

УДК 579.64:579.24

## ТВЕРДОФАЗНЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК ДЛЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2024 г. Н. А. Ушакова<sup>а, \*</sup>, В. Г. Правдин<sup>б</sup>, И. В. Правдин<sup>б</sup>, Л. З. Кравцова<sup>б</sup>,  
Е. С. Бродский<sup>а</sup>, А. И. Амбарян<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071, Россия

<sup>б</sup>ООО НТЦ БИО, Белгородская область, Шебекино, 309292, Россия

\*e-mail: naushakova@gmail.com

Поступила в редакцию 10.10.2023 г.

После доработки 08.11.2023 г.

Принята к публикации 25.12.2023 г.

Разработана технология получения пробиотического препарата путем твердофазного культивирования смешанной культуры *Bacillus subtilis* В-8130, *B. subtilis* В-2984, *B. subtilis* В-4099 на свекловичном жоме, что показано на двух препаратах (ПроСтор и ГербаСтор). Твердофазная ферментация проводилась в условиях ограниченного доступа кислорода при температуре  $40 \pm 5^\circ\text{C}$ , рН 7.5–8.0 и влажности смеси  $45 \pm 3\%$  в течение 48–50 ч. При ферментации наблюдалось закисление реакционной массы, достоверное повышение титра клеток и образование биопленки на фитосорбенте. Среди идентифицированных летучих продуктов к 48 ч ферментации содержание уксусной кислоты, 3-метилбутановой кислоты, *n*-гваякола и 2-*n*-пентилфурана увеличивалось, а ароматических веществ фенольного ряда уменьшалось. Получены дополнительные метаболиты, усиливающие антибактериальные свойства и вкусовые качества пробиотического препарата. Образование биопленки позволило сохранить при высушивании ( $45^\circ\text{C}$ ) жизнеспособных клеток: в ПроСторе  $1.2 \times 10^8$  КОЕ/г, и в ГербаСторе  $0.58 \times 10^8$  КОЕ/г. В ГербаСторе с расширенным спектром лекарственных растений снижение титра бактерий связано с обезвоживанием при сушке и с антибактериальными свойствами фитоконпонента.

**Ключевые слова:** пробиотик, *Bacillus subtilis*, твердофазная ферментация, биопленка, метаболиты твердофазной ферментации

DOI: 10.31857/S0026365624050168

В системе кормопроизводства широко применяются пробиотики – класс микробиологических препаратов для регуляции и улучшения состава кишечной биоты животных. Современные эффективные кормовые пробиотические препараты представляют собой композиции пре-, пробиотиков и их метаболитов (Sánchez et al., 2016; Шендеров и соавт., 2017; Ushakova et al., 2021). Разные препараты по-разному и с разной эффективностью корректируют работу желудочно-кишечного тракта организма хозяина. Это определяется как особенностью штамма-пробиотика, так и формой, в которой бактерии вводятся в организм животного. Биологическая эффективность повышается при получении пробиотиков в виде биопленки на твердом носителе. Препараты, основанные на получении биопленки пробиотиков, отличаются сохранением жизнеспособных клеток, их метаболитов, наличием сигнальных веществ бактериального происхождения, влияющих

на гомеостаз многоклеточных организмов-хозяев (Горшков и соавт., 2010). Биологическая активность кормовых добавок повышается при комбинировании пробиотиков с лекарственными растениями (Правдин и соавт., 2011; Pavlov et al., 2014). Разносторонняя направленность действия пробиотической составляющей и фитоконпонентов обеспечивает продуктивность животных, увеличение перевариваемости кормов, нормализацию работы желудочно-кишечного тракта, укрепление иммунитета, возможность сохранения поголовья при отказе от использования кормовых антибиотиков.

Цель работы – изучение процесса твердофазного культивирования смешанной культуры бактерий р. *Bacillus* на природном сорбенте (микроизмельченном свекловичном жоме) и влияния факторов стадии ферментации, высушивания и комбинации с лекарственными растениями на жизнеспособность бактерий.

В работе использовали штаммы бактерий из коллекции ВКПМ, перспективные для получения пробиотических препаратов для замены кормовых антибиотиков согласно свойствам, описанным в их паспортах: *B. subtilis* ВКПМ В-8130 (кишечный симбионт с эндогликаназной активностью); *B. subtilis* ВКПМ В-2984 (антагонист *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*); *B. subtilis* ВКПМ В-4099 (применяется для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний сельскохозяйственных животных и птицы).

Применяли двустадийную технологию получения биологически активной кормовой добавки, включающую раздельное глубинное аэробное культивирование на глюкозо-пептонной среде Эйкмана (“Биотехновация”, Россия) пробиотических штаммов с получением жидкой культуры (первая стадия), и последующее твердофазное культивирование смешанной культуры (1 : 1 : 1) *B. subtilis* ВКПМ В-8130, титр клеток  $(3.5 \pm 0.5) \times 10^9$  КОЕ/мл, *B. subtilis* ВКПМ В-2984, титр клеток  $(5.0 \pm 1.2) \times 10^9$  КОЕ/мл, *B. subtilis* ВКПМ В-4099, титр клеток  $(6.5 \pm 0.9) \times 10^9$  КОЕ/мл на свекловичном жоме при ограниченном доступе кислорода в закрытом полиэтиленовом пакете с замком Zip-Lock, полностью заполненном ферментационной массой (вторая стадия).

Смешанную культуру бацилл вносили в количестве 20% от конечной массы смеси с жомом. Использовали стерилизованный автоклавированием микроизмельченный свекловичный жом, размер частиц не более 1 мм. Твердофазную ферментацию проводили при температуре  $40 \pm 5^\circ\text{C}$ , pH 7.5–8.0 и влажности смеси  $45 \pm 3\%$  в течение 48 ч. После высушивания ( $45^\circ\text{C}$ , влажность 8%) к полученной смеси добавляли 10% порошка лекарственных растений (смесь в равных количествах: эхинацея, расторопша в варианте ПроСтор, и эхинацея, душица, зверобой, лист подорожника, расторопша, цветы ромашки в варианте ГербаСтор). Смесь перемешивали в течение 0.5 ч и подвергали дроблению до получения порошка однородной массы, в которой определяли содержание клеток бактерий р. *Bacillus*.

Количество жизнеспособных клеток в жидкой культуре (КОЕ/мл) определяли стандартным методом серийных разведений; в сыром или сухом препарате КОЕ/г определяли методом серийных разведений 10% водной взвеси порошка после встряхивания 30 мин на лабораторном шейкере ПЭ-6500, “ЭКРОСХИМ”, Россия (в соответствии с ГОСТ Р 54065-2010). Число повторностей при определении КОЕ – трехкратное. Количество повторностей ферментации для ПроСтора – 7, для ГербаСтора – 4. Контроль pH осуществляли с использованием pH-метра Экотест 2000 (НПП “Эко-никс”, Россия).

Анализ летучих органических соединений проводили методом твердофазной микроэкстракции

(SPME) (Mottaleb, 2014). 10 г сухого продукта твердофазной ферментации до смешения с травами помещали в стеклянную емкость объемом 0.5 л, добавляли 2 мкл раствора внутреннего стандарта  $D_8$ -толуола (5 мкг) в метаноле, вводили сорбционный стержень и выдерживали 1 ч при температуре  $40^\circ\text{C}$ . Сорбционный стержень затем вводили в хромато-масс-спектрометрическую систему, включающую газовый хроматограф Trace и масс-спектрометрический детектор ThermoFinnigan Polaris Q (“ThermoElectron”, США). Условия анализа: кварцевая капиллярная колонка  $30 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм}$  с неподвижной фазой SGE VPX-5 (слой 0.25 мкм), программирование температуры от 40 до  $280^\circ\text{C}$  со скоростью  $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ , температура инжектора  $240^\circ\text{C}$ , интерфейса –  $240^\circ\text{C}$ ; ионизация электронным ударом при энергии электронов 70 эВ. Скорость газа-носителя (He) – 0.5 мл/мин. Оценку концентрации летучих соединений проводили по методу внутреннего стандарта. Анализ делали в трех повторностях.

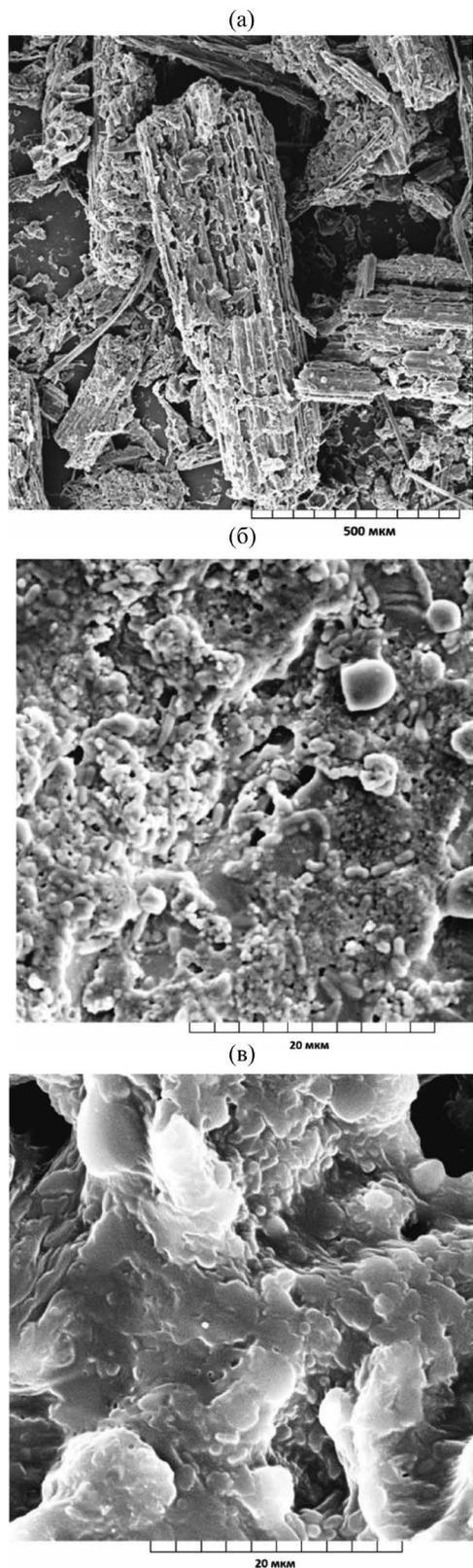
Сканирующую электронную микроскопию осуществляли на микроскопе Tescan Mira 3 LMH (“Tescan”, Чехия). Препараты в виде порошка наносили на поверхность двустороннего проводящего скотча для микроскопии Supplies (США), наклеенного на предметный столик. Напыление осуществляли золотом на установке Q150R ES Plus (“Quorum Technologies Ltd”, Великобритания).

Сравнение количества клеток в препаратах проводили с помощью Robust ANOVA (Wilcox, 2017), с использованием метода бутстрэп (700 случайно сгенерированных из исходной выборки), так как распределение выборок полученных данных отличалось от нормального (результаты теста Шапиро–Уилкинсона по одной из выборок:  $p = 0.007$ ,  $W = 0.802$ ). При сравнении выборок использовали непараметрические методы и медиану по данным титра клеток и кислотности, применяли тест Браннера–Манзела (Karch, 2023). Для статистического анализа данных использовали программу Jamovi 2.4.8.0.

Электронно-микроскопические исследования свекловичного жома показали, что его частицы представляют собой трубчато-складчатую структуру с большим количеством микропор (рисунок, а), что указывает на потенциально высокие сорбционные свойства фитоносителя.

При твердофазном культивировании смешанной культуры бактерий на поверхности частиц носителя развивались клетки бактерий, и ко вторым суткам наблюдалось образование биопленки (рисунок, б, в). При этом отмечено закисление реакционной массы с начального значения pH 7.6 до pH 6.6 на первые сутки и до pH 5.8 на 48 ч культивирования, а также повышение общего титра клеток (таблица).

Анализ данных с использованием Robust ANOVA показал, что титр клеток зависел от фактора “стадия ферментации”, но не зависел от фактора тип препарата – ПроСтор или ГербаСтор ( $p < 0.001$



**Рисунок.** Биопленка в препаратах: а – вид частиц свежескопленного жома; б – развитие бацилл на поверхности носителя в препарате ПроСтор, 24 ч; в – биопленка на поверхности носителя в препарате ГербаСтор, 48 ч.

и  $p = 0.086$  соответственно). Пост-хок сравнение уровней фактора “стадия ферментации” выявило, что титр клеток через 48 ч после начала ферментации был достоверно выше, чем до начала твердофазной стадии культивирования ( $\psi\text{-hat} = -0.661$ ,  $p < 0.001$ ). Численность клеток в сырых препаратах 45% влажности по завершении ферментации составила для ПроСтор  $1.45 \times 10^8$  КОЭ/г и ГербаСтор  $6.65 \times 10^8$  КОЭ/г. Содержание клеток после высушивания до 8% влажности в конечном препарате с фитоконпонентами по значениям медианы:  $1.2 \times 10^8$  КОЕ/г для ПроСтор (рН 6.2) и  $0.58 \times 10^8$  КОЕ/г для ГербаСтор (рН 5.9). При расчете на абсолютно сухой вес (АСВ) титров клеток препаратов по завершении ферментации этот показатель в сыром ГербаСтор был достоверно выше, чем в препарате ПроСтор – тест Манна–Уитни: статистика теста ( $U$ ) = 4.5,  $p = 0.014$ . Достоверных различий в количестве клеток в конечных препаратах 8% влажности между ПроСтор и ГербаСтор не было (тест Манна–Уитни: статистика теста ( $U$ ) = 12,  $p = 0.345$ ). Титр клеток по АСВ в этих конечных препаратах также достоверно не различался (тест Манна–Уитни: статистика теста ( $U$ ) = 12,  $p = 0.345$ ). При сравнении расчетных показателей по АСВ титра клеток сырых продуктов ферментации 45% влажности с учетом 10% добавления фитоконпонентов и титра клеток в конечном препарате выявлено, что для ГербаСтор получение конечного продукта сопровождалось падением показателя с  $11.9 \times 10^8$  КОЕ/г до  $0.6 \times 10^8$  КОЕ/г, т.е. в 18 раз. Это может объясняться не только высушиванием, но также ингибирующим действием лекарственных растений с антимикробными свойствами – душицы, зверобоя, лопуха, ромашки (Корсун, Корсун, 2010). В варианте ПроСтор с расторопшей для поддержания печени и иммуностимулирующей эхинацеей сохранение высокого титра клеток в сухом препарате свидетельствовало о защитном эффекте биопленки при обезвоживании и отсутствии значимого отрицательного действия этих фитоконпонентов на жизнеспособность микробных клеток: снижение числа клеток (с  $2.4 \times 10^8$  КОЕ/г до  $1.6 \times 10^8$  КОЕ/г) составило 1.5 раза.

В ходе твердофазного культивирования на свежескопленном жоме смешанной культуры бактерий *B. subtilis* ВКПМ В-8130, *B. subtilis* ВКПМ В-2984, *B. subtilis* ВКПМ В-4099 на примере ПроСтора показано, что к 48 ч увеличивается содержание идентифицированных летучих соединений: уксусной кислоты с  $0.010 \pm 0.002$  до  $0.025 \pm 0.0004$  мкг/г, 3-метилбутановой кислоты с  $0.002 \pm 0.0003$  до  $0.0034 \pm 0.0004$  мкг/г, а также *n*-гваякола с  $0.005 \pm 0.0005$  до  $0.015 \pm 0.002$  мкг/г и 2-н-пентилфурана  $0.006 \pm 0.0009$  до  $0.0015 \pm 0.0002$  мкг/г. Эти данные соответствуют снижению рН реакционной смеси. В то же время наблюдалось снижение количества выявленных ароматических

**Таблица.** Показатели титра клеток в препаратах при твердофазной ферментации на свекловичном жоме

Препарат	Титр клеток, КОЕ/г*			Высушенный препарат
	Продукт твердофазной ферментации, сут			
	0	1	2	
ПроСтор	$1.50 \times 10^8$	$1.60 \times 10^8$	$1.45 \times 10^8$ (на сухую массу – $2.4 \times 10^8$ )	$1.20 \times 10^8$ (на сухую массу – $1.98 \times 10^8$ )
ГербаСтор	$1.05 \times 10^8$	$1.75 \times 10^8$	$6.65 \times 10^8$ (на сухую массу – $1.1 \times 10^9$ )	$0.58 \times 10^8$ (на сухую массу – $9.59 \times 10^7$ )

\*КОЕ/г сырой массы для твердофазной стадии и КОЕ/г сухого конечного препарата. Приведены значения медианы.

веществ фенольного ряда (фенол, ацетилфенол, крезол, ацетофенон), а также диметилпиразина, 2-н-пентилфурана, 3-изопропоксibenзальдегида и салицилового альдегида, что нивелирует антипитательные свойства свекловичного жома и подтверждает способность смешанной культуры бактерий р. *Bacillus* повышать качество пищи, расщепляя в организме токсические вещества. Выделение уксусной кислоты подтверждает наличие бактериальной ферментации. Увеличение содержания 3-метилбутановой кислоты свидетельствует о протекании элементов брожения в заданных условиях твердофазного культивирования. Гваякол – простой фенол с биологической активностью, антиоксидант, используется при диареях, действуя дезинфицирующе и противогнилостно (DrugBank, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11359>). 2-пентилфуран – ароматическое вещество, которое могут синтезировать бациллы, например, *B. megaterium* ХТВГ34 (Zou et al., 2010), – является безопасной пищевой добавкой, усилителем вкуса (Cha et al., 2021).

Твердофазная стадия культивирования использованных в работе бактерий р. *Bacillus* на органическом носителе позволила получить защищающую клетки биопленку и сохранить высокий титр жизнеспособных клеток после сушки, а также получить дополнительные метаболиты, усиливающие антибактериальные свойства и вкусовые качества пробиотического препарата.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП “Инструментальные методы в экологии” при ИПЭЭ РАН. Работа выполнена за счет бюджетного финансирования, тема № 51 (0109-2019-0008).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горшков В. Ю., Петрова О. Е., Даминова А. Г., Гоголев Ю. В. Система межклеточной коммуникации энтеробактерии *Erwinia carotovora* при формировании адаптивного ответа к условиям неблагоприятным для роста // Доклады АН. 2010. Т. 430. С. 268–272.
- Корсун Е. В., Корсун В. Ф. Фитотерапия. Традиции российского травничества. М.: Центрполиграф, 2010. 882 с.
- Правдин В. Г., Кравцова Л. З., Ушакова Н. А. Способ получения комплексной биологически активной кормовой добавки для животных, птицы и рыбы с пробиотиками и лекарственными травами / Патент РФ № 2477614 от 11.06.2011. Опубл. 20.01.2013. Бюл. № 2.
- Шендеров Б. А., Сеница А. В., Захарченко М. М. Метабиотики: вчера, сегодня, завтра. СПб.: Крафт, 2017. 80 с.
- Cha D. H., Roh G. H., Hesler S. P., Wallingford A., Stockton D. G., Park S. K., Loeb G. M. 2-Pentylfuran: a novel repellent of *Drosophila suzukii* // Pest. Manag. Sci. 2021. V. 77. P. 1757–1764.
- Karch J. D. Bmtest: A jamovi module for Brunner–Munzel’s test—a robust alternative to Wilcoxon–Mann–Whitney’s test // Psych. 2023. V. 5. P. 386–395.
- Mottaleb M. A. Solid-phase microextraction (SPME) and its application to natural products // Handbook of chemicals and biological plant analytical methods. Ch. 5. / Ed. K. Hostettmann. Wiley, 2014. P. 105–127.
- Pavlov D. S., Ushakova N. A., Pravdin V. G., Kravtsova L. Z., Liman C. A., Ponomarev S. V. The ProStor and Ferm KM complex probiotic additives: biotechnological innovation for enhancing the quality of domestic fish mixed feed // News in chemistry, biochemistry and biotechnology: state of the art and prospects of development. Nova Science Publishers. New York. 2014. V. 20. P. 239–244.

Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenço A., Gueimonde M., Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease // Mol. Nutrit. Food Res. 2016. V. 61. Art. 1600240. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>

Ushakova N.A., Pravdin V.G., Kravtsova L.Z., Ponomarev S.V., Gridina T.S., Ponomareva E.N., Rudoy D.V.,

Chikindas M.L. Complex bioactive supplements for aquaculture – evolutionary development of probiotic concepts // Probiotics Antimicrob. Proteins. 2021. V. 13. P. 1696–1708.

<https://doi.org/10.1007/s12602-021-09835-y>

Wilcox R.R. Introduction to robust estimation and hypothesis testing. 4<sup>th</sup> edn. Academic Press, 2017. 810 p.

---



---

## SHORT COMMUNICATIONS

---



---

### Solid-State Method of Production of Probiotic Feed Additives for Farm Animals

N. A. Ushakova<sup>1, \*</sup>, V. G. Pravdin<sup>2</sup>, I. V. Pravdin<sup>2</sup>, L. Z. Kravtsova<sup>2</sup>,  
E. S. Brodsky<sup>1</sup>, and A. V. Ambaryan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, 119071, Russia

<sup>2</sup> Scientific and Technical Center BIO LLC, Belgorod region, Shebekino, 309292, Russia

\*e-mail: [naushakova@gmail.com](mailto:naushakova@gmail.com)

**Abstract.** A technology has been developed for producing a probiotic preparation by solid-state cultivation of a mixed culture of *Bacillus subtilis* B-8130, *B. subtilis* B-2984, *B. subtilis* B-4099 on beet pulp, which is shown in two preparations (ProStor and GerbaStor). Solid-state fermentation was carried out under conditions of limited access to oxygen at a temperature of  $40 \pm 5^\circ\text{C}$ , pH 7.5–8.0 and mixture humidity  $45 \pm 3\%$  for 48–50 hours. During the process, acidification of the reaction mass was observed, a significant increase in cell titer and the formation of a biofilm on phytosorbent. The cell titer depended on the factor “stage of fermentation”, but did not depend on the factor type of preparation – ProStor or GerbaStor. Among the identified volatile products, by 48 hours of fermentation the content of acetic acid, 3-methylbutanoic acid, *p*-guaiacol and 2-n-pentylfuran increased, and aromatic substances of the phenolic series decreased. Additional metabolites were obtained that enhance the antibacterial properties and taste of the probiotic preparation. The formation of a biofilm made it possible to preserve viable cells during drying ( $45^\circ\text{C}$ ): in ProStor  $1.2 \times 10^8$  CFU/g, and in GerbaStor  $0.58 \times 10^8$  CFU/g. In HerbaStore with an expanded range of medicinal plants, a decrease in the titer of bacilli is associated with dehydration during drying and with the antibacterial properties of phytocomponents.

**Keywords:** probiotic, *Bacillus subtilis*, solid-state fermentation, biofilm, metabolites of solid-state fermentation