

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 615.014.67:615.3

СОЗДАНИЕ КАПСУЛИРОВАННЫХ ФОРМ АУТОПРОБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ *LACTOBACILLUS SPP.* И *ENTEROCOCCUS SPP.*

Цапиева А. Н., Морозова А. О., Карасева А. Б., Новикова Н. С.,
Суворов А. Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Научно-образовательный центр «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Цапиева Анна Николаевна,
НОЦ «Молекулярные основы
взаимодействия микроорганизмов
и человека» НЦМУ «Центр
персонализированной медицины»
ФГБНУ «ИЭМ»,
ул. Академика Павлова, д. 12, Санкт-
Петербург, Россия, 197376.
E-mail: anna.tsapieva@gmail.com

Статья поступила в редакцию 03.10.2022
и принята к печати 10.11.2022.

РЕЗЮМЕ

Для расширения ассортимента форм выпуска аутопробиотиков, повышения потребительской привлекательности, увеличения срока хранения и возможностей транспортировки был разработан протокол получения их капсулированной формы. Были проведены испытания капсулированных форм индигенных бактерий родов *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus spp.* с целью оценки жизнеспособности клеток бактерий после лиофилизации и хранения в различных условиях. Было проведено исследование влияния криопротекторов различного состава на сохранение жизнеспособности лиофилизатов индигенных *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus spp.* Полученные результаты показали, что применение 10 % сахарозы и 1 % желатина в составе защитной среды сохраняет исходные свойства бактериальных штаммов, способствуя их выживанию в процессе криоконсервации и лиофилизации. Было установлено, что наиболее благоприятным условием хранения капсулированных аутопробиотиков на основе *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus spp.* является температурный режим до 25 °С с предельным сроком годности 1 год.

Ключевые слова: аутопробиотики, инкапсуляция, лиофилизация, пробиотики, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*

Для цитирования: Цапиева А.Н., Морозова А.О., Карасева А.Б., Новикова Н.С., Суворов А.Н. Создание капсулированных форм аутопробиотиков на основе *Lactobacillus spp.* и *Enterococcus spp.* Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(6):54-63. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-54-63.

DEVELOPMENT OF CAPSULATED AUTOPROBIOTICS BASED ON *LACTOBACILLUS SPP.* AND *ENTEROCOCCUS SPP.*

**Tsapieva A. N., Morozova A. O., Karaseva A. B., Novikova N. S.,
Suvorov A. N.**

Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Tsapieva Anna N.,
Institute of Experimental Medicine,
Academician Pavlov str., 12, Saint
Petersburg, Russia, 197376.
E-mail: anna.tsapieva@gmail.com

Received 03 October 2022; accepted
10 November 2022.

ABSTRACT

In order to expand the range of autoprobiotic release forms, increase consumer attractiveness, prolongate product's shelf life and transportation possibilities, a protocol for obtaining an encapsulated form of autoprobiotics was developed. Tests were carried out on encapsulated forms of indigenous bacteria in order to assess the viability of bacterial cells after lyophilization and storage under various conditions. The effect of various cryoprotectants on the lyophilized *Lactobacillus spp.* and *Enterococcus spp.* cells viability was studied. The results obtained showed that the use of 10 % sucrose and 1 % gelatin as part of a protective medium retains the original properties of bacterial strains, contributing to their survival during cryopreservation and lyophilization. The most favorable storage conditions and expiration dates for encapsulated autoprobiotics based on *Lactobacillus spp.* and *Enterococcus spp.* were determined.

Key words: autoprobiotics, encapsulation, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, lyophilization, probiotics.

For citation: Tsapieva AN, Morozova AO, Karaseva AB, Novikova NS, Suvorov AN. Development of capsulated autoprobiotics based on *Lactobacillus spp.* and *Enterococcus spp.* Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(6):54-63. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-6-54-63.

Список сокращений: БАД — биологически активная добавка, ЖКТ — желудочно-кишечный тракт, ФБС — фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Необходимость разработки и поиска новых форм аутопробиотических препаратов обусловлена несколькими факторами, главным из которых является продление срока хранения продукта и увеличение эффективности аутопробиотической терапии. Надлежащая терапевтическая эффективность и биодоступность могут быть обеспечены путем подбора подходящей лекарственной формы, состава и технологии производства.

Предпосылками для создания персонализированного пробиотического продукта стали недостатки применения промышленных пробиотиков и представление об уникальности микробиоценоза организма каждого индивидуума [1, 2].

Очевидно, что значительная часть пробиотических бактерий теряет свою активность вследствие гибели микроорганизмов при хранении жидкой формы в течение 2–4 недель, иногда раньше. Кроме того, достоверно показано, что в процессе прохождения через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека большая часть микроорганизмов погибает и до кишечника доходит лишь незначительная их часть. Причинами этого являются низкие значения pH, влияние соляной кислоты и пепсина желудочного сока [3]. Пробиотические препараты, содержащие лиофильно высушенную биомассу, сохраняют лечебные свойства при значительно большем сроке хранения, чем жидкие формы пробиотиков [4].

Одним из наиважнейших факторов для сохранения жизнеспособности бактериальных клеток при лиофилизации, кроме подбора условий сушки, является подбор эффективного криопротектора. Наиболее часто в качестве криопротекторов применяют глицерин, сахарозу, глюкозу, желатин, агар-агар. Криопротектор должен быть нетоксичным, не оказывать влияние на потребительские свойства и должен защищать клетки от повреждающего действия замораживания. Углеводы обычно применяют в сочетании с другими криопротекторами, чаще всего желатином, для достижения максимальной выживаемости бактерий в процессе сушки. Углеводы проникают в клетки и создают осмотическое давление, чем препятствуют образованию кристаллов льда и разрушению клетки в процессе замораживания; желатин, в свою очередь, не проникает в клетки, увеличивает стабилизирующее действие среды, позволяет хранить высушенные микроорганизмы без создания вакуума [5].

Капсулирование — рутинная технология, которая нашла широкое применение в различных отраслях промышленности и является хорошим примером использования микротехнологий в науке о пище и биотехнологии. Широкое распространение получило капсулирование пробиотических бактерий, применяемых как в виде препаратов-пробиотиков, так и в виде БАДов, для их защиты при транзите через агрессивную среду различных отделов ЖКТ [3]. Применение капсулирования также увеличивает разнообразие доступных форм пробиотиков, повышает удобство использования вне дома, в путешествиях и делает доступным длительное хранение препарата без потери активности входящих в его состав микроорганизмов. Но главным значением инкапсуляции пробиотиков является защита клеток от неблагоприятной окружающей среды верхних отделов ЖКТ и последующее их высвобождение в жизнеспособном и метаболически активном состоянии в кишечнике [6].

Основным материалом для изготовления капсул является желатин (натуральный продукт гидролиза коллагенсодержащего сырья), реже используют капсулы, изготовленные из растительного сырья — гидроксипропилметилцеллюлозы. Капсулы на основе полимеров неживотного происхождения широко используются пациентами, имеющими аллергии, а также вегетарианцами. Кроме материала капсул немаловажной является их оболочка, именно она делает капсулы кислотоустойчивыми, благодаря технологии пленочного покрытия, которое может быть нанесено на любой тип капсул. Капсулы, имеющие такое покрытие, называют кишечнорастворимыми. Преимуществом таких капсул является возможность безопасно и эффективно доставлять их содержимое в кишечник за счет длительного растворения (1–2 часа), в то время как обычные желатиновые капсулы без покрытия растворяются в ЖКТ в течение 20 минут [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы микроорганизмов. Материалом исследования являлись полученные в отделе микробной терапии НЦМУ штаммы индигенных энтерококков и лактобацилл, выделенные в период 2020–2021 гг. от пациентов. В исследование вошло 17 штаммов энтерококков: *E. faecium* (n = 10), *E. hirae* (n = 5), *E. durans* (n = 2) и 15 штаммов лактобацилл: *L. fermentum* (n = 3), *L. paracasei* (n = 4), *L. rhamnosus* (n = 5), *L. plantarum* (n = 2) и *L. delbreuckii* (n = 1), полученных и идентифицированных до вида согласно протоколам, описанным в патентах № 2460778 и № 2546253 РФ [7, 8].

Условия культивирования и хранения. Культивирование лактобацилл проводили на селективной питательной среде для лактобацилл МРС (Hi-media, Индия; Conda, Испания), Лактобакагар (Оболensk, Россия), 5 % белково-витаминном концентрате Супро Плюс (ООО «Протеин», Санкт-Петербург) при 37–40 °C в аэробных и анаэробных условиях в течение 24–48 часов. Энтерококки культивировали на селективной питательной среде Энтерококкагар (Оболensk, Россия). Для создания анаэробных условий использовали анаэрогат (Schnett-biotech GmbH, Германия) и газогенерирующие пакеты для создания микроаэрофильных/анаэробных условий Анаэрогаз (ИНКО, Россия).

Хранение микроорганизмов осуществляли в морозильной камере при -70 °C (New Brunswick Scientific, США). Для этого чистые культуры микроорганизмов, выращенные в жидкой питательной среде до стационарной фазы роста, концентрировали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 минут. Отбирали 50–80 % надосадочной жидкости и добавляли 10 % (по объему) стерильного 20 % глицерина. Затем перемешивали на вортексе. Хранение материала осуществляли в течение 6–12 месяцев с проверкой жизнеспособности микроорганизмов каждые 6 месяцев.

Получение биомассы. Чистые культуры микроорганизмов, находящиеся на хранении в криобанке, были рассеяны до отдельных колоний, после чего были использованы для получения посевного материала. Для этого отдельную колонию вносили в 10 мл стерильного 5 % Супро Плюс и инкубировали при 37 °C в течение 24 часов. Далее вносили 1 % посевного материала в 500 мл стерильного 5 % Супро Плюс и культивировали в течение 18 часов при 37 °C. Затем биомассу центрифугировали при 4500 об/мин (Eppendorf, Германия) при 4 °C в течение 20 минут, надосадок сливали, а осадок ресуспендировали в сахарозо-желатиновой защитной среде с/без NaCl, фосфатно-солевого буфера в соотношении 1:2 согласно [9]. Перед сублимационной сушкой проводили оценку общего количества бактерий в 1 мл биомассы. Для этого осуществляли посев всех образцов на плотную питательную среду методом десятикратных серийных разведений. Общее количество бактерий в 1 мл биомассы находилось в диапазоне $5 \cdot 10^7$ – $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. После подготовки биомассу с криопротектором разливали в стерильные флаконы слоем не более 1 см и проводили высушивание в лиофильной сушке FreeZone (Labconco, США) согласно протоколу.

Подготовка и стандартизация лиофилизата. Инкапсуляция. Диспергирование лиофилизата

бактерий проводили с помощью лабораторной мельницы IKA Basic 1 (IKA, Германия). Использовали мельницу с режимом «пульс» для предотвращения гибели клеток при интенсивном механическом и термическом воздействии. Для обеспечения стандартности гранулометрического состава получаемых образцов измельчение биомассы проводили путем протирания через сетку с размером ячеек 0,25 мм, смешивание измельченной биомассы со вспомогательными веществами проводили в герметичной емкости. Для наполнения капсул использовали ручной полуавтоматический капсулятор MC-100 (MC100, Беларусь) с загрузкой на 100 капсул, размер капсул «1», с ориентирующим устройством и трамбовочным инструментом. Использовали кислотоустойчивые капсулы DRcaps™ (Lonza, Россия). DRcaps™ выполнены из гидроксипропилметилцеллюлозы с кислотоустойчивым покрытием.

Контроль качества. Готовую для высушивания биомассу до внесения криопротектора проверяли на отсутствие посторонней микрофлоры, высевая 100 мкл продукта на чашку Петри с СПА (Оболensk, Россия). Лиофилизат после высушивания также проверяли на отсутствие посторонней микрофлоры, для этого 1 г порошка растворяли в 9 мл стерильной воды, перемешивали до растворения и высевали 100 мкл продукта на чашку Петри с СПА и агаром Сабура («ХайМедиа», Индия). Для оценки количества жизнеспособных клеток и наличия контаминации проводили счетный высеv методом последовательных десятикратных разведений с последующим высевом на плотные питательные среды. Для посева использовали СПА, агар Сабура (Лактобакагар (Оболensk, Россия), Энтерококкагар (Оболensk, Россия), хромогенный агар HiCrome Coliform Agar («ХайМедиа», Индия)). Результаты учитывали через 24–72 часа культивирования. Для готовых капсул после наполнения лиофилизатом проводили контроль фармакопейных показателей, таких как: внешний вид на наличие вмятин, трещин, средняя масса содержимого и содержание. Для контроля качества и оценки микробиологической чистоты готовых капсул, капсулы растворяли в физиологическом растворе внесением капсулы в соотношении 1:10 и перемешивали на вортексе до полного растворения. Для оценки количества жизнеспособных клеток в капсуле и наличия контаминации также проводили счетный высеv методом последовательных десятикратных разведений с последующим высевом на вышеперечисленные плотные питательные среды. Результаты учитывали через 24–72 часа культивирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С использованием материалов и методов, описанных ранее, была получена биомасса, содержащая живые аутопробиотические штаммы энтерококков и лактобацилл для последующей сублимационной сушки с добавлением криопротектора различного состава. Готовую биомассу аутопробиотика после центрифугирования и отделения надосадка ресуспендировали в сахарозо-желатиновой защитной среде с/без NaCl, агар-агара, фосфатно-солевого буфера в соотношении 1:2 по объему и высушивали в лиофильной сушке FreeZone согласно протоколу. Результаты проверки количества жизнеспособных микроорганизмов до и после высушивания представлены в таблице 1.

Выживаемость индигенных штаммов после лиофилизации при применении сахарозо-желатиновой защитной среды и без нее была выражена в процентах, результаты представлены в таблице 2. Установлено, что нет достоверных отличий в количестве жизнеспособных микроорганизмов при высушивании в присутствии криопротекторов на основе сахарозы и желатина при добавлении солей натрия и без их добавления. Достоверные отличия наблюдаются при высушивании биомассы без добавления криопротектора, выживаемость клеток при таком высушивании снижается до 40 %, однако абсолютные конечные титры не снижаются ниже 5×10^7 , что является также высоким показателем для количества микроорганизмов в составе пробиотического препарата.

После высушивания лиофилизат крайне неоднородный, потому производили диспергирование полученного лиофилизата согласно методике, описанной выше. После измельчения лиофилизат помещали в отдельную стерильную герметичную емкость для дальнейшего использования. К подготовленному лиофилизату добавляли каолин и магния стеарат. Стеарат магния используется в большинстве рецептур и обеспечивает достаточные скользящие свойства, а каолин обеспечивает необходимые технологические свойства (уменьшает липкость, слеживаемость порошка и увеличивает его текучесть), также обладает обволакивающими и детоксикационными свойствами [11]. Объем капсулы типоразмера «1» равен 0,5 мл. Для заполнения капсулы использовали 130 мг лиофилизата индигенных бактерий *Enterococcus faecium*/*Lactobacillus spp.*, 30 мг каолина и 1,5 мг магния стеарата.

Контроль качества капсул и содержимого проводили согласно методике, описанной в материалах и методах, сразу после получения капсул. Все капсулы прошли контроль качества, посторонней

микрофлоры обнаружено не было. Для оценки возможностей хранения капсулированного аутопробиотика и установления срока годности капсул с лиофилизированными индигенными бактериями контроль количества жизнеспособных микроорганизмов, отсутствия посторонней микрофлоры и общий контроль качества капсул осуществляли через 3, 6 и 12 месяцев хранения. Результаты представлены в таблице 3. Посев осуществлялся методом серийных десятикратных разведений на плотные питательные среды: хромогенный агар, агар Сабуро (для выявления дрожжей и плесеней) и селективную питательную среду для индигенных бактерий — Энтерококкагар для энтерококков и МРС агар для лактобацилл. Все образцы прошли микробиологический контроль, на посевах наблюдались исключительно целевые микроорганизмы. Хранение капсулированных аутопробиотиков осуществляли при температуре 20–25 °С в герметично закрытых емкостях.

В процессе контроля заложенных на хранение образцов сухой биомассы все контролируемые биологические параметры оставались в пределах нормы. Количество жизнеспособных бактерий оставалось на высоком уровне в течение одного года наблюдений — не менее 10^7 КОЕ/г. Контроль фармакопейных показателей капсул в течение срока наблюдения обнаружил, что через 12 месяцев наблюдается потеря исходных свойств капсул в 30 % случаев — часть капсул становилась хрупкой, изменяла цвет, появлялись трещины.

Дополнительно, для оценки влияния неблагоприятных условий хранения капсулированных аутопробиотиков проводили определение жизнеспособности микроорганизмов в капсулах при хранении в условиях повышенной температуры окружающей среды. Для эксперимента были отобраны капсулы с аутопробиотиками на основе разных видов микроорганизмов. Капсулы хранили в термостате при температуре +50 °С в течение 3 и 7 дней. Результаты эксперимента представлены в таблице 4.

В результате проведенного эксперимента было установлено, что количество жизнеспособных микроорганизмов при воздействии высокой температуры снижалось для всех представленных образцов. Однако некоторые штаммы в составе капсул оставались жизнеспособными даже после 7 суток хранения при 50 °С. Таким образом, можно заключить, что аутопробиотики в капсулированной форме являются удобной альтернативой жидкой формы, более удобны для хранения и транспортировки, не требуют специальных температурных режимов содержания.

Таблица 1. Общее количество жизнеспособных бактерий

Номер образца	Вид микроорганизма	Количество жизнеспособных микроорганизмов, КОЕ/г			
		Биомасса	Лиофилизат СЖ	Лиофилизат СЖ+0,9 % NaCl	Лиофилизат СЖ+ФБС
1.	<i>E. faecium</i>	5×10 ⁷	9×10 ⁸	1×10 ⁹	1×10 ⁹
2.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁸	1×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
3.	<i>E. faecium</i>	5×10 ⁷	1×10 ⁹	1×10 ⁹	2×10 ⁹
4.	<i>E. faecium</i>	5×10 ⁷	7×10 ⁸	8×10 ⁸	8×10 ⁸
5.	<i>E. faecium</i>	5×10 ⁷	1×10 ⁹	1×10 ⁹	1×10 ⁹
6.	<i>E. faecium</i>	7×10 ⁷	2×10 ⁹	1×10 ⁹	2×10 ⁹
7.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁸	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
8.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁸	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
9.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁸	1×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
10.	<i>E. faecium</i>	5×10 ⁷	1×10 ⁹	1×10 ⁹	1×10 ⁹
11.	<i>E. hirae</i>	5×10 ⁷	1×10 ⁹	1×10 ⁹	1×10 ⁹
12.	<i>E. hirae</i>	6×10 ⁷	2×10 ⁹	1×10 ⁹	2×10 ⁹
13.	<i>E. hirae</i>	6×10 ⁷	1×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
14.	<i>E. hirae</i>	1×10 ⁸	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
15.	<i>E. hirae</i>	5×10 ⁷	2×10 ⁹	1×10 ⁹	2×10 ⁹
16.	<i>E. durans</i>	1×10 ⁸	3×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
17.	<i>E. durans</i>	1×10 ⁸	2×10 ⁹	3×10 ⁹	3×10 ⁹
18.	<i>L. fermentum</i>	3×10 ⁶	4×10 ⁷	6×10 ⁷	6×10 ⁷
19.	<i>L. fermentum</i>	6×10 ⁷	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
20.	<i>L. fermentum</i>	7×10 ⁷	1×10 ⁹	1×10 ⁹	1×10 ⁹
21.	<i>L. paracasei</i>	1×10 ⁸	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
22.	<i>L. paracasei</i>	1×10 ⁸	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
23.	<i>L. paracasei</i>	7×10 ⁸	6×10 ⁹	8×10 ⁹	8×10 ⁹
24.	<i>L. paracasei</i>	1×10 ⁸	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
25.	<i>L. rhamnosus</i>	2×10 ⁸	3×10 ⁹	3×10 ⁹	3×10 ⁹
26.	<i>L. rhamnosus</i>	1×10 ⁸	1×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
27.	<i>L. rhamnosus</i>	3×10 ⁸	5×10 ⁹	5×10 ⁹	5×10 ⁹
28.	<i>L. rhamnosus</i>	5×10 ⁸	8×10 ⁹	8×10 ⁹	8×10 ⁹
29.	<i>L. rhamnosus</i>	2×10 ⁸	4×10 ⁹	4×10 ⁹	4×10 ⁹
30.	<i>L. plantarum</i>	5×10 ⁸	8×10 ⁹	8×10 ⁹	8×10 ⁹
31.	<i>L. plantarum</i>	1×10 ⁸	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
32.	<i>L. delbreuckii</i>	1×10 ⁷	2×10 ⁸	2×10 ⁸	2×10 ⁸

* СЖ — сахарозо-желатиновая защитная среда (10 % сахара, 1 % желатин); ФБС — фосфатно-солевой буфер.

Таблица 2. Выживаемость индигенных штаммов после лиофилизации при применении сахарозо-желатиновой защитной среды

Криопротектор	Выживаемость клеток после лиофилизации
10 % сахароза, 1 % желатин	80 ± 2 %
10 % сахароза, 1 % желатин в фосфатно-солевом буфере	80 ± 2 %
10 % сахароза, 1 % желатин в 0,9 % растворе NaCl	80 ± 2 %
Без криопротектора	37 ± 8 %

Таблица 3. Изменение количества жизнеспособных микроорганизмов в капсулированных аутопробиотиках с течением времени

Номер образца	Вид микроорганизма	Количество жизнеспособных микроорганизмов, КОЕ/г		
		1 неделя	3 месяца	6 месяцев
1.	<i>E. faecium</i>	9×10 ⁸	8,5×10 ⁸	8,5×10 ⁸
2.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁹	1×10 ⁹	9×10 ⁸
3.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁹	1×10 ⁹	9×10 ⁸
4.	<i>E. faecium</i>	7×10 ⁸	7×10 ⁸	6,5×10 ⁸
5.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁹	9,5×10 ⁸	9,5×10 ⁸
6.	<i>E. faecium</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	1,5×10 ⁹
7.	<i>E. faecium</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
8.	<i>E. faecium</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
9.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁹	1×10 ⁹	9,5×10 ⁸
10.	<i>E. faecium</i>	1×10 ⁹	9,5×10 ⁸	9,5×10 ⁸
11.	<i>E. hirae</i>	1×10 ⁹	1×10 ⁹	1×10 ⁹
12.	<i>E. hirae</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
13.	<i>E. hirae</i>	1×10 ⁹	1×10 ⁹	9×10 ⁸
14.	<i>E. hirae</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
15.	<i>E. hirae</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
16.	<i>E. durans</i>	3×10 ⁹	3×10 ⁹	2,5×10 ⁹
17.	<i>E. durans</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	1,5×10 ⁹
18.	<i>L. fermentum</i>	4×10 ⁷	4×10 ⁷	3×10 ⁷
19.	<i>L. fermentum</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	1,5×10 ⁹
20.	<i>L. fermentum</i>	1×10 ⁹	1×10 ⁹	1×10 ⁹
21.	<i>L. paracasei</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
22.	<i>L. paracasei</i>	2×10 ⁹	2×10 ⁹	2×10 ⁹
23.	<i>L. paracasei</i>	6×10 ⁹	5,5×10 ⁹	5,5×10 ⁹

24.	<i>L. paracasei</i>	2×10^9	2×10^9	2×10^9
25.	<i>L. rhamnosus</i>	3×10^9	3×10^9	3×10^9
26.	<i>L. rhamnosus</i>	1×10^9	1×10^9	9×10^8
27.	<i>L. rhamnosus</i>	5×10^9	$4,5 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$
28.	<i>L. rhamnosus</i>	8×10^9	8×10^9	7×10^9
29.	<i>L. rhamnosus</i>	4×10^9	$3,5 \times 10^9$	3×10^9
30.	<i>L. plantarum</i>	8×10^9	$7,5 \times 10^9$	$7,5 \times 10^9$
31.	<i>L. plantarum</i>	2×10^9	$1,5 \times 10^9$	1×10^9
32.	<i>L. delbreuckii</i>	2×10^8	2×10^8	2×10^8

Таблица 4. Влияние высокой температуры на жизнеспособность микроорганизмов в составе капсул с аутопробиотиками

Вид микроорганизма	КОЕ/мл, до эксперимента	КОЕ/мл, 3 дня	КОЕ/мл, 7 дней
<i>Enterococcus spp.</i>			
<i>E. faecium</i>	2×10^9	4×10^7	3×10^6
<i>E. faecium</i>	4×10^8	1×10^6	---
<i>E. hirae</i>	2×10^8	5×10^3	---
<i>E. hirae</i>	5×10^8	4×10^7	3×10^6
<i>E. durans</i>	2×10^9	7×10^7	1×10^6
<i>Lactobacillus spp.</i>			
<i>L. fermentum</i>	4×10^6	1×10^4	---
<i>L. paracasei</i>	2×10^8	---	---
<i>L. rhamnosus</i>	2×10^8	3×10^4	3×10^3
<i>L. plantarum</i>	2×10^8	7×10^6	1×10^6

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инкапсуляция является современным способом выпуска биологически активных добавок к пище, различных пробиотических препаратов с возможностью прогнозирования и планирования заданных потребительских свойств и качественных характеристик жизнеспособности микроорганизмов в составе продукта. Мы успешно апробировали метод капсулирования штаммов аутопробиотиков и показали сохранение стабильности биологических свойств аутопробиотических культур при лиофилизации и последующем хранении. В работе мы использовали классическую композицию, состоящую из сахарозы и желатина, что позволило нам получить высокую степень выживаемости

клеток бактерий как после процесса лиофилизации, так и после экспериментов по ускоренному старению образцов капсул. Метод может быть применен для рутинного получения аутопробиотиков в форме капсул со сроком хранения 1 год.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors stated no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования РФ. Соглашение № 075-15-2022-302 (20.04.2022). / The study was supported by the Ministry of Science

and Higher Education of the Russian Federation, Agreement No. 075-15-2022-302 (20.04.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Патент № 2126043 Российская Федерация, МПК С 12 N 1/20, А 61 К 35/74. Способ получения банка аутохтонных штаммов микроорганизмов для восстановления кишечного микробиоценоза человека / Хачатрян А.П., Хачатрян Р.Г.; заявители и патентообладатели Хачатрян А.П., Хачатрян Р.Г. — 97112279/13; заявл. 29.07.1997; опубл. 10.02.1999.
2. Соловьева О.И. Использование пробиотиков и аутопробиотиков в лечении синдрома раздраженной толстой кишки / О. И. Соловьева, В. И. Симаненков, А. Н. Суворов, Е. И. Ермоленко, И. А. Шумихина, Д. А. Свиридо. //Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2017. — № 7 (143). — С. 115–120.
3. Капсулирование пробиотиков в гидрофильные полимеры: сборник статей Международной научно-практической конференции «Биотехнология и общество в XXI в.», 15–18 сентября 2015 г. / редкол. А. А. Ильичев [и др.]. — Барнаул: Алтайский государственный университет, 2015. — 176–179 с.
4. Гордиенко П.А. Научное обоснование создания новых лекарственных форм пробиотиков (обзор литературы и результаты собственных экспериментов) / П. А. Гордиенко, В. И. Чуешов, А. Д. Гордиенко, Е. В. Кудогоцева // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. — 2015. — № 22. (219). — С. 121–127.
5. Frolova MD. Osobennosti razrabotki liofilizirovannykh zakvasok // Molochnaya promyshlennost'. 2008. — № 6. — S. 70–71.
6. Технологии инкапсуляции в пищевой промышленности: материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых «Научные исследования и разработки к внедрению в АПК», 29–30 марта 2018 г.: / редкол.: Г. О. Такаландзе [и др.]. — Иркутск: ИРГСХА, 2018. — 456 с.
7. Патент № 2460778 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А61К 35/74, А23С 9/127. Способ получения аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина / Суворов А.Н., Симаненков В.И., Сундукова З.Р., Ермоленко Е.И., Цапиева А.Н., Донец В.Н., Соловьева О.И.; заявители и патентообладатели Суворов А.Н., Симаненков В.И. — № 2010154822/10; заявл. 30.12.2010; опубл. 10.09.2012, Бюл. № 16. — 7 с.
8. Патент № 2546253 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, С12Q 1/68, А61К 35/74, А23С 9/123. Способ получения персонифицированного аутопробиотического продукта и способ лечения синдрома раздраженной кишки с использованием этого про-

дукта / Симаненков В.И., Суворов А.Н., Соловьева О.И., Ермоленко Е.И., Цапиева А.Н., Сундукова З.Р.; заявители и патентообладатели Симаненков В.И., Суворов А.Н. — № 2013120765/10; заявл. 25.04.2013; опубл. 10.04.2015, Бюл. № 10. — 18 с.

9. Кузьмина О.М. Конструирование защитных сред для криоаморазивания молочнокислых бактерий // Научное обеспечение молочной промышленности (ВНИМИ-80 лет): Сборник научных трудов. — М.: ВНИМИ, 2009. — С. 228–232.

10. Похиленко В.Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В. Д. Похиленко, А. М. Баранов, К. В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. — 2009. — № 4(12). — С. 99–121.

11. Государственная фармакопея СССР. Издание XI. Вып. 2: Общие методы анализа, лекарственное растительное сырье. // М.: Медицина, — 1989. — 398 с.

Информация об авторах:

Цапиева Анна Николаевна, к.б.н., научный сотрудник отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Морозова Анастасия Олеговна, младший научный сотрудник отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Карасева Алена Борисовна, научный сотрудник отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Новикова Надежда Сергеевна, научный сотрудник отдела микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ»;

Суворов Александр Николаевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом микробной терапии НОЦ «Молекулярные основы взаимодействия микроорганизмов и человека» НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБНУ «ИЭМ».

Author information:

Tsapieva Anna N., research fellow at Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine;

Morozova Anastasia O., junior researcher at Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine;

Karaseva Alena B., research associate at Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine;

Novikova Nadezhda S., research associate fellow at Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine;

Suvorov Alexander N., PhD, Dr. Med. Sci., professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of Microbial therapy Department of Scientific and educational center “Molecular bases of interaction of microorganisms and human” of World-Class Research Centre for Personalized Medicine of Institute of Experimental Medicine.