется к получению микрокапсулированных форм пробиотиков. Однако, недостаточность существующего технологического оснащения ограничивает промышленное использование метода микрокапсулирования. Это послужило предпосылкой для осуществления данной работы, основной целью которой является разработка другого, более простого и дешевого технологического приема иммобилизации пробиотиков – включение клеток в пространственную структуру полимера, известное как «мембранный захват» или адгезивный метод. Он основан на том, что многие микроорганизмы в их естественной среде обитания после первоначального прикрепления к субстрату – образуют колонии, а затем и биопленки, которые определяются как заключенные в матрицу популяции микроорганизмов.

Биопленка наделяет клетки многими полезными свойствами, включая снижение клеточного вымывания, повышенную биохимическую стабильность, стимулирование межклеточного взаимодействия посредством включения аутоstimуляторов кворума и улучшенное распределение субстрата. С микрoэкологической точки зрения, пребывание микроорганизма внутри кишечной биопленки является избирательным преимуществом, которое позволяет ему существовать в защищенной нише, позволяющей им

непосредственно взаимодействовать с хозяином. Поскольку не все пробиотические микроорганизмы могут образовывать биопленки, искусственное, «принудительное» включение их в особое средство доставки могло бы облегчить колонизацию и удержание полезных штаммов в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), тем самым усиливая их пробиотические свойства.

В качестве несущей основы матрицы представляется перспективным использование БЦ. Наряду с высокой пористостью и прочностью, БЦ обладает высокой адсорбционной способностью и полностью биосовместима как с микроорганизмами, так и с организмом человека.

Хотя иммобилизация биопленок обеспечивает физический защитный барьер от внешних стрессов, можно использовать дополнительный прием для повышения устойчивости и жизнеспособности клеток. Он предполагает включение в матрикс специального полисахаридного компонента, обладающего пребиотической активностью. Ожидается, что присутствие пребиотика в матриксе будет стимулировать пролиферацию клеток, способствуя образованию в нем пробиотической биопленки, обеспечивающей дополнительную защиту. Представляется, что рабочий модельный штамм пробиотика должен, во-первых, оказывать благотворное воздействие на здоровье человека и, во-вторых, обладать способностью образовывать биопленки на абиотических поверхностях. Такими свойствами обладает *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Разработка и получение иммобилизованных в биополимерные мембраны пробиотиков требует обоснованного выбора дополнительных ингредиентов для матрицы, способа иммобилизации штамма и получения стабильной товарной формы биологически активного компонента на основе биопленки пробиотической культуры. Предполагается, что данная синбиотическая система (нейтральный носитель + пребиотик + пробиотик) может быть использована для доставки «рабочего штамма» в целевую нишу – толстый кишечник.

Цель работы: исследование возможности использования комплексной полисахаридной матрицы с пробиотическими биопленками (ПМПБ) в качестве транспортной системы для их доставки в организм хозяина.

Задачи исследования:

- провести скрининг микробных полисахаридов по их пребиотической активности;
- подобрать оптимальный способ включения пребиотического компонента в матрицу БЦ;
- определить влияние состава культуральной среды на формирование биопленки *L. rhamnosus* GG;
- получить микрогранулы ПМПБ путем иммобилизации биопленок *L. rhamnosus* GG в матричный комплекс бактериальная целлюлоза/пуллулан (БЦ/ПУЛ);
- определить жизнеспособность пробиотика при транспортировке через ЖКТ и при его контролируемом высвобождении в толстом кишечнике в условиях *in vitro* и *in vivo*;

- определить состав и разнообразие микробиома добровольцев после приема экспериментального образца БАД «Лактоцелл».

Объекты исследования: полисахаридный матричный комплекс БЦ/ПУЛ; микрогранулы полисахаридной матрицы с пробиотическими био пленками.

Методы исследования: Пребиотическая активность – степень гидролиза, серийные разведения с последующим посевом на среду MRS. Получение пленок БЦ/ПУЛ – добавление полисахарида-пребиотика в ферментационную среду с продуцентом БЦ, совместное культивирование продуцентов БЦ и ПУЛ. Исследование структуры пленок и микрогранул – сканирующая электронная микроскопия. Прочность пленок – машина “Instron”. ИК-спектр – Фурье-спектрофотометр Jasco FT/IR6200. Био пленкообразование – метод микропланшетов. Имобилизация пробиотиков – инкубация в био пленкоиндуцирующей среде. Флуоресцентная микроскопия – флуоресцентный микроскоп Biozero. Исследование толерантности к желудочной кислоте и солям желчных кислот, высвобождение пробиотиков – искусственная модель ЖКТ. Исследование *in vivo* на крысах – микроскопирование, метод FISH, оценка жизнеспособности. Метагеномный анализ – добровольцы, принимавшие БАД «Лактоцелл».

Научная новизна результатов исследования.

Оптимизирована питательная среда, культивирование на которой индуцирует био пленкообразование *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Сконструирована питательная среда и подобраны условия для совместного выращивания продуцентов экзополисахаридов *Komagataeibacter xylinus* C-3 и *Aureobasidium pullulans* C-7 для получения биокомпозиата БЦ/ПУЛ.

Впервые показано, что бесклеточный экстракт фекалий – «фекалаза» может применяться для моделирования ферментативной активности кишечного микробиома.

Впервые получены синбиотические микрогранулы с био пленкой пробиотической культуры.

Разработан новый пробиотический БАД «Лактоцелл», предназначенный для коррекции и восстановления кишечного микробиома.

Теоретическая значимость исследований. Диссертационная работа имеет прикладной характер и содержит новые знания о процессе имобилизации пробиотической культуры в микрогранулы био полимеров системы нейтральный носитель–пребиотик. В данном исследовании рассматривается возможность имобилизации не планктонных клеток, а пробиотических био пленок. Теоретически и экспериментально обоснован выбор состава композитного материала пребиотического действия. Обозначены пути эффективного и доступного способа получения композитов БЦ с биологически активным компонентом. Это исследование подтвердило преимущество метода совместного культивирования продуцентов как более эффективного подхода, повышающего рентабельность способа получения комплексного полисахаридного матрикса. Полученные сведения об

изменениях в составе микробиоты кишечника после приема БАД «Лактоцелл» могут быть полезными при дальнейшем развитии научной основы для использования микробиома в профилактике заболеваний.

Практическая ценность исследования.

Создана питательная среда для искусственной симбиотической микробной системы продуцент БЦ + продуцент ПУЛ.

Разработанная новая модель толстого кишечника с микробными метабиотиками может стать важным прогностическим инструментом для определения эффективности систем доставки пробиотиков в их экологическую нишу.

Новый комплексный иммобилизованный пробиотический БАД «Лактоцелл» может использоваться для профилактики микроэкологических изменений в ЖКТ и коррекции собственной микрофлоры.

Микрогранулы полисахаридной матрицы с иммобилизованной пробиотической культурой могут найти применение в функциональных продуктах питания.

Основные положения, выносимые на защиту:

- выбор оптимальных источников углерода и минеральных компонентов питательной среды способствует индукции и стимуляции образования биопленки *Lactobacillus rhamnosus* GG;

- совместное культивирование продуцентов биополимеров упрощает и удешевляет способ получения композита из микробных полисахаридов;

- синбиотическая система (нейтральный носитель + пребиотик + пробиотик) обеспечивает защиту в стрессовых условиях ЖКТ и сохранность объёма жизнеспособных клеток пробиотической культуры, позволяя осуществлять эффективную доставку пробиотиков в толстый кишечник.

Основные результаты исследований и выводы:

1. На модели желудочного сока определена устойчивость к гидролизу трех микробных полисахаридов, которая располагалась в следующем порядке: ПУЛ (97%) > КК (93%) > ГК (90%). Установлено, что ПУЛ лучше стимулирует рост пробиотического штамма *Lactobacillus rhamnosus* GG по сравнению с ксантаном и гелланом. Пребиотическая оценка ПУЛ составляла – 0,33, а показатели ксантана и геллана – 0,11 и 0,23.

2. Стратегия кокультивирования продуцентов является предпочтительной для получения биокомпозита БЦ/ПУЛ, нежели способ *in situ*. Масса пленки при добавлении предварительно синтезированного пребиотика в ферментационную среду с продуцентом БЦ составила 11,9 г/л, при совместном культивировании – 16,8 г/л. Методом ИК спектроскопии установлено, что включение ПУЛ в БЦ-пленку происходит путем химического взаимодействия. Композит БЦ/ПУЛ образует сеть волокон (средний размер – 80 ± 4 нм), обеспечивающую высокие механические свойства (прочность на разрыв – $27 \pm 0,7$ МПа; относительное удлинение при разрыве – $14 \pm 0,5\%$).

3. Подобрана оптимальная модификация состава среды PYG_m, при выращивании на которой происходит индукция и стимуляция образования биопленки *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103. Предлагаемый состав модифицированной среды PYG_m (г/л): пептон – 15, гидролизат казеина – 5, глюкоза – 5, дрожжевой экстракт – 10, MgSO₄ – 0,1, инулин – 1, желчь – 0,5.

4. Разработана схема получения микрогранул ПМПБ: совместное культивирование продуцентов полисахаридов для образования композита БЦ/ПУЛ → измельчение и грануляция матрицы → иммобилизация пробиотика в среде, индуцирующей биопленкообразование → лиофилизация. Готовые к употреблению синбиотические микрогранулы содержали 9,82 log КОЕ/г.

5. Выживаемость иммобилизованных LGG в микрогранулах ПМПБ после инкубации в модельной системе желудок + двенадцатиперстная кишка на 6 log выше, чем у свободных клеток. Титр LGG в соке толстого кишечника увеличился на 1,5 log (11,4 log КОЕ/г) по сравнению с исходным значением (9,75 log КОЕ/г). Пероральное введение микрогранул ПМПБ крысам продемонстрировало, что пробиотики успешно высвобождаются из матрикса в среде толстого кишечника. Наиболее высокая концентрация жизнеспособных иммобилизованных LGG в образцах фекалий выявлена между 3 и 7 днями после начала потребления (7,38-7,63 log КОЕ/г), через неделю после последнего приема было обнаружено 5,12 log КОЕ/г.

6. Употребление биологически активной добавки «Лактоцелл» способствовало увеличению разнообразия микробиома добровольцев. Перед началом приема пробиотических микрогранул преобладали бактерии типа *Firmicutes*, однако после курса пробиотика наблюдалось увеличение уровня *Bacteroidetes*. После употребления «Лактоцелл» обнаружено значительное присутствие бактерий с пробиотическими свойствами, включая виды *Lactobacillus rhamnosus*. Установлено повышение активности метаболизма аминокислот, жирных кислот, витамина B1, полиаминов и пирувата.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа была выполнена в рамках проекта AP09259491 «Биотехнологии использования полисахаридной матрицы с пробиотическими биопленками для создания комбинированных молочных продуктов» (2021-2023 гг.).

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 9 печатных работах, включая 3 статьи в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 2 статьи в республиканских научных журналах, включенных в перечень КОКСНВО МНВО РК, 4 тезиса в материалах международных конференций.

Личный вклад автора заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, анализе, интерпретации и оформлении полученных результатов, подготовке рукописей публикаций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 107 страницах. Содержит 4 таблицы, 28 рисунков, 1 приложение, список использованных источников из 260 наименований.