

Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 573.4; 616.3(043)

На правах рукописи

ЖАНТЛЕСОВА СИРИНА ДУЙСЕНОВНА

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

8D05101 – Биология

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант:
Савицкая И.С., д.б.н., профессор

Зарубежный научный консультант:
Дигель И.Э., PhD,
профессор Ахенского Университета
Прикладных Наук

Республика Казахстан
Алматы, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG – пробиотик с доказанным клиническим эффектом.....	10
1.2 Иммобилизация как способ защиты клеток от стрессовых факторов	19
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	27
2.1 Объекты и материалы исследования.....	27
2.2 Методы исследования.....	27
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	37
3.1 Выбор пребиотика для включения в матрицу БЦ	37
3.1.1 Определение устойчивости полисахаридов в искусственном желудочном соке.....	37
3.1.2 Влияние микробных полисахаридов на рост LGG	40
3.2 Получение полисахаридного матричного комплекса БЦ/пуллулан.....	43
3.2.1 Создание полисахаридного матричного комплекса методом <i>in situ</i> в процессе биосинтеза целлюлозной матрицы.....	43
3.2.2 Создание полисахаридного матричного комплекса путем совместного культивирования продуцентов БЦ и пуллулана.....	47
3.3 Получение микрогранул с пробиотическими биопленками	53
3.3.1 Влияние состава культуральной среды на формирование биопленки штаммом LGG	53
3.3.2 Иммобилизация клеток LGG в гранулы полисахаридного матрикса.....	57
3.3.3 Определение уровня выживаемости пробиотических комплексов в микрогранулах ПМПБ после сублимационной сушки	61
3.4 Исследование эффективности микрогранул ПМПБ в качестве транспортной системы для их доставки пробиотиков в организм хозяина.....	62
3.4.1 Определение уровня жизнеспособности иммобилизованных бактерий в условиях, моделирующих желудочный сок и секрецию двенадцатиперстной кишки.....	62
3.4.2 Высвобождение пробиотиков в имитируемом соке толстого кишечника.....	66
3.4.3 Обнаружение LGG в содержимом кишечника лабораторных животных.....	70
3.5 Разработка биологически активной добавки на основе пробиотической культуры, иммобилизованной в микрогранулы биополимеров.....	74

3.6	Влияние «Лактоцелла» на разнообразие микробиоты у здоровых добровольцев.....	76
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	82
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	84
	ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	106

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БЦ	бактериальная целлюлоза
ПУЛ	пуллулан
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт
БЦ/ПУЛ	бактериальная целлюлоза/пуллулан
ПППБ	полисахаридная матрица с пробиотическими биопленками
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
ЧК	чувство кворума
КК	ксантановая камедь
ГГ	гелановая камедь
ОПА	оценка пребиотической активности
ОП	оптическая плотность
КОЕ	колониеобразующие единицы
г	грамм
л	литр
мкм	микрометр
мл	миллилитр
МПа	мегапаскаль
об/мин	оборотов в минуту
об./об.	объемное процентное содержание компонента по отношению к общему объему
масс./об.	массовое процентное содержание компонента по отношению к общему объему
см	сантиметр
мм	миллиметр
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
HS	питательная среда S. Hestrin, M. Schramm
MRS	питательная среда де Ман, Рогосса и Шарпе
PYG	питательная среда, состоящая из пептона, дрожжевого экстракта и глюкозы
ИЖС	искусственный желудочный сок
ИДК	искусственная двенадцатиперстная кишка
ИКС	искусственный кишечный сок
ЭПС	экзопполисахариды
DNS	динитросалициловая кислота
КМЦ	карбоксиметилцеллюлоза
БАД	биологически активная добавка

ВВЕДЕНИЕ

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. Иммобилизация биопленок обеспечивает защиту от стрессовых воздействий и сохранность объёма жизнеспособных клеток пробиотической культуры. Показано, что после приема синбиотических микрогранул экспериментальными животными, пробиотики не только пережили транзит через кишечник, но высвобождались и колонизировали толстый кишечник, о чем свидетельствуют обнаруженные в фекалиях бактерии через неделю после кормления. Прием биологически активной добавки (БАД) «Лактоцелл» оказал положительное влияние на разнообразие человеческого микробиома.

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, которая в значительной степени способствует поддержанию здоровья всего желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и его устойчивости к колонизации патогенами [1,2]. 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 [3]. Оболочка микрокапсулы создает физический барьер, защищающий пробиотические клетки от неблагоприятных воздействий. 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 [4]. 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 [5,6].

Биопленка наделяет клетки многими полезными свойствами, включая снижение клеточного вымывания, повышенную биохимическую стабильность, стимулирование межклеточного взаимодействия посредством включения аутостимуляторов кворума и улучшенное распределение субстрата [7,8]. Эпителиальные ассоциации, образованные постоянными представителями кишечного тракта, также проявляют свойства, характерные для бактериальной биопленки [9]. Бактерии, входящие в ее состав, прочно прикреплены к поверхности плоского многослойного эпителия и одновременно встроены в самопроизводящийся матрикс из внеклеточного полимерного вещества [10,11]. С микроэкологической 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 ЖКТ, тем самым усиливая их пробиотические свойства [12].

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 [13]. Иммобилизация микробных клеток на БЦ, в том числе и пробиотиков, достаточно успешно осуществлена с самыми разными целями [14–16].

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. Пребиотики – это неперевариваемые человеком полисахариды, которые служат питанием для сахаролитических пробиотических микроорганизмов. 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 [17,18].

Разработка и получение иммобилизованных в биополимерные (полисахаридные) 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 биопленками.

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 – разрывная машина “Instron”. ИК-спектр – Фурье-спектрофотометр Jasco FT/IR6200. Биопленкообразование – метод микропланшетов. Иммобилизация пробиотиков – инкубация в биопленкоиндуцирующей 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 флуоресцентной гибридизации *in situ*, оценка жизнеспособности. Метагеномный анализ – добровольцы, принимавшие БАД «Лактоцелл».

Научная новизна результатов исследования.

Оптимизирована питательная среда, культивирование на которой индуцирует биопленкообразование *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 биокompозита БЦ/ПУЛ.

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

Впервые получены синбиотические микрогранулы с биопленкой 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 иммобилизации пробиотической культуры в микрогранулы биополимеров системы нейтральный носитель–пребиотик. В данном исследовании рассматривается возможность иммобилизации не планктонных клеток, а пробиотических биопленок.

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 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 микрoэкологических 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 объема жизнеспособных клеток пробиотической культуры, позволяя осуществлять эффективную доставку пробиотиков в толстый кишечник.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа была выполнена в рамках проекта АР09259491 «Биотехнологии использования полисахаридной матрицы с пробиотическими биопленками для создания комбинированных молочных продуктов» (2021-2023 гг.).

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих конференциях:

- VIII Международные фарабиевские чтения. Материалы международной научной конференции студентов и молодых ученых «Фараби элeмi» (6-7 апреля 2021, Алматы);
- V Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» MOSM (8-12 ноября 2021, Екатеринбург, Россия);
- V International Scientific and Practical Conference EXPERIMENTAL AND THEORETICAL RESEARCH IN MODERN SCIENCE (16-18 мая 2022, Кишинев, Молдова);
- X Международные фарабиевские чтения. Материалы междунар. науч. конференции студентов и молодых ученых «Фараби элeмi» (6-8 апреля 2023, Алматы).

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 компьютерного текста и состоит из следующих разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, список использованных источников из 260 наименований. Работа включает 4 таблицы, 28 рисунков и 1 приложение.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 *Lactobacillus rhamnosus* GG – пробиотик с доказанным клиническим эффектом

Пробиотики — это живые микроорганизмы, чье присутствие в достаточном количестве может приносить пользу здоровью хозяина [19]. Для этого они должны быть безопасными, живыми и способными выживать при неблагоприятных условиях ЖКТ [20]. На сегодняшний день в список пробиотиков включено 35 видов или подвидов, которые можно разделить на три категории: бактерии, продуцирующие молочную кислоту (такие как *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Enterococcus*), дрожжи и спорообразующие палочки [21].

Одним из наиболее хорошо изученных штаммов пробиотиков является *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) ATCC 53103. LGG был первоначально выделен из образцов фекалий здорового взрослого человека Шервудом Горбач и Барри Голдин [17]. Штамм был обнаружен в 1985 г при попытке выделить штамм лактобацилл, который отвечал бы следующим необходимым характеристикам для идеального пробиотика: устойчивость к желудочной кислоте и желчи, выживание при транзите в нижние отделы ЖКТ, способность последовательно прикрепляться и колонизироваться на эпителиальных клетках кишечника, выработка антимикробного вещества, быстрый темп роста и благотворное влияние на здоровье человека [22]. Это один из наиболее широко изученных пробиотиков, и его влияние на здоровье человека было изучено и доказано в многочисленных клинических испытаниях [17]. *Lactobacillus rhamnosus* GG присвоен статус GRAS (generally recognized as safe), объявленного FDA и статус QPS (qualified presumption of safety), присвоенный им EFSA [17].

LGG представляет собой грамположительные палочки с отчетливым маслянистым запахом при культивировании, а ее морфология представляет собой кремово-белую колонию. При окрашивании по Грамму он образует палисадную структуру, в отличие от других лактобактерий, что помогает при его идентификации. LGG ферментирует целлобиозу, фруктозу, глюкозу, маннит, маннозу, мелезитозу, рамнозу, рибозу, салицин, сорбит, трегалозу и ксилозу. Он не ферментирует лактозу, мальтозу, сахарозу, а также амигдалин, арабинозу, эритрит, гликоген, инозитол и мелибиозу.

Молекулярная основа взаимодействий LGG–хозяин. Успех пробиотических микроорганизмов зависит от способности микробиоты колонизировать ЖКТ.

У взрослых LGG пробиотики продемонстрировали, способность выживать в ЖКТ не менее 1 недели [23]. У новорожденных и младенцев меньший, еще формирующийся кишечный микробиом обуславливает более легкую колонизацию ЖКТ LGG, что подтверждается обнаружением LGG в фекалиях в течение 2 недель после введения [24].

Успешная колонизация LGG, по сравнению с другими видами *Lactobacillus*, может быть связана с определенными морфологическими особенностями. LGG имеет высокую адгезию к гликопротеинам кишечной слизи человека, причем его связывание с кишечным эпителием существенно ингибирует адгезию патогенных штаммов [25]. Этот процесс называется конкурентной колонизацией и является, видимо, одним из основных факторов, лежащих в основе высокой эффективности LGG в профилактике кишечных инфекций [22]. Повышенная адгезионная активность LGG по сравнению с другими родственными штаммами во многом связана с особенностями его пилей. Пили или фимбрии представляют собой длинные и тонкие протеиновые выступы клеточной поверхности, присутствующие у некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий [26]. Сравнительный геномный анализ *Lactobacillus rhamnosus* LC705 выявил наличие последовательности ДНК, известной как ген *spaCBA*, участвующего в образовании пили-подобных придатков. Было показано, что ингибирование *spaCBA* снижает адгезию к ЖКТ [27].

Важно отметить, что клетки, подвергнутые центробежной силе $8000\times g$, полностью лишаются пилей. Поскольку очень вероятно, что большая часть пробиотического эффекта LGG зависит от его уникальных пилей и способности к адгезии, важно избегать этой уязвимости во время промышленного производства пробиотика, чтобы сохранить функциональный продукт [28].

Существуют гены трех секретируемых LPXTG-подобных белков пилинов (*spaCBA*). Структурно LGG пили содержит три различных мономера пилина, которые ковалентно связаны: основной *SpaA* и второстепенные пилины *SpaB* и *SpaC*. Масс-спектрометрия показала соотношение пилинов *SpaA/SpaC/SpaB* – 5:2:1. *SpaA* выполняет лишь структурную функцию, формирующую основную цепь пилуса, в то время как вспомогательные пилины играют функциональную роль [29]. Считается, что пилин *SpaC*, расположенный на кончике пилуса и покрывающий его длину, играет ключевую роль в адгезии к слизистой, а малый пилин *SpaB* действует как молекулярный переключатель, ответственный за прекращение пилуса и инициацию связывания пептидогликана [17,29].

Было показано, что различные условия стимулируют или подавляют экспрессию фенотипа пилей у других штаммов микробиоты [30], однако, например, при воздействии низкого pH, пили LGG все еще экспрессируются [31]. Хотя пили LGG по-прежнему экспрессируют в разных условиях, в полости рта и влагалища они отсутствуют [31], что может иметь последствия при инфекционных заболеваниях мочевыводящих путей и кариесе. Примечательно, что сравнительный анализ генома и функциональный анализ видов *L. rhamnosus* показал, что функциональные *SpaCBA* пили значительно более распространены в изолятах человека, чем в молочных изолятах.

Возможно, благодаря своей превосходной адгезивной способности, бактерии можно выделить из слюны человека через 2 недели после приема

внутри [32], из кала в течение 7 дней [23] и из образцов биопсии кишечника в течение 28 дней [33]. Помимо этого, LGG также хорошо прикрепляется к толстому кишечнику, а также может быть выделен из полости рта, миндалин и влагалища [17].

Экзополисахариды (ЭПС) являются еще одним фактором адаптации LGG. Слой внеклеточного полисахарида часто встречается в лактобациллах, а его компоненты структурно разнообразны [17]. Поверхностный внеклеточный слой LGG имеет два первичных полисахарида: длинный тип, богатый галактозой, и короткий тип, богатый глюкозой и маннозой. Интересно, что генетический нокаут первого типа приводит к тому, что микроорганизм лучше прикрепляется к эпителиальным клеткам кишечника за счет меньшей защиты от комплемент-опосредованного лизиса и кателицидинов, специфических катионных антимикробных пептидов [34].

LGG также конкурирует за кишечные моносахариды и, таким образом, опосредованно замедляет рост других потенциальных патогенов. Это особенно касается *Clostridium difficile*, который вызывает инфекцию, связанную с истощением нормальной кишечной флоры. Он не так эффективно использует питательные вещества, поэтому присутствие других видов микроорганизмов обычно подавляет ее рост. Например, моносахариды, такие как N-ацетилглюкозамин и N-ацетилнейраминная кислота, редко встречаются в природе в свободной форме, но в избытке присутствуют в боковых цепях желудочно-кишечного муцина. *C. difficile* не имеет необходимых ферментов для извлечения этих моносахаридов из олигосахаридных цепей, поэтому эти бактерии вынуждены конкурировать за свободные моносахариды, но делают это менее эффективно, по сравнению с другими микроорганизмами толстого кишечника [35].

Иммуномодуляция. Роль LGG в иммуномодуляции противоречива, поскольку выделенные из него белки и их физико-химические свойства демонстрируют как воспалительное, так и противовоспалительное действие. Предполагается, что пили LGG участвуют в иммуномодуляции. В исследовании *in vitro* на LGG, выведенном без гена *sraCBA*, который кодирует рост наружных пилей, сообщалось об увеличении экспрессии воспалительного цитокина интерлейкина (IL)-8, который был снижен у штамма дикого типа [36]. Белки, секретируемые из LGG, также могут играть противовоспалительную роль в иммунном ответе. Выделение растворимого белка HM0539 из LGG подавляет воспалительный путь TLR4/MyD88/NFkB в тканях толстого кишечника [37]. Однако избыточная экспрессия toll-подобного рецептора TLR4 или первичный ответ миелоидной дифференцировки (MyD88) обращали этот эффект вспять. Сигнальный путь TLR4 может быть ответственен за усиление воспаления при хронических и острых заболеваниях [38,39] (воспалительное заболевание кишечника и атеросклероз) указывая на то, что LGG при острых воспалительных состояниях может иметь ограниченный эффект.

В отличие от противовоспалительного действия, эффекторные вещества, такие как липотейхоевая кислота (ЛТК), обнаруженные в клеточных стенках некоторых грамположительных бактерий, включая LGG, также могут участвовать в модуляции иммунного ответа, проявляя провоспалительные свойства. В организме человека репортерные клеточные линии предназначены для мониторинга внутриклеточных сигнальных путей. Было показано, что ЛТК, продуцируемый штаммом LGG дикого типа, активирует воспалительный сигнальный путь NF-κB в репортерных клетках. И наоборот, активность этого пути значительно снижается при удалении гена ЛТК [40]. Это также приводит к снижению способности активировать TLR2/6-зависимую передачу сигналов NFκB в репортерных клетках и снижению индукции мРНК IL-8 в клетках CaCo-2 из толстого кишечника человека, действуя как на местном, так и на системном уровне. Тем не менее последствия этого при определенных болезненных состояниях и точная роль LGG в воспалительных и противовоспалительных путях все еще нуждаются в изучении.

Адьювант для вакцин. Другим способом изучения иммуномодулирующих эффектов LGG является проверка его способности улучшать гуморальный ответ на вакцины при использовании в качестве адьюванта. Работа Isolauri и др. продемонстрировала, что добавление LGG в количестве 5×10^{10} КОЕ к пероральной ротавирусной вакцине значительно усиливает её иммуногенность [41]. Было также показано, что LGG в молоке (10^{10} КОЕ/сутки, за неделю до вакцинации) способствует увеличению титра антител, нейтрализующих полиовирус. Наблюдалось четырехкратное увеличение полиовирус-специфических IgA у взрослых, которые получали пероральную вакцину против полиомиелита [42].

Кроме того, приём LGG в количестве 10^{10} КОЕ/капсула в течение 28 дней усиливал защиту после введения аттенуированной пероральной вакцины против гриппа. Интересно, что этот эффект был специфичен для конкретного штамма вируса: титры антител против штаммов H1N1 и B оставались низкими как в контрольных, так и в LGG группах, в то время как в случае штамма H3N2, LGG заметно повышал уровень защиты [43]. Однако, не было обнаружено никакого влияния на эффект пероральной вакцины против *S. typhi* Ty21a (4×10^{10} КОЕ ежедневно, 7 дней) [44].

Клиническое применение LGG. Как упоминалось ранее, было показано, что LGG колонизирует кишечник новорожденных значительно лучше, чем взрослых [24]. Интересно, что пренатальные добавки с LGG ($1,8 \times 10^{10}$ КОЕ/капсула, ежедневно с 36-й недели беременности) изменяют состав микробиоты новорожденных, способствуя возникновению полезного микробиомного профиля, в котором доминируют бифидобактерии [45–47].

Другое исследование показало, что постнатальное применение LGG (10^9 КОЕ/сутки, лиофилизированный порошок, смешанный с грудным молоком), вероятно, оказывает влияние на модели колонизации кишечника новорожденных, вызывая более высокое видовое разнообразие по сравнению

с плацебо [48], хотя анализ не проводился на детальном уровне. Как именно LGG может способствовать колонизации бифидобактерий *in vivo*, еще предстоит изучить.

LGG часто выбирают в качестве пробиотика для профилактики и лечения желудочно-кишечных инфекций и диареи из-за его отличной способности адгезии к кишечной слизи. В метааналитических исследованиях обсуждалось использование LGG для лечения острой диареи у детей [49–51]. LGG может сокращать продолжительность диареи в среднем на 1,05 дня, особенно это заметно у детей из Европы, которые получали высокие дозы (не менее 10^{10} КОЕ/сутки). Также было установлено, что LGG в дозировке 10^9 КОЕ/сутки, добавленный в кисломолочные продукты, уменьшает риск возникновения желудочно-кишечных инфекций у детей, находящихся на стационарном лечении [52].

Кроме того, недоедающие дети в Перу показали более низкую частоту диареи при приеме LGG в дозировке свыше 10^{10} КОЕ/день. Эти бактерии применялись в виде лиофилизированного порошка, смешанного с жидким вишневым желатином. Самые значительные результаты были достигнуты у детей, которые не получали грудное молоко [53]. Однако длительное употребление молока, содержащего LGG (10^8 КОЕ/сутки), у детей, посещающих детские сады в Финляндии, не оказали влияния на частоту желудочно-кишечных заболеваний [54].

Недавний метаанализ показал, что лечение LGG также может снизить частоту и интенсивность боли у детей с синдромом раздраженного кишечника (СРК). Однако важно отметить, что клинические эффекты были умеренными [55], что неудивительно, учитывая большую гетерогенность патогенеза у пациентов с СРК.

Пероральное введение LGG (6×10^9 КОЕ) с грудным молоком предотвращает кишечную колонизацию дрожжеподобными грибами рода *Candida* у недоношенных новорожденных [56]. Два пилотных исследования (прием 10^{10} КОЕ LGG в обезжиренном молоке и $1,2 \times 10^9$ КОЕ в лиофилизированном порошке) также продемонстрировали многообещающие результаты в лечении рецидивирующего колита детей, вызванного *Clostridium difficile* [57,58]. Кроме того, в ходе двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования было показано, что применение йогурта с LGG у пациентов с заболеваниями почек приводит к элиминации устойчивых к ванкомицину энтерококков у всех участников [59].

Определить количество живых пробиотических бактерий для приема при различных показаниях непросто. Оптимальная доза, вероятно, зависит от штамма и цели применения [60]. Однако в отношении конкретного штамма или комбинации штаммов было проведено очень мало исследований для выявления взаимосвязи доза-эффект [61]. Ввиду отсутствия конкретных исследований зависимости доза-эффект можно принять во внимание заявление AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire), где утверждалось,

что концентрация пробиотиков должна быть $\geq 10^6$ КОЕ/мл в тонком кишечнике и $\geq 10^8$ КОЕ/г в толстом кишечнике [62].

В исследовании с участием 7 добровольцев, при введении от 10^6 до 10^8 LGG, лактобактерии невозможно было выделить из образцов фекалий. При введении 10^9 КОЕ, 2 из 7 добровольцев время от времени колонизировались LGG на низком уровне от 10^3 до 10^4 КОЕ/г фекалий. При дозе LGG 10^{10} КОЕ/сутки все добровольцы были колонизированы. Среднее количество LGG, обнаруженных в фекалиях, составляло от 10^6 до 10^7 КОЕ/г. По-видимому, колонизирующая доза данного пробиотика составляет от 10^{10} до 10^{11} КОЕ/сутки [63]. Высокая эффективность дозы LGG, превышающей 10^{10} КОЕ/сутки, была подтверждена в метаанализе острого гастроэнтерита у детей [50].

Данные метаанализа [51] свидетельствуют о различных исходах высоких ($>10^{10}$ КОЕ/сутки) и низких доз ($<10^{10}$ КОЕ/сутки) LGG при остром гастроэнтерите у детей:

- 5×10^9 КОЕ/сутки LGG необходимо для кишечной колонизации;
- пробиотик следует принимать в высоких дозах, обычно $5-10 \times 10^9$ КОЕ/сутки детям и $10-20 \times 10^9$ КОЕ/сутки взрослым в течение $\geq 5-7$ дней;
- в случае антибактериальной терапии LGG следует принимать во время лечения и дополнительно в течение 1-3 недель после лечения антибиотиками;
- LGG следует принимать с пищей, чтобы избежать воздействия слишком низкого pH. Иммобилизация увеличивает жизнеспособность клеток во время производства пробиотика и для его адресной доставки в ЖКТ.

Было выдвинуто предположение, что дисбактериоз кишечника может способствовать развитию колоректального рака за счет колонизации патогенными бактериями [64]. Кроме того, химиотерапия может изменить состав кишечной микробиоты [65]. Было показано, что использование LGG в сочетании с пребиотиком изменяет несколько биомаркеров колоректального рака через 12 недель [66]. В этом исследовании количество бифидобактерий и лактобактерий увеличилось, при этом титры *Clostridium perfringens* и количество повреждений ДНК уменьшилось у 37 пациентов с раком толстой кишки и у 43 пациентов с полипэктомией.

Helicobacter pylori является известным фактором риска развития рака желудка, и эрадикация может быть эффективной терапией для его предотвращения [67]. Однако нежелательные побочные эффекты лечения могут включать диарею, боль, тошноту и вздутие живота, что приводит к прекращению терапии [68,69]. Во время эрадикации *H. pylori*, применение LGG (6×10^9 КОЕ два раза в день) повышает переносимость из-за уменьшения побочных эффектов [69]. Хотя скорость эрадикации не менялась, использование LGG может способствовать предотвращению развития рака желудка, по крайней мере за счет повышения переносимости лечения.

Очевидно, что монотерапия LGG имеет многочисленные преимущества, включая успешное лечение симптомов *H. pylori* и снижение риска развития рака желудка. В сочетании с другими пробиотиками и пребиотиками LGG

может уменьшить послеоперационные инфекции и улучшить иммунную функцию у пациентов с раком толстой кишки, что важно в период снижения иммунной функции.

Что касается пользы для органов дыхания, рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование с участием 281 детей, показало, что потребление LGG (в виде молока с добавлением 10^9 КОЕ/мл LGG) в течение 3 месяцев, снижало количество инфекций верхних дыхательных путей по сравнению с плацебо [52].

Считается, что развитие аллергии связано как с генетическими факторами, так и с факторами окружающей среды [70,71]. Дисбактериоз и снижение разнообразия микробиома кишечника младенцев включены в патогенез аллергических заболеваний у детей из-за таких факторов, как использование антибиотиков в утробе матери и рождение с помощью кесарева сечения [72].

В одном рандомизированном контролируемом исследовании при потреблении многовидового пробиотика, содержащего бактерии LGG (5×10^9 КОЕ/сутки), во время беременности, грудного вскармливания и младенчества сообщалось об изменении влияния антибиотиков и кесарева сечения на дисбактериоз кишечника, увеличении количества бифидобактерий и снижении патогенных протеобактерий и клостридий. Это указывает на то, что использование пробиотических добавок в младенчестве может помочь восстановить эубиоз [72].

Наблюдательные исследования показали, что лактобактерии могут иметь особое значение в развитии аллергии. Присутствие LGG, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus paracasei* в раннем возрасте коррелирует с более низкой распространенностью аллергических заболеваний, а невысокий уровень *Lactobacillus* у детей с генетической предрасположенностью часто сопровождается тем, что один или двое родителей имеют аллергические заболевания [73,74].

Также изучалась возможность использования LGG для снижения риска развития аллергии [75]. 303 недоношенным детям давали различные штаммы пробиотиков. У детей, получавших LGG перинатально, частота аллергических заболеваний была ниже по сравнению с детьми, получавшими плацебо, после 2 лет наблюдения. Продолжительность лечения варьировала от 3 до 6 месяцев, а дозы — от 1×10^9 до 5×10^{10} КОЕ.

Существуют обширные клинические исследования эффективности и механизмов использования LGG для предотвращения аллергических заболеваний и уменьшения симптомов аллергии на коровье молоко у детей. Детям с высоким риском развития аллергических заболеваний из-за генетической предрасположенности, использования антибиотиков может быть полезно принимать не менее 1×10^9 – 5×10^9 КОЕ/сутки, не менее 3-6 месяцев [75]. В другом исследовании потребление $1,4 \times 10^7$ – 5×10^9 КОЕ/сутки в течение как минимум 4 недель также благоприятно влияло на здоровье детей с аллергией на коровье молоко [76]. Доза 2×10^{10} КОЕ LGG может быть

полезна взрослым с аллергией на пыльцу березы, для иммуномодуляции и стимулирования IgA [77].

Противоинфекционная активность LGG. LGG продуцируют бактериоцины, обладающие антимикробной активностью против анаэробных бактерий, таких как *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Salmonella* [78]. Продуцируя бактериоцины, резидентные бактерии оказывают бактериостатическое или бактерицидное действие на патогены, играя основополагающую роль в химическом барьерном действии кишечной микробиоты. Геном LGG кодирует несколько генов, связанных с бактериоцинами [27], но индуцировать производство этих соединений *in vitro* непросто. Не все из секретируемых LGG противомикробных соединений идентифицированы, однако молочная кислота является основным противомикробным веществом, вырабатываемым всеми лактобактериями. Молочная кислота может способствовать активности других соединений, обладающих антимикробным действием [79].

Также важно помнить, что у бактерий процесс межклеточной коммуникации, называемый чувством кворума (ЧК), основан на синтезе и секреции небольших гормоноподобных молекул, называемых аутоиндукторами, координируемых главным образом в ответ на плотность бактериальной популяции [80]. Механизм ЧК регулирует выработку бактериоцинов молочнокислыми бактериями через секретируемые бактериоциноподобные пептидные феромоны [81]. Было обнаружено, что молекулы ЧК, у лактобацилл, контролирующие выработку бактериоцина, активируются в ответ на инфекции [82,83]. Сообщалось, что LGG продуцирует аутоиндуктор-2 (АИ-2), который, как предполагается, является важной межвидовой молекулой ЧК, продуцируемой как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями [84].

Изучение антимикробных соединений, вырабатываемых LGG выявило наличие пяти значимых соединений. Однако, результаты различных исследований подтвердили, что молочная кислота играет ключевую роль, ингибируя рост

Согласно результатам исследования Lu и др., в питательной среде с пробиотиком LGG были идентифицированы семь термостабильных пептидов, обладающих антибактериальной активностью в отношении энтероагрегативного штамма *E. coli* EAEC 042, *Salmonella typhi* и *Staphylococcus aureus*, но в последствии они не были изучены [85]. Изучение антимикробных соединений, вырабатываемых LGG, выявило наличие пяти значимых соединений. Однако, результаты различных исследований подтвердили, что молочная кислота играет ключевую роль, ингибируя рост *S. typhimurium*. Это соединение не только хелатирует важные факторы роста, такие как железо из питательной среды, но также увеличивает проницаемость грамотрицательных мембран и, в частности, влияет на экспрессию гена вирулентности сальмонеллы *hilA* [86]. Молочная кислота состоит из двух

стереоизомеров, d-молочной кислоты и l-молочной кислоты, а штаммы лактобактерий создают эти изомеры в различных соотношениях. *L. rhamnosus* образуют в основном l-молочную кислоту, в меньших количествах – d-молочную кислоту (94,2 и 5,8%, соответственно), в то время как другие виды имеют противоположную картину [87].

В таблице 1 представлен обзор антибактериального действия пробиотика LGG *in vitro* против желудочных и кишечных патогенов.

Таблица 1 – Антибактериальное действие LGG против желудочных и кишечных патогенов

Патоген	Условия эксперимента	Наблюдаемые эффекты	Ссылки
<i>Shigellas</i> spp.	Прямой контакт	Бактерицидный	[88,89]
Энтеровирулент <i>Escherichia coli</i>	Прямой контакт	Бактерицидный	[78]
	Пептиды с NPSRQERR и PDENK последовательностями	Бактерицидный	[90]
	Прямой контакт	Уменьшение шига-токсина	[91–93]
	Прямой контакт	Ингибирование адгезии	[93]
	Прямой контакт	Ингибирование продукции IL-8, CCL и CXCL	[94]
<i>Salmonella typhimurium</i>	Прямой контакт	Бактерицидный	[88,89]
	Пептиды с NPSRQERR	Бактерицидный	[95–97]
	Последовательности DENK	Ингибирование адгезии	[97,98]
	Прямой контакт	Ингибирование проникновения клеток в энтероцитоподобные клетки	[98]
<i>Helicobacter pylori</i>	Прямой контакт с LB-SCS	Низкая бактерицидная активность	[99]
	Прямой контакт с продуцируемым бактериоцином	Бактерицидная активность	[100]
	Прямой контакт	Ингибирование адгезии к клеткам желудка	[101]
	Прямой контакт с LB-SCS	Отсутствие ингибирующего эффекта против адгезии к клеткам секретирующие слизь	[99]

Как показано в этой главе, штамм LGG широко изучался и, возможно, является наиболее изученным микроорганизмом среди всех пробиотиков. Он безопасен, хорошо переносится, а также оказывает потенциально

благоприятное воздействие на многие системы органов и болезненные состояния. Это происходит тремя способами: посредством иммуномодуляции, роста и пролиферации клеток, а также в качестве антимикробного средства, помогающего стимулировать эубиоз. Наличие пилей способствует их колонизации ЖКТ. Эффекты могут быть системными, если есть путь, по которому LGG или его продукты могут «путешествовать», а также могут быть локальными и специфическими.

Одно из явных преимуществ LGG заключается в том, что этот пробиотик хорошо охарактеризован и имеет очень хорошие показатели безопасности, что делает его настолько популярным. LGG давали, в частности, младенцам с низкой массой тела [102,103], беременным женщинам [104,105], ВИЧ-инфицированным пациентам [106] и пациентам на аппаратах искусственной вентиляции легких [107]. Таким образом, безопасность LGG неоднократно подтверждалась тем, что его применение не сопровождалось серьезными побочными явлениями в различных клинических исследованиях.

1.2 Иммобилизация как способ защиты клеток от стрессовых факторов

Пробиотики обычно используются в виде биологически активных добавок к пище, или терапевтических препаратов в форме таблеток, капсул, порошков, саше. Но наиболее часто пробиотики употребляются в составе функциональных продуктов питания. И те, и другие формы применяются перорально, следовательно, попадают в ЖКТ, который им надо благополучно пройти, чтобы достичь целевой ниши – толстого кишечника, в котором они будут работать. Однако было показано, что пробиотические бактерии часто имеют низкую выживаемость во время транзита в желудочно-кишечную систему. [108]. Наиболее критичными точками на этом пути являются, прежде всего, желудок с его низкими значениями pH и верхние отделы кишечника, где присутствуют желчные кислоты и пищеварительные ферменты.

Одним из решений этой проблемы является метод иммобилизации или инкапсуляции бактериальных клеток [109]. Термины «иммобилизация» и «инкапсуляция» используются взаимозаменяемо в большинстве представленных литературных источников [109]. В отличие от инкапсуляции, процесс которой заключается в формировании непроницаемого слоя вокруг сердцевины из инкапсулированного материала, иммобилизация представляет собой метод, при котором материал захватывается либо внутри матрицы, либо на ее поверхности.

Иммобилизация клеток позволяет создать подходящую микросреду (межклеточный контакт, градиенты питательных веществ и pH), стимулируя клеточную активность иммобилизованных клеток [110,111]. Методы иммобилизации часто повторяют естественные процессы, поскольку многие

микроорганизмы способны прикрепляться к различным поверхностям и выживать на них.

Эффективность биотехнологических процессов, применяемых в промышленности, может быть повышена путем иммобилизации клеток, используемых в качестве биокатализаторов. Иммобилизованные клетки имеют преимущества по сравнению со свободными, включая сохранение стабильных и активных биокатализаторов, высокую объемную производительность и улучшенный контроль над процессом [15]. Однако иммобилизация пробиотических клеток влечет за собой определенные технологические процедуры, усложняющие производство и увеличивающие его стоимость [112]. При рассмотрении вопроса о иммобилизации бактериальных клеток необходимо учитывать выбор пробиотического штамма, количество, необходимое для достижения положительного воздействия на здоровье, а также стабильность клеток на различных этапах обработки [112].

К наиболее распространенным методам иммобилизации клеток относятся: прикрепление на твердом носителе, инкапсуляция, включение в пространственную структуру носителя и иммобилизация с использованием мембранных технологий (рисунок 1).

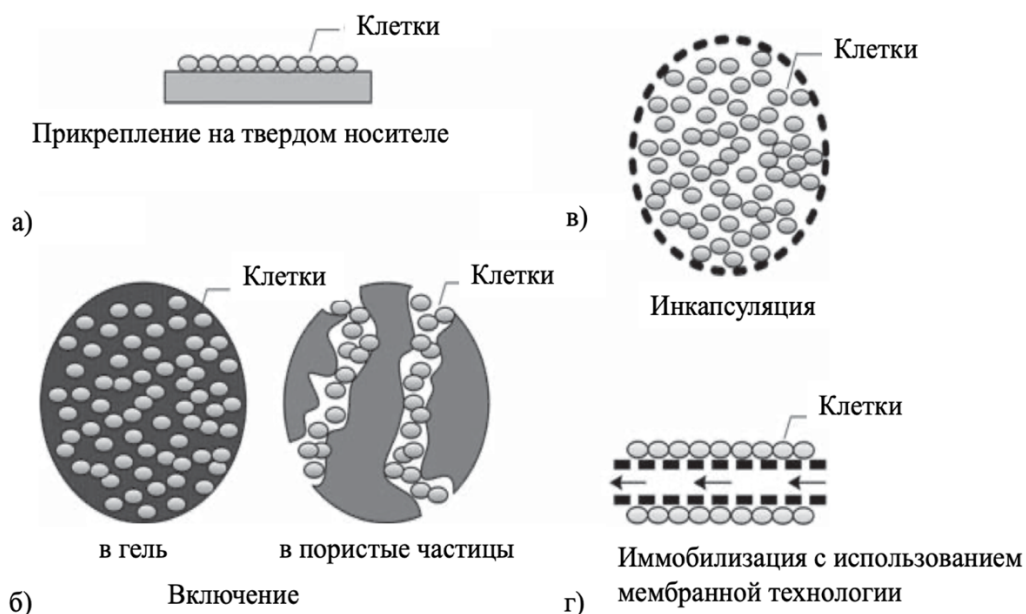


Рисунок 1 – Основные методы иммобилизации клеток [113]

Прикрепление клеток к носителю обусловлено либо электростатическими силами, либо ковалентным связыванием между клеточной мембраной и поверхностью материала [114]. На этот процесс влияют разнообразные характеристики субстрата, адгезивных молекул, секретируемых клетками, питательной среды и особенно клеточной поверхности. Свойства клеточной поверхности, такие как гидрофобность, выработка внеклеточного полимерного вещества и наличие фимбрий и

жгутиков, играют важную роль в определении скорости и степени прикрепления.

Адсорбция часто основана на электростатических взаимодействиях и силах ван-дер-Ваальса между заряженными носителями и иммобилизованными клетками. Гидрофобные поверхности в некоторых случаях обладают более высокой адгезионной способностью, чем гидрофильные.

Адсорбция на поверхностях относительно проста по сравнению с другими методами. Основным недостатком такого подхода является низкая эффективность иммобилизации. В зависимости от механизма иммобилизации может возникнуть динамическое равновесие между отсоединением и прикреплением клеток, а свободно подвешенные клетки обычно сосуществуют с иммобилизованными клетками. Поэтому применение этой технологии ограничено для многих систем биопroduкции, особенно для тех, в которых используются быстрорастущие микроорганизмы, такие как бактерии и дрожжи. Однако он нашел широкое применение при очистке сточных вод с помощью медленно растущих микроорганизмов.

Благодаря прикреплению к соответствующим абиотическим или биотическим поверхностям клетки могут образовывать биопленки, в которых они растут и размножаются. Как только биопленка сформировалась, бактерии экспрессируют гены по схеме, которая резко отличается от их планктонных аналогов, что приводит к фенотипическим изменениям и становится основным бактериальным резервуаром во многих биосистемах [115]. Обычно в качестве носителей для биопленок используются целлюлозные (ДЭАЭ-целлюлоза, древесина, опилки) и неорганические материалы (пористый фарфор и пористое стекло) [114].

Некоторые бактерии с биопленкообразующими способностями могут совместно с другими микроорганизмами образовывать биопленки, таким образом, функционируя как связующий организм при развитии биопленки. Прочность, с которой бактерии прикрепляются к опорной поверхности, часто варьирует и тесно связана с толщиной биопленки. Результаты исследования Doleyres и Lacroix [116] продемонстрировали, что иммобилизованная популяция бифидобактерий с высокой плотностью клеток может вызвать реакцию ЧК, что позволяет молочнокислым бактериям лучше адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды.

Включение/захват в пористые материалы и гель-матрикс. Клетки могут быть включены во внутренние поры материалов-носителей [117]. Когда клетки растут в пористых материалах и достигают определенного уровня плотности клеток, они будут заключены внутри. Материалы, используемые для этого метода иммобилизации, включают пористые стекла, глины, цеолит и керамику. Захват в пористых частицах имеет три основных преимущества по сравнению с захватом в гель: во-первых, иммобилизующие частицы обладают высокой устойчивостью к сжатию, что неизбежно происходит в биореакторах; во-вторых, в процессе включения в значительной степени

сохраняется жизнеспособность клеток, так как иммобилизация осуществляется в мягких условиях; в-третьих, просто и дешево провести иммобилизацию клеток, подходящую для крупномасштабного производства.

В большинстве исследований *метод включения в гель* используется из-за его простоты и высокого уровня удержания клеток. Вспомогательными материалами могут быть полисахаридные гели (например, альгинаты, каррагинан, агар, хитозан, полигалактуроновая кислота) или другие полимерные матрицы (например, желатин, коллаген, поливиниловый спирт) [118–120].

Субстраты и продукты могут диффундировать в гель и выходить из них, в то время как клетки остаются внутри. Существуют градиенты концентрации субстратов и продуктов от центра гелевых матриц к поверхности из-за ограничения внутреннего массопереноса. Следовательно, клетки, расположенные близко к поверхности, могут расти быстрее, чем клетки внутри. Внешнее сопротивление массопереносу на поверхности также может быть значительным для крупных шариков геля при недостаточном перемешивании [119,121].

Метод включения в гель имеет недостаток, заключающийся в ограниченной механической стабильности. Структура геля легко разрушается за счет роста клеток в гелевой матрице и продукции углекислого газа. Другим недостатком клеточного захвата является ограничение содержания кислорода в матрице.

Инкапсуляция сочетает в себе методы захвата с использованием мембранной технологии. Он основан на включении клеток в полупроницаемую капсулу, представляющую собой мембрану, которая избирательно позволяет небольшим молекулам (например, кислороду и питательным веществам) и продуктам реакции свободно диффундировать, но удерживает крупные молекулы и клетки внутри капсулы [119].

Мембрана капсулы обычно готовится из альгината или поли-L-лизина. Капсулы могут быть маленькими, для включения одной клетки (микрокапсулы), или большими, для большего количества клеток (макрокапсулы).

O'riordan и Andrews [122] сообщили, что популяция бифидобактерий, инкапсулированных в крахмал, не показала значительного улучшения жизнеспособности во время желудочного воздействия. Но когда в качестве капсульного материала использовали резистентный крахмал, инкапсулированные пробиотики сохраняли жизнеспособность даже после 8-часового пребывания в моделируемых желудочно-кишечных условиях [123]. Лиофилизированный *B. longum*, инкапсулированный в хитозан и альгинат, поддерживал жизнеспособность на уровне 6,43 КОЕ/г после агрессивного воздействия кислот и солей желчных кислот и [124]. *B. longum*, инкапсулированный в гуммиарабик, желатин и водорастворимый крахмал, показал более высокую резистентность при воздействии моделированного желудочного раствора [125,126].

Инкапсуляция с одиночным либо множественными биополимерными покрытиями считается эффективным методом защиты пробиотиков от желудочного сока и солей желчных кислот [126]. Однако, иммобилизация клеток в капсулы в основном была разработана для применения в медицине, но не для промышленного использования из-за высокой стоимости изготовления капсул.

Метод мембранного сдерживания широко используется для рециркуляции клеток во время непрерывных процессов. Восстановленные клетки могут быть перенесены обратно в биореактор для увеличения плотности и продуктивности клеток. Микрофльтрационные мембраны для удержания дрожжевых клеток были разработаны и коммерчески применяются в пивоваренной промышленности. Например, компания “Millipore” разработала картридж “Millispark” для производства игристого вина, во время которого в винной бутылке осуществляется вторичное брожение [114].

Еще одним преимуществом является то, что клетки могут быть полностью удалены из культуры, что делает ее пригодной для производства бесклеточных продуктов. Однако, как и все технологии с использованием мембран, этот метод характеризуется высоким сопротивлением массопереносу и загрязнению мембран [127,128].

Среди вышеперечисленных методов иммобилизация путем включения/захвата в пространственную структуру носителя является наиболее предпочтительной. В последние годы в качестве усовершенствованной альтернативы появилась иммобилизация посредством комбинации двух или более методов, причем наиболее часто используемой комбинацией является адсорбция или ковалентное связывание в качестве первой стадии, а затем включение/захват полученного производного в пористый полимер [129].

Помимо самого метода, выбор носителя является еще одним важным решением, которое необходимо сделать в ходе подготовки к иммобилизации клеток. В идеале материалы-носители должны соответствовать следующим критериям:

- наличие в достаточном количестве и по низкой цене;
- механическая, химическая и термическая стабильность при длительном использовании и в условиях хранения;
- большая площадь поверхности, доступная для клеток и субстратов;
- наличие функциональных групп для связывания клеток;
- отсутствие снижения клеточной активности;
- простота использования;
- нетоксичность и низкая реакционная способность;
- безопасная утилизация или возможность переработки;
- низкое сродство к загрязнениям.

Существует множество разнообразных типов носителей для иммобилизации, включая полимерные матрицы, такие как альгинат, агар,

желатин, к-каррагинан, хитозан, пектин, полиакриламид, эпоксидная смола, а также пористые или непористые материалы, например, древесная стружка, нержавеющая сталь, хлопчатобумажная ткань, частицы пористого стекла, диэтиламиноэтилцеллюлоза, пористый кремнезем, пористая керамика и диатомовая земля. Среди методов иммобилизации живых клеток большинство исследователей отдают предпочтение иммобилизации в природные биополимеры благодаря нетоксичности матрикса (что имеет решающее значение для пищевых продуктов), простоте метода иммобилизации, высокой жизнеспособности и продуктивности иммобилизованных клеток [15].

При разработке систем доставки иммобилизованных пробиотиков с целью обеспечения контролируемого высвобождения необходимо учитывать сложную физиологию ЖКТ. Как правило, высвобождение бактерий вызывается деградацией, дезинтеграцией или растворением носителя [130].

После приема внутрь иммобилизованный пробиотик быстро проходит через пищевод (занимает около 10-14 секунд [131]) и достигает желудка; это точка, в которой ожидается наибольшая потеря жизнеспособности бактерий из-за высокого уровня кислоты. pH желудка и время прохождения через него могут сильно различаться и зависеть от многих факторов (возраст, время последнего потребления пищи). Средние значения pH желудка находятся в пределах pH 1-2,5 [132]. Время нахождения в желудке также сильно варьирует [133] и часто составляет от 5 минут до двух часов. Более мелкие частицы будут удерживаться в течение более короткого промежутка времени. В желудке содержится примерно до 1,5 л желудочного сока, а натошак обычно только 50 мл [130]. Кроме кислоты в желудке также содержится пепсин — протеолитический фермент, расщепляющий белки. Пепсин образуется в результате автокаталитического расщепления его предшественника зимогена, пепсиногена, при низком pH желудка.

После прохождения через желудок иммобилизованные пробиотики попадают в тонкую кишку, транзит через которую, как сообщалось, в одном исследовании составляет от 1,5 до 4,5 часов [134], а в другом – от 0,5 до 9,5 часов [135]. При повторных экспериментах с одним пациентом наблюдались значительные различия во времени транзита по тонкому кишечнику [130], что указывает на большую изменчивость у отдельных субъектов. pH тонкой кишки находится в диапазоне pH 6,15-7,35 в проксимальной области и повышается до pH 6,80-7,88 в дистальной части.

После прохождения через тонкую кишку иммобилизованные пробиотики попадают в толстую кишку, где pH немного снижается до pH 5,26-6,72 в восходящей ободочной кишке и pH 5,20-7,02 в нисходящей ободочной кишке [136]. Время прохождения фармацевтических препаратов в толстой кишке сильно варьируется, обычно в диапазоне от 6 до 32 часов [100], но были отмечены и более длительные периоды [137].

Когда система иммобилизации опускается по ЖКТ, относительное количество присутствующей жидкости будет уменьшаться, поскольку

содержимое уплотняется в фекалии [130]. Толстый кишечник, в отличие от остальной части ЖКТ, является домом для большой концентрации местных видов бактерий, которые могут переваривать материал-носитель тем самым высвобождая пробиотики.

Дополнительным инструментом контроля высвобождения является мукоадгезия к слизистым оболочкам [138]. Точный его механизм до конца не изучен, но считается, что он основан на взаимопроникновении мукоадгезивных макромолекул и слизи с последующим установлением нескольких типов взаимодействий, включая электростатические, водородные связи и гидрофобные взаимодействия [139]. Возможно также, что существуют некоторые диффузионные и механические эффекты, подобные трению. Этот тип адгезии к поверхностям слизистой оболочки увеличивает время пребывания в ЖКТ и может использоваться в сочетании с системами иммобилизации с отсроченным высвобождением клеток.

Сорбированные пробиотики «Бифидумбактерин-форте» и «Пробифор» прошли широкую клиническую апробацию, проведенную по всем правилам доказательной медицины. В этих препаратах живые клетки бифидобактерий иммобилизованы на частицах активированного угля. Когда они попадают в кишечник в репродуктивных дозах, они образуют изолированные микроколонии в химусе благодаря активному взаимодействию и активной адгезии к слоям стенки слизистой оболочки кишечника под воздействием химических и электростатических сил. Применение этих препаратов обеспечивало удовлетворительный клинико-бактериологический эффект по крайней мере в 2-3 раза быстрее и эффективней. «Бифидумбактерин форте» как пробиотик, обеспечивающий высокую локальную колонизацию слизистой кишечника, способствует элиминации патогенной и условно-патогенной микрофлоры [140]. Препарат «Пробифор» эффективен для лечения воспалительных гастроэнтерологических патологий желудочно-кишечного тракта: язвенном и хроническим холецистопанкреатите и др. Применение препарата у гастроэнтерологических больных приводило к морфологическому восстановлению слизистой оболочки толстой кишки, обеспечивая полноту выздоровления [141].

Хотя существует множество пробиотических продуктов и методов иммобилизации клеток, применение технологии иммобилизации в промышленном секторе все еще ограничено. Это в основном связано с проблемами безопасности, подтверждения стабильности и функциональности биологически активных культур, а также отсутствием процессов, которые можно было бы легко масштабировать. Текущие исследования направлены на решение этих проблем, поскольку иммобилизация является эффективным способом защиты и повышения жизнеспособности клеток. Ключевыми факторами для внедрения на промышленном уровне являются выбор материалов-носителей и технологии иммобилизации.

В перспективе ожидается увеличение числа исследований, посвященных коиммобилизации пробиотических микроорганизмов с пребиотиками, антиоксидантами, пептидами или иммуностимулирующими соединениями. При правильном выборе таких веществ можно усилить положительные эффекты пробиотиков [122].

Природа высвобождения пробиотика имеет особое значение, поскольку, без знания и учета этого, процент доставленных бактерий может быть значительно меньше, чем введенный. Доставка в тонкую кишку будет способствовать иммунному ответу, тогда как толстый кишечник является традиционным местом антипатогенного действия. В настоящее время исследуется ряд эффективных носителей и связанных с ними механизмов контролируемого высвобождения. Переваривание материала-носителя микрофлорой толстой кишки может быть лучшим методом целевого высвобождения.

Ожидается, что в ближайшее время будут разработаны новые инновационные способы введения и доставки пробиотиков. Тем не менее, по-прежнему необходимы дополнительные исследования для выбора иммобилизационных носителей, которые могут вызвать успешную адгезию к определенным клеткам кишечника, тем самым обеспечивая целевую доставку пробиотических бактерий. Следует проводить больше исследований *in vivo* с людьми, чтобы подтвердить эффективность иммобилизации при транспортировке пробиотиков и их контролируемом высвобождении в толстом кишечнике.

2 ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты и материалы исследования

Объекты исследования:

1. Полисахариды: ксантановая камедь (КК), пуллулан (ПУЛ), геллановая камедь (ГК);
2. Штамм *Komagataeibacter xylinus* C-3 – продуцент бактериальной целлюлозы (БЦ);
3. Штамм *Aureobasidium pullulans* C-7 – продуцент ПУЛ;
4. Штаммы *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC[®] 53103[™] (LGG), *Escherichia coli* ATCC[®] 8739[™];
5. Пленки БЦ и БЦ/ПУЛ;
6. Микрогранулы БЦ+LGG, БЦ/ПУЛ+LGG;
7. 40 самцов крыс породы “Wistar” весом 180-220 г;
8. 20 добровольцев (10 мужчин, 10 женщин – 20-30 лет).

Материалы исследования

Питательные среды:

а) для культивирования LGG:

Бульон MRS (г/л): пептон – 10; мясной экстракт – 8; дрожжевой экстракт – 4; глюкоза – 20; K_2HPO_4 – 2; Твин-80 – 1; дизамещенный цитрат аммония – 2; ацетат натрия – 5; $MgSO_4$ – 0,1; $MnSO_4$ – 0,05 (pH 6,5).

Бульон PYG (г/л): бактериологический пептон – 15, ферментативный гидролизат казеина – 5, глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 10 (pH 6,5).

б) для культивирования штамма-продуцента БЦ:

Классическая среда HS (г/л): глюкоза – 20, Na_2HPO_4 – 2,7, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 5, лимонная кислота – 1,15 (pH 6,0);

в) для культивирования штамма-продуцента ПУЛ:

Базовая среда для культивирования *A. pullulans* C-7 (г/л) [142]: глюкоза – 50, дрожжевой экстракт – 5, $(NH_4)_2SO_4$ – 5, NaCl – 1, KH_2PO_4 – 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 (pH 5);

г) для совместного культивирования продуцентов ПУЛ и БЦ:

Питательная среда с глюкозой (ПС-1), представляла собой комбинацию среды HS для *K. xylinus* C-3 и базовой среды для *A. pullulans* C-7. Состав (г/л): глюкоза – 50, дрожжевой экстракт – 10, пептон – 5, лимонная кислота – 1,15, Na_2HPO_4 – 2,7, KH_2PO_4 – 5, $(NH_4)_2SO_4$ – 5, NaCl – 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 (pH 6,0);

Питательная среда с мелассой (ПС-2) (г/л): меласса – 20, Na_2HPO_4 – 2,7, KH_2PO_4 – 1, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 5, лимонная кислота – 1,15, этанол – 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5, KCl – 0,5, $FeSO_4$ – 0,01 (pH 6,0).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Определение пребиотического потенциала микробных полисахаридов

1) *Определение степени гидролиза (СГ) полисахаридов в искусственном желудочном соке (ИЖС)*

Использовали модельную систему *in vitro*. Для этого готовили ИЖС с применением 0,2% раствора хлорида натрия (рН 1,0-5,0 путем добавления 1М HCl). В эту систему добавляли по 2,5 мл 10% раствора полисахарида и инкубировали при 37°C в течение 6 часов. Оценку устойчивости полисахаридов проводили на основе СГ. Пробы отбирали каждые 2 часа для определения начальной и конечной концентрации редуцирующего сахара. Концентрацию редуцирующего сахара определяли фотоколориметрически с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты (DNS), общий сахар измеряли с помощью рефрактометра АТС 32 Brix (Брикс, Китай). СГ рассчитывали по формуле:

$$\text{СГ (\%)} = \frac{\text{редуцирующий сахар}}{\text{общий сахар} - \text{начальный редуцирующий сахар}} * 100 \quad (1)$$

2) *In vitro* *определение пребиотических свойств микробных полисахаридов*

Пребиотическая активность ГК, КК и ПУЛ была исследована методом *in vitro*, описанным Huebner и др. [143] с некоторыми модификациями. Полисахариды добавляли в колбы с безуглеводной средой MRS в концентрации 1% (масс./об.). Положительным контролем служила стандартная среда MRS с глюкозой. В качестве отрицательного контроля использовали MRS без источника углерода.

Суточные культуры пробиотического штамма LGG и кишечной палочки *E. coli* ATCC® 8739TM инокулировали (10⁷ КОЕ/мл) в колбы с питательными средами (1%, об./об.) и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Периодически отбирали образцы из каждой колбы для измерения оптической плотности (ОП) с использованием спектрофотометра UV-1601 PC (Shimadzu, Киото, Япония) (ОП 600). Количество жизнеспособных бактерий также определяли после инкубации на MRS агаре (для лактобацилл) и питательном агаре (для *E. coli*) (37°C, 24 часа). Изменения рН ферментационной среды определяли с помощью рН-метра SevenCompact S220 (Меттлер Толодо, Урдорф, Швейцария).

Оценку пребиотической активности (ОПА) определяли с помощью следующей формулы (2):

$$\text{ОПА} = \frac{\text{Пребиотик} (\log \Pi_{24\text{ч}} - \log \Pi_{0\text{ч}})}{\text{Глюкоза} (\log \Pi_{24\text{ч}} - \log \Pi_{0\text{ч}})} - \frac{\text{Пребиотик} (\log E_{24\text{ч}} - \log E_{0\text{ч}})}{\text{Глюкоза} (\log E_{24\text{ч}} - \log E_{0\text{ч}})} \quad (2)$$

где log Π - логарифм роста (КОЕ/мл) пробиотических бактерий через 24 и 0 часов на пребиотике и глюкозе; log E - логарифм роста (КОЕ/мл) *E. coli* через 24 и 0 часов на пребиотике и глюкозе.

2.2.2 Получение пленок БЦ и БЦ/ПУЛ

1) Получение БЦ в поверхностных условиях культивирования

Инокулят готовили путем переноса колонии из рабочей агаровой культуры в 100 мл питательного бульона NS и последующего инкубирования при 30°C в течение 48 часов. Полученную культуру энергично встряхивали для освобождения иммобилизованных клеток от синтезированной целлюлозной пленки с последующей фильтрацией суспензии через стерильные сетки. Затем клетки осаждали центрифугированием при 10 000×g. Титр клеток определяли по ОП и доводили до 10⁷ клеток/мл с помощью спектрофотометра.

Жидкофазное стационарное культивирование продуцента БЦ проводили в жидкой среде NS. Среду разливали в колбы по 100 мл. Затем в среду вносили 1 мл инокулята. Культивирование проводили при 30°C в течение 7 суток. Пленки БЦ отделяли от культуральной среды и промывали в 0,5-1% растворе NaOH при 80°C до полного удаления клеток. Затем образцы целлюлозы отмывали от раствора NaOH дистиллированной водой, 0,5% раствором уксусной кислоты и снова дистиллированной водой до нейтральной реакции. Массу пленок определяли после предварительного высушивания в сушильном шкафу при 50°C до постоянного веса образца.

2) Получение полисахарида ПУЛ

Посевной материал *Aureobasidium pullulans* C-7, выращивали на скошенной среде Сабуро в пробирках в течение 7 суток при 27°C. Образовавшуюся пленку гриба размером 1 см² переносили из пробирок в предферментационную колбу, которая содержала 25 мл среды базовой среды и культивировали в течении 3-х суток в орбитальном шейкере-инкубаторе ES-20 (Biosan, Рига, Латвия) (20 об/мин) при 25°C. Далее из них засекали ферментационные колбы из расчета 1% от объема среды и инкубировали в тех же условиях.

Выделение ПУЛ из культуральной жидкости продуцента осуществляли центрифугированием в течение 15 мин при 6000×g и его осаждением из супернатанта путем добавления 2-х объемов 96%-го спирта. Затем снова центрифугировали в том же режиме с целью отделения осажденного ЭПС. Полученный ПУЛ высушивали в сушильном шкафу при 40°C и измельчали в лабораторной мельнице IKA Multi Drive (IKA, Штауфен, Германия) до порошкообразного состояния.

3) Получение полисахаридного комплекса БЦ/ПУЛ

- вариант *in situ*.

Инокулят *K. xylinus* C-3, полученный вышеописанным способом, вносили в 100 мл среды NS, в которую добавляли 1% и 2% ПУЛ. Систему инкубировали в статических условиях при 30°C в течение 7 суток. После чего пленку отделяли фильтрованием, обрабатывали NaOH, уксусной кислотой, отмывали от этих химикатов дистиллированной водой по вышеприведенному протоколу. Массу пленок после высушивания определяли гравиметрически.

- кокультивирование *K. xylinus* C-3 и *A. pullulans* C-7.

Инокулят *K. xylinus* С-3 и *A. pullulans* С-7 были получены вышеописанными способами. Титр клеток в посевных материалах определяли по ОП и доводили до плотности $\approx 10^7$ клеток/мл.

Инокулянты обеих культур (1%, об./об.) добавляли в колбы, содержащие по 100 мл сред ПС-1 и ПС-2. Культивирование проводили в статическом режиме при температуре 30°C в течение 7 суток. Затем пленку отделяли и промывали согласно вышеуказанному протоколу.

4) Определение содержания ПУЛ в композите БЦ/ПУЛ

Раствор целлюлазы готовили путем растворения 50 мг/мл целлюлазы из *Trichoderma* sp. (Sigma-Aldrich, Тауфкирхен, Германия) в деионизированной воде. Образец БЦ/ПУЛ добавляли в раствор целлюлазы в соотношении 1:10 и инкубировали в орбитальном шейкер-инкубаторе при температуре 37°C, 24 часа. Осаждение ПУЛ проводили в соответствии с вышеописанным способом. Количество ПУЛ в БЦ/ПУЛ определяли гравиметрически.

2.2.3 Определение физико-химических свойств пленок БЦ/ПУЛ

1) Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

ИК-спектры полимеров измеряли с помощью спектрофотометра Jasco FT/IR6200 (Jasco, Истон, Мэриленд, США). Образцы первоначально подвергали сушке и превращали в порошок. Затем порошок смешивали со спектрально чистым KBr и смесь прессовали. Перед использованием прессформу протирали этиловым спиртом, используя безворсовые салфетки. Порошок, помещенный в прессформу, непосредственно перед прессованием разравнивали с помощью шпателя для обеспечения равномерности распределения вещества в объеме прессформы во время прессования.

Сканирование выполнялось на персональном компьютере, который дополнительно генерирует ИК-спектр. Спектры были получены с разрешением 2 см⁻¹ и 50 сканов в диапазоне 4000-400 см⁻¹. Детектор отслеживает диапазон длин волн и передает сигнал на компьютер, который преобразует сигнал в спектр поглощения. Полученные спектры интерпретировали.

2) Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Изображения СЭМ получены при помощи сканирующего электронного микроскопа JSM-7800F (Jeol, Токио, Япония) с напряжением ускорения 5 кВ. Тонкие срезы образцов были высушены, помещены на металлическую подложку и покрыты платино-палладиевым сплавом (Pt/Pd 80/20). Программное обеспечение Image J (версия 1.8.0, Национальный институт здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, США) использовалось для анализа микрофотографий и измерения диаметров волокон и размеров пор. Был определен и усреднен диаметр не менее 100 волокон.

3) Определение прочности пленок

Механические характеристики, такие как предел прочности при растяжении (МПа) и относительное удлинение при разрыве (%), были измерены на разрывной машине Instron (модель 3365, Норвуд, Массачусетс,

США) в одноосном режиме. Размер пленок БЦ и БЦ/ПУЛ для анализа составлял – ширина 10 мм, длина 10 см. Механические характеристики каждого образца были представлены в виде средних значений, определенных на основе пяти образцов.

2.2.4 Определение биопленкообразующей способности пробиотика

1) Культивирование бактерий и подготовка культуры для анализа

Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC® 53103™) культивировали в среде MRS при 37°C в течение 48 часов для получения концентрации клеток 10^8 КОЕ/мл. Затем культуральную жидкость центрифугировали при $4000 \times g$ в течение 15 мин (лабораторная центрифуга RS-6MC (Дастан, Бишкек, Кыргызстан). Клетки отделяли от супернатанта и дважды промывали физиологическим раствором.

2) Анализ биопленкообразования LGG методом микропланшетов

Метод, предложенный Lebeer и соавторами [18], был использован с незначительными изменениями: 200 мкл питательной среды и суспензии LGG (10^8 КОЕ/мл) смешивали в лунках полистиролового микротитрационного планшета и инкубировали в течение 48 часов при 37°C. Образовавшиеся в лунках биопленки промывали 5 раз 200 мкл фосфатно-буферного раствора (PBS) и сушили при 25°C в течение 40 мин в перевернутом положении.

Оставшиеся прикрепленные бактерии окрашивали 1 мл 0,1%-ного раствора кристаллического фиолетового (Merck, Дармштадт, Германия) в течение 30 мин. После окрашивания раствор красителя отсасывали, лунки промывали 5 раз 200 мкл дистиллированной воды и сушили в течение 30 мин при 25°C. Краситель, связанный с прикрепленной биопленкой, экстрагировали 200 мкл смеси этанола и ацетона (80:20). Затем из каждой лунки отбирали аликвоты по 150 мкл и определяли ОП при 570 нм. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную питательную среду. Результаты образования биопленки были классифицированы как положительные ($\text{ОП } 570 \geq 1$), слабо положительные ($0,1 \leq \text{ОП } 570 < 1$) или отрицательные ($\text{ОП } 570 < 0,1$).

Аналогичным образом проведено исследование возможности образования штаммом LGG биопленки на полисахаридных матрицах. Полисахаридные диски помещали в лунки планшета, и каждую лунку заполняли питательной средой, засеянной бактериями (10^8 КОЕ/мл). Затем планшет инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C, запечатав парафильмом для предотвращения испарения. Эффективность образования биопленки анализировали, методом, описанным выше. Кроме того, наличие или отсутствие биопленки было подтверждено с помощью СЭМ.

2.2.5 Получение микрогранул с пробиотическими биопленками

1) Иммобилизация LGG в матрицу БЦ и БЦ/ПУЛ

Для иммобилизации в БЦ и БЦ/ПУЛ использовали суспензию бактерий LGG с концентрацией клеток 10^8 КОЕ/мл. Гранулы были получены путем измельчения пленок БЦ и БЦ/ПУЛ в лабораторной мельнице IKA MultiDrive (IKA, Штауфен, Германия) и последующим гранулированием в грануляторе ZLSP-300 (Россия). Стерильные гранулы и бактериальные клетки помещали в среду PYG_m, предназначенную для стимуляции образования биопленки, и инкубировали при температуре 37°C до 48 часов, чтобы обеспечить надлежащую иммобилизацию в носителях. Затем микрогранулы промывали от слабо прикрепленных клеток стерильным физиологическим раствором.

Количество иммобилизованных бактерий определяли путем подсчета бактериальных клеток, полученных после разрушения микрогранул целлюлазой, на агаре MRS.

2) Микроскопия

Микроскопические исследования, использованные в этом исследовании, включали СЭМ, лазерную конфокальную флуоресцентную микроскопию и оптическую микроскопию.

Оптическую микроскопию выделенных колоний из пробиотических микрогранул проводили с использованием светового микроскопа (Scope A.1, Zeiss, Германия), оснащенного цифровой камерой Axio Cam MRc (Carl Zeiss, Германия).

Для флуоресцентной микроскопии рабочий раствор красителя готовили путем добавления 3 мкл красителя SYTO[®]9, LIVE/DEAD[™] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Уолтем, Массачусетс, США) к 1 мл PBS. Образцы микрогранул вносили в 200 мкл окрашивающего раствора, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, защищенном от света, и, наконец, промывали PBS. Затем визуализировали на флуоресцентном микроскопе Biozero (Keyence, Осака, Япония) — длина волны возбуждения: 480 нм; излучения: 500 нм.

СЭМ изображения были получены с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-7800F (Jeol, Токио, Япония). Образцы микрогранул были высушены и помещены на металлическую подложку, после чего покрыты напылением платино-палладиевого сплава (Pt/Pd 80/20). Анализ изображений проводился при различных увеличениях и ускоряющем напряжении 5 кВ.

3) *Определение уровня выживаемости пробиотических микроорганизмов в микрогранулах после сублимационной сушки*

После проведения процедуры иммобилизации влажные микрогранулы подвергались сублимационной сушке в течение 24 часов (Telstar LyoQuest-55, Испания). Параметры процесса высушивания микрогранул: замораживание ($t_{\text{полок}} = \text{минус } 40^\circ\text{C}$, $\tau = 4$ часа, $t_{\text{пр. конеч}} = \text{минус } (47 \pm 2)^\circ\text{C}$); сублимация ($t_{\text{полок}} = 35^\circ\text{C}$, $t_{\text{исп}} = \text{минус } (54 \pm 2)^\circ\text{C}$, $P = 20$ Па, $\tau = 12$ часов); десорбция ($t_{\text{полок}} = 25^\circ\text{C}$, $t_{\text{исп}} = \text{минус } (60 \pm 2)^\circ\text{C}$, $P = 8$ Па, $\tau = 8$ часов).

Количество жизнеспособных LGG в высушенных микрогранулах определяли методом серийных разведений и с последующим посевом на

MRS агар для подсчета КОЕ/г в образцах.

2.2.6 Определение устойчивости иммобилизованных клеток в условиях, моделирующих желудочный сок и секрецию двенадцатиперстной кишки

1) Исследование толерантности к желудочной кислоте и солям желчных кислот

5 г микрогранул вносили во флаконы с 50 мл ИЖС (3 г/л пепсин, растворенный в растворе хлорида натрия (2 г/л), доведенного до pH 2 (0,1 моль/л HCl) и инкубировали в течение 2 часов. Затем те же микрогранулы помещали в 50 мл раствора искусственной двенадцатиперстной кишки (ИДК) (1 г/л панкреатин, 4,5 г/л солей желчных кислот, растворенные в растворе хлорида натрия (2 г/л), доведенного до pH 6,8) на 2 часа. Оба раствора предварительно стерилизовали путем фильтрации через мембрану толщиной пор 0,22 мкм. Инкубирование проводилось в шейкере-инкубаторе (150 об/мин) при температуре 37°C, для имитации температуры тела. Выжившие бактерии подсчитывали путем подсчета количества колоний на чашках с MRS агаром после инкубации при 37°C, 72 часа.

Для оценки выживаемости свободных клеток 1 мл бактериальной суспензии вводили в 9 мл ИЖС и инкубировали (в течение 2 часов). Затем 1 мл суспензии переносили в 9 мл раствора ИДК. Условия инкубации для свободных бактерий были идентичны тем, которые использовались для микрогранул. После инкубационного периода выживаемость свободных клеток определяли с использованием вышеупомянутого метода.

2) Высвобождение пробиотика в имитируемый сок толстого кишечника с фекальной суспензией/ферментативным экстрактом фекалий

Свежие образцы фекалий были предоставлены тремя донорами (двумя женщинами и одним мужчиной в возрасте 22-30 лет). Все доноры не имели заболеваний ЖКТ и не принимали про- или пребиотики или антибиотики в течение трех месяцев до взятия пробы.

Образец фекалий от каждого донора разбавляли стерильным калийфосфатным буфером (0,01 м, pH 7,4) и смешивали с помощью минимиксера (BioSpec, Бартлсвилл, Оклахома, США) для получения 10% (масс./об.) фекальной жижи. Затем ее центрифугировали (2000 об/мин, 5 мин) и супернатант использовали в качестве фекальной суспензии. Для приготовления ферментативного экстракта фекалий супернатант после первого центрифугирования дополнительно центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость (фекалазу), выделенную после второго центрифугирования, дополнительно фильтровали через мембрану толщиной 0,22 мкм для удаления фекальной микрофлоры.

Микрогранулы помещали в 45 мл свежеприготовленного имитируемого кишечного сока (ИКС) (5 мл фекальной суспензии или ферментативного экстракта кала, смешанного с 0,2 г/л хлорида калия, 8 г/л хлорида натрия, 0,24 г/л фосфата калия одноосновного, 1,44 г/л

двухосновного фосфата натрия, pH 7,2) после 2-часовой инкубации в желчном растворе. Все экспериментальные группы инкубировали в течение 3-18 часов в шейкерном инкубаторе в анаэробных (для фекальной суспензии) или аэробных (для фекального ферментативного экстракта) условиях при температуре 37°C. В конце инкубационного периода отбирали аликвоты объемом 1 мл и подсчитывали количество выживших бактерий путем подсчета колоний на чашках с MRS агаром после инкубации при 37°C в течение 72 часов.

3) Определение целлюлазной активности

Для сравнения целлюлолитической активности экстракта фекалий и фекальной суспензии использовали и модифицировали «метод агаровой чашки» (agar-based method), описанный Balla A. и др. [144]. Анализ проводили путем добавления 100 мкл образцов в лунки, содержащие агаровую среду с 1% карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) и инкубировали при 30°C, 24 часа. 1% раствор конго красного использовали для выявления зоны гидролиза целлюлозы, образующейся вокруг лунки после добавления раствора (15 мин) с последующим обесцвечиванием раствором NaCl (1M) в течение 10 мин. Для оценки активности целлюлазы измеряли диаметр светлых зон, окружающих лунки. Ферментативный индекс *Ei* рассчитывали согласно следующей формуле:

$$Ei = (\text{диаметр ореола} - \text{диаметр лунки}) / \text{диаметр лунки} \quad (3)$$

Количественную оценку целлюлазной активности в фекальной суспензии/экстракте оценивали с помощью метода DNS (3,5-динитросалициловой кислоты) [145], который измеряет количество редуцирующих сахаров, высвобождаемых при гидролизе. В качестве субстрата готовили 1%-ный раствор КМЦ в 1 М цитратном буфере с pH 5,0. Для инициации реакции к 1 мл раствора КМЦ добавляли 100 мкл пробы и 1 мл цитратного буфера. Затем смесь инкубировали при 45°C в течение 30 мин. Для остановки реакции вводили 1 мл DNS. Обработанные образцы кипятили 10 мин, охлаждали для стабилизации цвета и измеряли ОП при 540 нм. За одну единицу активности брали количество фермента, способное гидролизовать КМЦ и высвободить 1 μмоль редуцирующих сахаров в минуту.

2.2.7 Определение устойчивости иммобилизованных клеток при транзите ЖКТ крыс

1) Экспериментальные животные

Исследование проводили на самцах крыс породы “Wistar” массой 180-200 г. Животных содержали на стандартном рационе вивария. В экспериментах руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [146].

В возрасте 5 недель животные случайным образом были разделены на

четыре группы (по 10 крыс в каждой). Первой, второй и третьей группам давали смесь обычного коммерческого рациона и микрогранул БЦ/LGG, ПМППБ или суспензии свободных LGG ($\approx 9 \log$ КОЕ в день) в соотношении 3:1, соответственно, в течение 7 дней. Между тем, контрольная группа получала только обычный корм. Образцы фекалий отбирали в течение недели потребления и последующей недели наблюдения.

2) Обнаружение LGG в образцах фекалий крыс

Образцы фекалий крыс гомогенизировали и разбавляли в 10 раз калийфосфатным буфером (0,01 м, pH 7,4). Фекальную суспензию использовали для подсчета бактерий путем посева на MRS агар и инкубации в течение 72 ч при 37°C в анаэробных условиях. Количество бактерий в фекалиях выражали в виде $\log$ КОЕ/г. Для идентификации LGG случайно выбранные колонии с каждой чашки агара пересевали на среду MRS, содержащий индикаторный краситель (0,04 г/л бромкрезолового фиолетового), где единственным источником углерода была лактоза. Лактозоположительные бактерии образуют молочную кислоту путем сбраживания лактозы, которая снижает pH среды, вызывая изменение цвета с фиолетового на желтый. Напротив, лактозонегативные бактерии образуют небольшие колонии и используют пептон и дрожжевой экстракт для роста без образования молочной кислоты, в результате чего колонии сохраняют свой фиолетовый цвет. Потенциальные изоляты LGG также были исследованы с помощью светового микроскопа и СЭМ, чтобы подтвердить, что клетки имели форму, типичную для LGG (палочки в цепочках).

Дополнительно предполагаемые колонии LGG были идентифицированы методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием специфичного для мишени зонда для определения последовательности 16S рРНК. Использовали меченный флуоресценцией зонд Lcas467 (5'-CCGTCACGCCGACAACAG-3'), предназначенный для идентификации LGG [147]. Зонд был помечен изотиоцианатом флуоресцеина (FITC). Бактериальную суспензию ($\approx 10^7$ клеток) на предметных стеклах гибридизовали добавлением 10-20 мкл гибридизационного буфера (0,9 М NaCl, 20 мМ Трис HCl (pH 7,2), 0,1% додецилсульфат натрия, 30% формамид) с 1 мкл олигонуклеотидного зонда и инкубировали при 46°C в течение 2 ч. После гибридизации каждый образец промывали буфером (180 мМ NaCl, 20 мМ Трис HCl (pH 7,2), 0,1% додецилсульфат натрия, 5 мМ ЭДТА). Предметные стекла микроскопа промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Затем образцы визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Biozero (Keyence, Осака, Япония).

2.2.8 Метагеномный анализ

1) Экспериментальные группы

В данном исследовании участвовали две экспериментальные группы (1 – до приема пробиотика, 2 – после приема пробиотика), состоящие из 20 здоровых добровольцев (10 женщин, 10 мужчин, 20-30 лет). Участники

принимали биологически активную добавку «Лактоцелл» согласно инструкции в течение 10 суток.

2) Экстракция ДНК и секвенирование 16S

Образцы фекалий были собраны участниками эксперимента в соответствии со стандартным протоколом сбора. Добровольцам были выданы пробирки для сбора фекалий со средой DNA/RNA Shield Fecal Collection Tube with UTM[®] Mycobioime (R1101, Zymo Research).

Этапы выделения геномной ДНК из образцов проводили с использованием набора ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, D4300) согласно инструкции производителя (Zymo Research, Ирвин, Калифорния, США). Качество выделенной ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Концентрацию и чистоту каждого образца ДНК определяли с помощью флуорометра Invitrogen Qubit 3.0 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). В качестве отрицательного контроля использовали стерильную воду. Анализ состава микробиома кишечника включал секвенирование области V1-V3 гена 16S рРНК. Для создания библиотек последовательностей использовали набор Nextflex 16S V1-V3 Amplicon-seq (Perkin Elmer, США). Затем эти библиотеки были секвенированы системой Illumina Novaseq 6000 (Novogene Bioinformatics Technology Co., Тяньцзинь, Китай).

3) Биоинформационный анализ

Сведения о секвенировании ампликона 16S, начиная с исходных данных, была преобразована в таблицы, указывающие плотность таксонов, с использованием конвейера LotuS2 (Less OTU Scripts 2). Важные этапы этой процедуры включали разделение последовательностей, обеспечение качества и объединение идентичных секвенций с помощью простого демультиплексора. Химерные последовательности были распознаны и удалены с использованием алгоритмов UCHIME. Последующие таксономические корректировки и группировка последовательностей с использованием базы данных SILVA были выполнены с использованием LCA и UPARSE соответственно.

2.2.9 Статистическая обработка результатов экспериментов

Если не указано иное, все экспериментальные группы анализировали в трех повторностях. Экспериментальные измерения представлены как среднее значение и стандартное отклонение (среднее $\pm$ SD). Разницу между группами анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки. Весь статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения SPSS (версия 28.0, IBM Corp., Армонк, Нью-Йорк, США). Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Статистический анализ и визуализация метагеномного исследования были выполнены в “Python 3.9.16”. Таблица ASV была нормализована на основе факторов с использованием метода GMPR, чтобы учесть различия

между выборками и избежать потенциальной потери данных, связанной с разрежением; были сохранены только ASV, присутствующие по меньшей мере в 50% выборок в обеих группах. Все сравнения групп проводились с использованием знаково-рангового критерия Уилкоксона с использованием библиотеки SciPy 1.10.1; корректировка для множественных сравнений не применялась из-за ограниченного размера выборки. Альфа-разнообразие оценивали по индексам Шеннона и Симпсона, бета-разнообразие – по расстоянию Брея-Кертиса с использованием тестов ANOSIM и PERMANOVA, библиотекой “Scikit-bio 0.5.6”. Ординацию межвыборочного состава осуществляли с помощью анализа главных координат (PCoA). Таксономические признаки, значимо связанные с ординацией (показаны стрелками), определялись с использованием коэффициента корреляции Спирмена ρ с поправкой FDR. Дифференциальный анализ таксономических признаков проводился с использованием “PyDeseq2 0.3.5” с порогом значимости $p \leq 0,05$. Дифференциальный анализ функциональных особенностей был основан на различиях в медианах с 95% доверительным интервалом (ДИ) с использованием оценки Холлджеса-Легмана. Значимыми считались только различия в функциональных особенностях с непересекающимися ДИ. Корреляционный анализ проводился с использованием коэффициента ρ Спирмена только для дифференциально обильных признаков. Анализ важности признаков проводился с использованием комбинации деревьев решений с повышением градиента и биномиальной логистической регрессии с перекрестной проверкой с исключением одного с использованием библиотек “Scikit-learn 1.2.2” и “LightGBM 3.3.5”. Анализ ROC-AUC (area under ROC curve, площадь под ROC-кривой) был выполнен на основе однозначных прогнозов без предварительного выбора признаков или настройки гиперпараметров. Визуализация была выполнена с использованием библиотек “Matplotlib 3.7.1” и “Seaborn 0.11.2”. Кладограмма и линейчатая диаграмма L2FC были сгенерированы с использованием визуальных инструментов “LEfSe 1.0.8”.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Выбор пребиотика для включения в матрицу БЦ

3.1.1 Определение устойчивости полисахаридов в искусственном желудочном соке

Пребиотики – это неперевариваемые организмом-хозяином пищевые ингредиенты, которые оказывают благотворное влияние на здоровье хозяина благодаря их избирательному метаболизму в ЖКТ. Под избирательным метаболизмом подразумевается: устойчивость к кислотности желудка и гидролизу ферментами млекопитающих; абсорбция органами ЖКТ; ферментация кишечной микрофлорой; избирательная стимуляция роста и/или активность полезных кишечных бактерий. К пребиотикам относят фруктоолигосахариды, инулин, галактоолигосахариды, лактитол, лактулозу и др. [148]. Все чаще встречается информация о пребиотических свойствах полисахаридов, синтезируемых микроорганизмами [148]. Тогда можно попробовать получить биоконпозитную матрицу путем совместного культивирования двух продуцентов: БЦ и другого полисахарида (потенциального пребиотика). В связи с этим, были исследованы пребиотические характеристики трех биосинтетических полисахаридов: ксантана, геллана, пуллулана. Ксантан представляет собой внеклеточный полисахарид, продуцируемый бактерией *Xanthomonas campestris* [149]. Пуллулан – это внеклеточный гомополисахарид глюкозы, продуцируемый многими видами гриба *Aureobasidium*, в частности *A. pullulans* [150]. Геллан – это полисахарид, продуцируемый бактерией *Sphingomonas elodea* [151].

Поскольку ключевые свойства пребиотиков – неспособность расщепляться в верхних отделах ЖКТ, особенно в желудке и избирательно стимулировать рост пробиотических бактерий, пребиотическая активность исследовались по этим критериям.

Пребиотики не должны гидролизироваться в желудочном соке для того, чтобы они могли попасть в кишечник и повлиять на популяцию пробиотиков. СГ полисахаридов оценивали по количеству редуцируемых сахаров до и после инкубации их в ИЖС. Инулин использовался в качестве коммерческого стандартного пребиотика. График зависимости СГ полисахаридов от времени и показателя pH показан на рисунке 2.

После инкубации в течение 6 часов максимальное значение СГ инулина составило 1,9%, в то время как у ПУЛ – 2,6%. Наибольшие показатели СГ ксантана и геллана составили 7,2% и 9,9% соответственно.

Исследуемые полисахариды, подобно инулину, были устойчивы к желудочному соку. Более того, степень их гидролиза имела достоверно отрицательную корреляцию с pH. Например, после инкубации при pH 5 и 1 в течение 6 часов СГ ПУЛ составила 0,93 и 2,60% соответственно. Вероятно, это объясняется более легким разрывом гликозидных связей при низком pH, что приводит к частичному гидролизу полисахаридов.

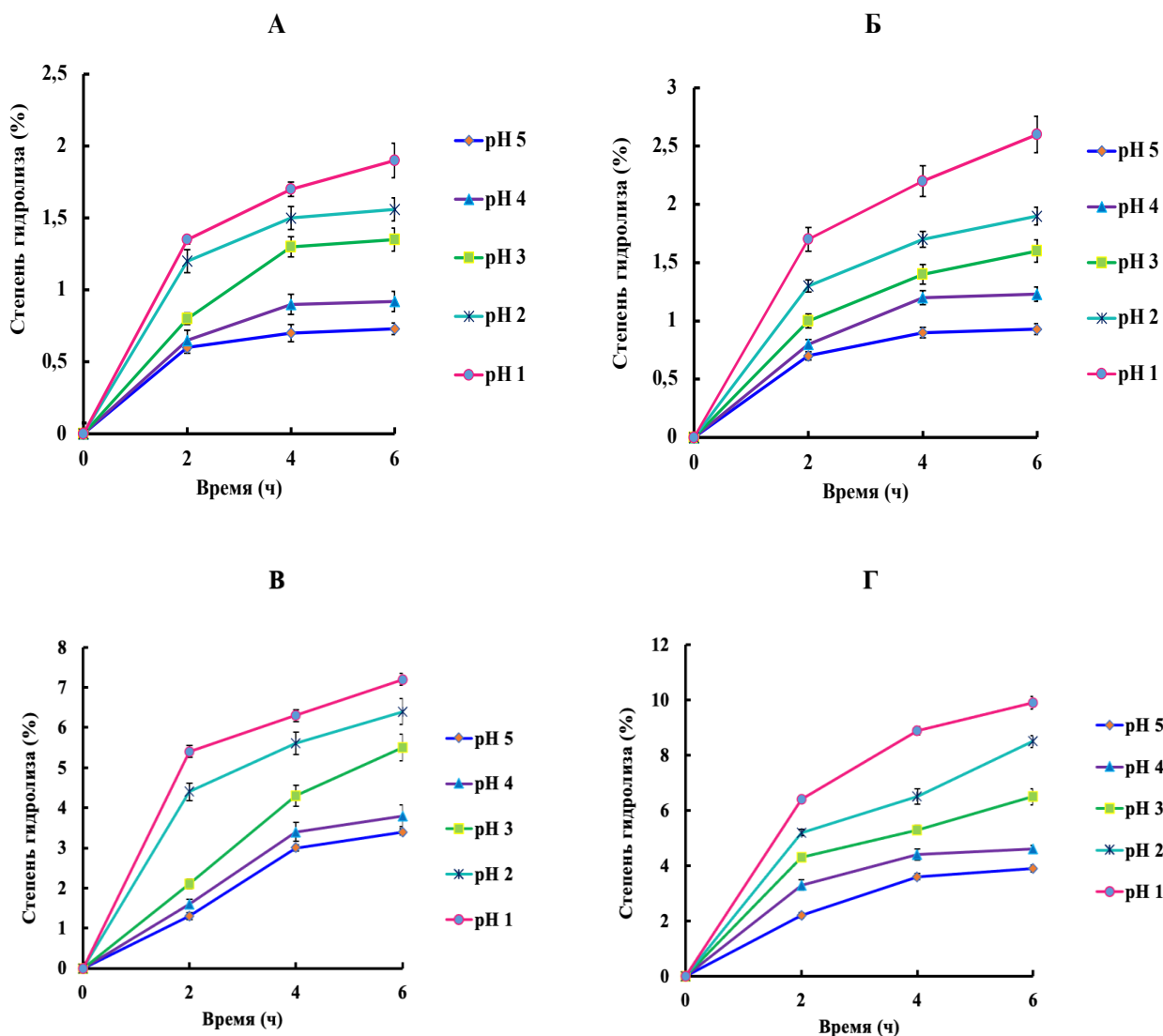


Рисунок 2 – Устойчивость полисахаридов в ИЖС: инулин (А), ПУЛ (Б), КК (В), ГК (Г)

С другой стороны, время инкубации также влияло на СГ, поскольку длительное время способствовало разложению большего количества полисахаридов до моно- и дисахаридов в кислых условиях. Устойчивость к гидролизу располагалась в следующем порядке: инулин (98%)>ПУЛ (97%)>КК (93%)>ГК (90%) соответственно. Было обнаружено незначительное различие между резистентностью инулина и ПУЛ под действием желудочного сока. Это свидетельствовало о хорошей стабильности ПУЛ в кислых условиях.

Как правило, пищевые продукты обычно проходят через желудок человека в течение 4 часов. По меньшей мере, 90% от начальной концентрации этих полисахаридов попадает в микропопуляцию кишечника. Следовательно, можно было с уверенностью предположить, что большая часть всех полисахаридов может попасть в кишечник и затем использована обитающими там пробиотиками.

3.1.2 Влияние микробных полисахаридов на рост LGG

Влияние полисахаридов на рост пробиотической культуры оценивали путем выращивания штамма на среде MRS с добавлением ксантана, геллана и пуллулана, а также с глюкозой (в качестве положительного контроля) и без источника углерода (в качестве отрицательного контроля). Концентрацию биомассы LGG выявляли путем определения клеточной плотности бульона MRS. ОП клеток LGG на средах с полисахаридами в течение 24-часового периода ферментации показана на рисунке 3а.

Было показано, что штамм способен к росту на всех средах с полисахаридами. LGG продемонстрировал наибольший прирост биомассы на среде с ПУЛ. К 12 часам ферментации ОП клеток составляла $0,92 \pm 0,02$ и увеличилась до $1,94 \pm 0,03$ через 24 часа. При использовании субстратов геллана и ксантана рост биомассы повысился незначительно в течение первых 12 часов; через 24 часа плотность клеток достигла $1,24 \pm 0,02$ и $1,13 \pm 0,03$ соответственно.

Рост штамма на среде с глюкозой оказался высоким. Это было ожидаемо, поскольку основным питательным веществом для LGG, как и для большинства организмов, не только бактерий, является глюкоза [152]. При использовании микробных полисахаридов ксантана и геллана рост штамма пробиотика был менее эффективным по сравнению с глюкозой, однако добавление ПУЛ привело к уровню роста, сравнимому с использованием глюкозы.

Рост LGG в среде MRS без добавления основного источника углерода был значительно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с другими вариантами. Это может быть объяснено тем, что другие компоненты среды MRS, такие как мясной и дрожжевой экстракты, содержат некоторое количество углеводов, способствующих росту бактерий. Naganuma и соавторы отмечали, что микроорганизмы способны использовать аминокислоты для своего роста [153]. Это объясняет способность пробиотика к росту в среде без добавления основного источника углерода.

Интенсивность метаболических процессов LGG контролировали по изменению pH среды, который служит индикатором превращения сахаров в органические кислоты как конечные продукты метаболизма. Результаты, представленные на рисунке 3б, свидетельствуют о зависимости между изменениями уровней pH и ростом бактериальной культуры.

pH ферментационной среды, содержащей ПУЛ, инокулированной LGG, значительно снизился после 24 часов инкубации. Снижение pH показало, что глюкоза из ПУЛ утилизируется, что указывает на выработку органических кислот. Однако падение pH среды было сильнее в положительном контроле по сравнению со средой, содержащей ПУЛ. pH отрицательного контроля оставался практически неизменным в течение всего периода инкубации.

Геллан и ксантан существенно не влияли на изменение pH в течение 12 часов ферментации, но показатели pH снизились к 24 часам до $5,22 \pm 0,01$ и $5,42 \pm 0,03$ соответственно. Согласно этим результатам, полисахариды ГК и

КК медленно ферментируются штаммом пробиотиком. В предыдущем исследовании авторы предположили, что разветвленные боковые цепи и $\beta(1\rightarrow4)$ гликозидные связи ксантана и геллана могут быть причиной медленной утилизации полисахаридов [154].

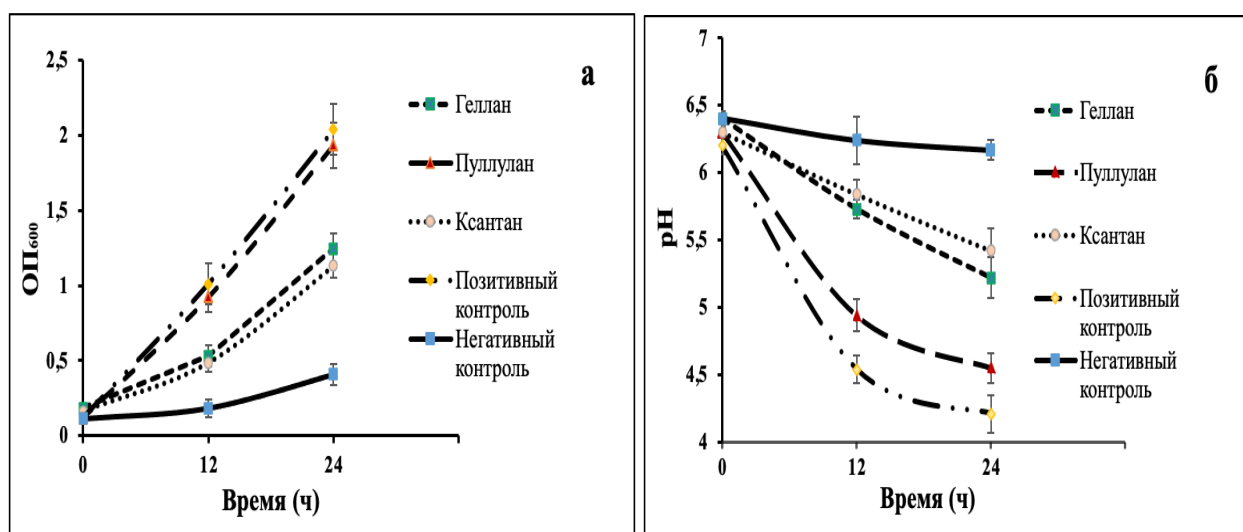


Рисунок 3 – Влияние микробных полисахаридов на рост LGG (а) и на кислотность среды (б)

Большинство микроорганизмов предпочитают использовать глюкозу как основной источник энергии. Как сообщают Faria и др. [155], ксантан содержит 43% глюкозы, 32% маннозы и 24% глюкуроновой кислоты. В то время как геллан состоит примерно из 60% глюкозы, 20% глюкуроновой кислоты и 20% рамнозы [156]. Исследования показали, что состав мономеров и тип связей влияют на скорость ферментации, при этом L-рамноза, арабиноза, мелезитоза и ксилоза ферментируются медленнее, чем D-глюкоза [157]. Это может объяснить, почему рост бактерий на среде с исследуемыми полисахаридами был медленнее, чем на среде с глюкозой.

ПУЛ состоит из глюкозы и имеет связи, которые могут быть гидролизваны бактериями. Структура полисахарида включает в себя $\alpha(1\rightarrow4)$ и $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидные связи. Ранее сообщалось, что ингибирующая активность α -глюкозидазы штамма LGG варьирует от 13,5% до 37,9% [158]. Этот фермент разрушает α -1,4-гликозидные и α -1,6-гликозидные связи, что позволяет бактериям утилизировать полисахарид [159].

В предыдущем исследовании, где ПУЛ использовался в качестве субстрата для штамма *Lactobacillus*, отмечался усиленный рост бактерий, сопровождающийся выделением молочной и уксусной кислот [154].

Химическая структура играет значительную роль в процессе метаболизма источников углерода лактобактериями, а также в скорости, с которой это происходит. Тот факт, что среда с ПУЛ была предпочтительнее для увеличения клеточной биомассы по сравнению с другими микробными

полисахаридными средами, может быть связан со сложной химической структурой геллана и ксантана.

Пребиотическую активность субстратов дополнительно исследовали путем подсчета жизнеспособных клеток (log КОЕ/мл) и определения показателей пребиотической активности.

Пребиотический субстрат характеризуется своей избирательностью и не может быть легко ферментирован комменсальными микроорганизмами (не лакто- и бифидобактериями, т. е. не пробиотиками). В связи с этим в рамках исследования анализировался рост *E. coli* на среде MRS с микробными полисахаридами. Пробиотик хорошо рос на всех средах, однако количество клеток варьировалось в зависимости от субстрата (таблица 2).

Таблица 2 – Уровень роста пробиотика и кишечной палочки выращенных на различных средах

Штамм	Субстрат	log КОЕ/мл		Δ роста (log КОЕ/мл через 24 часа - log КОЕ/мл через 0 часов)
		0 часов	24 часа	
LGG	ГК	6,03±0,24 ^a	7,74±0,09 ^a	1,71
	ПУЛ	6,23±0,23 ^a	8,02±0,11 ^b	1,79
	КК	5,92±0,15 ^a	7,54±0,12 ^a	1,62
	Глюкоза	6,44±0,22 ^a	8,19±0,14 ^b	1,75
<i>E. coli</i>	ГК	6,22±0,25 ^a	7,85±0,29 ^a	1,63
	ПУЛ	5,34±0,18 ^b	6,85±0,17 ^c	1,51
	КК	5,83±0,19 ^a	7,63±0,27 ^a	1,80
	Глюкоза	5,74±0,17 ^a	7,95±0,28 ^a	2,21

Примечание: буквенные обозначения показывают статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группами внутри каждого временного интервала (0 часов и 24 часа).

Как и ожидалось, активное увеличение клеток LGG обнаружено на среде, содержащей глюкозу. Это связано с тем, что углеводы с более короткими цепями ферментируются с более высокой скоростью [160]. Было обнаружено, что добавление ПУЛ оказывает значительное влияние на жизнеспособность пребиотических клеток по сравнению с ксантаном и гелланом. *E. coli*, также, подобно многим бактериям, предпочитает глюкозу в качестве источника углерода. Но в отличие от остальных субстратов количество клеток *E. coli* на среде с ПУЛ было очень низким ($p < 0,05$), что указывает на избирательную стимуляцию микроорганизмов пребиотиком.

Оценка пребиотической активности (ОПА) была рассчитана после 24 часов культивирования (рисунок 4). Она указывает на способность субстрата стимулировать исключительно рост пробиотика. Субстраты с положительной оценкой поддерживают хороший рост пребиотических бактерий, и количество клеток сопоставимо с уровнем при выращивании на непребиотической среде (например среде с глюкозой). Однако рост *E. coli*, на пребиотическом субстрате, теоретически должен быть очень низким по

сравнению с непробиотической средой. Согласно Huebner и др. [143], микроорганизмы, отдающие предпочтение глюкозе нежели пребиотику, могут иметь низкую или даже отрицательную пребиотическую оценку.

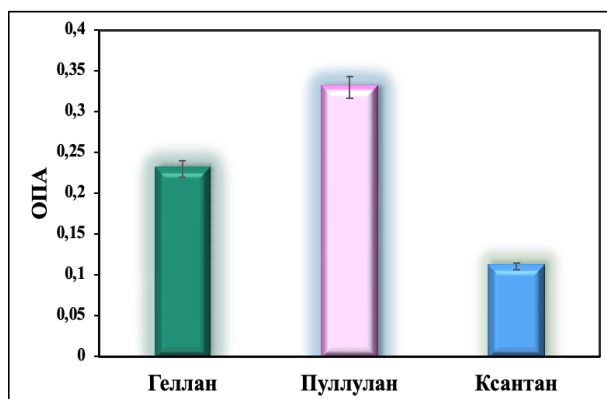


Рисунок 4 – Оценка пребиотической активности (ОПА) микробных полисахаридов.

Таким образом, все микробные полисахариды оказали положительное влияние на рост пробиотического штамма. Показатели ОПА полисахаридов расположились в следующем порядке: ПУЛ>ГК>КК. ПУЛ имел самый высокий пребиотический потенциал с оценкой $0,33 \pm 0,01$. Другими словами, он оказался более подходящим пребиотиком для штамма GG в качестве источника углерода. Влияние ПУЛ на микробную популяцию, наблюдаемое в этом исследовании, согласуется с результатами предыдущих работ [161–164].

Высокая оценка ПУЛ указывает на его селективное стимулирование роста пробиотической культуры и за счет этого подавления развития патогенных организмов, что делает его идеальным пребиотиком.

3.2 Получение полисахаридного матричного комплекса БЦ/пуллулан

3.2.1 Создание полисахаридного матричного комплекса методом *in situ* в процессе биосинтеза целлюлозной матрицы

Создание биоконструктов – одно из интенсивно развивающихся направлений не только биотехнологии, но и материаловедения. Это эффективный и распространенный способ разработки новых материалов с комбинированием свойств отдельных компонентов и преодоления некоторых ограничений отдельных материалов [165]. Для этих целей могут быть использованы как природные и синтетические полимеры, так и некоторые неорганические соединения.

Композиты состоят из двух типов материалов: матрицы и наполнителя. Матрица выполняет роль каркаса и поддерживает армирующий элемент (наполнитель), при этом последний улучшает физико-химические и

биологические свойства матрицы. Широкий спектр матриц и армирующих материалов позволяет синтезировать различные композиты с оптимизированными свойствами [166,167]. Отличительной особенностью таких кластеров (комплексов) является синергизм свойств природной стабилизирующей матрицы (водорастворимость, биосовместимость, пролонгированность биологического действия) и различных специфических свойств материала наполнителя.

В этой области все большую популярность приобретают исследования, направленные на разработку композитных материалов, использующих в качестве каркасной основы БЦ [168,169]. Многие микроорганизмы способны синтезировать БЦ, но основным продуцентом являются бактерии *K. xylinus* [170]. С химической точки зрения БЦ – линейный полимер, состоящий из элементарных звеньев D-глюкозы (anhydro glucopyranose), соединенных 1,4-β-гликозидными связями и поскольку она является синтезируемым микроорганизмами ЭПС – химически чистым внеклеточным продуктом, не содержащим лигнина, смол, жиров и восков [171,172].

БЦ также характеризуется высокой кристалличностью и степенью полимеризации. Не менее важны такие физические параметры БЦ, как гибкость, высокая пористость, разнообразная форма и высокая влагоудерживающая способность [172]. Особенно следует отметить, что БЦ нетоксичный, биосовместимый и биоразлагаемый полимер, широко используемый в биомедицине и других смежных областях [173].

Микро- и нанофибриллярная структура биоцеллюлозы, открывает огромные возможности для создания различных биокомпозитных материалов на ее основе. Это связано с тем, что агрегаты фибрилл занимают незначительную часть объема, образуя поры разного диаметра, что позволяет вводить в БЦ разнообразные соединения от наноразмерных частиц до высокомолекулярных полимеров [169]. Имеются в ней и большие поры, в которые можно поместить клетки прокариотных и даже эукариотных организмов. Для этого требуются специальные приемы, позволяющие увеличить поры, необходимые для интеграции клеток эукариот в БЦ. Эти технологии используются в различных областях тканевой инженерии: от простых 2D-каркасов до 3D-печати. Обычно армирующие компоненты обладают биологической активностью, и поскольку биоцеллюлоза является инертным материалом, они придают матрице-носителю новые функциональные свойства [14].

Существует три основные стратегии создания биоцеллюлозных биокомпозитов. Первая включает физические модификации, такие как нанесение покрытий, легирование и смешивание. Вторая группа методов предполагает химические модификации, включающие молекулярную модификацию и модификацию структуры пор. Эти методы позволяют изменять гидрофобность матрицы, что особенно важно для усиления клеточной адгезии при создании композитов [3]. Третья группа – биологические методы, при которых функционализация биоцеллюлозы

происходит либо в процессе ее синтеза (*in situ*, кокультивирование), либо после ее биосинтеза (*ex situ*).

ПУЛ содержит как $\alpha(1\rightarrow4)$, так и $\alpha(1\rightarrow6)$ связи, а также линейную структуру основной цепи, что повышает вероятность сродства к БЦ по сравнению с другими полимерами, которые содержат только отдельные формы связей [174]. Более того, ПУЛ широко используется в пищевой промышленности в качестве загущающего, гелеобразующего и стабилизирующего агента [175,176], поэтому высока вероятность того, что он может защитить микроорганизмы, продуцирующие БЦ, от напряжения сдвига и увеличить производство БЦ. Более того, как съедобный полимер, ПУЛ был объявлен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами как “GRAS” (в целом признан безопасным).

В стратегии *in situ* армирующие материалы добавляют в питательную среду с продуцентом БЦ, где наполнитель включается в сеть целлюлозы и становится частью структуры полимера. Включение БЦ в ПУЛ ранее изучалось Trovatti и др., где целлюлоза была успешно включена в пленку ПУЛ, образуя устойчивый нанокомпозит, который может быть использован в качестве упаковки для пищевых продуктов и биомедицинского материала [177].

Однако влияние добавления ПУЛ на синтез БЦ недостаточно изучено. Это полисахарид, который содержит гликозидные цепи $\alpha(1\rightarrow4)$ и $\alpha(1\rightarrow6)$, может связываться с микрофибриллами БЦ во время их синтеза и способствовать улучшению выхода экзополисахарида и усилению механических свойств БЦ.

Используемый в работе вариант метода *in situ* включал в себя предварительный синтез полисахарида ПУЛ. Экзополисахарид получали путем культивирования дрожжеподобного гриба *A. pullulans* C-7 на базовой среде, 6 суток, 25°C, 20 об/мин (рисунок 5).



Рисунок 5 – Схема получения пуллулана

Клетки дрожжеподобного гриба отделяли от культуральной жидкости на 6-е сутки. Полисахарид осаждали из супернатанта 96%-м этанолом и высушивали в сухожаровом шкафу при 40°C. Полученный ПУЛ измельчали до порошкообразного состояния.

Полисахарид в концентрации 1% или 2% вносили в питательную среду, инокулированную продуцентом БЦ, как проиллюстрировано на рисунке 6. Образующиеся в процессе синтеза микрофибриллы целлюлозы образуют сеть, которая захватывает ПУЛ и он включается в целлюлозную матрицу в процессе ее образования.

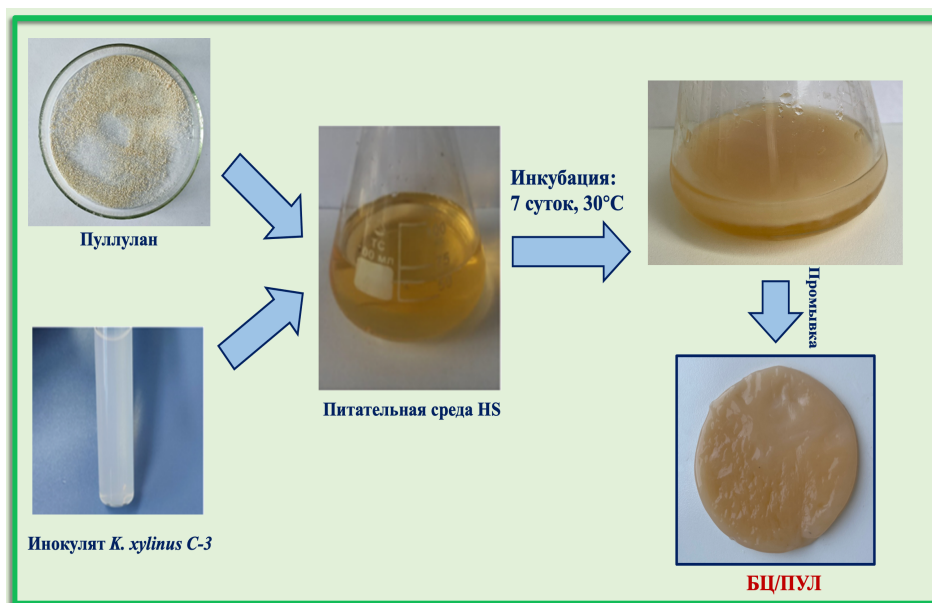


Рисунок 6 – Создание полисахаридного матричного комплекса путем включения пребиотика в БЦ

Эффективность выхода БЦ в питательной среде с ПУЛ представлена на рисунке 7.

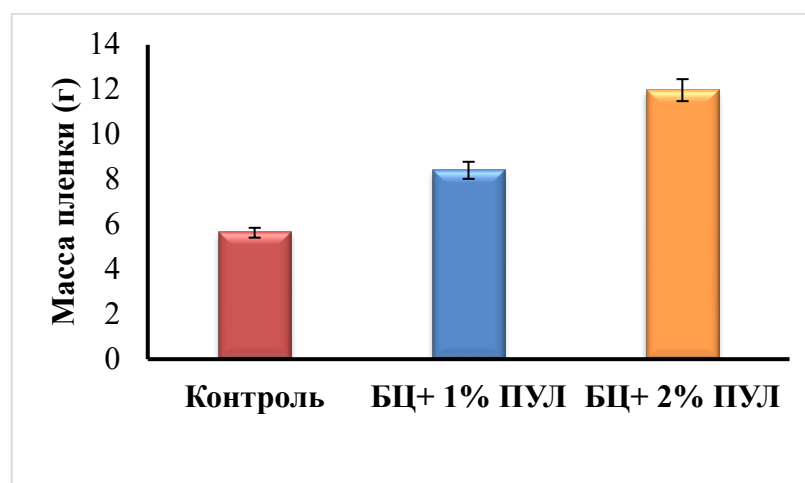


Рисунок 7 – Масса пленок БЦ/ПУЛ

Согласно полученным результатам, масса пленки без добавления ПУЛ (контроль) составила $5,63 \pm 0,22$ г/л. Установлено, что при инкубировании БЦ в среде с 1% ПУЛ, выход экзополисахарида возрос до $8,41 \pm 0,38$ г/л. При добавлении 2% ПУЛ, масса пленки значительно увеличилась – $11,98 \pm 0,49$ г/л. Выход БЦ увеличивался в полтора раза при добавлении 1% ПУЛ и в 2 раза при добавлении 2% полисахарида.

Такой прирост может быть объяснен тем, что некоторые добавки могут иметь высокое сродство к протофибриллам БЦ и некристаллизованным микрофибриллам, насыщая их участки с водородными связями. Поскольку процесс синтеза включает в себя множество протофибрилл БЦ, полученных и экстрадированных различными целлюлозосинтазными комплексами, весь процесс полимеризации и совместной кристаллизации целлюлозы может быть ограничен наименее эффективным ферментом целлюлозосинтазы. Когда участки с водородными связями насыщены, перед совместной кристаллизацией образуются более мелкие микрофибриллы БЦ. Следовательно, эффект наименее эффективного сайта целлюлозосинтазы был снижен, поскольку глюкановая цепь, продуцируемая этим сайтом, могла кристаллизоваться с меньшим количеством глюкановых цепей [178,179]. Подтверждение этого предположения обнаруживается также в работе Cheng и др. [178,180], которые установили, что добавление 1,5-2% полисахарида КМЦ в культуральную среду увеличивает выход БЦ в 1,7 раза.

На основании этого исследования можно сделать вывод, что высокая концентрация ПУЛ может повысить выход БЦ за счет нарушения совместной кристаллизации протофибрилл, тем самым уменьшая эффект ограничения уровня выхода экзополисахарида.

3.2.2 Создание полисахаридного матричного комплекса путем совместного культивирования продуцентов БЦ и пуллулана

Второй способ биологического создания БЦ композитов – это метод совместного культивирования микроорганизмов-продуцентов. Поскольку ПУЛ продуцируется микроорганизмами, возможно совместное культивирование, где штаммы-продуценты БЦ и ПУЛ могут быть инокулированы вместе. ПУЛ образуется дрожжеподобным грибом *A. pullulans* и во время синтеза включается в растущий матрикс БЦ. Т. е. композит можно получить кокультивированием микроорганизмов, создавая искусственную симбиотическую систему.

Стратегия производства композиционных материалов на основе биоцеллюлозы путем совместного культивирования микроорганизмов-продуцентов была успешно применена в ряде исследований. Метод совместного культивирования *K. xylinus* в одной среде с другими бактериями был успешно применен для синтеза композитов БЦ/гиалуроновая кислота [181], БЦ/полигидроксibuтират [182] и БЦ/низин [183]. Этот метод также использовался при кокультивировании *K. xylinus* с грибом-базидиомицетом *Fomitopsis officinalis*, продуцентом агариновой кислоты [184].

Однако использование искусственно созданных микробных ассоциаций может быть затруднено из-за конкуренции за компоненты питательной среды. Примером может служить работа Ну и др. — описывающая совместное культивирование продуцентов БЦ и ПУЛ [185]. Попытка оказалась успешной, но эффективность выхода композита БЦ/ПУЛ (0,249 г/л), которая оценивалась по его весу, оказалась ниже, нежели варианта, когда ПУЛ добавляли в среду для *K. xylinus* (1,997 г/л). Однако, уровень производства композитной пленки может изменяться в зависимости от состава источников питательных веществ в среде. В связи с этим, главная задача работы – экспериментально подтвердить это.

Оба полимера синтезируются из глюкозы. Поскольку упомянутые авторы использовали глюкозу в качестве источника углерода в среде для совместного культивирования *K. xylinus* и *A. pullulans*, между ними вполне могла возникнуть борьба за этот субстрат. В связи с этим, в данной работе использовали мелассу вместо глюкозы. Меласса является побочным продуктом в конечной стадии кристаллизации при производстве сахара. Из-за высокого содержания сахара ее часто используют в качестве сырья для приготовления питательных сред. Это делает мелассу одним из наиболее экономичных источников углерода в микробиологии.

Питательная среда для совместного культивирования представляла собой комбинацию ранее разработанных сред для продуцентов БЦ и ПУЛ, основанных на 2% мелассе в качестве источника углерода [185,186]. Схема эксперимента показана на рисунке 8 [187].

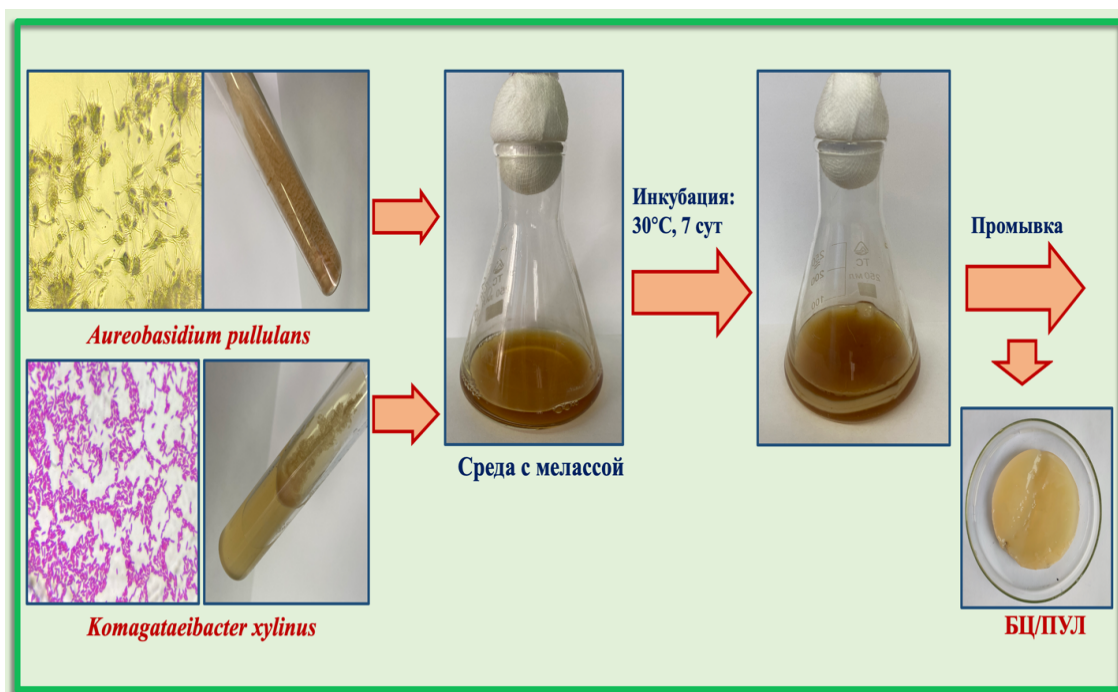


Рисунок 8 – Получение биокompозита БЦ/ПУЛ путем совместного культивирования

Согласно полученным данным, выход композита БЦ/ПУЛ на среде с мелассой (ПС-2) в 1,6 раза выше, чем на среде с глюкозой (ПС-1) (таблица 3).

Таблица 3 – Выход БЦ и ПУЛ после 7 суток статического культивирования продуцентов

Вариант	ПС-1		ПС-2	
	Продуктивность, г/л	Толщина пленки, мм	Продуктивность, г/л	Толщина пленки, мм
<i>K. xylinus</i> C-3 (БЦ)	4,6±0,26	4,0±0,21	10,8±0,64***	8,0±0,47***
<i>A. pullulans</i> C-7 (ПУЛ)	8,2±0,51	-	10,3±0,54***	-
<i>K. xylinus</i> C-3 + <i>A. pullulans</i> C-7 (БЦ/ПУЛ)	10,12±0,62	7,0±0,37	16,8±0,88***	12,0±0,67***

Примечание: *** достоверные ($p < 0,001$) различия с 1-й группой.

Такой эффект может быть обусловлен комбинацией углеводов, присутствующих в мелассе (сахарозы, глюкозы и фруктозы). Продуценты биополимеров сначала потребляют глюкозу, а затем постепенно и другие углеводы. Хорошо известно, что уксуснокислые бактерии, продуцирующие целлюлозу, окисляют глюкозу до глюконовой кислоты, что может снизить pH среды и ограничить синтез биополимеров [54]. Когда эти продуценты выращиваются на среде с мелассой, процесс интенсивного образования глюконовой кислоты ограничивается, и pH остается примерно на прежнем уровне (от 5,3 до 6,2). Кроме сахаров, меласса содержит много органических азотсодержащих соединений, таких как аминокислоты, нуклеиновые кислоты и витамины, которые могут стимулировать рост обоих микроорганизмов.

Кроме того, стимуляция образования пленки БЦ может быть вызвана ПУЛ, присутствующим в питательной среде. Fang и др., а позже Liu и соавторы сообщали, что добавление некоторых полисахаридов (таких как леван, ксилан, и карбоксиметилцеллюлоза) в ферментационную среду увеличивает выход БЦ [181,188]. Предполагаемый механизм заключается в том, что полисахариды могут связываться с предварительно кристаллизованными микрофибриллами БЦ, тем самым препятствуя процессу сокристаллизации, который является этапом, ограничивающей скорость продукции БЦ [189]. Во время синтеза БЦ цепи глюкозы, синтезированные внутри бактериальной клетки, выходят из нее через мельчайшие поры, присутствующие на ее клеточной мембране. Параллельные соседние протофибриллы БЦ совместно кристаллизуются, образуя более крупные микрофибриллы. Они собираются в большие ленты благодаря двум основным процессам: физической агрегации, где микрофибриллы соединяются вместе, и химическому связыванию, где они объединяются с помощью полисахаридов. Сокристаллизация, физическая агрегация и химическое связывание происходят одновременно, но с разной

скоростью и степенью [188]. Влияние ПУЛ на формирование БЦ могло иметь место во всех процессах.

Исходя из вышеприведенной информации, предполагаемая причина увеличения выхода пленки, заключается в том, что ПУЛ включается в матрицу БЦ во время ее синтеза, образуя «гибридный» биополимер БЦ/ПУЛ. Чтобы доказать это, синтезированный композит подвергали расщеплению ферментом целлюлазой. По мере деградации БЦ, водорастворимый ПУЛ (если он присутствовал в композите) выходил в раствор, из которого его осаждали этанолом, высушивали и взвешивали. Данные, полученные в этой серии экспериментов, указывают на то, что 37-40% синтезированного ПУЛ было включено в целлюлозную матрицу ($3,2 \pm 0,18$ на среде с глюкозой; $6,7 \pm 0,32$ на среде с меллассой).

Таким образом, комплексный полисахаридный комплекс БЦ/ПУЛ получили методом *in situ* и совместным культивированием продуцентов этих полисахаридов. Кокультивирование обеспечило наиболее высокий уровень синтеза композита.

Пленку БЦ/ПУЛ полученную методом совместного культивирования исследовали ИК-спектроскопией для определения химической структуры и возможных взаимодействий между его компонентами. Спектры БЦ, ПУЛ и БЦ/ПУЛ показаны на рисунке 9.

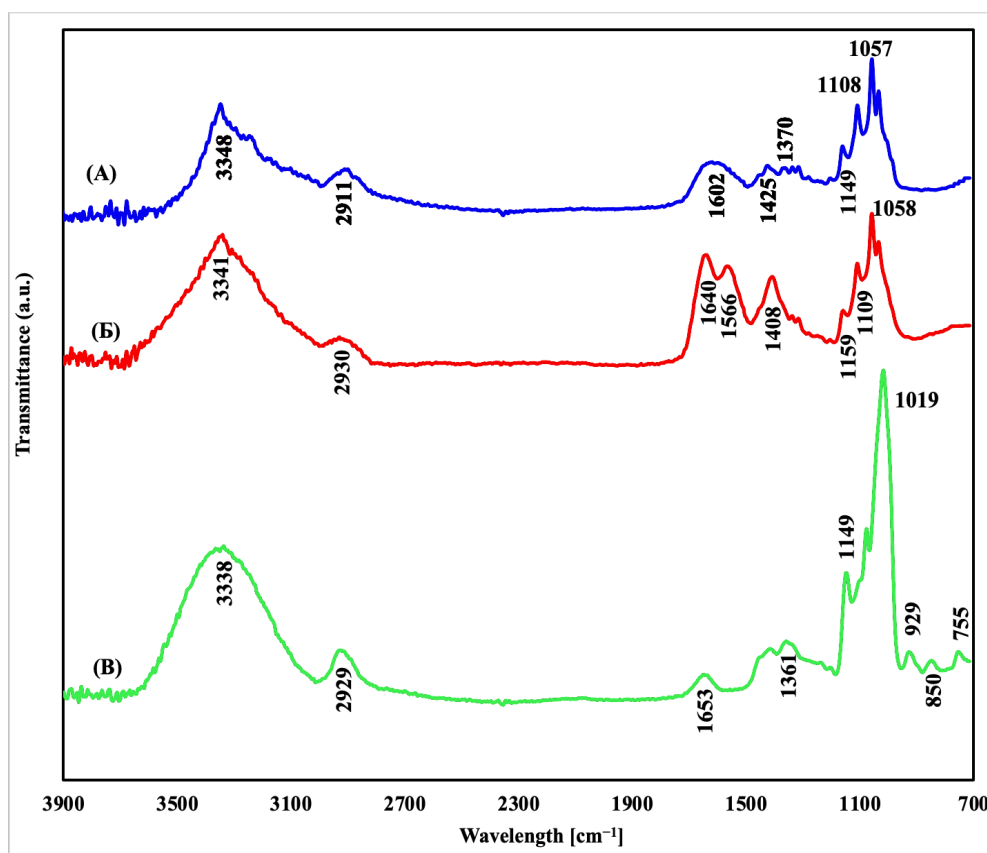


Рисунок 9 – ИК-спектры (А) БЦ/ПУЛ, (Б) БЦ и (В) ПУЛ

На образце БЦ/ПУЛ можно обнаружить характерные пики обоих компонентов, указывающие на его составную природу. Пики при 3348 см^{-1} и 2911 см^{-1} присутствуют во всех образцах из-за распространенности фенольных соединений, содержащих свободные гидроксильные группы, и колебаний растяжения С-Н соответственно [190]. Пик поглощения при 1602 см^{-1} связан с колебаниями растяжения С=О в акрилкетонах, растяжения С=С в ароматических кольцах и изгиба связи О-Н в фенолах [191,192]. Красное смещение пика в этом спектре по сравнению с индивидуальными спектрами БЦ и ПУЛ можно объяснить водородными связями между полярными группами компонентов в образце композита. Наличие участков водородных связей в БЦ способствует химическому взаимодействию целлюлозы с различными полимерами [193].

Пики, обнаруженные при 1425 см^{-1} и 1370 см^{-1} , объясняются изгибными колебаниями связей С-Н [194] в составе БЦ и ПУЛ соответственно. Колебания растяжения углерод-кислородных связей целлюлозы выражаются в виде набора очень хорошо структурированных пиков при 1108 см^{-1} и 1057 см^{-1} . Пик, появившийся при 1149 см^{-1} , является характерным пиком С-О растягивающей вибрации [195] структуры ПУЛ.

Образование новых связей между целлюлозными волокнами и ПУЛ может изменить микроструктуру пленки БЦ/ПУЛ. Структурные свойства БЦ и БЦ/ПУЛ были исследованы с помощью СЭМ. На рисунке 10 показана структура сухих пленок БЦ и БЦ/ПУЛ. Благодаря высокому разрешению СЭМ-изображений, удалось обнаружить различия в морфологии поверхности пленок и провести сравнение диаметров и расположения полимерных микрофибрилл относительно друг друга.

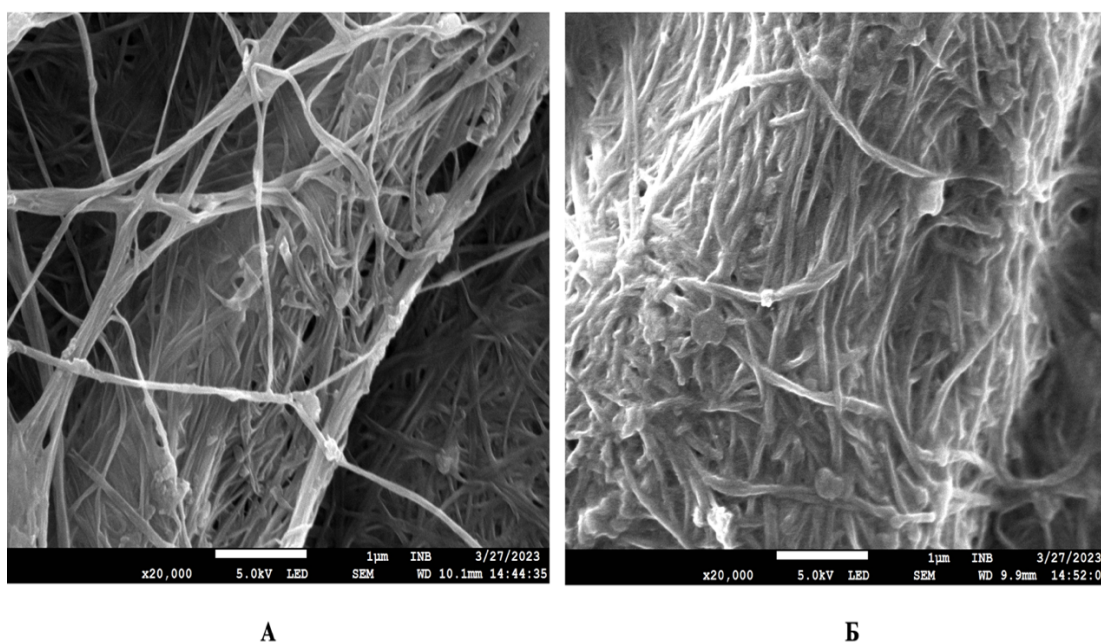


Рисунок 10 – СЭМ изображения пленок БЦ (А) и БЦ/ПУЛ (Б)

Поверхности БЦ и БЦ/ПУЛ отличались разной микроморфологией. В образцах БЦ/ПУЛ наблюдалось заметное уменьшение промежутков между волокнами (рисунок 9Б). Тем не менее, высокопористая трехмерная сетчатая структура сохранилась. Средний размер пор БЦ/ПУЛ составил 61 ± 5 нм, в то время как для БЦ он составил 103 ± 6 нм, что указывает на то, что содержание ПУЛ оказывает значительное влияние на этот параметр. Уменьшение промежутков между волокнами в этом композите согласуется с данными Gao и др. [189] и Liu и др. [181] о модификации БЦ водорастворимыми полисахаридами. Средний измеренный диаметр волокон БЦ составил 63 ± 5 нм, а в композите – 80 ± 4 нм, т. е. они стали толще. Возможное объяснение этого состоит в том, что глюкановые цепи $\alpha(1 \rightarrow 4)$ и $\alpha(1 \rightarrow 6)$ ПУЛ, обладают высоким сродством к микрофибриллам БЦ, способствуя их связыванию.

Хотя полученные экологически чистые биокompозиты (с технической точки зрения) состоят из двух основных отдельных компонентов — волокон и биополимерной матрицы, именно способ и степень связывания между обоими компонентами в значительной степени влияют на механические свойства волокон. Например, агрегация молекул ПУЛ и БЦ может существенно повлиять на прочность материала на разрыв.

Поскольку средняя толщина пленок БЦ/ПУЛ была выше, чем у чистой БЦ (таблица 2), что могло повлиять на их механические свойства, для исследования были взяты образцы одинаковой толщины. Измерения показали, что композит БЦ/ПУЛ обладает повышенной прочностью на разрыв (27,44 МПа) по сравнению с чистой БЦ (18,31 МПа) (рисунок 11). Кроме того, относительное удлинение при разрыве композита (14,2%) было на 35% выше по сравнению с БЦ (9,3%).

Чем больше относительное удлинение при разрыве, тем легче материал переносит ударные нагрузки. Таким образом, ПУЛ оказал положительное влияние на механические свойства БЦ, что указывает на увеличение числа межмолекулярных водородных связей в композите БЦ/ПУЛ.

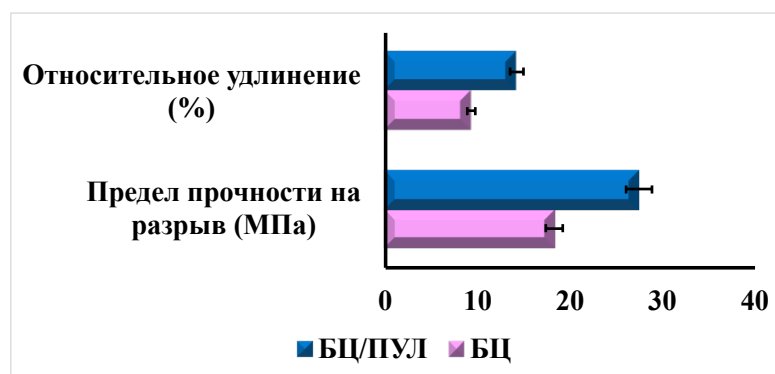


Рисунок 11 – Предел прочности на разрыв и относительное удлинение для БЦ и композита БЦ/ПУЛ.

Эти данные хорошо согласуются с ранее полученными результатами Ни и др. [196]. Действительно, Liu и др. утверждали, что наиболее важным

фактором, влияющим на прочность при растяжении, являются водородные связи между микрофибриллами, особенно между образующими их глюкановыми цепями [181]. Таким образом, можно предположить, что связывание ПУЛ с микрофибриллами БЦ способствует их уплотнению и укреплению за счет увеличения плотности водородных связей, что подтверждается методом ИК-спектроскопии.

Получение комплексного полисахаридного матрикса путем совместного культивирования продуцентов является более эффективным, нежели метод, в котором ПУЛ вносится в ферментационную среду с продуцентом БЦ. Это исследование подтвердило экономичность метода кокультивирования, указав на его потенциал как более выгодного метода для производства полисахаридного матрикса.

Таким образом, возможность совместного культивирования продуцентов бактериальной целлюлозы и пуллулана была реализована на практике для успешного получения биокompозита с пребиотическими свойствами. По сравнению с другими методами, искусственные симбиотические микробные системы имеют ряд преимуществ:

- Два или более видов микроорганизмов выращиваются, хранятся и повторно используются вместе. Рост микроорганизмов и производство компонентов материала осуществляются в одних и тех же условиях.

- Получение биокompозита требует меньшего числа этапов предварительной обработки и очистки.

- Оптимизация условий ферментации при совместном культивировании способствует улучшению общего производства целлюлозной пленки в присутствии ПУЛ в питательной среде, что делает производство биокompозитов более эффективным и технологически упрощенным.

- Био- и «зеленые» композиты, полученные при совместном выращивании продуцентов БЦ и ПУЛ, обладают улучшенными механическими свойствами, такими как прочность на разрыв и удлинение, по сравнению с отдельными биополимерами.

Хотя механизмы совместного культивирования требуют более детального изучения, данное исследование является хорошим началом, поскольку оно подтверждает его потенциал в качестве более экономически выгодного метода получения композитных материалов в будущем.

3.3 Получение микрогранул с пробиотическими биопленками

3.3.1 Влияние состава культуральной среды на формирование биопленки штаммом LGG

Образование биопленки пробиотическими бактериями, такими как *Lactobacillus* spp. считается полезным свойством, поскольку оно может способствовать большей устойчивости в слизистой оболочке хозяина, тем самым предотвращая колонизацию патогенными бактериями [197]. Исследование возможности разных видов *Lactobacillus* образовывать

био пленки показало, что только некоторые штаммы обладают этой характеристикой [18,197]. Потенциал к колонизации пробиотических бактерий рассматривается как фактор, способствующий иммуномодуляции, исключению патогенов и усилению контакта со слизистой оболочкой [25,198].

Многие адгезивные бактерии встречаются в естественной среде в виде поверхностно прикрепленных биопленок, где они содержатся в самопроизводящемся внеклеточном матриксе, который защищает их от неблагоприятных условий окружающей среды. Биопленки, также играют определённую роль во взаимоотношениях между человеческим организмом и колонизирующими его микробами, в связи с этим способность пробиотических бактерий расти в виде биопленки имеет большое значение для пролонгирования своего действия в ЖКТ [199].

В этой связи целесообразным представлялось исследование биопленкообразующей способности рабочего штамма LGG при культивировании его на разных средах, поскольку их состав может влиять на способность пробиотических бактерий образовывать биопленки [199].

В работе использован метод обнаружения образования биопленок, который основан на способности красителя кристаллического фиолетового. Данный краситель способен связываться с клетками и матриксом биопленок. Этот метод позволяет получить относительные показатели плотности всей биопленки на поверхности подложки – микропланшета. Были протестированы питательные среды: стандартная среда для лактобактерий MRS и PYG, а также эти среды с небольшими модификациями. Бульон PYG, в отличие от среды MRS, содержит меньшее количество глюкозы и не содержит солей.

После культивирования LGG на стандартной среде MRS было выявлено, что штамм не образовывал биопленок в бульоне MRS (рисунок 12).

ОП была ниже 0,1, что идентично показаниям отрицательного контроля. Напротив, в среде PYG, которая характеризуется дефицитом солей и более низким содержанием глюкозы (1% вместо 2% в MRS), после 48 ч инкубации наблюдалось образование биопленки ($ОП\ 570 \geq 1$).

Специфическое влияние глюкозы на образование биопленки можно оценить путем варьирования концентраций глюкозы в одной и той же среде. Глюкоза служит основным сырьем для синтеза ЭПС, основного компонента матрицы биопленки [200]. Таким образом, в одном из экспериментальных вариантов он не был полностью исключен из MRS, но был снижен до 0,5%. В MRS с ограниченным содержанием глюкозы наблюдалось гораздо лучшее образование биопленки по сравнению со «стандартным» MRS. Однако, если концентрацию глюкозы снижали до 0,5% в среде PYG, наблюдалось снижение образования биопленки. Аналогичным образом, дополнительное добавление глюкозы в среду PYG (до 2%) также приводило к значительному снижению образования биопленки. Это явление ясно демонстрирует

важность концентрации глюкозы для образования биопленки как в средах MRS, так и в средах PYG.

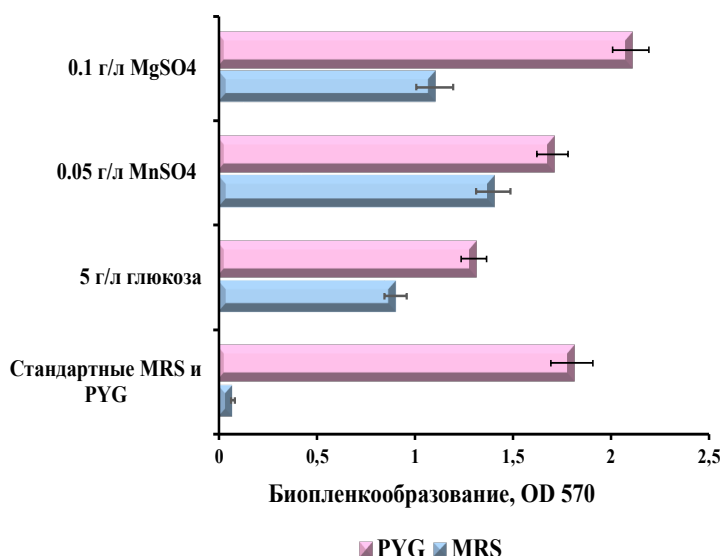


Рисунок 12 – Влияние компонентов сред MRS и PYG на формирование биопленки LGG

Ранее несколько исследований также показали ограниченную доступность питательных веществ в местах формирования биопленки. Это, предположительно, происходит посредством создания стрессовых состояний, которые стимулируют экспрессию генов, связанных с выживанием, в том числе тех, которые связаны с образованием биопленки [18,197,201]. Однако, такой эффект, по-видимому, может зависеть от метаболических особенностей штамма. Например, Leber и др. [18] продемонстрировали, что удаление глюкозы из среды MRS значительно увеличивало способность LGG к образованию биопленки. В то же время другой штамм *L. casei Shirota* демонстрировал лишь незначительное увеличение этого свойства. Судя по результатам наших экспериментов, оптимальная концентрация глюкозы для образования биопленки LGG в среде PYG равна 0,5%.

Первым и необходимым этапом образования биопленки, является адгезия, т. е. прикрепление бактерий к субстрату. На ее эффективность влияют двухвалентные катионы, поскольку они определяют электростатические взаимодействия. В составе MRS без глюкозы $MnSO_4$ (0,05 г/л) оказывал стимулирующее действие на образование биопленки, в то время как $MgSO_4$ (0,1 г/л) не оказывал существенного влияния на этот параметр. Наблюдаемая разница вероятно обусловлена различной ростостимулирующей активностью этих солей. Как было ранее показано для лактобактерий, в том числе и для LGG, Mn^{2+} значительно стимулировал рост бактерий, в то время как с Mg^{2+} такого ответа не наблюдалось [202]. Удаление раствора солей, содержащих Mn^{2+} и Mg^{2+} , из среды MRS значительно уменьшало образование биопленки *L. johnsonii* FI9785 и его мутантов в одном из опубликованных исследований. Авторы объясняли это

важной ролью ионов этих металлов в клеточном метаболизме [203]. Введение Mn^{2+} в среду PYG не повлияло на эффективность образования биопленки, в то время как добавление Mg^{2+} стимулировало ее образование. Таким образом, среди протестированных модификаций питательных сред оптимальной для образования биопленки, по-видимому, является среда PYG с добавлением 0,1 г/л $MgSO_4$.

В формировании биопленки участвует ЭПС, вырабатываемый бактериями, способными к его образованию. Показано, что уровень производства ЭПС, а также его структурный состав могут играть роль в процессе формирования биопленки [18]. Предполагается, что сложные полисахариды, присутствующие в питательной среде, могут либо включаться во внеклеточный матрикс, либо способствовать размножению бактерий, тем самым косвенно усиливая образование биопленки. В связи с этим, для образования биопленки штаммом LGG может оказаться полезным добавление полисахаридов, которые специфически стимулируют рост этого штамма в питательной среде. О таком влиянии инулина на штамм GG сообщили Leber и соавторы [18]. Они предположили, что это может быть связано со стимуляцией агрегации клеток за счет увеличения выработки ЭПС. В данной работе при введении различных концентраций (от 0,5 до 5 г/л) инулина в среду PYG было установлено, что 1 г/л является достаточным и оптимальным (рисунок 13).

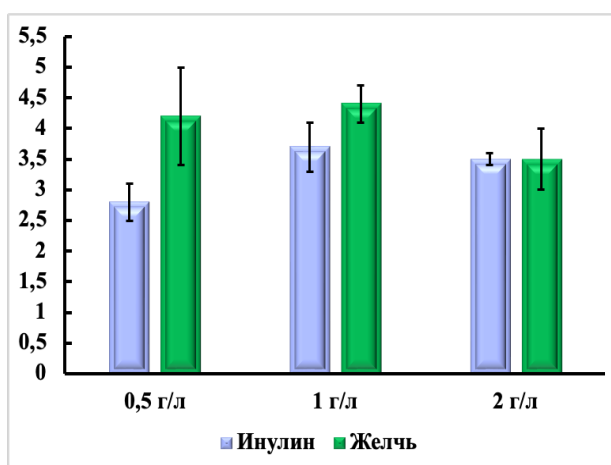


Рисунок 13 – Влияние ЭПС-индуцирующих компонентов на образование биопленки

Помимо инулина, ряд исследователей, изучавших влияние различных добавок на эффективность образования биопленки лактобактериями, обнаружили, что в дополнение к пребиотикам важную роль играют желчь и муцин, присутствующие в пищеварительном тракте [204,205]. Однако эти факторы действуют индивидуально, т. е. не только видо-, но и штаммоспецифично. Например, желчь индуцирует экспрессию генов, кодирующих биосинтез адгезинов и ЭПС, хотя эта особенность коррелирует с резистентностью к желчи у тестируемых штаммов [204]. Следовательно,

различные концентрации желчи добавлялись в среду PYG для культивирования LGG. Добавление желчи увеличивало образование биопленки в 1,5-1,9 раза.

Вышеупомянутые результаты нашли подтверждение в другом дизайне - данные вариации среды добавляли в лунки микропланшета, содержащие диски БЦ/ПУЛ, т. е. оценивали образование биопленки на полисахаридной матрице (рисунок 14).

Итогом этого эксперимента можно считать, что, во-первых, штамм GG способен образовывать биопленку на композите БЦ/ПУЛ; во-вторых, добавление 1 г/л инулина и 0,5 г/л желчи в среду положительно способствовало образованию биопленок.

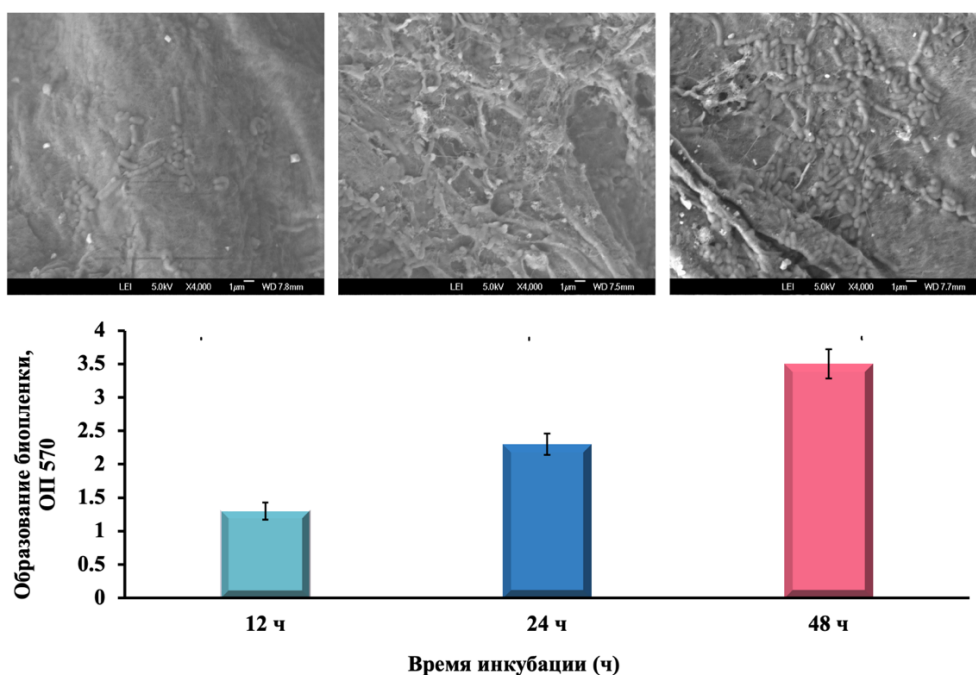


Рисунок 14 – Динамика образования биопленки LGG на полисахаридной матрице БЦ/ПУЛ

Состав среды PYG_m (г/л), адаптированной под данный штамм GG, выращивание на которой стимулирует у него биопленкообразование: пептон – 15, гидролизат казеина – 5, глюкоза – 5, дрожжевой экстракт – 10, MgSO₄ – 0,1, инулин – 1, желчь – 0,5.

3.3.2 Иммобилизация клеток LGG в гранулы полисахаридного матрикса

Иммобилизация клеток — это общий термин, описывающий физическое удержание микробных клеток в области пространства (носителя) с ограничениями свободной миграции [206]. По сравнению с системами, где используются суспендированные микроорганизмы, технология иммобилизованных клеток предлагает ряд преимуществ. Среди них непрерывное использование, более высокая плотность клеток, улучшенная

метаболическая активность, предотвращение межфазной инактивации, повышенная продуктивность, устойчивость к тяжелым металлам, растворителям, изменениям pH и температуре [206,207].

Трехмерная пористая сетчатая структура БЦ с большой площадью поверхности состоит из нановолокон, способных удерживать большое количество неорганических и органических соединений. Присутствие гидроксильных групп на поверхности целлюлозы обеспечивает адсорбцию клеток посредством водородных связей и электростатических взаимодействий [17,208]. Следовательно, БЦ может служить отличным субстратом для иммобилизации клеток и хорошим поддерживающим материалом.

В предыдущих исследованиях, проводимых на кафедре биотехнологии КазНУ, в комбинированную полисахаридную матрицу был иммобилизован производственный штамм LGG [209]. В этом исследовании рассматривается возможность иммобилизации не планктонных клеток, а пробиотических биопленок.

Одним из наиболее эффективных методов иммобилизации микроорганизмов является метод «адсорбции-инкубации», предложенный Nguyen и др. [210]. Основным принципом заключается в том, что на стадии адсорбции бактерии содержатся в физиологическом растворе вместе с носителем, что позволяет микробным клеткам прилипнуть к поверхности без увеличения их первоначального количества из-за отсутствия питательных веществ в среде. Чтобы создать условия для размножения клеток и увеличить их концентрацию, за стадией адсорбции следует инкубация носителя с иммобилизованными клетками в богатой питательными веществами среде. При таком подходе происходит пролиферация уже прикрепленных клеток как на поверхности, так и внутри носителя, что приводит к общему увеличению их численности.

Адсорбция и включение в пространственную структуру являются двумя наиболее часто используемыми способами иммобилизации. Метод адсорбции заключается в прикреплении клеток к твердым носителям посредством физического или химического взаимодействия. Включение в пространственную структуру предполагает внедрение клеток во внутренние поры материалов-носителей.

Инокулят штамма GG культивировали в среде PYG_m, индуцирующей образование биопленки, до концентрации клеток 10⁹ КОЕ/мл. Микрогранулы БЦ и БЦ/ПУЛ со средним размером 1-2 мм вводили в среду PYG_m и инкубировали при оптимальной температуре 37°C в течение 48 часов. Количество иммобилизованных бактерий определяли путем посева культуральной суспензии на MRS агар после обработки микрогранул ферментом целлюлазой (рисунок 15).

Морфологические свойства бактерий LGG оставались стабильными в течение всего процесса иммобилизации. Микроскопически клетки LGG представляют собой неподвижные, палочковидные, грамположительные

бактерии. Колонии LGG на агаре MRS — белые, округлые, выпуклые, с гладкой и блестящей поверхностью и мягкой консистенцией.

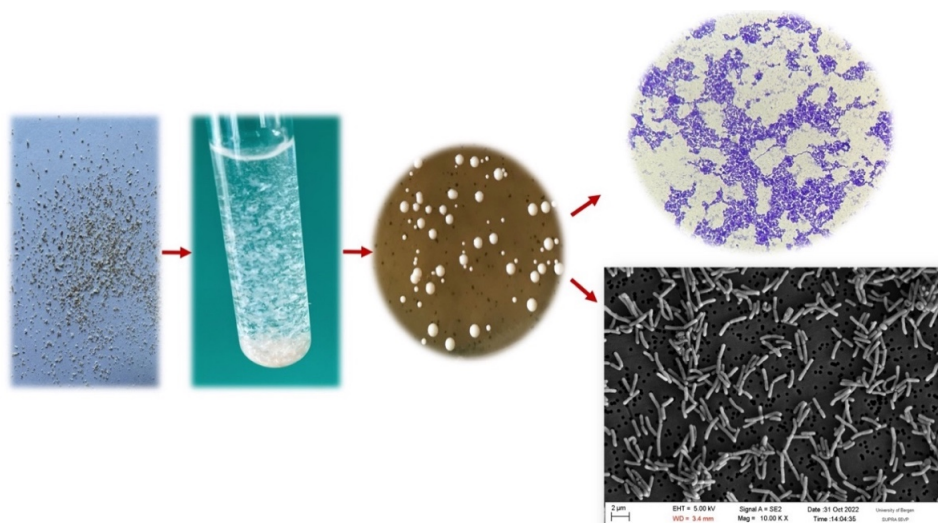


Рисунок 15 – Морфология колоний и клеток LGG после иммобилизации в микрогранулы БЦ/ПУЛ

При инкубации микрогранул в бульоне PYG_m в течение 48 ч, количество клеток увеличивалось примерно на 1-1,7 log (рисунок 16). Среднее значение трех анализов показало, что число бактерий в микрогранулах БЦ возросло до $1,25 \times 10^{10}$ КОЕ/г (10,09 log КОЕ/г), в то время как в БЦ/ПУЛ до $5,5 \times 10^{10}$ КОЕ/г (10,74 log КОЕ/г).

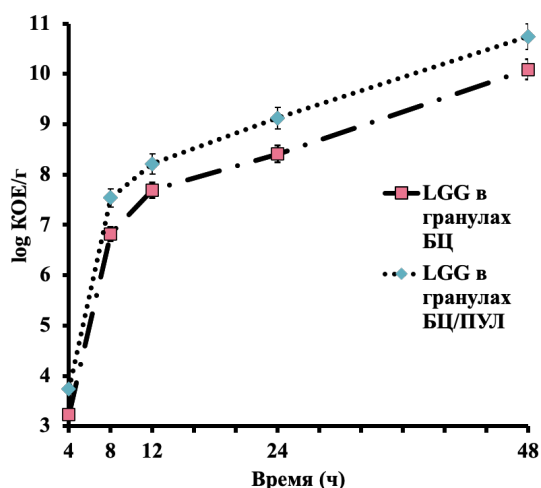


Рисунок 16 – Эффективность иммобилизации биопленкообразующего LGG в микрогранулах БЦ и БЦ/ПУЛ

Количество бактериальных клеток было выше при культивировании микрогранул в присутствии ПУЛ, где пребиотик, по-видимому, позволял бактериям размножаться быстрее.

Высокий титр бактерий, включенных в оба варианта микрогранул, свидетельствует о том, что процесс иммобилизации был успешным, а материалы-носители были совместимы с пробиотическим штаммом.

Структура микрогранул целлюлозы достаточно «губчатая», поэтому питательные вещества из окружающей среды могут диффундировать в их внутреннее пространство, обеспечивая рост и размножение клеток штамма не только на поверхности, но и внутри. Во всех образцах присутствуют пробиотические микроколонии, образующие биопленки (рисунок 17).

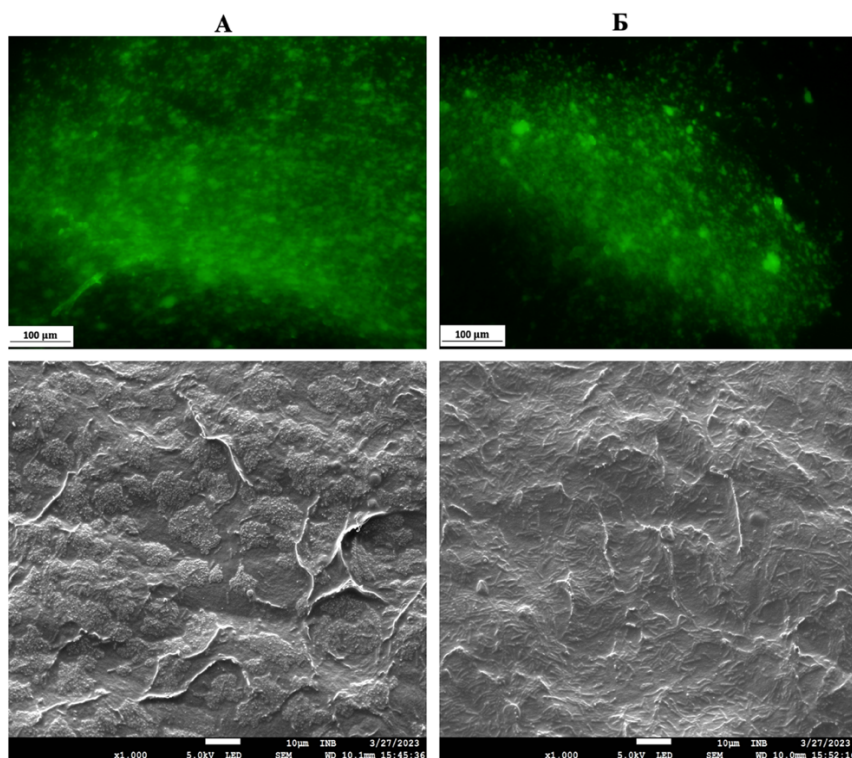


Рисунок 17 – СЭМ и флуоресцентные изображения биопленки LGG (А) БЦ/ПУЛ и (Б) БЦ

Как показано на изображениях СЭМ, клетки LGG диспергировались в пористую сеть материала-носителя и были включены в волокнистый матрикс. Структура целлюлозы, состоящая из мелких пор, расположенных на поверхности, и крупных пор, расположенных внутри, может обеспечить подходящее пространство для микроорганизмов. Фотографии, полученные с помощью лазерной конфокальной флуоресцентной микроскопии, также подтверждают наличие биопленки бактерий.

Полученные результаты подтверждают успешную иммобилизацию бактерий LGG на носителях. Благодаря пористой волокнистой основе БЦ его можно использовать в качестве удобной матрицы для пробиотических биопленок. Процедура иммобилизации была очень простой, недорогой, легко реализуемой и не требовала каких-либо химических модификаций.

3.3.3 Определение уровня выживаемости пробиотических микроорганизмов в микрогранулах ПМПБ после сублимационной сушки

Биологически активные соединения, включая пробиотики, предпочтительнее использовать в сухих формах из-за длительных сроков хранения и трудностей в обращении с большими объемами [211,212].

Сублимационная сушка, также известная как лиофилизация, в основном, используется для удаления воды из чувствительных (по большей части биологических) продуктов, не повреждая их. Этот метод позволяет удалить большую часть воды при температуре намного ниже 0°C (обычно от -40°C до -20°C) посредством сублимации, фазового перехода от льда к водяному пару. Однако во время процесса низкотемпературного воздействия бактерии подвержены стрессам окружающей среды (тепловому, осмотическому, механическому и окислительному), которые могут вызвать серьезные повреждения клеток и привести к нарушению целостности и функциональной активности (например, подкисление, выработка ароматических соединений, пробиотическая активность и т.д.). Поэтому для предотвращения нежелательных эффектов во время процесса лиофилизации необходимо использовать криопротекторы.

В данной работе рассматривается возможность использования полисахаридного матричного комплекса как криозащитного средства во время лиофилизации. Для этого образцы подвергали сублимационной сушке без применения внешних криопротекторов (например, трегалозы и сахарозы).

Влияние лиофилизации как на свободные, так и на иммобилизованные клетки показано на рисунке 18. Первоначальное количество бактерий в БЦ/ПУЛ, составлявшее 10,61 log КОЕ/г, снизилось до 9,82 log КОЕ/г, потеря была в 2,5 раза ниже чем для планктонных клеток. Для микрогранул БЦ, разница клеток составила 1,21 log КОЕ/г.

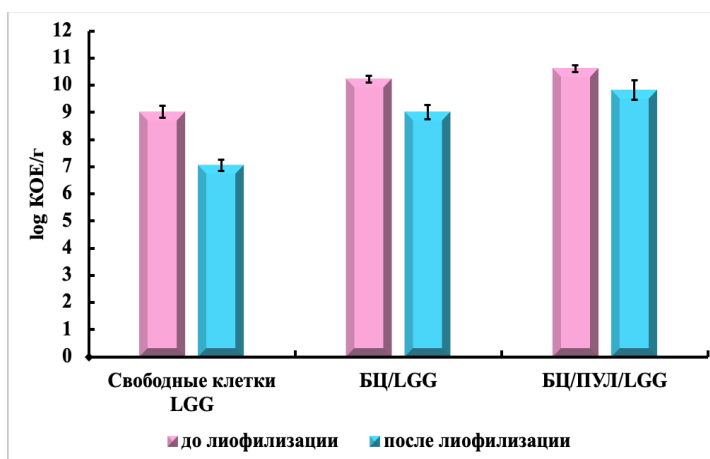


Рисунок 18 – Титр клеток свободных и иммобилизованных LGG до и после сублимационной сушки

Результаты позволяют предположить, что наличие пробиотических биопленок в микрогранулах может быть эффективным средством защиты клеток во время сублимационной сушки.

Согласно Jagannath и соавторов [213], БЦ с ее волокнистой структурой является матрицей для включения молочнокислых бактерий, и физическим барьером, уменьшая вредные последствия для клеток во время замораживания. Исследование Jingjing и др. показало, что добавление различных буферных солей в культуральную среду для индуцирования биоплёнки оказало влияние на выживаемость бактерий *Lactobacillus* при лиофилизации, что может быть связано с образованием биопленок [214].

Также сообщалось, что полисахариды и дисахариды, включая лактозу, маннит, мальтодекстрин, мальтозу, лактулозу и инулин, играют важную роль в защите бактериальных клеток во время сублимационной сушки [215]. Их криозащитный эффект объясняется способностью предотвращать вредное замораживание клеточных жидкостей, удерживая соли в высоковязкой фазе или стеклообразном состоянии и связываясь с молекулами воды в мембранных бислоях, что ингибирует образование внутриклеточного и внеклеточного льда [216]. Предполагается, что полисахарид пуллулан может защищать клетки с помощью аналогичного механизма.

Shu и др. [217] показали, что эффективность составных криопротекторов при сублимационной сушке обычно выше, чем у одиночных криопротекторов. Отмечается, что в большинстве случаев присутствие пребиотических веществ может повысить выживаемость клеток в процессе лиофилизации [211,218] в дополнение к синергетическому действию с пробиотиками.

Полученные данные свидетельствуют о том, что комбинация полисахаридов (БЦ и ПУЛ) могла эффективно улучшить выживаемость LGG во время высушивания.

3.4 Исследование эффективности микрогранул ПМПБ в качестве транспортной системы для их доставки пробиотиков в организм хозяина

3.4.1 Определение уровня жизнеспособности иммобилизованных бактерий в условиях, моделирующих желудочный сок и секрецию двенадцатиперстной кишки

Наиболее важной характеристикой устойчивости пробиотиков является сохранение жизнеспособности клеток в агрессивных условиях ЖКТ. Защита пробиотических клеток от воздействия желудочного сока, солей желчных кислот и гидролитических ферментов является одной из основных задач иммобилизации.

Несмотря на то, что при подборе пробиотических культур одним из важнейших критериев селекции является определение толерантности микроорганизмов к желчи и низким значениям pH, необходимо было определить уровень стрессоустойчивости иммобилизованных клеток в

условиях, имитирующих ЖКТ. Даже у устойчивых штаммов наблюдается значительная гибель клеток, степень которой является индивидуальной характеристикой штамма.

Когда пробиотики попадают в желудок, они подвергаются воздействию низкого pH желудочного сока, который создает крайне неблагоприятную среду для большинства бактерий. Кроме того, желудок создает дополнительные условия, неблагоприятные для пробиотиков, такие как высокая ионная сила, активность протеазы (пепсин) и механическое воздействие [219].

Хотя конечной моделью для определения функциональной эффективности “транспортного средства” является человеческий организм, этот подход имеет этические ограничения. Поэтому в большинстве исследований используется модель «искусственного ЖКТ», которая имитирует физико-химическое состояние основных отделов пищеварительной системы – желудка, тонкого и толстого кишечника [220,221].

В данном исследовании такая модель *in vitro* была модифицирована для имитации прохождения иммобилизованных бактерий LGG через различные отделы ЖКТ (рисунок 19).

Микрогранулы БЦ и БЦ/ПУЛ с иммобилизованным штаммом LGG последовательно инкубировали в течение 2 ч в ИЖС, ИДК и 18 ч в ИКС. Количество выживших бактерий определяли путем подсчета колоний на чашках с MRS агаром после инкубации.

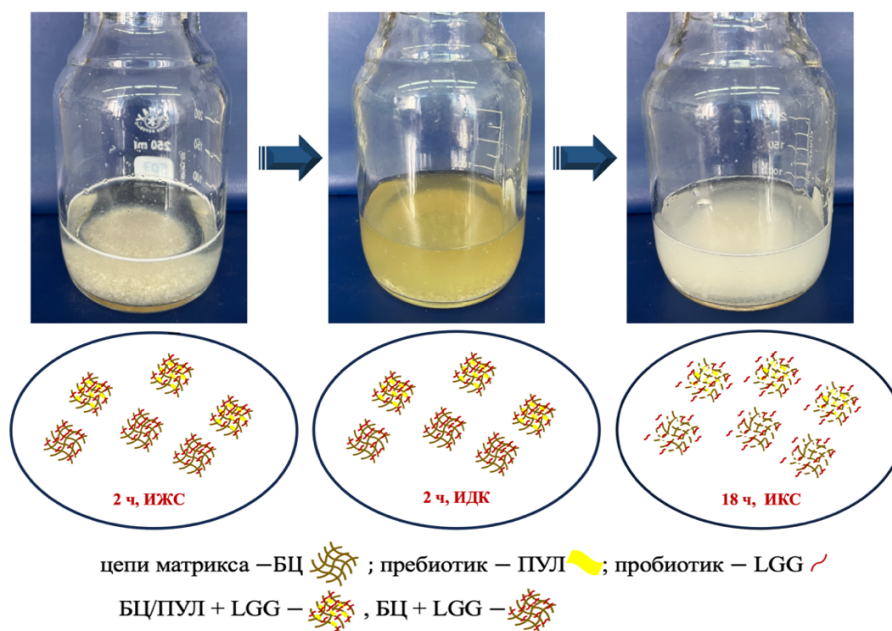


Рисунок 19 – Дизайн модели искусственного ЖКТ

Результаты определения жизнеспособности LGG, подвергнутых воздействию условий ИЖС, для свободных клеток, иммобилизованных в БЦ, а также коиммобилизованных в БЦ с ПУЛ показаны на рисунке 20. Клетки

LGG в композите БЦ/ПУЛ после воздействия низкого pH (2,0) в течение 2 часов выживали лучше по сравнению с другими экспериментальными группами (свободные клетки, микрогранулы БЦ без ПУЛ).

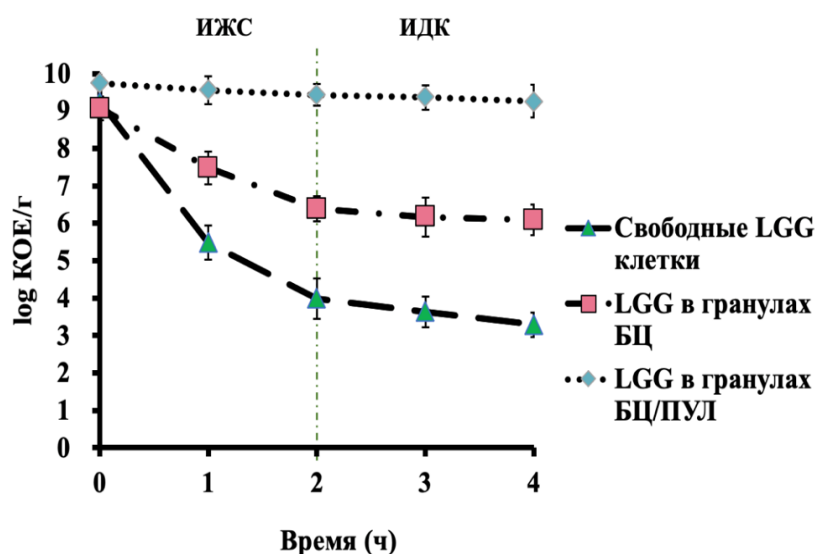


Рисунок 20 – Выживаемость свободных и иммобилизованных клеток LGG при последовательной инкубации в ИЖС и ИДК

6,39 log КОЕ/г штамма GG сохранили жизнеспособность в микрогранулах БЦ после 2-часовой инкубации в ИЖС (исходное количество – 9,07 log КОЕ/г). Присутствие пребиотика обеспечивало наивысший уровень защиты клеток с потерей 0,3 log КОЕ/г (исходное количество – 9,75 log КОЕ/г). Напротив, количество свободных клеток LGG значительно снижалось при воздействии ИЖС (5,24 log КОЕ/г) в течение того же периода времени.

Согласно результатам Jagannath и др. [213], БЦ образует микроленты, которые накладываются друг на друга, переплетаются и формируются параллельно. Это позволяет им эффективно удерживать бактериальные клетки внутри и на поверхности, тем самым значительно повышая выживаемость клеток.

Эти результаты указывают на то, что микрогранулы БЦ и на основе комбинированной полисахаридной матрицы БЦ/ПУЛ стабильны в условиях искусственного желудка. Однако, пробиотик в БЦ/ПУЛ сохранял свою жизнеспособность лучше, вероятно, благодаря взаимодействию между матрицей и пребиотиком. Возможный в основе этого механизм заключается в том, что ПУЛ внутри матрицы включается в поры БЦ, тем самым предотвращая диффузию кислого содержимого в микрогранулы. О таком защитном действии ПУЛ на пробиотические бактерии ранее сообщали несколько авторов [222–224]. Кроме того, иммобилизованная биопленка LGG с высокой плотностью клеток также могла обеспечить адаптацию бактерий к кислотному стрессу.

Следующая преграда на пути пробиотика – двенадцатиперстная кишка, в которой также присутствуют негативные факторы для выживания клеток (соли желчных кислот, гидролитические ферменты поджелудочной железы). Устойчивость к солям желчных кислот, которые выделяются в двенадцатиперстной кишке, является важным параметром для пробиотиков при прохождении через ЖКТ.

Микрогранулы инкубировали 2 часа в растворе ИДК после воздействия желудочного сока (рисунок 20).

Присутствие солей желчных кислот существенно не влияло на выживаемость бактерий во всех экспериментальных группах. После 2-часовой инкубации в ИДК количество жизнеспособных свободных клеток уменьшилось лишь на 0,6 log КОЕ/г. В микрогранулах БЦ количество клеток LGG снизилось на 0,3 log КОЕ/г, а в БЦ/ПУЛ наблюдалось лишь недостоверное ($p > 0,05$) снижение жизнеспособности клеток – на 0,17 log КОЕ/г.

Известно, что, несмотря на повреждения и стрессы, вызванные солями желчных кислот, LGG переносит их относительно хорошо, как это было отмечено Xiao и соавторами [225]. Эти данные хорошо согласуются с результатами, опубликованными Ding и др., которые сообщали, что HCl был более вреден для *L. rhamnosus*, чем бычья желчь, а воздействие кислых условий приводило к снижению жизнеспособности бактерий [226]. Было обнаружено, что человеческие штаммы пробиотиков, обладают большей устойчивостью к воздействию желчи по сравнению со штаммами другого происхождения [227]. Более того, как упоминалось выше, добавление желчи в среду во время иммобилизации пробиотических клеток способствовало образованию биопленки и не вызывало уменьшения количества клеток. Концентрация желчи в кишечнике человека колеблется от 0,2 до 2% [228], что соответствует концентрации, используемой в составе среды PYG_m при иммобилизации пробиотика (0,5%).

В целом, что касается выживаемости клеток LGG в микрогранулах БЦ/ПУЛ после обработки ИЖС и ИДК, то наблюдалось лишь незначительное отличие от исходного количества клеток. Полученные данные согласуются с результатами Fijałkowski и др. [229], которые пришли к выводу, что иммобилизация молочнокислых бактерий на БЦ обеспечивает высокий уровень защиты бактерий от негативного воздействия желудочного сока и солей желчных кислот.

Этот подход, по-видимому, хорошо работает и тогда, когда в качестве носителей для иммобилизации используются другие биополимеры. Cheow и др. [230,231] изучали эффект сочетания альгината с двумя различными типами крахмала, обладающими пребиотическими свойствами, и их потенциал для повышения устойчивости биопленок. Их исследование показало, что модифицированный 0,6%-ный кукурузный крахмал, в композите с хитозаном, значительно повышает устойчивость биопленки штамма LGG к лиофилизации, высоким температурам и хранению в

холодильнике. В более раннем сообщении Doleyres и Lacroix [116] предполагается, что иммобилизованная популяция бифидобактерий с высокой плотностью клеток может индуцировать реакцию, чувствительную к кворуму, тем самым обеспечивая адаптацию молочнокислых бактерий к изменяющимся условиям окружающей среды. Возможными причинами наблюдаемой повышенной резистентности являются ограниченное проникновение противомикробных препаратов, замедление темпов роста, активация общей стрессовой реакции, индукция фенотипа биопленки и межклеточная коммуникация [232].

Таким образом, исследование показало, что синергетический эффект бактериальной биопленки и дополнительной защиты в виде полисахаридной матрицы повышает устойчивость пробиотика.

3.4.2 Высвобождение пробиотиков в ИКС

Конечной целью иммобилизации LGG является обеспечение их безопасной доставки в толстый кишечник. Для его моделирования *in vitro* некоторые авторы используют систему, называемую ИКС [233,234]. При этом практически во всех статьях по этой теме ИКС – это раствор солей, иногда трипсин, но главное – нейтральный pH. При этом не учитывается то, что главное в этом отделе – огромный микробиом (до 10^{13} КОЕ/г), состоящий из более 500 видов только бактерий, не говоря уже о других типах микробов [235]. По сути, это постоянно работающий в организме человека биореактор, в котором происходят серьезные метаболические процессы, связанные с ферментативной активностью живущих в нем микробов, которые осуществляют так называемое полостное пищеварение [236].

Наиболее приближенной к «кишечной природе» может служить динамическая модель *in vitro*, которая более точно имитирует последовательные кинетические условия в ЖКТ, включая активную микробиоту. Для имитации условий слепой кишки Maathuis и соавторы добавляли образцы фекалий, которые использовали в качестве инокулята в *in vitro* модель толстого кишечника [237]. Модель состоит из четырех соединенных между собой стеклянных сосудов с мембраной внутри. Между стеклянной рубашкой и мембраной находится вода (для изменения температуры). Температура контролируется датчиком. Оказывая давление на воду через разные промежутки времени и в определенной последовательности, гибкая мембрана сжимается и вызывает перистальтические волны, которые перемешивают содержимое полости и перемещают его по системе. На наш взгляд, это достаточно сложная система, требующая аппаратного оформления.

Традиционно используемый подход предполагает использование фекальной суспензии, которая включает фильтрацию кала для удаления остатков пищи [238]. Аналогичная идея используется при трансплантации фекалий для лечения заболеваний ЖКТ, в частности болезни Крона [239,240]. Фекальная суспензия содержит микроорганизмы и побочные

продукты их метаболизма, известные как метабитики, которые включают целлюлолитические ферменты. Было предположено, что может быть создана упрощенная модификация этой системы, в которой в «кишечный сок» добавляются не кишечные микробы, а продукты их жизнедеятельности [241]. В этом исследовании микроорганизмы были удалены из фекальной суспензии, тем самым был получен ферментативный экстракт кала – фекалаза. Результаты такого подхода могут быть использованы в качестве прогностического инструмента для определения эффективности систем доставки пробиотиков в их экологическую нишу.

В традиционной системе *in vitro*, имитирующей условия толстой кишки (рН 7,2 + электролиты), микрогранулы целлюлозы практически не разрушались, поскольку для этого требовалось присутствие специального фермента – целлюлазы. Целлюлоза и ее производные могут разлагаться только в толстой кишке, поскольку только там обитают целлюлозолитические бактерии. Известно, что целлюлаза естественным образом присутствует в ЖКТ у травоядных животных и других видов, которые в основном потребляют растительную пищу [242]. Хотя организме человека волокнистые материалы перевариваются менее эффективно, чем у жвачных животных, в фекалиях, где присутствуют все компоненты микробной кишечной биопленки, были обнаружены целлюлозолитические микроорганизмы [243].

Фекальные бактерии, переваривающие целлюлозу, относятся к *Bacteroides* spp., *Ruminococcus* spp., *Clostridium* spp. и *Eubacterium* spp. [244]. Более того, в толстой кишке *Bacteroides* является преобладающим бактериальным таксоном [245,246]. Целлюлозолитические бактерии, даже если они присутствуют в небольшом количестве, играют жизненно важную роль, поскольку их отсутствие значительно снизило бы расщепление и утилизацию многочисленных субстратов, тем самым влияя на общее функционирование микробного сообщества [244].

Для оценки целлюлазной активности фекальной суспензии и фекалазы был проведен полуколичественный анализ. Оба варианта (фекалазу и фекальную суспензию) вводили в лунки, которые вырезали на агаровых чашках, содержащих субстрат – 1% КМЦ. Затем они были окрашены раствором Конго красного. Он взаимодействует с полисахаридами, содержащие смежные β -(1–4)-связанные глюкопиранозильные звенья в виде КМЦ. Присутствие фермента определяли по образованию менее окрашенных зон гидролиза, что указывало на наличие целлюлазной активности (рисунок 21А).

Ферментативный индекс определялся путем отношения между разницей диаметров области вокруг зоны гидролиза и самой лунки к диаметру лунки. Согласно полученным результатам, фекальная суспензия имела E_i равный $1,8 \pm 0,07$, в то время как фекалаза – $1,7 \pm 0,04$. Наблюдаемая разница между образцами, однако, не была статистически значимой ($p > 0,05$).

В количественном тесте, фекалазу и фекальную суспензию исследовали с помощью – DNS анализа. Он основан на ферментативном гидролизе КМЦ, приводящий к высвобождению редуцирующих сахаров. Как показано на рисунке 21Б, активность целлюлазы в обеих тестируемых группах существенно не различалась ($0,60 \pm 0,03$ Ед/мл и $0,53 \pm 0,06$ Ед/мл для фекальной суспензии и фекалазы соответственно). Это означает, что при проведении подобных тестов возможно использование бесклеточного экстракта.

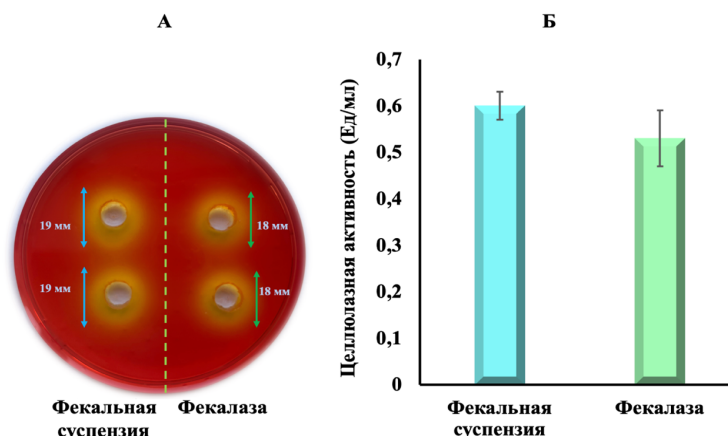


Рисунок 21 – (А) Зоны гидролиза КМЦ, образованные фекальной суспензией и фекалазой, выявленные окрашиванием Конго красным, (Б) оценка активности целлюлазы с использованием анализа DNS

В количественном тесте, фекалазу и фекальную суспензию исследовали с помощью – DNS анализа. Он основан на ферментативном гидролизе КМЦ, приводящий к высвобождению редуцирующих сахаров. Как показано на рисунке 21Б, активность целлюлазы в обеих тестируемых группах существенно не различалась ($0,60 \pm 0,03$ Ед/мл и $0,53 \pm 0,06$ Ед/мл для фекальной суспензии и фекалазы соответственно). Это означает, что при проведении подобных тестов возможно использование бесклеточного экстракта.

Одной из задач был выбор варианта с наиболее высокой целлюлазной активностью. При тестировании фекальных суспензий необходим анаэробный инкубатор, поскольку анаэробные бактерии преобладают в нормальной фекальной флоре человека. Следовательно, несомненным преимуществом использования фекалазы является отсутствие необходимости в данном оборудовании, что упрощает процесс исследования. Таким образом, в дальнейших экспериментах использовали фекалазу для приготовления ИКС.

Чтобы оценить высвобождение иммобилизованных бактерий после прохождения через ИЖС и ИДК, микрогранулы инкубировали при 37°C в ИКС с фекалазой (рисунок 22).

Через 3 часа инкубации в ИКС, в среду выделялось 3,96 log КОЕ/г жизнеспособных бактерий LGG, иммобилизованных в микрогранулах БЦ. Этот процесс продолжался в течение 15 часов, в результате чего конечное количество жизнеспособных клеток составило 5,96 log КОЕ/г с последующей стабилизацией.

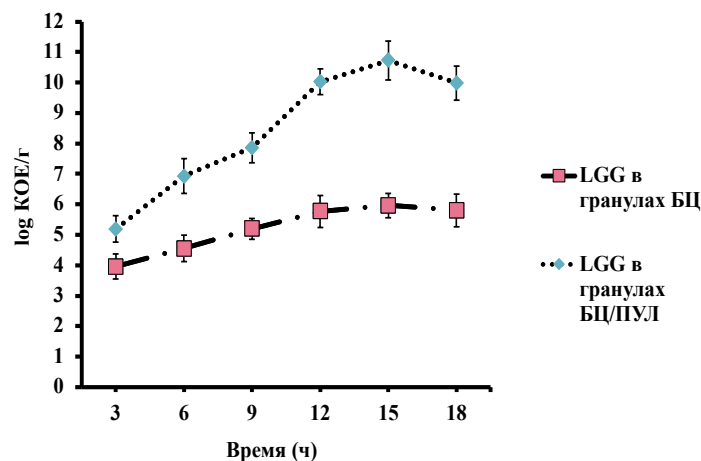


Рисунок 22 – Высвобождение иммобилизованных бактерий LGG в ИКС

По сравнению с экспериментальной группой БЦ, количество клеток, высвободившихся микрогранулами БЦ/ПУЛ и успешно достигших толстого кишечника, не только оставалось стабильным, но и увеличилось более чем на 1,5 log (11,4 log КОЕ/г) по сравнению с исходным значением (9,75 log КОЕ/г). Это увеличение может быть связано с присутствием в микрогранулах пребиотика, который служил источником углерода и стимулировал пролиферацию пробиотических клеток.

Согласно нашему предыдущему исследованию [209], инкапсуляция LGG в микрокапсулы БЦ/ПУЛ позволила доставить бактерии в целевой сайт концентрацией до 10,2 log КОЕ/г. Основываясь на полученных данных, метод иммобилизации с образованием биопленки, используемый в данной работе, оказался даже более эффективным, поскольку в соке толстого кишечника было обнаружено до 11,4 log КОЕ/г LGG, что в 10 раз выше. Плюсами данного приема является то, что это более простой в технологической реализации метод иммобилизации пробиотиков, так как не требует специального аппаратного оформления. Метод микрокапсуляции, хотя и эффективен, может стать дорогим из-за необходимости в приобретении и обслуживании микрокапсулятора (экструдера, спреера или эмульгатора), средств для смешивания, создания оболочки и охлаждения, а также системы для сбора и сушки микрокапсул.

Эти эксперименты показали, что микрогранулы БЦ/ПУЛ успешно разлагались в модельном ИКС, что позволяет рассматривать их в качестве подходящего носителя для доставки пробиотиков. Высвобождение LGG происходило благодаря активности целлюлазы в модельном толстом кишечнике, что приводило к деградации целлюлозных микрогранул. Итак,

иммобилизованные в ПМПБ пробиотики по уровню резистентности к воздействию желудочного сока и солей желчных кислот значительно превосходят суспензию свободных клеток и могут беспрепятственно преодолевать «желудочный» барьер при их пероральном введении.

В классических исследованиях в области пробиотической микробиологии, реальную активность и эффективность экзогенных пробиотических штаммов принято оценивать не только в искусственной пищеварительной системе, но и по их способности выживать в условиях *in vivo*. Результаты этой серии экспериментов представлены в последующем разделе.

3.4.3 Обнаружение LGG в содержимом кишечника лабораторных животных

Дополнительным подтверждением эффективности этой «транспортной системы» могут служить результаты экспериментов по введению в организм млекопитающих пробиотических клеток, иммобилизованных в ПМПБ. Активность *in vivo* можно оценить по способности приживания экзогенных штаммов. Это связано с тем, что клиническая эффективность пробиотиков зависит от колонизации кишечной слизистой оболочки и замещения функций, что способствует восстановлению нормальной индигенной флоры. Как правило, микроорганизмы, входящие в состав пробиотиков, временно занимают экологическую нишу, которая со временем заселяется колониями штаммов, изначально населяющих слизистую оболочку кишечника. Иными словами, это способствует созданию микроэкологической среды, способствующей коррекции собственной микрофлоры.

Несмотря на то, что штаммы бактерий, используемые в производстве пробиотиков, обычно отбираются из микрофлоры ЖКТ человека, они все же не обладают длительной индивидуальной колонизационной резистентностью и элиминируются из кишечника в течение 1-2 недель, т.е. прекращают обнаруживаться [247]. Однако, в зависимости от штамма это замещение происходит в различные временные сроки. Как уже указывалось ранее, рабочий штамм LGG был выбран потому, что проявляет более высокую адгезионную активность по сравнению со многими родственными штаммами. Это связано с наличием у него специфических пилей [248]. Когда LGG с их помощью прикрепляется к эпителию кишечника, он подавляет адгезию других микробов – явление, известное как конкурентная колонизация. Эта способность, вероятно, является ключевым фактором, лежащим в основе эффективности LGG в профилактике кишечных инфекций [249].

С целью определения «судьбы» вводимых перорально LGG при прохождении их через ЖКТ животных, крысам добавляли в корм микрогранулы ПМПБ и БЦ/LGG, а также свободные клетки бактерий. Вводимая доза составляла один миллиард КОЕ/день.

Способность пробиотиков выживать в условиях *in vivo* оценивается по присутствию живых клеток в образцах фекалий, которые содержат всю кишечную микробиоту, т. е. с использованием традиционной и репрезентативной модели [250].

Дифференциацию экзогенных и эндогенных лактобацилл обычно проводят при помощи метода «отпечатков» (DNA fingerprinting). Для этого после различных сроков приема экзогенных пробиотиков образцы фекалий высевают на питательную среду, произвольно отбирают колонии и используют этот материал в качестве матриц для амплификации 16S рДНК в ПЦР. Затем полученные 16S рДНК обрабатывают рестриктазами, разделяют электрофоретически и по полиморфизму длины рестрикционных фрагментов определяют наличие в фекалиях экзогенных пробиотических бактерий [251]. В данном исследовании была использована более модернизированная схема, состоящая из (а) посева образцов на среду MRS с индикатором, (б) микроскопии *lac*- колоний и (в) FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*) идентификации (рисунок 23). Метод FISH становится все более популярным для выявления пробиотических бактерий, которые намеренно вводятся в ЖКТ [252].

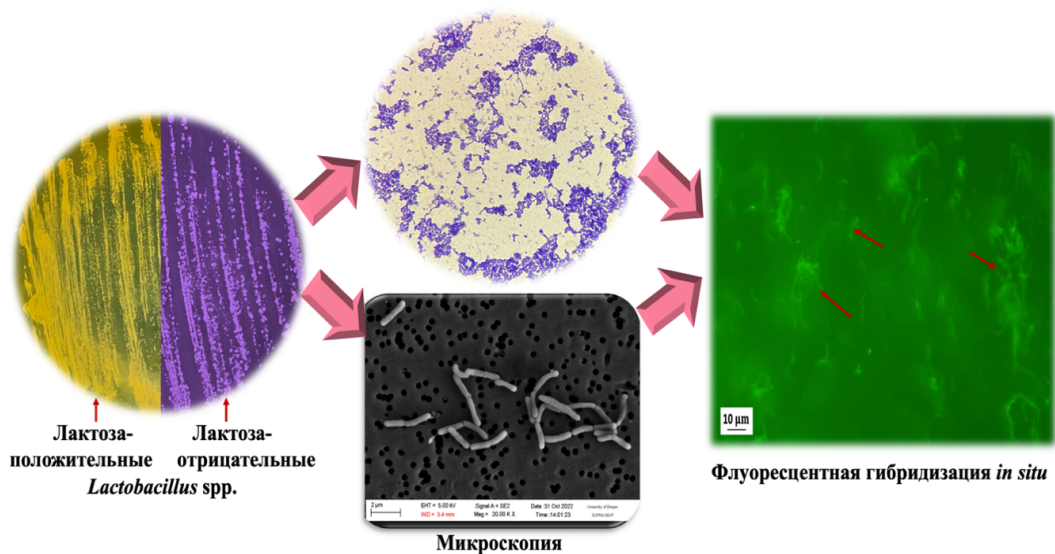


Рисунок 23 – Схема идентификации LGG: культивирование на индикаторной среде MRS → микроскопия (световая, электронная) → FISH с использованием зонда с флуоресцентной меткой

LGG отличается от большинства других молочнокислых бактерий своей неспособностью сбраживать лактозу [253], что и было использовано для их идентификации путем отбора типичных LGG-подобных колоний из образцов фекалий и культивирования их на лактозном MRS агаре с индикаторным красителем. Это традиционный микробиологический прием, который основан на способности лактозоположительных бактерий сбраживать лактозу, входящую в состав среды, с образованием молочной кислоты,

которая снижает pH среды, вызывая изменение ее цвета (пожелтение) в присутствии индикатора бромкрезолового фиолетового.

Образцы фекалий крыс отбирали ежедневно во время и после приема пробиотиков и культивировали в питательной среде для появления колоний и их последующего анализа. В результате из каждого образца были отобраны 5-10 типичных LGG-подобных колоний, образованных из грамположительных палочковидных бактерий, формирующих длинные цепочки, типичные для штамма GG. Колонии пересеивали и культивировали в бульоне. Затем образцы с бактериальной суспензией гибридизовали добавлением буфера со специфическим зондом с флуоресцентной меткой Lcas467. Длинные цепочки бактерий на флуоресцентном изображении (рисунок 23) представляют собой бактерии LGG, поскольку они прореагировали с зондом. Основываясь на результатах FISH, все проанализированные колонии из каждого образца фекалий принадлежали LGG.

При употреблении в пищу как свободных, так и иммобилизованных бактерий они обнаруживались в фекалиях на вторые сутки и достигали максимального уровня на пятые сутки (таблица 4). При этом количество клеток существенно варьировало в зависимости от того, в каком виде они прошли через желудочно-кишечный тракт животных.

Таблица 4 – Титр LGG (log КОЕ/г) в образцах фекалий крыс после приема различных вариантов пробиотика

День	Свободные LGG	БЦ/LGG	ПМПБ
	Во время приема		
1	0	0	0
2	2,05±0,13	3,43±0,24*	5,32±0,23*,**
3	3,09±0,18	4,34±0,35*	7,63±0,11*,**
4	3,34±0,31	4,56±0,21*	7,39±0,21*,**
5	3,51±0,54	4,83±0,23*	7,44±0,25*,**
6	3,49±0,19	4,77±0,32*	7,41±0,13*,**
7	3,31±0,23	4,81±0,26*	7,38±0,32*,**
После приема			
8	2,53±0,13	4,30±0,45*	7,29±0,35*,**
9	1,76±0,22	3,35±0,24*	6,54±0,54*,**
10	1,04±0,09	2,67±0,12*	6,04±0,42*,**
11	0	2,39±0,10*	5,95±0,12*,**
12	0	1,94±0,08*	5,53±0,65*,**
13	0	1,77±0,12*	5,32±0,45*,**
14	0	1,58±0,12*	5,12±0,58*,**

Примечание: * достоверные (p<0,001) различия с 1-й группой: ** достоверные (p<0,001) различия с 1-й и со 2-й группами.

Самая высокая концентрация жизнеспособных LGG в образцах фекалий была обнаружена между 3 и 7 днями после начала приема микрогранул ПМПБ (7,38-7,63 log КОЕ/г). После введения микрогранул БЦ/LGG (без пребиотика) максимальное количество в образцах колебалось между 4,34 и 4,81 log КОЕ/г, т. е. на 3 порядка ниже. Популяционный уровень свободных клеток был еще меньше и составлял только 3,09-3,51 log КОЕ/г. У контрольных крыс LGG не был обнаружен из-за отсутствия данного штамма в кишечных экосистемах этих животных.

После прекращения приема свободных LGG концентрация клеток в фекалиях снижалась и полностью исчезала к 11-му дню. То есть при таком способе доставки происходит только временная транзиторная колонизация кишечника экзогенными лактобактериями.

Через неделю после последнего приема микрогранул БЦ без пребиотика количество клеток LGG снизилось до ≈ 1 log. В то же время, после последнего приема микрогранул ПМПБ было обнаружено значительное количество LGG – 5,12 log КОЕ/г.

Полученные результаты свидетельствуют о лучшем сохранении жизнеспособности клеток в иммобилизованном состоянии и их беспрепятственном прохождении через верхние отделы пищеварительного тракта. Кроме того, добавление пребиотика в ПМПБ способствует стимулированию пролиферации пробиотических клеток. Таким образом, данная система доставки эффективна как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*.

Это демонстрирует, что полисахаридная матрица, содержащая по меньшей мере один миллиард КОЕ, является подходящим носителем для успешной доставки пробиотических клеток в толстую кишку. Однако, надо помнить, что основным недостатком целлюлозы является ее взаимопроницающие поры. Ее открытая структура позволяет пробиотическим клеткам преждевременно высвободиться в желудке во время прохождения через верхние отделы ЖКТ. Добавление ПУЛ позволило преодолеть это ограничение, предположительно, за счет герметизации пор, что привело к лучшей выживаемости и последующему более высокому высвобождению LGG.

Полученные экспериментальные данные позволяют утверждать, что БЦ выполнял функции «убежища», способного вместить значительное количество клеток LGG, а ПУЛ действовал как пребиотик, стимулируя рост пробиотических клеток и образование ими биопленки. Пребиотик служил защитным барьером, оберегавший эти убежища. «Двери» оставались закрытыми при воздействии неблагоприятных условий, таких как желудочная кислота и желчные соли. Однако при достижении целевого участка (толстой кишки) они открывались. Когда пребиотик утилизировался, пробиотики, содержащиеся в микрогранулах, высвобождались и колонизировали кишечник. Таким образом, микрогранулы БЦ/ПУЛ способствовали постепенному высвобождению клеток LGG.

Предлагаемая система, состоящая из нейтрального носителя, пребиотика и пробиотика, представляет собой новый подход, направленный на повышение эффективности существующих пробиотиков.

3.5 Разработка биологически активной добавки на основе пробиотической культуры, иммобилизованной в микрогранулы биополимеров

Способ иммобилизации и полисахаридная матрица, разработанные в ходе экспериментальных исследований, явились теоретической и методической основой для создания инновационного иммобилизованного пробиотика. Он представляет собой микрогранулы полисахаридной пребиотической матрицы с иммобилизованной в ней биопленкой пробиотика для повышения его клеточной концентрации и жизнеспособности в агрессивных условиях технологических процессов производства и доставки их в ЖКТ. Экспериментальному образцу – микрогранулам ПМПБ дали рабочее название «Лактоцелл». Его получение включало ряд этапов:

1. Инокулят *K. xylinus* С-3 (продуцент БЦ) получали путем переноса колонии из рабочей агаровой культуры в 100 мл питательного бульона HS и затем инкубировали при температуре 30°C в течение 48 часов. Клетки осаждали путем центрифугирования со скоростью 10 000×g. Титр клеток в инокуляте определяли по ОП и доводили до 10⁷ клеток/мл с использованием спектрофотометра UV-1601 PC (“Shimadzu”, Япония).

Инокулят *A. pullulans* С-7 (продуцент ПУЛ) был получен путем переноса пленки дрожжеподобного гриба из агаровой культуры (размером 1 см²) в колбу, содержащую 25 мл среды базовой среды. Культуру выращивали в течение 3 суток в орбитальном шейкере-инкубаторе (20 об/мин) при температуре 25°C. Исходную культуру инокулировали (1%) в колбу объемом 250 мл, содержащую 100 мл среды базовой среды, и инкубировали при 30°C в течение 3 суток. Клетки микроорганизма отделяли от культуральной жидкости центрифугированием в течение 15 мин при 6000×g. Титр клеток в посевном материале определяли по ОП и доводили до плотности клеток ≈10⁷ клеток/мл.

Инокулят обеих культур (1%) вносили в 250-мл колбы, содержащие 100 мл среды. После чего инкубировали при 30°C, в течение 7 суток. Затем пленку отделяли и промывали в 0,5-1% растворе NaOH при 80°C до полного удаления клеток. После чего целлюлозные образцы отмывали от раствора NaOH дистиллированной водой, 0,5% раствором уксусной кислоты и вновь дистиллированной водой до нейтральной реакции.

2. Накопление биомассы штамма пробиотика *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 осуществляли путем глубинного культивирования в питательной среде MRS. Штамм LGG инокулировали в 50 мл бульона MRS и инкубировали в течение 48 часов при 37°C. Культуральную жидкость центрифугировали в течение 15 минут, при 4°C, 4000×g. Затем супернатант отделяли и клетки дважды промывали дистиллированной водой.

Осадок ресуспендировали в 3 мл раствора хлорида натрия.

4. Для иммобилизации в гранулы БЦ/ПУЛ использовали суспензию бактерий LGG с концентрацией клеток 10^8 КОЕ/мл. Гранулы были получены путем измельчения пленок БЦ/ПУЛ в лабораторной мельнице и последующим гранулированием в грануляторе ZLSP-300 (Россия). Стерильные гранулы и бактериальные клетки помещали в среду PYG_m, предназначенную для стимуляции образования биопленки, и инкубировали при температуре 37°C до 48 часов, чтобы обеспечить надлежащую иммобилизацию в носителях.

5. Полученные синбиотические микрогранулы высушивали в лиофилизаторе LyoQuestPlus-55. Готовые к употреблению микрогранулы содержали 10^9 КОЕ/г.

6. Микрогранулы расфасовывали в саше и хранили при температуре от 2°C до 25°C.

Все указанные особенности технологии «Лактоцелл» отражены в лабораторном регламенте, схема которого приведена на рисунке 24.

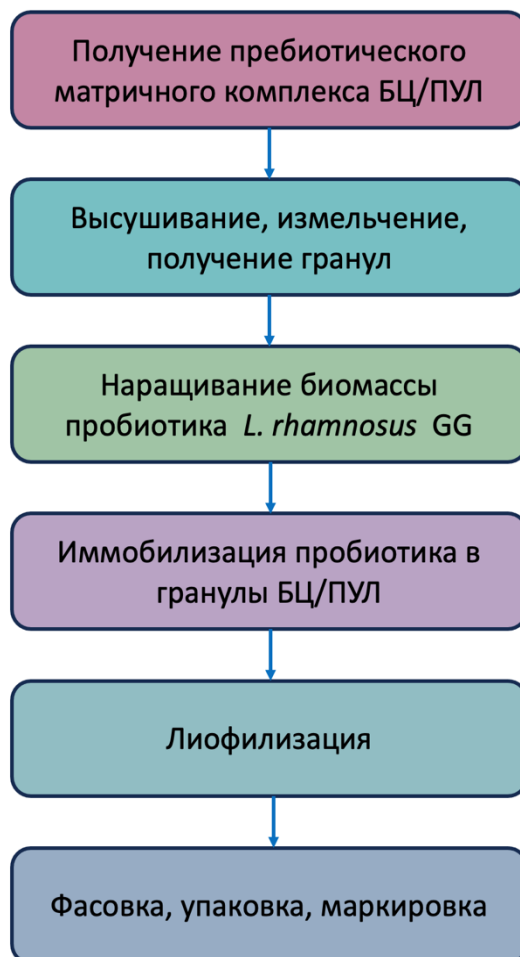


Рисунок 24 – Схема получения биологически активной добавки к пище «Лактоцелл»

Были подготовлены несколько серий экспериментального образца с установленным количеством живых микробных клеток. Дизайн биологически активной добавки (БАД) «Лактоцелл» в виде сухих гранул в саше-пакетах представлен на рисунке 25.



Рисунок 25 – Образцы биологически активной добавки «Лактоцелл»

На «Лактоцелл» были разработаны пакеты нормативной технической документации: технологическая инструкция по производству, рецептура, план НАССР, уведомление о безопасности, удостоверение качества, инструкция по применению, макет этикетки, декларация, научный отчет, протокол испытаний о биологической безопасности, выданный ТОО «Нутритест». БАД «Лактоцелл» зарегистрирован в Комитете санитарно-эпидемиологического контроля Министерства Здравоохранения Республики Казахстан (KZ.16.01.98.003.R.000453.07.23 от 19 июля 2023 года).

3.6 Влияние «Лактоцелла» на разнообразие микробиоты у здоровых добровольцев

Разнообразие кишечных бактерий имеет важное значение для здоровой микрэкосистемы кишечника. Результаты многочисленных исследований показали, что диетическое вмешательство с использованием пробиотиков может существенно увеличить разнообразие микробиоты слизистой оболочки кишечника [254–256]. Причем это происходит даже у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника [257].

Исследования микробиома человека показывают, что определенные штаммы *Lactobacillus* часто обнаруживаются в кишечнике и других частях человеческого организма. Наиболее широко изученным среди пробиотиков является *L. rhamnosus* GG [248].

В данном исследовании участвовали две экспериментальные группы (1 – до приема пробиотика, 2 – после приема пробиотика), состоящие из 20 здоровых добровольцев (10 женщин, 10 мужчин, 20-30 лет).

Было проанализировано, как разработанные пробиотические микрогранулы влияют на состав микробиоты слизистой оболочки кишечника людей. В качестве основной конечной точки было выбрано альфа и бета разнообразие микробиоты, относительное изобилие кишечной микробиоты и корреляция метаболических путей и таксонов на уровне видов.

Таксономический состав оценивали на видовом уровне, а для количественной оценки бактериального альфа-разнообразия рассчитывали индексы Шеннона и Симпсона. Альфа-разнообразие микробиоты кишечника было заметно увеличено в исследуемой группе, как с точки зрения видового разнообразия, так и с точки зрения доминирования. Однако, согласно данным, между экспериментальными группами не было статистически значимой разницы ($p=0,812$) (рисунок 26А).

Анализ бета-разнообразия осуществлялся с помощью метода главных координат (РСоА), в качестве меры расстояния выбран индекс Брея – Кертиса. Обнаружено четкое различие среди двух групп. Кластер группы после приема микрогранул с пробиотиками перекрывался с группой, не принимавшей пробиотики, указывая на значительный сдвиг в направлении кластера. Анализ сходства (ANOSIM) с использованием расстояния Брея-Кертиса показал существенные различия в составе микробиоты кишечника на уровне рода между экспериментальными группами (значение $R=0,11$, значение $p=0,04765$). Анализ процедуры перестановки множественных ответов показал, что внутригрупповое расстояние было больше в группе после приема пробиотика, что соответствует размеру эллипсоида при РСоА. Роды, вносящие значительный вклад в ординацию выборок, показаны на рисунке 26Б. *Lachnospiraceae*_UCG-008, *Erysipelatoclostridium*, *Eubacterium_ruminantium*, *Rikenellaceae*_RC9 и *Helicobacter* положительно коррелировали и вносили значительный вклад в кластер после приема, в то время как *Ruminococcus_Torques*, *Prevotella*, *Lachnospiraceae*_FE2018, *Oscillibacter*, *Flavonifractor* и *Roseburia* — до потребления пробиотиков.

Чтобы всесторонне изучить состав микробиоты кишечника, была определена относительная численность доминантных родов в микробиоте кишечника (рисунок 26В,Г). Обнаружено значительное разнообразие доминирующих родов после приема пробиотиков. Отмечена более высокая относительная численность видов *Desulfobacterota*, *Lactobacillales*, *Desulfovibrionales*, *Staphylococcales*. Кроме того, было выявлено большое количество семейств, таких как *Lactobacillaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Carnobacteriaceae*, по сравнению с показателями до потребления пробиотических микрогранул. Прием пробиотика значительно обогатил микробное сообщество такими родами, как *Bilophila*, *Lactobacillus*, *Phocaea*, *Prevotellaceae*, *Faecalibacterium*, *Desulfovibrio*, *Granulicatella*. Более того, по данным двухнедельного анализа приема пробиотиков, микробиом был также значительно обогащен *Lactobacillus_amylovorus*, *Lactobacillus_rhamnosus* ($p>0,0001$). Напротив, у участников эксперимента до потребления пробиотических микрогранул показано высокое количество *Parabacteroides*

gordonii, *Roseburia faecis* ($p=0,01$) и *Colidextribacter Massiliensis*, *Bacteroides acidifaciens* ($p=0,05$).

Доминирующие в микробиоте кишечника десять типов, были представлены в формате гистограммы. Общеизвестно, что соотношение *Firmicutes/Bacteroidetes* часто используется в качестве индикатора структуры микробиоты кишечника. Относительная численность *Firmicutes* была выше до потребления пробиотических микрогранул, тогда как доля *Bacteroidetes* была выше в группе после приема пробиотика. Кроме того, в обеих экспериментальных группах было определено соотношение *Proteobacteria/Verrucomicrobiota/Actinobacteria* (рисунок 26Д).

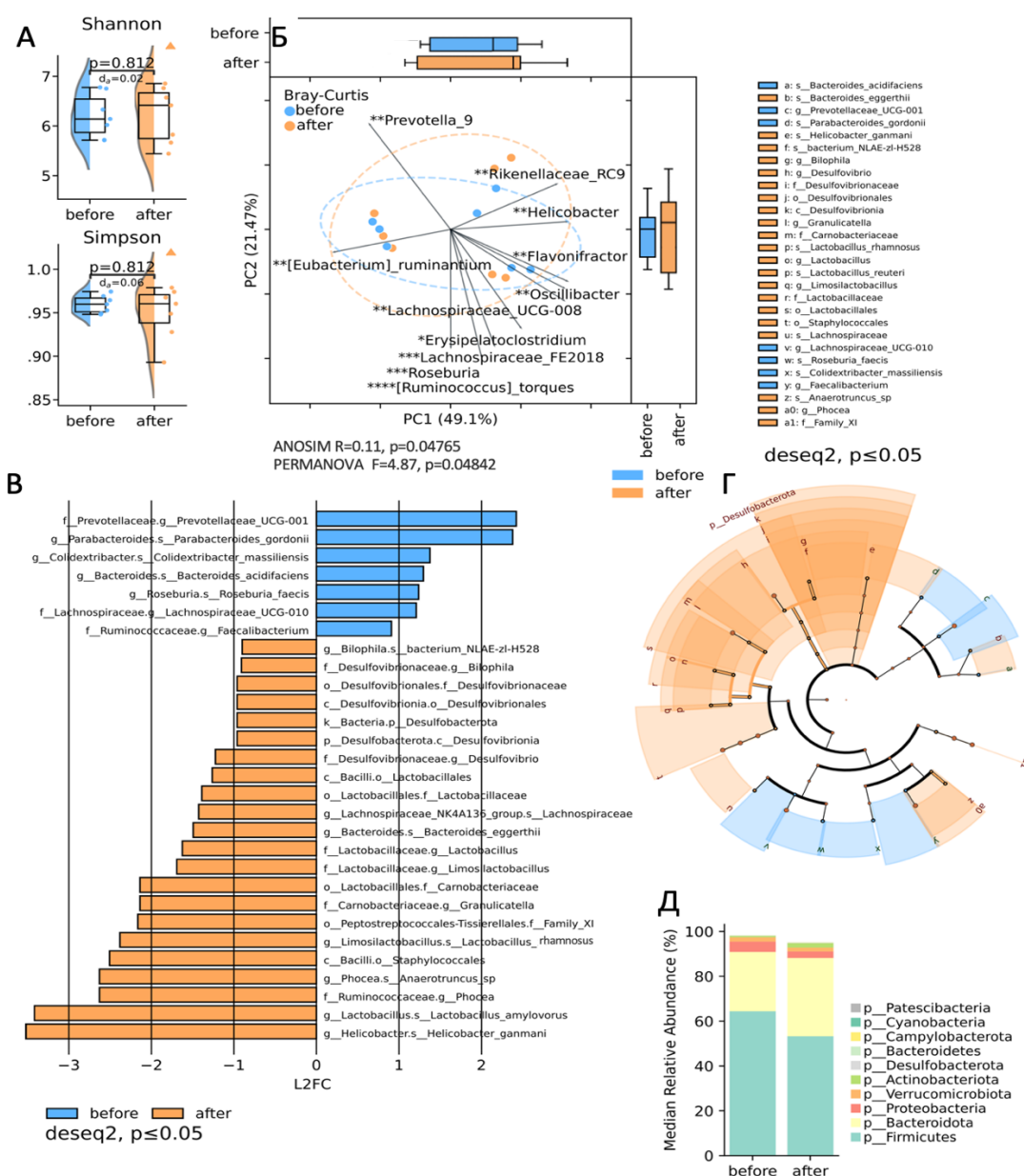


Рисунок 26 – Анализ разнообразия внутри и между экспериментальными группами, а также таксоны с разной численностью: (А) α -разнообразие; (Б) β -разнообразие; (В) гистограмма предполагаемого $\log_2$ -

кратного изменения (L2FC) между таксонами с дифференциальной численностью и (Г) кладограмма таксонов с дифференциальной численностью; (Д) медианная относительная численность 10 наиболее распространенных типов. Экспериментальные группы до и после потребления пробиотика показаны синим и оранжевым цветом соответственно.

Относительная численность видов была определена путем анализов важности признаков и ROC-AUC (area under ROC curve, площадь под ROC-кривой), как показано на рисунке 27А. Было обнаружено большое количество бактерий с пробиотическими свойствами в группе после приема микрогранул, таких как *Bifidobacterium longum*, *Odoribacter splanchnicus*, *Bacteroides eggerthii*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus rhamnosus* ($p=0,011$), *Lactobacillus amylovorus* ($p=0,0262$), *Finogoldia magna* ($p=0,033$), *Blautia bacterium* ($p=0,004$). До потребления пробиотиков в микробиоте кишечника наблюдалось высокое количество *Colidextribacter Massiliensis* ($p=0,0491$), *Roseburia faecis* ($p=0,0428$), бактерий *Ruminococcaceae* ($p=0,033$). Как показано на рисунке 27Б, после приема были также идентифицированы несколько видов семейства *Lactobacillaceae*.

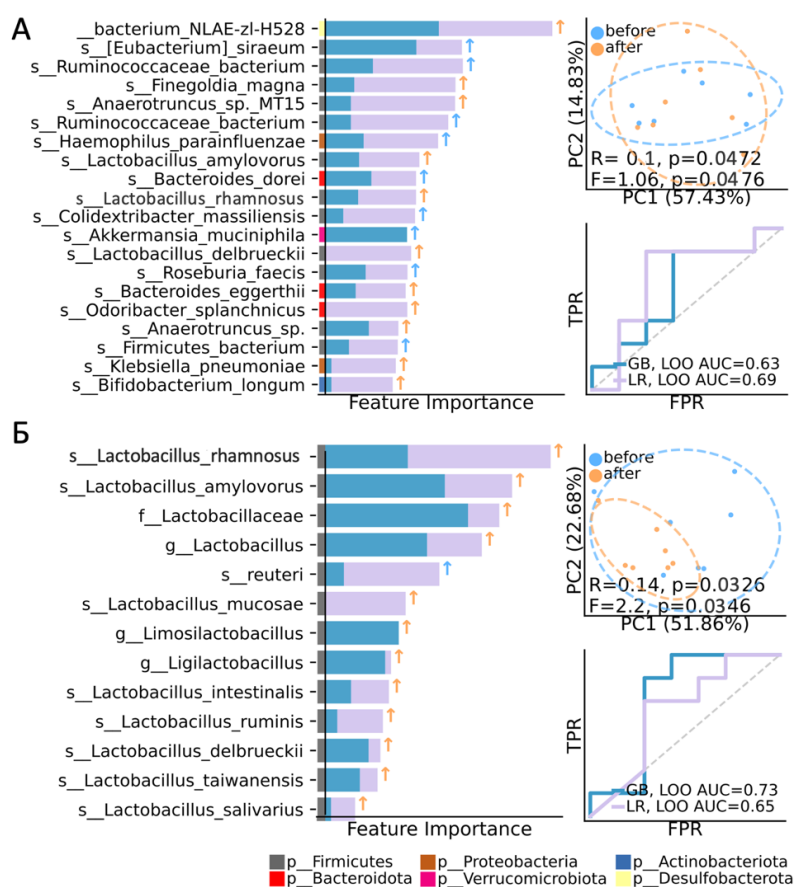


Рисунок 27 – Анализ важности признаков на основе относительной численности таксонов: (А) на основе всех видов; (Б) на основе всех таксонов

семейства *Lactobacillaceae*. (Слева): первые 20 таксонов, ранжированные по предполагаемой важности для дифференциации групп. (Вверху справа): анализ главных координат (РСоА) на основе 20 наиболее важных таксонов. (Внизу справа): кривая AUC-ROC, отражающая степень разделения между группами во время валидации. GB = усиление градиента; LR = логистическая регрессия; LOO = перекрестная проверка с исключением одного; AUC = площадь под кривой. AUC>0,5 предполагает разделение групп, тогда как AUC=1 указывает на абсолютное разделение. Экспериментальные группы до и после потребления пробиотика показана синим и оранжевым цветом соответственно. Группа с большей медианной численностью обозначена стрелкой.

Анализ выявил 5 потенциальных метаболических путей в каждом образце. PWY-5971: биосинтез пальмитата II (бактерии и растения), $p=0,029375$; PWY-6895: суперпуть биосинтеза тиаминдифосфата II, $p=0,043125$; ARG+POLYAMINE-SYN: суперпуть биосинтеза аргинина и полиаминов, $p=0,015625$; POLYAMSYN-PWY: суперпуть биосинтеза полиаминов I, $p=0,015625$; и PWY-6396: суперпуть биосинтеза 2,3-бутандиола, $p=0,03125$, были повышены после приема пробиотика.

По данным корреляционного анализа PWY-5971, PWY-6895 и PWY-6396 показаны статистически значимые положительные корреляции с *Lactobacillus rhamnosus*, *Helicobacter ganmani*, *Lachnospiraceae*, *Anaerotruncus* sp. И отрицательная корреляция с *Roseburia faecis* и *Colidextribacter massiliensis* (рисунок 28). *Blautia bacterium* и *Lactobacillus amylovorus* продемонстрировали корреляцию со всеми возможными микробными путями. Кроме того, была выявлена отрицательная корреляция между ARG+POLYAMINE-SYN и POLYAMSYN-PWY с *Lactobacillus amylovorus* и *Blautia bacterium*.

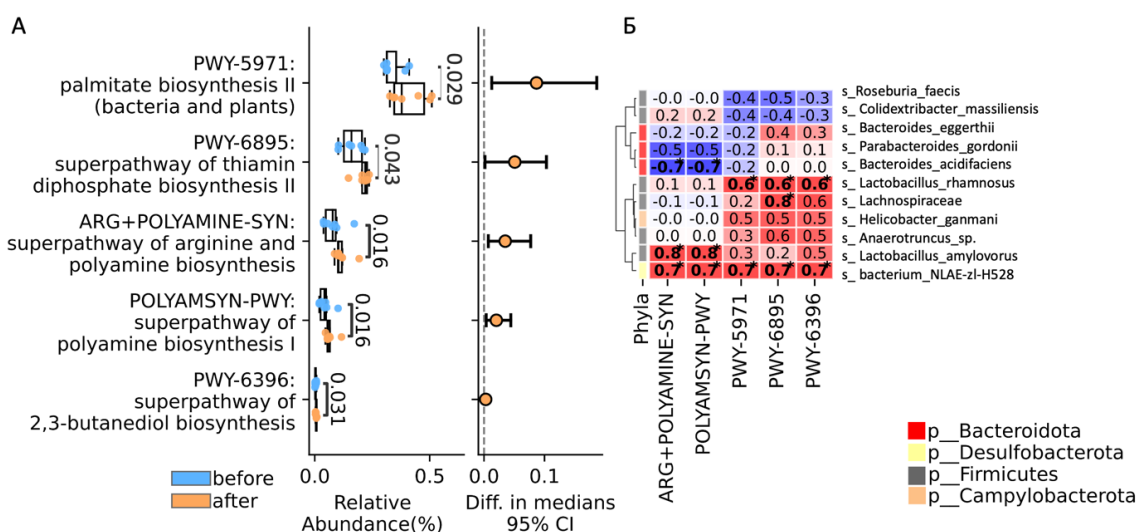


Рисунок 28 – Метаболические пути и корреляция между ними и таксонами на уровне видов: (А) Относительное обилие метаболических путей и 95% ДИ

для разницы между их медианами; (Б) Кластерная диаграмма, показывающая закономерности корреляции между относительной численностью метаболических путей и таксонами на уровне видов. Экспериментальные группы до и после потребления пробиотика показаны синим и оранжевым цветом соответственно. * $p < 0,05$.

Согласно полученным результатам, виды *Lactobacillus* коррелируют с метаболическими путями аминокислот, жирных кислот, витамина В1, полиаминов и пирувата. *Lactobacillus rhamnosus* может улучшить состав фекальной микробиоты, обеспечивая короткоцепочечными жирными кислотами (КЦЖК), которые являются источниками энергии. В ряде работ показано, что большее количество пробиотиков может ускорить расщепление промежуточных углеводных продуктов, влияя на синтез КЦЖК и способствуя увеличению концентрации жирных кислот в толстой кишке [258].

Полученные результаты также косвенно подтверждают результаты других работ, которые продемонстрировали, что изменения уровня пептидов и дипептидов, а также различных метаболитов аминокислот, полиаминов и метаболитов в кишечнике и кровотоке потенциально могут быть связаны с эффективностью пробиотиков [259,260].

Изучение изменения метаболизма, вызванных приемом пробиотиков, может дать новое понимание регуляции метаболических процессов и сыграть решающую роль в разработке инновационных подходов в профилактике и лечении различных заболеваний [256]. Данные продемонстрировали, что добавление в рацион одних только пробиотиков оказало значительное влияние на изменение микробиома, тем самым показав, что подобное диетическое вмешательство дало положительный эффект.

Полученные сведения об изменениях в составе микробиоты кишечника участников эксперимента следует рассматривать в плане возможности развития научной основы для использования микробиома в профилактике заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют сделать следующие **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 совместного культивирования 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 В1, полиаминов и пирувата.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Wang X., Zhang P., Zhang X. Probiotics Regulate Gut Microbiota: An Effective Method to Improve Immunity // *Molecules* – 2021. – Vol. 26, No. 19. – P.6076.
2. Sanders M.E., Merenstein D., Merrield C.A., Hutkins R. Probiotics for human use // *Nutrition Bulletin* – 2018. – Vol. 43, No. 3. – P.212–225.
3. Pinmanee P., Sompinit K., Jantimaporn A., Khongkow M., Haltrich D., Nimchua T., Sukyai P. Purification and Immobilization of Superoxide Dismutase Obtained from *Saccharomyces cerevisiae* TBRC657 on Bacterial Cellulose and its Protective Effect against Oxidative Damage in Fibroblasts // *Biomolecules* – 2023. – Vol. 13, No. 7. – P.1156.
4. Mitropoulou G., Nedovic V., Goyal A., Kourkoutas Y. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production // *Journal of Nutrition and Metabolism* – 2013. – Vol. 2013. – P.1–15.
5. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm Formation as Microbial Development // *Annual Review of Microbiology* – 2000. – Vol. 54, No. 1. – P.49–79.
6. Donlan R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces // *Emerging Infectious Diseases* – 2002. – Vol. 8, No. 9. – P.881–890.
7. Ławniczak Ł., Kaczorek E., Olszanowski A. The influence of cell immobilization by biofilm forming on the biodegradation capabilities of bacterial consortia // *World Journal of Microbiology and Biotechnology* – 2011. – Vol. 27, No. 5. – P.1183–1188.
8. Yong Y.-C., Zhong J.-J. Quorum Sensing: A new regulatory circuit in pollutants biodegradation // *Journal of Bioscience and Bioengineering* – 2009. – Vol. 108. – P.S78–S79.
9. Abee T., Kovacs A.T., Kuipers O.P., van der Veen S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria // *Current Opinion in Biotechnology* – 2011. – Vol. 22, No. 2. – P.172–179.
10. Tannock G.W., Ghazally S., Walter J., Loach D., Brooks H., Cook G., Surette M., Simmers C., Bremer P., Dal Bello F., Hertel C. Ecological Behavior of *Lactobacillus reuteri* 100-23 Is Affected by Mutation of the *luxS* Gene // *Applied and Environmental Microbiology* – 2005. – Vol. 71, No. 12. – P.8419–8425.
11. Walter J., Loach D.M., Alqumber M., Rockel C., Hermann C., Pfitzenmaier M., Tannock G.W. D-Alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract // *Environmental Microbiology* – 2007. – Vol. 9, No. 7. – P.1750–1760.
12. Jones S.E., Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors // *BMC Microbiology* – 2009. – Vol. 9, No. 1. – P.35.

13. Portela R., Leal C.R., Almeida P.L., Sobral R.G. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications // *Microbial Biotechnology* – 2019. – Vol. 12, No. 4. – P.586–610.
14. Jayani T., Sanjeev B., Marimuthu S., Uthandi S. Bacterial Cellulose Nano Fiber (BCNF) as carrier support for the immobilization of probiotic, *Lactobacillus acidophilus* 016 // *Carbohydrate Polymers* – 2020. – Vol. 250. – P.116965.
15. Fijałkowski K., Peitler D., Rakoczy R., Żywicka A. Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution // *LWT - Food Science and Technology* – 2016. – Vol. 68. – P.322–328.
16. Lappa I.K., Kachrimanidou V., Alexandri M., Papadaki A., Kopsahelis N. Novel Probiotic/Bacterial Cellulose Biocatalyst for the Development of Functional Dairy Beverage // *Foods* – 2022. – Vol. 11, No. 17. – P.2586.
17. Segers M.E., Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions // *Microbial Cell Factories* – 2014. – Vol. 13, No. Suppl 1. – P.S7.
18. Lebeer S., Verhoeven T.L., Perea Vélez M., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C. Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG // *Applied and Environmental Microbiology* – 2007. – Vol. 73, No. 21. – P.6768–6775.
19. FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Group Report. (London Ontario, Canada) / FAO Food and Nutrition Paper 85, 2002.
20. Масирбаева А., Сайфудин А., Жантлесова С., Ерденбекова М., Талапбек Ш., Байсариева А. КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИКОВ И ПРЕБИОТИКОВ // *Микробиология және вирусология* – 2023. – Т.1, № 40. – С.72–84.
21. Sanders M.E. Probiotics in 2015 // *Journal of Clinical Gastroenterology* – 2015. – Vol. 49, No. Supplement 1. – P.S2–S6.
22. Doron S., Snyderman D.R., Gorbach S.L. *Lactobacillus* GG: Bacteriology and clinical applications // *Gastroenterology Clinics of North America* – 2005. – Vol. 34, No. 3. – P.483–498.
23. Goldin B.R., Gorbach S.L., Saxelin M., Barakat S., Gualtieri L., Salminen S. et al. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract // *Digestive Diseases and Sciences* – 1992. – Vol. 37, No. 1. – P.121–128.
24. Sepp E., Mikelsaar M., Salminen S. Effect of administration of *lactobacillus casei* strain GG on the gastrointestinal microbiota of newborns // *Microbial Ecology in Health and Disease* – 1993. – Vol. 6, No. 6. – P.309–314.
25. Tuomola E.M., Ouwehand A.C., Salminen S.J. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus // *Federation of*

European Microbiological Societies Immunology & Medical Microbiology – 1999. – Vol. 26, No. 2. – P.137–142.

26. Krishnan V. Pilins in gram-positive bacteria: A structural perspective // IUBMB Life – 2015. – Vol. 67, No. 7. – P.533–543.

27. Kankainen M. Paulin L., Tynkkynen S., von Ossowski I., Reunanen J., Partanen P., Satokari R., Vesterlund S., Hendrickx A.P., Lebeer S. et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2009. – Vol. 106, No. 40. – P.17793.

28. Tripathi P., Dupres V., Beaussart A., Lebeer S., Claes I.J., Vanderleyden J., Dufrêne Y.F. Deciphering the nanometer-scale organization and assembly of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili using atomic force microscopy // Langmuir – 2012. – Vol. 28, No. 4. – P.2211.

29. Reunanen J., von Ossowski I., Hendrickx A.P., Palva A., de Vos W.M. Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG // Applied and Environmental Microbiology – 2012. – Vol. 78, No. 7. – P.2337.

30. Motherway M.O., Zomer A., Leahy S.C., Reunanen J., Bottacini F., Claesson M.J., O'Brien F., Flynn K., Casey P.G., Munoz J.A. et al. Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2011. – Vol. 108, No. 27. – P.11217.

31. Douillard F.P., Ribbera A., Kant R., Pietilä T.E., Järvinen H.M., Messing M., Randazzo C.L., Paulin L., Laine P., Ritari J., Caggia C. et al. Comparative Genomic and Functional Analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* Strains and Their Comparison with Strain GG // Public Library of Science Genetics – 2013. – Vol. 9, No. 8. – P.e1003683.

32. Meurman J.H., Antila H., Salminen S. Recovery of *lactobacillus strain* GG (ATCC 53103) from saliva of healthy volunteers after consumption of yoghurt prepared with the bacterium // Microbial Ecology in Health and Disease – 1994. – Vol. 7, No. 6. – P.295–298.

33. Alander M., Satokari R., Korpela R., Saxelin M., Vilpponen-Salmela T., Mattila-Sandholm T., von Wright A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption // VTT Publications – 2001. – No. 454. – P.351.

34. Lebeer S., Claes I.J., Verhoeven T.L., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C. Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine // Microbial Biotechnology – 2011. – Vol. 4, No. 3. – P.368–374.

35. Wilson K.H., Perini F. Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora // Infection and Immunity – 1988. – Vol. 56, No. 10. – P.2610.

36. Lebeer S., Claes I., Tytgat H.L., Verhoeven T.L., Marien E., von Ossowski I., Reunanen J., Palva A., Vos W.M., Keersmaecker S.C., Vanderleyden J. Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells // Applied and Environmental Microbiology – 2012. – Vol. 78, No. 1. – P.185–193.
37. Li Y., Yang S., Lun J., Gao J., Gao X., Gong Z., Wan Y., He X., Cao H. Inhibitory Effects of the *Lactobacillus rhamnosus* GG Effector Protein HM0539 on Inflammatory Response Through the TLR4/MyD88/NF-κB Axis // Frontiers in Immunology – 2020. – Vol. 11. – P.551449.
38. Kuzmich N.N., Sivak K.V., Chubarev V.N., Porozov Y.B., Savateeva-Lyubimova T.N., Peri F. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis // Vaccines – 2017. – Vol. 5, No. 4. – P.34.
39. Ciesielska A., Matyjek M., Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling // Cellular and Molecular Life Sciences 2021. – Vol. 78, No. 4. – P.1233–1261.
40. Claes I.J., Segers M.E., Verhoeven T.L. et al. Lipoteichoic acid is an important microbe-associated molecular pattern of *Lactobacillus rhamnosus* GG // Microbial Cell Factories – 2012. – Vol. 11. – P.161.
41. Isolauri E., Joensuu J., Suomalainen H., Luomala M., Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG // Vaccine – 1995. – Vol. 13, No. 3. – P.310.
42. De Vrese M., Rautenberg P., Laue C., Koopmans M., Herremans T., Schrezenmeir J. Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination // European Journal of Nutrition – 2005. – Vol. 44, No. 7. – P.406–413.
43. Davidson L.E., Fiorino A.M., Snyderman D.R., Hibberd P.L. *Lactobacillus* GG as an immune adjuvant for live-attenuated influenza vaccine in healthy adults: A randomized double-blind placebo-controlled trial // European Journal of Clinical Nutrition – 2011. – Vol. 65, No. 4. – P.501–507.
44. Fang H., Elina T., Heikki A., Seppo S. Modulation of humoral immune response through probiotic intake // Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology – 2000. – Vol. 29, No. 1. – P.47–52.
45. Lahtinen S.J., Boyle R.J., Kivivuori S., Oppedisano F., Smith K.R., Robins-Browne R., Salminen S.J., Tang M.L. Prenatal probiotic administration can influence *Bifidobacterium* microbiota development in infants at high risk of allergy // Journal of Allergy and Clinical Immunology – 2009. – Vol. 123, No. 2. – P.499–501.
46. Gueimonde M., Sakata S., Kalliomäki M., Isolauri E., Benno Y., Salminen S. Effect of maternal consumption of *Lactobacillus* GG on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates // Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition – 2006. – Vol. 42, No. 2. – P.166–170.
47. Ismail I.H., Oppedisano F., Joseph S.J., Boyle R.J., Robins-Browne R.M., Tang M.L. Prenatal administration of *Lactobacillus rhamnosus* has no effect

on the diversity of the early infant gut microbiota // *Pediatric Allergy and Immunology* – 2012. – Vol. 23, No. 3. – P.255–258.

48. Agarwal R., Sharma N., Chaudhry R., Deorari A., Paul V.K., Gewolb I.H., Panigrahi P. Effects of oral *Lactobacillus* GG on enteric microflora in low-birth-weight neonates // *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* – 2003. – Vol. 36, No. 3. – P.397–402.

49. Szajewska H., Wanke M., Patro B. Meta-analysis: The effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhoea in children // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* – 2011. – Vol. 34, No. 9. – P.1079–1087.

50. Szajewska H., Skórka A., Ruszczyński M., Gieruszczak-Białek D. Meta-Analysis: *Lactobacillus* GG for treating acute gastroenteritis in children - Updated analysis of randomised controlled trials // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* – 2013. – Vol. 38, No. 5. – P.467–476.

51. Szajewska H., Skórka A., Ruszczyński M., Gieruszczak-Białek D. Meta-analysis: *Lactobacillus* GG for treating acute diarrhoea in children // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* – 2007. – Vol. 25, No. 8. – P.871–881.

52. Hojsak I., Snovak N., Abdović S., Szajewska H., Misak Z., Kolacek S. *Lactobacillus* GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *Clinical Nutrition* – 2010. – Vol. 29, No. 3. – P.312–316.

53. Oberhelman R.A., Gilman R.H., Sheen P., Taylor D.N., Black R.E., Cabrera L., Lescano A.G., Meza R., Madico G. A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children // *Journal of Pediatrics* – 1999. – Vol. 134, No. 1. – P.15–20.

54. Kumpu M., Kekkonen R.A., Kautiainen H., Järvenpää S., Kristo A., Huovinen P., Pitkäranta A., Korpela R., Hatakka K. Milk containing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and respiratory illness in children: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *European Journal of Clinical Nutrition* – 2012. – Vol. 66, No. 9. – P.1020–1023.

55. Horvath A., Dziechciarz P., Szajewska H. Meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for abdominal pain-related functional gastrointestinal disorders in childhood // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* – 2011. – Vol. 33, No. 12. – P.1302–1310.

56. Manzoni P., Mostert M., Leonessa M.L., Priolo C., Farina D., Monetti C., Latino M.A., Gomirato G. Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: A randomized study // *Clinical Infectious Diseases* – 2006. – Vol. 42, No. 12. – P.1735–1742.

57. Gorbach S.L., Chang T.W., Goldin B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG // *The Lancet* – 1987. – Vol. 330, No. 8574. – P.1519.

58. Biller J.A., Katz A.J., Flores A.F., Buie T.M., Gorbach S.L. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG // Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition – 1995. – Vol. 21, No. 2. – P.224–226.
59. Manley K.J., Fraenkel M.B., Mayall B.C., Power D.A. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: A randomised controlled trial // Medical Journal of Australia – 2007. – Vol. 186, No. 9. – P.454–457.
60. Aureli P., Capurso L., Castellazzi A.M., et al. Probiotics and health: An evidence-based review // Pharmacological Research – 2011. – Vol. 63, No. 5. – P.366–376.
61. Bertazzoni E., Donelli G., Midtvedt T., Nicoli J., Sanz Y. Probiotics and clinical effects: Is the number what counts? // Journal of Chemotherapy – 2013. – Vol. 25, No. 4. – P.193–212.
62. Bockle J.C. Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte [French]. 2005. – P.1–126.
63. Saxelin M., Pessi T., Salminen S. Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* Strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers // International Journal of Food Microbiology – 1995. – Vol. 25, No. 2. – P.199–203.
64. Tjalsma H., Boleij A., Marchesi J. et al. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: Beyond the usual suspects // Nature Reviews Microbiology – 2012. – Vol. 10, No. 8. – P.575–582.
65. Wang Y.H., Yao N., Wei K.K., Jiang L., Hanif S., Wang Z.X., Pei C.X. The efficacy and safety of probiotics for prevention of chemoradiotherapy-induced diarrhea in people with abdominal and pelvic cancer: A systematic review and meta-analysis // European Journal of Clinical Nutrition – 2016. – Vol. 70, No. 11. – P.1246–1253.
66. Rafter J., Bennett M., Caderni G., Clune Y., Hughes R., Karlsson P.C., Klinder A., O'Riordan M., O'Sullivan G.C., Pool-Zobel B. et al. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients // American Journal of Clinical Nutrition – 2007. – Vol. 85, No. 2. – P.488–496.
67. Wroblewski L.E., Peek R.M., Wilson K.T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk // Clinical Microbiology Reviews – 2010. – Vol. 23, No. 4. – P.713–739.
68. Myllyluoma E., Veijola L., Ahlroos T., Tynkkynen S., Kankuri E., Vapaatalo H., Rautelin H., Korpela R. Probiotic supplementation improves tolerance to *Helicobacter pylori* eradication therapy - A placebo-controlled, double-blind randomized pilot study // Alimentary Pharmacology and Therapeutics – 2005. – Vol. 21, No. 10. – P.1263–1272.
69. Armuzzi A., Cremonini F., Ojetti V., Bartolozzi F., Canducci F., Candelli M., Santarelli L., Cammarota G., De Lorenzo A., Pola P., Gasbarrini G. et al. Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: A pilot study // Digestion – 2001. – Vol. 63, No. 1. – P.1–7.

70. Dzidic M., Abrahamsson T.R., Artacho A., Björkstén B., Collado M.C., Mira A., Jenmalm M.C. Aberrant IgA responses to the gut microbiota during infancy precede asthma and allergy development // *Journal of Allergy and Clinical Immunology* – 2017. – Vol. 139, No. 3. – P.1017–1025.
71. Clark H., Granell R., Curtin J.A., Belgrave D., Simpson A., Murray C., Henderson A.J., Custovic A., Paternoster L. Differential associations of allergic disease genetic variants with developmental profiles of eczema, wheeze and rhinitis // *Clinical and Experimental Allergy* – 2019. – Vol. 49, No. 11. – P.1475–1486.
72. Korpela K., Salonen A., Vepsäläinen O., Suomalainen M., Kolmeder C., Varjosalo M., Miettinen S., Kukkonen K., Savilahti E., Kuitunen M., de Vos W.M. Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic-treated and in caesarean-born infants // *Microbiome* – 2018. – Vol. 6, No. 1. – P.182.
73. Johansson M.A., Sjögren Y.M., Persson J.O., Nilsson C., Sverremark-Ekström E. Early colonization with a group of Lactobacilli decreases the risk for allergy at five years of age despite allergic heredity // *Public Library of Science ONE* – 2011. – Vol. 6, No. 8. – P.e23031.
74. Björkander S., Carvalho-Queiroz C., Hallberg J., Persson J.O., Johansson M.A., Nussbaum B., Jenmalm M.C., Nilsson C., Sverremark-Ekström E. Childhood allergy is preceded by an absence of gut lactobacilli species and higher levels of atopy-related plasma chemokines // *Clinical and Experimental Immunology* – 2020. – Vol. 202, No. 3. – P.288–299.
75. Lundelin K., Poussa T., Salminen S., Isolauri E. Long-term safety and efficacy of perinatal probiotic intervention: Evidence from a follow-up study of four randomized, double-blind, placebo-controlled trials // *Pediatric Allergy and Immunology* – 2017. – Vol. 28, No. 2. – P.170–175.
76. Tan W., Zhou Z., Li W., Lu H., Qiu Z. *Lactobacillus rhamnosus* GG for Cow's Milk Allergy in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Frontiers in Pediatrics* – 2021. – Vol. 9. – P.727127.
77. Piirainen L., Haahtela S., Helin T., Korpela R., Haahtela T., Vaarala O. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on rBet v1 and rMal d1 specific IgA in the saliva of patients with birch pollen allergy // *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* – 2008. – Vol. 100, No. 4. – P.348–342.
78. Silva M., Jacobus N.V., Deneke C., Gorbach S.L. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 1987. – Vol. 31, No. 8. – P.1231–1233.
79. Marianelli C., Cifani N., Pasquali P. Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions // *Research in Microbiology* – 2010. – Vol. 161, No. 8. – P.673–680.
80. Sperandio V., Torres A.G., Jarvis B., Nataro J.P., Kaper J.B. Bacteria-host communication: The language of hormones // *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America – 2003. – Vol. 100, No. 15. – P.8951–8956.

81. Risøen P.A., Brurberg M.B., Eijsink V.G., Nes I.F. Functional analysis of promoters involved in quorum sensing-based regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus* // Molecular Microbiology – 2000. – Vol. 37, No. 3. – P.619–628.

82. Sturme M.H.J., Francke C., Siezen R.J., de Vos W.M., Kleerebezem M. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: A special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1 // Microbiology – 2007. – Vol. 153, No. 12. – P.3939–3947.

83. Moslehi-Jenabian S., Vogensen F.K., Jespersen L. The quorum sensing luxS gene is induced in *Lactobacillus acidophilus* NCFM in response to *Listeria monocytogenes* // International Journal of Food Microbiology – 2011. – Vol. 149, No. 3. – P.269–273.

84. De Keersmaecker S.C.J., Sonck K., Vanderleyden J. Let LuxS speak up in AI-2 signaling // Trends in Microbiology – 2006. – Vol. 14, No. 3. – P.114–119.

85. Lu R., Fasano S., Madayiputhiya N., Morin N.P., Nataro J., Fasano A. Isolation, identification, and characterization of small bioactive peptides from *Lactobacillus* GG conditional media that exert both anti-gram-negative and Gram-positive bactericidal activity // Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition – 2009. – Vol. 49, No. 1. – P.23–30.

86. De Keersmaecker S.C.J., Verhoeven T.L., Desair J., Marchal K., Vanderleyden J., Nagy I. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid // Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters – 2006. – Vol. 259, No. 1. – P.89–96.

87. Manome A., Okada S., Uchimura T., Komagata K. The ratio of L-form to D-form of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria // Journal of General and Applied Microbiology – 1998. – Vol. 44, No. 6. – P.371–374.

88. Hütt P., Shchepetova J., Lõivukene K., Kullisaar T., Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens // Journal of Applied Microbiology – 2006. – Vol. 100, No. 6. – P.1324–1332.

89. Zhang Y., Zhang L., Du M., Yi H., Guo C., Tuo Y., Han X., Li J., Zhang L., Yang L. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food // Microbiological Research – 2011. – Vol. 167, No. 1. – P.27–31.

90. Lee Y.K., Lim C.Y., Teng W.L., Ouwehand A.C., Tuomola E.M., Salminen S. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria // Applied and Environmental Microbiology – 2000. – Vol. 66, No. 9. – P.3692–3697.

91. Lee Y.K., Puong K.Y., Ouwehand A.C., Salminen S. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli // *Journal of Medical Microbiology* – 2003. – Vol. 52, No. 10. – P.925–930.
92. Larsen N., Nissen P., Willats W.G.T. The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus* ssp. and *E. coli* O138 // *International Journal of Food Microbiology* – 2007. – Vol. 114, No. 1. – P.113–119.
93. Johnson-Henry K.C., Donato K.A., Shen-Tu G., Gordanpour M., Sherman P.M. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function // *Infection and Immunity* – 2008. – Vol. 76, No. 4. – P.1340–1348.
94. Vélez M.P., Petrova M.I., Lebeer S., Verhoeven T.L., Claes I., Lambrichts I., Tynkkynen S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C. Characterization of MabA, a modulator of *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion and biofilm formation // *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology* – 2010. – Vol. 59, No. 3. – P.386–398.
95. Lopez M., Li N., Kataria J., Russell M., Neu J. Live and ultraviolet-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease flagellin-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells // *Journal of Nutrition* – 2008. – Vol. 138, No. 11. – P.2264–2268.
96. Fayol-Messaoudi D., Berger C.N., Coconnier-Polter M.H., Liévin-Le Moal V., Servin A.L. pH-, lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic lactobacilli against *Salmonella enterica* serovar typhimurium // *Applied and Environmental Microbiology* – 2005. – Vol. 71, No. 10. – P.6008–6013.
97. Makras L., Triantafyllou V., Fayol-Messaoudi D., Adrian T., Zoumpopoulou G., Tsakalidou E., Servin A., De Vuyst L. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds // *Research in Microbiology* – 2006. – Vol. 157, No. 3. – P.241–247.
98. Mack D.R., Michail S., Wei S., McDougall L., Hollingsworth M.A. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* – 1999. – Vol. 276, No. 4. – P.G941–950.
99. Coconnier M.H., Lievin V., Hemery E., Servin A.L. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB // *Applied and Environmental Microbiology* – 1998. – Vol. 64, No. 11. – P.4573–4580.
100. Avonts L., De Vuyst L. Antimicrobial potential of probiotic lactic acid bacteria. // Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen) – 2001. – Vol. 66, No. 3b. – P.543–550.
101. Rokka S., Myllykangas S., Joutsjoki V. Effect of specific colostral antibodies and selected lactobacilli on the adhesion of *Helicobacter pylori* on AGS

cells and the *Helicobacter*-induced IL-8 production // Scandinavian Journal of Immunology – 2008. – Vol. 68, No. 3. – P.280–286.

102. Luoto R., Lsolaui E., Lehtonen L. Safety of *lactobacillus* GG probiotic in infants with very low birth weight: Twelve years of experience // Clinical Infectious Diseases – 2010. – Vol. 50, No. 9. – P.1327–1328.

103. Manzoni P., Lista G., Gallo E., Marangione P., Priolo C., Fontana P., Guardione R., Farina D. Routine *Lactobacillus rhamnosus* GG administration in VLBW infants: A retrospective, 6-year cohort study // Early Human Development – 2011. – Vol. 87, No. 1. – P.S35–38.

104. Kalliomäki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial // Lancet – 2001. – Vol. 357, No. 9262. – P.1076–1079.

105. Kopp M.V., Hennemuth I., Heinzmann A., Urbanek R. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Probiotics for Primary Prevention: No Clinical Effects of *Lactobacillus* GG Supplementation // Pediatrics – 2008. – Vol. 121, No. 4. – P.e850–e856.

106. Salminen M.K., Tynkkynen S., Rautelin H., Poussa T., Saxelin M., Ristola M., Valtonen V., Järvinen A. The Efficacy and Safety of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG on Prolonged, Noninfectious Diarrhea in HIV Patients on Antiretroviral Therapy: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Study // HIV Clinical Trials – 2004. – Vol. 5, No. 4. – P.183–191.

107. Morrow L.E., Kollef M.H., Casale T.B. Probiotic prophylaxis of ventilator-associated pneumonia: A blinded, randomized, controlled trial // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine – 2010. – Vol. 182, No. 8. – P.1058–1064.

108. Asgari S., Pourjavadi A., Licht T.R., Boisen A., Ajalloueian F. Polymeric carriers for enhanced delivery of probiotics // Advanced Drug Delivery Reviews – 2020. – Vol. 161–162. – P.1–21.

109. Morya S., Aeron G. Immobilization and microencapsulation // Journal of Advanced Research in Biotechnology – 2017. – Vol. 2, No. 3. – P.1–4.

110. Akin C. Biocatalysis with immobilized cells // Biotechnology and Genetic Engineering Reviews – 1987. – Vol. 5, No. 1. – P.319–367.

111. Dervakos G.A., Webb C. On the merits of viable-cell immobilisation // Biotechnology Advances – 1991. – Vol. 9, No. 4. – P.559–612.

112. Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications // Journal of Food Engineering – 2011. – Vol. 104, No. 4. – P.467–483.

113. Ge X., Yang L., Xu J. Cell Immobilization: Fundamentals, Technologies, and Applications // Industrial Biotechnology Wiley – 2017. – P.205–235.

114. Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I., Marchant R., Koutinas A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review // Food Microbiology – 2004. – Vol. 21, No. 4. – P.377–397.

115. Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hébraud M., Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria // *Journal of Microbiological Methods* – 2007. – Vol. 68, No. 3. – P.605–612.
116. Doleyres Y., Lacroix C. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection // *International Dairy Journal* – 2005. – Vol. 15, No. 10. – P.973–988.
117. Viktor Nedović R.W. Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology // Springer Dordrecht – 2004. – Vol. 8A, No. 5. – P.561.
118. Norton S., D'Amore T. Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing // *Enzyme and Microbial Technology* – 1994. – Vol. 16, No. 5. – P.703–714.
119. Park J.K., Chang H.N. Microencapsulation of microbial cells // *Biotechnology Advances* – 2000. – Vol. 18, No. 4. – P.303–319.
120. Rathore S., Desai P., Liew C., Chan L., Heng P. Microencapsulation of microbial cells // *Journal of Food Engineering* – 2013. – Vol. 116, No. 2. – P.369–381.
121. Wijffels R.H. Characterization of Immobilized Cells; Introduction / Immobilized Cells – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001. – P.1–5.
122. O'Riordan K., Andrews D., Buckle K., Conway P. Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage // *Journal of Applied Microbiology* – 2001. – Vol. 91, No. 6. – P.1059–1066.
123. Ashwar B.A., Gani A., Shah A., Masoodi F.A. Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics // *Food Chemistry* – 2018. – Vol. 239. – P.287–294.
124. Ji R., Wu J., Zhang J., Wang T., Zhang X., Shao L., Chen D., Wang J. Extending viability of *bifidobacterium longumin* chitosan-coated alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology // *Frontiers in Microbiology* – 2019. – Vol. 10. – P.1389.
125. Lian W.C., Hsiao H.C., Chou C.C. Survival of bifidobacteria after spray-drying // *International Journal of Food Microbiology* – 2002. – Vol. 74, No. 1–2. – P.79–86.
126. Annan N.T., Borza A.D., Hansen L.T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions // *Food Research International* – 2008. – Vol. 41, No. 2. – P.184–193.
127. Gryta M. The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system // *Desalination* – 2002. – Vol. 142, No. 1. – P.79–88.
128. Lebeau T., Jouenne T., Junter G.A. Diffusion of sugars and alcohols through composite membrane structures immobilizing viable yeast cells // *Enzyme and Microbial Technology* – 1998. – Vol. 22, No. 6. – P.434–438.

129. Laponi M.J., Méndez M., Trelles J., Rivero C. Cell immobilization strategies for biotransformations // *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* – 2022. – Vol. 33. – P.100565.
130. Gombotz W.R., Wee S.F. Protein release from alginate matrices // *Advanced Drug Delivery Reviews* – 2012. – Vol. 64. – P.194–205.
131. Aulton M. Aulton's *Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines* // *Pharmaceutics The Design and Manufacture of Medicines* – 2018. – P.908.
132. Evans D.F., Pye G., Bramley R., Clark A.G., Dyson T.J., Hardcastle J.D. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects // *Gut* – 1988. – Vol. 29, No. 8. – P.1035–1041.
133. McConnell E.L., Fadda H.M., Basit A.W. Gut instincts: Explorations in intestinal physiology and drug delivery // *International Journal of Pharmaceutics* – 2008. – Vol. 364, No. 2. – P.213–226.
134. Davis S.S., Hardy J.G., Fara J.W. Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine // *Gut* – 1986. – Vol. 27, No. 8. – P.886–892.
135. Coupe A.J., Davis S.S., Wilding I.R. Variation in Gastrointestinal Transit of Pharmaceutical Dosage Forms in Healthy Subjects // *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* – 1991. – Vol. 8, No. 3. – P.360–364.
136. Press A.G., Hauptmann I.A., Hauptmann L., Fuchs B., Fuchs M., Ewe K., Ramadori G. Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* – 1998. – Vol. 12, No. 7. – P.673–678.
137. Sathyan G., Hwang S., Gupta S.K. Effect of dosing time on the total intestinal transit time of non-disintegrating systems // *International Journal of Pharmaceutics* – 2000. – Vol. 204, No. 1–2. – P.47–51.
138. Sogias I.A., Williams A.C., Khutoryanskiy V. V. Why is chitosan mucoadhesive? // *Biomacromolecules* – 2008. – Vol. 9, No. 7. – P.1837–1842.
139. Khutoryanskiy V.V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers // *Macromolecular Bioscience* – 2011. – Vol. 11, No. 6. – P.748–764.
140. Феклисова Л.В., Мескина Е.Р. Новое поколение сорбированных бифидосодержащих пробиотиков в педиатрической практике // *Альманах клин. мед.* – 2005. – № 8. – С.329–338.
141. Воробьев А.А., Бондаренко В.М., Лыкова Е.А., Григорьев А.В., Мацулевич Т.М. Микроэкологические нарушения при клинической патологии и их коррекция бифидосодержащими пробиотиками // *Вестник РАМН* – 2004. – № 2. – С.13–17.
142. Cheng K.-C., Demirci A., Catchmark J.M. Effects of plastic composite support and pH profiles on pullulan production in a biofilm reactor // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2010. – Vol. 86, No. 3. – P.853–861.
143. Huebner J., Wehling R.L., Hutkins R.W. Functional activity of commercial prebiotics // *International Dairy Journal* – 2007. – Vol. 17, No. 7. – P.770–775.

144. Balla A., Silini A., Cherif-Silini H., Bouket A.C., Boudechicha A., Luptakova L., Alenezi F.N., Belbahri L. Screening of Cellulolytic Bacteria from Various Ecosystems and Their Cellulases Production under Multi-Stress Conditions // *Catalysts* – 2022. – Vol. 12, No. 7. – P.769.
145. Islam F., Roy N. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses // *BMC Research Notes* – 2018. – Vol. 11, No. 1. – P.445.
146. Государственный стандарт РК. Надлежащая лабораторная практика. СТ РК 2829-2016. Содержание и использование лабораторных животных в GLP-исследованиях от 18 Ноября, 2016, № 290.
147. Ardita C.S., Mercante J.W., Kwon Y.M., Luo L., Crawford M.E., Powell D.N., Jones R.M., Neish A.S. Epithelial Adhesion Mediated by Pilin SpaC Is Required for *Lactobacillus rhamnosus* GG-Induced Cellular Responses // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – Vol. 80. – P.5068– 5077.
148. Gibson G.R., Karen R.R., Tuohy K.H., Arland D., Alix G., Mélanie M., Eileen S., Delphine L., Gunnar M., Sandra D. et al. Dietary prebiotics: current status and new definition // *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods* – 2010. – Vol. 7, No. 1. – P.1–19.
149. Causse B., Spadini L., Martins J., Lenoir T., Heyraud A., Delolme C. Xanthan exopolysaccharide: Acid–base reactivity related to structure and conformation. A model for understanding the reactivity of degraded and colloidal soil organic matter // *Chemical Geology* – 2013. – Vol. 359. – P.150–158.
150. Singh R., Gaur R., Tiwari S., Gaur M.K. Production of pullulan by a thermotolerant *aureobasidium pullulans* strain in non-stirred fed batch fermentation process. // *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* – 2012. – Vol. 43, No. 3. – P.1042–1050.
151. Karlton-Senaye B.D., Ibrahim S.A. Impact of Gums on the Growth of Probiotic Microorganisms // *Proceedings of the 2013 National Conference on Advances in Environmental Science and Technology* – Cham: Springer International Publishing, 2016. – P.165–170.
152. Corcoran B.M., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross R.P. Survival of Probiotic *Lactobacilli* in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars // *Applied and Environmental Microbiology* – 2005. – Vol. 71, No. 6. – P.3060–3067.
153. Naganuma T., Iinuma Y., Nishiwaki H., Murase R., Masaki K., Nakai R. Enhanced Bacterial Growth and Gene Expression of D-Amino Acid Dehydrogenase With D-Glutamate as the Sole Carbon Source // *Frontiers in Microbiology* – 2018. – Vol. 9. – P.2097.
154. Xu J., Wang R., Zhang H., Wu J., Zhu L., Zhan X. In vitro assessment of prebiotic properties of oligosaccharides derived from four microbial polysaccharides // *LWT* – 2021. – Vol. 147. – P.111544.
155. Faria S., Petkowicz C., Morais S., Terrones M., Resende M., Franc, F., Cardoso V. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth // *Carbohydrate Polymers* – 2011. – Vol. 86, No. 2. – P.469–476.

156. Silva S.S., Fernandes E., Pina S., Silva-Correia J., Vieira S., Oliveira J., Reis R. 2.11 Polymers of Biological Origin // *Comprehensive Biomaterials*. Elsevier, 2017. – P.228–252.
157. Gietl E., Mengerink W., Slegte J., Gibson G., Rastall R., Heuvel E. Factors Involved in the *In Vitro* Fermentability of Short Carbohydrates in Static Faecal Batch Cultures // *International Journal of Carbohydrate Chemistry* – 2012. – Vol. 2012. – P.1–10.
158. Nelios G., Santarmaki V., Pavlatou C., Dimitrellou D., Kourkoutas Y. New Wild-Type *Lactocaseibacillus rhamnosus* Strains as Candidates to Manage Type 1 Diabetes // *Microorganisms* – 2022. – Vol. 10, No. 2. – P.272.
159. Smith K.A., Salyers A.A. Characterization of a neopullulanase and an alpha-glucosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* 95-1 // *Journal of Bacteriology* – 1991. – Vol. 173, No. 9. – P.2962–2968.
160. Stewart M.L., Timm D.A., Slavin J.L. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an *in vitro* fermentation system // *Nutrition Research* – 2008. – Vol. 28, No. 5. – P.329–334.
161. Chlebowska-Śmigiel A., Kycia K., Neffe-Skocińska K., Kieliszek M., Gniewosz M., Kołożyn-Krajewska D. Effect of Pullulan on Physicochemical, Microbiological, and Sensory Quality of Yogurts // *Current Pharmaceutical Biotechnology* – 2019. – Vol. 20, No. 6. – P.489–496.
162. Chlebowska-Smigiel A., Gniewosz M., Kieliszek M., Bzducha-Wrobel A. The Effect of Pullulan on the Growth and Acidifying Activity of Selected Stool Microflora of Human // *Current Pharmaceutical Biotechnology* – 2017. – Vol. 18, No. 2. – P.121–126.
163. Kycia K., Chlebowska-Śmigiel A., Szydłowska A., Sokół E., Ziarno M., Gniewosz M. Pullulan as a potential enhancer of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* viability in synbiotic low fat yoghurt and its sensory quality // *LWT* – 2020. – Vol. 128. – P.109414.
164. Leathers T.D. Biotechnological production and applications of pullulan // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2003. – Vol. 62, No. 5–6. – P.468–473.
165. Treesuppharat W., Rojanapanthu P., Siangsano C., Manuspiya H., Ummartyotin S. Synthesis and characterization of bacterial cellulose and gelatin-based hydrogel composites for drug-delivery systems // *Biotechnology Reports* – 2017. – Vol. 15. – P.84–91.
166. Olsson R.T., Azizi Samir M.A., Salazar-Alvarez G., Belova L., Ström V., Berglund L.A., Ikkala O., Nogués J., Gedde U.W. Making flexible magnetic aerogels and stiff magnetic nanopaper using cellulose nanofibrils as templates // *Nature Nanotechnology* – 2010. – Vol. 5, No. 8. – P.584–588.
167. Meng N., Zhou N., Zhang S., Shen J. Synthesis and antimicrobial activities of polymer/montmorillonite–chlorhexidine acetate nanocomposite films // *Applied Clay Science* – 2009. – Vol. 42, No. 3–4. – P.667–670.

168. Saska S., Barud H.S., Gaspar A.M., Marchetto R., Ribeiro S.J., Messaddeq Y. Bacterial Cellulose-Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone Regeneration // International Journal of Biomaterials – 2011. – Vol. 2011. – P.1–8.
169. Shah N., Ul-Islam M., Khattak W.A., Park J.K. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material // Carbohydrate Polymers – 2013. – Vol. 98, No. 2. – P.1585–1598.
170. Prudnikova S. V., Shidlovsky I.P. The New Strain of Acetic Acid Bacteria *Komagataeibacter xylinus* B-12068 – Producer of Bacterial Cellulose for Biomedical Applications // Journal of Siberian Federal University. Biology – 2017. – Vol. 10, No. 2. – P.246–254.
171. Esa F., Tasirin S.M., Rahman N.A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application // Agriculture and Agricultural Science Procedia – 2014. – Vol. 2. – P. 113–119.
172. Bodin A. et al. Bacterial Cellulose as Biomaterial / Comprehensive Biomaterials – Elsevier, 2011. – P.405–410.
173. Vassilyeva N.V., Savitskaya I., Zhantlessova S., Mansurov Z., Smagulova G. Morphological and Physicochemical Properties of Nanostructured Cellulose Obtained through Chemical and Biological Methods // Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – 2022. – No. 58. – P.55–70.
174. Chi K., Catchmark J.M. The influences of added polysaccharides on the properties of bacterial crystalline nanocellulose // Nanoscale – 2017. – Vol. 9, No. 39. – P.15144–15158.
175. Xiao Q., Tong Q., Zhou Y., Deng F. Rheological properties of pullulan-sodium alginate based solutions during film formation // Carbohydrate Polymers – 2015. – Vol. 130. – P.49–56.
176. Tiwari S., Patil R., Dubey S.K., Bahadur P. Derivatization approaches and applications of pullulan // Advances in Colloid and Interface Science – 2019. – Vol. 269. – P.296–308.
177. Trovatti E., Susana C., Laurent F., Carmen S., Armando N. Sustainable nanocomposite films based on bacterial cellulose and pullulan // Cellulose – 2012. – Vol. 19, No. 3. – P.729–737.
178. Cheng K.-C., Catchmark J.M., Demirci A. Effects of CMC Addition on Bacterial Cellulose Production in a Biofilm Reactor and Its Paper Sheets Analysis // Biomacromolecules – 2011. – Vol. 12, No. 3. – P.730–736.
179. Weng Y., Nagle B., Mueller K., Catchmark J. The formation of *Gluconacetobacter xylinum* cellulose under the influence of the dye brilliant yellow // Cellulose – 2019. – Vol. 26, No. 18. – P.9373–9386.
180. Cheng K.-C., Catchmark J.M., Demirci A. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis // Journal of Biological Engineering – 2009. – Vol. 3, No. 1. – P.12.
181. Liu K., Catchmark J.M. Bacterial cellulose/hyaluronic acid nanocomposites production through co-culturing *Gluconacetobacter hansenii* and *Lactococcus lactis* under different initial pH values of fermentation media // Cellulose – 2020. – Vol. 27, No. 5. – P.2529–2540.

182. Ding R., Hu S., Xu M., Hu Q., Jiang S., Xu K., Tremblay P.L., Zhang T. The facile and controllable synthesis of a bacterial cellulose/polyhydroxybutyrate composite by co-culturing *Gluconacetobacter xylinus* and *Ralstonia eutropha* // Carbohydrate Polymers – 2021. – Vol. 252. – P.117137.
183. Gao G., Fan H., Zhang Y., Cao Y., Li T., Qiao W., Wu M., Ma T., Li G. Production of nisin-containing bacterial cellulose nanomaterials with antimicrobial properties through co-culturing *Enterobacter* sp. FY-07 and *Lactococcus lactis* N8 // Carbohydrate Polymers – 2021. – Vol. 251. – P.117131.
184. Громовых Т.И., Гаврюшина И.А., Садыкова В.А., Фельдман Н.Б., Дмитренко А.С., Айрапетова А.Ю., Луценко С.В. Получение иммобилизованного мицелия базидиомицета *Fomitopsis Officinalis* (vill.:fr.) Bond. Et sing. продуцента агарациновой кислоты // Антибиотики и Химиотерапия – 2018. – Т. 63, № 9–10. – С.3–9.
185. Shokatayeva D., Ignatova L., Savitskaya I., Kistaubaeva A., Talipova A., Asylbekova A., Mashzhan A. Bacterial Cellulose and Pullulan from Simple and Low Cost Production Media // Eurasian Chemico-Technological Journal – 2019. – Vol. 21, No. 3. – P.247.
186. Zhantlessova S.D., Khamitkyzy Zh., Talipova A., Savitskaya I., Kistaubaeyva A. Selection and optimization of cultivation conditions for bacterial cellulose producer // International Journal of Biology and Chemistry – 2022. – Vol. 15, No. 1. – P.55–63.
187. Zhantlessova S., Savitskaya I., Kistaubayeva A., Ignatova L., Talipova A., Pogrebnyak A., Digel I. Advanced “Green” Prebiotic Composite of Bacterial Cellulose/Pullulan Based on Synthetic Biology-Powered Microbial Coculture Strategy // Polymers – 2022. – Vol. 14, No 15. – P.3224.
188. Fang L., Catchmark J.M. Characterization of water-soluble exopolysaccharides from *Gluconacetobacter xylinus* and their impacts on bacterial cellulose crystallization and ribbon assembly // Cellulose – 2014. – Vol. 21, No. 6. – P.3965–3978.
189. Gao G., Cao Y., Zhang Y., Wu M., Ma T., Li G. In situ production of bacterial cellulose/xanthan gum nanocomposites with enhanced productivity and properties using *Enterobacter* sp. FY-07 // Carbohydrate Polymers – 2020. – Vol. 248. – P.116788.
190. Senthamilselvi S., Kumar P., Lakshmi P., Govindaraju M. Green Simplistic Biosynthesis of Anti-Bacterial Silver Nanoparticles Using *Annona Squamosa* Leaf Extract // Nano Biomedicine and Engineering – 2013. – Vol. 5, No. 2. – P.102–106.
191. Chandu B., Mosali V., Mullamuri B., Bollikolla H.A facile green reduction of graphene oxide using *Annona squamosa* leaf extract // Carbon letters – 2017. – Vol. 21. P.74–80.
192. Zahoor M., Shafiq S., Ullah H., Sadiq A., Ullah F. Isolation of quercetin and mandelic acid from *Aesculus indica* fruit and their biological activities // BMC Biochemistry – 2018. – Vol. 19, No. 1. – P.5.

193. Kunjiappan S., Chowdhury R., Bhattacharjee C. Isolation and structural elucidation of flavonoids from aquatic fern *Azolla microphylla* and evaluation of free radical scavenging activity // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences – 2013. – Vol. 5. – P.743–749.
194. Fatima A., Yasir S., Khan M., Manan S., Ullah M., Ul-Islam M. Plant extract-loaded bacterial cellulose composite membrane for potential biomedical applications // Journal of Bioresources and Bioproducts – 2021. – Vol. 6, No. 1. – P.26–32.
195. Zhao W., Sugunan A., Gillgren T. et al. Surfactant-free starch-graphene composite films as simultaneous oxygen and water vapour barriers // npj 2D Materials and Applications – 2022. – Vol. 6, No. 1. – P.20.
196. Hu H., Catchmark J.M., Demirci A. Co-culture fermentation on the production of bacterial cellulose nanocomposite produced by *Komagataeibacter hansenii* // Carbohydrate Polymer Technologies and Applications – 2021. – Vol. 2. – P.100028.
197. Terraf M.C., Juárez Tomás M.S., Nader-Macías M.E., Silva C. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components // Journal of Applied Microbiology – 2012. – Vol. 113, No. 6. – P.1517–1529.
198. Tuomola (née Lehto) E.M., Salminen S.J. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures // International Journal of Food Microbiology – 1998. – Vol. 41, No. 1. – P.45–51.
199. Li Z., Behrens A.M., Ginat N., Tzeng S.Y., Lu X., Sivan S., Langer R., Jaklenec A. Biofilm-Inspired Encapsulation of Probiotics for the Treatment of Complex Infections // Advanced Materials – 2018. – Vol. 30, No. 51. – P.e1803925.
200. Rendueles O., Kaplan J.B., Ghigo J. Antibiofilm polysaccharides // Environmental Microbiology – 2013. – Vol. 15, No. 2. – P.334–346.
201. Speranza B., Corbo M.R., Sinigaglia M. Effects of Nutritional and Environmental Conditions on *Salmonella* sp. Biofilm Formation // Journal of Food Science – 2011. – Vol. 76, No. 1. – P.12–16.
202. Imbert M., Blondeau R. On the Iron Requirement of *Lactobacilli* Grown in Chemically Defined Medium // Current Microbiology – 1998. – Vol. 37, No. 1. – P.64–66.
203. Dertli E. Biochemistry and Functional Analysis of Exopolysaccharide Production in *Lactobacillus Johnsonii*: Phd thesis – School 761 of Biological Sciences, 2013. – P.263.
204. Slížová M., Nemcová R., Mad'ar M., Hadryová J., Gancarčíková S., Popper M., Pistl J. Analysis of biofilm formation by intestinal lactobacilli // Canadian Journal of Microbiology – 2015. – Vol. 61, No. 6. – P.437–446.
205. Ambalam P., Kondepudi K.K., Nilsson I., Wadström T., Ljungh Å. Bile stimulates cell surface hydrophobicity, Congo red binding and biofilm formation of *Lactobacillus* strains // Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters – 2012. – Vol. 333, No. 1. – P.10–19.

206. Suzana M., Claudia M., Larissa F., Sandra S. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater // *African Journal of Biotechnology* – 2013. – Vol. 12, No. 28. – P.4412–4418.
207. Morikawa M. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species // *Journal of Bioscience and Bioengineering* – 2006. – Vol. 101, No. 1. – P.1–8.
208. Pahlevan M., Toivakka M., Alam P. Mechanical properties of TEMPO-oxidised bacterial cellulose-amino acid biomaterials // *European Polymer Journal* – 2018. – Vol. 101. – P.29–36.
209. Kistaubayeva A., Abdulzhanova M., Zhantlessova S., Savitskaya I., Karpenyuk T., Goncharova A., Sinyavskiy Y. The Effect of Encapsulating a Prebiotic-Based Biopolymer Delivery System for Enhanced Probiotic Survival // *Polymers* – 2023. – Vol. 15, No. 7. – P.1752.
210. Nguyen D.N., Ton N.M.N., Le V.V.M. Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in bacterial cellulose by “adsorption-incubation” method // *Int Food Res J* – 2009. – Vol. 16. – P.59–64.
211. Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F., Gibbs P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria // *International Dairy Journal* – 2004. – Vol. 14, No. 10. – P.835–847.
212. Giulio B., Orlando P., Barba G., Coppola R., De Rosa M., Sada A., De Prisco P., Nazzaro F. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying // *World Journal of Microbiology and Biotechnology* – 2005. – Vol. 21, No. 5. – P.739–746.
213. Jagannath A., Raju P.S., Bawa A.S. Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria // *LWT - Food Science and Technology* – 2010. – Vol. 43, No. 8. – P.1197–1203.
214. Jingjing E., Rongze M., Zichao C., Caiqing Y., Ruixue W., Qiaoling Z., Zongbai H., Ruiyin S., Junguo W. Improving the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 by increasing biofilm formation based on adjusting the composition of buffer salts in medium // *Food Chemistry* – 2021. – Vol. 338. – P.128134.
215. Li R., Zhang Y., Polk D.B., Tomasula P.M., Yan F., Liu L. Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro and in vivo by a new encapsulation system // *Journal of Controlled Release* – 2016. – Vol. 230. – P.79–87.
216. Shah N.P., Ravula R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts // *Australian Journal of Dairy Technology* – Dairy Industry Association of Australia, 2000. – Vol. 55, No. 3. – P.139.
217. Shu G., Wang Z., Chen L., Wan H., Chen H. Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet:

Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature // LWT – 2018. – Vol. 90. – P.70–76.

218. Schwab C., Vogel R., Gänzle M.G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying // Cryobiology – 2007. – Vol. 55, No. 2. – P.108–114.

219. Han S., Lu Y., Xie J., Fei Y., Zheng G., Wang Z., Liu J., Lv L., Ling Z., Berglund B., Yao M., Li L. Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology – 2021. – Vol. 11. – P.609722.

220. Bokkhim H., Bansal N., Grøndahl L., Bhandari B. In-vitro digestion of different forms of bovine lactoferrin encapsulated in alginate micro-gel particles // Food Hydrocolloids – 2016. – Vol. 52. – P.231–242.

221. Sbehat M., Altamimi M., Sabbah M., Mauriello G. Layer-by-Layer Coating of Single-Cell *Lactobacillus rhamnosus* to Increase Viability Under Simulated Gastrointestinal Conditions and Use in Film Formation // Frontiers in Microbiology – 2022. – Vol. 13. – P.838416.

222. Çabuk B., Tellioğlu Harsa Ş. Protection of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 under in vitro gastrointestinal conditions with whey protein/pullulan microcapsules // Journal of Bioscience and Bioengineering – 2015. – Vol. 120, No. 6. – P.650–656.

223. Liu Z., Wenqin G., Hao D., Lin G. The Protective Effect of Microcapsules (Pullulan / Sucrose / Whey Protein) on Vitality of *Lactobacillus bulgaricus* QY-2 // Journal of Physics: Conference Series – 2021. – Vol. 18. 93, No. 1. – P.012007.

224. Ajalloueian F., Guerra P., Bahl M., Torp A., Hwu E., Licht T., Boisen A. Multi-layer PLGA-pullulan-PLGA electrospun nanofibers for probiotic delivery // Food Hydrocolloids – 2022. – Vol. 123. – P.107112.

225. Xiao K. Bile Resistance in *Lactobacillus Rhamnosus* GG: Stability and Mechanisms: Master's Thesis. University of Helsinki – MBIOT 793 Biotechnology, 2015. – P.71.

226. Ding W.K., Shah N.P. Acid, Bile, and Heat Tolerance of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria // Journal of Food Science – 2007. – Vol. 72, No. 9. – P.446–450.

227. Panicker A. Evaluation of Bile Tolerance in Dairy and Human Origin *Lactobacillus Fermentum* Strains // Indian Journal of Dairy Science – 2014. – Vol. 67. – P.421–425.

228. Kristoffersen S.M., Ravnum S., Tourasse N.J., Økstad O.A., Kolstø A.B., Davies W. Low Concentrations of Bile Salts Induce Stress Responses and Reduce Motility in *Bacillus cereus* ATCC 14579 // Journal of Bacteriology – 2007. – Vol. 189, No. 18. – P.6741–6741.

229. Fijałkowski K., Peitler D., Rakoczy R., Żywicka A. Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution // LWT - Food Science and Technology – 2016. – Vol. 68. – P.322–328.

230. Cheow W.S., Kiew T.Y., Hadinoto K. Effects of adding resistant and waxy starches on cell density and survival of encapsulated biofilm of *Lactobacillus rhamnosus* GG probiotics // LWT - Food Science and Technology – 2016. – Vol. 69. – P.497–505.
231. Doleyres Y., Lacroix C. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection // International Dairy Journal – 2005. – Vol. 15, No. 10. – P.973–988.
232. Salas-Jara M., Ilabaca A., Vega M., García A. Biofilm Forming *Lactobacillus*: New Challenges for the Development of Probiotics // Microorganisms – 2016. – Vol. 4, No. 3. – P.35.
233. Sin Jin H., Siew Fei Y., Kar Yan C., Hor Kuan C., Yoke Wei S. Effect of gums coating materials on the survival of microencapsulated probiotics under simulated gastrointestinal conditions // Materials Today: Proceedings – 2020. – Vol. 29. – P.16–19.
234. Xu M., Gagné-Bourque F., Dumont M., Jabaji S. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions // Journal of Food Engineering – 2016. – Vol. 168. – P.52–59.
235. Lacy B.E., Spiegel B. Introduction to the Gut Microbiome Special Issue // American Journal of Gastroenterology – 2019. – Vol. 114, No. 7. – P.1013–1013.
236. Purohit H.J. Gut-Bioreactor and Human Health in Future // Indian Journal of Microbiology – 2018. – Vol. 58, No. 1. – P.3–7.
237. Maathuis A.J., van den Heuvel E.G., Schoterman M.H., Venema K. Galacto-Oligosaccharides Have Prebiotic Activity in a Dynamic In Vitro Colon Model Using a ¹³C-Labeling Technique // The Journal of Nutrition – 2012. – Vol. 142, No. 7. – P.1205–1212.
238. Di T., Chen G., Sun Y., Ou S., Zeng X., Ye H. In vitro digestion by saliva, simulated gastric and small intestinal juices and fermentation by human fecal microbiota of sulfated polysaccharides from *Gracilaria rubra* // Journal of Functional Foods – 2018. – Vol. 40. – P.18–27.
239. Ser H.L., Letchumanan V., Goh B.H., Wong S.H., Lee L.H. Use of Fecal Microbiome Transplant in Treating Human Diseases: Too Early for Poop? // Frontiers in Microbiology – 2021. – Vol. 12. – P.519836.
240. Zhou S., Cui Y., Zhang Y., Zhao T., Cong J. Fecal microbiota transplantation for induction of remission in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis // International Journal of Colorectal Disease – 2023. – Vol. 38, No. 1. – P.62.
241. Savitskaya I., Zhantlessova S., Kistaubayeva A., Ignatova L., Shokatayeva D., Sinyavskiy Y., Kushugulova A., Digel I. Prebiotic Cellulose–Pullulan Matrix as a “Vehicle” for Probiotic Biofilm Delivery to the Host Large Intestine // Polymers – 2024. – Vol.16, No. 1. – P.30.

242. Tanimura A., Liu W., Yamada K., Kishida T., Toyohara H. Animal cellulases with a focus on aquatic invertebrates // Fisheries Science – 2013. – Vol. 79, No. 1. – P.1–13.
243. Piancone E., Fosso B., Marzano M., De Robertis M., Notario E., Oranger A., Manzari C., Bruno S., Visci G., Defazio G. et al. Natural and after colon washing fecal samples: the two sides of the coin for investigating the human gut microbiome // Scientific Reports – 2022. – Vol. 12, No. 1. – P.17909.
244. Froidurot A., Julliard V. Cellulolytic bacteria in the large intestine of mammals // Gut Microbes – 2022. – Vol. 14, No. 1. – P.2031694.
245. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora // Science – 2005. – Vol. 308, No. 5728. – P.1635–1638.
246. Chassard C., Scott K.P., Marquet P., Martin J.C., Del'homme C., Dapoigny M., Flint H.J., Bernalier-Donadille A. Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using combined molecular and cultural approaches // Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology – 2008. – Vol. 66, No. 3. – P.496–504.
247. Han S., Lu Y., Xie J., Fei Y., Zheng G., Wang Z., Liu J., Lv L., Ling Z., Berglund B., Yao M., Li L. Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey // Frontiers in cellular and infection microbiology – 2021. – Vol. 11. – P.609722.
248. Capurso L. Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG // Journal of Clinical Gastroenterology – 2019. – Vol. 53, No. 1. – P.S1–S41.
249. Doron S., Snyderman D.R., Gorbach S.L. *Lactobacillus* GG: Bacteriology and Clinical Applications // Gastroenterology Clinics of North America – 2005. – Vol. 34, No. 3. – P.483–498.
250. Jiang S., Zhang C., Han Z., Ma W., Wang S., Huo D., Cui W., Zhai Q., Huang S., Zhang J. Native microbiome dominates over host factors in shaping the probiotic genetic evolution in the gut // npj Biofilms and Microbiomes – 2023. – Vol. 9, No. 1. – P.80.
251. Antonio M.A.D., Hillier S.L. DNA Fingerprinting of *Lactobacillus crispatus* Strain CTV-05 by Repetitive Element Sequence-Based PCR Analysis in a Pilot Study of Vaginal Colonization // Journal of Clinical Microbiology – 2003. – Vol. 41, No. 5. – P.1881–1887.
252. Pasulka A.L., Howes A.L., Kallet J.G., VanderKelen J., Villars C. Visualization of probiotics via epifluorescence microscopy and fluorescence in situ hybridization (FISH) // Journal of Microbiological Methods – 2021. – Vol. 182. – P.106151.
253. Hussain N., Li R., Takala T.M., Tariq M., Zaidi A.H., Saris P.E.J. Generation of Lactose- and Protease-Positive Probiotic *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG by Conjugation with *Lactococcus lactis* NCDO 712 // Applied and Environmental Microbiology – 2021. – Vol. 87, No. 6. – P.e02957-20.

254. Qian L., Huang J., Qin H. Probiotics and dietary intervention modulate the colonic mucosa-associated microbiota in high-fat diet populations // The Turkish Journal of Gastroenterology – 2020. – Vol. 31, No. 4. – P.295–304.
255. Kumar R., Sood U., Gupta V., Singh M., Scaria J., Lal R. Recent Advancements in the Development of Modern Probiotics for Restoring Human Gut Microbiome Dysbiosis. // Indian journal of microbiology – 2020. – Vol. 60, No. 1. – P.12–25.
256. Johnson C.H., Ivanisevic J., Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms // Nature Reviews Molecular Cell Biology – 2016. – Vol. 17, No. 7. – P.451–459.
257. Ng S.C., Lam E.F., Lam T.T., Chan Y., Law W., Tse P.C., Kamm M.A., Sung J.J., Chan F.K., Wu J.C. Effect of probiotic bacteria on the intestinal microbiota in irritable bowel syndrome // Journal of Gastroenterology and Hepatology – 2013. – Vol. 28, No. 10. – P.1624–1631.
258. Zhang D., Liu H., Wang S., Zhang W., Wang J., Tian H., Wang Y., Ji H. Fecal Microbiota and Its Correlation With Fatty Acids and Free Amino Acids Metabolism in Piglets After a *Lactobacillus* Strain Oral Administration // Frontiers in Microbiology – 2019. – Vol. 10. – P.785.
259. Linsalata M., Cavallini A., Messa C., Orlando A., Refolo M.G., Russo F. *Lactobacillus rhamnosus* GG Influences Polyamine Metabolism in HGC-27 Gastric Cancer Cell Line: A Strategy Toward Nutritional Approach to Chemoprevention of Gastric Cancer // Current Pharmaceutical Design – 2010. – Vol. 16, No. 7. – P.847–853.
260. Hove P., Nealon N., Chan S., Boyer S., Haberecht H., Ryan E. Metabolomics and proteomics of *L. rhamnosus* GG and *E. coli* Nissle probiotic supernatants identify distinct pathways that mediate growth suppression of antimicrobial-resistant pathogens // BioRxiv – 2020.

Приложение А



ЕВРАЗИЙСКИЙ ЭКОНОМИЧЕСКИЙ СОЮЗ
Комитет санитарно-эпидемиологического контроля
Министерства здравоохранения Республики Казахстан

EAC **СВИДЕТЕЛЬСТВО**
о государственной регистрации продукции

KZ.16.01.98.003.R.000453.07.23 от 19 июля 2023 года

Продукция: Биологически активная добавка к пище «Лактоцелл». Изготовлена в соответствии с документами: СТ НАО 990140001154-001-2022. (Далее согласно приложению)

Изготовитель (Производитель): НАО "Казахский национальный университет имени Аль-Фараби", 050040, г. Алматы, пр. аль-Фараби, 71, Республика Казахстан

Заявитель: НАО "Казахский национальный университет имени Аль-Фараби", 050040, г. Алматы, пр. аль-Фараби, 71, Республика Казахстан

Соответствует: ТР ТС 021/2011 утв. Реш. КТС от 09.12.2011 № 880, ТР ТС 022/2011 утв. Реш. КТС от 09.12.2011 № 881, ТР ТС 029/2012 утв. Реш. СЕЭК от 20.07.2012 № 58.

Свидетельство выдано на основании: Протокол испытаний ИЛ ТОО "НУТРИТЕСТ" № 597Р от 28.12.2022 года, экспертное заключение Экспертного совета по регистрации БАД к пище, детского питания, пищевых добавок и др. продуктов № 10/ЭК-053-22 от 21.01.2023 года.

Срок действия: Не ограничен

Председатель
Н. Садвакасов



№ 0002026



Сканировано с CamScanner



ЕВРАЗИЙСКИЙ ЭКОНОМИЧЕСКИЙ СОЮЗ

Комитет санитарно-эпидемиологического контроля
Министерства здравоохранения Республики Казахстан

ПРИЛОЖЕНИЕ К СВИДЕТЕЛЬСТВУ
о государственной регистрации продукции

19 июля

2023 года

KZ.16.01.98.003.R.000453.07.23

Область применения (продолжение, начало на бланке свидетельства):

Для реализации населению через аптечную сеть и специализированные магазины, отделы торговой сети в качестве биологически активной добавки к пище, как источник пробиотических микроорганизмов *Lactobacillus rhamnosus* GG, и пребиотика - бактериальной целлюлозы/пуллулан, для стимуляции иммунной защиты организма, восстановления микрофлоры кишечника, в том числе после длительного приема антибиотиков, устранения усталости и утомляемости. Условия хранения: Хранить в оригинальной упаковке, в защищенном от света месте, недоступном для детей месте при температуре не выше от 2°C до 25°C и относительной влажности не более 75%. Состав: бактериальная целлюлоза/пуллулан, лиофилизированные молочнокислые бактерии *Lactobacillus rhamnosus* GG. Содержание пробиотических микроорганизмов 1×10^9 КОЕ/г. Рекомендуемая дозировка: взрослым и детям старше 14 лет по 1 саше 1-2 раза в день во время еды. Содержимое саше перед применением суспендировать в воде, молоке или йогурте. Продолжительность приема - 10-30 дней. При необходимости прием можно повторить. Противопоказания: непереносимость компонентов, беременность, кормление грудью. Перед применением рекомендуется проконсультироваться с врачом. Предупреждение: не превышать суточную дозу. Производитель не несет ответственности за любой ущерб, вызванный неправильным использованием или хранением. Срок годности: 1 год. Упаковка: саше-пакеты, массой нетто по 3 г. Не является лекарством.

Председатель
Н. Садвакасов



Страница 111

№ 0002026

Сканировано с CamScanner