

УДК 604:615.4

## КАПСУЛИРОВАННЫЕ В АЛЬГИНАТ ПРОБИОТИКИ: ПОЛУЧЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА

© 2022 г. А. Н. Сомов<sup>1</sup>, \*, В. Д. Похиленко<sup>1</sup>, И. А. Дунайцев<sup>1</sup>, М. В. Клыкова<sup>1</sup>, И. А. Чукина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Оболensk, 142279 Россия

\*e-mail: somov@obolensk.org

Поступила в редакцию 01.08.2022 г.

После доработки 25.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Получены микрокапсулированные препараты пробиотических штаммов *Propionibacterium freudenreichii* и *Lactobacillus helveticus* при помощи инкапсулирующей установки В-395 Pro (Büchi, Швейцария). С использованием форсунок 80, 150 и 300 мкм методом отверждения альгинатных водных растворов получены микросферы (микрогранулы) средним диаметром 160, 375 и 850 мкм. Показано, что в состав гранул включается более 98% живых бактериальных клеток, которые легко и без потери жизнеспособности могут быть переведены из гранул в водный раствор инкубацией с хелатирующими соединениями, например, цитратом натрия. В составе микрогранул данные микроорганизмы сохраняют удовлетворительную жизнеспособность до 3 месяцев при хранении в виде суспензии в физрастворе в условиях бытового холодильника. При этом пропионовокислые бактерии продемонстрировали значительно большую стабильность при хранении. Отмечено, что предлагаемые производителем методы расчета среднего размера микрогранул неточны. Для улучшения устойчивости капсулированных пробиотиков в желудочно-кишечном тракте возможно нанесение на частицы препарата дополнительных оболочек с использованием этой же установки. В результате данной работы отработана технология капсулирования бактериальных клеток в альгинатную оболочку с получением пробиотических препаратов с характеристиками, позволяющими их практическое применение и дальнейшее совершенствование.

**Ключевые слова:** пробиотики, пропионовокислые бактерии, лактобациллы, микрокапсулирование, альгинат натрия

DOI: 10.56304/S0234275822050131

В последние годы наблюдается растущий интерес к использованию ряда микроорганизмов в качестве перорального лекарственного средства, улучшающего метаболизм, иммунитет и общее состояние здоровья животных и человека [1, 2]. Эффект максимален при достаточной концентрации таких микроорганизмов-пробиотиков в нижних отделах желудочно-кишечного тракта. Для проявления своего позитивного действия пробиотики должны удерживаться в толстом кишечнике в жизнеспособном состоянии достаточное время [1, 3, 4]. Многие пробиотики не выдерживают пребывания в агрессивной среде верхних отделов ЖКТ, а также быстро выводятся из ЖКТ, что де-

лает их применение проблематичным [1, 5–7]. Одним из способов решения этой проблемы считают капсулирование живых пробиотических микроорганизмов в растворимую оболочку, способную раскрываться и некоторое время удерживать свое содержимое в толстом кишечнике [6–8]. Часто для капсулирования используют полисахарид из морских водорослей – альгинат натрия, который при помещении в раствор кальциевой соли может затвердевать, образуя достаточно прочные и пластичные гелевые частицы, растворимые в водных средах с веществами, связывающими ионы кальция [5, 9]. В нашей работе мы получали препараты капсулированных пробиотиков двух разных видов бацилл: *Propionibacterium freudenreichii* и *Lactobacillus helveticus*, и изучали их свойства. Препараты получали на установке для капсулирования Encapsulator В-395 Pro (Büchi Labortechnik AG, Швейцария).

*Список сокращений:* ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; КОЕ – колониеобразующие единицы; МО – микроорганизм; MRS – Man Rogosa Sharp, среда для культивирования молочнокислых бактерий; ПГРМ – панкреатический гидролизат рыбной муки; ПАВ – поверхностно-активное вещество, УЗ – ультразвук.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В экспериментах использовали имеющиеся в коллекции “ГКПМ-Оболенск” Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ) штаммы симбиотических микроорганизмов, а именно типовые лактобациллы – *Lactobacillus helveticus* штамм ВФ1 и пропионовокислые бактерии – *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii* штамм № В-9352. В рабочем состоянии их поддерживали методом субкультивирования на MRS– и лактобакагаре. Для выделения и культивирования использовали плотную сухую питательную среду для лактобацилл “Лактобакагар” (Оболенск, ГНЦ ПМБ). Суточную культуру *P. freudenreichii* с чашки с лактобакагаром, выращенную в микроаэрофильных условиях при 37°C, заседали во флаконы с 100 мл питательной среды ПГРМ с добавлением глюкозы и цистеина (рН 7.2) и подрощивали при тех же условиях еще 24 ч, анализируя рН и оптическую плотность. Полученную культуральную жидкость центрифугировали в режиме 2200 g 10 мин с использованием центрифуги LMC-4200R (BioSan, Латвия), клеточную массу промывали физраствором и разводили в 20 раз физраствором, определяя количество живых клеток посевом на чашки с плотной питательной средой. Культивирование *L. helveticus* проводили при 36°C в анаэробных условиях в 200 мл флаконах на питательной среде MRS бульон (Condalab, Испания). Клетки *L. helveticus* отделяли от питательной среды центрифугированием при 2200 g в течение 10 мин, осажденные клетки промывали в физраствором, повторно центрифугировали при тех же режимах, ресуспендировали в физрастворе и методом стандартных высевов определяли КОЕ полученной суспензии.

Для приготовления технологических растворов использовали безводные CaCl<sub>2</sub> и NaCl марки хч, двузамещенный цитрат натрия, неионный ПАВ Твин 20 (Sigma, США) и альгиновокислый на-

трий (“Реахим”, Россия). Все растворы готовили на деионизованной воде с удельным сопротивлением 18.2 МОм см и дополнительно фильтровали. Стерилизовали растворы автоклавированием в стандартных условиях (0.5 атм. 20 мин). Водные растворы альгината натрия после автоклавирования очищали от деструктурированных фракций центрифугированием при 2000 g в течение 3–5 мин, осадок удаляли.

Капсулированные препараты получали методом полимеризации капель альгината натрия в водных растворах хлористого кальция (0.1 М) на установке для капсулирования Encapsulator B-395 Pro (Büchi Labortechnik AG, Швейцария) в соответствии с инструкцией производителя [10]. Использовали форсунки диаметром 80, 150 и 300 мкм, причем для каждой из форсунок и каждого рабочего раствора оптимальный режим подбирался отдельно, описание режимов приведено в табл. 1.

В качестве рабочего раствора использовали смесь суспензии бактериальных клеток и водного раствора альгината натрия двух разных концентраций (см. табл. 1) в соотношении 1 : 4 по объему. Полимеризующим раствором служил 0.1 М водный раствор CaCl<sub>2</sub> с 0.1%-ным Твин 20. После отверждения микросфер в реакторе установки в течение 8–10 мин раствор кальция сливали без контакта содержимого реактора с окружающей средой, полученные микросферы отмывали стерильным физраствором с добавлением 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и переносили в пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой, где хранили при температуре 4°C до использования.

Определение размеров капсул проводили методом анализа дифракции света на лазерном гранулометре MicroTec Plus (Fritsch, Германия) в следующем режиме: производительность насоса 4, интенсивность УЗ диспергирования 4, трехкратный опрос датчиков, расчет по Фраунгоферу. Морфологию капсул оценивали визуально в световом мик-

**Таблица 1.** Режимы работы установки для капсулирования Encapsulator B-395 Pro

**Table 1.** Operating modes of the Encapsulator B-395 Pro for the present work

Рабочие параметры, с форсункой	Концентрация альгината натрия, %					
	1.5	3	1.5	3	1.5	3
	80 мкм		150 мкм		300 мкм	
Скорость подачи рабочего раствора, см <sup>3</sup> /мин	5	5	7–9	8–10	15	15
Частота вибрации, кГц	2	2	0.7–0.9	0.8–1.0	0.6	0.6
Напряжение на индукторе заряда, В	2000	1200	1200	1200	1200	1200
Магнитная мешалка, % от макс. оборотов	60–70	60–70	60–70	60	60	60
Введенный объем рабочего раствора/Объем р-ра CaCl <sub>2</sub> , см <sup>3</sup> /см <sup>3</sup>	20/450	20/450	20/400	20/450	20/420	20/420

**Таблица 2.** Результаты измерения размера капсул с клетками *P. freudenreichii* и *L. helveticus* гранулометром MicroTec Plus**Table 2.** Results of the measurements of the capsules with *P. freudenreichii* and *L. helveticus* cells by using the MicroTec Plus particle sizer

Диаметр (мкм) сопла форсунки	Вид бактерии-пробиотика	Мода 1, мкм (объемн. %)	Мода 2, мкм (объемн. %)	Мода 3, мкм (объемн. %)	Медиана мкм
80	<i>Pr. freudenreichii</i>	157 ± 5 (100)	—	—	157 ± 5
	<i>L. helveticus</i>	154 ± 19 (96)	—	—	159 ± 24
150	<i>Pr. freudenreichii</i>	94 ± 15 (2 и 25)*	378 ± 57 (85)	1200 ± 190 (3)	338 ± 33
	<i>L. helveticus</i>	104 ± 11 (1 и 26)*	360 ± 49 (81)	1050 ± 50 (5)	335 ± 31
300	<i>Pr. freudenreichii</i>	170 ± 50 (14)	806 ± 31 (86)	—	750 ± 5
	<i>L. helveticus</i>	140 ± 55 (11)	863 ± 45 (89)	—	800 ± 5

*Примечание:* \* меньшее значение для рабочего раствора на основе 1.5%-ного, большее – 3%-ного альгината.

*Note.* \* lower value for the working solution based on the 1.5% alginate, and higher for the 3% alginate solution.

**Таблица 3.** Результаты измерения размера капсул с *P. freudenreichii* и *L. helveticus* для рабочих растворов с разным содержанием альгината (объединено для двух МО)**Table 3.** Results of the measurements of the capsules with *P. freudenreichii* and *L. helveticus* cells for the solutions having different alginate concentration (combined results for the two microorganisms)

Диаметр сопла форсунки	Концентрация альгината, %	Мода 1, мкм (объемн. %)	Мода 2, мкм (объемн. %)	Мода 3, мкм (объемн. %)	Медиана, мкм
80	1.5	159 ± 20 (96)	—	—	159 ± 20
	3	157 ± 14 (100)	—	—	157 ± 14
150	1.5	115 ± 60 (2.5)	338 ± 38 (95)	1000 ± 200 (4)	322 ± 33
	3	104 ± 9 (6)	412 ± 20 (77)	1130 ± 200 (3)	389 ± 76
300	1.5	194 ± 31 (16)	834 ± 48 (84)	—	788 ± 46
	3	189 ± 54 (10)	863 ± 43 (89)	—	788 ± 25

роскопе “Биомед” (Россия) при минимальном увеличении и в цифровом микроскопе MSZ-APO-V (Correct, Япония).

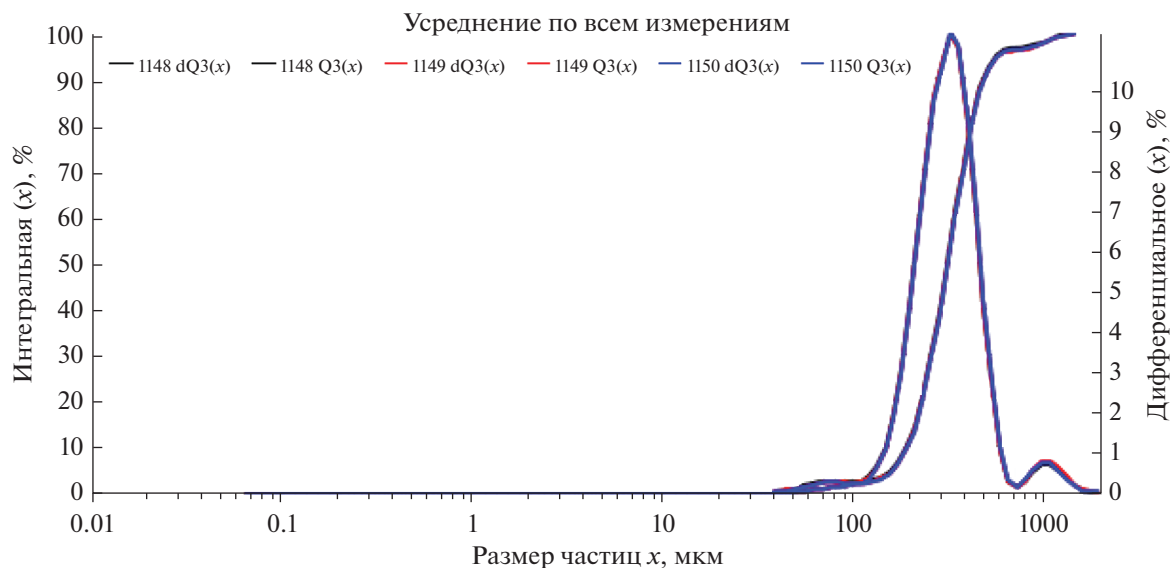
Определение количества живых клеток в капсулированных препаратах проводили следующим образом. Из пластиковой 50 мл пробирки специальным отборником переносили 200 мкл суспензии капсул в 1 мл раствора цитрата натрия 1–2%-ного (в зависимости от размера капсул) и выдерживали 30–60 мин для растворения их оболочки. Отбирали 0.5 мл жидкой смеси, вносили в пробирки с физраствором, проводили серийные разведения и высевали на чашки с лактобакагаром. Чашки помещали в микроаэрофильные условия в термостате при 37°C на 48 ч, после чего подсчитывали число колоний. Высушенный капсулированный препарат растворяли в 2 мл воды и через 15 мин добавляли 2 мл 2%-ного раствора цитрата натрия,

на 30–60 мин. Затем титровали физраствором, высевали на чашки с лактобакагаром и инкубировали в тех же условиях.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными математическими методами корреляционного и дисперсионного анализа [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты измерений размера капсул лазерным гранулометром MicroTec Plus приведены в табл. 2 для препаратов на основе двух разных видов МО. Для иллюстрации на рис. 1 для одного из препаратов приведено типичное графическое представление распределения капсул/частиц по размерам, полученное при помощи прибора MicroTec Plus и программы обработки результатов MaS Control (Fritsch).



**Рис. 1.** Графическое представление распределения микрогранул по размерам для препарата с клетками *Pr. freudenreichii* на основе 1.5%-ного альгината, полученного с форсункой 150 мкм (объединение трех измерений с построением дифференциального и интегрального распределений) при помощи программы обработки результатов MaS Control (Fritsch).

**Fig. 1.** Graphical image of the microgranules diameters distribution for the preparation containing *Pr. freudenreichii* cells on the base of 1.5% alginate solution, the nozzle 150  $\mu\text{m}$ . Three measurements were combined, and the differential and integral distributions were calculated by using the data treatment program MaS Control (Fritsch).

Как следует из данных табл. 2, достоверной разницы в размерах капсул с разными МО не выявлено. Результаты сравнительного анализа размеров капсул, полученных в рабочих растворах с различающейся в 2 раза концентрацией альгината натрия приведены в табл. 3.

Достоверной разницы в размерах получаемых капсул и в этом случае не обнаружено. Таким образом, по результатам измерений размеров капсул, получаемых на установке В-395 Pго, можно сделать следующие выводы.

1. Диаметр сопла форсунки в условиях проведенных экспериментов является определяющим фактором размера получаемых капель (микросфер). Размер частиц в основной фракции микросфер в 2 (форсунка 80 мкм) или 2.5 раза (форсунки 150 и 300 мкм) больше диаметра сопла форсунки и составляет 160, 375 и 850 мкм соответственно.

2. Двукратная разница в содержании альгината не влияла на размер получаемых капсул (капель).

3. Присутствие бактериальных клеток в составе смеси не влияло на размер капель/гранул.

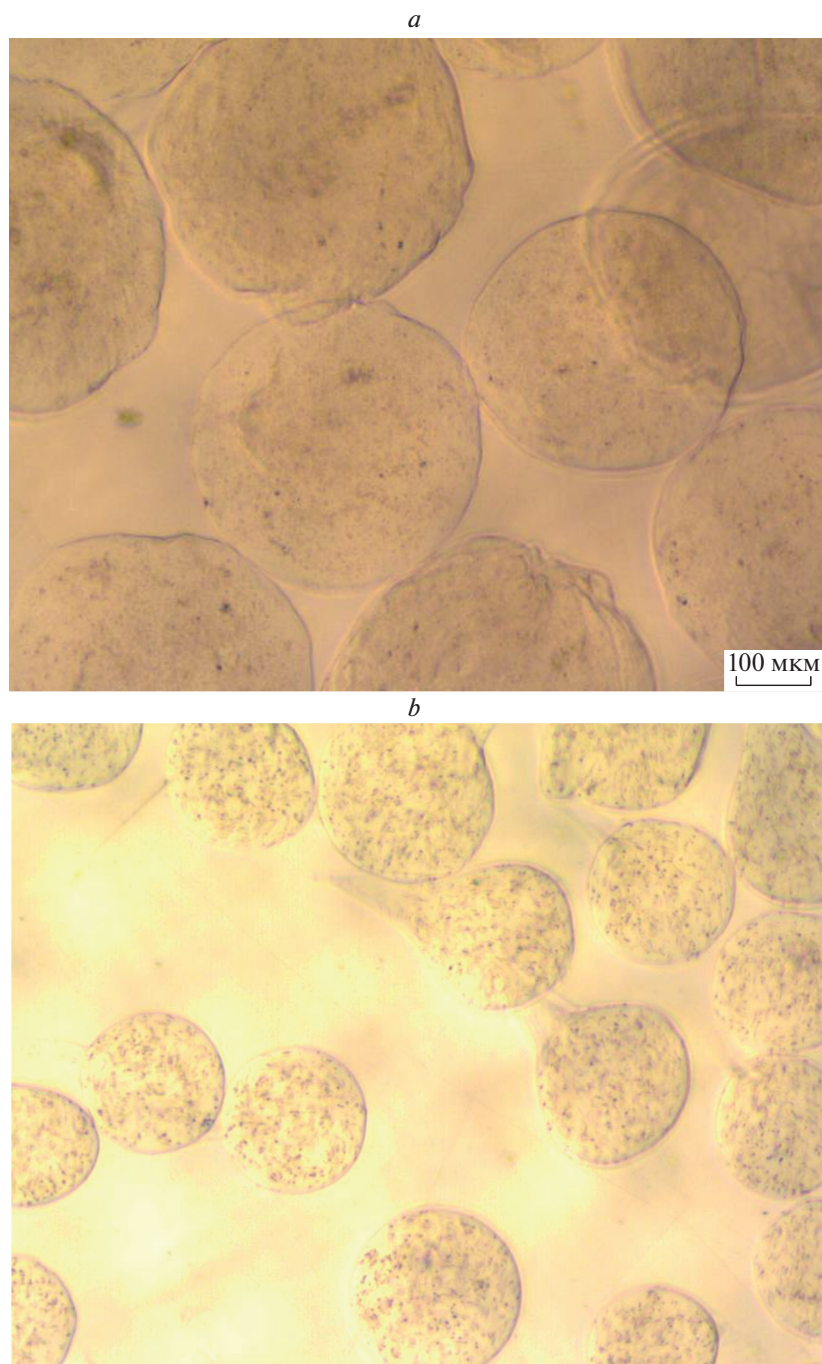
4. Характерно нарушение монодисперсности получаемых капель (капсул) для форсунок с соплом шире 80 мкм по причине образования сателлитных мелких капель приблизительно в 3–4 раза меньшего диаметра. Эта мелкая фракция составляет до 20% общего объема, и увеличивается с ро-

стом диаметра сопла как в отношении среднего размера капель, так и их доли.

5. Расчет диаметра капель по формулам, предложенным производителем оборудования на основании гидродинамической теории колебательного разрыва струи жидкости [10, 12] не дает точной оценки размера получаемых гранул, сильно завышая эти величины для мелких частиц (см. Приложение 1). Это может быть связано как с созреванием геля, формирующего частицы препарата, так и с учетом влияния капиллярных сил при формировании капель и их электрического заряда: разница расчетных значений размеров частиц и определяемых опытным путем тем больше, чем меньше диаметр сопла форсунки и, соответственно, диаметр капель (Приложение 1).

Морфологически получаемые гранулы с пробиотиками представляют собой округлые, почти сферические частицы с визуально неопределяемой оболочкой, “нафаршированные” равномерно распределенными по объему бактериальными клетками (рис. 2). Присутствует фракция “грушевидных” частиц с конусообразным выступом. Такая форма капель, согласно современным работам [13], может быть вызвана игрой электростатических и капиллярных сил и фиксироваться при быстром затвердевании капель в полимеризующем растворе.

Гранулы с бактериальными клетками в виде суспензии в физрастворе сохраняли форму, размеры и



**Рис. 2.** Микрофотографии полученные с помощью цифрового микроскопа MSZ-APO-V. *a* – микрогранулы культуры *Pr. freudenreichii* образованные на основе 1.5%-ного альгината, с использованием форсунки 150 мкм; *b* – культуры *L. helveticus* на основе 3%-ного альгината, с использованием форсунки 80 мкм.

**Fig. 2.** Microphotograph obtained with a digital microscope MSZ-APO-V *a* – *Pr. freudenreichii* cell culture microgranules formed on the basis of 1.5% alginate using the 150  $\mu\text{m}$  nozzle; *b* – *L. helveticus* cell culture microgranules based on 3% alginate, using the 80  $\mu\text{m}$  nozzle.

содержимое при хранении в условиях бытового холодильника (+4°C) не менее трех месяцев.

Результаты определения содержания живых клеток пробиотиков в препаратах (Т) путем высевов на

плотную питательную среду и подсчета колоний микроорганизмов (КОЕ) приведены в табл. 4.

Согласно расчетам (см. Условия эксперимента), как правило, вне гранул остается не более

**Таблица 4.** Содержание живых клеток в препаратах пробиотиков до и после инкапсулирования в альгинатную оболочку**Table 4.** The content of living cells in the probiotic preparations before and after encapsulation into the alginate shell

Диаметр сопла форсунки, мкм	Концентрация альгината, %	Культура МО	Значение КОЕ, $T \times 10^{-7}$ в 1 мл			Тк/Тс %
			в суспензии с альгинатом, Тс	в капсулах, Тк	вне капсул, Тн	
80	1.5	<i>Pr. freuden</i>	55.5 ± 51	30.8 ± 10	0.036 ± 0.0205	55
		<i>L. helvetic</i>	19.1 ± 1.8	13.9 ± 12.1	0.0136 ± 0.0179	73
	3	<i>Pr. freuden</i>	55.5 ± 51	26.5 ± 5.5	0.0027 ± 0.0040	48
		<i>L. helvetic</i>	19.1 ± 1.8	6.5 ± 6.1	0.0025 ± 0.0042	34
150	1.5	<i>Pr. freuden</i>	95 ± 8	57 ± 30	0.012 ± 0.012	59
		<i>L. helvetic</i>	45.5 ± 22.2	39.5 ± 32	0.0019 ± 0.0005	87
	3	<i>Pr. freuden</i>	95 ± 8	25 ± 23	0.071 ± 0.076	26
		<i>L. helvetic</i>	45.5 ± 22.2	35.8 ± 30	0.0031 ± 0.0039	79
300	1.5	<i>Pr. freuden</i>	92 ± 32	26 ± 20	0.042 ± 0.0035	28
		<i>L. helvetic</i>	35.7 ± 23.9	25.8 ± 21	0.0013 ± 0.0008	72
	3	<i>Pr. freuden</i>	92 ± 32	13.6 ± 4.1	0.0029 ± 0.0011	15
		<i>L. helvetic</i>	35.7 ± 23.9	14.5 ± 7	0.0003 ± 0.0002	41

**Таблица 5.** Содержание живых клеток пробиотических бактерий *P. freudenreichii* в капсулированных препаратах после их хранения при температуре +4°C**Table 5.** Content of the living cells of the probiotic *P. freudenreichii* within encapsulated preparations after their storage at +4°C for the weeks

Содержание альгината, %	Содержание живых клеток $T \times 10^{-6}$ КОЕ/см <sup>3</sup> после хранения, недель						
	0	1	2	4	8	12	16
1.5	698 ± 445	252	306 ± 186	263 ± 115	31 ± 5.7	2.75 ± 4.1	0.01
3	411 ± 140	164	210 ± 94	177 ± 35	6.8	0.57 ± 0.57	<0.0001
Среднее ± станд. отклонение	546 ± 344	208 ± 62	258 ± 142	221 ± 86	22.9 ± 14.5	1.66 ± 2.89	0.005

0.5% клеток. В то же время в собранных гранулах оказывается свыше 98% живых бактериальных клеток, а именно в среднем  $98.4 \pm 3\%$  для *Pr. freudenreichii* и  $98.9 \pm 1.8\%$  для *L. helveticus*. Потери связа-

ны в основном с прилипанием материала к стенкам реактора, и при тщательном выборе режиме работы установки их обычно удавалось свести к долям процента. Доля включенных в гранулы клеток не

**Таблица 6.** Содержание живых клеток пробиотических бактерий *L. helveticus* в капсулированных препаратах после их хранения при температуре +4°C**Table 6.** Content of the living cells of the probiotic *L. helveticus* within encapsulated preparations after their storage at +4°C for the weeks

Содержание альгината, %	Содержание живых клеток $T \times 10^{-6}$ КОЕ/см <sup>3</sup> после хранения, недель					
	0	1	2	4	8	12
1.5	220 ± 210	20.6 ± 13.1	3.47 ± 3.26	0.16 ± 0.22	0.30 ± 0.42	0.0008 ± 0.0017
3	180 ± 154	40.6	3.5	0.18 ± 0.26	0.000026 ± 0.00004	0.0011 ± 0.0023
Среднее ± станд. отклонение	204 ± 12	24.6 ± 14.5	3.47 ± 2.82	0.17 ± 0.22	0.012 ± 0.026	0.001 ± 0.0018

зависела от вида бактерий, диаметра сопла форсунки и содержания альгината, то же относится и к потерям. Приведенная в табл. 3 величина отношения определяемого титра живых клеток в капсулах к их титру в суспензии  $T_k/T_c$ , как следует из приведенных данных, варьировала от 0.25 до почти 0.90 (в среднем  $0.51 \pm 0.23$  [12]) и может быть полезной для априорной оценки количества живых клеток в получаемом капсулированном препарате.

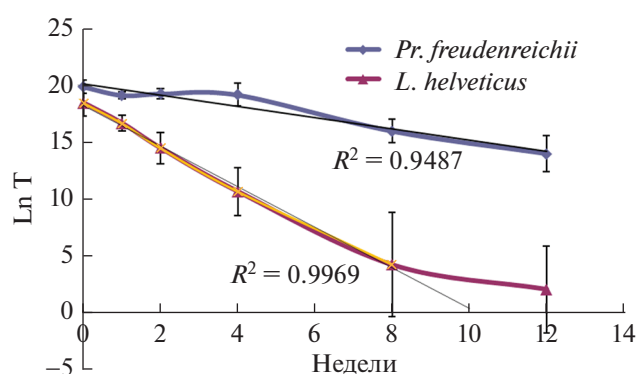
Полученные капсулированные препараты выдерживали в виде жидкой суспензии в физиологическом растворе с добавлением ионов кальция в условиях бытового холодильника от 2 до 4 мес. Результаты определения количества живых клеток в хранившихся препаратах представлены в табл. 5 и 6.

Как следует из приведенных в таблицах данных, кинетика инактивации сильно различается у двух микроорганизмов (рис. 3).

В начальный период хранения при температуре  $4^\circ\text{C}$  кинетика снижения числа живых клеток удовлетворительно описывается экспоненциальной зависимостью, причем лактобациллы теряют жизнеспособность гораздо быстрее (на порядки величины), чем пропионовокислые бактерии. Для пропионовокислых бактерий отмечена тенденция к более быстрому падению содержания живых клеток у препаратов с большим количеством альгината в капсулах, т.е. с более плотными частицами (статистически недостоверно). Тенденция к пониженному содержанию живых клеток в частицах с повышенным содержанием альгината непосредственно после капсулирования также наблюдалась уже для обоих штаммов (табл. 3).

В данной работе мы попытались выяснить закономерности получения инкапсулированных в альгинатную матрицу бактериальных клеток с использованием современной технологии, воплощенной в установке Büchi-395 Pro. Ранее в ряде аналогичных работ и в обзорах [1–9, 16] были описаны похожие результаты, однако многие вопросы оставались невыясненными. Так, в работе [16] авторы доложили результаты использования одной форсунки (120 мкм) и более ранней модели той же установки (В-390) на менее концентрированной суспензии клеток (на 1.5 порядка). Авторы не дали полной характеристики фракционно-дисперсного состава своих препаратов и не комментируют значительные различия среднего размера частиц. Кроме того, использованные в качестве пробиотических штаммы бифидобактерий полностью теряли жизнеспособность уже к концу первого месяца хранения, что делает их применение практически невозможным.

Полученные инкапсулированные бактериальные клетки предполагается использовать в препаратах пробиотиков, принимаемых перорально, поэтому важнейшими характеристиками капсул (гра-



**Рис. 3.** Кинетика инактивации капсулированных препаратов, сводная по штамму для *Pr. freudenreichii* (верхняя линия) и *L. helveticus* (нижняя линия). Начальная часть кривой подчиняется обратной экспоненциальной зависимости, аппроксимация методом наименьших квадратов (прямые линии, рядом приведены значения коэффициентов корреляции).

**Fig. 3.** Inactivation kinetics for the encapsulated preparations, summarized for the strain *Pr. freudenreichii* (upper line) and *L. helveticus* (lower line). The initial part of the curve obeys the inverse exponential dependence, for the approximation by the least squares method (straight lines). The values of the correlation coefficients are shown nearby. Axes: abscissa is time in weeks, ordinate is natural logarithm of CFU.

нул, микросфер) являются, наряду с содержанием живых клеток, размер этих частиц, механическая прочность и одновременно проницаемость для метаболитов. С применением природного полисахарида альгината натрия методом полимеризации заряженных капель в водном растворе на установке В-395 Pro удается получить удовлетворительные препараты, в которых размер частиц легко можно задавать в диапазоне от 150 до 1000 мкм и более. Очевидно, данный метод позволяет применять практически любой набор пробиотических штаммов, поскольку в микросферах они надежно изолированы, что исключает антагонистические взаимодействия. Показано, что данные препараты могут храниться месяц и более в условиях бытового холодильника без неприемлемой потери качества.

Отмеченная тенденция более быстрого снижения жизнеспособности клеток в более плотных микросферах может быть связана с их пониженной проницаемостью для метаболитов. Этот эффект должен сильнее проявляться для более крупных частиц, поскольку скорость насыщения их объема питательными веществами и эвакуации продуктов метаболизма инкапсулированных клеток, обратно пропорциональна линейному размеру частиц. Однако такой зависимости мы не наблюдали в проведенных экспериментах — возможно, потому что фактически популяция капсул, получаемых на более широких соплах форсунки, со-

стоит их двух и более групп частиц, включая в несколько раз более мелкие (см. табл. 3 и рис. 1 и 2).

В опубликованных работах, описывающих использование альгинатных капсул показано, что они не могут обеспечить полную защиту пробиотикам при прохождении через ЖКТ [2, 8]. Для решения этой проблемы предлагается создавать многослойные оболочки, наслаивая на альгинатную основу, например, хитозан, другие полисахариды, полилизин и иные полимеры, заряженные положительно в водных растворах [9, 14–16].

Отработанная нами технология получения капсулированных в альгинатную матрицу живых пробиотиков на примере двух бактерий, *Propionibacterium freudenreichii* и *Lactobacillus helveticus*, на установке В-395 Pro Encapsulator (Buchi, Швейцария), может быть использована для получения препаратов, пригодных для практического применения. Вышеизложенные результаты экспериментов и предварительные данные по получению препаратов на основе двух- и трехслойных гранул (микросфер) позволяют предположить возможность использования этого же оборудования для получения многослойной оболочки капсул, что существенно улучшит устойчивость инкапсулированных препаратов к разрушающим внешним факторам.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Онлайн-версия содержит дополнительные материалы, доступные по адресу DOI: 10.56304/S0234275822050131.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nisha Y., Milind B.J., Imran A.K. Probiotic delivery systems: applications, challenges and prospective. *IRJP*, 2013, 4(4), 1–9. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04401>
2. Islam M.A., Cheol-Heui Y., Yun-Jaie C., Chong-Su Ch. Microencapsulation of live probiotic bacteria *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 20(10), 1367–1377. <https://doi.org/10.4014/jmb.1003.03020>
3. Amin T., Thakur M., Jain S.C. Microencapsulation – the future of probiotic cultures. *JMBFS*, 2013, 3(1), 35–43.
4. Gbassi K., Vandamme T. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut gildas. *Pharmaceutics*, 2012, 4, 149–163. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics4010149>
5. Corona-Hernandez R.I., Alvarez-Parilla E., Lizardi-Mendoza J., Islas-Rubio A.R., de la Rosa L.A., Wall-Medrano A. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: a review. *CRFSFS*, 2013, 2, 614–28. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12030>
6. Samedi L., Charles A.L Viability of 4 probiotic bacteria microencapsulated with arrowroot starch in the simulated gastrointestinal tract (GIT) and yoghurt. *Foods*, 2019, 8(5), 175. <https://doi.org/10.3390/foods8050175>
7. Mohammad N.A., Zaidel D.N.A, Muhamad I.I., Yaakob H., Hamid M.A., Jusoh Y.M.M. Biopolymeric encapsulation of probiotics for improved release properties in the gastrointestinal digestion system. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, 2020, 778, 012033. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/778/1/012033>
8. 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, 1(7), 2834–2840. <https://doi.org/10.1021/bm200576h>
9. Cook M.T., Tzortzis G., Charalampopoulos D., Khutoryanskiy V.V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J. Control Release*, 2012, 162(1), 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>
10. [https://doi.org//pdf/Operation-Manuals/OM\\_115-93484\\_B-395\\_en.pdf](https://doi.org//pdf/Operation-Manuals/OM_115-93484_B-395_en.pdf) <https://doi.org/10.3390/foods8050175https://assets.buchi.com/image/upload/v1605799582>
11. Гордиенко М.Г. Статистическая обработка результатов пассивного и активного экспериментов в биотехнологии. М.: Изд РГХТУ им. Менделеева, 2015, 105 с.
12. Lord Rayleigh F.R.S. On the instability of jets. *Proceedings of the LMS*, 1878, 1–10(1), 4–13. <https://doi.org/10.1112/plms/sl-10.1.4>
13. Ширяева С.О., Григорьев А.И. Жидко-капельный аэрозоль. Теоретические основы получения. Учебное пособие. Ярославль: Изд. ЯрГУ, 2013, 100.
14. Oberoi K., Tolun A., Altintas Z., Sharma S. Effect of alginate-microencapsulated hydrogels on the survival of *Lactobacillus rhamnosus* under simulated gastrointestinal conditions. *Foods*, 2021 Aug 26; 10(9): 1999. <https://doi.org/10.3390/foods10091999>
15. Ta L.P., Bujna E., Antal O., Ladányi M., Juhasz R., Szecsi A., Kun S., Sudheer S., Gupta V.K., Nguyen Q.D. Effects of various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, Jul 31; 183, 1136–1144. doi: . Epub 2021 Apr 28. *Int J Biol Macromol.*, 2021. PMID: 33932423. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/778/1/012033> <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.170>
16. Yeung T.W., Ucok E.F., Tiani K.A. et al. Microencapsulation in alginate and chitosan microgels to enhance viability of *Bifidobacterium longum* for oral delivery. *Front. Microbiol.*, 19 April 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00494>



## Alginate-Encapsulated Probiotics: Preparation and Some Properties

A. N. Somov<sup>a, #</sup>, V. D. Pokhilenko<sup>a</sup>, I. A. Dunaytsev<sup>a</sup>, M. V. Klykova<sup>a</sup>, and I. A. Chukina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (FBIS SRCAMB),  
Federal Service of Consumer Right Surveillance and Human Welfare, Obolensk, Moscow Oblast, 142279 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: somov@obolensk.org*

**Abstract**—Microencapsulated preparations of probiotic strains *Propionibacterium freudenreichii* and *Lactobacillus helveticus* have been obtained using the B-395 Pro encapsulator (Buchi, Switzerland). Microspheres (microgranules) with an average diameter of 160, 375 and 850  $\mu$  were obtained by curing aqueous alginate solutions with passing through nozzles of 80, 150 and 300  $\mu$ , respectively. It was shown that more than 98% of living bacterial cells were included in the granules, which can easily and without loss of viability be transferred from granules into an aqueous solution by incubation with chelating compounds, for example, sodium citrate. Within microgranules, these microorganisms retained satisfactory viability for up to 3 months when stored as a suspension in buffered saline in a household refrigerator. Under these conditions, propionic acid bacteria demonstrated a significantly better preservation. At the same time, the authors found that the methods proposed by the manufacturer for predicting the average size of microgranules are inaccurate. To improve the stability of encapsulated probiotics in the gastrointestinal tract, it is possible to apply additional shells to the drug particles using the same equipment. As a result, a technology was developed for encapsulating bacterial cells in an alginate shell to obtain probiotic preparations with characteristics allowing their practical application and further improvement.

**Keywords:** probiotics, propionic acid bacteria, lactobacilli, microencapsulation, sodium alginate