

УДК 579.6; 615.

Получение микрокапсулированной формы симбиотического комплекса пробиотиков *Lactobacillus helveticus* с использованием альгината и хитозана

© 2020 Е. Н. СВЕНТИЦКИЙ^{1,*}, Д. К. ТОРОПОВ¹, Т. С. ЕГОРОВА¹¹ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, 197110

*e-mail: e.n.sventitskiy@hpb.spb.ru

Поступила в редакцию 12.09.2019 г.

После доработки 06.11.2019 г.

Принята к публикации 23.03.2020 г.

Проведено сравнение различных технологий получения пробиотических препаратов, включая «Витафлор», созданный на основе комплекса двух симбиотических штаммов: *Lactobacillus helveticus* D-75 и D-76 – с доказанными эффектами синтрофии и синергизма. Препарат «Витафлор» выпускается в виде лиофилизата биомассы лактобацилл. В работе показано, что биологическая активность препарата «Витафлор» понижается в агрессивных средах желудочно-кишечного тракта до величины, исключающей бактериальную колонизацию и ожидаемый терапевтический эффект. Альгинат-хитозановые микрокапсулы на основе симбиотического комплекса, используемого в препарате «Витафлор», повысили защищенность микроорганизмов от желудочно-кишечной среды и реализовали их регулируемое во времени высвобождение. Наиболее эффективным оказался эмульсионный способ капсулирования с защитой лактобацилл, превышающей на 5 порядков препарат «Витафлор» и на 3 порядка капсулированную экструзионно форму. Эмульсионный способ капсулирования, разработанный для препарата «Витафлор», применим и для других микроорганизмов. Технология эмульсионного микрокапсулирования относительно проста, легко масштабируется и не требует сложного оборудования.

Ключевые слова: пробиотики, *Lactobacillus helveticus*, технология микрокапсулирования, природные полисахариды, альгинат, хитозан

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-56-63

Отрицательное воздействие внешней среды на организм человека может вызывать микробиологические нарушения, способствующие возникновению и развитию различных заболеваний [1]. В связи с этим в последние годы постоянно расширяется спектр пробиотических препаратов, восстанавливающих микрофлору, заметно увеличился и объем их промышленного производства. В большинстве случаев пробиотики используют перорально для профилактики и лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Механизм действия пробиотических микроорганизмов связан с влиянием на кишечную микрофлору – увеличением числа полезных бактерий и уменьшением популяции оппортунистических

и потенциально патогенных микроорганизмов. Положительный результат достигается благодаря изменению локального значения pH, подавляющего патогены, производству бактериоцинов, модификации токсинов, а также стимуляции иммунных механизмов слизистой оболочки кишечника. Очевидно, что антагонизм и конкуренция с патогенами за «место обитания» возможны в случае достаточного количества живых клеток пробиотика. В ряде исследований [2–4] показано, что бактериальный препарат пробиотика должен содержать не менее 10^6 – 10^7 колониеобразующих единиц (КОЕ)/г при ежедневном потреблении пациентом 10^8 жизнеспособных пробиотических клеток. В настоящее время в мире

Список сокращений: ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; КОЕ – колониеобразующая единица.

производится более 70 пробиотических препаратов перорального применения, однако многие из них не дают ожидаемого терапевтического эффекта [4]. Это может быть результатом низкого содержания жизнеспособных бактериальных клеток в препарате и/или их инактивации при прохождении через ЖКТ человека до момента достижения толстой кишки – области максимальной бактериальной колонизации и, соответственно, желательного присутствия пробиотика. К основным факторам, инактивирующим микроорганизмы, относят низкое значение pH в желудке и высокое содержание желчных солей в кишечнике. Большинство современных пробиотических препаратов включает бактериальные штаммы *Lactobacillus* или *Bifidobacterium*, которые входят в фенотипическую группу молочнокислых бактерий и играют наиболее важную роль в функционировании ЖКТ [5] благодаря способности этих микроорганизмов преобразовывать молочный сахар в молочную кислоту. Однако уже при прохождении кислотосодержащей желудочной среды возможна настолько высокая степень инактивации пробиотика, которая исключает последующую колонизацию ЖКТ. Например, в условиях, моделирующих желудочную среду при pH 2, различные штаммы *Bifidobacterium* полностью погибают во временном интервале от 30 мин до 1 ч [2]. Необходимо учитывать, что время нахождения пробиотических клеток в желудке составляет $1,5 \pm 0,5$ ч, прохождение через тонкую кишку занимает $3,2 \pm 1,6$ ч, в толстой кишке происходит задержка на время от 6 до 32 ч и более [2]. Таким образом, защита бактериальных клеток от отрицательного воздействия среды ЖКТ, с учетом указанных временных интервалов, является необходимым условием практического применения пробиотических препаратов. Наиболее эффективным способом защиты микроорганизмов от агрессивной среды желудка считается их иммобилизация в полимерном матриксе и последующее микрокапсулирование. На основании результатов многочисленных исследований обосновано применение для микрокапсулирования нетоксичных полимеров альгината и хитозана, получаемых из природного сырья и использующихся в пищевом и фармацевтическом производстве [6, 7]. Эти полимеры обладают рядом свойств, необходимых для микрокапсулирования. Так, водные растворы альгината натрия могут образовывать в присутствии ионов двухвалентных металлов (обычно Ca^{2+}) прочно сшитый гель с полианионными свойствами. Особенностью хитозана, катионного полисахарида, является способность связываться с полианионным комплексом альгината, а также с отрицательно за-

ряженной слизистой ЖКТ. Микрокапсулирование пробиотических клеток проводят обычно путем высокотемпературного распылительного высушивания бактериальной суспензии в растворе полимера или путем ионотропного желирования альгинатных микросфер с включенными микроорганизмами. Возможность негативного воздействия процесса микрокапсулирования на пробиотики зависит от природы бактериального штамма, способа капсулирования и свойств используемых полисахаридов [8, 9].

Целью работы было изучение возможности повышения эффективности пробиотических препаратов на примере препарата «Витафлор», разработанного и производимого ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России (Санкт-Петербург). «Витафлор» относится к препаратам нового поколения, так как имеет в своей основе не отдельные бактериальные штаммы, а симбиотическую композицию штаммов *Lactobacillus* с доказанными эффектами синтрофии и синергизма [1]. «Витафлор» выпускается в виде лиофильно высушенного порошка и содержит остатки молока, входящего в состав питательной среды, используемой для выращивания, метаболиты, накопленные в бактериальной биомассе, криопротекторы, используемые для защиты бактерий при высушивании. Эти компоненты препарата «Витафлор» могут оказывать благоприятное действие на выживаемость лактобацилл в условиях ЖКТ. Необходимо также учитывать, что используемая в препарате комбинация симбиотических штаммов обладает высоким адаптационным потенциалом, проявляющимся в неблагоприятных условиях. Как будет продемонстрировано далее, указанные обстоятельства обеспечивали некоторую защиту лактобацилл в кислых средах по сравнению с водной суспензией тех же бактерий. Однако уровень этой защиты и, соответственно, количество жизнеспособных микроорганизмов, попадающих в кишечник, не позволяет реализовать в полной мере пробиотические свойства «Витафлора». Совершенствование препарата предполагалось осуществить путем микрокапсулирования лактобацилл с применением природных полисахаридов альгината и хитозана, а также с использованием двух различных технологий, основанных на экструзии или эмульгировании бактериальных суспензий. Результаты сравнения препаративных форм, полученные при моделировании условий прохождения пробиотиков через ЖКТ человека, предполагалось использовать для рекомендаций по внедрению в производственную практику.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Характеристика производственных штаммов препарата «Витафлор»

Лактобациллы, входящие в состав препарата «Витафлор», относятся к роду *Lactobacillus*, виду *Lactobacillus helveticus* – штаммы D-75 и D-76. Вид переопределен из *Lactobacillus acidophilus* после полного секвенирования геномов [10]. Микроорганизмы были депонированы во Всероссийском государственном научно-исследовательском институте сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург) в 2017 году. Бактерии *Lactobacillus helveticus* относятся к фенотипической группе молочнокислых бактерий на основании характерного типа ферментации – молочнокислого брожения. Установлена ярко выраженная антагонистическая активность этих лактобацилл в отношении широкого спектра аэробных, факультативно-анаэробных и облигатно-анаэробных бактерий и грибов, нарушающих микробиологическое состояние ЖКТ. Свойства пробиотиков обусловлены продукцией неспецифических антимикробных метаболитов: молочной кислоты, перекиси водорода, лизоцима и специфических субстанций – бактериоцинов [11], повреждающих мембраны и инактивирующих клетки-мишени. Антагонистическая активность препарата «Витафлор» проверена в отношении стандартных референсных культур, рекомендованных Центром экспертизы и контроля иммунобиологических препаратов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва). Антагонистическая активность штамма *Lactobacillus helveticus* D-76 выше, чем *Lactobacillus helveticus* D-75, что определяет симбиотический эффект в комплексе этих штаммов [1].

Препараты

В работе использованы полисахариды альгинат натрия и хитозан (Sigma-Aldrich, США). Альгинат натрия (далее: альгинат) – линейный водорастворимый полианионит, включающий мономеры манну-роновой и гиалуриновой кислот. Хитозан – растворимый в кислых водных растворах поликатионит со степенью деацетилирования 75% и молекулярной массой около 10^3 кДа. Химически чистые реактивы: HCl, NaOH, KH_2PO_4 , $CaCl_2$, – а также рафинированное подсолнечное масло («Благо», Россия). Все использованные растворы стерилизовали автоклавированием или фильтрацией через поры с размером 0,45 мкм (Sartorius, Германия).

Оборудование

В работе использовано следующее оборудование: термостат BT120 (LB, Чехия) для выра-

щивания микроорганизмов и моделирования условий ЖКТ; центрифуга CM-50 (ELMI, Латвия) для концентрирования биомассы; спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu, Япония) для определения оптимального ресуспендирования клеток (после центрифугирования) в фосфатном буфере; рН-метр рН 213 (Hanna, Германия) для приготовления растворов полисахаридов и модельных сред ЖКТ; инвертированный микроскоп TS100 (Nikon, Япония) для определения формы, размеров и поверхностных свойств микрокапсул; ультразвуковой гомогенизатор HD2070 (Sonopuls, Германия) для разрушения микрокапсул; автоклав 2540NK (Tuttnauer, Германия) для стерилизации посуды и растворов; ламинарный шкаф ВЛ-22 («Сампо», Россия) для проведения процесса микрокапсулирования лактобацилл.

Определение количества жизнеспособных клеток

Определение количества жизнеспособных клеток в водных суспензиях проводили с помощью стандартного метода 10-кратных разведений и последующего посева на питательный агар МРС-5. При исследовании микрокапсулированных препаратов микрокапсулы предварительно разрушали с помощью ультразвука. Для этих целей зонд ультразвукового гомогенизатора помещали в исследуемый образец объемом 10 мл, который облучали в течение 1 мин. Продолжительность воздействия ультразвука и его мощность подбирали опытным путем, добиваясь разрушения микрокапсул (при этом мутная суспензия превращалась в опалесцирующую жидкость) и сохранения жизнеспособности клеток, что предварительно проверяли на суспензии некапсулированных лактобацилл с той же биологической активностью.

Методы микрокапсулирования микроорганизмов

Процесс создания такой препаративной формы включал смешивание пробиотиков с жидкой полимерной субстанцией, диспергирование полученной суспензии на мелкие микросферы с их последующим превращением в микрокапсулы. Для диспергирования бактериальной суспензии в лабораторных и производственных масштабах используют три способа: высокотемпературное высушивание при распылении, экструзия через небольшое (около 0,5 мм) отверстие и эмульгирование [2, 12]. В связи со значительной или полной инактивацией лактобацилл в результате распылительного высушивания суспензии клеток в полимерной среде [8] мы не использовали этот метод. Два последних способа, описанных в литературе

[4, 5, 12], применены с небольшими модификациями. Образование микрокапсул в обоих случаях происходило путем иотропного желирования микробиологических суспензий альгината при контакте с водным раствором CaCl_2 . Размеры микрокапсул определяются размером бактериальных клеток и составляют обычно от сотен до тысяч микрометров. При использовании экструзионного и эмульсионного методов для каждого эксперимента специально проводили наработку биомассы микроорганизмов с последующим центрифугированием клеточной суспензии при 4000 об/мин в течение 5 мин на центрифуге СМ-50 (ELMI, Латвия).

В случае экструзионного метода экспериментальным путем подбирали максимальные концентрации клеточной суспензии в фосфатном буфере, а также концентрацию и объем водного раствора альгината, обеспечивающие получение в растворе CaCl_2 стабильных микрокапсул круглой формы диаметром 1–2 мм с гладкой поверхностью. Оптимальная концентрация клеточной суспензии в фосфатном буфере (рН 7,2) составляла около 10^7 КОЕ/мл, что соответствовало оптической плотности 2,0 при 600 нм (OD_{600}). В случае повторных исследований исходную клеточную суспензию ресуспендировали до указанной величины OD_{600} . Для образования микрокапсул 1 мл полученной суспензии вводили в 50 мл водного раствора 2%-ного альгината. Смесь экструдировали с помощью шприца в виде отдельных капелек через иглу диаметром 0,5 мм в 200 мл 0,05 М раствора CaCl_2 в воде при медленном перемешивании на магнитной мешалке в течение 15 мин до окончания процесса желирования альгината. Покрытие отфильтрованных и промытых стерильной водой альгинатных капсул дополнительной оболочкой [13] проводили, помещая их на 10 мин в 200 мл 0,4%-ного раствора хитозана. рН раствора хитозана предварительно доводили до 6,0 для образования полиэлектролитного комплекса с альгинатом.

Метод эмульсионной инкапсуляции также широко используется для защиты различных пробиотиков [4, 12] с получением того же продукта, что и при экструзии альгинатных микрокапсул, с внутриобъемным распределением жизнеспособных бактериальных клеток. В методе используют аналогичные технологические приемы: введение лактобацилл в раствор альгината и его последующее желирование в присутствии ионов Ca^{2+} . Последовательность эмульсионного микрокапсулирования включала получение клеточной суспензии, как и в предыдущем методе, для ее последующего введения в раствор альгината. Однако оптимальная концентрация этой суспензии в физиологическом рас-

творе составляла около 10^9 КОЕ/мл, то есть была на 2 порядка выше по сравнению с экструзионным методом. В 20 мл 4%-ного раствора альгината в воде, нагретого до 40 °С, вводили при тщательном перемешивании 4 мл полученной суспензии. Образование эмульсии типа «вода в масле» происходило в течение 5 мин при добавлении капелек нагретой суспензии клеток в альгинате в 100 мл подсолнечного масла с 0,2 мл Tween-80 при перемешивании масляной фазы со скоростью 600 об/мин. Разрушение эмульсии и образование микрокапсул происходило при быстром добавлении 100 мл водного раствора 0,1 М CaCl_2 , охлажденного предварительно до 4 °С. После желирования альгинатных капелек в присутствии ионов Ca^{2+} водную фазу с микрокапсулами отделяли, а капсулы концентрировали центрифугированием и промывали 0,1 М раствором CaCl_2 и дистиллированной водой. В результате получали альгинатные микрокапсулы сферической формы с диаметром около 1 мм.

Моделирование условий ЖКТ

Проходя через ЖКТ, клетки пробиотика сначала попадают в кислую среду желудка с рН 1,0–2,5, а затем в среду кишечника с рН 5–7. Согласно Фармакопее США [2], начальные условия можно моделировать, доводя физиологический раствор до рН 2 с помощью 0,01 М раствора HCl . В качестве модели среды кишечника со значением рН 7,2 использовали 1%-ный раствор KH_2PO_4 , рН которого доводили до требуемого значения 0,2 М раствором NaOH .

Анализ высвобождения клеток микроорганизмов из микрокапсул

Из-за большого размера пробиотических клеток (0,6–1,5 мкм) их высвобождение из микрокапсул не связано с процессами диффузии и может происходить лишь при разрушении микрокапсул. Скорость выхода клеток в среду ЖКТ обусловлена параметрами этой среды, продолжительностью пребывания в ней, а также свойствами микрокапсул. Учитывая данные ранее проведенных исследований, например, представленных в работе [13], мы помещали микрокапсулы в модельные среды желудка и кишечника соответственно на 1 и 6 ч. Количество живых клеток в образцах определяли после экспозиций различной длительности при температуре 37 °С. За исключением эмульсионного метода, исследуемые образцы содержали изначально одинаковое число клеток лактобацилл.

Исследование влияния среды на образцы микрокапсул включало несколько этапов: приготовление суспензии лактобацилл в растворе альгината натрия и получение альгинатных и альгинат-хито-

занных микрокапсул методом экструзии, а также альгинатных капсул методом эмульгирования, как указано выше. Из полученных микрокапсул было приготовлено 12 образцов (по 4 одинаковых образца для каждого из трех способов микрокапсулирования). Каждый образец содержал 500 мг капсул в пенициллиновых флаконах. Во все образцы вносили по 10 мл раствора с pH 2, флаконы помещали на 1 ч в термостат с температурой 37 °С (моделирование процессов в желудке), после чего в течение 1–2 мин аккуратно отбирали с помощью шприца жидкость из всех флаконов. Три образца с микрокапсулами, полученными различными способами, разрушали с помощью ультразвука, как описано выше, и отбирали для высева на питательную среду с целью определения степени воздействия на лактобациллы кислой среды. В каждый из 9 оставшихся флаконов вносили по 10 мл раствора с pH 7,2, после чего продолжали инкубацию образцов при 37 °С (моделирование процессов в кишечнике). Через определенные промежутки времени (1, 2 и 6 ч) из термостата вынимали по одному образцу, приготовленному различными способами, отбирали надосадочную жидкость и определяли в ней количество жизнеспособных клеток, высвободившихся из микрокапсул. После 6-часовой экспозиции и анализа части надосадоч-

ной жидкости весь образец обрабатывали ультразвуком до полного разрушения микрокапсул и полученный материал высеивали на питательную среду. Обнаружено, что в течение 6 ч все бактерии, сохраняя жизнеспособность, успевают выйти из микрокапсул. Для оценки влияния инкапсулирования пробиотика на его устойчивость в среде ЖКТ анализировали изменение количества жизнеспособных клеток в исходной суспензии лактобацилл и в суспензии с альгинатом, из которой получали микрокапсулы, используя условия обработки капсулированных препаратов.

Для оценки влияния капсулирования на эффективность действия симбиотического комплекса пробиотических бактерий *Lactobacillus helveticus* в качестве контроля использовали препарат «Витафлор», который подвергали аналогичным обработкам в тех же средах.

Все эксперименты проведены в трех повторях, включая стадию наработки биомассы лактобацилл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Количества жизнеспособных клеток в суспензиях и в микрокапсулах при воздействии сред с различными значениями pH представлены в табл. 1.

Таблица 1

Количество жизнеспособных клеток в суспензиях и микрокапсулах при воздействии сред с pH 2,0 и pH 7,2
The number of viable cells in suspensions and microcapsules when exposed to a medium with pH 2,0 and pH 7,2

Состав образца	Способ капсуляции	Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл					
		Суспензия клеток	Капсулы с клетками	Экспозиция капсул при pH 2,0; 1 ч	Экспозиция капсул при pH 7,2; 1 ч	Экспозиция капсул при pH 7,2; 2 ч	Экспозиция капсул при pH 7,2; 6 ч
1	2	3	4	5	6	7	8
Альгинатные капсулы	Экструзия	$(4,3 \pm 0,8) \cdot 10^7$	$(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^7$	$(2,7 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(8,3 \pm 0,4) \cdot 10^2$	$(4,3 \pm 0,4) \cdot 10^3$	$(3,3 \pm 0,5) \cdot 10^3$
Альгинатно-хитозановые капсулы	Экструзия	$(4,3 \pm 0,6) \cdot 10^7$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(6,7 \pm 0,8) \cdot 10^6$	$(6,0 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(3,3 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(1,7 \pm 0,4) \cdot 10^5$
Альгинатные капсулы	Эмульгирование	$(6,4 \pm 0,9) \cdot 10^9$	$(2,9 \pm 0,9) \cdot 10^9$	$(1,3 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(1,6 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(1,3 \pm 0,8) \cdot 10^8$	$(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^7$
Суспензия клеток в растворе альгината	–	$(5,7 \pm 1,0) \cdot 10^7$	–	$(5,2 \pm 0,4) \cdot 10^2$	$(2,0 \pm 0,5) \cdot 10^7$	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^2$	< 10
Суспензия препарата «Витафлор»	–	$(8,1 \pm 0,5) \cdot 10^7$	–	$(5,2 \pm 0,6) \cdot 10^3$	–	–	$(1,5 \pm 0,4) \cdot 10^2$
Суспензия симбиотического комплекса	–	$(4,1 \pm 0,4) \cdot 10^7$	–	$(7,7 \pm 0,6) \cdot 10^1$	–	–	< 10

Как видно из данных, представленных в табл. 1, после инкубации капсулированных образцов в среде с pH 2 в них снижалось количество жизнеспособных клеток (сравните значения КОЕ/мл в 4 и 5 столбцах), что может быть связано с присутствием клеток вне капсул (практически инкапсулировать все клетки невозможно, так как часть из них сорбируется на поверхности микрокапсул и остается при отмывании) или выходом их в агрессивную среду из некачественных капсул.

В среде с pH 7,2 по значениям КОЕ/мл можно судить о скорости выхода лактобацилл из капсул и, следовательно, разрушении последних. Именно эту тенденцию можно проследить в течение первых двух часов (табл. 1, столбцы 6 и 7) для всех капсулированных препаратов – количество клеток, вышедших в среду, возрастало на порядок в течение второго часа инкубации. За последующие 4 ч, то есть через 6 ч инкубации (столбцы 7 и 8), высвобождения бактериальных клеток не зарегистрировано, что, по-видимому, свидетельствует о полном их выходе из микрокапсул в течение 2 ч. При эмульсионном капсулировании через 6 ч число жизнеспособных клеток даже снижалось, что может быть связано с их частичной агрегацией в присутствии остатков масляной фазы.

При сравнении биологической активности образцов, содержащих некапсулированные и капсулированные лактобациллы (табл. 1, столбцы 3 и 4), заметно лишь небольшое (приблизительно в 5 раз) снижение числа жизнеспособных клеток в последнем случае, что положительно характеризует все использованные методы иммобилизации пробиотиков. Как следует из результатов воздействия среды на незащищенные микрокапсулами клетки в альгинатной суспензии, такая система не может быть использована при создании пробиотического препарата. Аналогичные результаты получены и в отсутствие какой-либо защиты клеток от агрессивной среды в суспензии симбиотического комплекса. Значительно увеличив содержание лактобацилл в водной суспензии (на 2 порядка), мы предполагали выявить «эффект кворума» [11, 14], но ожидаемых результатов не получили (данные не приводятся). На основании полученных результатов можно говорить о защитном эффекте микрокапсулирования лактобацилл после их пребывания в среде с pH 2 для всех использованных методов капсулирования. Наименьший защитный эффект, с потерей около 4 порядков жизнеспособных клеток, как и предполагалось, наблюдали в случае альгинатных капсул. Такое снижение, по-видимому, связано с дефектами альгинатных капсул, покрытых порами диаметром 10–50 нм [2]. Через эти поры иммобилизо-

ванные лактобациллы высвобождаются не могут в силу их большего размера (1–2 мкм), но возможна диффузия наружного раствора, в который помещены микрокапсулы, что и приводит к инактивации бактерий. Этот нежелательный процесс можно предотвратить, покрыв альгинатную капсулу слоем хитозана. Действительно, при использовании альгинатно-хитозановых капсул потери биологической активности инкапсулированных пробиотиков после пребывания в желудочной среде в течение 1 ч и дополнительной 6-часовой экспозиции в среде кишечника составляли около 2 порядков, что гораздо меньше, чем в альгинатном варианте. В работе [13] показано, что хитозан покрывает альгинатную капсулу слоем толщиной около 10 мкм, образуя сложный полиэлектролитный комплекс. Важно, что при этом хитозан не проявляет присущей ему антимикробной активности в отношении капсулированных пробиотиков и меняет поверхностный заряд микрокапсулы с отрицательного на положительный. Последнее обстоятельство способствует взаимодействию с отрицательно заряженной поверхностью слизистой ЖКТ и тем самым может дополнительно регулировать прохождение транзитной микрофлоры.

Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными Cook и соавт. [2, 13], которые анализировали изменение содержания жизнеспособных клеток пробиотика *Bifidobacterium breve* при микрокапсулировании методом экструзии в присутствии альгината и хитозана и скорость их высвобождения из микрокапсул в течение 2 ч в среде с pH 7,2.

На основании представленных в табл. 1 результатов можно говорить о высокой степени защиты лактобацилл в альгинатных микрокапсулах, полученных эмульсионным методом и не покрытых хитозановым слоем. В этом случае, по сравнению с экструзионным методом, значительно увеличивалось (на 2 порядка) содержание жизнеспособных клеток в исходной суспензии и в микрокапсулах. Возможно, при эмульсионном способе капсулирования поверхностный слой хитозана изменяется под действием масляной фазы, оставшейся после отделения микрокапсул от эмульсии. Однако, независимо от причин дополнительной устойчивости клеток, очевидны важные преимущества эмульсионного способа микрокапсулирования пробиотика для получения препарата с требуемой для колонизации в толстой кишке концентрацией не ниже 10^6 – 10^7 КОЕ/мл [2, 15]. К преимуществам эмульсионного метода можно также отнести простоту получения микрокапсул и возможность масштабирования без использования специального технологического оборудования.

Как видно из данных, представленных в табл 1, поведение лактобацилл в препарате «Витафлор» отличается от их капсулированных вариантов. Так, по сравнению с водными и альгинатными суспензиями исследованных клеток без микрокапсулирования пробиотики препарата «Витафлор» оказались более устойчивыми к агрессивному действию модельных сред (на 1–2 порядка). Выше мы уже обсуждали эту особенность препарата, которая, по-видимому, связана, во-первых, с протективным действием питательной среды, используемой при культивировании бацилл, и, во-вторых, с присутствием симбиотического комплекса. Однако количество жизнеспособных клеток, сохраняющихся в препарате «Витафлор» после его обработки при pH 2,0 и 7,2, не превышает 2 порядка, что ниже соответствующих значений для всех капсулированных форм и на 5 порядков меньше, чем для полученной эмульгированием.

Таким образом, нами показано, что для защиты пробиотиков от инактивирующей среды ЖКТ, в том числе в желудке и в тонкой кишке, и получения высоких титров микроорганизмов для колонизации толстой кишки необходимо создание специальной формы этих препаратов.

На примере штаммов, входящих в состав препарата «Витафлор», показана возможность инкапсуляции жизнеспособных клеток в полимерных матрицах альгината различными способами. Поверхность полученных при этом микрочастиц может быть покрыта хитозановой оболочкой, которая, образуя полиэлектролитный комплекс с альгинатом, обеспечивает дополнительную защиту микроорганизмов в ЖКТ. Согласно полученным результатам, использованные методы позволяют капсулировать 90% пробиотических клеток с сохранением их жизнеспособности. Достаточная простота, отсутствие необходимости применения специального оборудования, воспроизводимость высоких результатов эмульсионного метода позволяют рекомендовать этот метод для получения эффективных пробиотических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

- Петров Л.Н., Вербичкая Н.Б., Добрица В.П., Галкин Г.Н., Петров Н.Л. Бактериальные пробиотики: биотехнология, клиника, алгоритмы выбора. СПб: ФГУП Гос. НИИ ОЧБ, 2008, 136 с.
- Cook T. M., Tzortzis G., Charalampopoulos D., Khutoryanskiy V.V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J. Control. Release*, 2012, 162(1), 56–67. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.06.003
- Chavarri M., Marañón I., Ares R., et al. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *J. Food Microbiol.*, 2010, 142(1–2), 185–189. doi: 10.1016/j.foodmicro.2010.06.022
- Kailasapathy K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 2002, 3(1), 39–48.
- Ariful I.M., Yun C.-H., Choi Y.-J., Cho C.-S. Microencapsulation of live probiotic bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 20(10), 1367–1377. doi: 10.4014/jmb.1003.03020
- Sosnik A. Alginate particles as platform for drug delivery by the oral route: state-of-the-art. *ISRN Pharm.*, 2014, 926157. doi: 10.1155/2014/926157
- Luo Y., Qin W. Recent advances of chitosan and its derivatives for novel applications in food science. *J. Food Process. Beverages*, 2013(1), 1–13. doi: 10.1007/s11947-013-1599-4
- Yeung T.W., Üçok E.F., Tiani K.A., McClements D.J., Sela D.A. Microencapsulation in oral delivery. *Front. Microbiol.*, 2016, 7, 494–505. doi: 10.3389/fmicb.2016.00494
- Bosnea L.A., Moschakis T., Nigam P.S., Biliaderis C.G. Growth adaptation of probiotics in biopolymer-based coacervate structures to enhance cell viability. *LWT*, 2017, 77, 282–289. doi: 10.1016/j.lwt.2016.11.056
- Toropov V.A., Vakhitov T.Y., Shalaeva O.N., Roshchina E.K., Sitkin S.I. Complete genome sequences of the probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus helveticus* D75 and D76. *Genome Announc.*, 2018, 6(11), e01552-17. doi: 10.1128/genomeA.01552-17
- Хохлов А. С. Низкомолекулярные микробные ауторегуляторы. М.: «Наука», 1988, 269 с.
- Somo S.I., Khanna O., Brey E.M. Alginate microbeads for cell and protein delivery. In: *Cell Microcapsulation. Methods in Molecular Biology*. Ed. E.C. Opara, N.Y.: Humana Press, 2017, 1479, 217–224. doi: 10.1007/978-1-4939-6364-5_17
- Cook M.T., Tzortzis G., Charalampopoulos D., Khutoryanskiy V.V. Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *Biomacromolecules*, 2011, 12(7), 2824–2840. doi: 10.1021/bm200576h
- Эль-Регистан Г.И. Покой как форма адаптации микроорганизмов. В книге: Бухарин О.В., Гинцбург А.П., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: «Медицина», 2005, 367, 11–142.
- Yeung, T.W., Arroyo-Maya, I.J., McClements, D.J., Sela, D.A. Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles, enhancing *Lactococcus lactis* subsp. cremoris LM0230 viability using calcium alginate beads. *Food Funct.*, 2016, 7(4), 1797–1804. doi: 10.1039/c5fo00801h

Preparation of Microencapsulated Symbiotic Complex of Probiotics based on *Lactobacillus helveticus* using Alginate and Chitosan

E. N. SVENTITSKII^{1,*}, D. K. TOROPOV¹, and T. S. EGOROVA¹

¹State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical and Biological Agency of Russia, St.-Petersburg, 197110 Russia

*e-mail: e.n.sventitskiy@hpb.spb.ru

Received September 12, 2019

Revised November 6, 2019

Accepted March 23, 2020

Abstract—Various technologies for producing different forms of probiotic preparations including Vitaflor have been compared. This preparation was created based on two symbiotic *Lactobacillus helveticus* strains, D-75 and D-76, with proven effects of syntrophy and synergism. It is produced in the form of freeze-dried lactobacilli biomass. It was shown that the biological activity of Vitaflor in an aggressive environment of the gastrointestinal tract (GET) was reduced to a level that excluded both bacterial colonization and therapeutic effect. Alginate-chitosan microcapsules containing the Vitaflor symbiotic complex protected the microorganisms from the aggressive action of the GET medium and provided their time-controlled release. The emulsion encapsulation turned out to be most effective: the protection of live lactobacilli was 5 orders of magnitude higher than that in the Vitaflor preparation and 3 orders of magnitude higher than with the extrusion method of obtaining microcapsules. The emulsion encapsulation developed for Vitaflor can be applied to other microorganisms; the technique is rather simple, easily scalable and does not require complex equipment.

Keywords: probiotics, *Lactobacillus helveticus*, microencapsulation technology, natural polysaccharides, alginate, chitosan

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-56-63