

УДК 579.22:579.64:579.676

ПОВЫШЕНИЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР В ВЕРХНИХ ОТДЕЛАХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ПРИ ХРАНЕНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОГО БИОСОВМЕСТИМОГО ГЕЛЯ

© 2025 г. О. А. Галуза^{1,2,*}, А. В. Храмова¹, Е. К. Полищук³, Г. И. Эль-Регистан¹, Ю. А. Николаев¹

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

²ООО “Бавар+”, Москва, 127206 Россия

³Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук,
Москва, 109316 Россия

*e-mail: olesya_galuza@mail.ru

Поступила в редакцию 05.06.2025 г.

После доработки 27.06.2025 г.

Принята к публикации 05.07.2025 г.

Иммобилизация молочнокислых бактерий (на примере *Enterococcus faecium*) в силанольно-гуматные гели (СГГ) позволяет не только повысить количество жизнеспособных клеток при длительном хранении относительно контрольного варианта (что было показано ранее), но также и усилить их потенциальные пробиотические свойства. Антагонистическая активность против тест-штаммов микроорганизмов (*E. coli*, *S. aureus*, *Y. lipolytica*) повышается в 0.7–5 раз по сравнению с планктонными культурами. Количество клеток *E. faecium* в СГГ в условиях кислотного и ферментативного стресса, имитирующих условия верхних отделов желудочно-кишечного тракта человека, сохранялось на уровне 30–80% от исходного, в то время как в контроле (нестабилизованном препарате) наблюдалась практически полная гибель клеток. Технологические показатели кисломолочных продуктов, полученных с применением в качестве заквасок, иммобилизованных в СГГ *E. faecium*, улучшаются: время образования сгустка сокращается с 48 до 44 ч, органолептическая оценка повышается. Продемонстрирована безопасность СГГ для животных при приеме внутрь в дозах, не превышающих 5 г/кг/сут. СГГ может быть рекомендован для применения в ветеринарии и пищевой отрасли в качестве кормовой добавки-адсорбента и стабилизатора культур-пробиотиков в качестве компонентов пищевых продуктов.

Ключевые слова: силанольно-гуматный гель, биосовместимый гель, молочнокислые бактерии, *Enterococcus faecium*, иммобилизация клеток, выживаемость, антимикробная активность, кисломолочные продукты, биопрепараты, кормовые добавки, пробиотики

DOI: 10.7868/S3034574X25060033

В настоящее время исследование роли микрофлоры желудочно-кишечного тракта в здоровье и питании человека и животных приобретает особое значение. Пробиотики – это пищевые добавки с живыми микроорганизмами, которые благотворно влияют на организм человека [1]. Самыми важными и распространенными пробиотиками являются молочнокислые бактерии (МКБ), которые оказы-

вают положительное влияние на организм человека посредством поддержания гомеостаза и укрепления здоровья, оказывая противовоспалительное, антимикробное и противовирусное, иммуномодулирующее, гипохолестеринемическое, антиканцерогенное и антиоксидантное действие [2]. Способность клеток МКБ к адгезии и производству антибактериальных веществ, в том числе бактериоцинов,

обеспечивает конкурентное исключение кишечных патогенов и уменьшение их количества в кишечнике. МКБ широко используются в качестве заквасочных культур в пищевой промышленности, главным образом, в хлебопечении, молоко- и мясоперерабатывающих производствах [3]. Эти микроорганизмы проявляют широкий спектр функционально-технологических свойств, которые обеспечивают формирование физико-химических, органолептических и микробиологических показателей качества продукции. Наиболее важными свойствами молочнокислых бактерий с точки зрения технологии ферментированных продуктов питания являются активное кислотообразование, продуцирование ароматических веществ, бактериоцинов, а также активность гидролитических ферментов, в том числе протеолитических [4].

Качество кисломолочных продуктов и биопрепаратов является важнейшим фактором в поддержании здоровья человека и сельскохозяйственных животных, поэтому актуальна разработка новых технологий и подходов к созданию товаров с улучшенными свойствами [5]. Существенная проблема в сфере биотехнологического производства и молочной промышленности – быстрое снижение качества продукции, содержащей МКБ, обусловленное гибелью микробных клеток [6]. Так, срок годности молочнокислых продуктов не превышает четырех недель, несмотря на то, что начальный уровень жизнеспособных клеток находится в пределах установленных норм (10^6 – 10^8 КОЕ/мл). За этот период количество активных микроорганизмов может сократиться на порядок и более [7].

Международные стандарты, установленные ВОЗ и ФАО, определяют строгие нормативы содержания МКБ в пищевых продуктах. Согласно Codex Standard 243-2003, минимально допустимые концентрации составляют: 10^7 КОЕ/мл для общего количества микроорганизмов; 10^6 КОЕ/мл для специфических групп МКБ; 10^4 КОЕ/мл для дрожжевых культур [8].

В российской практике производства молочнокислых продуктов нормы содержания МКБ составляют 10^6 – 10^7 КОЕ/мл клеток, а дрожжей от 10^4 до 10^5 КОЕ/мл. Данный показатель нормирован для каждого вида национального кисломолочного продукта в соответствии с ГОСТ Р 52738-2007. Для заквасок с МКБ (биопрепаратов) согласно ГОСТ Р 34372-2017 для жидких и замороженных заквасок количество жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий должно быть не менее 10^8 КОЕ/г (см^3), для сухих – не менее 10^9 КОЕ/г. Для концентрированных бактериальных заквасок показатель составляет не менее 10^{10} КОЕ/г (см^3). Показатель для кормовых пробиотиков – 10^6 КОЕ/г.

Согласно правилам многих стран, фактическое количество жизнеспособных клеток, определяемое

как колониеобразующие единицы (КОЕ), в пробиотическом продукте (биопрепарате или кисломолочном продукте) не может быть ниже значения, указанного на этикетке, до истечения срока годности продукта. Таким образом, как производители, так и компетентные государственные органы постоянно отслеживают количество жизнеспособных клеток в коммерческих продуктах, чтобы обеспечить соответствие заявленным требованиям [9]. Однако помимо того, что количество жизнеспособных клеток снижается на разных этапах производства и последующего хранения биопрепаратов и кисломолочных продуктов, бактерии также подвергаются агрессивному воздействию условий в желудочно-кишечном тракте (низкое значение pH, влияние желчи и пепсина желудочного сока), что снижает их выживаемость и последующую способность к колонизации кишечника [3].

Несмотря на то, что число жизнеспособных бактериальных клеток постоянно отслеживается для каждого типа реализуемого пробиотического продукта, имеются лишь ограниченные данные о способности конкретного штамма микроорганизмов в составе конкретного пробиотического продукта выживать в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) после приема внутрь [10]. Жизнеспособность традиционно считается необходимым условием для того, чтобы пробиотик приносил пользу для здоровья [11]. В этом контексте на первом Консультативном совещании экспертов ФАО/ВОЗ по оценке полезных для здоровья и питательных свойств пробиотиков было указано, что для каждого потенциального штамма следует проверять способность сохранять жизнеспособность в целевой среде [12]. Многие производители пытаются найти способы сохранения жизнеспособности бактериальных клеток не только в конечной продукции, но и на различных этапах производства. Эти способы включают в себя выбор подходящей питательной среды, использование защитных средств в процессе сублимационной сушки, микрокапсулирование и усовершенствование систем упаковки [13–16].

Наиболее распространенным способом, направленным на повышение качества молочной продукции и биопрепаратов, является снижение температуры при хранении [17]. Однако он имеет множество недостатков: нестабильность, высокие затраты ресурсов (дополнительное оборудование, энергоресурсы и др.) [17]. Также для увеличения сроков хранения продукции используют такие методы, как селекция более устойчивых штаммов, инкапсулирование, изоляция от активных форм кислорода и др., но все эти способы также требуют высоких затрат [18].

Проблема поиска новых, простых, эффективных и менее затратных способов хранения пробиотических продуктов с высоким титром клеток

и увеличенным сроком хранения является актуальной и касается всех возможных отраслей промышленности, в которых применяются биопрепараты и продукты на основе МКБ [18]. Помимо этого, бактерии в процессе хранения не должны менять функционально-технологические свойства продукции в худшую сторону, а также должны обладать высокой способностью к выживанию в условиях ЖКТ и синтезу антимикробных компонентов [19]. Наибольший потенциал для этих целей представляет способ иммобилизации живых клеток бактерий в гели, поскольку этот метод хорошо изучен, отличается простотой в производстве и контроле, и является эффективным и распространенным [20]. Выбор подходящей иммобилизационной матрицы (носителя) является важной стадией в разработке продукции на основе гелей, поскольку эффективность иммобилизации зависит от характеристик матрицы, таких как жесткость, вязкость, абсорбционная способность, механическая прочность и пористость [21].

Ранее для иммобилизации клеток МКБ был применен новый тип биосовместимого геля смешанного состава на основе гуматов, модифицированных органосиланами (3-(аминопропил) триэтоксисилана (АПТЭС)) [22, 23] – силанольно-гуматный гель (СГГ), в состав которого также входят органические кислоты-титранты [24, 25]. Такой гель обладает кислотропными свойствами (легко и обратимо оживается), способен легко высвобождать клетки, а органические кислоты, вносимые на стадии получения геля как титранты, могут служить для бактерий дополнительным источником углерода [26–29]. Ранее гель был успешно применен для хранения углеводородокисляющих бактерий в течение 12 мес [28], а также для молочнокислых бактерий [29]. Было показано, что СГГ способен поддерживать жизнеспособность МКБ в условиях хранения при комнатной температуре на протяжении 5 мес на уровне 10–80% от исходного количества в зависимости от типа культуры и используемой кислоты-титранта [29, 30]. Это свойство открывает новые возможности применения геля для пролонгирования жизнеспособности иммобилизованных клеток, и может стать решением актуальной проблемы длительного хранения пробиотических продуктов и биопрепаратов. Влияние СГГ на пробиотические свойства МКБ ранее не было исследовано.

Цель настоящей работы является исследование способности иммобилизованных и хранившихся в СГГ молочнокислых бактерий к синтезу антимикробных веществ и выживаемости в условиях *in vitro*, имитирующих условия верхних отделов ЖКТ, изучение технологических свойств молочнокислого продукта на основе гелей с клетками МКБ, а также определение отсутствия токсичности и опасности силанольно-гуматного геля.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Объектом исследования была молочнокислая бактерия *Enterococcus faecium* M3185 из коллекции UNIQEM Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук. Бактерий культивировали при $28 \pm 2^\circ\text{C}$ на орбитальной качалке (100 об./мин) в конических колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл жидкой среды LB (лизогенный бульон Луриа-Бертани, Диаэм, Россия) до стационарной фазы роста (24 ч). Стационарную культуру использовали для иммобилизации в силанольно-гуматные гели.

Иммобилизация клеток в силанольно-гуматный гель. Силанольно-гуматный гель получали с использованием гумата Фульвигрейн Классик (“РодАгро”, Россия) и органосилана (3-аминопропил)триэтоксисилана (АПТЭС) (“Лента 91”, Россия) по разработанной ранее методике [22] с модификациями [28, 29]. К 10 мл 10%-ного стерильного раствора гумата при интенсивном перемешивании добавляли 350 мкл АПТЭС. Полученный раствор титровали до значений pH 6.5–7.0 10%-ным раствором молочной кислоты. Затем, не переставая перемешивать, вносили 5 мл стационарной культуры МКБ. Полученную смесь разливали по 1 мл в пробирки типа Эппендорф объемом 2 мл. В течение 5–6 ч при комнатной температуре происходило застывание (желирование) смеси.

Исследование способности иммобилизованных и хранившихся клеток МКБ в СГГ к синтезу антибактериальных веществ. Антагонистическую активность в отношении тест-штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (*E. coli* K-12; *S. aureus* ATCC 6538, *Y. lipolytica* HMM-149 из коллекции UNIQEM) оценивали модифицированным методом совместного культивирования [31, 32]. Для исследования были отобраны культуры-антагонисты *E. faecium*, хранившиеся в разных условиях: стационарная культура; культура, хранившаяся в жидкой среде LB в течение 1 мес; культура, хранившаяся в СГГ в течение 1 мес. В модифицированном методе совместного инкубирования получали культуры бактерий-антагонистов и тест-бактерий стационарной фазы роста, которые разводили до 10^6 КОЕ/мл, смешивали в пропорции 1 : 1 в стерильной среде LB, и инкубировали в течение 24 и 120 ч при 37°C и 450 об./мин. Контролем служили чистые культуры тест-штаммов (без добавления культур-антагонистов), инкубировавшиеся в тех же самых условиях. По истечении времени инкубирования осуществляли высеив бактериальных суспензий на агаризованную среду LB из кратных разведений в физиологическом растворе, а затем определяли и оценивали количество жизнеспособных клеток тест-штаммов. Фактор редукции

тест-штаммов (**FR**, десятичный логарифм отношения количества жизнеспособных клеток опытного варианта относительно контроля) определяли по формуле [32]:

$$FR = \lg \left(\frac{K_k}{K_0} \right),$$

где K_0 – концентрация клеток тест-штамма при совместном инкубировании с антагонистом, КОЕ/мл; K_k – концентрация клеток тест-штамма в отсутствие антагониста, КОЕ/мл [31, 32].

Исследование способности иммобилизованных и хранившихся клеток МКБ в СГГ к выживаемости в лабораторных условиях, имитирующих условия верхних отделов ЖКТ. Для исследования были использованы культуры, хранившиеся в разных условиях:

- культура стационарной фазы роста;
- культура стационарной фазы роста, смешанная со свежеприготовленным СГГ в соотношении 1 : 3;
- культура, хранившаяся в жидкой среде LB в течение 1 мес;
- культура, хранившаяся в СГГ в течение 1 мес;
- клетки, хранившиеся 1 мес в СГГ и затем извлеченные из него.

Исследование влияния pH на выживаемость МКБ. Исследование проводили по методике, описанной в работе Хосейни с соавт. [33]. В условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения в желудке у человека, определяли количество жизнеспособных микроорганизмов в начале и конце опыта, сравнивая их численные значения. Культуры с титром 10^8 КОЕ/мл ресуспендировали в стерильном PBS-буфере с pH 8.0 и доводили pH до значений 1.0, 1.5, 2.0, используя 1 н HCl, затем инкубировали в пробирках Эппендорф, объемом 2 мл, при 37°C в течение 180 мин в термошейкере TS-100 (“Biosan”, Латвия). Далее делали высев десятичных разведений на плотную питательную среду LB через 30 и 180 мин. Затем подсчитывали выросшие колонии и определяли число жизнеспособных-кислотоустойчивых микроорганизмов [33].

Исследование влияния ферментов на выживаемость МКБ. Исследование проводили по методике, описанной в патенте [34]. В условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека в желудке и тонком кишечнике, определяли количество жизнеспособных микроорганизмов в начале и конце опыта, сравнивая их численные значения. Культуры с начальным титром 10^8 КОЕ/мл инкубировали при 37°C в течение 180 мин в кислой модельной среде с pH 2.0–2.2 и препаратом “ацидин-пепсин” (“Белмедпрепараты”, Беларусь) в концентрации 0.5 мг/мл. Далее определяли число жизнеспособных микроорганизмов путем посева десятичных разведений на агаризованную пита-

тельную среду LB [34]. Оставшуюся суспензию центрифугировали 20 минут при 3490 g на центрифуге Medifuge (“Thermo FS”, Россия), затем удаляли супернатант. К осажденным клеткам добавляли щелочную модельную среду с pH 7.0–7.2 и препаратом “Панзинормом форте 20000” (“КРКА-РУС”, Россия) в концентрации 2.5 мг/мл в объеме кислой модельной среды. Осадок ресуспендировали и инкубировали суспензию в течение 12 ч, а затем определяли остаточное количество жизнеспособных-ферментостойчивых микроорганизмов [34].

Исследование влияния желчи на выживаемость МКБ. Исследование проводили по методике, описанной в работе Хосейни с соавт. [33]. В условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека в двенадцатиперстной кишке, определяли количество жизнеспособных микроорганизмов в начале и конце опыта, сравнивая их численные значения. Культуры с титром 10^8 КОЕ/мл ресуспендировали в стерильном PBS-буфере с pH 8.0 с добавлением 0.5, 1.0 и 2.0% (по весу) бычьей желчи (“Sigma-Aldrich”, США). Затем инкубировали при 37°C в термошейкере TS-100 (“Biosan”, Латвия) в течение 180 мин. Далее делали высев десятичных разведений на плотную питательную среду LB, подсчитывали выросшие колонии и определяли число жизнеспособных желчустойчивых микроорганизмов [33].

Исследование технологических свойств кисломолочного продукта на основе СГГ с иммобилизованными клетками МКБ. Для исследования были отобраны продукты на основе ультрапастеризованного молока Parmalat Natura Premium с содержанием жира 0.5% (“Parmalat SpA”, Италия), приготовленные с равными дозами пробиотических препаратов (титр клеток 10^8 КОЕ/мл) культурой стационарной фазы роста; культурой, хранившейся в жидкой среде LB в течение 1 мес, культурой, хранившейся в СГГ в течение 1 мес.

Определение времени образования молочного сгустка (времени сквашивания) осуществляли по методике, описанной в ГОСТ 34372-2017. Определение активной кислотности (pH) проводили по методике, описанной в ГОСТ 32892-2014. Определение газообразующей активности осуществляли по методике, описанной в МР 2.3.2.2327-08. Определение ароматообразующей активности осуществляли по методике, описанной в МР 2.3.2.2327-08.

Органолептическая оценка. Полученный продукт оценивали согласно требованиям ГОСТ Р ИСО 22935-1-2011 и ГОСТ ISO 11037-2013. В ходе исследования была разработана система комплексной органолептической оценки. Сенсорный анализ осуществлялся экспертной группой, состоящей из квалифицированных дегустаторов, которые проводили оценку по следующим основным параметрам: визуальные характеристики (внешний вид и цвет), текстурные свойства (консистенция),

ароматические качества и вкусовые характеристики продукта.

Для обеспечения объективности оценки каждому параметру был присвоен определенный весовой коэффициент значимости: вкусовые характеристики – 7; текстурные характеристики (консистенция и внешний вид) – 6; ароматические характеристики – 4; цветовые характеристики – 3. На основе этих коэффициентов были установлены максимальные баллы для каждого показателя: вкус – максимум 35; консистенция – максимум 30; запах – максимум 20; цвет – максимум 15. Итоговая оценка качества продукта определялась по следующей градации: превосходное качество – 95–90 баллов; высокое качество – 89–80 баллов; удовлетворительное качество – 79–60 баллов; неудовлетворительное качество – менее 60 баллов. Важно отметить, что при отклонении от эталонных показателей по любому из оцениваемых параметров происходит снижение общей балльной оценки продукта. Разработанный дегустационный лист оценки, предложенный дегустаторам, отображен в табл. 1S.

Определение отсутствия токсичности и опасности СГГ. Этическое одобрение. Все процедуры соответствовали стандартам, изложенным в Директиве 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза о защите животных, используемых в научных целях. Исследовательская работа на животных проводилась в соответствии с рекомендациями NC3RS Руководства по проведению экспериментов *in vivo*. Исследование было одобрено локальной комиссией по биоэтике Федерального центра пищевых систем им. В.Н. Горбатова Российской академии наук.

Период и место проведения исследования. Исследование проводилось с июля по сентябрь 2024 г. в лаборатории экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения Федерального центра пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук.

Обоснование выбранного способа введения препарата. Использовали стерильный силанольно-гуматный гель с молочной кислотой – титрантом без иммобилизованных бактериальных клеток. В соответствии с требованиями ГОСТ 32644-2014 и Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств был выбран внутрижелудочный путь введения исследуемого образца [35].

Оценка острой токсичности, кумулятивных эффектов (по методу Лима) и субхронической токсичности. Токсичность оценивали в соответствии с требованиями ГОСТ 32644-2014 и ГОСТ Р 1.2.3156-13 с участием лабораторных мышей Balb/c для исследования острой токсичности, крыс стока Wistar – для исследования кумулятивных

эффектов и субхронической токсичности. Доза для оценки острой токсичности соответствовала требованиям ГОСТ 32644-2014 и составляла 5.0 г/кг, исходя из безопасности данной дозы, была выбрана начальная доза для исследования кумулятивных эффектов и субхронической токсичности (5 г/кг).

Оценка раздражающего действия на кожу. Оценку проводили в соответствии с требованиями ГОСТ Р 1.2.3156-13 и ГОСТ 32436-2013 с участием морских свинок методом накожных аппликаций в количестве 0.5 г, в соответствии с требованиями ГОСТ 32436-2013.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка результатов биологического эксперимента по определению токсичности СГГ проводилась с использованием программы “Statistical Package for the Social Sciences Statistics 23.0” (“IBM Corp.”, США). Межгрупповое сравнение проводилось с использованием попарного сравнения групп с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы и межквартильного диапазона ([P25–P75]). Статистически значимым считался показатель $p = 0.05$ или менее. Все остальные исследования выполнены в двух биологических повторностях, по три параллельных эксперимента (технические повторности) в каждом. При расчетах определяли среднее арифметическое и экспериментальную ошибку (функция “Среднее отклонение экспериментальных значений от среднего”, SPOTKJL), для $p < 0.05$ с использованием программы Microsoft Excel 2016 (“Microsoft Corporation”, США). Различия между вариантами считали значимыми, если они превышали экспериментальную ошибку, обычно менее 20% для экспериментов по определению КОЕ. На рисунках представлены данные типичных экспериментов, в таблицах – средние арифметические значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Антагонистическая активность культур *E. faecium*, хранившихся в разных условиях. Способность МКБ образовывать антибиотические вещества и за счет этого оказывать бактерицидное и бактериостатическое действие на вредную микрофлору является одним из важнейших потенциальных пробиотических свойств биопрепаратов. Известно, что антагонистическая активность бактерий осуществляется с помощью разных механизмов, включая образование бактериоцинов, кислот и др. [32]. Помимо хороших физико-химических параметров, матрица для иммобилизации и хранения культур должна способствовать сохранению или улучшению их пробиотических свойств. Для подтверждения способности силанольно-гуматного геля сохранять потенциальные пробиотические свойства иммобилизованных культур были проверены антагонистические свойства культур в от-

ношении тест-штаммов. Результаты эксперимента показали, что культура *E. faecium* обладала антимикробной активностью против всех исследуемых штаммов тест-культуры. Наиболее высокий уровень ингибирования роста наблюдался по отношению к тест-штамму *Y. lipolytica* НММ-149 (рис. 1, табл. 2S).

Планктонная культура *E. faecium* стационарной фазы роста подавляла рост тест-штамма *Y. lipolytica* НММ-149 в 495.7 и 4182.1 раза (табл. 2S) на 24 и 120 ч культивирования, в то время как в контроле культура росла. Планктонная культура, хранившаяся в среде LB в течение 1 мес, подавляла рост тест-штамма в 982.6 и 3320.3 раза (табл. 2S) на 24 и 120 ч культивирования, а культура, иммобилизованная в СГГ и хранившаяся в течение 1 мес – в 3250 и 32435.6 раза соответственно.

Умеренный уровень антимикробной активности наблюдали по отношению к штамму грамположительного стафилококка *St. aureus* ATCC 6538 (рис. 2, табл. 2S).

Планктонная культура *E. faecium* стационарной фазы роста подавляла рост тест-штамма *S. aureus* ATCC 6538 в 10.6 и 14.8 раз (табл. 2S) на 24 и 120 ч культивирования, в то время как в контроле культура продолжала рост. Культура, хранившаяся в среде LB в течение 1 мес, подавляла рост тест-штамма в 57.2 и 17 раз на 24 и 120 ч культивирования соответственно (табл. 2S). Культура, иммобилизованная в СГГ и хранившаяся в течение 1 мес, обладала самым высоким антимикробным действием – подавляла рост стафилококка в 395.1 и 526.7 раз на 24 и 120 ч культивирования (табл. 2S).

Самый низкий уровень антимикробной активности наблюдался по отношению к *E. coli* К-12 (рис. 3, табл. 2S).

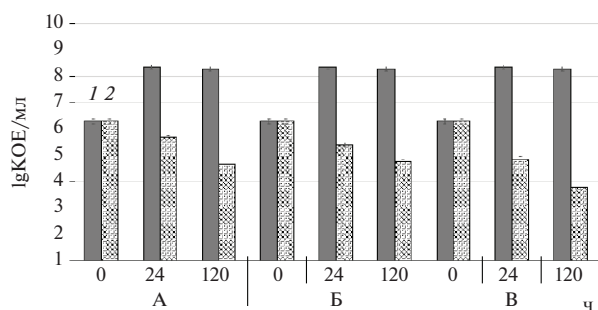


Рис. 1. Титр жизнеспособных клеток тест-штамма *Y. lipolytica* НММ-149 (lgKOE/мл) при совместном культивировании в течение 0, 24 и 120 ч в контрольном варианте без культуры-антагониста (1) и с культурами-антагонистами *E. faecium* (2) при культивировании с планктонной культурой *E. faecium* стационарной фазы роста (А), культивировании с планктонной культурой *E. faecium*, хранившейся в среде LB в течение 1 мес (Б) и культивировании с культурой *E. faecium*, иммобилизованной в СГГ и хранившейся в течение 1 мес (В).

Планктонная культура *E. faecium* стационарной фазы роста и культура, хранившаяся в среде LB в течение 1 мес, подавляли рост тест-штамма *E. coli* К-12 в 2.8–4.0 раза (табл. 2S) на 24 и 120 ч культивирования соответственно (табл. 2S). Культура, иммобилизованная в СГГ и хранившаяся в течение 1 мес, обладала самым высоким антимикробным действием – подавляла рост тест-штамма в 9.6 и 3.2 раза (табл. 2S).

Таким образом, штамм *E. faecium* обладал важным пробиотическим свойством – антимикробной активностью по отношению к трем тест-штаммам разных таксономических групп. Самый ярко вы-

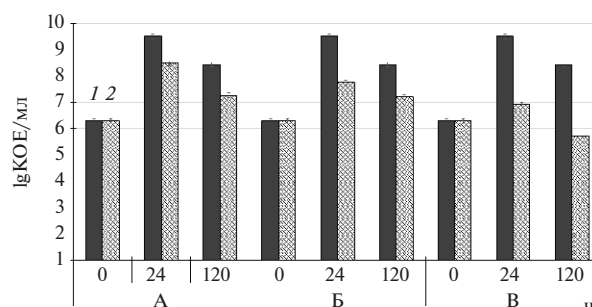


Рис. 2. Титр жизнеспособных клеток тест-штамма *St. aureus* ATCC 6538 (lgKOE/мл) при совместном культивировании в течение 0, 24 и 120 ч в контрольном варианте без культуры-антагониста (1) и с культурами-антагонистами *E. faecium* (2): А – культивирование с планктонной культурой *E. faecium* стационарной фазы роста; Б – культивирование с планктонной культурой *E. faecium*, хранившейся в среде LB в течение 1 мес; В – культивирование с культурой *E. faecium*, иммобилизованной в СГГ и хранившейся в течение 1 мес.

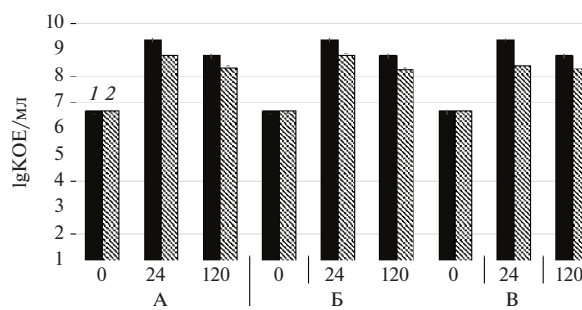


Рис. 3. Титр жизнеспособных клеток тест-штамма *E. coli* К-12 при совместном культивировании в течение 0, 24 и 120 ч в контрольном варианте без культуры-антагониста (1) и с культурами-антагонистами *E. faecium* (2): А – культивирование с планктонной культурой *E. faecium* стационарной фазы роста; Б – культивирование с планктонной культурой *E. faecium*, хранившейся в среде LB в течение 1 мес; В – культивирование с культурой *E. faecium*, иммобилизованной в СГГ и хранившейся в течение 1 мес.

раженный эффект проявляется по отношению к штамму дрожжей *Y. lipolytica* НММ-149 – фактор редукции составлял 3.5–4.5, минимальный антимикробный эффект наблюдается против *E. coli* К-12, с FR не выше 1.0. Самым выраженным рост-подавляющим действием обладала культура *E. faecium*, иммобилизованная в СГГ – в присутствии СГГ FR повышался на 0.5–1.0 (титр выживающих клеток тест-микроорганизмов снижался в 3–10 раз) относительно культур в жидкой среде.

Возможные причины, приводящие к тому, что иммобилизованная культура обладала максимальным рост-ингибирующим действием по отношению к тест-штаммам бактерий, могут заключаться в усилении биосинтеза антимикробных веществ иммобилизованными клетками, в том числе бактериоцинов, и их повышенной стабильности в гелевом окружении [36, 37].

Устойчивость культур *E. faecium*, хранившихся в разных условиях, к низким рН, ферментам поджелудочной железы и желчи. При определении потенциальных пробиотических свойств культур большое значение имеет устойчивость к низким рН, ферментам поджелудочной железы – главным антимикробным факторам в желудке и двенад-

цатиперстной кишке, а также к солям желчных кислот, главному антимикробному фактору тонкого кишечника. Устойчивость к этим факторам необходима для колонизации и метаболической активности пробиотических бактерий [38].

Клетки культуры стационарной фазы роста и планктонной культуры, хранившейся в жидкой среде LB в течение 1 мес, плохо выживают в условиях высокой кислотности (табл. 1): титр КОЕ падает на 2–6 порядков, доля жизнеспособных клеток через 30 и 180 мин не превышала 0.5%.

Чтобы понять, способен ли сам гель защищать клетки от воздействия соляной кислоты, культуру в стационарной фазе роста смешали со свежеприготовленным гелем в пропорции 1 : 3, и установили, что в таких условиях бактерии выживают лучше. Титр КОЕ снижался лишь в 2.5–3 раза, количество жизнеспособных клеток находится на уровне 39–45% при инкубировании в течение 30 и 180 мин при рН от 1.5 до 2.0 (табл. 1). Такой же высокий защитный эффект геля показан и для культуры, хранившейся в нем в течение 1 мес. Количество жизнеспособных клеток сохранялось на уровне 25–37% в условиях кислотного шока (табл. 1). Помимо проявления защитного эффекта, иммо-

Таблица 1. Титр (КОЕ/мл) и доли (%) жизнеспособных клеток культур после инкубации в течение 30 и 180 мин с разными значениями рН, имитирующими условия желудка

Культура	Титр клеток до помещения в условия с разным рН, КОЕ/мл*	Титр клеток после инкубации в течение 30 мин, КОЕ/мл**			Титр клеток после инкубации в течение 180 мин, КОЕ/мл**		
		рН 1.5	рН 2.0	рН 2.5	рН 1.5	рН 2.0	рН 2.5
Культура стационарной фазы роста	4.5×10^8 (100)	6.88×10^3 (0.0015)	1.0×10^4 (0.0023)	2.6×10^5 (0.0587)	7.20×10^2 (0.0002)	6.40×10^2 (0.0001)	7.80×10^2 (0.0002)
Культура стационарной фазы роста, смешанная с СГГ в соотношении 1 : 3	1.9×10^8 (100)	7.58×10^7 (39.89)	8.6×10^7 (45.37)	8.6×10^7 (45.05)	8.24×10^7 (43.37)	7.46×10^7 (39.26)	8.02×10^7 (42.21)
Культура, хранившаяся в жидкой среде LB в течение 1 мес	8.4×10^7 (100)	0 (0)	2.7×10^4 (0.03)	7.2×10^4 (0.09)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Культура, хранившаяся в СГГ в течение 1 мес	5.2×10^7 (100)	0 (0)	1.0×10^6 (1.94)	8.0×10^6 (15.33)	0 (0)	0 (0)	3.60×10^6 (6.90)
Клетки, хранившиеся 1 мес в СГГ и извлеченные из него	1.1×10^8 (100)	3.4×10^7 (30.00)	3.6×10^7 (31.93)	3.7×10^7 (32.63)	4.28×10^7 (37.54)	3.34×10^7 (29.30)	2.92×10^7 (25.61)

* Доля жизнеспособных клеток от исходного количества, %; ** доля жизнеспособных клеток от исходного титра, %.

билизация в СГГ способна привести к изменению свойств самих клеток. Так, бактерии, хранившиеся в СГГ в течение 1 мес и извлеченные из него, обладали повышенной устойчивостью при инкубации в течении 30 мин при рН 2.0–2.5. Количество выживших клеток составило 1.9–15.3% соответственно, а при инкубации в течение 180 мин выживало 6.9% при рН 2.5 (табл. 1). Клетки планктонной культуры в этих условиях не выживали.

Основным механизмом защитного действия СГГ в кислых условиях является способность полимера, составляющего основу геля, силсескви-оксангуминовых комплексов, связывать ионы H^+ , тем самым снижая водородный показатель среды [22]. Этот механизм защиты аналогичен тому, как СГГ повышал устойчивость клеток углеводородо-кисляющей бактерии *Acinetobacter seifertii* к ионам Cu^{2+} [39].

Второй причиной лучшего выживания клеток, длительно хранившихся в СГГ, является их повышенная стрессоустойчивость, обусловленная различными механизмами [39].

Поскольку при нахождении в СГГ клетки сохраняют метаболическую активность, они могут использовать известные механизмы устойчивости к кислым средам – механизм экспорта протонов в сочетании с катаболизмом аминокислот для буферизации цитоплазмы [40]; путем выброса протонов с использованием F1Fo-АТФаза; за счет деиминации аргинина и агматина для предотвращения подкисления цитоплазмы; за счет декар-

боксирования тирозина до его аминной формы, тирамина, для минимизации подкисления [41]. Показано, что клетки, хранящиеся в СГГ, в ходе метаболизма защелачивают среду, что также способствует снижению негативных последствий кислотного шока [29].

При исследовании влияния ферментов желудка и поджелудочной железы на выживаемость бактерий выявлено, что клетки планктонной культуры стационарной фазы роста и хранившиеся в среде ЛВ в течение 1 мес, а также клетки, извлеченные из геля, имеют нулевую выживаемость (табл. 2). Клетки стационарной фазы роста, смешанные со свежеприготовленным СГГ в пропорции 1 : 3, сохранялись на уровне 43.7–80.3% (табл. 2), а клетки, хранившиеся в СГГ в течение 1 мес, выживали в количестве 21.4–112.8% (табл. 2). Препарат “Ацидин-пепсин” с действующими веществами – гидрохлоридом бетаина и пепсином, оказывал бактериостатическое действие на клетки, в то время как препарат “Панзинорм форте 20000” с действующим веществом – панкреатином, не оказывал на клетки никакого влияния.

Возможным механизмом, обеспечивающим защиту клеток в СГГ от гибели при воздействии протеаз, является способность полимера их связывать, так как СГГ создавался как сорбент [22].

При исследовании влияния желчи на выживаемость бактерий показано, что самой низкой устойчивостью обладали клетки, хранившиеся в жидкой среде ЛВ в течение 1 мес, их количество

Таблица 2. Титр (КОЕ/мл) и доли (%) жизнеспособных клеток культур после инкубации в течение 3 и 18 ч с ферментными препаратами “Ацидин-пепсин” и “Панзинорм форте 20000”, имитирующими условия желудка и поджелудочной железы

Культура	Титр клеток до помещения в условия с добавлением разных ферментных препаратов, КОЕ/мл*	Титр клеток после инкубации в течение 3 ч с “Ацидин-пепсином”, КОЕ/мл**	Титр клеток после инкубации в течение 18 ч с “Панзинормом форте 20000”, КОЕ/мл**
Культура стационарной фазы роста	4.50×10^8 (100)	0 (0)	0 (0)
Культура стационарной фазы роста, смешанная с СГГ в соотношении 1 : 3	1.90×10^8 (100)	8.32×10^7 (43.79)	1.53×10^8 (80.32)
Культура, хранившаяся в жидкой среде ЛВ в течение 1 мес	8.40×10^7 (100)	0 (0)	0 (0)
Клетки, хранившиеся 1 мес в СГГ, и извлеченные из него	5.22×10^7 (100)	0 (0)	0 (0)
Культура, хранившаяся в СГГ в течение 1 мес	1.14×10^8 (100)	2.44×10^7 (21.40)	1.29×10^8 (112.81)

* Доля жизнеспособных клеток от исходного количества, %; ** доля жизнеспособных клеток от исходного титра, %.

Таблица 3. Титр (КОЕ/мл) и доли (%) жизнеспособных клеток культур после инкубации в течение 3 ч с 1%-ным препаратом желчи, имитирующими условия желудка и поджелудочной железы

Культура	Титр клеток до помещения в условия с добавлением 1% препарата желчи, КОЕ/мл*	Титр клеток после инкубации в течение 180 мин с 1% препаратом желчи, КОЕ/мл**
Культура стационарной фазы роста	4.50×10^8 (100)	1.43×10^8 (31.82)
Культура стационарной фазы роста, смешанная с СГГ в соотношении 1 : 3	1.90×10^8 (100)	8.42×10^7 (44.32)
Культура, хранившаяся в жидкой среде LB в течение 1 мес	8.40×10^7 (100)	9.04×10^6 (10.76)
Клетки, хранившиеся 1 мес в СГГ и извлеченные из него	5.22×10^7 (100)	1.31×10^7 (25.10)
Культура, хранившаяся в СГГ в течение 1 мес	1.14×10^8 (100)	4.16×10^7 (36.49)

* Доля жизнеспособных клеток от исходного количества, %; ** доля жизнеспособных клеток от исходного титра, %.

через 3 ч инкубирования составило 10.8% (табл. 3). Клетки стационарной фазы роста сохранялись в количестве 31.8%, в 3 раза больше, чем в предыдущем варианте. Примерно такой же уровень наблюдали для культуры, хранившейся в СГГ в течение 1 мес – 36.5%. Клетки стационарной фазы роста, смешанные со свежеприготовленным СГГ, обладали самой высокой устойчивостью, в 1.3–4.4 раза большей, чем в остальных вариантах. Также показано, что СГГ помимо защитной функции от желчи способен также менять и свойства клеток, хранившихся в нем – их жизнеспособность сохранялась на уровне 25.1%, что в 2 раза выше, чем показатель в планктонной культуре, хранившейся в течение 1 мес (табл. 3).

Соли желчных кислот в высоких концентрациях могут солюбилизовать липиды мембран и вызывать диссоциацию интегральных мембранных белков, что приводит к утечке содержимого клеток и их гибели. Таким образом, основным действием желчных кислот является разрушение липидной бислоевой структуры клеточной мембраны [42]. Доминирующей формой желчи является конъюгированная желчная кислота [40], которая легко связывается с аминокислотными группами СГГ и снижает тем самым подвижность и, соответственно, антимикробную активность. Толерантность к солям желчи связана с наличием у бактерий гидролазы солей желчи, которая характерна также и для энтерококков [43–45]. В культуре, хранившейся в жидкой среде LB в течение 30 сут, метаболически активные клетки отсутствовали, так как переходили в аметаболические покоящиеся формы [46], соответственно, активность гидролазы также отсутствовала и биоцидный эффект желчи был максимален. В СГГ клетки, наоборот, пребывали в состоянии гипометаболизма и сохраняли свою ферментативную

активность [29], что минимизировало биоцидное действие желчи.

Технологические свойства кисломолочного продукта на основе СГГ с иммобилизованными клетками МКБ. Одной из оценок успешности дальнейшего применения биопрепаратов или продуктов на основе МКБ, иммобилизованных в СГГ, является их способность сохранять технологически значимые характеристики на протяжении всего срока хранения. Для этого была проведена оценка потребительских качеств молочнокислых продуктов, изготовленных с равными дозами пробиотических препаратов (титр клеток 10^8 КОЕ/мл) – культурой стационарной фазы роста; культурой, хранившейся в жидкой среде LB в течение 1 мес; культурой, хранившейся в СГГ в течение 1 мес.

В первую очередь, необходимо было определить способность пробиотических препаратов сквашивать молоко (образовывать сгусток), поскольку это одна из важнейших характеристик, влияющих на технологию производства продукта [47]. Показано, что культура энтерококка, иммобилизованная и хранившаяся в СГГ в течение 1 мес, образовывала сгусток через 44 ч после внесения препарата, а культура стационарной фазы роста и хранившаяся без геля – за 48 ч (табл. 4). Активная кислотность продукта с внесенными клетками, хранившимися в СГГ, была равна активной кислотности продукта, изготовленного с препаратом культуры стационарной фазы роста, а активная кислотность продукта с культуры, хранившейся 2 мес в жидкой среде LB была ниже всего (табл. 4). Низкая активная кислотность негативно сказывается на органолептических показателях продукции [47], что коррелирует с нашими результатами дегустационной оценки. Самый низкий балл был у продукта, приготовленного с использованием препарата с культурой,

Таблица 4. Технологические показатели молочнокислых продуктов, изготовленных с применением препаратов на основе культур *E. faecium*, хранившихся в разных условиях

Образец	Время образования сгустка, ч	Активная кислотность (рН)	Средний балл, выставленный по результатам дегустационной оценки	Высота поднятия губчатого сгустка при определении газообразующей активности, см	Время появления розовой окраски сыворотки, мин
Продукт на основе препарата из культуры стационарной фазы роста	48	4.62	89	3.0	2.57
Продукт на основе препарата из культуры, хранившейся в жидкой среде LB в течение 2 мес	48	4.58	86	1.3	2.50
Продукт на основе препарата из культуры, хранившейся в СГГ в течение 2 мес	44	4.77	97	2.8	2.06

хранившейся 2 мес без геля. Для него был отмечен кислый вкус, неприятный запах и консистенция. Самый высокий балл был у продукта, приготовленного из закваски бактерий, хранившейся в СГГ 2 мес. Для него отмечен приятный вкус и запах, кремовая текстура и необычный цвет – светло-кофейный, хотя и нетипичный для молочнокислых продуктов, но не вызывающий неприятных ассоциаций.

Максимальная высота поднятия губчатого сгустка при определении газообразующей активности отмечена для продукта на основе препарата из культуры стационарной фазы роста, самая низкая – для продукта на основе препарата из культуры, хранившейся в жидкой среде LB в течение 2 мес (табл. 4). Клетки стационарной фазы роста обладают высоким уровнем метаболизма (подтвердившимся экспериментом по определению газообразующей активности), у клеток, иммобилизованных в СГГ уровень метаболизма снижен, а у клеток, длительно хранившихся в среде LB, он самый низкий. Время появления розовой окраски сыворотки при определении ароматообразующих веществ было самое быстрое для продукта на основе препарата из культуры стационарной фазы роста, самое медленное – для продукта на основе препарата из культуры, хранившейся в СГГ в течение 2 мес (табл. 4). По результатам определения газообразующей и ароматообразующей активности можно сделать вывод, что клетки культуры, хранившейся в СГГ в течение 2 мес, сохраняют свою метаболическую активность на высоком уровне относительно нестабилизированной культуры.

Иммобилизация МКБ в СГГ позволяет сохранить их технологические свойства и улучшить

органолептические характеристики конечного продукта даже после двухмесячного хранения. Продукты, полученные с использованием препаратов на гелевой основе, обладают отличными органолептическими показателями, приятны на вкус, цвет и аромат, без резких, неприятных посторонних примесей.

Подтверждение отсутствия токсичности и опасности силанольно-гуматного геля с молочной кислотой. Для практического применения СГГ в качестве носителя для иммобилизованных клеток (основа для создания биопрепаратов) очень важно исследовать его биобезопасность и отсутствие токсичности для живых объектов при различных способах введения.

При оценке острой токсичности была изучена доза силанольно-гуматного геля 5 г/кг. Предельно допустимая доза исследуемого образца при внутрижелудочном введении не вызвала гибели мышей, также не было зафиксировано признаков неблагополучия у животных как сразу после введения, так и на протяжении всего периода наблюдения. Не было также отмечено других признаков интоксикации: внешний вид, двигательная активность, дыхательная и сердечная деятельность, реакция на внешние раздражители в норме.

Все животные на протяжении эксперимента стабильно увеличивали массу тела (в среднем на 0.1 г, 0.05 г, 0.05 г в сутки соответственно), которая в конце исследования превышала начальную на 8.4, 3.7, 3.9% соответственно). По результатам аутопсии и макроскопического исследования внутренних органов – головного мозга, тимуса, легких, сердца, селезенки, надпочечников, почек, печени, матки и яичников животных отклонений не выявлено,

относительная масса перечисленных внутренних органов соответствовала.

На основе проведенного эксперимента силанольно-гуматный гель не классифицируется по согласованной на глобальном уровне системе классификации опасности и маркировки химической продукции (СГС) как остро токсичное соединение ($DL50/LD50 > 5$ г/кг), согласно ГОСТ 12.1.007 добавку можно отнести к IV классу опасности – веществам малоопасным.

При определении кожно-раздражающего действия СГГ при однократной аппликации через 60 мин, 24, 48 и 72 ч после ее удаления на месте наложения пробы признаков раздражения кожного покрова не выявлено. Среди соматических реакций выявлены повышенная возбудимость и тревога в момент нанесения исследуемого геля. Изменений клинических признаков не наблюдалось – морские свинки на протяжении эксперимента были подвижны и активны; мышцы в тонусе; тактильная реакция сохранена; видимые слизистые оболочки бледно-розового цвета, истечений и других признаков воспалительных реакций не обнаружено. Таким образом, силанольно-гуматный гель в нативном виде не обладает раздражающим действием на кожу.

При определении кумулятивного эффекта на протяжении всего эксперимента не выявлено каких-либо отклонений в физиологическом состоянии крыс: особи были подвижны и активны; мышцы в тонусе; тактильная реакция сохранена; шерсть плотно прилегала к телу, гладкая, чистая, блестящая; кожный покров эластичный, без нарушения целостности; видимые слизистые оболочки бледно-розового цвета, истечений и признаков воспалительных реакций нет; глаза ярко-красного цвета; акты мочеиспускания и дефекации – соответствовали физиологической норме. Динамика прироста массы тела крыс в период исследования представлена на рис. 4.

Изменение массы животных всех групп было сходным, животные постепенно прибавляли массу. Суммарные привесы для самок опытной группы составили 87.2%, для самок контрольной группы – 75.8%; для самцов опытной группы – 54.9%, для крыс контрольной группы – 48.2%.

Результаты анализа морфологических показателей цельной крови животных, характеризующих функциональную активность лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, представлены в табл. 3S. В крови животных опытных групп самок и самцов изменения содержания лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов; показателей концентрации эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, среднего объема эритроцита, среднего содержания гемоглобина в эритроците и средней концентрации гемоглобина в эритроцитах; концентрации тромбоцитов, среднего объема тромбоцита, распределения тромбоцитов и тромбокрита относительно

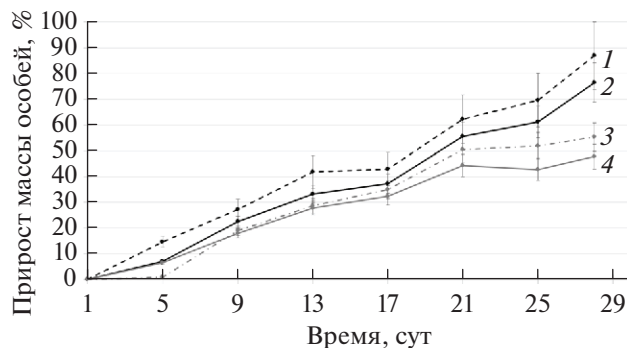


Рис. 4. Динамика прироста массы тела крыс в эксперименте по определению кумулятивного эффекта при пероральном введении стерильного силанольно-гуматного геля, выраженная в % от абсолютного значения массы тела особей каждой группы: 1 – опытная группа самок; 2 – контрольная группа самок; 3 – опытная группа самцов; 4 – контрольная группа самцов.

показателей крыс контрольных групп выявлены не были. Установлено статистически значимое увеличение ширины распределения эритроцитов в крови самок крыс опытной группы на 7.73% ($p < 0.05$) относительно показателя самок крыс контрольной группы, чего не наблюдалось при сравнении данного показателя у самцов. Также отмечена тенденция к снижению концентрации тромбоцитов в крови самок опытной группы относительно показателя самок контрольной группы на 26.73% ($p > 0.05$).

Результаты исследования биохимических показателей сыворотки крови экспериментальных животных представлены в табл. 4S. Установлено, что СГГ не оказывал статистически значимого влияния на изменение показателей опытных животных в сравнении с контрольными. Отмечена тенденция к увеличению активности АСТ на 33.56% ($p > 0.05$) и щелочной фосфатазы на 38.86% ($p > 0.05$) с одновременным снижением активности АЛТ на 20.45% ($p > 0.05$) у самок опытной группы в сравнении с самками контрольной группы. У самцов опытной группы отмечалась аналогичная тенденция к снижению активности АЛТ на 20% ($p > 0.05$) и увеличению активности щелочной фосфатазы на 17.56% ($p > 0.05$) в сравнении с самцами контрольной группы. У самок и самцов опытных групп была отмечена тенденция к снижению концентрации триглицеридов на 23.16% ($p > 0.05$) и 16.45% ($p > 0.05$) соответственно, в сравнении с показателем концентрации триглицеридов у контрольных групп животных.

После 28 сут внутрижелудочного введения силанольно-гуматного геля у самцов опытной группы наблюдалась тенденция к снижению концентрации глюкозы в сыворотке крови на 34.65% ($p > 0.05$) в сравнении с самцами контрольной группы, чего

не было выявлено у самок опытной группы при сравнении с самками контрольной группы.

По результатам аутопсии и макроскопического исследования внутренних органов крыс на 29 сут не было выявлено выраженных различий между группами. Установлено отсутствие выраженного негативного влияния на органы сердечно-сосудистой, иммунной, дыхательной, нервной и репродуктивной систем при введении силанольно-гуматного геля.

Силанольно-гуматный гель согласно классификации относится к IV классу опасности – обладает слабовыраженной материальной и функциональной кумуляцией при внутрижелудочном введении на протяжении 28 суток в суммарной дозе 64.34 г/кг (для самок и самцов).

Таким образом, полученные данные позволяют рекомендовать силанольно-гуматный гель в дозах, не превышающих 5 г/кг/сутки, что благодаря высокой эффективности иммобилизации полезных бактерий (на примере *E. faecium*) в СГГ позволяет обеспечивать пробиотические эффекты при фактическом суточном потреблении СГГ животным или человеком на несколько порядков ниже порога безопасности, демонстрируя высокий уровень безопасности данной технологии иммобилизации в пищевой промышленности и ветеринарии.

* * *

СГГ образуется в водной среде в результате многостадийного процесса, начинающегося с гидролиза (3-аминопропил)-триэтоксисилана, в ходе которого образуются силоксановые связи а также аминогруппы [22]. В итоге из (3-аминопропил)-триэтоксисилана и гуматов формируется полимер с 3-Д структурой, который хорошо растворим в воде и не обладает токсическим эффектом по отношению к живым организмам. У геля отсутствует острая токсичность при дозе 5 г/кг, кумулятивный эффект, он не обладает кожно-раздражающим действием, и относится к IV классу опасности (малоопасные вещества).

Инновационность (новизна и высокая вероятность применения в практической деятельности) нового разработанного способа иммобилизации бактерий в СГГ заключается в создании эффективного носителя для пробиотических культур, который не только сохраняет, но и усиливает их биологические свойства. Особенно важным является повышение антагонистической активности в 1.5–2.5 раза по сравнению с планктонными культурами. Защитный эффект СГГ проявлялся в значительном повышении выживаемости клеток в условиях ЖКТ (до 100% против 0% в контроле), что открывает новые перспективы для создания эффективных пробиотических препаратов. При этом важно отметить, что сам гель, помимо выполнения функции носителя клеток, может выступать

энтеросорбентом, поскольку обладает хорошими сорбционными свойствами [22]. Гуминовые вещества, входящие в состав геля способны положительно влиять на микробиом кишечника человека [48]. Они также могут быть использованы в сельском хозяйстве и животноводстве в виде жидкой или сухой добавки в корма в качестве источника минеральных и органических веществ для стимуляции роста животных [49]. Гуминовые вещества обладают множеством полезных эффектов, таких как антибактериальное, противовирусное и противовоспалительное действие на животных, укрепляют иммунную систему, оказывают антистрессовый эффект. В конечном итоге после введения гуматов в рацион животных снижалась их смертность и увеличивался прирост [50].

Благодаря комплексу уникальных свойств силанольно-гуматного геля, открываются широкие перспективы его практического применения в различных сферах биотехнологии и промышленности. Применение СГГ позволит разработать новые виды биопрепаратов (заквасок) с пролонгированным сроком хранения. В фармацевтической отрасли возможно применение СГГ для производства пробиотических препаратов с повышенной стабильностью, создание лекарственных форм с контролируемым высвобождением бактериальных клеток, разработка средств для нормализации микрофлоры.

Силанитно-гуматные гели демонстрируют значительный потенциал в качестве инновационной и безопасной матрицы для иммобилизации пробиотических культур в пищевой и кормовой промышленности, открывая новые возможности для разработки функциональных продуктов и кормов. Полученные результаты убедительно свидетельствуют о том, что СГГ является высокоэффективным инструментом для защиты и активации пробиотических бактерий с доказанной безопасностью и функциональностью.

СГГ могут быть рекомендованы к применению в пищевой промышленности как компонент пробиотических продуктов, как техническое вспомогательное средство (носитель и стабилизатор культур) для улучшения их качества, безопасности и пробиотического эффекта, в том числе для создания новых поколений функциональных пищевых продуктов с гарантированной эффективностью. Возможность его использования в технологии кисломолочных продуктов, изготавливаемых с использованием заквасочных микроорганизмов и обогащенных путем добавления в процессе сквашивания и/или после него пробиотических микроорганизмов в монокультурах и/или ассоциациях в соответствии с ГОСТ 32923-2014, для достижения требуемого уровня содержания молочнокислых микроорганизмов – не менее 10^7 КОЕ/мл, пробиотических микроорганизмов – не менее 10^6 КОЕ/мл.

В контексте разработки новых функциональных пищевых ингредиентов, силанольно-гуматные гели предлагаются в качестве инновационной и научно обоснованной безопасной добавки, обладающей уникальными свойствами стабилизации пробиотических культур, позволяющей обеспечить сохранность и стабильность требуемого количества полезных бактерий – в соответствии с ГОСТ Р 55577-2013 – иммобилизации лактобактерий в количестве не менее 10^6 КОЕ/г и бифидобактерий в количестве не менее 5×10^6 КОЕ/г.

В ветеринарии и кормопроизводстве СГГ могут быть широко применены в качестве основы для кормовых добавок-адсорбентов и стабилизаторов пробиотических культур, создания препаратов для восстановления микрофлоры животных, разработки средств для профилактики кишечных заболеваний. Помимо этого, на основе силанольно-гуматных гелей можно создать комбинированные формы препаратов с другими биологически активными веществами.

Полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале силанольно-гуматного геля как инновационной разработки, способной решить проблему длительного хранения бактериальных препаратов и сохранения их функциональной целевой активности. Дальнейшее развитие исследований в этом направлении может привести к созданию новых эффективных пробиотических препаратов и технологий их производства.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ООО “БА-ВАР+” за разностороннюю поддержку этой работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Финансирование работы осуществлялось за счет гранта РНФ № 24-24-20062.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было одобрено комиссией по биоэтике Федерального исследовательского центра пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук. Все исследования проводились в строгом соответствии с Российскими и международными правовыми актами по проведению экспериментов с использованием лабораторных животных: приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 “Об утверждении Правил лабораторной практики” от 19 июня 2003 г. и “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, утвержденными Приказом МЗ СССР №742 от 13.11.84 г. “Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных” и № 48 от 23.01.85 г. “О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Онлайн версия содержит дополнительный материал, доступный по ссылке <https://doi.org/10.7868/S3034574X25060033>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B. et al. // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014. V. 11. P. 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
2. Felis G.E., Salvetti E., Torriani S. In: Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications. Second Ed. / Eds. F. Mozzi, R.R. Raya, G.M. Vignolo. Wiley Blackwell. 2016. P. 25–30. <https://doi.org/10.1007/BF00395928>
3. Hove H., Nørgaard H., Brobech Mortensen P. // Eur. J. Clin. Nutr. 1999. V. 53. № 5. P. 339–350. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600773>
4. Tabasco R., Palencia P., Fontecha J., Peláez C., Requena T. // LWT-Food Science and Technology. 2014. V. 55. № 2. P. 680–684. <https://doi.org/10.3390/foods9080303>
5. Leroy F., De Vuyst L. // Trends Food Sci. Technol. 2004. V. 15. № 2. P. 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
6. Ng E.W., Yeung M., Tong P.S. // Int. J. Food Microbiol. 2011. V. 145. № 1. P. 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.006>
7. Shin H.J., Lee J., Pestka J., Ustunol Z.P. // J. Food Protect. 2000. V. 63. № 3. P. 327–331. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.3.327>
8. Codex Standard for Fermented Milks. Codex Stan. 243-2003. P. 1–5.
9. De Vos W.M. // Microbial Cell Factories. 2011. V. 10. Suppl 1. P. S2. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S2>
10. Ayivi R., Ibrahim S., Gyawali R., Krastanov A., Tahergorabi R., Aljaloud S. et al. // Dairy. 2020. V. 1. № 3. P. 202–232. <https://doi.org/10.3390/fermentation9110964>
11. Lahtinen S.J. // Microb. Ecol. Health and Dis. 2012. V. 23. № 1. P. 18567. <https://doi.org/10.4236/fns.2018.912099>
12. FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002, P. 1–11. Gould G.W. // Int. J. Food Microbiol.. 1996. V. 33. № 1. P. 51–64. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01133-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01133-6)
13. Gherna R.L., Reddy C.A. // Methods for General and Molecular Microbiology. 2007. P. 1019–1033. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6690-4_48

14. *Vinderola G., Binetti A., Burns P., Reinheimer J.* // *Frontiers in Microbiology*. 2011. V. 2. P. 70. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00070>
15. *Schottroff F., Fröhling A., Zunabovic M., Krottenthaler A., Schlüter O., Jäger H.* // *Frontiers in Microbiology*. 2018. V. 9. P. 2773. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02773>
16. *Memiši N.R., Moracanin V.-M., Škrinjar M.M., Iličić M., Ač M.D.* // *Acta Periodica Technologica*. 2014. № 45. P. 55–66.
17. *Talwalkar A., Kailasapathy K.* // *Compr. Rev. Food. Sci. Food Safety*. 2002. V. 3. № 3. P. 117–124. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00018.x>
18. *Borin G.P., de Melo R.R., Crespim E., Sato H.H., Contesini F.J.* // *Polymer Gels*. 2018. P. 1–20. https://doi.org/10.1007/981-106086-1_2
19. Иммуобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы. / Ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. 499 с.
20. *Wilkowska A., Kregiel D., Guneseer O., Karagul Yuceer Y.* // *Yeast*. 2015. V. 32. P. 217–225. <https://doi.org/10.1002/yea.3085>
21. *Volikov A., Ponomarenko S., Gutsche A., Nirschl H., Hatfield K., Perminova I.* // *RSC Advances*. 2016. V. 6. P. 48222–48230. <https://doi.org/10.1039/c6ra08222a>
22. Патент РФ 2021. № 2757600.
23. *Nikolaev Y., Borzenkov I., Demkina E., Loiko N., Kanapatsky T., Perminova I. et al.* // *Int. J. Environ. Res*. 2021. V. 15. № 6. P. 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijerph15061192>
24. *Galuzha O.A., Kovina N.E., Korotkov N.A., Nikolaev Yu.A., El'-Registan G.I.* // *Microbiology*. 2023. V. 92. Suppl. 1. P. S17–S21. <https://doi.org/10.1134/S0026261723700219>
25. *Zaunmüller T., Eichert M., Richter H., Uden G.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 72. P. 421–429. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0395-9>
26. *Mehmeti I., Solheim M., Nes I.F., Holo H.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. № 15. P. 4756–4758. <https://doi.org/10.1128/AEM.00772-13>
27. Николаев Ю.А., Борзенков И.А., Дёмкина Е.В., Лойко Н.Г., Канапацкий Т.А., Перминова И.В. и др. // *Микробиология*. 2021. Т. 90. № 6. С. 692–705. <https://doi.org/10.31857/S0026365621060089>
28. *Galuzha O., El'-Registan G., Vishnyakova A., Nikolaev Yu.* // *Microbiology*. 2025. V. 94. № 1. P. 1–17. <https://doi.org/10.1134/S002626172490001X>
29. *Galuzha O., El'-Registan G., Kashirskaya N., Korotkov N., Nikolaev Yu.* // *Microbiology*. 2024. V. 93. Suppl. 1. P. S11–S116. <https://doi.org/10.1134/S0026261724900112>
30. Чернявская Е.Ф., Дутко А.А., Белясова Н.А. // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биол. наук*. 2013. №1. 73–77.
31. *Ирктова А.Н., Каган Я.Р., Соколова Г.Г.* // *Известия АлтГУ*. 2012. № 3–1. С. 41–44.
32. *Hosseini S.V., Arlindo S., Bohme K., Fernandez-No C., Calo-Mata P., BarrosVelazquez J.* // *J. Appl. Microbiol.* 2009. V. 107. P. 1392–1403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04205.x>
33. Патент Российская Федерация. 2021. № 2 468 087 С1.
34. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. М.: Гриф и К, 2012. 944 р.
35. *Javed M.A., Masud T., Riaz Q.T.A., Imran M., Maqsood S.* // *Ann. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 699–708. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0155-9>
36. *Zur J., Wojcieszynska D., Guzik U.* // *Molecules*. 2016. V. 21. P. 958–973. <https://doi.org/10.3390/molecules21070958>
37. *Strompfová V., Lauková A* // *Anaerobe*. 2007. V. 13. № 5–6. P. 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2007.03.003>
38. *Nikolaev Y.A., Demkina E.V., Ilicheva E.A., Kanapatskiy T.A., Borzenkov I.A., Ivanova A.E. et al.* // *Microorganisms*. 2023. V. 11. № 5. P. 1133. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051133>
39. *Ramsey M., Hartke A., Huycke M.* *The Physiology and Metabolism of Enterococci* // Eds. M. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, N. Shankar Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014. P. 1–55.
40. *Gaca A.O., Lemos J.A.* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2019. V. 83. № 3. P. 1–46. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-19>
41. *Begley M., Cormac G.M.G., Hill C.* // *FEMS Microbiol Rev.* 2005. V. 29. № 4. P. 625–651. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.tb00236.x>
42. *Gunn John S.* // *Microbes and Infection*. 2000. V. 2. № 8. P. 907–913. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00335-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00335-9)
43. *Moser S.A., Savage D.C.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 3476–3480. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3476-3480.2001>
44. *Taranto M.P., Perez-Martinez G., de Valdez G.F.* // *Res. Microbiol.* 2006. V. 157. P. 720–725. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.04.008>
45. *Galuzha O., El'-Registan G., Kanapatskiy T., Nikolaev Yu.* // *Microbiology*. 2024. V. 93. № 5. P. 615–628. <https://doi.org/10.1134/S0026261724900588>
46. *Урбах М.С., Стурова Ю.Г.* // *Ползуновский вестник*. 2024. № 2. С. 172–181.
47. *Swidsinski A., Dörffel Y., Loening-Baucke V., Gille C., Reißhauer A., Göktas O. et al.* // *World J. Gastroenterol.* 2017. V. 23. № 5. P. 885–890. <https://doi.org/10.3748/wjg.V23.i5.885>
48. *Yang H.L., Chiu H.C., Lu F.* // *Am J. Hematol.* 1996. V. 51. № 3. P. 200–206.
49. *Islam K.M.S., Schuhmacher A., Gropp J.M.* // *Pakistan Journal of Nutrition*. 2005. V. 4. № 3. P. 126–134. <https://doi.org/10.3923/pjn.2005.126-134>

Increased Survival Rate of Probiotic Cultures in the Upper Gastrointestinal Tract during Storage Using a New Biocompatible Gel

O. A. Galuza^{a, b, *}, A. V. Khranova^a, E. K. Polishchuk^c, G. I. El-Registan^a, and Yu. A. Nikolaev^a

^a*Vinogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center “Fundamental Foundations of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b*LLC BAVAR+, Moscow, 127206 Russia*

^c*Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Scientific Center of Food Systems named after V.M. Gorbатов of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 109316 Russia*

**e-mail: olesya_galuza@mail.ru*

Immobilization of lactic acid bacteria (using *Enterococcus faecium* as an example) in silanol-humate gels (SHG) not only increases the number of viable cells during long-term storage compared to the control (as previously shown), but also enhances their potential probiotic properties. The antagonistic activity against test strains of microorganisms (*E. coli*, *S. aureus*, and *Y. lipolytica*) increases by 0.7–5 times compared to planktonic cultures. The number of *E. faecium* in SHG under conditions of acid and enzymatic stress, simulating the conditions of the upper parts of the human gastrointestinal tract, is maintained at a level of 30–80% of the initial level, while in the control (unstabilized preparation), almost complete cell death is observed. Technological indicators of fermented milk products obtained using immobilized in SHG *E. faecium* as starters improve: the time of clot formation is reduced from 48 to 44 hours, the organoleptic assessment increases. The safety of SHG for animals has been demonstrated when ingested at doses not exceeding 5 g/kg/day. SHG can be recommended for use in veterinary medicine and the food industry as a feed additive-adsorbent and stabilizer of probiotic cultures as components of food products.

Keywords: silanol-humate gel, biocompatible gel, lactic acid bacteria, *Enterococcus faecium*, cell immobilization, survival rate, antimicrobial activity, fermented milk products, biopharmaceuticals, feed additives, and probiotics