

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Дбар Сария Джоновна

**Создание полифункциональной пищевой добавки на основе *Lactococcus lactis*
subsp. *lactis***

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, доцент

Стоянова Л. Г.

Москва – 2023 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Общая характеристика молочнокислых бактерий	13
1.2. Продукты метаболизма пробиотических культур.....	14
1.2.1. Аминокислоты, КЦЖК и молочная кислота.....	14
1.2.2. Бактериоцины молочнокислых бактерий	22
1.3. Нейромедиаторная активность.....	26
1.3.1. Кишечно-мозговая ось.....	32
1.3.2. Микробиота и заболевания ЦНС.....	36
1.3.3. Психобиотики и их применение.....	39
1.4. Пробиотики и адгезия.....	45
1.5. БАДы на основе пробиотических культур и оптимизация их способов хранения.....	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	52
2.1. Штаммы МКБ и их культивирование.....	52
2.2. Определение уровня антимикробной активности штаммов <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	53
2.3. Определение концентраций биогенных аминов	54
2.4. Метод определения короткоцепочечных жирных кислот	56
2.5. Определение количества молочной кислоты.....	57
2.6. Определение адгезионной способности штаммов <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	58
2.7. Разработка и оптимизация условий хранения препарата (БАД).....	59
2.8. Метод определения токсичности	61

2.9. Апробация лабораторного образца в модельных опытах на крысах препубертатного периода.....	62
2.10. Статистическая обработка экспериментальных данных.....	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	67
3.1. Определение спектра антимикробного действия и влияния аминокислот на рост и продукцию бактериоцинов штаммами <i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> в динамике их роста в ферментационной среде	67
3.2. Исследование нейромедиаторной активности и влияние аминокислот на синтез нейроактивных соединений штаммами лактококков	89
3.3. Изучение состава короткоцепочечных и молочной кислот, синтезируемых лактококками.....	108
3.4. Определение адгезионной способности штаммов лактококков.....	112
3.5. Оценка биотоксичности и жизнеспособности <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> штамма 194 и его метаболитов	115
3.6. Изучение двигательной активности, ориентировочно-исследовательского поведения и уровня тревожности крыс под влиянием культуральной жидкости <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> штамма 194.....	119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	125
ВЫВОДЫ.....	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	130
РЕКОМЕНДАЦИИ.....	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	134
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	161

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

В настоящее время в рамках усилий ВОЗ по борьбе с растущей глобальной антибиотикоустойчивостью поощряются исследования по разработке новых противомикробных лекарственных средств (Soltani et al., 2021). Доказано, что антибиотики уничтожают не только болезнетворных микробов, но и нормальную микробиоту слизистых оболочек кишечника, что приводит к дисбактериозам и микозам. В связи с этим, особое внимание ученых привлекают нетоксичные антибактериальные вещества природного происхождения (Ansari, Liong, 2015). Так, известно, что штаммы *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, которым присвоен статус “GRAS” (Generally Recognized As Safe), что определяет их как абсолютно безопасные для здоровья человека и животных, способны к синтезу бактериоцинов (Rattanachaikunsorn, Phumkhachorn, 2010). Среди них наиболее известным является низин – полипептид, состоящий из 34 аминокислотных остатков, включающий небелковую аминокислоту лантионин (Устюгова и др., 2012). Низин используется в качестве пищевого консерванта (E234) благодаря его антибактериальному действию, направленному против листерий, клостридий и молочнокислых бактерий (МКБ), вызывающих порчу продуктов питания (Nes et al., 1996). Способность к синтезу низина является физиологической особенностью, характерной исключительно для молочнокислых бактерий вышеуказанного подвида. Однако антимикробная активность штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* против грамотрицательных микроорганизмов и микромицетов на данный момент является недостаточно изученным свойством. Описание новых штаммов-продуцентов бактериоцинов с широким спектром действия, позволит использовать их в качестве потенциальной альтернативы антибиотикам в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, садоводстве и других областях (Cotter et al., 2013).

Другим важным направлением исследований является изучение двунаправленного взаимодействия между кишечником, микробиомом и мозгом,

регулируемого на нервном, гормональном и иммунологическом уровнях и включающего ЦНС, нейроэндокринную и нейроиммунную системы, кишечную и вегетативную (симпатическая и парасимпатическая ветви) нервную систему и микробиотические факторы кишечника (Collins et al., 2012; Шендеров, 2016). Психическое состояние организма, особенно при стрессе, оказывает длительное влияние на кишечную микробиоту (Dinan et al., 2015; Gilbert et al., 2018). Помимо этого, нарушение в содержании нейромедиаторных аминокислот и их метаболитов в организме - одна из причин возникновения различных патологических процессов (прежде всего дисфункций нервной системы) и развития ряда нервных и психических заболеваний, особенно в детском возрасте (Горина и др., 2012; Vuotto et al., 2020). Также некоторые аминокислоты, такие как триптофан и тирозин, могут влиять на функции центральной нервной системы, изменяя синтез и высвобождение серотонина и катехоламинов. Ранее было доказано (Аверина, Даниленко, 2017; Ortega et al., 2022), что пробиотические штаммы лактобацилл могут продуцировать основные нейромедиаторы: ацетилхолин, норадреналин, дофамин, серотонин, играющих роль в выполнении когнитивных функций и в регуляции эндокринной системы. Значимость этого функционального свойства вызвала необходимость в дифференциации пробиотиков и введении класса "психобиотиков" - бактерий, которые приносят пользу психическому здоровью человека (Cheng et al., 2019). У представителей рода *Lactococcus* способность к синтезу нейромедиаторов не была исследована, однако ее наличие расширило бы спектр полезных свойств пробиотических штаммов и позволило их использовать в качестве биологически активной добавки в терапии тревожных и других расстройств, связанных с центральной нервной системой.

Цель и задачи работы

Целью работы является создание полифункциональной пищевой добавки на основе *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить свойства штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, отобрать наиболее эффективные штаммы с пробиотическими свойствами.
2. Выявить способность к синтезу антимикробных метаболитов и нейромедиаторов в динамике роста отобранных штаммов.
3. Исследовать влияние аминокислот на рост, антимикробную активность и синтез нейромедиаторов отобранными штаммами.
4. Определить способность к образованию короткоцепочечных жирных кислот штаммами лактококков.
5. Изучить адгезионные свойства штаммов *L.lactis* subsp. *lactis*.
6. Создать лабораторный образец пищевой добавки на основе наиболее эффективного пробиотического штамма *L. lactis* subsp. *lactis*.
7. Провести апробацию лабораторного образца в модельных опытах на крысах препубертатного периода.

Объекты исследования

Объектами исследования являлись 3 штамма *L lactis* subsp. *lactis* разного происхождения с высокой бактерицинсинтезирующей активностью. Для эксперимента был отобран природный штамм 194, выделенный из коровьего молока фермы в Бурятии (IPPAS C-616; GenBank: DQ255954.1, см. раздел «Приложения», Рисунки 9-10), а также штаммы F-116 (ВКПМ: В-4591; КМ МГУ 281; GenBank: EF100777.1) и F-119 (КМ МГУ 283; GenBank: F100778.1), полученные слиянием протопластов двух, низкоактивных по синтезу низина, родственных штаммов (Стойнова, Егоров, 1998; патент РФ № SU 1687616 А1, 1989; патент РФ № RU 2374320 С2, 2009). Штаммы содержатся в коллекции культур микроводорослей ИФР РАН, ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика» и в коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Предмет исследования

Предметом исследования являлось изучение пробиотических свойств 3-х штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, с целью создания полифункционального БАДа.

Научная новизна исследования.

В работе показано, что штаммы подвида *L. lactis* subsp. *lactis* способны к синтезу антимикробных метаболитов широкого спектра действия, подавляющих рост грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжей и грибов, что является малоизвестным и особо ценным свойством для лактококков. Показано, что усиление антимикробной активности возможно путем внесения в среду культивирования ряда аминокислот, являющихся структурными компонентами бактериоцинов.

Впервые доказана способность штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* к синтезу катехоламинов и предшественника серотонина (5-НТР), что создает возможность использования их в качестве потенциальной антидепрессантной мишени при различных заболеваниях, связанных с центральной нервной системой. Проведение исследований способности штаммов к синтезу нейромедиаторов и влияния аминокислот на синтез биогенных аминов, их предшественников и продуктов метаболизма, дало понимание возможного вклада штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* в ось «микробиота-кишечник-мозг». Утвержден протокол испытаний и акт апробации применения *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194. В модельных опытах оценено влияние наиболее эффективного штамма на двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение и уровень тревожности у крыс препубертатного периода.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

Исследование антимикробной активности штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* позволило расширить представления о возможном использовании их в пищевой промышленности, медицине и сельском хозяйстве. Результаты исследований способны дополнить курс лекций «Бактериоцины: физиологическое значение и практическое использование», проводимых для студентов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ.

Разработанные рекомендации по биотехнологическому процессу создания пищевой добавки на основе *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 позволяют создать как про-, так и метабиотик полифункционального назначения. Создан лабораторный образец полифункциональной пищевой добавки, подобраны оптимальные условия его хранения, изучены его биотехнологические показатели.

Методология и методы исследования

Основой методологии в диссертационной работе являлось использование современных методов микробиологии, биотехнологии, физиологии, аналитической химии и статистики, необходимых для обработки результатов исследований.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Природный штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 и штаммы, полученные слиянием протопластов F-116 и F-119, в динамике роста в биосинтетической среде с дрожжевым экстрактом синтезируют бактериоцины с высоким уровнем антимикробной активности относительно тест-культур, колонизирующих продукты питания и вызывающих токсикоинфекции.
2. Исследуемые штаммы лактококков способны к синтезу биогенных аминов, продуктов их деградации и предшественников, в частности, 5-НТР как

связующего звена в оси микробиота-кишечник-мозг.

3. Отдельные аминокислоты, добавленные в среду культивирования, влияют на синтез бактериоцинов и биогенных аминов в динамике роста продуцентов.
4. Адгезивные свойства исследуемых штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* свидетельствуют о их способности к формированию биопленки как важного функционального показателя, предъявляемого к пробиотикам.
5. На основании установленных пробиотических показателей трех штаммов лактококков: уровня ингибиторной активности на тест-культуры, синтеза нейромедиаторов, короткоцепочечных жирных кислот и адгезионной способности отобран наиболее перспективный природный штамм 194 как основа полифункциональной пищевой добавки.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Работа выполнена в лаборатории физиологии и биохимии микробов кафедры микробиологии, на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета, в аналитическом центре химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский Государственный университет имени М. В. Ломоносова», а также в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова". Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием соискателя. Достоверность результатов обеспечивается проведением исследовательских работ современными методами, в соответствии с международными рекомендациями. Основные положения и результаты научно - квалификационной работы были представлены на конференциях разного уровня, посвященных проблемам микробиологии, биотехнологии и медицины: «Fifth international conference on radiation and applications in various fields of research» RAD-2017 (Черногория, 2017); «Food Quality and safety, Health and Nutrition» (Skopje,

2017); Материалы конгресса Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (Москва, 2017); Материалы XI съезда ВНПОЭМП (Москва, 2017); Материалы V Национального конгресса бактериологов, серия Ассоциация «Национальное научно-практическое общество бактериологов» (Москва, 2019); Всероссийская конференция с международным участием «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019); «5th Euro-asian summit of experts on pneumococcal infection» (Russia, 2021); XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2021» (Москва, 2021); «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарной экспертизы и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции» под девизом «Здоровое животное – безопасная пища – здоровый человек» (Москва, 2021); «3-й Российский микробиологический конгресс» (г. Псков, 2021); VII Пушинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», школа-конференция для молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие» (Пушино, 2021); «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (Москва, 2022); Материалы XII съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2022); XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2022» (Москва, 2022); «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарной экспертизы и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции» под девизом «Здоровое животное – безопасная пища – здоровый человек» (Москва, 2023); «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сборник трудов XV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского» (Москва, 2023).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 5 работ, среди них 4 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 166 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и обсуждения собственных исследований, заключения, выводов, рекомендаций, списка сокращений, списка литературы, состоящего из 142 зарубежных источников и 61 отечественных, приложений, включающих акт апробации и протокол испытаний. Работа проиллюстрирована 60 рисунками и 7 таблицами.

Личный вклад соискателя

Личное участие автора заключалось в сборе и анализе литературных источников по теме исследования, определении цели работы, осуществлении выбора путей решения задач, выполнении экспериментальных исследований, включая изучение микробиологических и физиолого-биохимических особенностей роста и развития разных штаммов молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с целью установления их пробиотического потенциала, проведение физиологических исследований в модельных опытах на крысах, в статистическом анализе полученных результатов, подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и постерных докладов на конференциях.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность за ценные советы, неоценимую помощь и всестороннюю поддержку при выполнении работы: научному руководителю, д.б.н., в.н.с. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ Лидии Григорьевне Стояновой, к.б.н. Елене Владимировне Сорокиной, к.х.н., младшему научному сотруднику аналитического центра химического факультета МГУ Тимофею Александровичу Болотнику, д.м.н., заведующему лабораторией нейрхимической фармакологии Научно-исследовательского института имени В.В. Закусова Владимиру Сергеевичу Кудрину и аспирантке кафедры физиологии человека и животных Анне Андреевне Стахановой.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии – филогенетически не родственные микроорганизмы. Основным свойством МКБ, по которому их объединяют в отдельную обширную группу микроорганизмов, является способность образовывать в качестве главного продукта брожения молочную кислоту. Молочнокислое брожение осуществляют бактериальные организмы, гетерогенные по морфологии: палочковидные и шаровидные (кокки сферической или эллипсовидной формы), относящиеся к родам *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Bifidobacterium* и другие.

По систематическому положению стрептококки серологической группы N были выделены из бактерий рода *Streptococcus* в новый род *Lactococcus*. В этот род отнесены следующие виды и подвиды: *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*, *L. lactis* subsp. *hordniae*, *L. garvieae*, *L. pischlum*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* (Ленгелер и др., 2012).

Углеводный обмен играет ключевую роль у представителей рода *Lactococcus*. В среднем 12,5% генов в каждом геноме лактококков связаны с углеводным обменом. Среди основных генов из десяти оцененных видов / подвидов лактококков в общей сложности 38 генов (5,9%) были связаны с углеводным обменом. Большинство были вовлечены в гликолиз / глюконеогенез и пентозофосфатный путь (PPP). Двадцать восемь ключевых ферментов, которые способствуют гликолизу / глюконеогенезу и PPP, были закодированы (Yu et al., 2017). Показано, что гликолиз / глюконеогенез и PPP являются центральными путями метаболизма углеводов у представителей рода *Lactococcus*. Кроме того, все штаммы имеют гены, кодирующие фруктокиназу, фосфоенолпируват - протеин - фосфотрансферазу и глюкозо - 6 - фосфат - изомеразу, которые являются ключевыми ферментами метаболизма фруктозы и маннозы. Таким образом, все

штаммы могут ферментировать D - глюкозу, D - фруктозу и D – маннозу (Yu et al., 2017).

Бактерии рода *Lactococcus* – каталазоотрицательные, грамположительные, неподвижные, факультативные анаэробные бактерии, которые обычно обитают в животных, растениях и связанных с ними продуктах, в частности в ферментированных продуктах; они обычно считаются непатогенными по отношению к людям (Sun et al., 2014). Виды *Lactococcus lactis* имеют переменные и обильные пищевые потребности. Они обычно растут в диапазоне температур 10 - 40°C, хотя некоторые виды способны расти при температурах до 7°C в течение длительного инкубационного периода 10 - 14 дней (Sakala et al., 2002). Большинство видов лактококков могут расти при 4,0% NaCl; в средах они лучше всего растут при pH 7,0 и перестают расти, если pH падает до 4,5 (Teuber, 2009).

Представители рода *Lactococcus* занимают следующее систематическое положение: Домен: *Bacteria*; фила: *Firmicutes*; класс: *Bacilli*; порядок: *Lactobacillales*; семейство: *Streptococcaceae*.

1.2. Продукты метаболизма пробиотических культур

1.2.1. Аминокислоты, КЦЖК и молочная кислота

Известно, что лактококки синтезируют различные биологически активные вещества: было установлено, что в микробной биомассе пробиотических культур и в культуральной жидкости содержатся антимуtagenные вещества, ферменты, витамины группы В, короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) и аминокислоты (Rattanachaikunsorn, Phumkhachorn, 2010). Одной из важнейших функций аминокислот является их участие в синтезе белков, выполняющих каталитические, регуляторные, запасные, структурные, транспортные, защитные и другие функции (Malempati et al., 2023). Поэтому, аминокислоты служат питательной средой, способствующей ускоренному восстановлению клеток головного мозга. Таким образом, пробиотические микроорганизмы играют

огромную роль в процессах белкового синтеза и являются весьма ценными источниками аминокислот и ферментов.

На основе 20 «протеиногенных» (использующихся для построения белков и ферментов) аминокислот синтезируются «внебелковые» аминокислоты. Без этих органических соединений невозможен ни один физиологический процесс. Эти «внебелковые» аминокислоты (такие как карнитин, таурин, ГАМК и ДОФА) имеют большое значение для функционирования нервной системы. В результате, аминокислоты могут регулировать все основные нервные процессы: возбуждение и торможение, бодрость и сон, агрессию и тревогу, синаптическую пластичность, эмоции, поведение, память и обучение (Громова и др., 2010). Для функционирования организма необходимы все аминокислоты, но для работы мозга и центральной нервной системы особо важны следующие аминокислоты: триптофан, глицин, глутаминовая кислота и тирозин. Большая часть из них являются нейромедиаторами – активными биологическими веществами, отвечающими за передачу нервных импульсов, а значит эти аминокислоты отвечают за память, интеллект и возбудимость нервной системы (Ашмарин, Стукалова, 1996).

Прием больших нейтральных аминокислот (тирозин, лейцин, лизин, глутамин, пролин, валин, изолейцин, триптофан, треонин, аргинин, аспартат, гистидин, метионин), особенно триптофана, тирозина и аминокислот с разветвленной цепью (валин, лейцин и изолейцин), изменяет их поглощение мозгом и превращение в серотонин и катехоламины соответственно (Fernstrom, 2013), так как синтез и высвобождение нейромедиаторов чувствительны к относительно небольшим физиологическим изменениям концентрации предшественников (Fernstrom 1983). В виду этого, изменения концентрации триптофана в мозге влияют на синтез и высвобождение его медиатора, серотонина (5 - гидрокситриптамина), в то время как изменения концентрации тирозина в мозге оказывают такое же влияние на его продукты, катехоламиновые нейротрансмиттеры (дофамин, норадреналин и адреналин). Концентрация обеих

аминокислот в головном мозге легко изменяется при приеме внутрь любой другой аминокислоты, которая имеет общий конкурентный переносчик для поступления в мозг из кровотока. Одним из физиологических примеров является потребление пищи, поскольку прием белка поставляет экзогенные аминокислоты в кровообращение, вызывая повышение их концентрации, в то время как прием любого макронутриента вызывает секрецию инсулина, который непосредственно способствует поглощению большинства аминокислот (Fernstrom, 2013).

Маркус и его коллеги из Голландии представили доказательства того, что прием различных белков может оказывать влияние на соотношение триптофана в плазме и поведение у людей, связанное с серотонином (Markus et al., 1998). Исследуемые белки представляли собой α -лактальбумин и казеин. α -лактальбумин имеет более высокое содержание триптофана и более низкое содержание других больших нейтральных аминокислот, чем казеин. Следовательно, когда люди потребляли пищу, содержащую α -лактальбумин, соотношение триптофана в плазме повышалось до более высокого значения, чем наблюдаемое при приеме пищи, содержащей казеин. Также произошли изменения функций мозга, связанные с серотониновыми нейронами, такие как настроение, секреция пролактина и кортизола (Markus et al., 1998). Впоследствии открыли, что соотношение триптофана в плазме, подобное наблюдаемому у людей, было и у крыс, потреблявших эти белки (Feurté et al., 2001). Другие предположили, что выброс серотонина в мозг был выше у крыс, потреблявших пищу, содержащую α -лактальбумин, чем у крыс, потреблявших казеин, параллельно с изменениями в соотношении триптофана в плазме (Orosco et al., 2004). Таким образом, изменяя синтез и высвобождение серотонина и катехоламинов, триптофан, тирозин и его транспортные конкуренты могут влиять на функцию центральной нервной системы. Такие эффекты могут быть получены путем приема внутрь ряда продуктов и биологически активных добавок, содержащих аминокислоты.

В тоже время органические кислоты, главным образом КЦЖК, образуются в желудочно - кишечном тракте (ЖКТ) в миллимолярных количествах и особенно в

больших количествах встречаются в тех областях, где преобладают анаэробные микроорганизмы. КЦЖК представляют собой летучие насыщенные жирные кислоты, которые имеют в своей цепи 1 - 6 атомов углерода в алифатической цепи, существующие в прямой или разветвленной конформации (Ríos-Covián et al., 2016). Концентрация и соотношение образующихся КЦЖК зависят не только от состава микробиома и количества отдельных микроорганизмов в толстой кишке, но и от типа пищевых волокон, поставляемых микроорганизмам в качестве субстрата в процессе ферментации, и от диеты (Havenaar, 2011). Наиболее распространенными являются уксусная кислота, пропионовая кислота и масляная кислота (в молярном соотношении 3:1:1), которые составляют 90 - 95% КЦЖК, присутствующих в толстой кишке человека, в то время как меньшая часть из них приходится на муравьиную кислоту. Кроме того, при ферментации выбранных, часто быстро ферментируемых неперевариваемых углеводов образуется еще одна органическая кислота — молочная кислота (Morrison, Preston, 2016). Хотя она не принадлежит к группе КЦЖК, эта кислота может продуцироваться молочнокислыми бактериями, например, родами *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Bifidobacterium*. Однако в нормальных условиях она не накапливается в толстой кишке из-за присутствия некоторых видов бактерий, например, *Eubacterium hallii*, которые могут превращать лактат в различные КЦЖК (Miller, Wolin, 1996).

Имеются указания на то, что КЦЖК являются ключевыми медиаторами благотворного воздействия кишечной микробиоты. Они напрямую модулируют здоровье хозяина через ряд тканеспецифических механизмов, связанных с барьерной функцией кишечника, гомеостазом глюкозы, иммуномодуляцией, регуляцией аппетита, ожирением, а также оказывают прямое и косвенное влияние на маркеры риска сердечно - сосудистых заболеваний (Kuczyńska et al., 2011).

Дисбаланс кишечного микробиома и снижение количества бактерий, продуцирующих метаболиты, такие как уксусная, пропионовая и масляная кислоты, часто диагностируют у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, синдромом раздраженного кишечника 2 типа, сахарным диабетом, ожирением, бактериальными инфекциями, аутоиммунными или онкологическими

заболеваниями (Hu et al., 2018). Меньшее количество специфических бактерий и КЦЖК, приводящее к дисфункции кишечного барьера, вялотекущему воспалению и изменению глюкозного, липидного и энергетического гомеостаза, характерно для ожирения и сахарного диабета 2 типа. Установлено, что состав кишечной микробиоты у людей с ожирением отличается от такового у людей с нормальным весом (Rouxinol-Dias et al., 2016). Это подтверждается, в том числе, исследованиями, в которых выявлено, что *Faecalibacterium prausnitzii* наиболее обильна (около 5% бактериальной популяции) в кишечнике здоровых взрослых людей, тогда как у людей с избыточным весом выше количество *Firmicutes* и *Actinobacteria* и ниже количество *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* и *F. prausnitzii*. Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что ожирение связано со снижением количества *Bacteroidetes* и увеличением количества *Firmicutes*, при этом кишечный микробиом человека с ожирением менее разнообразен, чем у худощавого человека (Sanz et al., 2013). Следует также отметить, что *Faecalibacterium prausnitzii* является первой противовоспалительной комменсальной бактерией, идентифицированной на основании клинических данных человека, а также одним из основных продуцентов бутирата кишечного микробиома человека (Sokol et al., 2008). Другие исследования показали более высокую концентрацию КЦЖК (особенно масляной и пропионовой кислоты) в фекалиях детей с избыточным весом по сравнению со здоровыми детьми (Joseph et al., 2019).

КЦЖК играют очень важную роль в регулировании pH, увеличении всасывания кальция, железа, а также магния и благотворно влияют на метаболизм глюкозы и белков в печени. Кроме того, эти кислоты влияют на поддержание нормальной структуры, целостности и функции кишечника. Они проявляют противовоспалительную активность, заключающуюся в подавлении активности медиаторов воспаления в эпителии кишечника и, таким образом, ингибировании активации макрофагов NFκB, являющихся основным источником цитокинов в ходе воспалительного процесса при воспалительных заболеваниях кишечника (Kuczyńska et al., 2011). Эти кислоты являются основным источником энергии для

колоноцитов. Было показано, что источником 70% энергии, используемой эпителиальными клетками кишечника, является масляная кислота, продуцируемая комменсальными бактериями, особенно такими, как *Ruminococcus* и *Faecalibacterium* (Serpa et al., 2010). Кроме того, моделируя рост сапрофитной микробиоты, КЦЖК ингибируют развитие патогенных микроорганизмов, таких как *Escherichia coli*, *Salmonella* или *Campylobacter*, конкурирующих за места колонизации (Havenaar, 2011).

Производство КЦЖК можно косвенно модулировать, манипулируя кишечной микробиотой посредством приема внутрь живых полезных бактерий, известных как пробиотики. Альтернативной стратегией является прием пребиотиков, которые определяются как «субстрат, избирательно используемый микроорганизмами - хозяевами, приносящий пользу для здоровья». Пребиотики действуют как субстрат для бактерий в толстой кишке, которые, в свою очередь, ферментируют их в КЦЖК. Диета существенно влияет на здоровье кишечника и его микробный состав (Dalile et al., 2019).

В исследованиях на модели кишечника человека *in vitro* (система M-SHIME) было оценено влияние водной пробиотической суспензии, содержащей *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 30175, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 30173, *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 30174 и *Enterococcus faecium* NCIMB 30176. Выработка КЦЖК и маркеры воспаления были обнаружены после 3-недельного приема пробиотика (Moens et al., 2019). Результаты подтвердили колонизацию и рост трех видов пробиотиков в просвете и отделах слизистой оболочки проксимального и дистального отделов толстой кишки. Колонизация и рост пробиотических бактерий приводили к более высоким концентрациям лактата в проксимальных и дистальных отделах толстой кишки. По сути, лактат стимулировал рост бактерий, потребляющих его, что приводило к увеличению производства короткоцепочечных жирных кислот, особенно бутирата. Кроме того, наблюдался иммуномодулирующий эффект пробиотиков; продукция противовоспалительных цитокинов (IL-10 и IL-6) была увеличена, а продукция

воспалительных хемокинов (IL-8, CXCL 10 и MCP -1 и) снижена (Moens et al., 2019).

Другие ученые также проверили омолаживающий потенциал пробиотика в комбинации, содержащей *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* BCRC 12188, *Lactobacillus plantarum* BCRC 12251 и *Streptococcus thermophilus* BCRC13869. В исследованиях использовалась мышьяная модель *in vivo*, в которой старение индуцировалось d-галактозой. 12 - недельное исследование проводилось на 15 мышах. Выяснилось, что длительное введение пробиотической смеси за счет увеличения продукции КЦЖК ингибирования клеточного апоптоза и повреждения головного мозга приводит к улучшению памяти у стареющих мышей (Ho et al., 2019).

Дисбаланс в микробном составе кишечника присутствует также при психических заболеваниях, таких как расстройства пищевого поведения, расстройства аутистического спектра и аффективные и тревожные расстройства. Коммуникация микробиота – кишечник - мозг теоретически может происходить через несколько систем, включая ось кишечник - мозг (включая вегетативную нервную систему и энтеральную нервную систему), нейроэндокринные системы и иммунную систему (Sherwin et al., 2016).

Известно, что КЦЖК могут напрямую влиять на мозг, пересекая гемато - энцефалический барьер (ГЭБ), усиливая целостность ГЭБ, модулируя нейротрансмиссию, влияя на уровни нейротрофических факторов и способствуя биосинтезу серотонина. Биосинтез серотонина представляет собой путь гуморальной связи между кишечником и мозгом, на который могут влиять короткоцепочечные жирные кислоты (Mohajeri et al., 2018). Серотонин (5 - гидрокситриптамин - 5-НТ) образуется из триптофана и действует как нейротрансмиттер в ЦНС и на периферии. Более 90% 5-НТ в организме синтезируется в энтерохромаффинных клетках желудочно-кишечного тракта, где он регулирует различные функции, такие как подвижность и секреторные рефлексы. Остаток синтезируется в ЦНС в ядрах шва, расположенных в стволе

мозга, восходящие проекции которых участвуют в регуляции настроения, аппетита, памяти, обучения и сна (Gershon, Tack, 2007). Внутривисцеральное введение физиологических концентраций КЦЖК в проксимальный отдел толстой кишки крыс стимулировало высвобождение 5-НТ из энтерохромаффинных клеток. Одно исследование показало, что ацетат и бутират стимулируют транскрипцию триптофангидроксилазы 1 (фермент, ограничивающий скорость синтеза 5-НТ в слизистой оболочке) в модели энтерохромаффинных клеток человеческого происхождения, что позволяет предположить, что КЦЖК могут играть решающую роль в кишечной продукции 5-НТ и гомеостазе (Essien et al., 2013).

Также была продемонстрирована более благоприятная сторона лактата в качестве альтернативного, «сберегающего глюкозу», топлива для мозга. Экспериментальные и клинические исследования показывают, что лактат может быть использован в качестве альтернативного топлива для метаболизма мозга в условиях низкого уровня глюкозы. Предполагается, что лактат может использоваться в качестве альтернативного источника энергии при некоторых врожденных нарушениях метаболизма. Например, у пациентов с синдромом дефицита транспортера глюкозы типа 1 (GLUT1DS) лактат используется в качестве альтернативного топлива в мозге для компенсации нарушения транспорта глюкозы через гематоэнцефалический барьер (Taher et al., 2016). Так, когда организм работает в привычном режиме, глюкоза распадается на две молекулы пировиноградной кислоты; когда же мышцы начинают потреблять очень много энергии, кислорода не хватает и молекулы пировиноградной кислоты распадаются до молекул молочной кислоты. Последние поступают в печень, где из них конструируются новые молекулы глюкозы, которые из печени поступают в кровь и используются в качестве питания для мозга.

1.2.2. Бактериоцины молочнокислых бактерий

Лактококки обладают сильной антимикробной активностью в отношении многих родственных и неродственных микроорганизмов, включая микроорганизмы, вызывающие порчу пищевых продуктов, и патогенные бактериальные штаммы, принадлежащие к *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium* и *Bacillus spp.* Антимикробный эффект молочнокислых бактерий в основном обусловлен снижением рН пищи, конкуренцией за питательные вещества и выработкой ингибирующих метаболитов (Srivastava, 2018). Эти противомикробные молекулы входят в число полезных пептидов, которые естественным образом синтезируются некоторыми молочнокислыми бактериями во время ферментации молока, и традиционно используются в качестве пищевых биоконсервантов природного происхождения (Dobson et al., 2012).

Бактериоцины представляют собой антимикробные пептиды - предшественники, содержащие N - концевую лидерную последовательность (Kanmani et al., 2013), синтезированные на рибосомах, продуцируемые определенной бактерией. В некоторых случаях эти предшественники подвергаются посттрансляционным модификациям перед расщеплением лидерной области и экспортом за пределы клетки. Эти антимикробные пептиды обладают бактериостатическим или бактерицидным спектром действия, который в основном направлен против бактерий, тесно связанных с штаммом - продуцентом, и в редких случаях против более широкого круга неродственных групп бактерий (Cotter et al., 2013), таким образом, они составляют важную часть системы микробной защиты (Nes et al., 2007). Кроме того, они могут функционировать в ЖКТ как потенциальные естественные биотерапевтические агенты, облегчающие конкуренцию пробиотических штаммов и/или ингибирующие патогены; тем самым они вносят потенциальный вклад в баланс микробиоты и здоровье человека. Такие штаммы, продуцирующие бактериоцины, могут стать потенциальной альтернативой антибиотикам и могут быть полезны в качестве средства контроля носительства патогенов, поэтому они очень подходят в качестве микробных

пищевых добавок (Cotter et al., 2013). Активно проводятся исследования по взаимосвязи между пробиотическими продуктами, содержащими эти штаммы, и поддержанием здоровья кишечника человека (Yadav et al., 2009).

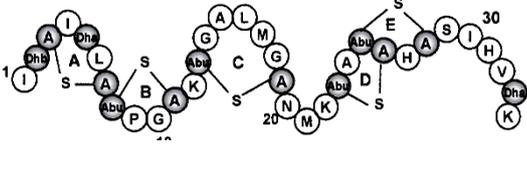
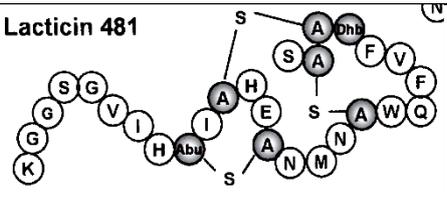
Первоначально бактериоцины были разделены на четыре класса. Четвертый класс бактериоцинов, состоящий из больших комплексов с углеводными или липидными фрагментами, был исключен и назван бактериолизинами, состоящими из лейконоцина S и лактоцина 27. Таким образом, бактериоцины в основном подразделяются на три класса (Liu et al., 2014).

Бактериоцины класса I обычно состоят из 19 - 50 аминокислот и подвергаются значительной посттрансляционной модификации, что приводит к образованию нестандартных аминокислот, таких как лантионин, β -метиллантионин, дегидробутирин, дегидроаланин и лабиринтин (Cuozzo et al., 2001., Parada et al., 2007). Класс I далее подразделяется на класс Ia (лантибиотики), класс Ib (лабиринтопептиды) и класс Ic (санктибиотики). Низин является наиболее популярным бактериоцином класса I, используемым в качестве пищевого консерванта из-за его антибактериального действия против листерий, спор клостридий и молочнокислых бактерий, вызывающих порчу продуктов питания (Таблица 1). Низин одобрен в качестве пищевой добавки (E234) в Европейском Союзе в соответствии с Директивой 95/2/ЕС (ЕС, 1995 г.) для следующих продуктов: пудинги из манной крупы и тапиоки (3 мг/кг); созревшие и плавленые сыры (12,5 мг/кг), взбитые сливки (10 мг/кг) и сыр Маскарпоне (10 мг/кг). Он также разрешен более чем в 40 странах мира, включая США, Австралию, Южную Африку, Россию и Индию, для использования в качестве противомикробного агента в различных пищевых продуктах (EFSA, 2017). Кроме того, во многих исследованиях сообщалось о низине как о альтернативном агенте для лечения инфекционных заболеваний, включая оральные, желудочно-кишечные, респираторные и кожные инфекции, мастит, лекарственно - устойчивые инфекции и неинфекционные заболевания, такие как рак. Штаммы *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* способны к синтезу бактериоцинов, среди которых наиболее известным

является низин, состоящий из 34 аминокислотных остатков, включая небелковую аминокислоту лантионин. Из молока бурятских коров выделен штамм 194, синтезирующий 2 бактериоцина, один из которых низин, второй – 20 - членный пептид, не содержащий лантионин (Устюгова и др., 2011).

Таблица 1.

Лангибиотики, образуемые *Lactococcus lactis* (Nes et al., 1996)

Лангибиотик	Молекулярная масса (кДА)	Число тиоэфиров	Структура
Низин А, Z	3353 3330	5	
Лактицин 481	2901	3	Lacticin 481 

Класс II содержит небольшие термостабильные немодифицированные пептиды и может быть дополнительно подразделен на класс IIa (педиоциноподобные бактериоцины), класс IIb (двухпептидные немодифицированные бактериоцины), класс IIc (циркулярные бактериоцины) и класс IId (немодифицированные, линейные, непедиоциноподобные бактериоцины). Педиоциноподобные бактериоцины являются наиболее доминирующими бактериоцинами класса IIa (Belguesmia et al., 2011). Бактофенцин А представляет собой новый бактериоцин класса IId с некоторыми уникальными свойствами. Он сильно катионный и имеет сходство с некоторыми катионными антимикробными пептидами эукариот. Уникальной особенностью бактофенцина А является то, что в отличие от специфического белка иммунитета он проявляет dltB

гомолог - опосредованный иммунитет, который, как предполагается, снижает отрицательный заряд клеточной стенки, тем самым препятствуя взаимодействию между бактериоцинами и клеткой (O'Shea et al., 2013).

Крупные и термолабильные бактериоцины составляют бактериоцины класса III. Колицин является одним из примеров бактериоцинов класса III, продуцируемых *E. coli*. Бактериоцины класса III также включают гельветицин М, гельветицин J и энтеролизин А, продуцируемые *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus* и *E. faecalis*, соответственно. Гельветицин М недавно был охарактеризован, и известно, что он разрушает клеточную стенку грамположительных бактерий и наружную мембрану грамотрицательных бактерий, таким образом, эффективен как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий (Sun et al., 2018).

Бактериоцинам для взаимодействия с мембранами требуется стыковочная молекула, такая как липид II или маннозопермеаза фосфотрансферазной системы (Héchar, Sahl, 2002). Однако некоторые бактериоцины могут не нуждаться в рецепторах - мишенях для стыковки. Гарвицин (Garvicin ML), циркулярный бактериоцин, полученный из *Lactococcus garvieae* DCC43, использует переносчик мальтозы ABC и пермеазу в качестве рецепторов (Gabrielsen et al., 2012). В то время как стыковочные молекулы повышают проводимость и стабильность пор, рецепторы в мембране - мишени могут определять специфичность бактериоцинов класса II. Бактериоцины I класса, являясь лантибиотиками с остатками (метил)лантионина (лантионин и метиллантионин), образуют внутримолекулярные тиоэфирные кольца. Бактериоцины класса II малы и обладают узким спектром бактерицидной активности. Лантибиотики образуют поры в «клиновидной» модели, в то время как бактериоцины класса II увеличивают проницаемость мембраны за счет пор «бочкообразной клепки» или по механизму «ковра» (Moll et al., 1999).

1.3. Нейромедиаторная активность

«Гормон» означает, что вещество выбрасывается в кровь особыми клетками, зачастую собранными в эндокринную железу. Гормоны распространяются по всему телу, действуют на многие органы и ткани, а их эффекты длятся долго – минуты и часы. Медиатор выделяется из отростка нейрона (аксона), образующего контакт с клеткой - мишенью – мышечной, железистой, другим нейроном. Медиатор действует точно, только на эту клетку, изменяя ее активность не более чем на несколько секунд (Бец, 2005).

Контакт аксона нейрона со следующей клеткой, в котором функционируют медиаторы, называют синапсом (Рисунок 1). Срабатывание синапса происходит, когда по аксону проходит электрический импульс, сигнализирующий о важном сенсорном раздражителе, например, боли, эмоциях, принятых мозгом решениях. Выделившись из окончания аксона, медиатор воздействует на рецепторы – чувствительные белки, расположенные на поверхности клетки - мишени. В случае норадреналина такие рецепторы подразделяются на два типа: альфа и бета, различающиеся по скорости срабатывания, а порой и по знаку эффекта: это либо возбуждение, либо торможение следующей клетки (Николлс и др., 2008).

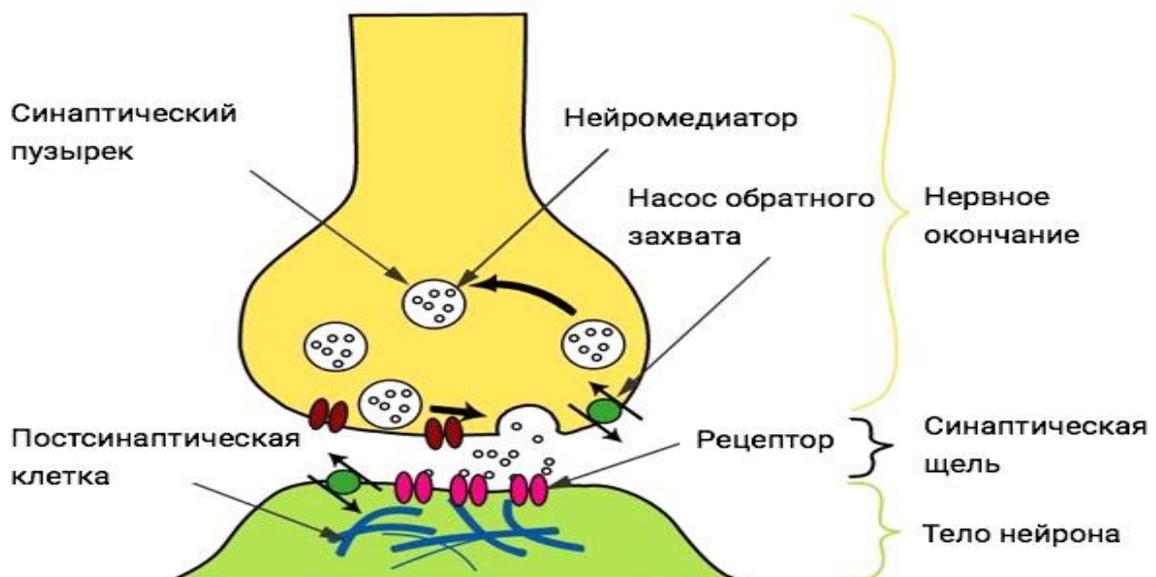


Рисунок 1. Схема строения синапса химической передачи (Савельев, 2006)

Исследование роли катехоламинов, например, норадреналина (НА) и дофамина (ДА), серотонина, а также их предшественников в регуляции гипоталамо - гипофизарного звена репродуктивной функции представляет не только теоретический интерес, но имеет большое значение для понимания механизмов нарушения нормального функционирования репродуктивной системы при различных патологических состояниях, старении, а также при воздействии на организм неблагоприятных факторов внешней среды (Арутюнян и др., 2004).

Известно, что лактобактерии используют нитрат и нитрит для образования оксида азота и сероводорода, которые модулируют моторику кишечника путем взаимодействия с ванилоидными рецепторами (которые также задействованы в процессах восприятия боли) на капсаицин - чувствительные нейроны, что в итоге приводит к нормализации моторной функции кишечника и снижению болевой чувствительности – одного из проявлений и измеряемого в исследованиях эквивалента тяжести течения младенческих кишечных коликов. Моторная функция кишечника регулируется и посредством других механизмов, в частности через нейромедиаторы, важными из которых являются биогенные амины. Катехоламины – дофамин, адреналин и норадреналин – синтезируются из L-тирозина в различных отделах мозга, надпочечниках, некоторых симпатических волокнах. В организме человека адреналин и норадреналин являются нейротрансмиттерами и гормонами, отвечающими за развитие стресс-реакции (Cheng et al., 2019).

Следует отметить, что особый интерес представляет роль кишечной микробиоты в обмене серотонина. Серотонин – это нейромедиатор и гормон, большая часть серотонина образуется в энтерохромаффинных клетках кишечника и только 10% - в серотонинергических нейронах эпифиза после проникновения триптофана через гемато - энцефалический барьер путем активного транспорта (Yano et al., 2015). Из триптофана синтезируется важнейший эндогенный адаптоген – мелатонин, обладающий широким спектром положительных эффектов, включая регуляцию циркадных ритмов, что обусловило создание группы антидепрессантов с механизмом действия, основанном на

мелатонинергическом агонизме (Кирпиченко, 2014). Серотонин, будучи нейротрансмиттером, вовлечен в регуляцию сна, аппетита, настроения, обучения, памяти, а также в работу пищеварительной, дыхательной и сердечно - сосудистой систем и гемостаза. Низкая активность серотонинергической системы головного мозга считается важнейшим нейробиологическим фактором тревоги и депрессии и является мишенью для антидепрессантов с механизмом действия, основанном на селективном подавлении обратного захвата серотонина. Серотонин облегчает двигательную активность, благодаря усилению секреции субстанции P в окончаниях сенсорных нейронов путём воздействия на ионотропные и метаботропные рецепторы (Foster, Neufeld, 2013).

Однако из триптофана может образовываться не только серотонин. Выделяют три пути биосинтеза из триптофана – кинурениновый, серотониновый и индольный (Рисунок 2). На равновесие в данной системе могут оказывать влияние как уровень стресса (и следовательно, кортизола), так и состояние кишечной микробиоты. Некоторые виды симбиотических бактерий обладают способностью декарбоксилировать триптофан, превращая его в серотонин. Повышенный вследствие стрессового воздействия уровень кортикостероидов активирует фермент триптофан - пирролазу, которая переводит обмен триптофана на кинурениновый путь, что приводит к снижению синтеза серотонина. Повышенный уровень кинуренина обычно отмечается у пациентов, страдающих от депрессии и синдрома тревожности, а также у пациентов с болезнью Альцгеймера и мигренью. В то же время прием определенных пробиотиков связан с более низким уровнем кинуренина и повышением уровня серотонина (Скрипченко и др., 2018).

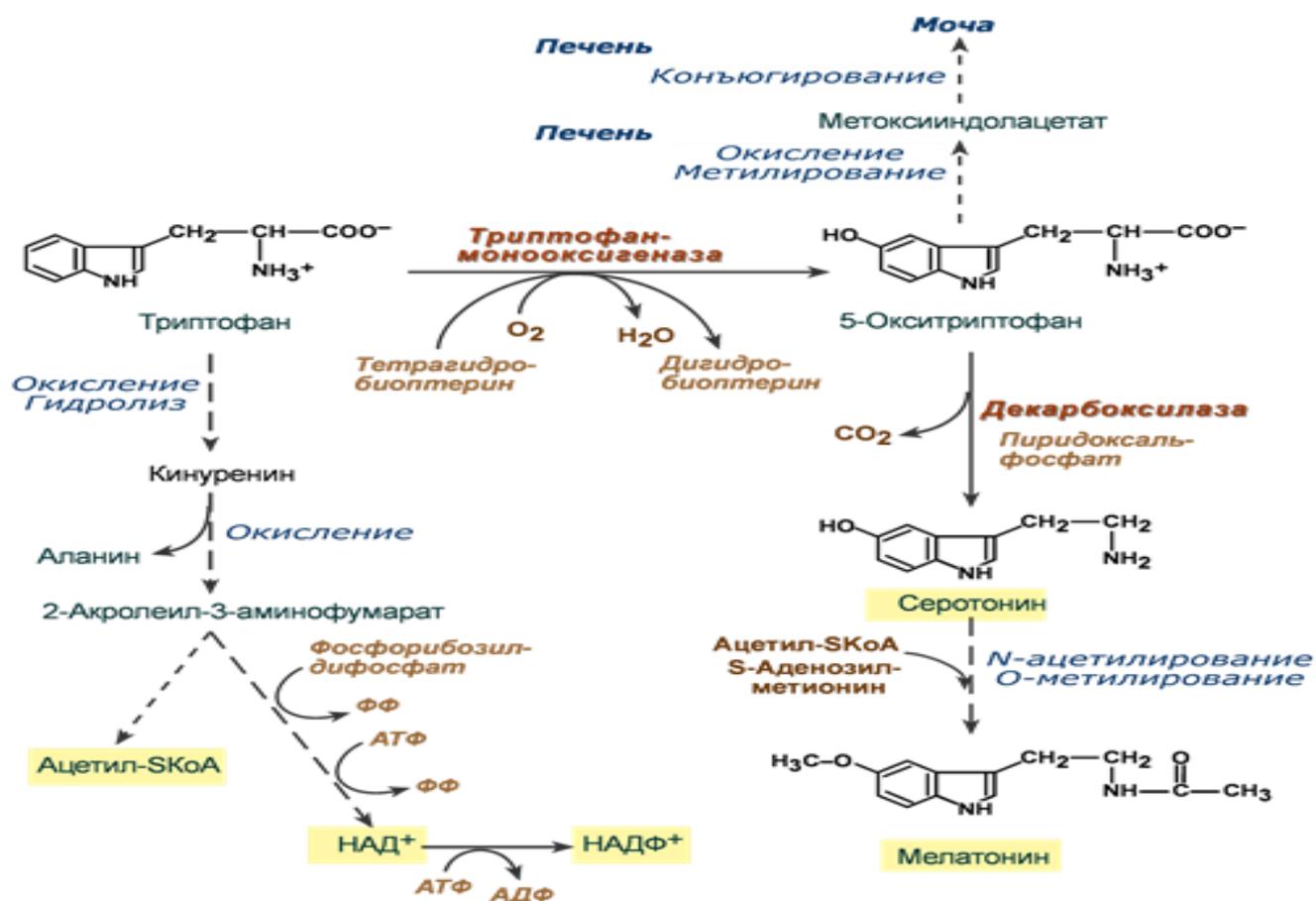


Рисунок 2. Пути превращения триптофана (Скрипченко и др., 2018)

ДА необходим для поддержания общего уровня двигательной активности, бодрствования мозга, высокого тонуса центров сенсорного восприятия, управлением движениями, памяти, эмоций, для точного выполнения моторных программ и блокировки произвольных движений. Уровень ДА влияет на активность гипоталамуса и гипофиза. У млекопитающих ДА выполняет роль гормона - антагониста пролактина, необходимого в свою очередь для выделения молока клетками грудной железы. В то же время ДА – важный нейротрансмиттер, он способствует переносу импульса от нейрона к нейрону через синаптические щели. ДА распространен как синаптический медиатор в трёх отделах головного мозга: чёрной субстанции, покрышке среднего мозга и в различных ядрах гипоталамуса. При этом вещество практически не встречается в периферической нервной системе (Iversen, Iversen, 2007).

Активность ДА обусловлена его связыванием с D - рецепторами пяти подтипов (D1-5), которые сопряжены с G-белками. Последние активируют (рецепторы D1 и D5) или, наоборот, ингибируют (рецепторы D2 - 4) аденилатциклазу, соответственно повышая или понижая уровень внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Самые распространённые – рецепторы D1 и D2. Недавно описанный дополнительный рецептор TAAR1 (trace amine-associated receptor 1 – рецептор следовых аминов 1) также действует на активность внутриклеточной аденилатциклазы (Grandy et al., 2016). Препараты, повышающие уровни ДА в мозге, являются стимуляторами физической и психической активности человека, некоторые из этих препаратов приобрели также статус наркотиков (например, амфетамины, стимулирующие выделение ДА в синаптическую щель).

НА – другой важнейший нейромедиаторный катехоламин – представляет собой гормон мозгового вещества надпочечников (в этой роли он выступает в кооперации с адреналином) и нейромедиатор нервных окончаний симпатической вегетативной и центральной нервной системы. Действие НА связано с влиянием на адренорецепторы (преимущественно на β 1- адренорецепторы, хотя он связывается и с α - адренорецепторами). Гормон НА оказывает сосудосуживающее действие, повышая кровяное давление, что применяется в практике реанимации, он же расширяет бронхи, тормозит желудочно - кишечный тракт. Действие НА на сердце связано со стимулирующим его влиянием на адренорецепторы сердечной мышцы, что приводит к увеличению сердечного выброса. Гормональное влияние НА как фактора стрессового ответа дополняется его нейротрансмиттерным эффектом, направленным на мобилизацию мозга при стрессе. Нейромедиаторная роль НА сводится к активации ЦНС и повышению уровня двигательной активности, снижению уровня тревожности и повышению агрессивности (Дубынин и др., 2003).

Вместе с адренокортикотропным гормоном, кортикостероидами, кортизолом, адреналин и норадреналин являются основными продуктами активации

гипоталамо – гипофизарно - надпочечниковой оси (ГГНО), дисфункция которой сопровождается гиперактивностью симпатической нервной системы, что наблюдается у пациентов с депрессией и тревогой. Что касается дофамина, то известно несколько дофаминовых путей в нейротрансмиссии, один из которых является частью так называемой «системы внутреннего подкрепления», отвечающей за позитивное настроение как вознаграждение за достижение результата. Различные психологические награды увеличивают уровень дофамина в мозге, таким же образом действуют и некоторые психоактивные вещества (Олескин, 2013).

Влияние адреналина и норадреналина на кишечную микробиоту заключается в усилении роста и вирулентности условно - патогенных бактерий, что, возможно, является одной из причин изменения кишечной микробной композиции у людей в стрессовых условиях. Подавляя выработку IgA, стимулируя перистальтику и выделение желчи, они способствуют увеличению популяции анаэробных бактерий *Bacteroides* и представителей патогенной микробиоты (Олескин, 2013). Пробиотики, как оказалось, снижают активность ГГНО, что приводит к нормализации концентрации стресс - гормонов у пациентов и их расслаблению (Wall et al., 2014).

Серотонин наряду с дофамином играет важную роль в механизмах гипоталамической регуляции гормональной функции гипофиза. Стимуляция серотонинергических путей, связывающих гипоталамус с гипофизом, вызывает увеличение секреции пролактина и некоторых других гормонов передней доли гипофиза – действие, противоположное эффектам стимуляции дофаминергических путей. Серотонин также участвует в регуляции сосудистого тонуса. Учитывая функции серотонина, интересно отметить, что в полосатом теле и гиппокампе GF - мышей обмен серотонина ускорен. Существуют данные о том, что в основе антидепрессивного и анксиолитического эффектов пробиотиков может лежать микробный синтез триптофана, поскольку было доказано, что у пациентов, страдающих депрессией, снижена секреция мелатонина и серотонина.

Хотя биогенные амины микробного происхождения слабо проникают через барьер слизистой оболочки внутренних органов, они, взаимодействуя с энтеральной нервной системой, могут передавать сигнальные вещества через блуждающий нерв и, таким образом, оказывать влияние на головной мозг (Шендеров, 2016).

Есть данные о том, что катехоламины повышают степень адгезии микробиоты ЖКТ к слизистой кишечника и способствуют формированию биоплёнок. Существенная стимуляция образования биоплёнок наблюдалась у обитателя кожных покровов (обнаруживаемого и в ЖКТ) *S. epidermidis*. У патогенных бактерий катехоламины, кроме пролиферации клеток, стимулируют образование токсинов, адгезинов и других факторов вирулентности (Clarke et al., 2006). Так, НА усиливает адгезию патогенного энтерогеморрагического штамма *E. coli* (ЕНЕС) к слизистой слепой, поперечно - ободочной и тонкой кишки (Vlisidou et al., 2004).

1.3.1. Кишечно – мозговая ось¹

Традиционно считается, что микробиом кишечника имеет несколько основных функций: защищает организм от колонизации патогенных микроорганизмов; укрепляет эпителиальный кишечный барьер; способствует абсорбции веществ и улучшению метаболизма. На сегодняшний день результаты идентификации микроорганизмов, входящих в состав микробиоты, позволили сделать ряд открытий и привели к пониманию микробиоты как одного из условий нормы и патологии организма хозяина, при этом микробиота кишечника представляет особый интерес ввиду сложности качественного и количественного состава, а также многообразия выполняемых функций, что позволило еще в начале

¹Основные результаты, изложенные в данной подглаве, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

1. Дбар С.Д., Стоянова Л.Г. Новое поколение пробиотиков-психобиотики, их назначение и функции // Антибиотики и химиотерапия. – 2021. – Т. 66. – №. 9-10. – С. 64 - 80. DOI: 10.37489/0235-2990-2021-66-9-10-64-78. IF (РИНЦ) - 0,634.

20 века И. И. Мечникову сравнить микробиоту с печенью и предложить рассматривать в качестве отдельного органа (Рябиченко, 2013).

В последние годы уделяется особое внимание изучению двунаправленной системы коммуникаций между микробиотой кишечника и мозгом, выделенных в ось микробиота – кишечник – мозг, которая оказалась ключевым игроком в начальной фазе развития нервной системы (Sampson, Mazmanian, 2015).

Известно о существовании связей между нарушением ранней бактериальной колонизации или микроэкологии кишечника с заболеваниями системы иммунитета, болезнями системы кровообращения, ожирением, сахарным диабетом 2 типа, нейродегенеративными заболеваниями, аутизмом, синдромом хронической усталости, синдромом дефицита внимания с гиперактивностью (Шендеров, 2016). Около 10 – 15 % человек во всем мире страдает от синдрома раздраженного кишечника (СРК). Этиопатогенез заболевания сложен, поскольку в его формировании, как правило, задействован ряд этиологических факторов, запускающих несколько патофизиологических механизмов (Ивашкин, Ивашкин, 2018). Среди наиболее обсуждаемых в литературе аспектов: личностные психологические аспекты; генетическая предрасположенность; факторы питания; развитие висцеральной гиперчувствительности; нарушения моторной активности; изменения в нейроэндокринной системе (ось «головной мозг - кишечник»); повышение проницаемости кишечника; развитие воспаления «низкой степени активности» и нарушение состава кишечной микробиоты (Ивашкин, Зольникова, 2019).

Исследования последних десятилетий также показали роль микробиоты в развитии воспалительных заболеваний кишечника. Было установлено, что нарушения микроэкологии кишечника связаны с СРК и другими хроническими воспалительными заболеваниями кишечника, что обуславливает эффективность пробиотиков в их комплексной терапии (Wasilewski et al., 2015; Markowiak-Kopeć, Śliżewska, 2020). Имеются доказательства, подтверждающие гипотезу о различии состава пристеночной и внутрипросветной микробиоты среди конкретных

подгрупп пациентов с СРК и здоровых лиц (Hungin et al., 2013; He et al., 2014; Jalanka - Tuovinen, et al., 2014). С помощью метода секвенирования 16S рРНК продемонстрировано, что у пациентов с СРК уменьшается разнообразие микробной популяции, изменяется доля конкретных бактериальных групп и степень вариабельности состава микробиоты (Spiller, Garsed, 2009). У пациентов с СРК наблюдается сокращение бактерий рода *Clostridium* и *Lactobacteria* (Kassinen et al., 2007; Cenac et al., 2007; Piche et al., 2008). Гомеостаз микробиоты является определяющим для адекватного функционирования кишечного барьера, нарушения которого играют важную роль на всех уровнях оси «микробиота – кишечник – мозг» (Rousseaux et al., 2007; Medani et al., 2010). Таким образом, термин «микробиота – кишечник – мозг» четко демонстрирует корреляционную взаимосвязь основных функциональных составляющих СРК (Родионова и др., 2009; Шептулина, Ивашкин, 2016).

С другой стороны, давно отмечено, что кишечные инфекции и хронические воспалительные заболевания сопровождаются тревожными, депрессивными расстройствами, нарушениями когнитивной сферы у 60% пациентов, а причина запоров – депрессии, на что обратил внимание еще Гиппократ (Savignac et al., 2014). Возможно, именно это послужило основой первых исследований, направленных на изучение влияния микробиоты на развитие тревожных и депрессивных расстройств и оценку терапевтического потенциала пробиотиков в отношении этих заболеваний.

Кишечник получает регуляторные сигналы от ЦНС и наоборот, поэтому возник термин «кишечно - мозговая ось» (КМО), который включает в себя афферентные и эфферентные нервные, эндокринные, иммунологические и пищевые связи между ЖКТ и ЦНС (Hueston, Deak, 2014). Основной особенностью данного понятия является двунаправленное взаимодействие, с различными механизмами регуляции. КМО работает через центральную регуляцию сытости. Изменение структуры рациона питания и контроль потребления пищи со стороны ЦНС влияют на доступность питательных веществ кишечной микробиоты и ее

состав. Сигнальные пептиды насыщения (СПН) – это ключевые молекулярные посредники управления оси (De Vadder et al., 2014). Эти пептиды, в частности пептид YY (pYY), транспортируются через кровь в мозг после приема пищи, чтобы подать сигнал сытости организма. СПН в основном образуются в ЖКТ, а также синтезируются в головном мозге. ЦНС может влиять на микробиом кишечника через нервные и эндокринные пути как прямым, так и косвенным образом. Связь между кишечником и мозгом осуществляется посредством формирования сенсорной информации в периферических отделах (кишечник) и ее перемещения в центральные структуры (ЦНС). Каждый стимул от чревных висцеральных афферентов проходит по внутренней энтеральной нервной системе, принимается в задних (дорсальных) рогах спинного мозга и передается по супраспинальным проводящим путям до окончательного болевого восприятия корой головного мозга (Wells et al., 2011; Barrett et al., 2012). Взаимодействие между центральными и периферическими областями оси происходит посредством большого количества нейромедиаторов и иммуномедиаторов, эндокринных медиаторов (Рисунок 3).

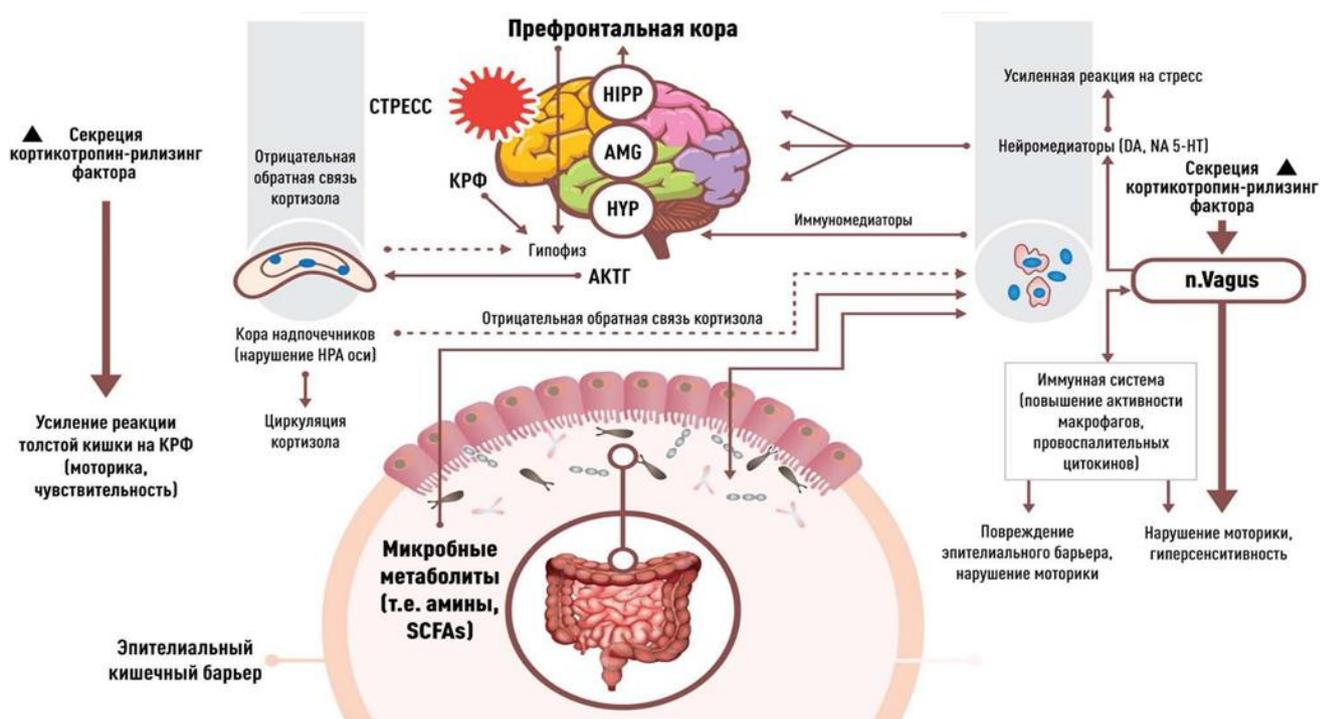


Рисунок 3. Модель взаимодействия оси «микробиота — кишка — мозг» (Ивашкин, Зольникова, 2019). Примечание: DA – дофамин; NA – норадреналин; 5-НТ – 5 - гидрокситриптамин

Вегетативная нервная система (ВНС) и ГГНО связывают ЦНС с внутренними органами и могут модулировать физиологию кишечника, в частности – моторику, секрецию и эпителиальную проницаемость, которая влияет на условия существования микроорганизмов, населяющих определенные ниши тела (Matsumoto et al., 2013). Измененная микробиота вызывает активацию иммунной системы, продукцию провоспалительных цитокинов. В ответ на стимулы нейромедиаторов, иммуномедиаторов из гипоталамуса выделяется кортикотропин – рилизинг - фактор (КРФ), который стимулирует переднюю долю гипофиза с увеличением синтеза адренкортикотропного гормона (АКТГ). АКТГ, в свою очередь, стимулирует высвобождение из коры надпочечников кортизола, который изменяет кишечный барьер и влияет на гипоталамус (НУР), амигдалу (AMG), гиппокамп (HIP). Эти эффекты приводят к изменениям моторики и болевого восприятия кишечника, нарушению эпителиального барьера и выработке нейротрансмиттеров с повышенным ответом на стрессовые события. В свою очередь, стрессовые факторы могут спровоцировать выработку системных провоспалительных цитокинов, активирующих гипоталамо – гипофизарно - надпочечниковую ось, изменяющую посредством последовательных нейроиммунных и гормональных реакций сенсорно - моторные функции и состав кишечной микробиоты (Mayer et al., 2014).

1.3.2. Микробиота и заболевания ЦНС

В эндокринном пути микробиом кишечника играет роль в развитии регуляции ГГНО, которая имеет важное значение в стрессовых и иммунных реакциях. Связь иммунной системы и ЦНС опосредуется системной циркуляцией иммунных факторов, которые связаны с депрессией. Такие факторы, как С - реактивный белок, IL - 1, IL - 6 являются периферическими маркерами воспаления и характерны при депрессии. Функция метаболического пути заключается в улучшении метаболизма благодаря КМО. Нарушение регуляции серотонинергических реакций и обмена триптофана микробиотой вызывает

патологическое состояние в нервной системе организма, в частности, аутизм, болезнь Хантингтона, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз (Rook et al., 2011).

Стресс вызывает изменение микробиоты, что влечет за собой появление дефектов эпителиального барьера и последующую активацию тучных клеток слизистых оболочек. Высвобождение сигнальных молекул, цитокинов и противовоспалительных пептидов в просвет кишечника происходит с помощью нейронов, энтероэндокринных и иммунных клеток, клеток Панета, которые находятся в прямой или косвенной связи с ЦНС и влияют на кишечную микробиоту (Viswanathan et al., 2013).

Учеными была обнаружена связь между травмой мозга и количественными изменениями состава микробов в ЖКТ человека. Специалисты попытались детально проследить эту взаимосвязь и определить природу процесса. Проводились эксперименты с травмой головного мозга у белых мышей. Исследователи установили, что после полученной травмы, толстая кишка белых мышей становилась более "проницаемой", в этом случае бактериям проще перемещаться из кишечника в другие ниши организма, что может привести к тяжелым осложнениям и даже к летальному исходу, например, при заражении крови. Также отмечалось, что нарушения в работе кишечника влияют на воспалительные процессы, происходящие в мозге после черепно - мозговой травмы. После того как мышам, с искусственно смоделированной травмой головы, внесли определенные таксоны кишечных бактерий у них значительно усугубилось воспаление мозга. Данное исследование может объяснить, почему пациенты с травмой головы, в 2,5 раза умирают чаще от проблем с ЖКТ, по сравнению с людьми, без подобных травм (Воеводкина, Хайтович, 2018).

Многие исследования подчеркивают важность микробиома при развитии различных заболеваниях ЦНС, которые можно классифицировать в соответствии с основными этиологиями на иммунно - опосредованные аутоиммунные заболевания, в частности расстройства аутистического спектра (РАС), и неиммунно - опосредованные нейропсихиатрические заболевания, такие как

аутизм, депрессия и стресс (Ochoa - Reparaz et al., 2011). В последние годы ведутся активные работы по изучению положительного влияния МКБ на функционирование нервной системы человека и животных (Neufeld et al., 2011).

РАС представляет собой комплекс нервно - поведенческих расстройств развития, нарушение социального взаимодействия и коммуникации. Научные исследования показали связь между микробиомом кишечника и РАС в прямой причинно - следственной связи или косвенной, как следствие атипичного питания. Нарушение микробиоты кишечника способствует чрезмерной колонизации нейротоксин - продуцирующих бактерий, что и вызывает аутистические симптомы. Депрессия является одной из основных форм расстройств настроения в результате нервно - психических нарушений. Группа ученых постулирует, что *Clostridium tetani* вызывает аутизм. Клинические исследования показали, что дисбаланс представителей рода *Bacteroides*, а также типа *Firmicutes* проявляются у детей с РАС. У здоровых пациентов доминируют фирмикутные бактерии, а у людей с патологией преобладают бактероиды (Воеводкина, Хайтович, 2018).

Существуют разногласия относительно отнесения пробиотиков к группе лекарственных средств, пищевым продуктам, либо пищевым добавкам. При приеме внутрь далеко не все пробиотики достигают кишечника жизнеспособными из - за повреждающего действия желудочного сока, однако установлено, что при попадании даже погибших пробиотических микроорганизмов в кишечник цитозин - фосфат - гуанозинового последовательности их ДНК распознаются антигенпрезентирующими клетками и вызывают специфические эффекты (Беляева, 2012).

Бактерии родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* являются сильными антидепрессантами, которые регулируют продукцию противовоспалительных цитокинов, нейромедиаторов и метаболизм триптофана (Ortega et al., 2022). Пробиотики, состоящие из *L. helveticus* и *B. longum*, показали анксиолитическое действие у лабораторных крыс (уменьшение психического напряжения, страха и

тревоги). Пробиотики могут облегчить состояние пациентов с нервно - психическими расстройствами и могут регулировать иммунные реакции, особенно в случае аутоиммунных заболеваний ЦНС. Ученые доказали, что *B. longum* NCC3001 нормализует функции гиппокампа у мышей, а *L. rhamnosus* оказывает дифференцированное регулирование секреции γ -аминомасляной кислоты (Wang et al., 2013).

1.3.3. Психобиотики и их применение

Первое предположение о возможности использовать представителей нормальной микробиоты в терапии депрессивных расстройств сделано в 1923 году доктором Филлипсом, который отмечал улучшение настроения у пациентов с меланхолией после курса лечения живыми молочнокислыми бактериями в желатиновых капсулах, хотя роль первооткрывателя общих позитивных эффектов применения продуктов, содержащих живых представителей нормальной микробиоты принадлежит И. И. Мечникову (Round, 2009).

В 2001 году интерес психиатров к желудочно - кишечному дискомфорту и нарушениям микроэкологии кишечника у пациентов возобновился после того, как доктором Бентоном было отмечено существование корреляции между частотой запоров и сниженным настроением (Benton, 2007). В 2005 году Алан Логан и Мартин Картзман предположили, что пробиотики могут выступать в качестве средства адьювантной терапии депрессии благодаря своей способности подавлять низкоуровневое воспаление, участвовать в антиоксидантной защите организма и стимулировать выработку BDNF – нейротрофического фактора мозга, вовлеченного в процессы роста и развития нейронов и патогенез тревоги и депрессии (Foster, Neufeld, 2013).

Результаты исследований, проведенных в этой области в течение последних 10 - 15 лет, позволили заведующему кафедрой психиатрии Национального Университета Ирландии в Корке, профессору Тимоти Дайнану и соавторам предположить, что внутри группы пробиотиков можно выделить более узкую

группу лекарственных средств – психобиотики. Психобиотики - это группа пробиотиков, которые влияют на функции и поведение центральной нервной системы, опосредованные осью кишечник - мозг, через иммунные, гуморальные, нервные и метаболические пути для улучшения не только функции желудочно - кишечного тракта, но также действующие как антидепрессант и обладающие анксиолитической способностью (Cheng et al., 2019).

Появление нового класса пробиотиков (психобиотиков), а также их применение заставило исследователей сосредоточиться на новой области нейробиологии. За последние пять лет некоторые штаммы психобиотиков подавляли воспаление и снижали уровень кортизола, что приводило к ослаблению симптомов тревоги и депрессии (Dinan et al., 2015).

Психобиотики эффективны в улучшении нейродегенеративных расстройств и нарушений развития нервной системы, включая, болезни Паркинсона и болезнь Альцгеймера (Рисунок 4). Большая часть исследований психобиотиков проводится с использованием исследований на животных, которые вызывают стресс и проводят поведенческие тесты на грызунах для оценки мотивации, тревоги и депрессии (Sarkar et al., 2016).

Распространенность аутистического спектра в мире составляет один из 160 детей. Пациенты с РАС часто испытывают желудочно - кишечные симптомы, диарею и запоры. Было показано, что пробиотики могут улучшать симптомы ЖКТ и даже симптомы, связанные с РАС. В результате поиска пяти основных первичных реестров, принятых Международным комитетом редакторов медицинских журналов (ICMJE) в ВОЗ, на сегодняшний день было зарегистрировано 10 клинических испытаний с использованием пробиотических вмешательств (Wang et al., 2011).

Болезнь Альцгеймера (БА) – является хроническим нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся когнитивными нарушениями и нарушениями памяти (Kumar, Singh, 2015). В недавней работе было оценено влияние применения

пробиотика на пациентах с тяжелой формой БА (Agahi et al., 2018). Проводились исследования с использованием нескольких штаммов, *L.casei* W56, *L. lactis* W19, *L. acidophilus* W22, *B.lactis* W52, *L.paracasei* W20, *L. plantarum* W62, *B.lactis* W51, *B. bifidum* W23 и *L. salivarius*W24 у пациентов с БА. Результаты показали, что пациенты с тяжелой формой БА были нечувствительны к пробиотическим добавкам (Leblhuber et al., 2018).

Также обнаружили, что введение пробиотической композиции (SLAB51) трансгенным мышам с болезнью Альцгеймера значительно снижает окислительный стресс, индуцируя белки сиртуины (SIRT-1). SLAB51 представляет собой композицию из девяти живых бактериальных штаммов - *Streptococcus thermophilus*, бифидобактерий - *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis*, лактобацилл - *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. brevis* (Bonfili et al., 2018).

Белки SIRT участвуют в регуляции клеточного гомеостаза у млекопитающих. Воздействуя на ряд процессов в центральной нервной системе, печени, поджелудочной железе, скелетных мышцах и жировой ткани, они регулируют обмен веществ в организме, что в существенной степени определяет их влияние на развитие болезней сердечно - сосудистой системы, различных видов рака, метаболического синдрома, нейродегенеративных и ряда других патологий (Фефелова и др., 2016). В других двух исследованиях изучалось влияние нескольких штаммов, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *B. lactis* и *B. longum*, на животных с БА. Было обнаружено, что пробиотические добавки улучшают обучение и дефицит памяти у крыс с БА по сравнению с контрольными крысами. Снижение количества амилоидных бляшек, воспаления и окислительного стресса наблюдалось в группе с болезнью Альцгеймера (Azm et al., 2018). Введение пробиотиков снижает уровень инсулина и резистентность к инсулину по сравнению с контролем.

Болезнь Паркинсона (БП) – представляет собой психоневрологическое заболевание, которое поражает примерно два процента пожилого населения. Запор

является распространенным немоторным симптомом у пациентов с БП (Fasano et al., 2015). В рандомизированном двойном слепом плацебо - контролируемом клиническом исследовании субъектам с БП вводили пробиотическую добавку, содержащую *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *L. reuteri* и *L. fermentum* в течение 12 недель. В группе, получавшей пробиотик, наблюдался пониженный балл по болезни Паркинсона. Кроме того, потребление пробиотиков не только значительно снижало уровни С-реактивного белка (hs - CRP) и малонового диальдегида (MDA), но также увеличивало уровни глутатиона. Примечательно, что потребление пробиотиков значительно улучшало функцию инсулина по сравнению с плацебо (Tamtaji et al., 2018). Одно рандомизированное контролируемое исследование было сфокусировано на генах, связанных с воспалением, инсулином и липидами, в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с БП. После 12-недельного вмешательства субъекты с БП, получившие пробиотическую добавку, продемонстрировали значительно подавленную экспрессию интерлейкина-1 (IL-1), IL-8, фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), повышенную экспрессию трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) и гамма - рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR- γ) по сравнению с плацебо-контролем. Однако не было обнаружено влияния на потребление пробиотиков экспрессии фактора роста эндотелия сосудов, рецептора липопротеинов низкой плотности или маркеров воспаления и окислительного стресса (Botzabadi et al., 2018).

Синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) – это заболевание мозга, наиболее распространенными симптомами которого являются невнимательность, гиперактивность и импульсивность. Согласно профессору Парти и его коллегам, у детей, получавших *L. rhamnosus*, был сниженный риск развития СДВГ. Кроме того, пищевые добавки, содержащие *L. acidophilus*, улучшают самоконтроль и внимание детей с СДВГ (Harding et al., 2003).

Синдром Туретта (ТС) – является неврологическим расстройством, которое обычно впервые наблюдается в детстве (Rampello et al., 2006). Согласно одному

недавнему сообщению, при пересадке фекальной микробиоты резко улучшаются симптомы синдрома Туретта через 8 недель после лечения (Zhao et al., 2017).

Было установлено, что дефицит сна вызывает депрессию, ухудшение памяти и аллергию (Grundgeiger et al., 2014). Только несколько сообщений показали, что использование ферментированных продуктов улучшает сон (Kitaoka et al., 2009). В двух исследованиях оценивалось влияние *L. brevis* SBC8803 на улучшение сна у мышей и людей. Имеются данные об улучшении сна во время фазы покоя после введения пробиотика.



Рисунок 4. Эффективность действия психобиотиков на спектр заболеваний (Cheng et al., 2019)

Психобиотики могут регулировать нейротрансмиттеры и белки, в том числе ГАМК, серотонин, глутамат и нейротрофический фактор мозга, которые играют важную роль в контроле нервного возбуждающе - тормозного баланса, настроения, когнитивных функций, процессов обучения и памяти (Martinowich, Lu, 2008). Профессор Судо с коллегами описали решающую роль микробиоты и гипоталамо - гипофизарно - надпочечниковой оси. Небольшой сдерживающий

стресс у мышей вызывает избыточное выделение кортикостерона и аденокортикотропного гормона по сравнению с мышами с нормальной микробиотой. Кроме того, провоспалительные цитокины активируют ГНО, усиливают проницаемость гемато - энцефалического барьера и снижают уровень серотонина, что приводит к психическим расстройствам, таким как депрессия (Silverman, Sternberg, 2012).

В дополнение к экспериментам на животных, несколько исследований выявили положительное влияние пробиотиков на психическое здоровье людей. Здоровые добровольцы, которым вводили *Bifidobacterium longum* 1714 в течение 4 недель, демонстрировали снижение стресса и улучшение памяти (Allen et al., 2016). В рандомизированном двойном слепом плацебо - контролируемом исследовании изучались эффекты пробиотического йогурта (*Lactobacillus acidophilus* LA5 и *Bifidobacterium lactis* BB12) и пробиотических капсул (*Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*), *Bifidobacterium longum* и *Streptococcus thermophiles*) на работниках нефтехимии (Mohammadi et al., 2016). Реципиенты, использующие как пробиотический йогурт, так и пробиотические капсулы, продемонстрировали улучшение показателей психического здоровья, оценивая общий опросник здоровья (GASS) по шкале тревоги и депрессии (DASS). Пробиотическая комбинация *L. helveticus* R0052 плюс *B. longum* R0175 снижала тревожность и депрессию у здоровых субъектов по сравнению с контролем (Messaoudi et al., 2011).

Однако доказательства воздействия психобиотиков на психические и неврологические расстройства остаются ограниченными. Необходимы дальнейшие исследования психобиотиков, чтобы определить их эффективность и механизм лечения различных психических расстройств в будущем.

1.4. Пробиотики и адгезия

С момента открытия мира микробов основным объектом изучения являлись, и в значительной степени пока остаются, изолированные клетки, их морфологические, генетические, биохимические свойства, а также чувствительность к различным антимикробным препаратам. Накопленные на этом пути сведения составляют основную базу современной клинической микробиологии и фармакологии. Все прогнозы по течению патологического процесса и подходы к этиотропной терапии основаны именно на тех знаниях, что главной причиной инфекции является множество одинаковых и самостоятельных микроорганизмов. Одним из наиболее важных достижений микробиологии последних 30 лет является открытие и изучение микробных сообществ, получивших название “биопленки” (Тец, Тец, 2013). Установлено, что в естественных условиях все микробы существуют не как некоторое количество самостоятельных и изолированных клеток, а находятся в составе биопленок. В организме человека микробные сообщества образуют все представители нормальной микробиоты и возбудители болезней. С их появления начинается развитие любой инфекции (O'Toole et al., 2000). Формирование и распространение биопленок в организме играют важнейшую роль в развитии патологического процесса. Уже сегодня по данным Центров по контролю и профилактике заболеваний США доказано, что более 70% инфекций человека обязательно сопровождается образованием биопленок. В их число входит и большая часть заболеваний дыхательной системы. Накопившиеся данные о свойствах биопленок открыли новые аспекты действия антимикробных препаратов на бактерии или грибы, образующие эти биопленки (Anderl et al., 2000).

Биопленки – пространственно - структурированные образования из микроорганизмов и их продуктов, в виде внеклеточного полимерного матрикса (Афиногенова, Даровская, 2011). Они образуются в основном на границе раздела фаз: «жидкость (водная фаза) – воздух», «твердое тело – жидкость», «твердое тело – воздух» и «жидкость – жидкость (две несмешивающиеся жидкости)» (Baumgarten

et al., 2012). Они могут формироваться на всех внедряемых в организм человека медицинских устройствах (катетерах, ортопедических имплантатах). У людей биопленки являются основной причиной микробных инфекций, например, эндокардита, инфекций почек и инфекций, связанных с протезами (Khatoon Z. et al., 2018). Наибольший интерес для исследователей представляют: все виды стафилококков (в т.ч. *Staphylococcus aureus*), *Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, так как являются возбудителями широкого спектра заболеваний. Ранее было доказано, что под действием негативного фактора, в виде химического агента, бактерии рода *Klebsiella* способны к образованию биопленок (Садртдинова, 2015). Также была выявлена разная антагонистическая активность лактококков относительно штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из различных очагов инфекции: плевральной жидкости, гнойных ран бедра, мочи, кала, крови (Стоянова, Габриэлян, 2017).

Одним из важных этапов формирования биопленки является прикрепление микроорганизмов к поверхности (адгезия). Человеческое тело имеет физические, биохимические и биологические барьерные системы, чтобы удерживать чужеродные микроорганизмы снаружи. Эпителиальные клетки кишечника и тесные связи между ними являются одним из физических барьеров для микроорганизмов и других токсических агентов вместе с гликокаликсом и слоями слизи на этих клетках (Арслан, 2002). Эпителиальные клетки выделяют сложную смесь гликопротеинов, называемую муцином, которая является основным компонентом слизистого слоя и пытается ингибировать связывание патогенных бактерий (González-Rodríguez et al, 2012). В дополнение к этим механизмам пробиотические микроорганизмы способствуют модуляции иммунной системы за счет некоторых свойств, таких как адгезия к слизистой оболочке кишечника, колонизация, усиление секреции муцина и исключение патогенов из слизи и подобных структур (Bermudez-Brito et al, 2012). Пробиотические молочнокислые бактерии взаимодействуют с эпителиальными клетками кишечника и слизью с помощью различных имеющихся у них поверхностных детерминант. Чтобы

прикрепиться к клеткам кишечника, они обычно используют различные структуры, такие как жгутики, пили, белки S-слоя, липотейхоевую кислоту, экзополисахариды (ЭПС) и белки, связывающие слизь. Профессор Дену и другие изучили влияние капсульных полисахаридов на время удержания бактерий в кишечнике. Они удалили полисахаридный слой из *Lactobacillus johnsonii* NCC533. Согласно результатам, с уменьшением содержания капсульных полисахаридов их вмешательство в электростатическое связывание рецепторов слизистой оболочки уменьшалось (Depou et al., 2008). Хотя функции ЭПС, обнаруженные в структуре клеточной стенки, до конца не выяснены, считается, что бактерии производят ЭПС, чтобы связываться с поверхностями и прикрепляться к окружающим бактериям. Продукция ЭПС в пробиотических штаммах играет важную роль как в их адгезии/колонизации, так и в адаптации к естественной среде в желудочно-кишечном тракте. Структура, тип и концентрация ЭПС в желудочно-кишечном тракте также относятся к факторам, влияющим на адгезию. Определение концентрации и структуры таких полимеров *in vivo* является новым предметом дальнейших исследований по выявлению влияния ЭПС на бактериальную адгезию (Sengupta et al., 2013; Aydemir, 2018).

1.5. БАДы на основе пробиотических культур и оптимизация их способов хранения

По мере того, как человеческое население живет дольше, хронические возрастные заболевания, такие как сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания, диабет II типа и некоторые виды рака (например, рак желудочно-кишечного тракта), которые, как известно, связаны с привычками питания, продолжают расти. Известно, что 70% причин общей смертности связаны с болезнями, вызванными неполноценным питанием (Espín et al., 2007). В настоящее время пищевые продукты интенсивно исследуются на предмет дополнительных физиологических преимуществ, которые могут снизить риск хронических заболеваний или иным образом улучшить здоровье. Именно

такие исследования вызвали глобальный интерес к растущей категории продуктов питания, называемых «биофункциональными продуктами» (Расторгуева, Лосевская, 2022). Концепция биофункциональных пищевых продуктов обычно используется, когда желаемый биологический, медицинский или физиологический эффект оказывают микроорганизмы (Gobbetti et al., 2010). Польза для здоровья от этих микроорганизмов может проявляться либо непосредственно за счет взаимодействия живых микроорганизмов (пробиотический эффект), либо косвенно за счет приема внутрь микробных метаболитов, синтезированных во время ферментации (биоактивный эффект). В отличие от пробиотической концепции (бактерии должны поступать в организм живыми и производить полезный метаболит в организме), биофункциональная концепция обычно используется, когда полезный метаболит появляется в самом пищевом продукте в процессе ферментации вследствие метаболической активности бактерий (Stanton et al., 2005).

В России такие продукты традиционно подразделяются на: диетические, направленные на лечение алиментарно-зависимых заболеваний человека; профилактические, направленные на предотвращение распространенных заболеваний (сердечно - сосудистые, ожирение и др.); специализированные, узко направленные на какие-либо функции организма (для спортсменов; людей, имеющих высокую физическую активность и т. п.); обогащенные, в которые добавлены или в которых замещены определенные микронутриенты; БАД к пище, содержащие необходимые человеку микронутриенты (витамины, минеральные вещества, пищевые волокна, пробиотики положительного действия и т.п.); продукты, предназначенные для питания детей и пожилых людей (Тихомирова, 2013). Известно, что некоторые питательные вещества человек не может восполнить благодаря только лишь правильному и сбалансированному питанию. И тут к нам на помощь приходят биологически активные пищевые добавки (БАДы).

Биологически активные пищевые добавки – дополнение к пище, содержащее один или несколько пищевых ингредиентов, принимаемое внутрь в виде таблеток, капсул, жидкости и промаркированное как пищевая добавка (Полуэктова и др., 2020). БАДы делятся на: преимущественно источники белка и аминокислот; в

основном источники незаменимых жирных кислот, липидов и жирорастворимых витаминов; источники преимущественно углеводов; источники преимущественно пищевых волокон; на основе природных минералов (цеолиты и др.), в т.ч. мумиё, таблетированные, капсулированные, порошкообразные, жидкие асептического разлива; на основе продуктов переработки мясо - молочного сырья; на основе рыбы, морских беспозвоночных, ракообразных, моллюсков и других морепродуктов, растительных морских организмов; на основе пробиотических микроорганизмов; на основе чистых культур микроорганизмов; на основе одноклеточных водорослей (спирулина, хлорелла и др.), дрожжей и их лизатов. Они делятся на нутрицевтики - БАДы с пищевой ценностью и парафармацевтики - БАДы с выраженной биологической активностью (Бурова, 2020).

Функциональная роль нутрицевтиков направлена на: компенсацию недостатка основных питательных веществ; целенаправленные изменения метаболизма; повышение неспецифической резистентности организма к воздействию вредных факторов внешней среды у населения, проживающего в экологически неблагоприятных регионах; оказание иммуномодулирующего эффекта; связывание и устранение посторонних веществ; улучшение питания человека, укрепление здоровья и профилактика различных заболеваний (Романцова, Лосевская, 2022). Парафармацевтики – БАДы, применяемые для профилактики и поддержания функциональной активности организма, в состав которых входят компоненты растительного, животного или бактериального происхождения. Например: продукты пчеловодства (прополис, мёд, пчелиный воск), рыбий жир, эубиотики. Действие парафармацевтиков реализуется по следующим направлениям: регуляция в физиологических границах функциональной активности отдельных органов и систем; активация систем, участвующих в развитии адаптационных компенсаторно - приспособительных реакций организма; регуляция деятельности нервной системы, включая высшую нервную деятельность; регуляция микробиоценоза желудочно - кишечного тракта (Фещенко, Война, 2020).

Эубиотики (пробиотики) – это биологически активные добавки, в состав которых входят живые микроорганизмы (МКБ) или их метаболиты, оказывающие благоприятный эффект на физиологические функции и биохимические реакции организма - хозяина через оптимизацию его макроэкологического статуса (Шендеров и др., 1997). Основная роль эубиотиков – нормализация состава и биологической активности микробиоты кишечника. В соответствии с классификацией по составу БАД - эубиотики делятся на следующие группы: бактериальные препараты - эубиотики на основе чистых культур микроорганизмов; бактериальные препараты - эубиотики смешанного состава с добавлением аминокислот, микроэлементов, моно - и дисахаридов. (Конакова, Кушакова, 2020).

Молочнокислые бактерии могут использоваться *in situ* в качестве микробных источников для естественного обогащения молочных продуктов широким спектром биологически активных компонентов, которые могут охватывать различные аспекты здоровья. Известно, что минимальной эффективной дозой, воздействующей на кишечную среду и оказывающей благотворное влияние на здоровье человека, считается 10^6 – 10^9 живых микробных клеток в сутки, хотя это зависит от конкретного штамма и продукта питания (Williams, 2010).

В настоящее время большое внимание уделяется поиску оптимальных способов хранения МКБ при производстве и длительном хранении. Известно, что лиофилизация является одним из главных способов хранения пробиотических культур, позволяющая сохранить жизнеспособность и полезные свойства в течение длительного времени. Одной из форм готовых препаратов является лиофилизированный биоматериал, содержащий живые клетки бактерий, их метаболиты и остатки среды. Оптимизация и корректность выполнения этапов лиофилизации прямо влияет на продуктивность технологического процесса и рентабельность производства, показатели качества продукции и практическую эффективность биопрепарата (Осадчая и др., 2002). Один из этапов лиофилизации включает в себя замораживание при низких температурах, что губительно для клеток микроорганизмов. Это может привести к потере жизнеспособного числа

клеток, которые определяют качество готового сухого препарата (Опарин, 1996). В связи с чем представляет большой интерес поиск веществ, способных сохранить клетки в процессе высушивания. Одними из таких веществ являются бентониты (алюмосиликаты).

Под термином «бентониты» следует понимать тонкодисперсные глины, обладающие высокой сорбционной активностью в отношении токсинов, солей тяжелых металлов, патогенной микробиоты, способны интенсифицировать обменные процессы в организме (Данилов, Воробьев, 2012). Они представляют собой алюмосиликаты, главнейшими из которых являются монтмориллонит, сапонит, нонтронит. Ведущее место занимает монтмориллонит (60 - 70%), поэтому бентониты часто называют монтмориллонитовыми глинами. Минералы группы монтмориллонита (бентонита) относятся к трехслойным силикатам, имеющим тетраэдрические и октаэдрические слои. При этом низкая величина заряда в слоях приводит к слабому электростатическому взаимодействию между отрицательно заряженными пакетами (слоями) и межпакетными катионами, в результате чего, кристаллическая решетка бентонитов способна раздвигаться до максимальных размеров, увеличивая межпакетную сорбцию в 10 - 15 раз. Поэтому именно бентониты являются непревзойденными адсорбентами, легко связывая как органические основания и их соли, так и неорганические соединения, образуя глиноорганические комплексы – бентоны (Семененко и др., 2017).

Бентонит обычно описывается как набухающий или ненабухающий бентонит. Набухающий бентонит (также известный как западный бентонит) представляет собой бентонит натрия, который набухает в воде и обычно используется в естественном состоянии. Ненабухающий бентонит представляет собой кальциевый бентонит (также известный как южный бентонит). Бентонит с высоким содержанием лития известен как гекторит и коммерчески добывается только в США (Staff, 2016).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Штаммы МКБ и их культивирование

Домен: *Bacteria*; фила: *Firmicutes*; класс: *Bacilli*; порядок: *Lactobacillales*; семейство: *Streptococcaceae*; род: *Lactococcus*; вид: *lactis* Грамположительная бактерия, широко применяемая для получения пахты и сыра. Клетки *L. lactis* – кокки, группирующиеся парами и короткими цепочками. Овальной формы, длина 0,5 - 1,5 мкм. *L. lactis* неподвижна и не образует спор. Тип метаболизма – гомоферментативное молочнокислое брожение (образует молочную кислоту из сахаров, преимущественно в виде L- (+) - изомера).

Данные свойства делают бактерию одним из важнейших продуцентов в молочной промышленности. Вид имеет международный статус «полностью безопасного» организма («GRAS» status), несмотря на отдельные данные о *L. lactis* subsp. *lactis* как об оппортунистическом патогене (Aguirre, Collins, 1993). Данная бактерия также используется в производстве овощных заготовок, пива, вина, ферментированных продуктов типа соевого молока, кефира и т. д. Это одна из наиболее изученных в генетическом и биохимическом планах грамположительных бактерий с низким содержанием ГЦ-пар в ДНК.

Штаммы 194, F-119 и F-116 *L. lactis* subsp. *lactis* были лиофилизированы и хранились в обрате (в обезжиренном молоке), являющегося лучшей средой для культивирования молочнокислых бактерий. Для получения обрата молоко центрифугировали при 1740 об/мин в течение 20 минут, снимали жировой компонент и стерилизовали при 0,5 ати 15 мин. Из обрата лактококки пересеивали в посевную среду, приготовленную на водопроводной воде с дрожжевым экстрактом (20 г/л) и глюкозой (10 г/л), рН среды устанавливали 6,8 - 7,0 с помощью 20% - ного раствора NaOH. Затем посевной материал в количестве 5% вносили в биосинтетическую (ферментационную) среду, следующего состава (г/л): сахароза - 20,0; KH_2PO_4 -20,0; NaCl - 2,0; MgSO_4 - 0,2; дрожжевой экстракт - 20,0; рН 6,8 - 7,0 (Стоянова, 2005).

2.2. Определение уровня антимикробной активности штаммов *L. lactis* subsp. *lactis*

При изучении спектра антимикробной активности лактококков в качестве тест-культур использовали грамположительную бактерию - *Staphylococcus aureus* AP017922.1, грамотрицательную бактерию - *Escherichia coli* 52, а также штамм микроскопических грибов: *Aspergillus niger* INA 00760 и дрожжи *Candida albicans* INA 00763.

Тест-культуры были получены из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова. Бактерии выращивали на МПА, микромицеты выращивали на среде Сабуро (г/л): глюкоза - 40,0; пептон - 10,0; агар - 20,0; левомицетин - 2,5 %. *Staphylococcus aureus* AP017922.1 и *Escherichia coli* 52 культивировали в термостате при 37°C, а *Aspergillus niger* INA 00760 и *Candida albicans* INA 00763 при 28 - 30°C. Использовали суточные культуры бактерий и двухсуточные культуры грибов и дрожжей. По зоне задержки роста судили об ингибиторной способности МКБ по отношению к разным группам микроорганизмов.

В качестве стандарта на грамположительную бактерию использовали коммерческий препарат низина «Nisaplin» (фирма «Aplin&Barrett, Ltd», Великобритания) с активностью 1×10^6 МЕ/г. В качестве стандарта на микромицеты использовали растворы 100, 50, 40 ед/мл коммерческого препарата нистатин (фирмы *Sigma*) с активностью 4670 единиц/мг. В качестве стандарта – антибиотика на грамотрицательные бактерии – растворы левомицетина в буфере с pH 5,5 (препарат в виде таблеток (0,5 мг) ОАО «Татхимфармпрепараты», г. Казань) 100, 50 и 25 ед/мл.

Для титрования антимикробных компонентов использовали суточные суспензии бактерий и грибов, которыми засекали среду МПА и Сабуро, соответственно. Фосфатный буфер с pH 5,5 для титрования антибиотика готовили на дистиллированной воде, в 1 л которой растворяли: 6,64 г - KH_2PO_4 и 0,142 г - K_2HPO_4 . Буфер стерилизовали при 1 атм в течение 20 мин.

Культивирование лактококков проводили в биосинтетической среде с добавлением аминокислот в концентрации 0,01 г/мл и без. Культуральную жидкость отбирали на разных стадиях роста с интервалом 3 ч в течение суток.

Экстракцию антимикробного компонента из культуральной жидкости лактококков и стандартных растворов проводили смесью ацетон : уксусная кислота : вода (CH_3COCH_3 : CH_3COOH : H_2O) в соотношении 4:1:5 при 55 °С в течение 90 мин. Экстракты разводили фосфатным буфером (рН 5,5) в соотношении 1:10 и вносили в лунки на агаровой среде с тест - организмом, затем культивировали в течение 24 - 48 ч.

Количественное определение антибиотической активности проводили по измерению зон подавления роста тест - культур с дальнейшим пересчетом по калибровочной кривой стандартных растворов антибиотиков. Величина зоны отсутствия роста указывала на степень активности данного антимикробного компонента в отношении исследуемой тест - культуры и зависела от его концентрации и химической природы (Егоров, 2004).

Изучение динамики роста штаммов *Lactococcus lactis* проводили в жидкой среде в течение 24 ч. В каждой точке отбирали пробу и измеряли оптическую плотность на ФЭКе ($\lambda=590$, $l=1,0$ см), с последующим пересчетом на количество клеток в 1 мл, уровень антимикробной активности, рН. Определение рН проводили с помощью рН - метра.

2.3. Определение концентраций биогенных аминов

Избранный в настоящей работе метод амперометрической детекции разделяемых путём высокоэффективной жидкостной хроматографии веществ «основан на измерении электрического тока, возникшего при окислении (восстановлении) анализируемого вещества на поверхности рабочего электрода, находящегося под определённым потенциалом» (Яшин, Яшин, 2002).

Образцы КЖ, среды или супернатанта разрушенной биомассы в количестве 20 мкл наносили на аналитическую колонку Ultrasphera C18, методом прямой инъекции. Определение БА, их предшественников и метаболитов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией на хроматографе LC-304T (“BAS”, WestLafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125, петля для нанесения образцов 20 мкл. Изучаемые вещества разделяли на термостатируемой при 25°C обращённо-фазовой колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4x100 мм, размер частиц 3 мкм (“Dr.Majsch GmbH”, «Элсико», Москва). Был использован насос РМ-80 (BAS, США), скорость элюции подвижной фазы – 1,0 мл/мин, давление 2.0 атм. Мобильная фаза содержала 0,1 М цитратно - фосфатный буфер, с 1,1 мМ октансульфоновой кислоты, 0,1 мМ ЭДТА и 9% ацетонитрила (рН 3.0). Измерение проводили на стеклоугольном электроде (+0.85 V) против Ag/AgCl электрода. Конкретный класс определяемых соединений – биогенные амины и их производные – окисляются при контакте с рабочим стеклоугольным электродом; в частности, катехоламины переходят в *n*-хинонимины. Наряду с разделяемыми и регистрируемыми с помощью электрохимической детекции (электродетекции) веществами, анализируемый раствор содержит внутренний стандарт – 3,4 - дигидроксибензиламин (ДГБА) в концентрации 0,5 мкМ. Электродетекции предшествует обращенно-фазовая (то есть с подвижной полярной фазой) ВЭЖХ, в основном основанная на вандерваальсовых взаимодействиях тестируемых соединений с наполнителем хроматографических колонок - силикагелем с присоединенными к нему алифатическими C18-цепочками (Кудрин и др., 1988).

Культивирование штаммов (194, F - 116, F - 119) проводили по описанному выше протоколу. Клетки собирали и бактериальную биомассу отделяли центрифугированием (8000g, 20 мин). Супернатант культуральной жидкости пропускали через фильтр Millipore (диаметр пор 0,22 мкм). Культуральную жидкость и стерильную среду (в качестве контроля) использовали для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с амперометрической

системой обнаружения. Помимо надосадочной жидкости, биомасса также тестировалась на БА: ее собирали и обрабатывали ультразвуком (22 кГц; 2-3 мин обработке при охлаждении до 0°C) в конце периода ферментации. Всего было проведено 4-5 независимых измерений.

Для количественной детекции низких (в том числе следовых) концентраций веществ в составе сложных смесей необходимы методы, «обеспечивающие высокую чувствительность определения примесей при слабой чувствительности к основным веществам смеси». Для указанных целей в последние десятилетия разработаны хемилюминесцентные, флуоресцентные, электрохимические (кондуктометрические и амперометрические) методы детекции. Они позволяют анализировать поллютанты в образцах почвы или воды из водоёма, оценить содержание загрязнителей и токсинов в пищевых продуктах, точно провести количественное определение крайне низких (нано - или пикомолярных) концентраций гормонов и нейромедиаторов в сложных смесях, характерных как для грибов, растений и животных (в том числе образцов крови человека), так и для микробных систем (бактериальные, дрожжевые клетки и др.), изученных в настоящей работе.

2.4. Метод определения короткоцепочечных жирных кислот

Для определения состава короткоцепочечных жирных кислот в культуральной жидкости в качестве конечных продуктов брожения и промежуточных метаболитов использовали метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Метод основан на различном распределении веществ между двумя несмешивающимися фазами - подвижной и неподвижной. Подвижной фазой является газ, неподвижной фазой - твердое вещество, которое называют носителем. При движении подвижной фазы вдоль неподвижной, компоненты смеси сорбируются на неподвижной фазе в соответствии со сродством к материалу неподвижной фазы (вследствие адсорбции или других механизмов). Поэтому неподвижную фазу называют также сорбентом.

Перед началом определения была проведена необходимая предварительная обработка проб. Культуральную жидкость отбирали в количестве 1 мл на разных стадиях роста молочнокислых бактерий. Доводили рН пробы до значения 2.0 концентрированной соляной кислотой (ч.д.а.). Затем пробу центрифугировали в течение 15 мин при скорости 13000 g, после чего отбирали супернатант в новые эппендорфы, снова центрифугировали в том же режиме. Получившийся супернатант разливали в хроматографические вials. Ввод проб осуществляли при помощи автоматического жидкостного дозатора ДАЖ-2М, объём пробы составлял 1 мкл.

Газожидкостную хроматографию проводили на приборе «Кристалл 2000 М» (Россия), оснащённом микрокапиллярной (15м×0,32мм×0,50мкм) колонкой ZB-FFAP (Zebron, США). Газ - носитель — аргон, расход газа составлял 15 мл/мин, детектор – пламенно-ионизационный ПИД с метанатором, температура детектора - 200°C. Измерения проводили в условиях температурного градиента в термостате от 70 до 160°C. Результаты хроматографии были обработаны при помощи программного обеспечения Chromatec Analytic 2.5 (Хроматэк, Россия).

2.5. Определение количества молочной кислоты

Количество молочной кислоты в среде определяли с использованием модифицированного метода Баркера-Саммерсона. Принцип метода: из молочной кислоты в присутствии серной кислоты и солей меди образуется уксусный альдегид, который, реагируя с параоксидифенилом, даёт фиолетово-окрашенные продукты.

Для определения количества молочной кислоты в культуральной жидкости выращивали лактококки в течение 24 ч на биосинтетической среде. В пробирки отбирали по 0,5 мл соответствующей исследуемой культуральной жидкости. В качестве контроля использовали 0,5 мл дистиллированной воды. Во все пробы добавляли по 0,5 мл 20%-ного CuSO_4 и дистиллированной водой доводили объём

жидкости до 5 мл. Затем добавляли по 0,5 г гидроксида кальция, тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Через 30 мин содержимое всех пробирок центрифугировали. Из каждой отбирали по 0,5 мл прозрачного центрифугата и переносили в сухие чистые пробирки, стоящие в ледяной воде. Затем медленно, при постоянном встряхивании, добавляли в каждую пробирку по 3 мл 2н H₂SO₄. После этого пробирки помещали на 5 мин в кипящую водяную баню, охлаждали до комнатной температуры (20°C) и добавляли по 2 капли (0,05 мл) щелочного раствора параоксидифенила. Содержимое пробирок осторожно перемешивали и оставляли на 30 мин на водяной бане с температурой 30°C, а затем на 90 с - в кипящую водяную баню, после чего охлаждали. Появлялось розовое окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации молочной кислоты. Раствор сравнения готовили аналогично исследуемым пробам, вместо культуральной жидкости в пробирки помещали по 0,5 мл дистиллированной воды. Полученные растворы колориметрировали на ФЭКе при $\lambda=670$ нм, $l=0,5$ см против раствора сравнения.

Для расчета молочной кислоты в культуральной жидкости строили калибровочный график, использовали различные концентрации молочной кислоты: 5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 15 мкг/мл. Ход определения проводили аналогично исследуемым пробам. На основании полученных данных строили калибровочный график, откладывая на оси абсцисс концентрацию молочной кислоты, а на оси ординат – оптическую плотность. По нему определяют содержание молочной кислоты в исследуемом образце (Кондрахин, 2004).

2.6. Определение адгезионной способности штаммов *L. lactis* subsp. *lactis*

В эксперименте тестировали 3 штамма *Lactococcus lactis* 194, F-119 и F-116. Бактериальные клетки выращивали на плотной питательной среде MRS - агар и жидкой питательной среде MRS (De Man et. al., 1960). Для этого одну полную микробиологическую 1 мкл петлю ночной бактериальной культуры вносили в 30

мл жидкой питательной среды MRS, перемешивали при 150 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре, вносили в каждую колбу по 3 полипропиленовых купона площадью около 300 мм², культивировали при температуре 37 °С на качалке со скоростью вращения 10 об/мин в бескислородной среде в течение 24 ч. По окончании культивирования из всех колб отбирали по 0,06 мл бактериальной суспензии для анализа концентрации колониеобразующих единиц (КОЕ). Каждый купон извлекали из суспензии, дважды промыли в 10 мл физраствора и обрабатывали ультразвуком в 5 мл физраствора на гомогенизаторе Soniprep 150 (MSE Ltd, Великобритания) при амплитуде 2 мк в течение 2 мин. В полученных суспензиях бактерий определяли концентрацию КОЕ. Наличие бактериальной биопленки на абиотических поверхностях фиксировали по опубликованному ранее методу (Диденко и др., 2015).

Определение концентрации КОЕ проводили методом 10-кратных разведений в 0,3 мл физраствора. Из каждого разведения высевали по 0,010 мл бактериальной суспензии на чашки Петри с питательной средой MRS-агар, подсушивали в закрытой чашке при комнатной температуре в течение 10 мин, культивировали при температуре 37 °С в течение 24 ч в бескислородной среде. После подсчета выросших колоний делали пересчет КОЕ на объем жидкой культуры или на единицу площади купона.

2.7. Разработка и оптимизация условий хранения препарата (БАДа)

В работе использовали штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194, выделенный из молока Бурятии. Штамм был лиофилизирован и хранился в морозильной камере. Лактококки регидротировали и далее культивировали в обрате (обезжиренном молоке). Для получения обрата сухое обезжиренное молоко разводили водой 7 г на 100 мл и стерилизовали при 0,5 ати.

Восстановление клеток из лиофилизованного состояния

Во флаконы с 1 мл лиофилизированных клеток в разных средах добавляли 1 мл стерильной воды, затем через 60 мин пересевали 0,5 мл из флакона в 5 мл обрата, после чего инкубировали в термостате при температуре 28 - 30 °С до образования плотного сгустка.

Далее штамм из обрата пересевали в посевную среду, затем посевной материал (в количестве 5%) вносили в биосинтетическую среду (составы сред см. в подглаве 2.1.) Регистрировали время образования сгустка, изменение рН и изменение оптической плотности на денситометре при длине волны 590 нм.

Перед лиофилизацией лактококки центрифугировали 15 мин при 9000 об/мин, клетки отмывали от среды. Сравнивали влияние 4-х защитных сред, добавляемых перед замораживанием: физраствор, обезжиренное молоко, 10% сахарозы +5% желатин и криопротектор на основе бентонита, в концентрациях от 0 до 10%, определяли КОЕ до/после лиофилизации и после года хранения (Рисунок 5). Для лиофилизации использовалась вакуумная установка LABCONCO FreeZone1 (США) с температурой конденсора - 52°С (Рисунок 6).



Рисунок 5. Схема разработки БАДа.



Рисунок 6. Вакуумная установка LABCONCO (США).

2.8. Метод определения токсичности

Токсичность штаммов выявляли методом бактериальной люминесценции. При оценке токсичности штаммов в каждую контрольную и опытную кюветы типа эппендорфа объемом 1,5 мл наливали 0,1 мл суспензии биосенсора. В контрольную кювету добавляли 0,9 мл дистиллированной воды, в опытную кювету – 0,9 мл водного экстракта молочнокислых бактерий, используя в пробе биосенсор $7,6 \times 10^7$ клеток на мл генно - инженерного штамма *Escherichia coli* K12 TG1 с созданным светящимся фенотипом, обеспеченным встроенным lux - опероном морских светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* 54D10. Полученный штамм хранится на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова и известен как биосенсор тест - системы «Эколюм-06» (Сорокина, Зарубина, 2017). Интенсивность свечения (имп/сек) биотеста контрольного и опытного образцов регистрировали одновременно через 5, 15 и 30 минут с помощью люминометра при температуре 25 °С. Индекс токсичности (Т) образцов устанавливали по программе люминометра по формуле: $T=100 \cdot (I_k - I) / I_k$,

где I_k – интенсивность свечения контроля, I – интенсивность свечения опыта. Оценку токсичности классифицировали по трем группам: значение $T < 2$ – образец нетоксичен; значение $T > 2$, но < 5 – образец токсичен; значение $T > 6$ – образец очень токсичен (Образцова и др., 2009). Иногда при действии малых концентраций веществ наблюдается стимуляция свечения тест-организма (T с отрицательным знаком). Анализ осуществляли при фиксированном времени экспозиции каждого контрольного и опытного образца, одновременно регистрируя их интенсивность люминесценции в 3-х повторностях. Анализировали не менее 3 проб одного образца, рассчитывая индекс токсичности.

2.9. Апробация лабораторного образца в модельных опытах на крысах препубертатного периода

Работа проводилась на нелинейных белых крысах обоего пола. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде с соблюдением 12 - часового светового режима дня (искусственное освещение с 8:00 до 20:00 ч), при температуре 20 - 24°C. Все эксперименты проводились с 10:00 до 18:00 ч. Всего в работе было использовано 33 крысы (4 выводка). Количество животных в каждом выводке колебалось от 7 до 9. Крысята каждого выводка содержались в отдельной клетке вместе с матерью до достижения ими месячного возраста. В каждом выводке животных разделяли на 3 группы: «контроль - обрат», «контроль - вода» и «опыт - бактерии». Группе «контроль - обрат» перорально вводили обрат (обезжиренное стерильное молоко), группе «контроль - вода» вводили воду для инъекций, группе «опыт - бактерии» - лиофильно высушенную культуру штамма 194 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, разведенную стерильной водопроводной водой. Обрат, воду и бактерии перорально вводили в количестве 1 мл/100 г веса животного. Кормление производили с 10 по 25 день жизни животного, что соответствует возрасту человека от 3 до 8 лет (Рисунок 7). В возрасте 30 дней крысят отсаживали от матери и подвергали тестированию. Эксперименты были проведены с соблюдением биоэтических норм обращения с экспериментальными

животными в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента. Условия содержания животных и использованные экспериментальные процедуры были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ (рег. №12.3 от 17.11.2022 г.)

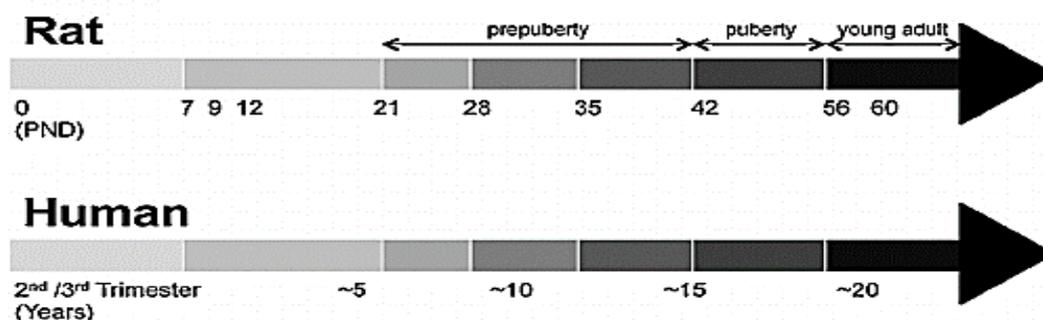


Рисунок 7. Графики развития мозга крысы и человека (Tseng et al., 2009)

Тест «Открытое поле»

1. Бесстрессорная модификация.

С помощью данного теста можно оценить выраженность и динамику отдельных поведенческих элементов, уровень эмоционально - поведенческой активности, уровень исследовательского поведения (Yang et al., 2011). «Открытое поле» входит в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов согласно приказу Минздрава России № 281 от 30.04.2013 г.

"Открытое поле" представляет собой пластиковую арену диаметром 100 см, с расчерченным восьмью диаметрами и двумя концентрическими окружностями, находящимися на равном расстоянии (20 см) друг от друга и от края арены, а также прямыми, делящими поле на 19 равных по площади областей. Арена окружена стенкой высотой 42 см. Над ареной на высоте 80 см помещена лампа мощностью 200 Вт (рисунок 8). Опыты проводились в тишине при рассеянном свете.

При тестировании животное помещали в центр арены и в течение 5 - ти минут (каждые 60 секунд) визуально оценивали следующие показатели: латентный период выхода из центра арены; горизонтальную двигательную активность -

пробег – количество пройденных секторов; вертикальную двигательную активность – стойки – количество подъемов на задние лапы; количество отходов от стенки арены – выходы I – количество пересечений внешней концентрической окружности; количество выходов в центр арены – выходы II – количество пересечений внутренней концентрической окружности; количество умываний – груминг – количество касаний морды животного передними лапами.

Параметры двигательной активности и обследование окружностей являются показателями ориентировочно - исследовательской активности. Раздельно учитывается короткий и длительный груминг. Короткий груминг характеризуется 1 - 2 быстрыми круговыми движениями лап вокруг носа, длительный груминг – умывание в области глаз, заведение лап за область ушей (Нотова и др., 2018).

2. Стрессогенная модификация.

Вместе с красной лампой над ареной помещается лампа мощностью 200 Вт и электрический звонок. Тестирование животных проводят как описано выше.



Рисунок 8. Установка «Открытое поле»

Тест «Светлая – темная камера»

Используется в нейробиологических и психофармакологических исследованиях для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности. Данный метод необходим для типирования животных по предпочтению темноты или света. Согласно приказу Минздрава России № 281 от 30.04.2013 г. методика входит в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов.

Экспериментальная установка представляет собой камеру (размер 30 x 22 x 35 см), разделенную перегородкой с отверстием на два отсека: один ярко освещенный, другой – затемненный (Рисунок 9). Животное помещали в светлый отсек и в течение трех минут визуально регистрировали следующие показатели:

- латентный период перехода в темный отсек, сек;
- суммарное время, проведенное в светлом отсеке, сек;
- количество стоек в светлом и темном отсеках;
- количество выглядываний из темного отсека;
- количество переходов между светлым и темным отсеками;
- количество умываний в светлом отсеке.

Уменьшение числа заходов в светлый отсек, времени пребывания в нём, числа стоек и увеличение коротких грумингов свидетельствует о нарастании тревожности в поведении животных (Hascoët, Bourin, 2001).



Рисунок 9. Установка «Светлая – темная камера»

2.10. Статистическая обработка результатов исследований

Статистическую обработку микробиологических результатов исследований проводили с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel, рассчитывали среднее арифметическое, доверительные интервалы, стандартное отклонение. Статистическую значимость различий определяли по общепринятой методике с использованием t - критерия Стьюдента. Достоверность различий соответствовала $p < 0,05$.

Данные по крысам обрабатывали с использованием пакета статистических программ "Statistica 10.0", Microsoft Excel, GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). При обработке результатов поведенческих тестов в начале проверили данные на нормальность распределения по критерию Шопиро - Уилка. Нормально распределённые данные сравнивали по параметрическим критериям (t - test Стьюдента), а распределения, отличные от нормального, с помощью непараметрических критериев. При сравнении характеристик массивов данных использовали точный метод Фишера и критерий Манна - Уитни и Краскела - Уоллиса (непараметрические критерии), а также дисперсионный анализ (ANOVA) с применением поправки Dunn (Dunn's multiple comparisons test). На рисунках представлены данные в виде среднего и стандартной ошибки среднего. Различия между группами считали достоверными при вероятности ошибки $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ²

3.1. Определение спектра антимикробного действия и влияния аминокислот на рост и продукцию бактериоцинов штаммами *L. lactis* subsp. *lactis* в динамике их роста в ферментационной среде

Спектр антимикробной активности штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* тестировали с использованием представителей различных групп микроорганизмов, включая грамположительную бактерию *Staphylococcus aureus* AP017922.1, грамотрицательную бактерию *Escherichia coli* 52, дрожжи *Candida albicans* INA 00763 и микроскопические грибы *Aspergillus niger* INA 00760 (детали состава сред см. в главе «Объекты и методы исследования»). Тест-микроорганизмы являются представителями разных групп контаминантов пищевого сырья, способных вызывать заболевания человека. Например, *S. aureus* AP017922.1 может вызывать широкий диапазон заболеваний, начиная с лёгких кожных инфекций - угри, импетиго, до смертельно опасных заболеваний, таких как - пневмония, менингит, остеомиелит, эндокардит, инфекционно-токсический шок и сепсис. *E. coli* 52 – условно-патогенные бактерии, вирулентные штаммы которого могут вызывать гастроэнтериты, воспаления мочеполовой системы, а также менингит у

² Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

1. Стоянова Л.Г., Дбар С.Д. Нутрицевтические показатели бактериоцинпродуцирующих лактококков для создания ферментированных функциональных продуктов // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – 2023. – № 3 (47). – С. 330 - 338. IF (РИНЦ) - 0,257.
2. Vodolazov I. R., Dbar S.D., Oleskin A.V., Stoyanova L.G. Exogenous and endogenous neuroactive biogenic amines: studies with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2018. – V. 54. – P. 603 - 610. DOI: 10.1134/S0003683818060157. IF (SJR) - 0,247.
3. Stoyanova L.G., Vodolazov I.V., Dbar S.D., Oleskin A.V. Probiotic strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produce neuroactive substances // Journal of Hygienic Engineering and Design. – 2017. – V. 20. – P. 25 - 31. IF (SJR) - 0,175.

новорождённых, в редких случаях перитонит, мастит и сепсисы. Известно, что микромицеты - *A. niger* INA 00760 и *C. albicans* INA 00763 выделяют токсины, являются причиной плесневения продуктов питания, в частности, колбас, хлебобулочных изделий, фруктов, овощей, и, как известно, дрожжи *C. albicans* INA 00763 – возбудители кандидозов у людей и животных. Количественное определение антимикробной активности проводилось путем измерения зон подавления роста (см. раздел «Приложения», Рисунки 1-8).

Исследование антибактериальной активности в динамике позволило определить период роста продуцента, когда синтез бактериоцинов достигает максимума своей активности, который у штамма 194 приходится на 9 ч культивирования (Рисунки 10 - 11) и соответствует экспоненциальной фазе роста, а у штаммов F-116 и F-119 приходится на 15 и 18 ч культивирования (Рисунки 12 - 15).

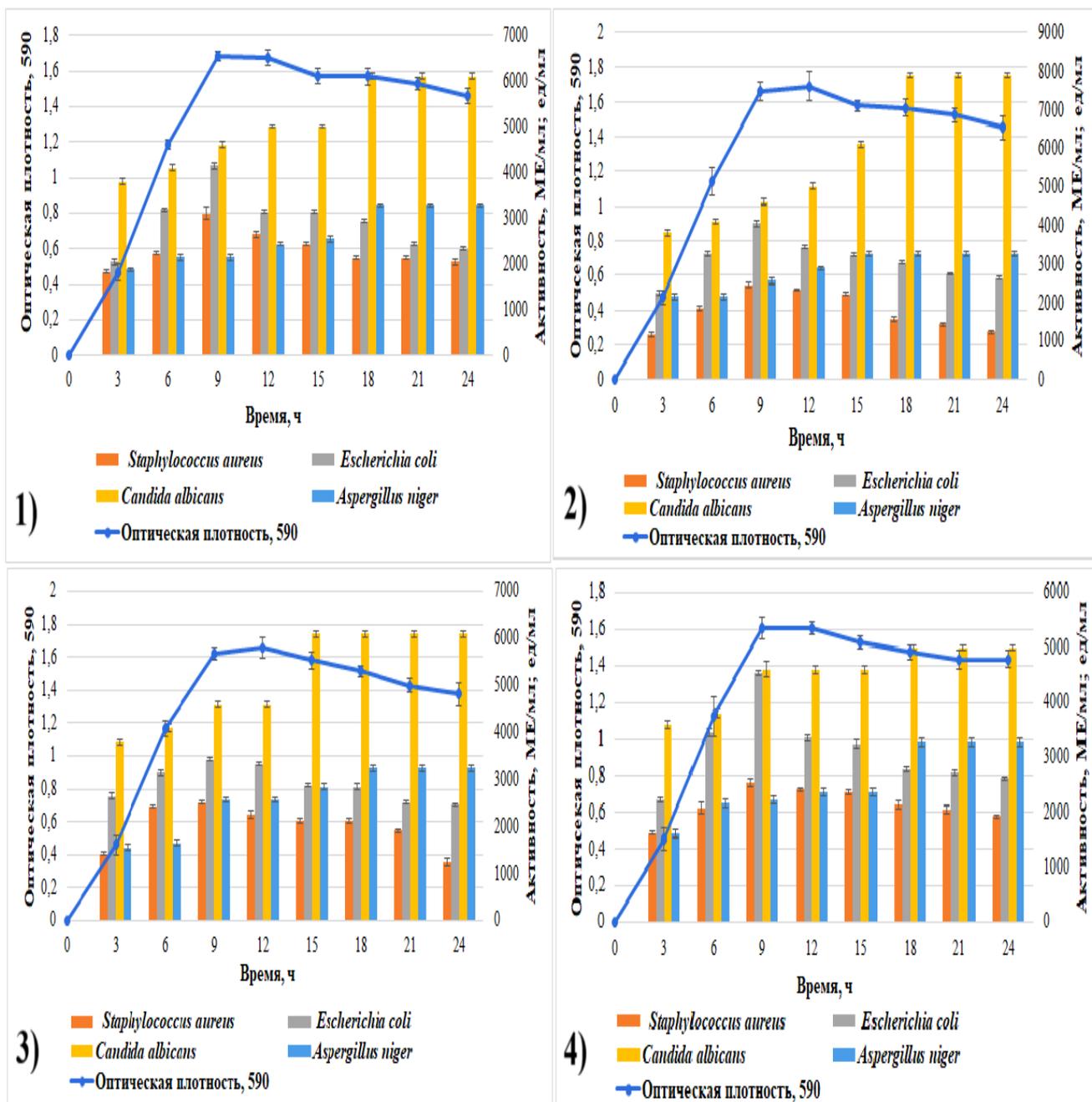


Рисунок 10. Антимикробная активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 в динамике роста в ферментационной среде с добавлением аминокислот. Примечание: 1 - контроль; 2 - тирозин; 3 - триптофан; 4 – аланин ($p \leq 0,05$)

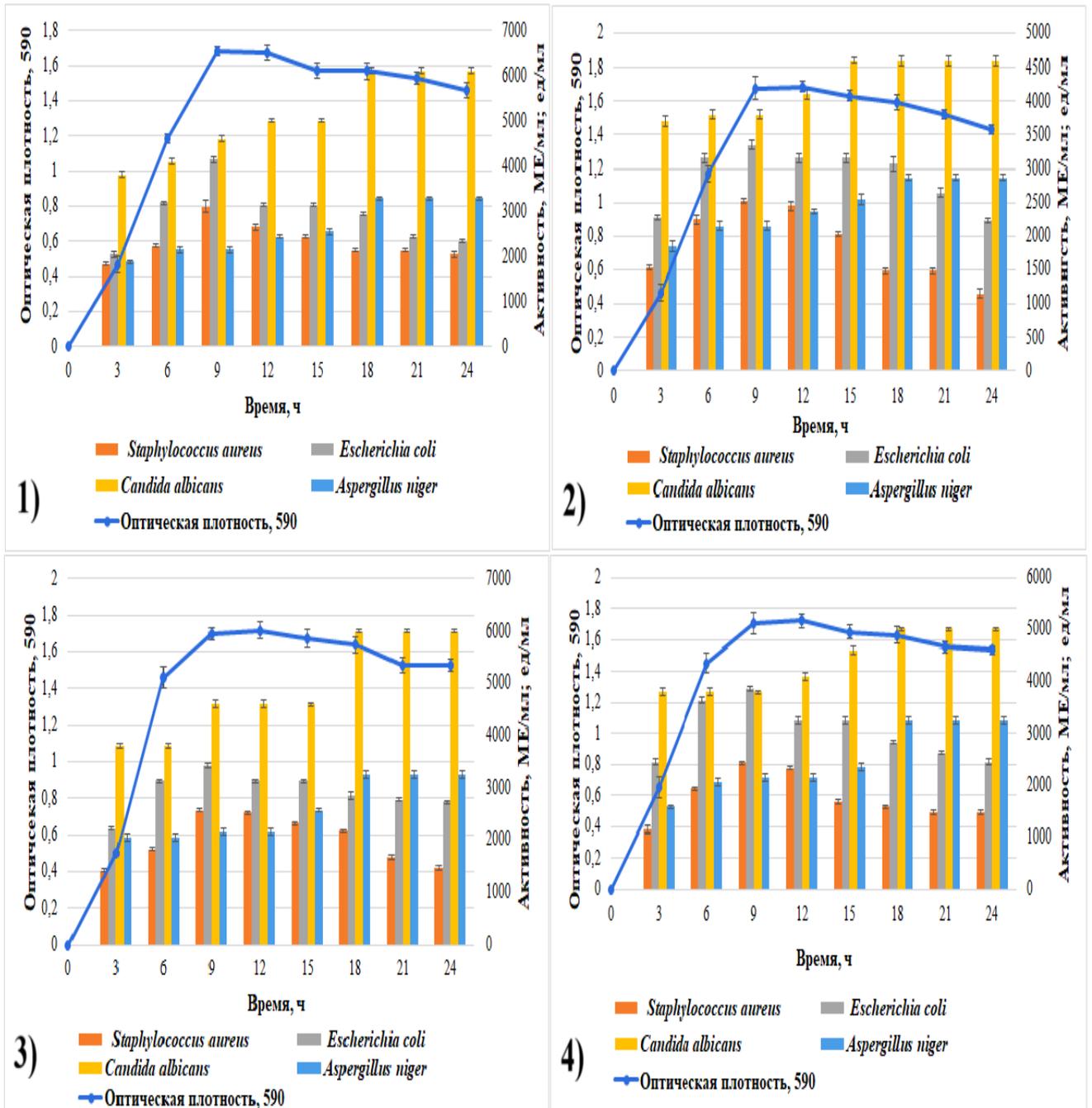


Рисунок 11. Антимикробная активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 в динамике роста в ферментационной среде с добавлением аминокислот. Примечание: 1 - контроль; 2 - изолейцин; 3 - глутаминовая кислота; 4 - серин ($p \leq 0,05$)

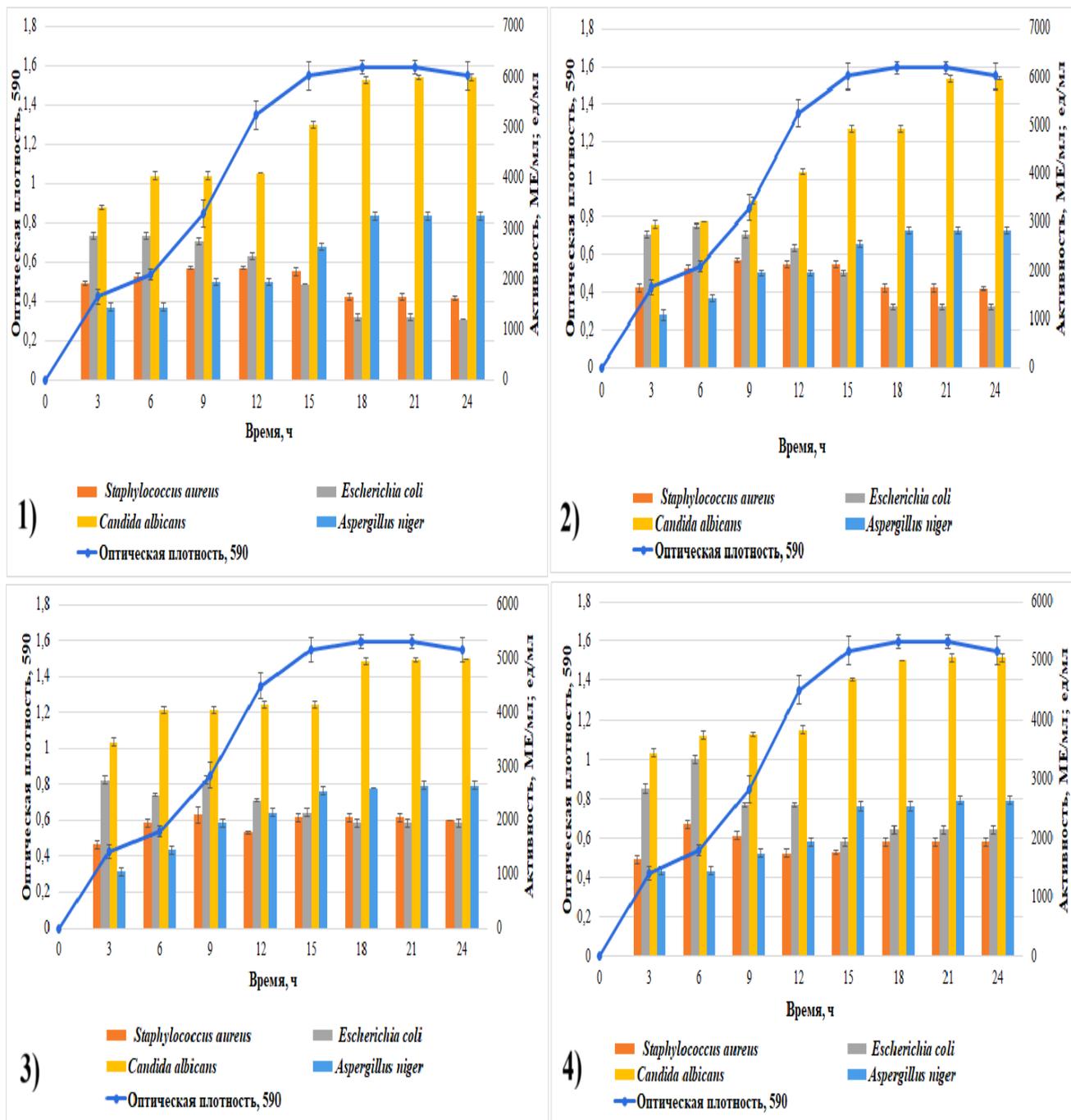


Рисунок 12. Антимикробная активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма F-116 в динамике роста в ферментационной среде с добавлением аминокислот. Примечание: 1 - контроль; 2 - тирозин; 3 - триптофан; 4 – аланин ($p \leq 0,05$)

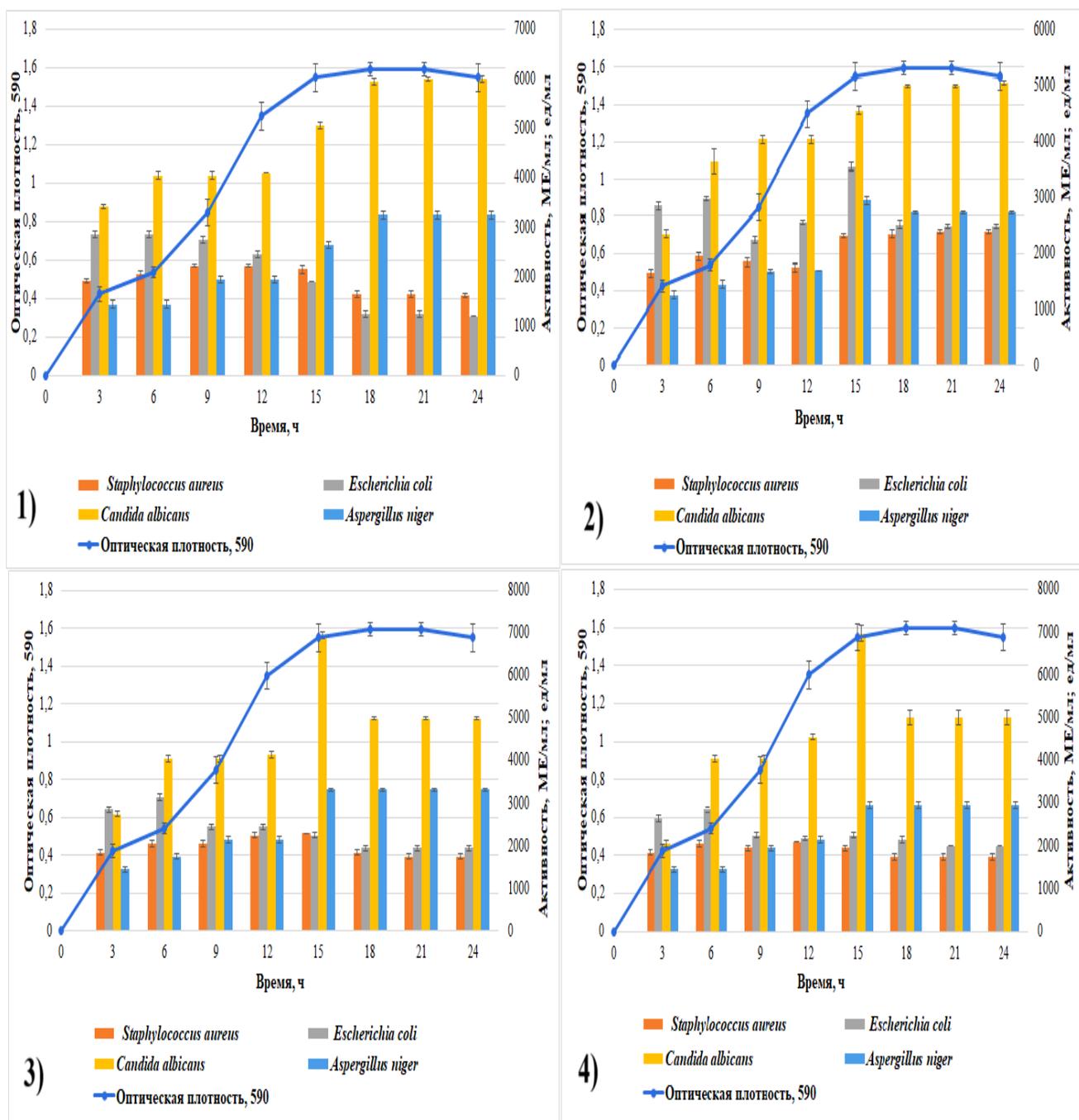


Рисунок 13. Антимикробная активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма F-116 в динамике роста в ферментационной среде с добавлением аминокислот. Примечание: 1 - контроль; 2 - изолейцин; 3 -глутаминовая кислота; 4 – серин ($p \leq 0,05$)

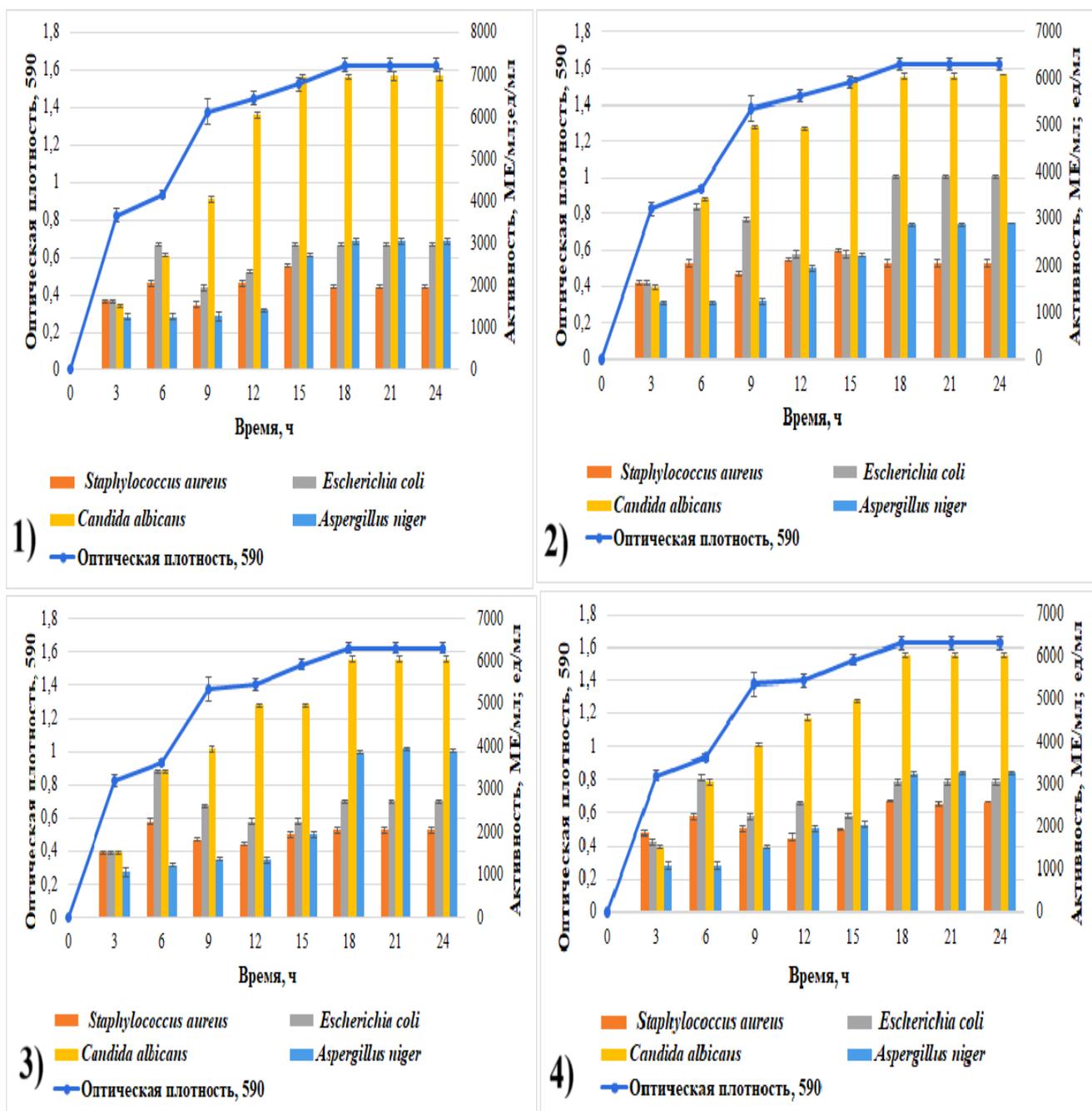


Рисунок 14. Антимикробная активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма F-119 в динамике роста в ферментационной среде с добавлением аминокислот. Примечание: 1 - контроль; 2 - тирозин; 3 - триптофан; 4 - аланин ($p \leq 0,05$)

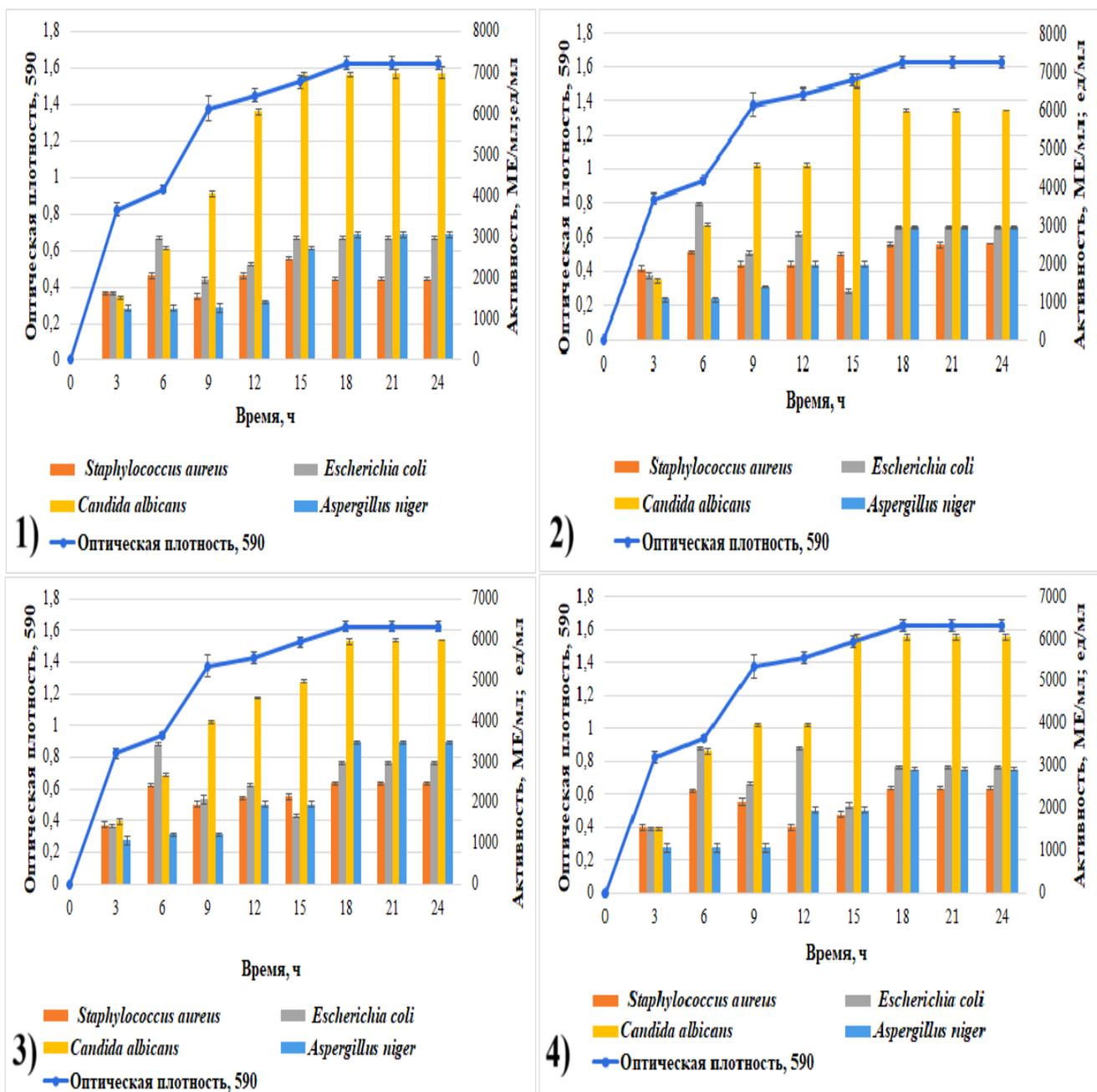


Рисунок 15. Антимикробная активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма F-119 в динамике роста в ферментационной среде с добавлением аминокислот. Примечание: 1 - контроль; 2 - изолейцин; 3 -глутаминовая кислота; 4 – серин ($p \leq 0,05$)

Существуют три группы аминокислот: заменимые аминокислоты – это аминокислоты, поступающие в организм человека с белковой пищей, либо образующиеся в организме из иных аминокислот; незаменимые аминокислоты – это аминокислоты, которые не могут быть получены в организме человека с помощью биосинтеза, поэтому должны постоянно поступать в виде пищевых белков и условно заменимые - необходимые только тогда, когда человек болен или испытывает стресс (Разумовский, Соболев, 2020). Их отсутствие в организме приводит к явлениям, угрожающим жизни.

К заменимым аминокислотам относятся: аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, серин и тирозин. Незаменимыми аминокислотами для взрослого здорового человека являются аминокислоты: гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин. К условно незаменимым аминокислотам относятся: аргинин, цистеин, глутамин, тирозин, глицин, пролин и серин (Amino acids: MedlinePlus Medical Encyclopedia: <https://medlineplus.gov/ency/article/002222.htm>). Известно, что некоторые аминокислоты являются незаменимыми и существует необходимость поступления их извне с пищей или в виде добавок.

Отличительным признаком молочнокислых бактерий является высокая потребность в сложных питательных веществах, пуринах, пиримидинах, аминокислотах, витаминах: тиамине, рибофлавине, биотине, никотиновой и пантотеновой кислотах. Этим и объясняется в значительной мере влияние на их рост добавления к средам различных растительных экстрактов - дрожжей, картофеля, моркови, кукурузы (Стоянова, 2017). Известно, что аминокислоты являются необходимыми компонентами питания для лактококков, а также структурными компонентами бактериоцинов пептидной природы, поэтому они способны усилить антимикробную активность штаммов лактококков. В связи с этим, было проведено исследование влияния различных аминокислот на антимикробную активность штаммов *L. lactis subsp lactis*. На рисунках 16 - 21

представлена антимикробная активность штаммов 194, F-116 и F-119 против грамположительной и грамотрицательной тест - культур *S. aureus* AP017922.1 и *E. coli* 52.

Из 7 аминокислот только триптофан повысил активность у штамма 194 на 9% (от 2225 до 2425 МЕ/мл по низину), что соответствует 6 ч культивирования. Максимум антимикробной активности (3100 МЕ/мл по низину) против *S. aureus* AP017922.1 приходится на 6 ч культивирования в контроле (Рисунок 16).

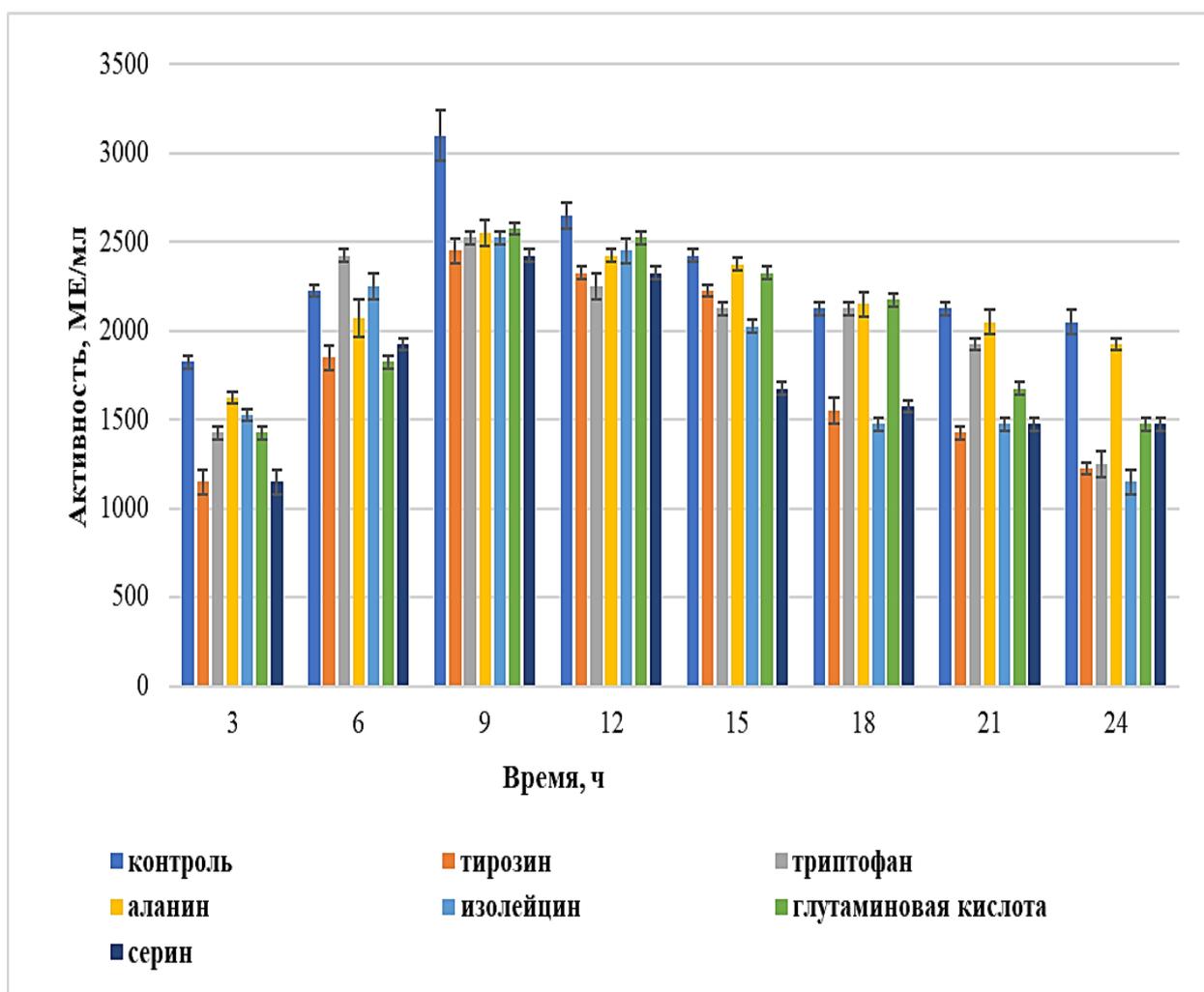


Рисунок 16. Бактерицидная активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 на *S. aureus* AP017922.1, в динамике роста в ферментационной среде, с добавлением аминокислот. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

У штамма F-116 наблюдалось повышение бактерицидной активности при добавлении в среду культивирования: аланина на 10% (от 2050 до 2250 МЕ/мл по низину) и 18% (от 1650 до 1950 МЕ/мл по низину) соответствует 6 и 18 ч культивирования; глутаминовой кислоты на 7% (от 2150 до 2300 МЕ/мл по низину) и 12% (от 1650 до 1850 МЕ/мл по низину), соответствует 15 и 18 ч культивирования; серина на 6% (от 1650 до 1750 МЕ/мл по низину), триптофана на 24 % (за 18 ч); изолейцина на 8% (от 2150 до 2325 МЕ/мл по низину) и 45% (от 1650 до 2400 МЕ/мл по низину), соответствует 15 и 18 ч культивирования (Рисунок 17). Таким образом, максимум антимикробной активности на *S. aureus* AP017922.1 (2400 МЕ/мл по низину) был достигнут при добавлении в среду культивирования аминокислоты изолейцина.

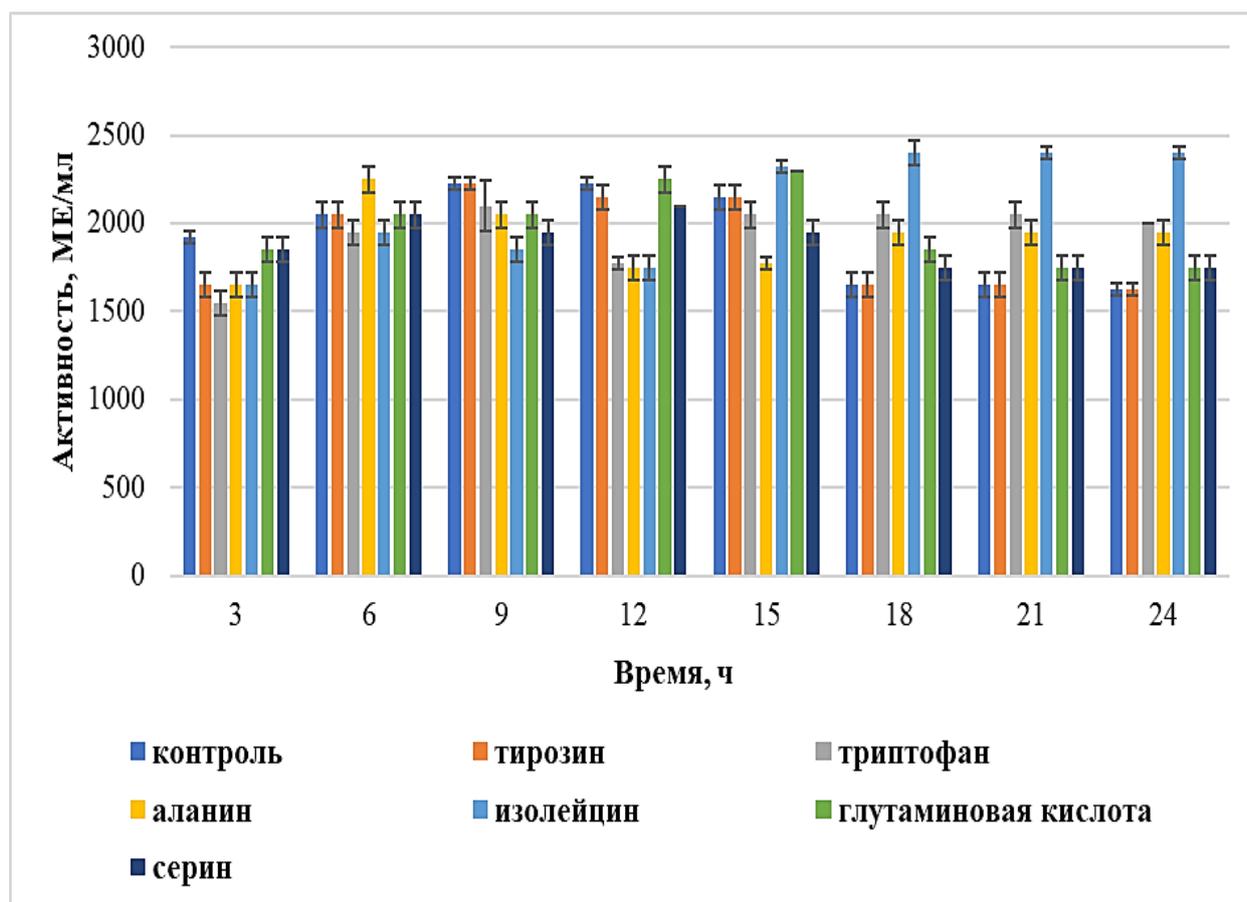


Рисунок 17. Бактерицидная активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма F-116 на *S. aureus* AP017922.1, в динамике роста в ферментационной среде, с добавлением аминокислот. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

У штамма F-119 наблюдалось увеличение бактерицидной активности против *S. aureus* AP017922.1 при добавлении в среду культивирования: аланина и изолейцина на 14% (от 1625 до 1850 МЕ/мл по низину) за 3 ч культивирования; триптофана и аланина на 10% (от 2050 до 2250 МЕ/мл по низину), изолейцина на 11%, глутаминовой кислоты и серина на 18% (6 ч); тирозина и триптофана на 18% (от 1550 до 1825 МЕ/мл по низину), аланина, изолейцина и глутаминовой кислоты на 26%, серина на 39% (за 9 ч); изолейцина, глутаминовой кислоты и серина на 25% (от 1975 до 2475 МЕ/мл по низину), аланина на 33% (от 1975 до 2475 МЕ/мл по низину) за 18 ч культивирования (Рисунок 18).

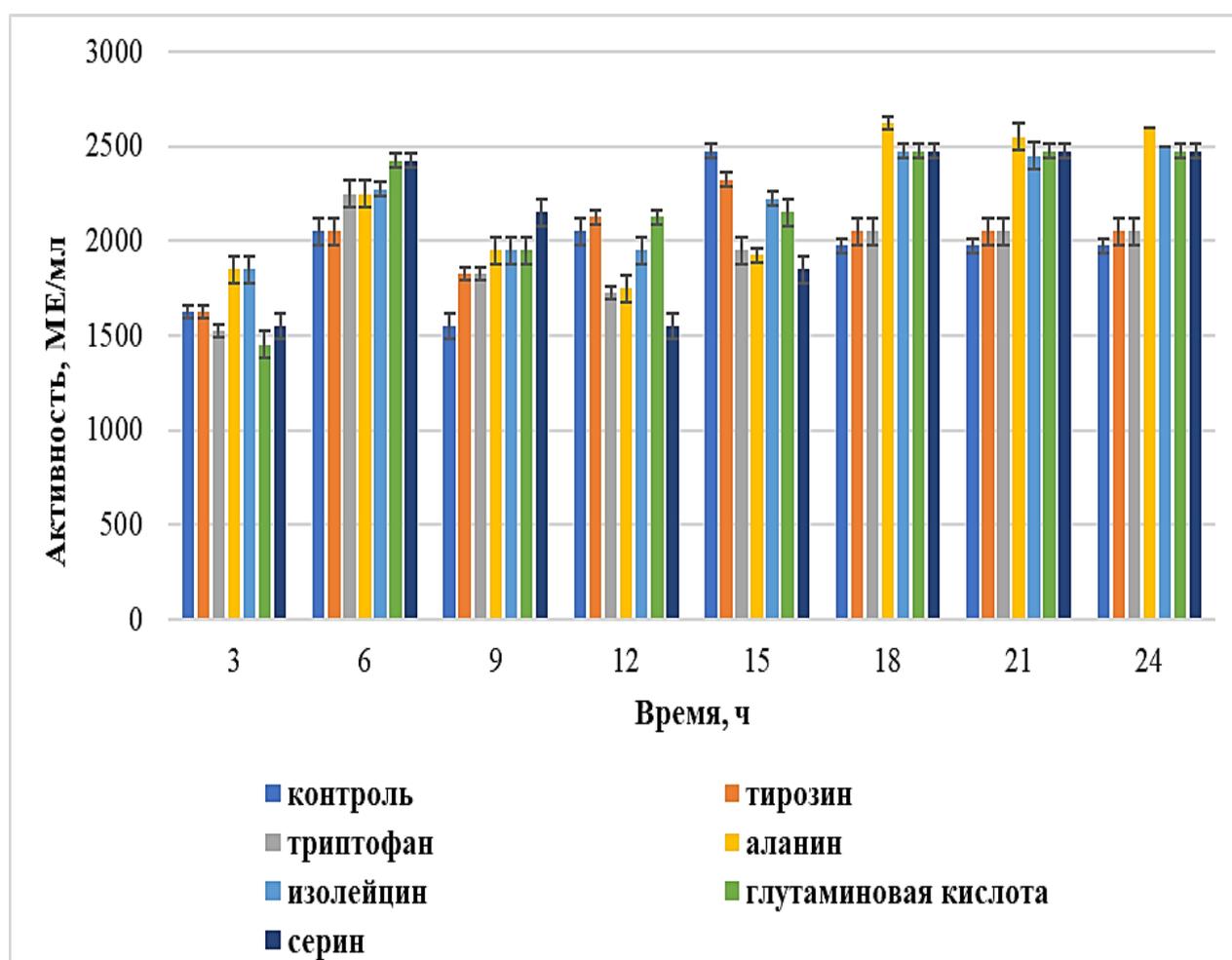


Рисунок 18. Бактерицидная активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма F-119 на *S. aureus* AP017922.1, в динамике роста в ферментационной среде, с добавлением аминокислот. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

Бактерицидная активность штамма 194 против *E. coli* 52 повысилась при добавлении: глутаминовой кислоты и аланина на 9% (от 2050 до 2225 ед/мл по левомецетину), тирозина на 10%, изолейцина на 11%, серина на 20% и триптофана на 29% за 3 ч культивирования; аланина на 9% (от 3175 до 3450 ед/мл по левомецетину), серина на 15% за 6 ч; аланина на 9% (от 4150 до 4525 ед/мл по левомецетину) за 9 ч; триптофана на 6% (от 3125 до 3325 ед/мл по левомецетину), аланина на 7%, тирозина на 10% за 12 ч; триптофана на 6% (от 2325 до 2475 ед/мл по левомецетину), тирозина и аланина на 13%, глутаминовой кислоты на 17% за 24 ч культивирования (Рисунок 19).

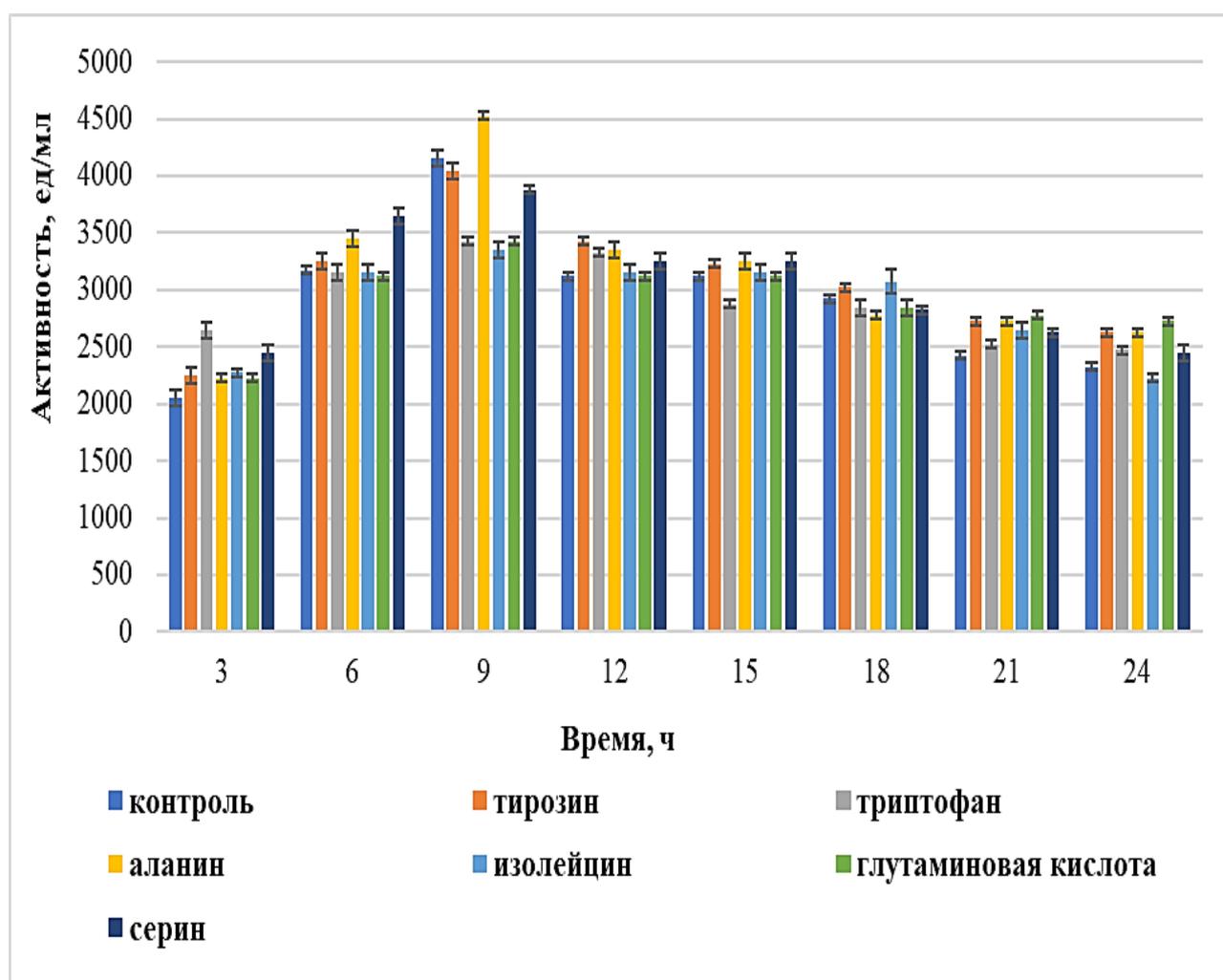


Рисунок 19. Бактерицидная активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 *L. lactis* subsp. *lactis* на *E. coli* 52, в динамике роста в ферментационной среде, с добавлением аминокислот. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

Антимикробная активность штамма F-116 против *E. coli* 52 увеличилась при добавлении: глутаминовой кислоты на 11% (от 2850 до 3150 ед/мл по левомецетину), аланина на 18% за 6 ч; триптофана на 13% (от 1900 до 2150 ед/мл по левомецетину), глутаминовой кислоты и серина на 18%, изолейцина на 87% за 15 ч (Рисунок 20).

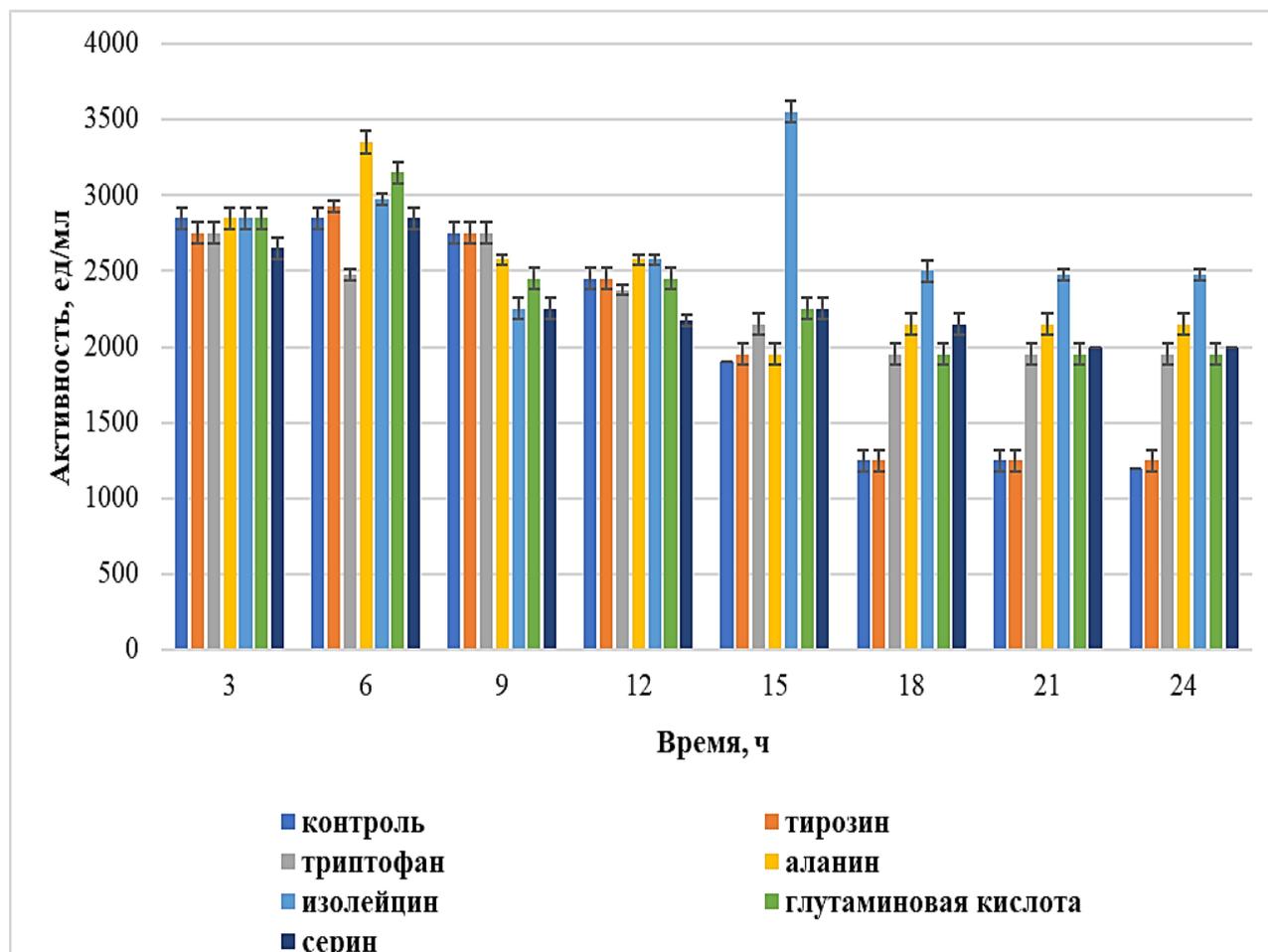


Рисунок 20. Бактерицидная активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма F-116 *E. coli* 52, в динамике роста в ферментационной среде, с добавлением аминокислот. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

Антимикробная активность штамма F-119 против *E. coli* 52 (Рисунок 21) повысилась при добавлении: аланина на 6% (от 2975 до 3150 ед/мл по левомецетину), тирозина на 9%, триптофана, серина и глутаминовой кислоты на 15%, изолейцина 18% за 6 ч; глутаминовой кислоты на 6% (от 1950 до 2075 ед/мл по левомецетину), аланина и изолейцина на 15%, серина на 32%, триптофана на

35%, тирозина 53% за 9 ч; аланина на 11% (от 2325 до 2575 ед/мл по левомецетину), изолейцина на 18%, серина на 47% за 12 ч; тирозина на 32% за 18 ч (от 2975 до 3925 ед/мл по левомецетину).

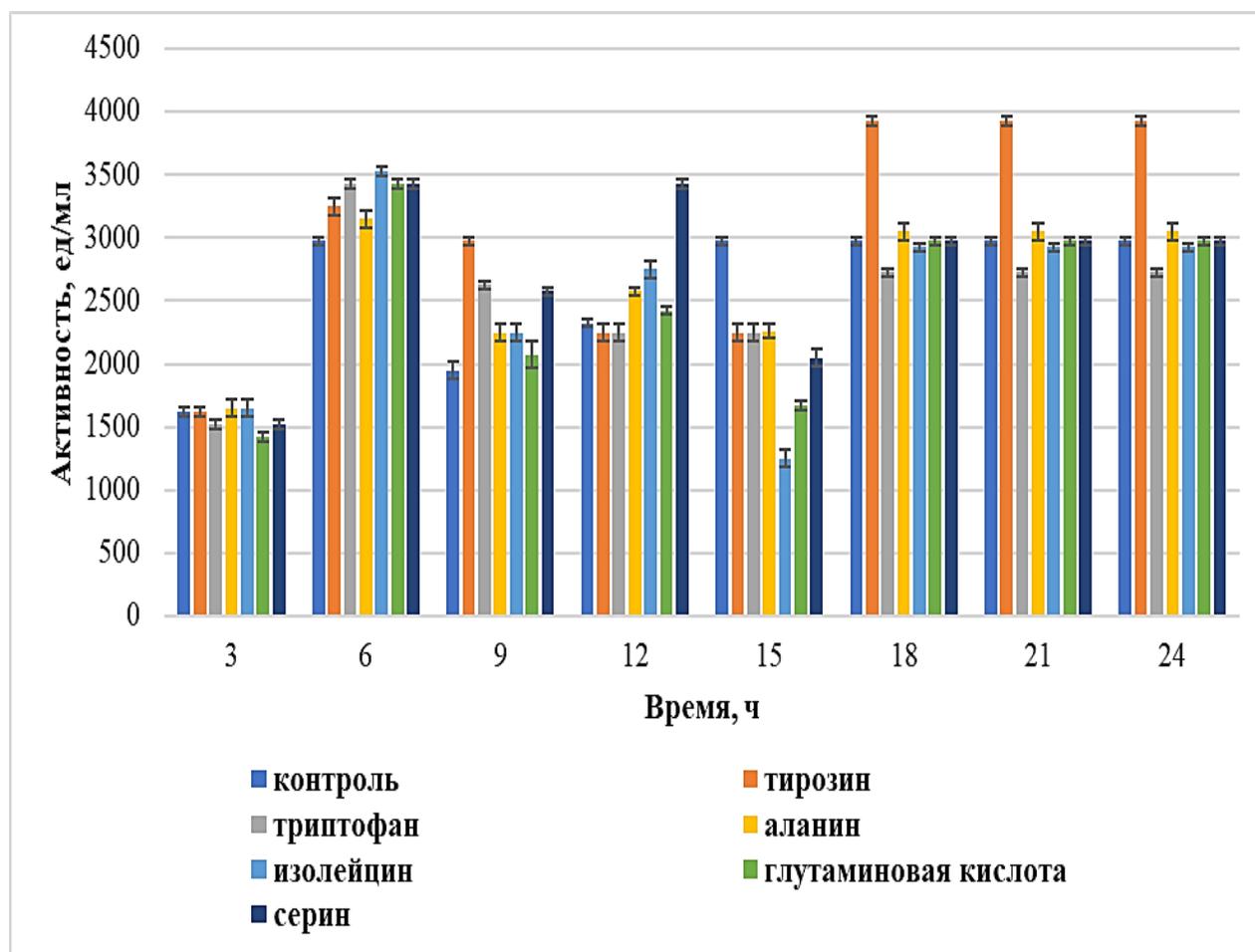


Рисунок 21. Бактерицидная активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма F-119 на *E. coli* 52, в динамике роста в ферментационной среде, с добавлением аминокислот. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

На основании полученных результатов, можно отметить, что в случае грамположительной тест-культуры штамм 194 не требует добавления в среду дополнительных компонентов, так как его активность без аминокислот составила 3100 ME/мл по низину. Штаммы F-116 и F-119 повысили активность при добавлении изолейцина и аланина на 45% и 33% соответственно (2400 и 2625 ME/мл по низину). В случае грамотрицательной тест-культуры штамм 194 дает увеличение антибактериальной активности на 9% при добавлении аланина (4525

ед/мл по левомецетину), а F-116 и F-119 с изолейцином и тирозином на 87% и 32% соответственно (3550 и 3925 ед/мл по левомецетину).

Ранее было установлено, что бактерицидная активность природного штамма 194, направленная на грамположительные бактерии, связана с продукцией двух бактериоцинов, один из которых является низином А (М=3353Да), второй - пептидом (М=2538 кДа), состоящим из 20 аминокислотных остатков и не содержащим лантионин, ингибирующий рост и грамотрицательных бактерий, что не характерно для лантибиотиков типа низина А (Устюгова и др., 2012). Вероятнее всего способность штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* подавлять рост грамотрицательной тест-культуры, связано с наличием второго бактериоцина, изучение свойств которого может дать начало другим исследованиям в контексте возможного использования бактериоцинов в комплексе с антибиотикотерапией при лечении заболеваний, вызванных полирезистентными возбудителями инфекций.

Также была изучена антимикотическая активность исследуемых лактококков штаммов 194, F-116 и F-119 (Рисунки 22 - 27). Результаты наших экспериментов указали на способность лактококков проявлять фунгицидную активность против микромицетов - отобранных тестов *Aspergillus niger* INA 00760 и дрожжей *Candida albicans* INA 00763 (активность в образцах рассчитана по нистатину).

Антимикотическая активность штамма 194 против *C. albicans* INA 00763 в большей степени увеличилась при добавлении: тирозина и триптофана на 22% (от 4975 до 6050 ед/мл по нистатину) за 15 ч; тирозина на 30% (от 6050 до 7850 ед/мл по нистатину) за 18 ч культивирования (Рисунок 22).

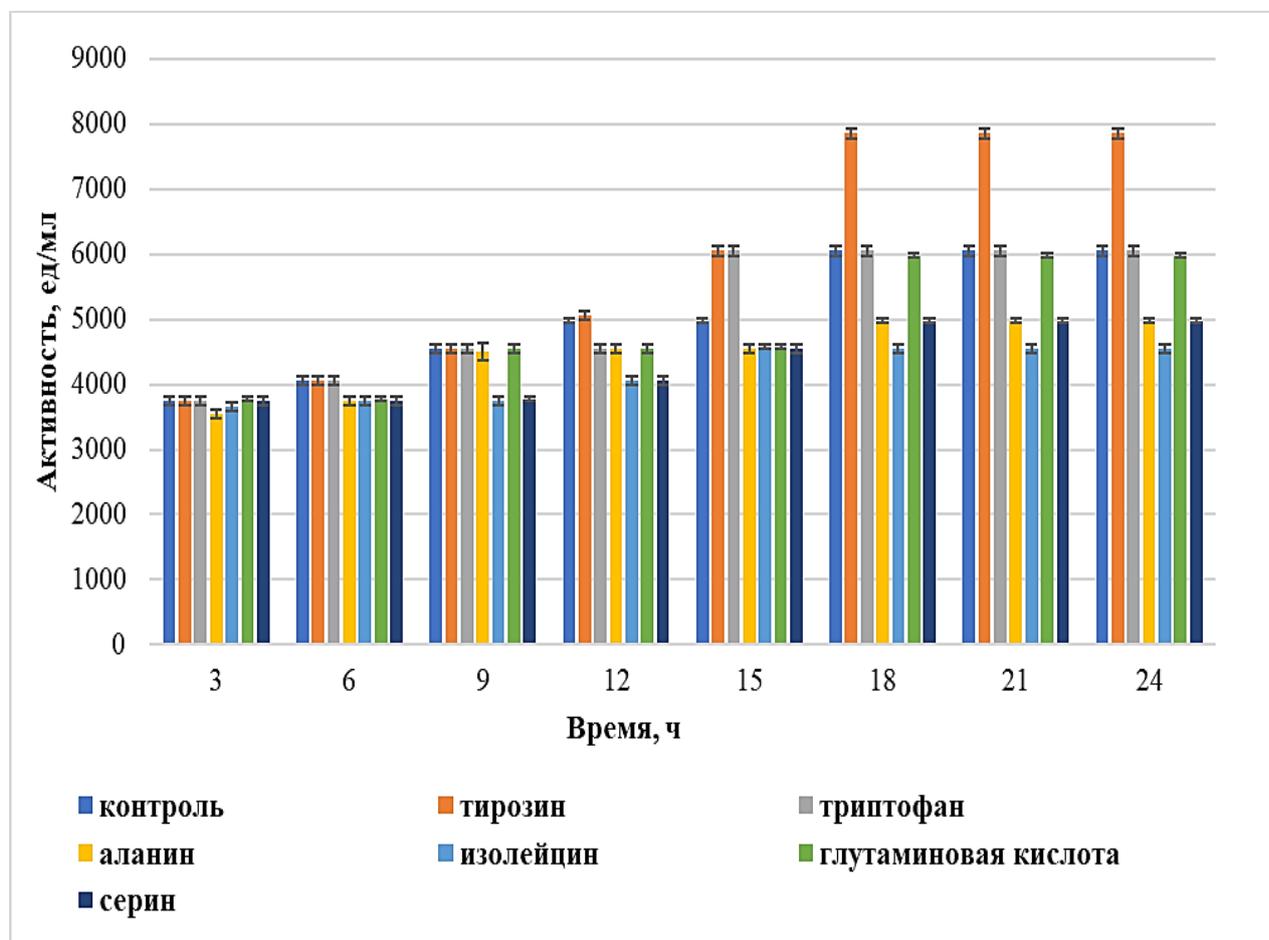


Рисунок 22. Антимикотическая активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 против *C. albicans* INA 00763, в динамике роста в ферментационной среде, с добавлением аминокислот. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

Штамм F-116 увеличил активность против дрожжей при добавлении в среду культивирования: серина на 11% (от 4100 до 4550 ед/мл по нистатину) за 12 ч; серина на 14% (от 5050 до 5750 ед/мл по нистатину) и глутаминовой кислоты на 38% за 15 ч (Рисунок 23).

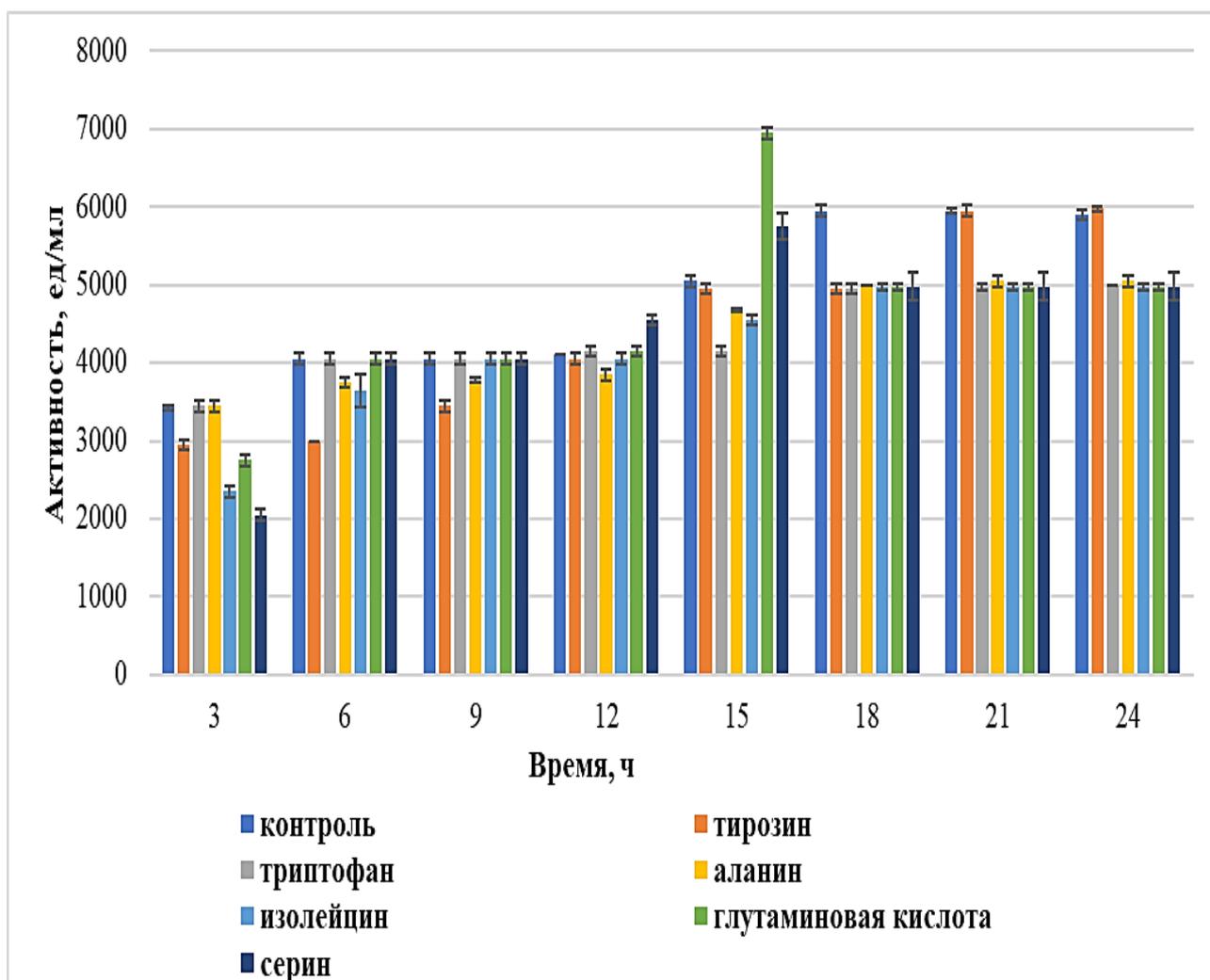


Рисунок 23. Антимикотическая активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма F-116 против *C. albicans* INA 00763, в динамике роста в ферментационной среде, с добавлением аминокислот. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

У F-119 активность повысилась при добавлении: изолейцина на 9% (от 2725 до 2975 ед/мл по нистатину), аланина на 12%, серина на 23%, тирозина и триптофана на 26% за 6 ч; изолейцина на 12% (от 4050 до 4550 ед/мл по нистатину), тирозина на 23% за 9 ч (Рисунок 24).

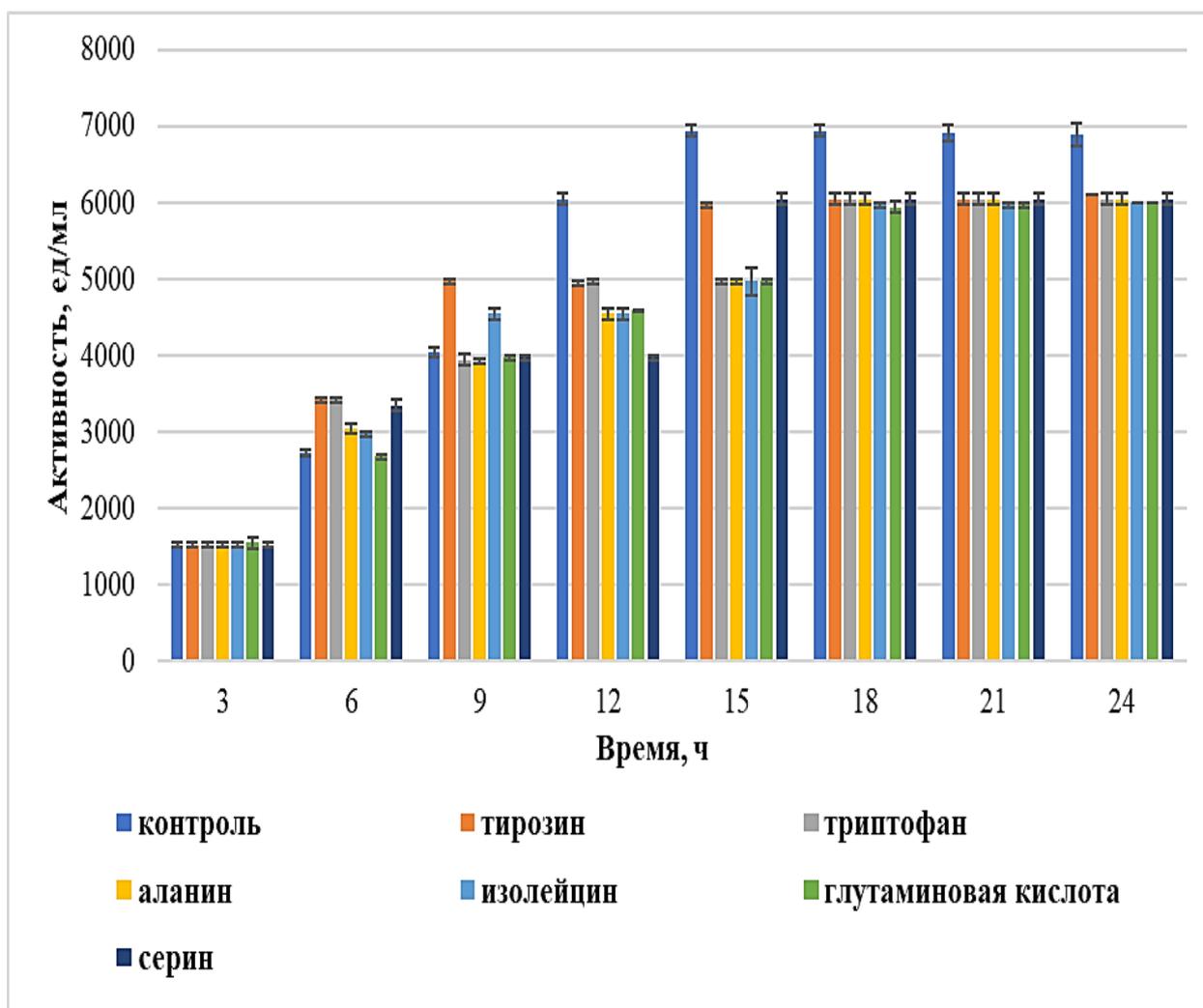


Рисунок 24. Антимикотическая активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма F-119 против *C. albicans* INA 00763, в динамике роста в ферментационной среде, с добавлением аминокислот. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

Антимикотическая активность штамма 194 против *A. niger* INA 00760 повысилась при добавлении в среду: глутаминовой кислоты на 9% (от 1875 до 2050 ед/мл по нистатину), тирозина на 15% за 3 ч; тирозина на 19% (от 2150 до 2550 ед/мл по нистатину), триптофана на 20% за 9 ч; триптофана на 6% (от 2575 до 2425 ед/мл по нистатину), тирозина на 19% за 12 ч; триптофана на 12% (от 2850 до 2550 ед/мл по нистатину), тирозина на 27% за 15 ч (Рисунок 25).

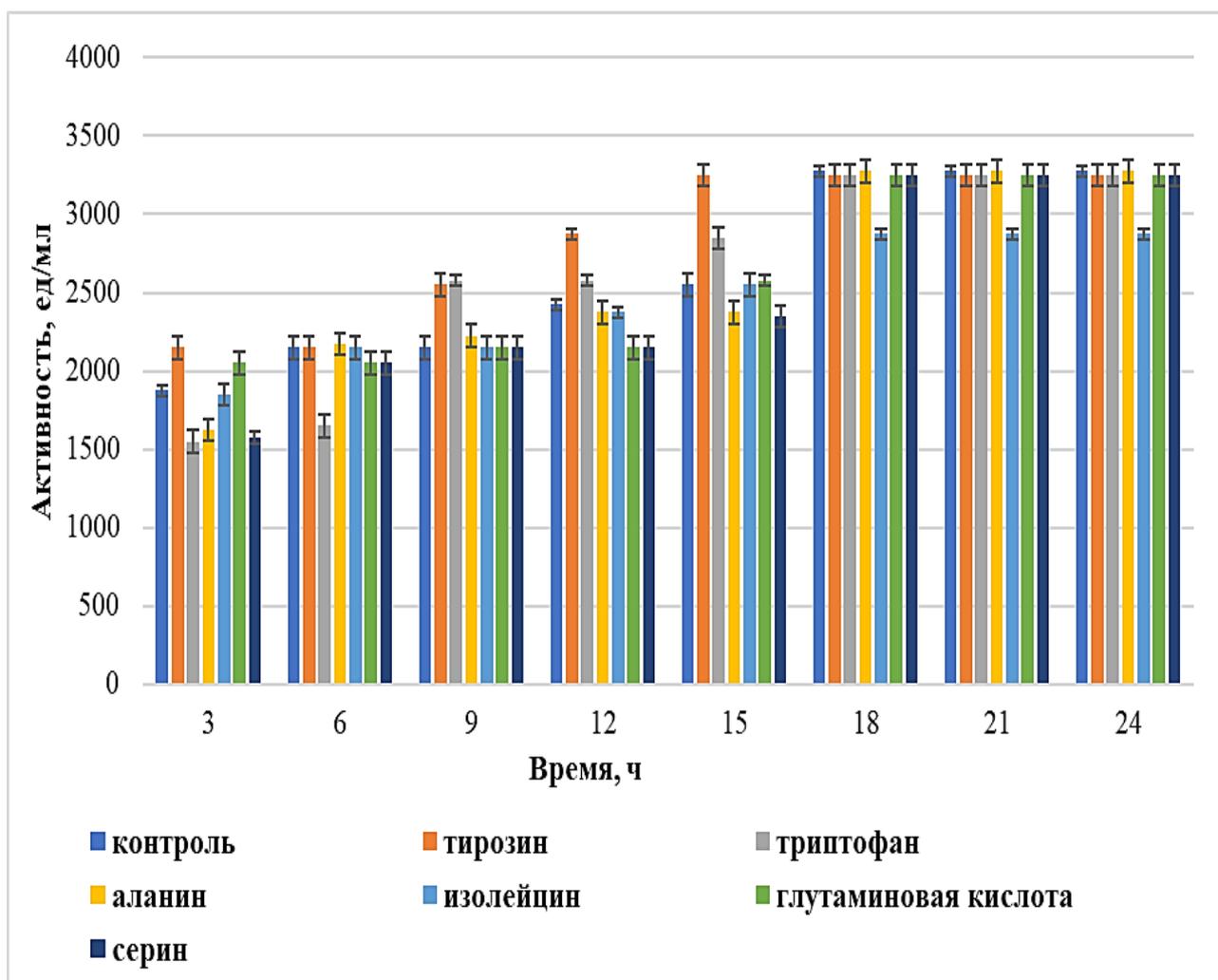


Рисунок 25. Антимикотическая активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 против *A. niger* INA 00760, в динамике роста в ферментационной среде, с добавлением аминокислот. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

У F-116 при добавлении: глутаминовой кислоты на 21% (от 1450 до 1750 ед/мл по нистатину) за 6 ч; глутаминовой кислоты, серина и триптофана на 10% (от 1950 до 2150 ед/мл по нистатину) за 12 ч; изолейцина и серина на 11% (от 2650 до 2950 ед/мл по нистатину), глутаминовой кислоты на 25% за 15 ч культивирования (Рисунок 26).

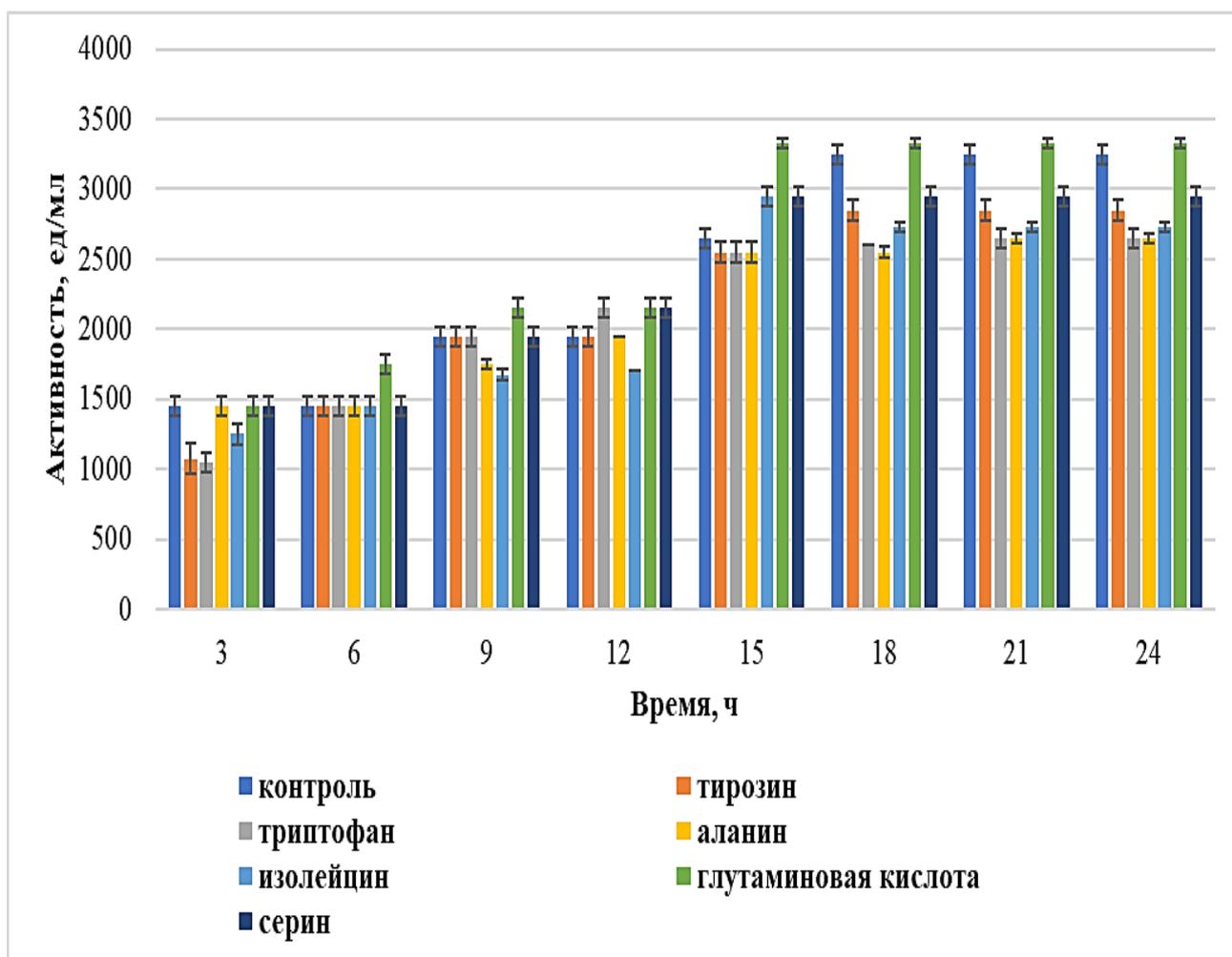


Рисунок 26. Антимикотическая активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма F-116 против *A. niger* INA 00760, в динамике роста в ферментационной среде, с добавлением аминокислот. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

У штамма F-119 антимикотическая активность против *A. niger* INA 00760 повысилась при добавлении: аланина на 20% (от 1275 до 1525 ед/мл по нистатину) за 9 ч; тирозина, аланина, изолейцина, серина и глутаминовой кислоты на 37% (от 1425 до 1950 ед/мл по нистатину) за 12 ч; аланина на 7% (от 3050 до 3275 ед/мл по нистатину), глутаминовой кислоты на 14% и триптофана на 30% за 18 ч (Рисунок 27).

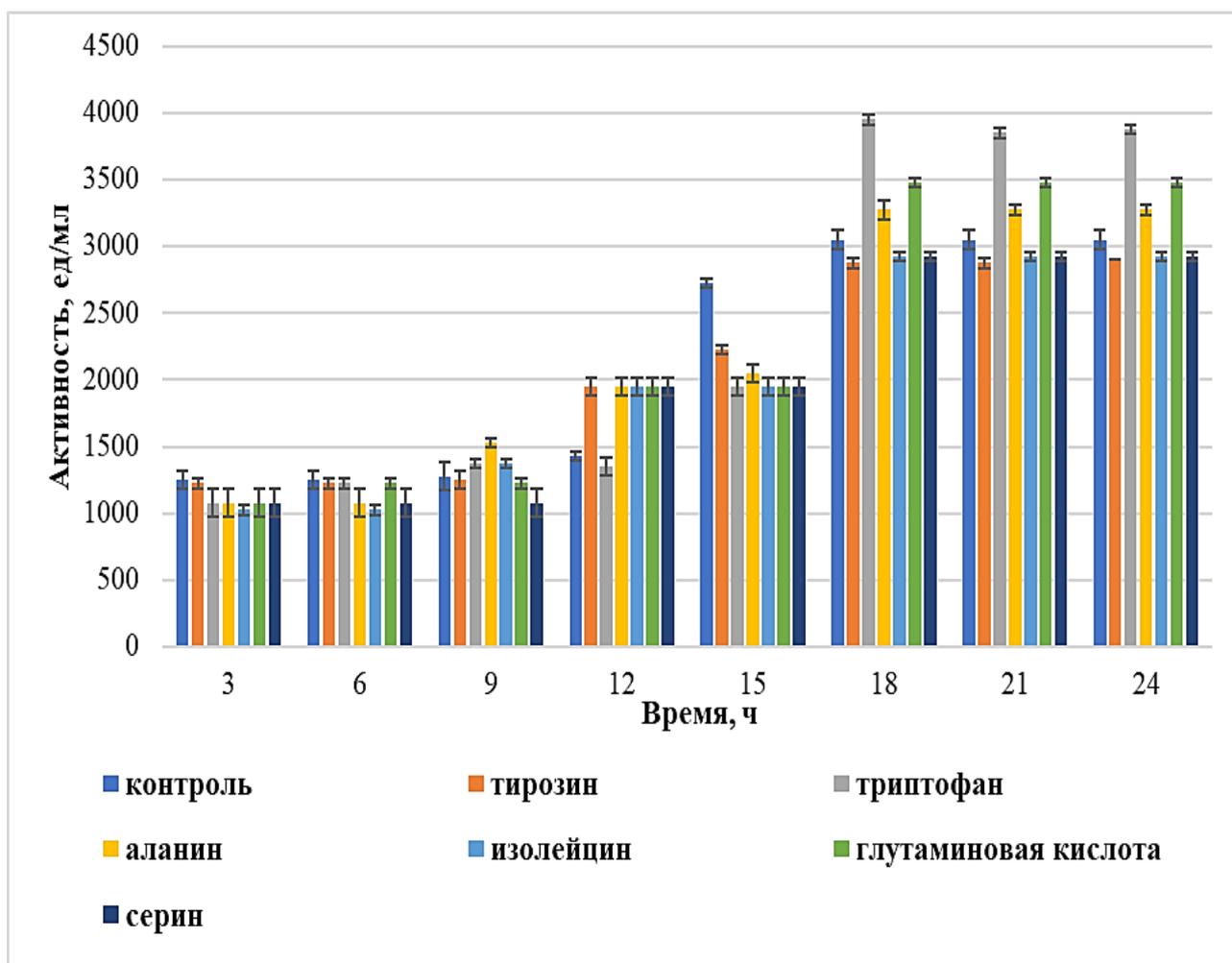


Рисунок 27. Антимикотическая активность *L. lactis* subsp. *lactis* штамма F-119 против *A. niger* INA 00760, в динамике роста в ферментационной среде, с добавлением аминокислот. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

Стоит заметить, что увеличение активности против дрожжей и грибов у лактококков соответствовало 15 - 18 ч культивирования. Повышение на 30% активности штамма 194 против *C. albicans* наблюдали при добавлении тирозина (7850 ед/мл), на 38% у штамма F-116 при добавлении глутаминовой кислоты (6950 ед/мл). При этом добавление аминокислот в среду культивирования не повысило антимикотическую активность штамма F-119. При изучении влияния аминокислот на активность против *A. niger* выявлено, что у штамма 194 активность увеличилась на 27% с добавлением в среду тирозина (3250 ед/мл), у штаммов F-116 в

присутствии глутаминовой кислоты (3325 ед/мд) и F-119 в присутствии триптофана (3950 ед/мл) на 25% и 30% соответственно.

Установленная у исследуемых лактококков антимикотической активность связана с наличием у штамма 194 антимикробного комплекса, содержащего алифатический альдегид ($M=290$ Да), а у F-116 и F-119 - трехкомпонентных антимикробных комплексов, названных авторами LGS, два из которых эффективны против грамположительных бактерий по типу низина, а третий с молекулярной массой $M=506$ Да отнесен к группе алкилароматических кетонов, содержащих также гидроксильные группы, имеющий фунгицидную активность (Стоянова и др., 2012; Stoyanova et al., 2016). Следует заметить, что способность лактококков *L. lactis* subsp. *lactis* к синтезу фунгицидных метаболитов является редким и малоизученным свойством (Kwak et al., 2014). Известно, что фунгициды обладают токсичностью для человека и животных, накапливаются в почве и воде, таким образом, потребность пищевой промышленности, медицины и сельского хозяйства в нетоксичных антимикотиках растет с каждым годом. В связи с этим актуален поиск новых фунгицидных веществ среди непатогенных форм микроорганизмов, а наличие данного свойства у штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* позволит существенно расширить спектр их применения.

3.2. Исследование нейромедиаторной активности и влияние аминокислот на синтез нейроактивных соединений штаммами лактококков

Одной из гипотез патогенеза депрессивных и тревожных состояний является моноаминергическая, которая связана с дефицитом серотонина и норадреналина в структурах головного мозга (Kasper, 2001). Известно, что моноамины и кортизол тесно взаимосвязаны друг с другом и с высокой долей вероятности вовлечены в патогенетические механизмы расстройств аутистического спектра (Каладзе и др., 2021). Дофамин, норадреналин и адреналин играют важную нейромедиаторную роль в работе нервной системы. Они контролируют процессы образного мышления, внимания, запоминания, интеллектуальной и эмоциональной

деятельности, участвуют в процессах сна и бодрствования, социальном поведении, обучении, памяти (Liu et al., 2013).

Использование 5-НТР в качестве альтернативной терапии натуральными средствами получает хорошие отзывы в клинической практике, в первую очередь, благодаря малому количеству потенциальных побочных эффектов (Sharma et al., 2019). Доказано, что более высокий уровень серотонина в спинномозговой жидкости может улучшить симптомы депрессивных заболеваний, а 5-НТР, в отличие от серотонина, может проходить через гематоэнцефалический барьер и не зависит от активности триптофангидроксилазы. В связи с этим он благоприятно влияет на уровень серотонина в ЦНС и, следовательно, на депрессивные заболевания (Liu et al., 2021).

Установлено, что исследуемые штаммы лактококков способны как к внутри-, так и внеклеточной содержанию нейромедиаторов на разных этапах роста. В связи с чем, культуры штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* центрифугировали и определяли БА 1) в супернатанте, т.е. выделяемые в среду культивации и 2) в осадке, который разрушали ультразвуком, т.е. накапливаемые внутри клеток БА. Были получены данные о выработке биогенных аминов и продуктов их метаболизма самими культурами лактококков за 9 и 24 ч культивирования (Рисунки 28 - 31). Помимо самих БА, было определено также содержание: а) их предшественников : 2,3-дигидроксифенилаланина (ДОФА) – предшественника катехоламинов, 5-гидрокситриптофана (5-НТР) – предшественника серотонина, 3-метокситирамина (3-МТ) - предшественника адреналина; б) их продуктов ферментативной дегградации – гомованилиновой кислоты (HVA), дигидроксифенилуксусной кислоты (DOPA C) ; L-диоксифенилаланина (DOPA L) – продукта гидроксилирования тирозина, а также 5-оксииндолуксусной кислоты (5-НИАА) – продукта дезаминирования серотонина.

Из полученных результатов (Рисунки 28 - 31) видно, что штаммы 194, F-116 и F-119 внутри- и внеклеточно за 9 часов культивирования повышали

концентрацию 5-НТР - предшественника серотонина, а за 24 ч культивирования – катехоламины (адреналин и дофамин).

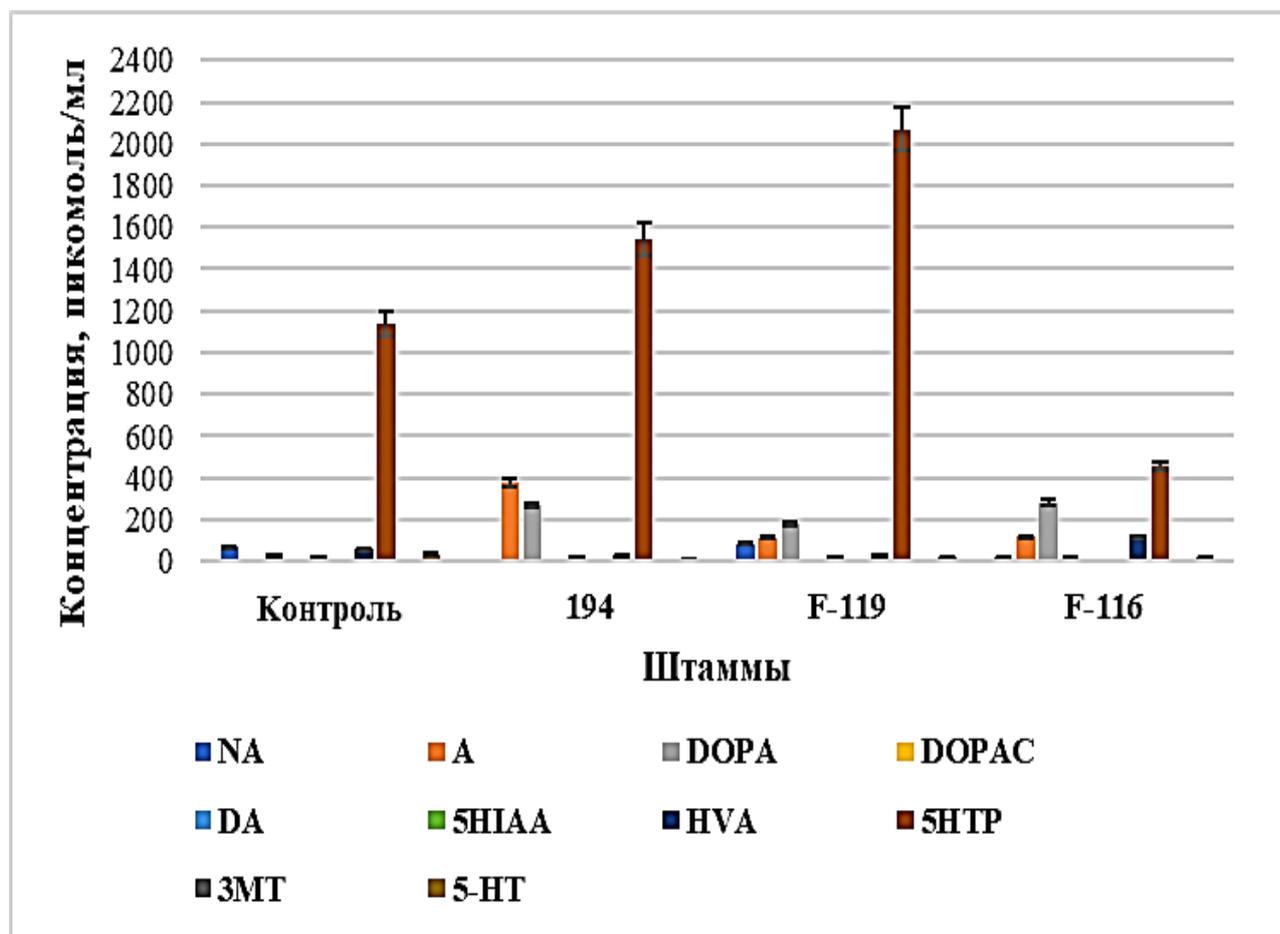


Рисунок 28. Внеклеточное содержание нейромедиаторов *L. lactis* subsp. *lactis* штаммов F-116, 194 и F-119 за 9 ч культивирования. Примечание: контроль – ферментационная (биосинтетическая) среда культивирования ($p \leq 0,05$)

За 9 ч культивирования внеклеточная концентрация: 5-НТР у штамма 194 увеличилась на 35% (от 1140,44 до 1544,33 пикомоль/мл) и у F-119 на 82%; адреналина у штамма F-119 составила 112,46 пикомоль/мл, у F-116 - 118,62 пикомоль/мл и у штамма 194 - 378,60 пикомоль/мл; 2,3 - дигидроксифенилаланина у штамма F-119 составила 181,56 пикооль/мл, у штамма 194 – 269,26 пикомоль/мл и у штамма F-116 – 281,90 пикомоль/мл (Рисунок 28).

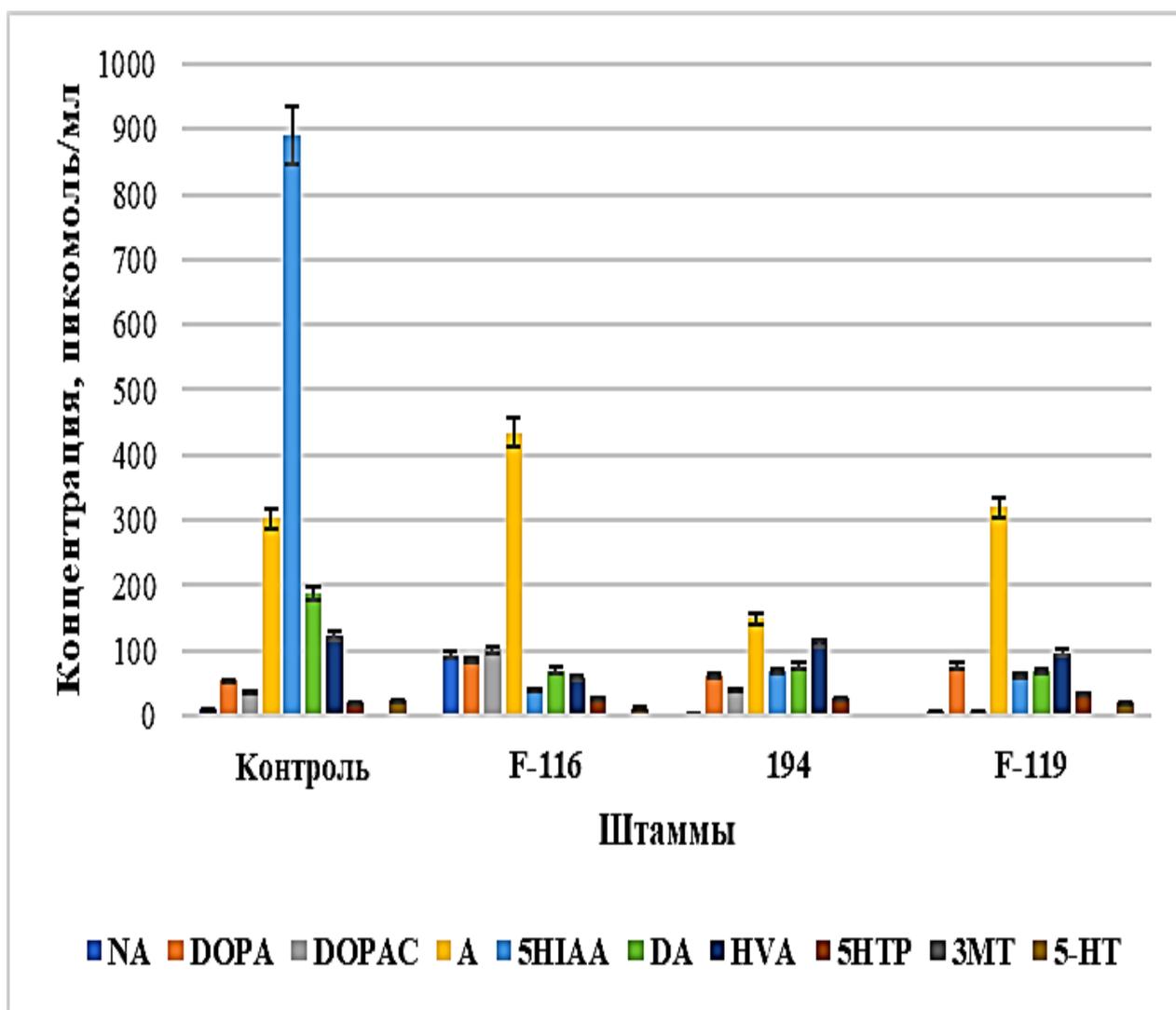


Рисунок 29. Внеклеточное содержание нейромедиаторов *L. lactis* subsp. *lactis* штаммов F-116, 194 и F-119 за 24 ч культивирования. Примечание: контроль – ферментационная (биосинтетическая) среда культивирования ($p \leq 0,05$)

За 24 ч культивирования внеклеточная концентрация адреналина у штамма F-116 увеличилась на 44% (с 302,39 до 435,07 пикомоль/мл). Повышенное содержание в контроле 5-гидрокситриптофана (1140,44 пикомоль/мл) за 9 ч и 5-оксииндолуксусной кислоты (889,63 пикомоль/мл) за 24 ч, возможно, связано с наличием в среде дрожжевого экстракта - источника свободных пептидов и аминокислот (Рисунок 29).

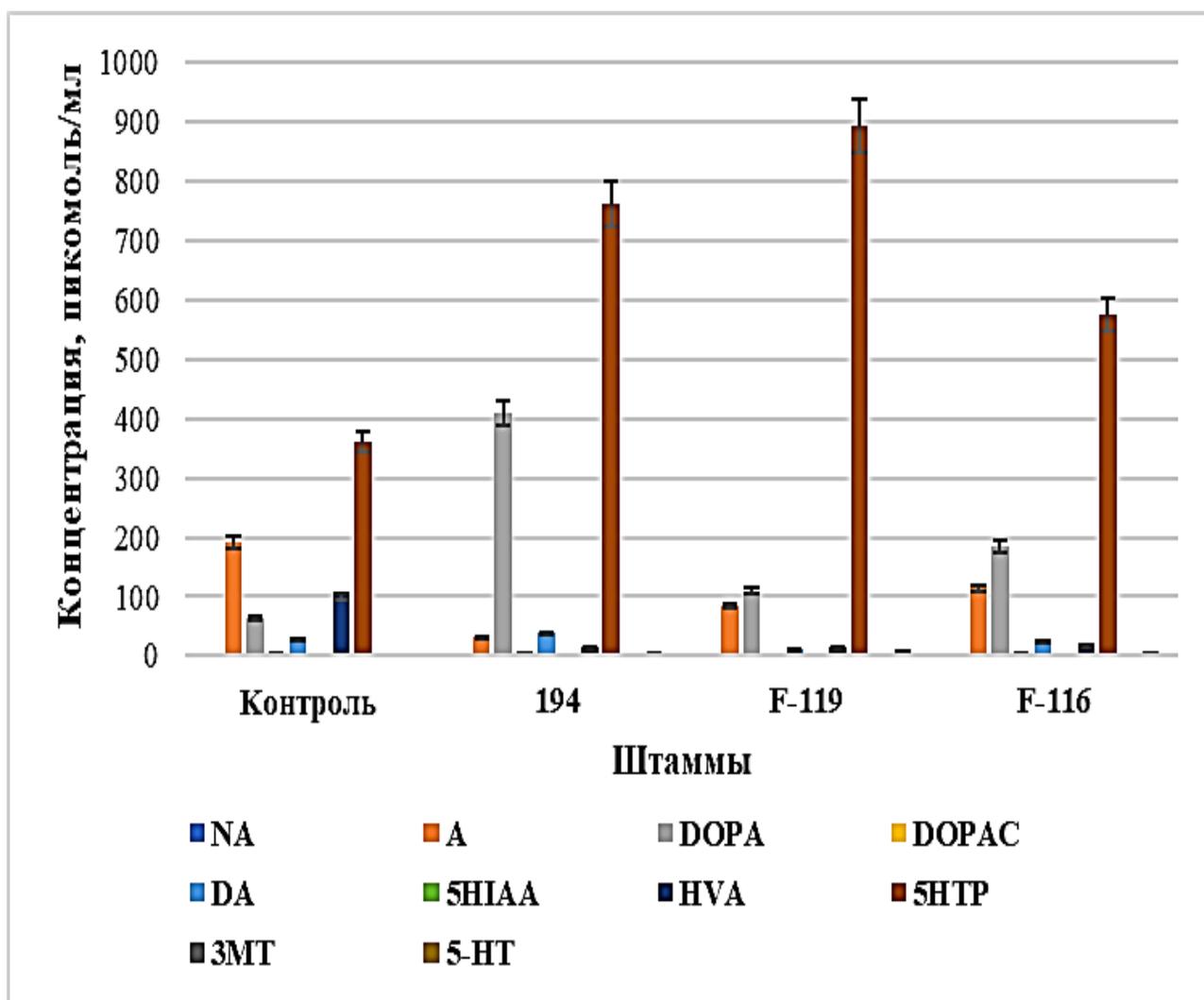


Рисунок 30. Внутриклеточное содержание нейромедиаторов *L. lactis subsp. lactis* штаммов F-116, 194 и F-119 за 9 ч культивирования. Примечание: контроль – ферментационная (биосинтетическая) среда культивирования ($p \leq 0,05$)

За 9 ч культивирования внутриклеточная концентрация: 5-гидрокситриптофана у штамма F-116 повысилась на 60% (от 360,19 до 575,16 пикомоль/мл), у 194 на 112%, у F-119 на 148%; 2,3 - дигидроксифенилаланина у штамма F-119 повысилась на 71% (от 63,83 до 109,28 пикомоль/мл), у F-116 на 190%, у штамма 194 на 542% (Рисунок 30).

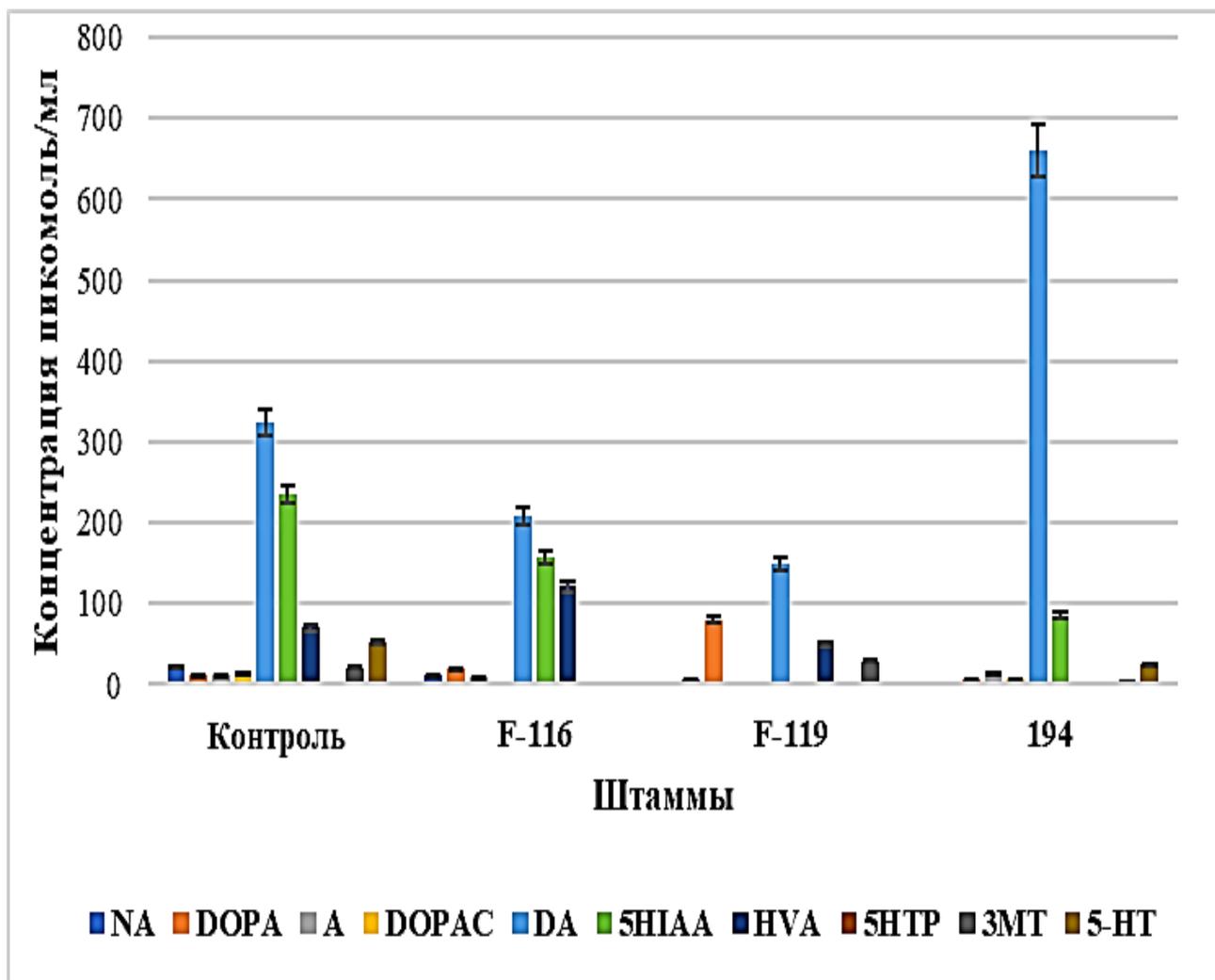


Рисунок 31. Внутриклеточное содержание нейромедиаторов *L. lactis* subsp. *lactis* штаммов F-116, 194 и F-119 за 24 ч культивирования. Примечание: контроль – ферментационная (биосинтетическая) среда культивирования ($p \leq 0,05$)

Содержание дофамина в клетках у штамма 194 повысилось на 103% (от 324,08 до 660,29 пикомоль/мл), а гомовалиновой кислоты у штамма F-116 на 73% (от 69,88 до 121,21 пикомоль/мл) за 24 ч культивирования (Рисунок 31).

Таким образом, наибольшая вне- и внутриклеточная концентрация 5-НТР была у штамма F-119 (2071,26 и 894,54 пикомоль/мл) и у штамма 194 (1544,33 и 763,96 пикомоль/мл), наименьшая у F-116 (455,69 и 575,16 пикомоль/мл). Следует отметить, что содержание внутриклеточного дофамина было больше у штамма 194 (660,29 пикомоль/мл), а внеклеточного адреналина было больше у штамма F-116 (435,07 пикомоль/мл). Наличие нейроактивных соединений в контрольных пробах,

скорее всего, связано с составом среды для культивирования лактококков, где присутствует дрожжевой экстракт (детали состава сред см. в главе «Объекты и методы исследования»).

Известно, что нарушения в содержании аминокислот и их метаболитов в организме — одна из причин возникновения различных патологических процессов (прежде всего дисфункций нервной системы) и развития ряда нервных и психических заболеваний, особенно в детском возрасте. Выдвинута гипотеза повреждающего действия дисбаланса нейромедиаторных аминокислот, метаболитов триптофана и катехоламинов на развивающийся мозг (Горина и др., 2012). Кроме того, нейромедиаторные аминокислоты и их рецепторы принимают участие в формировании фундаментальных процессов нервной деятельности: синаптической пластичности; нейрональной памяти и обучения; регуляции полимодальных сенсорных систем мозга; поддержании судорожного порога; регуляции мышечного тонуса; физиологических механизмов сна, тревоги и агрессии; чувствительности ЦНС к гипоксии и гипогликемии (McDougle et al., 1996).

Культивирование лактококков проводили в биосинтетической среде с добавлением аминокислот в концентрации 0,01 г/мл и без аминокислот. Культуральную жидкость отбирали на разных стадиях роста с интервалом 3 ч в течение суток. Ниже будет дано описание влияния 7 аминокислот, способных проходить через кровь в мозг (тирозина, триптофана, аланина, изолейцина, глутаминовой кислоты и серина), на синтез нейроактивных соединений, их предшественников и продуктов деградации (Рисунки 32 - 43).

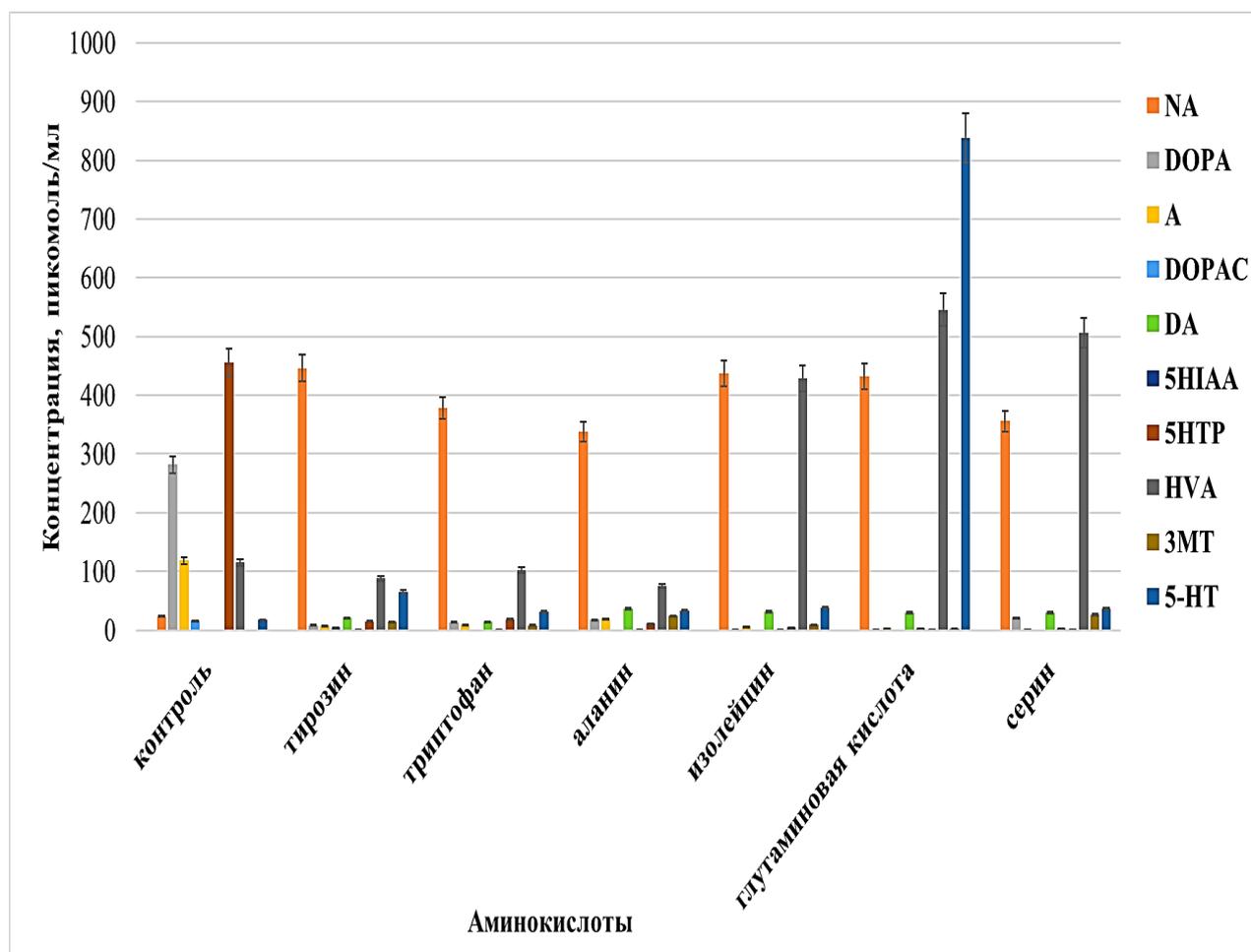


Рисунок 32. Влияние аминокислот на внеклеточную концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма F-116 за 9 ч культивирования. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

У штамма F-116 за 9 ч культивирования (Рисунок 32) внеклеточная концентрация норадреналина, увеличилась при добавлении: аланина и серина в 15 раз (от 23,29 до 338,40 пикомоль/мл), триптофана в 16 раз, глутаминовой кислоты и тирозина в 19 раз, изолейцина в 20 раз. Гомовалииновая кислота увеличилась с изолейцином и серином в 4 раза (от 115,09 до 428,85 пикомоль/мл), с глутаминовой кислотой в 5 раз. Серотонин повысился внеклеточно с глутаминовой кислотой в 48 раз (от 17,40 до 838,00 пикомоль/мл).

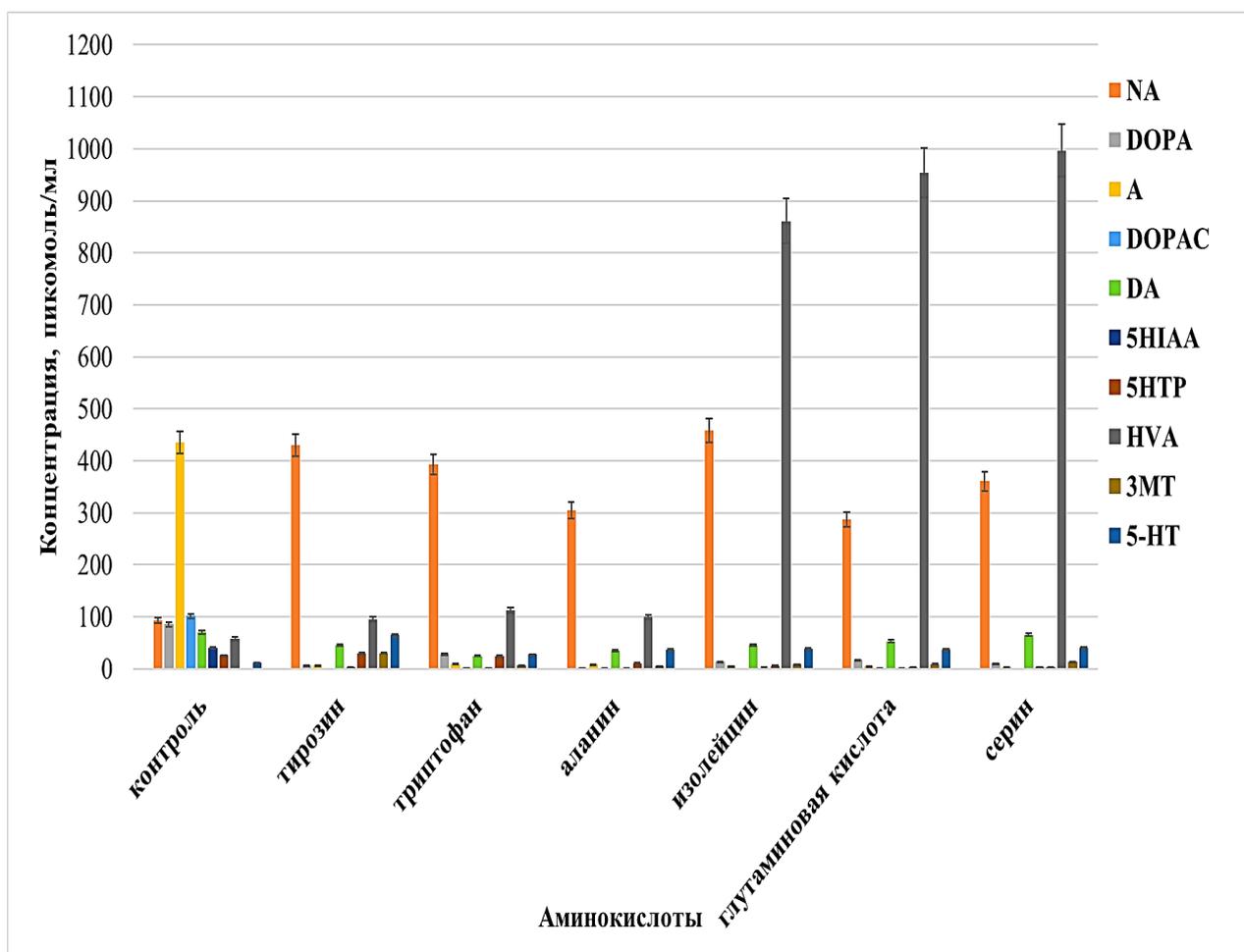


Рисунок 33. Влияние аминокислот на внеклеточную концентрация нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма F-116 за 24 ч культивирования Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

За 24 ч культивирования штамм F-116 повысил внеклеточную концентрацию норадреналина в 3 раза с глутаминовой кислотой и аланином (от 93,10 до 287,50 пикоомоль/мл), с серином и триптофаном в 4 раза, с тирозином и изолейцином в 5 раз. Гомовалииновая кислота увеличилась с изолейцином в 15 раз (от 57,79 до 861,08 пикоомоль/мл), с глутаминовой кислотой в 16 раза, с серином в 17 раз (Рисунок 33). Данные аминокислоты скорее всего послужили структурными компонентами конечного метаболита дофамина - гомовалииновой кислоты.

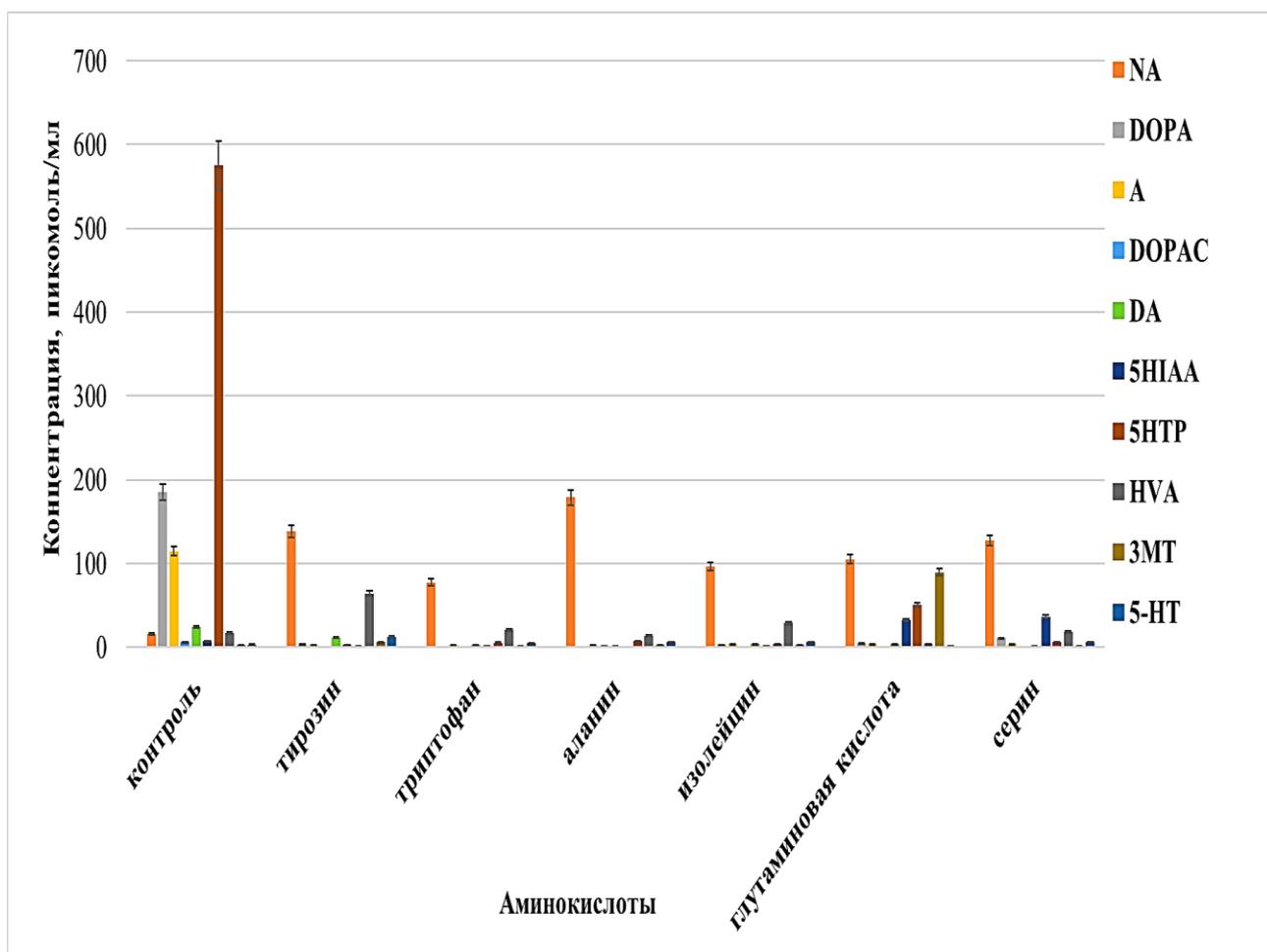


Рисунок 34. Влияние аминокислот на внутриклеточную концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма F-116 за 9 ч культивирования. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

За 9 ч штамм F-116 в клетках без добавления аминокислот образует больше предшественника серотонина – 5-гидрокситриптофана, чем в супернатанте (455,69 против 575,16 пикомоль/мл). Этот же штамм повысил синтез норадреналина с добавлением аминокислоты: триптофана в 5 раз (от 15,76 до 77,43 пикомоль/мл), изолейцина в 6 раз, глутаминовой кислоты в 7 раз, серина в 8 раз, тирозина в 9 раз и аланина в 11 раз. (Рисунок 34).

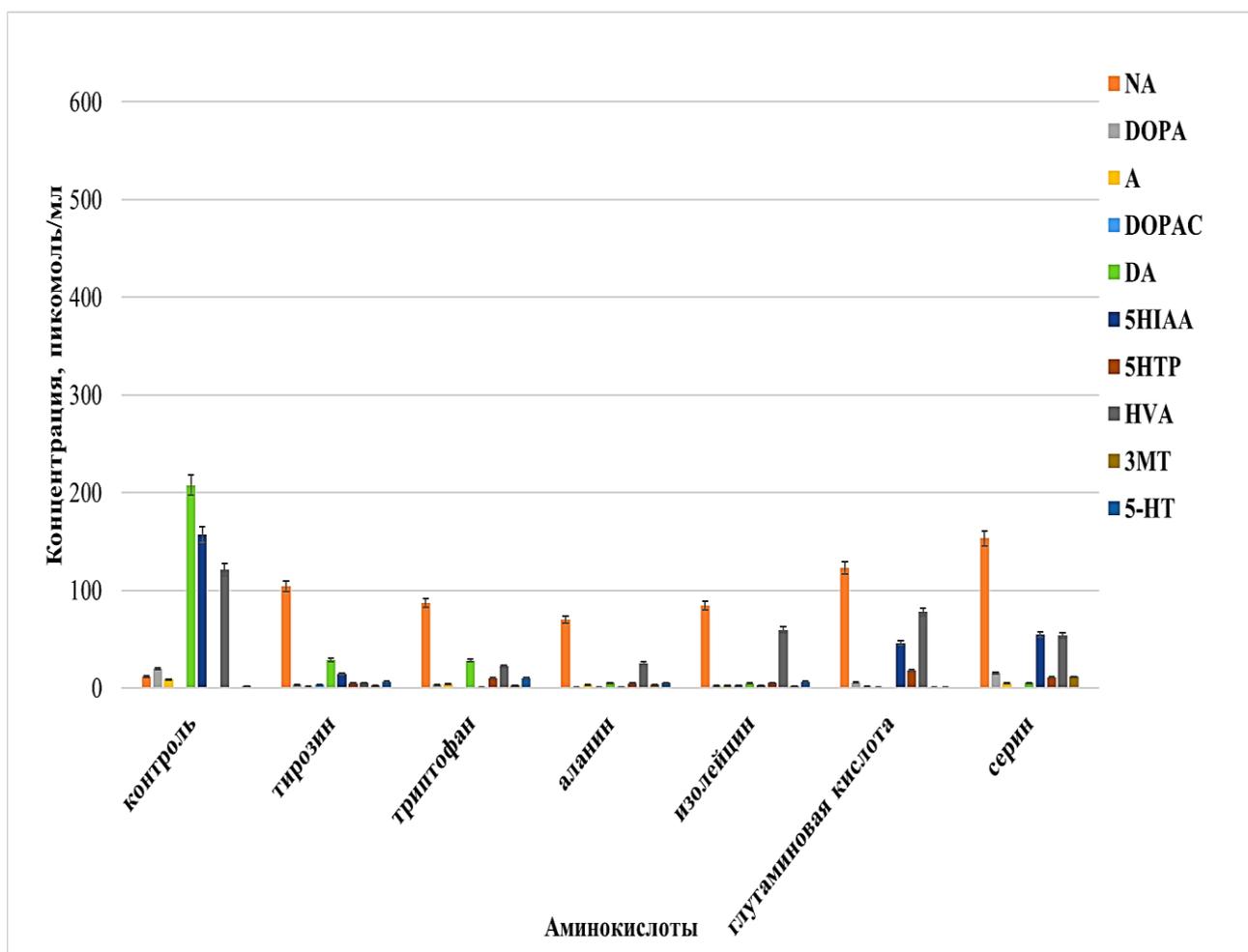


Рисунок 35. Влияние аминокислот на внутриклеточную концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма F-116 за 24 ч культивирования. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

За 24 ч штамм F-116 в клетках повысил синтез норадреналина при добавлении в среду глутаминовой кислоты в 1,3 раза (от 93,10 до 123,22 пикомоль/мл), серина в 1,6 раз (Рисунок 35). При добавлении аминокислот, повышения дофамина, как в контроле (207,43 пикомоль/мл), не наблюдалось, однако могло повлиять на наличие гомовалииновой кислоты внеклеточно за 24 ч (Рисунок 33).

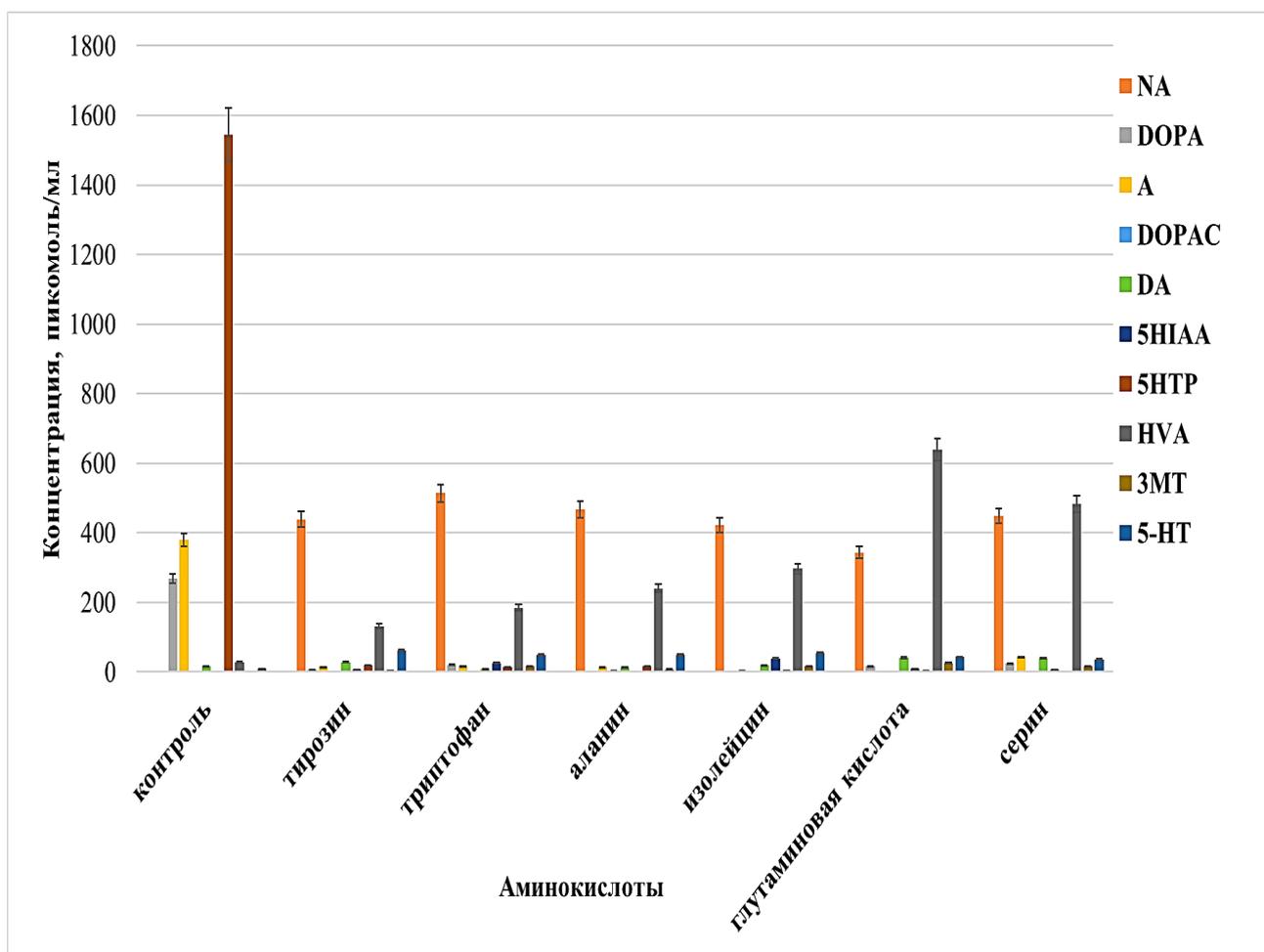


Рисунок 36. Влияние аминокислот на внеклеточную концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма 194 за 9 ч культивирования
Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

У штамма 194 за 9 ч культивирования наблюдалось внеклеточное увеличение концентрации норадреналина с добавлением аминокислот (норадреналина в контроле обнаружено не было). Так, с глутаминовой кислотой концентрация составила 343,16 пикомоль/мл, с изолейцином - 420,98 пикомоль/мл, тирозином - 438,31 пикомоль/мл, серином - 448,18 пикомоль/мл, аланином - 466,76 пикомоль/мл, триптофаном - 513,44 пикомоль/мл. Гомовалииновая кислота повысилась с добавлением: тирозина в 5 раз (24,74 до 131,10 пикомоль/мл), триптофана в 7 раз, аланина в 9 раз, изолейцина в 11 раз, серина в 17 раз, глутаминовой кислоты в 23 раза (Рисунок 36).

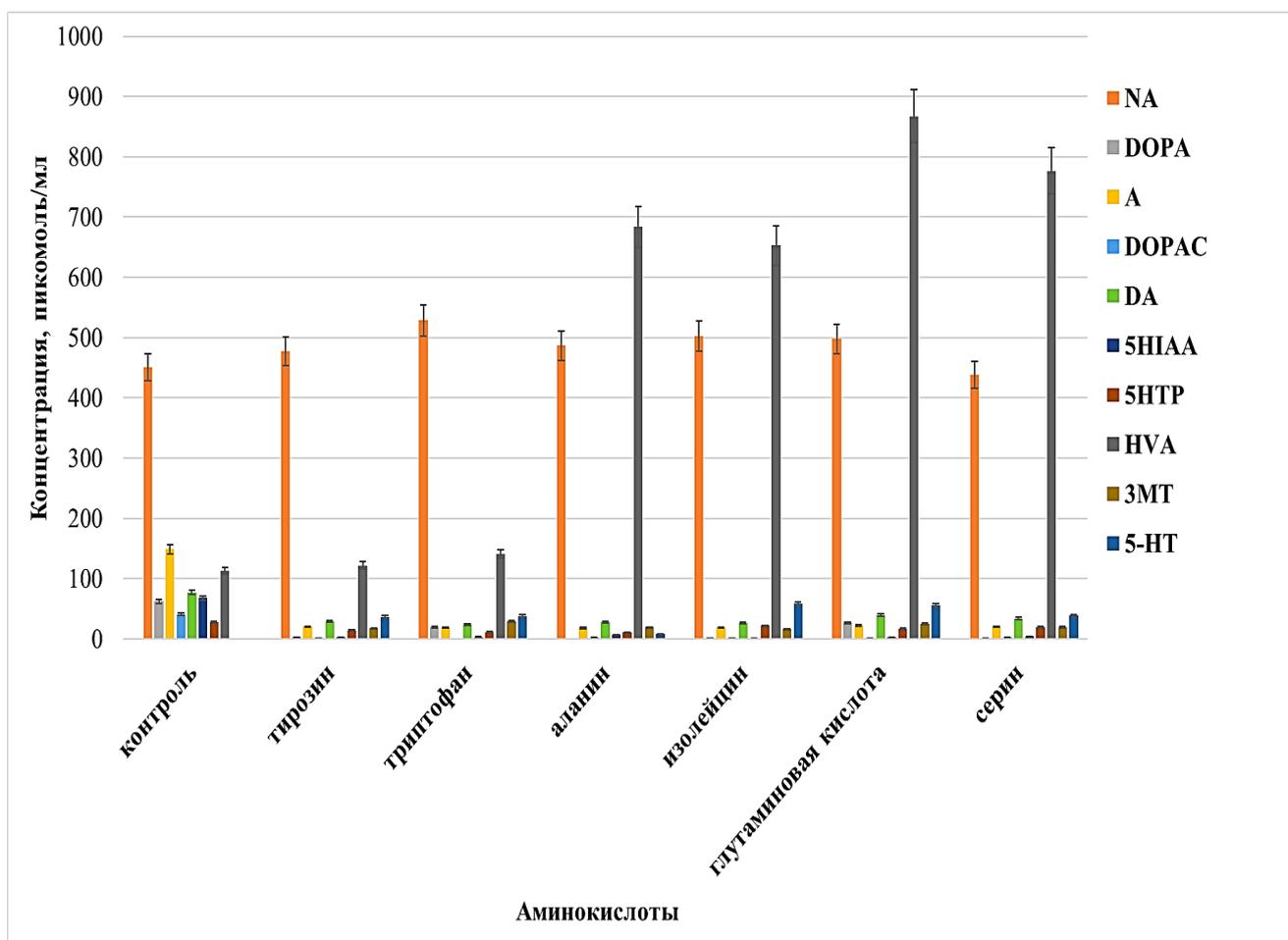


Рисунок 37. Влияние аминокислот на внеклеточную концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма 194 за 24 ч культивирования. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

За 24 ч культивирования этот же штамм повысил внеклеточную концентрацию гомовалиновой кислоты с добавлением: изолейцина и аланина в 6 раз (от 112,33 до 652,60), серина и глутаминовой кислоты в 7 раз. (Рисунок 37). Эти результаты демонстрируют схожую картину с данными по внеклеточному содержанию нейроактивных соединений у штамма F-116 за 24 ч культивирования (Рисунок 33).

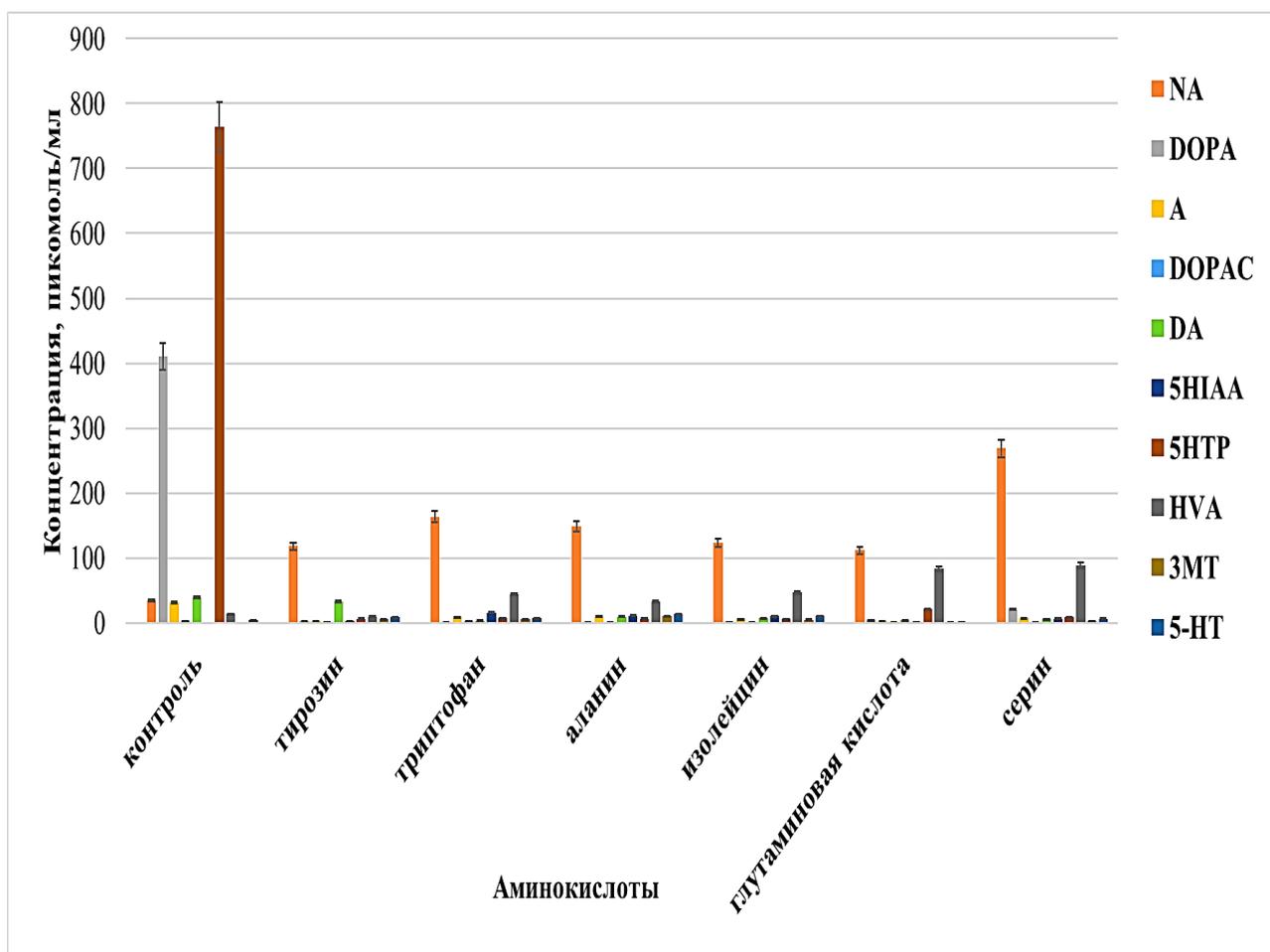


Рисунок 38. Влияние аминокислот на внутриклеточную концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма 194 за 9 ч культивирования. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

За 9 ч культивирования штамм 194 в клетках повысил синтез норадреналина при добавлении: глутаминовой кислоты в 3,2 раза (от 34,63 до 111,46 пикомоль/мл), тирозина в 3,4 раза, изолейцина в 3,5 раза, аланина в 4,2 раза, триптофана в 5 раз и серина в 7,7 раз (Рисунок 38), однако в клетках штамм образует меньше 5-гидрокситриптофана, чем в супернатанте - 763,93 против 1544,33 пикомоль/мл (Рисунок 36).

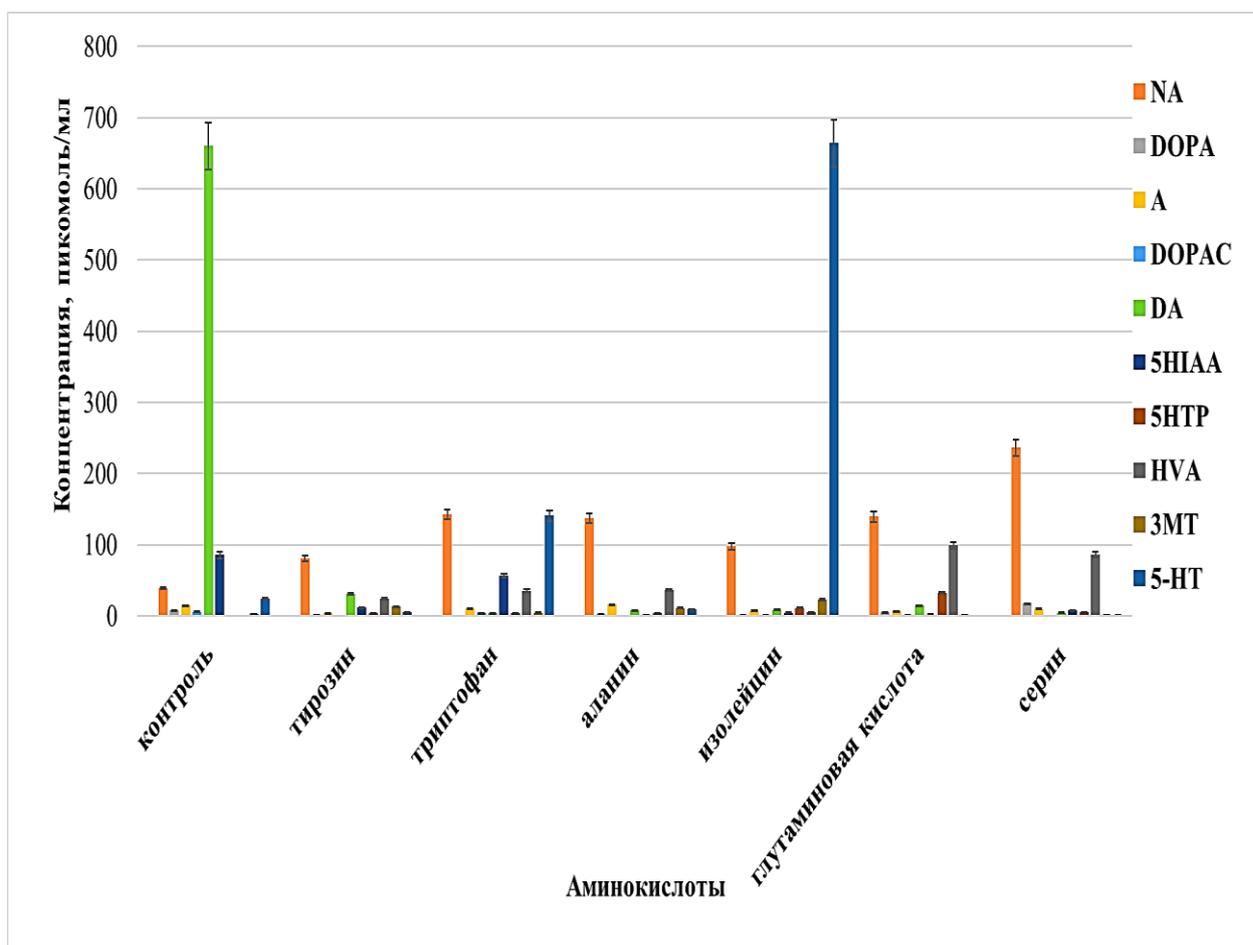


Рисунок 39. Влияние аминокислот на внутриклеточную концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма 194 за 24 ч культивирования. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

За 24 ч этот же штамм повысил синтез серотонина с триптофаном в 6 раз (от 24,49 до 140,70 пикомоль/мл), с изолейцином в 27 раз. Наличие дофамина, как в контроле, в пробах с аминокислотами, не было обнаружено (Рисунок 39).

Штамм 194 внутриклеточно синтезирует дофамина больше, чем внеклеточно. Внутриклеточное содержание в контрольной пробе дофамина (660,29 пикомоль/мл) объясняет повышение внеклеточной концентрации его конечного метаболита - гомовалиновой за 24 ч культивирования (Рисунки 39 и 37).

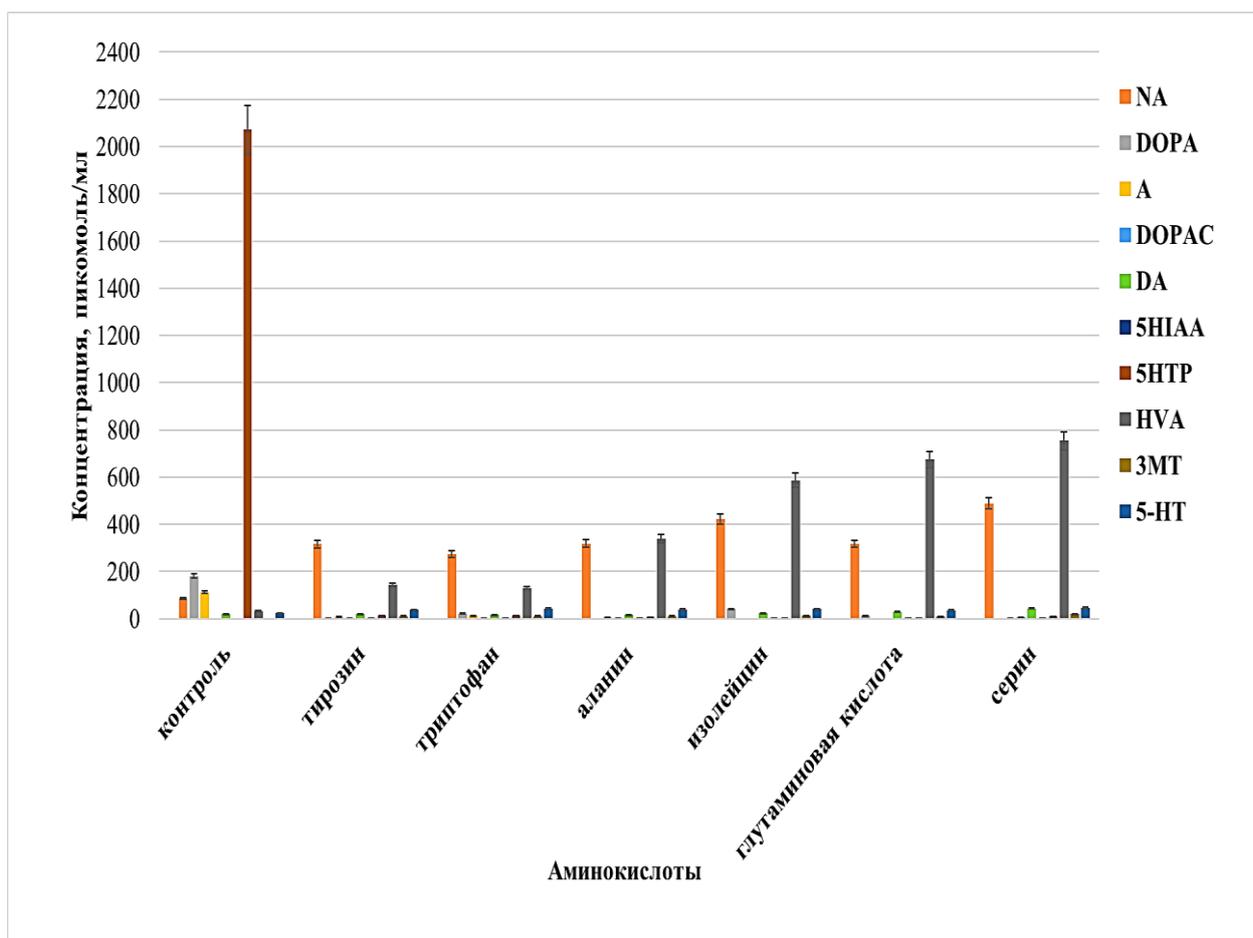


Рисунок 40. Влияние аминокислот на внеклеточную концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма F-119 за 9 ч культивирования. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

Штамм F-119 за 9 ч культивирования внеклеточно увеличил концентрацию норадреналина при добавлении в среду: триптофана в 3 раза (от 84,61 до 275,04 пикоомоль/мл), тирозина, глутаминовой кислоты и аланина в 4 раза, изолейцина в 5 раз, серина в 6 раз. Гомовалиновая кислота повысилась при добавлении: триптофана и тирозина в 4 раза (от 32,31 до 130,86 пикоомоль/мл), аланина в 11 раз, изолейцина в 18 раз, глутаминовой кислоты в 21 раз, серина в 23 раза (Рисунок 40).

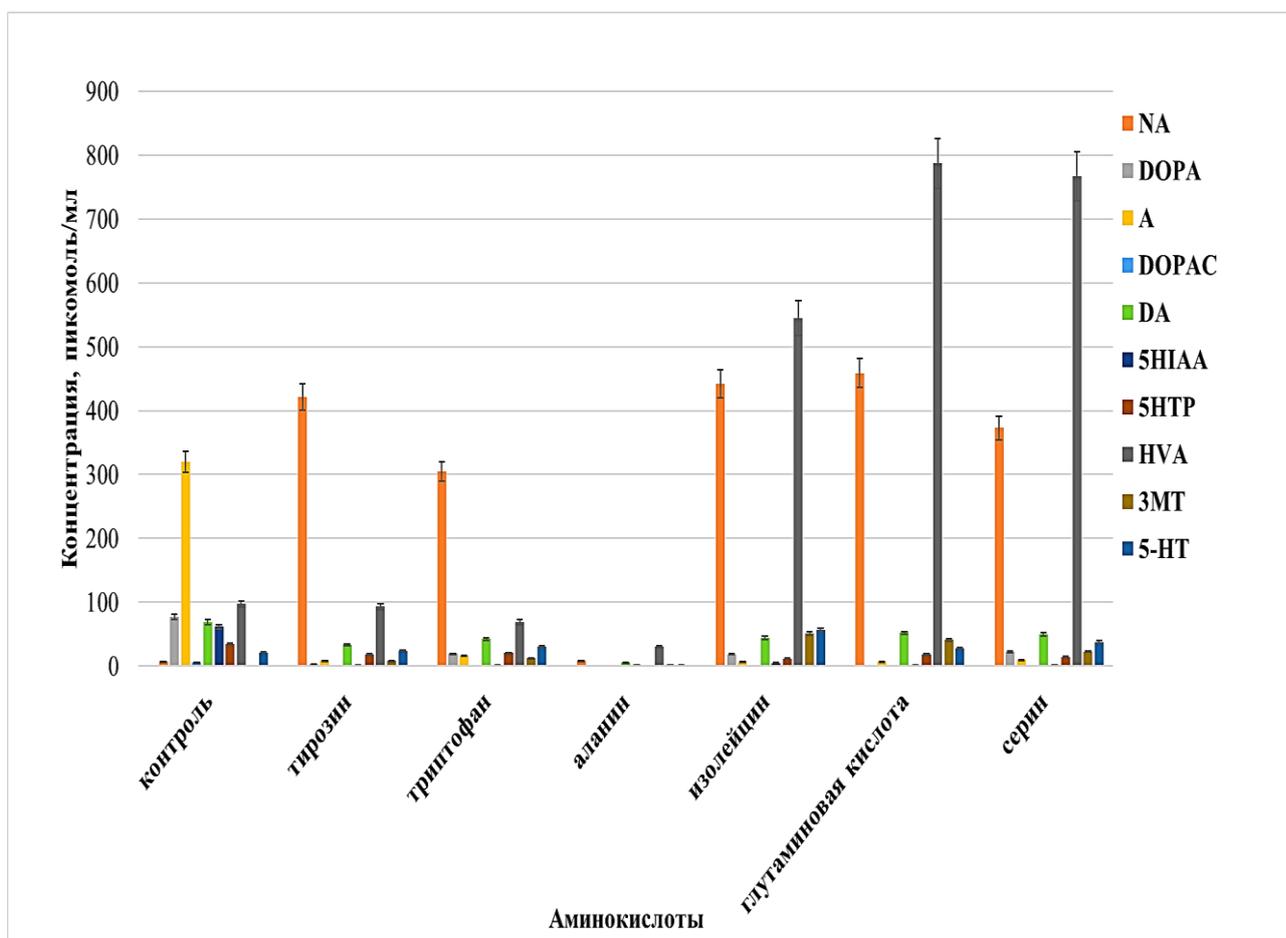


Рисунок 41. Влияние аминокислот на внеклеточную концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма F-119 за 24 ч культивирования. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

За 24 ч F-119 повысил внеклеточную концентрацию норадреналина с добавлением в среду: триптофана в 45 раз (от 6,84 до 304,55 пикомоль/мл), серина в 55 раз, тирозина в 62 раза, изолейцина в 65 раз и глутаминовой кислоты в 67 раз. Как и в случае со штаммами 194 и F-116 (Рисунки 33 и 37) гомовалиновая кислота у F-119 повысилась при добавлении: изолейцина в 6 раз (от 97,63 до 544,95 пикомоль/мл), серина и глутаминовой кислоты в 8 раз (Рисунок 41).

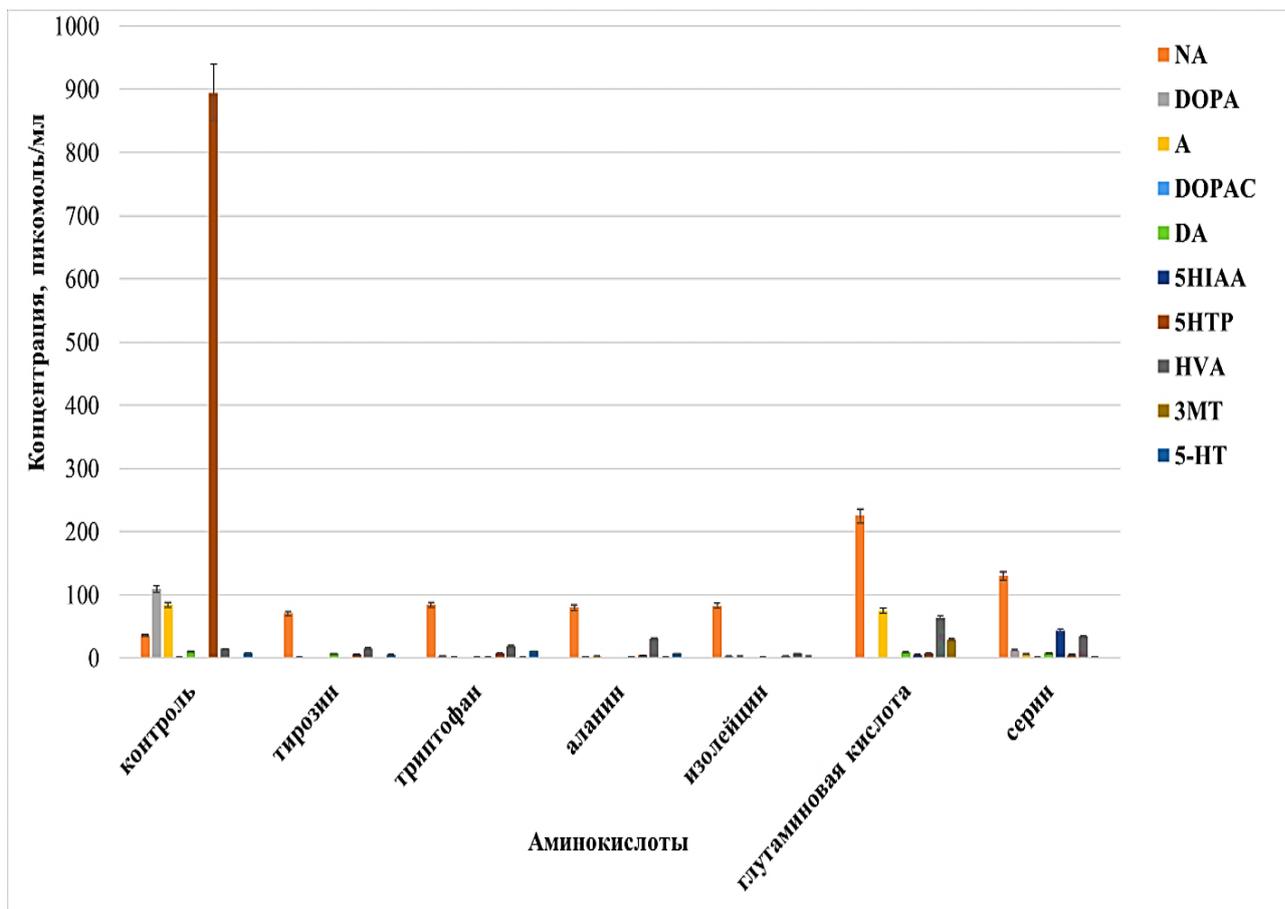


Рисунок 42. Влияние аминокислот на внутриклеточную концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма F-119 за 9 ч культивирования. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

Как и со штаммом 194, на Рисунке 42 видно, что за 9 ч культивирования штамм F-119 внутриклеточно без добавления аминокислот образует меньше 5-гидрокситриптофана, чем внеклеточно (от 894,54 до 2071,26 пикомоль/мл).

За 24 ч тот же штамм повысил внутриклеточный синтез норадреналина при добавлении: глутаминовой кислоты в 17 раз (от 6,68 до 110,47 пикомоль/мл), аланина в 18 раз, изолейцина в 20 раз, и триптофана в 21 раз, серина в 22 раза и тирозина в 27 раз (Рисунок 43). Стоит заметить, что F-119 за 24 ч культивирования, как и штаммы 194 и F-116 (Рисунки 35 и 39) демонстрирует повышенную внутриклеточную концентрацию дофамина (149,63 пикомоль/мл).

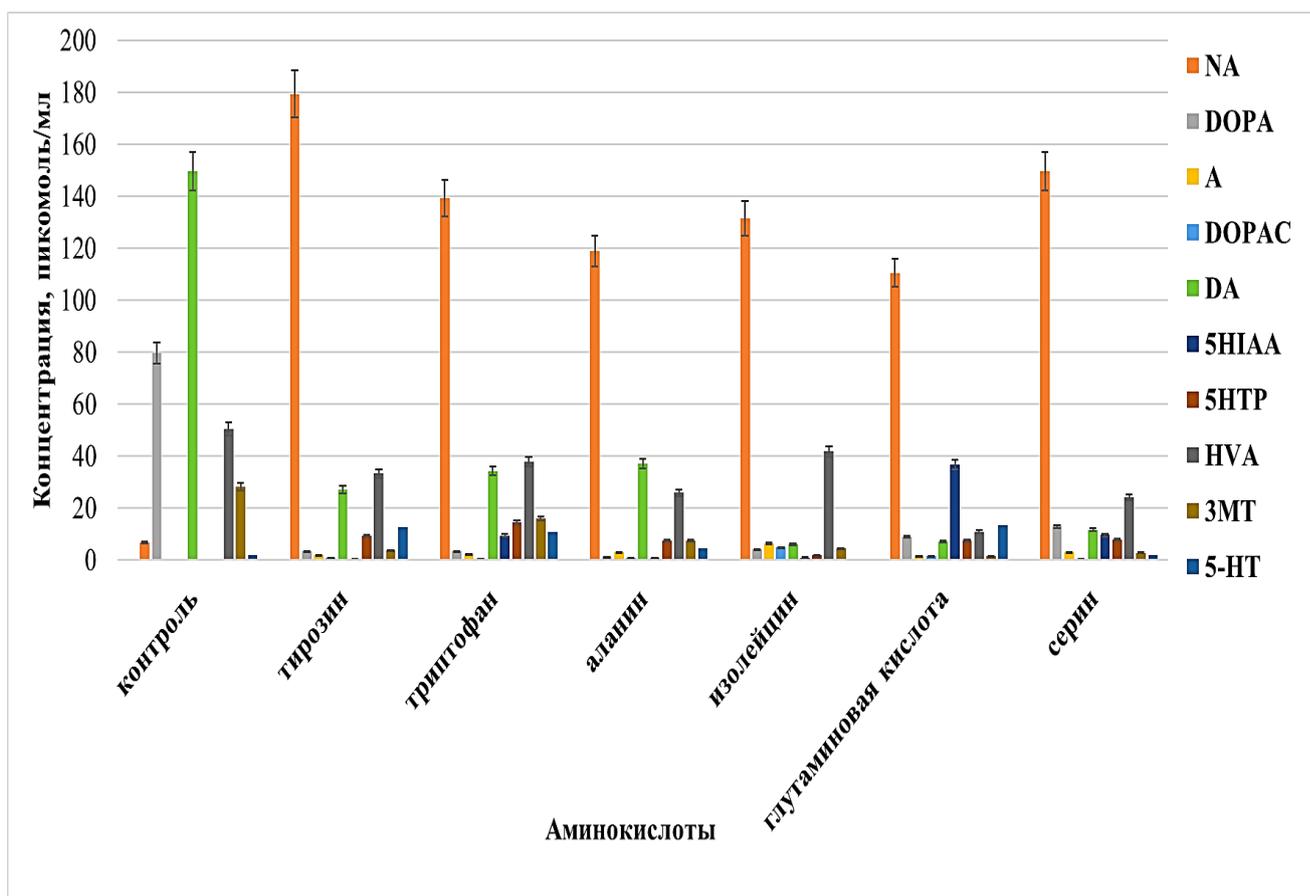


Рисунок 43. Влияние аминокислот на внутриклеточную концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма F-119 за 24 ч культивирования. Примечание: контроль – штамм без добавления аминокислот ($p \leq 0,05$)

Суммируя полученные результаты, следует отметить, что лактококки способны в биосинтетической среде без добавления аминокислот внутриклеточно синтезировать предшественник серотонина - 5-НТР. Но следует учесть, что аминокислоты попадают из крови в мозг с помощью транспортных систем. Изменение уровня аминокислот в крови способно нарушить баланс аминокислот, конкурирующих за одну и ту же транспортную систему (Горина и др., 2010). Так, серин и аланин тормозят поглощение глицина, но не ингибируют поглощение фенилаланина, гистидина, лизина и глутаминовой кислоты, что свидетельствует о наличии различных транспортных систем для разных типов аминокислот (Battaglia, Regnault, 2001). Вероятнее всего, они могут создавать конкуренцию 5-НТР при прохождении через гематоэнцефалический барьер.

Суточные культуры исследуемых штаммов при добавлении в среду аминокислот как предшественников нейромедиаторов в разной степени (как вне-, так и в клетке) образуют гомовалиновую кислоту, серотонин и норадреналин. У штамма F-116 серин и глутаминовая кислота стимулировали образование гомовалиновой кислоты (996,93 пикомоль/мл) и серотонина (838,00 пикомоль/мл) соответственно. У штамма 194 триптофан наиболее эффективно стимулировал образование норадреналина (528,15 пикомоль/мл). Вероятно, это связано с тем, что данные аминокислоты способны встраиваться в синтез нейроактивных соединений как их предшественники. Стоит отметить, что влияние глутаминовой кислоты на внеклеточную концентрацию серотонина у штамма F-116 можно объяснить тем, что данная аминокислота является предшественником другой аминокислоты - глутамина, которая в свою очередь участвует в создании фолиевой и нуклеиновых кислот, служит посредником нейромедиаторных и гормональных сигналов и способствует повышению проницаемости клеточных мембран для ионов калия, а также активно соучаствует в процессе производства «гормона счастья» – серотонина и ГАМК. Увеличение серотонина у штамма 194 в клетках с добавлением изолейцина, связано с тем, что помимо таких свойств, как: синтез гемоглобина, регуляция и стабилизации содержания сахара в крови, участие в процессах энергоснабжения, данная аминокислота может принимать активное участие в регуляции синтеза серотонина (Кузьмин и др., 2022).

3.3. Изучение состава короткоцепочечных и молочной кислот, синтезируемых лактококками

При ферментации некоторых углеводов МКБ помимо таких продуктов, как молочная кислота, образуются короткоцепочечные жирные кислоты. Летучие жирные кислоты (КЦЖК) являются важнейшими регуляторами углеводного, липидного и энергетического метаболизма в желудочно-кишечном тракте, печени и в других тканях (Олескин, 2013). Молочная кислота улучшает всасывание кальция

и витамина D, железа, снижает pH, подавляя рост патогенных микроорганизмов (Коваленко, Шабельникова, 2015).

С помощью газожидкостной хроматографии были исследованы культуральные жидкости молочнокислых бактерий на наличие уксусной (CH_3COOH), пропионовой (C_2H_5COOH), изомасляной ($(CH_3)_2COOH$), масляной ($CH_3(CH_2)_2COOH$), изовалериановой ($(CH_3)_2CHCH_2COOH$), валериановой (C_4H_9COOH), изокапроновой ($(CH_3)_2CH(CH_2)_2COOH$), капроновой ($C_5H_{11}COOH$) и каприловой ($C_7H_{15}COOH$) кислот на разных стадиях роста.

Как показали результаты, штаммы лактококков в разной степени накапливали КЦЖК в культуральной жидкости (Таблица 2). Лучшие показатели по уксусной кислоте были у штамма F-116 – 4,930 ммоль/л, у штамма 194 концентрация составила 3,910 ммоль/л, а у F-119 – 1,864 ммоль/л, что соответствует 5 ч культивирования. Наличие уксусной кислоты в культуральной жидкости гомоферментативных МКБ можно объяснить процессом перехода молочной кислоты в уксусный альдегид с дальнейшим окислением до уксусной кислоты при условии нагревания и подкисления (Романцова и др., 2008). Подкисление создает сама молочная кислота, имеющаяся в культуральной жидкости, а процесс нагревания необходим при использовании данного метода. Максимальная концентрация пропионовой кислоты была у штамма 194 (0,349 ммоль/л) в фазе затухания, у F-116 и F-119 составила 0,069 ммоль/л в экспоненциальной фазе роста. Так известно, что уксусная кислота является энергетическим субстратом для мышц, почек, сердца и мозга, а пропионовая кислота - регулятором метаболических процессов и липидного обмена в печени (Salminen et al., 1998). Количество изомасляной, масляной, изовалериановой кислот в культуральной жидкости всех штаммов лактококков увеличивалось в экспоненциальной фазе роста, а длинноцепочечных жирных кислот ($C_5 - C_7$) уменьшалось. У штамма 194 максимальная концентрация масляной кислоты составила 0,085 ммоль/л и изомасляной кислоты 0,119 ммоль/л за 5 и 9 ч культивирования. Изовалериановая кислота была повышена у штамма F-116 (0,116 ммоль/л) за 5 часов культивирования

Таблица 2.

Короткоцепочечные жирные кислоты, образуемые *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* в динамике роста в биосинтетической среде ($p \leq 0,05$)

Штамм	Время, ч	C2	C3	C4.	C4	C5.	C5	C6.	C6	C7
		Концентрация, ммоль/л								
194	5	3,910 ± 0,01	0,277 ± 0,02	0,095 ± 0,01	0,085 ± 0,01	0,072 ± 0,02	0	0	0	0
	9	3,311 ± 0,01	0,312 ± 0,01	0,119 ± 0,01	0,082 ± 0,01	0,085 ± 0,03	0	0,037 ± 0,01	0	0
	17	3,430 ± 0,01	0,349 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,080 ± 0,02	0,077 ± 0,01	0,003 ± 0,01	0,030 ± 0,01	0	0
F-116	5	4,930 ± 0,01	0,061 ± 0,03	0,020 ± 0,02	0,052 ± 0,01	0,116 ± 0,02	0,004 ± 0,01	0,023 ± 0,01	0,015 ± 0,01	0
	9	4,665 ± 0,01	0,058 ± 0,02	0,020 ± 0,03	0,048 ± 0,02	0,112 ± 0,01	0	0,024 ± 0,01	0,007 ± 0,01	0
	17	4,776 ± 0,01	0,069 ± 0,02	0,019 ± 0,02	0,049 ± 0,01	0,100 ± 0,03	0	0,024 ± 0,01	0,002 ± 0,01	0

F-119	5	1,864 ± 0,03	0,049 ± 0,01	0,02 4± 0,02	0,054 ± 0,03	0,061 ± 0,01	0	0,019 ± 0,02	0,007 ± 0,01	0
	9	1,849 ± 0,01	0,044 ± 0,01	0,02 5± 0,01	0,051 ± 0,01	0,057 ± 0,02	0	0,023 ± 0,01	0	0
	17	1,690 ± 0,02	0,069 ± 0,03	0,02 0± 0,01	0,045 ±0,0 1	0,050 ± 0,01	0	0,014 ± 0,01	0	0

Примечание: С2 - уксусная кислота, С3 - пропионовая кислота, С4. - изомасляная кислота, С4 - масляная кислота, С5. - изовалериановая кислота, С5 - валериановая кислота, С6. - изокапроновая кислота, С6 - капроновая кислота, С7 - каприловая кислота

Ранее доказано (Li et al., 2012, что масляная кислота участвует в регуляции водно-электролитного баланса и моторики толстой кишки, играет ведущую роль в обеспечении кишечного гомеостаза за счет прямого влияния на широкий спектр клеточных функций колоноцитов, является регулятором апоптоза, стимулирует процессы физиологической пролиферации нормальных колоноцитов и тормозит рост опухолевых клеток в толстой кишке (Ардатская, Дубынин, 2001). Также пропионовая, масляная и валериановая кислоты участвуют в синтезе нейромедиаторов (Dalile et al., 2019). В следовых количествах капроновая кислота обнаружена в лаг-фазе роста *L. lactis* subsp. *lactis* у штаммов F-116 и F-119. Известно, что капроновая кислота и более длинные жирные кислоты наиболее эффективны в качестве антимикробных соединений (Sjögren et al., 2003).

В результате эксперимента по определению молочной кислоты было выявлено, что наибольшее количество молочной кислоты в культуральной жидкости было у штамма *L. lactis* subsp. *lactis* 194 - 14,467 ммоль/л, у штаммов F-116 и F-119 концентрация составила 8,089 и 8,244 ммоль/л (Таблица 3).

Таблица 3.

Количество молочной кислоты, образуемое молочнокислыми бактериями (p≤0,05)

Микроорганизмы	Количество молочной кислоты, ммоль/л
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> штамм 194	14,467± 0,03
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> штамм F-116	8,089± 0,02
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> штамм F-119	8,244± 0,02

Молочная кислота – один из основных конечных метаболитов, образуемых МКБ, в процессе брожения. Лактококки - гомоферментативные молочнокислые бактерии, в процессе брожения они выделяют до 98% молочной кислоты. Микроорганизмы по-разному реагируют на кислотность среды обитания. Известно, что молочная кислота обладает широким спектром антимикробного действия. Например, при pH ниже 5,0 молочная кислота ингибирует рост спорообразующих бактерий, не влияя на развитие микроскопических грибов и дрожжей (Стойнова и др., 2012).

3.4. Определение адгезионной способности штаммов *L. lactis* subsp. *lactis*

Несмотря на все барьерные функции, присутствующие в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта человека, все еще остается проблемой инвазия многими кишечными патогенами, включая бактерии и вирусы. ЖКТ

содержит большое разнообразие микробных популяций, распределение которых различается в некоторых частях системы (Montalto et al., 2009). В частности, микроорганизмы в кишечнике взаимодействуют с хозяином, способствуя развитию иммунитета слизистых оболочек, а также выполняют различные другие функции, такие как предотвращение колонизации патогенными микроорганизмами и конкуренция с патогенами за пищу. Когда количество кишечных патогенов в желудочно-кишечном тракте увеличивается до определенного уровня, они могут вызвать инфекцию (Sekirov et al., 2010). Пробиотические микроорганизмы могут исключать патогены, когда они имеют более высокое сродство к рецепторным участкам или когда они находятся в более высоких концентрациях (McLoughlin et al., 2016).

Известно, что одним из условий выбора пробиотических культур является то, что микроорганизмы должны обладать колонизационным потенциалом, то есть сохраняться в пищеварительном тракте до достижения максимального положительного действия (быть устойчивыми к низким значениям pH, желчным кислотам, антимикробным веществам, хорошо адгезироваться к эпителию соответствующих слизистых оболочек). В связи этим была изучена способность к адгезии пробиотических штаммов *L. lactis* subsp *lactis*. Показано, что все тестируемые штаммы *L. lactis* после 24 ч культивирования в бескислородной среде достигали плотности культуры $\sim 10^8$ КОЕ/мл. Штаммы на полипропиленовой поверхности купонов формировали биопленки, значения КОЕ в которых составляли $\sim 10^2 - 10^3$ КОЕ/мм² (Таблица 4, Рисунок 44). Наибольшая плотность биопленки была зафиксирована у штамма *L. lactis* 194 ($7,17 \times 10^3$ КОЕ/мм²), наименьшая – у штамма *L. lactis* F-119 ($1,24 \times 10^2$ КОЕ/мм²) (Рисунок 45).

Адгезионная способность штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 729, F-116, 1605, 194С, 194, F-119, К-205 ($p \leq 0,05$)

Штамм	Концентрации КОЕ/мл		Плотность КОЕ/мл в биопленке	
	Среднее, КОЕ/мл	Отклонение	Среднее, КОЕ/мл	Отклонение
<i>L. lactis</i> F-119	5,25E+08	2,06E+08	1,24E+02	3,33E+02
<i>L. lactis</i> F-116	5,90E+08	1,41E+07	3,88E+02	2,08E+02
<i>L. lactis</i> 194	2,65E+08	1,77E+08	7,17E+03	2,12E+02

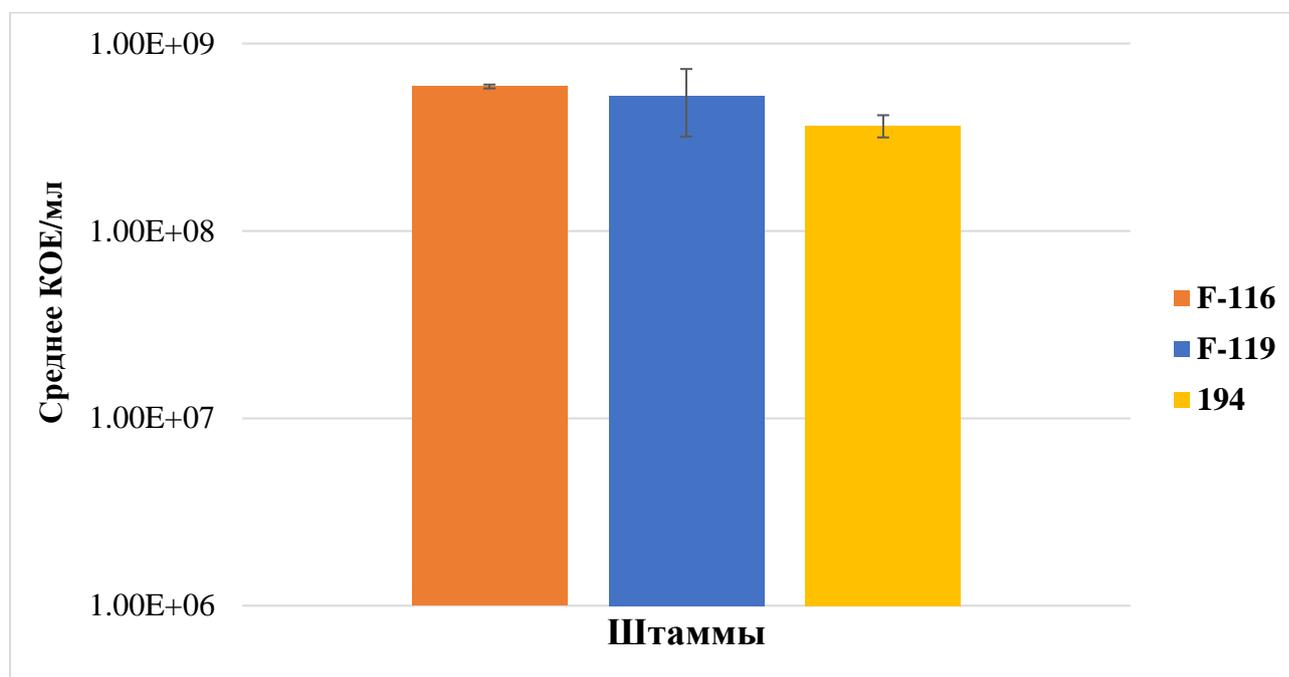


Рисунок 44. Количество КОЕ в культуре штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116, 194, F-119 ($p \leq 0,05$)

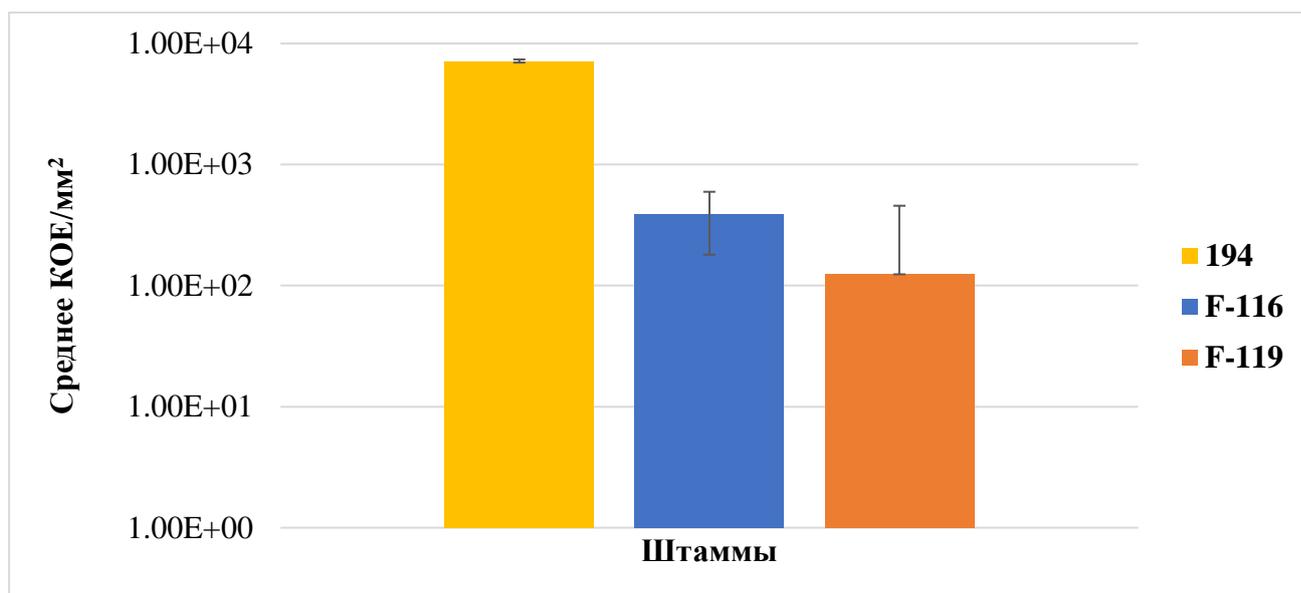


Рисунок 45. Количество КОЕ в биопленке штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116, 194, F-119 ($p \leq 0,05$)

Полученные результаты позволяют использовать штаммы лактококков в исследованиях клинических и госпитальных инфекций на начальном этапе — адгезии (Collado et al., 2007), где существенным фактором становится конкуренция молочнокислых бактерий с патогенами за прикрепление к слизистой оболочке кишечника.

На основании полученных результатов (антимикробная активность, синтез нейромедиаторов и КЦЖК, адгезионные свойства) было решено выделить штамм 194 *L. lactis* subsp. *lactis* для дальнейших исследований по созданию полифункциональной пищевой добавки на основе пробиотической культуры лактококков.

3.5. Оценка биотоксичности и жизнеспособности *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма 194 и его метаболитов

Одним из важных этапов в создании пробиотиков на основе лактококков является выбор подходящего носителя, свойства которого определяют степень защиты микроорганизмов от воздействия биологических жидкостей, способность

к высвобождению непосредственно в ЖКТ, а также сохранение свойств при транспортировке и длительном хранении (Brachkova et al., 2009). Основными требованиями, предъявляемыми к сорбентам, используемым в условиях производства лекарственных форм, являются высокая биологическая стойкость, сорбционная емкость, достаточная проницаемость для субстратов, пористость, отсутствие токсичности, доступность и экономичность. Отсутствие токсичности и подбор эффективных концентраций является необходимым технологическим свойством для носителей и одним из основных критериев при определении пригодности его для конструирования препарата. Поэтому на первом этапе проводили биотестирование как самого штамма, так и различных сред лиофилизации и криопротектора при помощи биотеста «Эколюм-08».

На основании полученных ранее данных, был выделен штамм 194, который оценили на биотоксичность. При экспресс исследовании наблюдалась стимуляция свечения клеток биотеста относительно контроля (индекс токсичности с отрицательным знаком для штамма 194 $T = -8$), что подтверждает безопасность использования исследуемых бактерий и продуктов их жизнедеятельности. По характеру стимуляции свечения биотеста с возрастанием времени биотестирования (5, 15, 30 мин) индекс токсичности практически не менялся. Так же провели оценку биологической активности сред для лиофилизации по интенсивности свечения биотеста «Эколюм-08» за 30 минут. В качестве криопротекторов использовались: физраствор, обезжиренное молоко, 10% сахара+5% желатин и бентонит в концентрациях от 1 до 10%. (Таблица 5). Концентрации криопротектора-бентонита 1%, 5% и 10% были ранее предложены производителем (Bento Health Ltd. София, Болгария). Индекс токсичности бентонита при концентрациях 1 и 5 % был с отрицательным знаком, наблюдалась стимуляция люминесцентной системы биотеста, а концентрация 10% давала небольшую токсичность в пределах нормы. Следовательно, разные концентрации бентонита стимулировали свечение биотеста, указывая на отсутствие токсического действия. Биотестирование на основе бактериальной люминесценции расширило возможности мониторинга,

позволило показать отсутствие токсичности как изученных штаммов и их метаболитов, а также защитных сред при длительном хранении микроорганизмов.

Таблица 5.

Оценка биологической активности сред с помощью бактериально-люминесцентного теста «Эколюм-08» по интенсивности свечения и определение индекса токсичности ($p \leq 0,05$)

Защитные среды	Интенсивность свечения биотеста (30 мин)	Индекс токсичности
Контроль	243 ±12	-
Обрат	1520±76	-5,25
NaCl	634±32	-1,6
Сахароза+Желатин	500±25	-1,1
Бентонит 1%	376,3±16	-0,6
Бентонит 5%	753±10	-2,1
Бентонит 10 %	150±28	0,4

В виду того, что в результате лиофилизации существенная доля микроорганизмов из проходящей обработку культуры теряют жизнеспособность, появляется необходимость в поиске новых методов иммобилизации бактерий для длительного хранения. Считается, что криопротекторы защищают клетки, замещая воду, взаимодействуя с фосфолипидами мембран и, следовательно, превалируют при фазовом переходе (Ефремова, Столбова, 2012). Сахара также являются предпочтительными защитными средами из-за их относительно низкой цены и химически безвредного характера (Chua et al., 2022).

В связи с этим, жизнеспособность клеток оценивали сразу после лиофилизации и после 12 месяцев хранения лиофилизированных препаратов, которые содержали живые клетки и их метаболиты. В Таблице 6 представлены результаты исследования влияния лиофилизации на выживаемость штамма 194 с защитными средами. Сразу же после лиофилизации выживаемость у штамма 194 в обезжиренном молоке снизилась на 20%, а на среде с бентонитом на 25%. Установлено, что через 12 месяцев хранения при посеве на плотные питательные среды сохранение жизнеспособности клеток в процессе лиофилизации обусловлено как начальной высокой концентрацией клеток ($1,8 \times 10^8$ КОЕ/мл), так и присутствием в среде криопротектора-бентонита. В процессе хранения в присутствии молока этот показатель снижался на 25%, а в присутствии бентонита на 17%. Аналогичная ситуация была и с молокосвертывающей способностью (С - активность) лактококков. Время образования сгустка достигло 8 ч при использовании 5% бентонита, 18 ч при высушивании с сахарозой и желатином и 48 ч при хранении культуры в обрате в виде плотного столбика молочного сгустка. Хранение лактококков, лиофильно высушенных без криопротекторов, в течение 10 месяцев снизило кислотообразующую активность на 60%, а с бентонитом кислотообразование снизилось не более чем на 3 – 10%.

Оценка жизнеспособности *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 ($p \leq 0,05$)

Варианты сред	Количество колоний после восстановления, КОЕ/мл			Время образования сгустка после пассажей, ч.
	До лиофилизации	После лиофилизации	После 1 года хранения	
Обрат	$2,0 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	48
NaCl	$1,9 \times 10^8$	$8,6 \times 10^7$	$6,4 \times 10^6$	25
Сахароза + желатин	$1,9 \times 10^9$	$0,8 \times 10^9$	$1,0 \times 10^6$	18
Бентонит 5%	$2,4 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	8

Полученные результаты по лиофилизации могут быть рекомендованы для создания сухих пробиотических препаратов. Таким образом, штамм 194 *L. lactis* subsp. *lactis* может быть адсорбирован на бентоните с получением комплексного органо - минерального препарата, обеспечивающего одновременно детоксикацию кишечника и пролонгированный выход пробиотика с высокой степенью выживаемости.

3.6. Изучение двигательной активности, ориентировочно-исследовательского поведения и уровня тревожности крыс под влиянием культуральной жидкости *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194

Все тесты проводили с 30-го по 35-й день жизни животных (Рисунок 46). Обрат, воду и бактерии - лиофильно высушенную культуру штамма 194 *L. lactis* subsp. *lactis*, растворенную в 2 мл стерильной дистиллированной воды, вводили

перорально крысам в количестве 1 мл/100 г веса животного (Таблица 7). Кормление производили с 10 по 25 день жизни (человеческий возраст от 3 до 8 лет). Результаты представлены в виде наличия статистических различий между группами «контроль - вода», «контроль - обрат», «опыт - бактерии».

Таблица 7.

Характеристика биологически активной добавки на основе пробиотического штамма 194 *L. lactis* subsp. *lactis* ($p \leq 0,05$)

ОП, нм	рН	КОЕ/мл	Активность против <i>St. aureus</i> , МЕ/мл (по низину)	Активность против <i>E. coli</i> , ед/мл (по левомицетину)	Активность против <i>A. niger</i> , ед/мл (по нистатину)	Активность против <i>C. albicans</i> , ед/мл (по нистатину)
1,601	4,5	$0,4 \times 10^7$	4100	2900	4000	7000

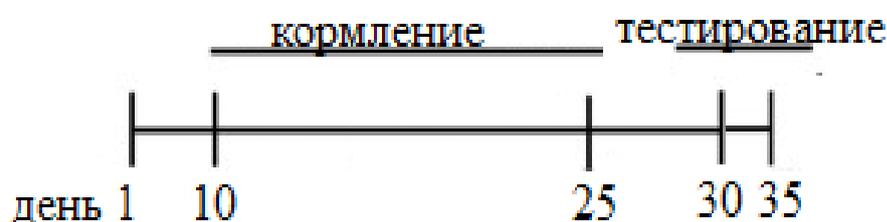


Рисунок 46. Схема эксперимента с крысами

При тестировании поведения мышей и крыс в любом лабораторном исследовании одним из важных его аспектов является исследовательское поведение этих животных. Тест «Открытое поле» используется для анализа ориентировочной - исследовательской реакции, двигательной активности и тревожности (Yang et al., 2011). Тревожность - психологическое и физиологическое состояния, а также особенности поведения, вызванные у животного и человека в ситуации (реальной или потенциальной), которая угрожает благополучию или

выживанию (Steimer, 2011). Один из важных параметров теста «Открытое поле» является латентный период крысы (время, за которое животное выйдет из центрального отсека).

Было выявлено значимое различие в латентном периоде животных у групп «контроль - вода» и «опыт - бактерии», а также у групп «контроль - вода» и «контроль - обрат» (Рисунок 47).

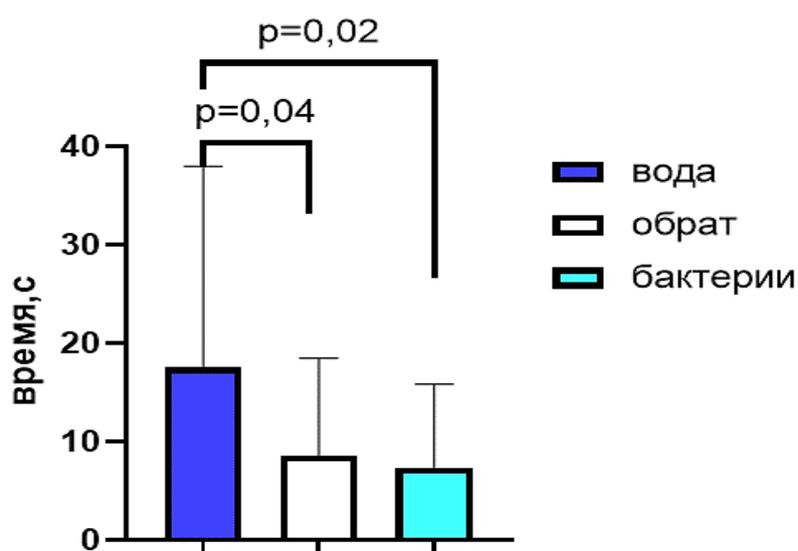


Рисунок 47. Латентный период выхода крысят в тесте «Открытое поле» - бесстрессогенная модификация на 30-й постнатальный день (ПНД). Примечание: данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего, Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparisons ($p \leq 0,04$)

Результаты показали, что крысы, в группах «опыт - бактерии» и «контроль - обрат», имели меньшее время латентного периода, чем крысы в группе «контроль - вода». Лучшие показатели были у группы «опыт - бактерии» ($p=0,02$), что говорит о скорости реакции избегания (большая склонность к выживанию), которая свойственна животным данного возраста. Половых различий внутри групп выявлено не было.

Комплексами врожденных действий, позволяющих животному осуществлять контакт с элементами среды, являются вертикальные стойки и тенденция принохиваться и обследовать поверхность (Зорина и др., 2002). Предполагается,

что уровень исследовательской активности животного, т.е. интенсивность тенденции освоить среду, находится в обратной зависимости от уровня страха и тревоги, которые обнаруживаются у данного животного.

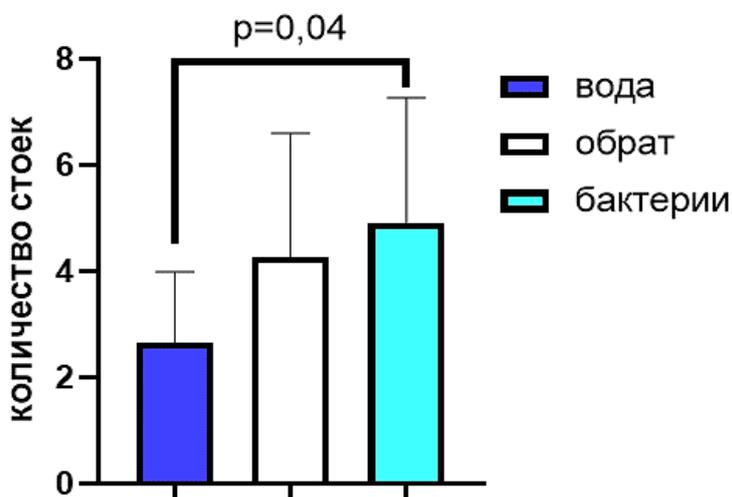


Рисунок 48. Стойки крысят в первую минуту в тесте «Открытое поле» - бесстрессогенная модификация на 30-й постнатальный день (ПНД). Примечание: данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки, Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparisons test ($p \leq 0,04$)

В случае со стойками в первую минуту, достоверные различия были между группами «контроль - вода» и «опыт - бактерии» ($p=0,04$). Крысы, употреблявшие бактерии, демонстрировали частую вертикальную активность (Рисунок 48), что говорит о повышенной ориентировочно-исследовательской активности у животных опытной группы.

Результаты по другому варианту теста «Открытое поле» - стрессогенная модификация показали, что крысы из группы «опыт - бактерии» имеют существенные различия с группой «контроль - обрат» ($p=0,03$). Животные с бактериями демонстрировали снижение актов груминга, что свидетельствует о уменьшении эмоциональности даже при внешнем стрессоре (красная лампа, звонок) и, как следствие, снижении уровня тревожности (Рисунок 49).

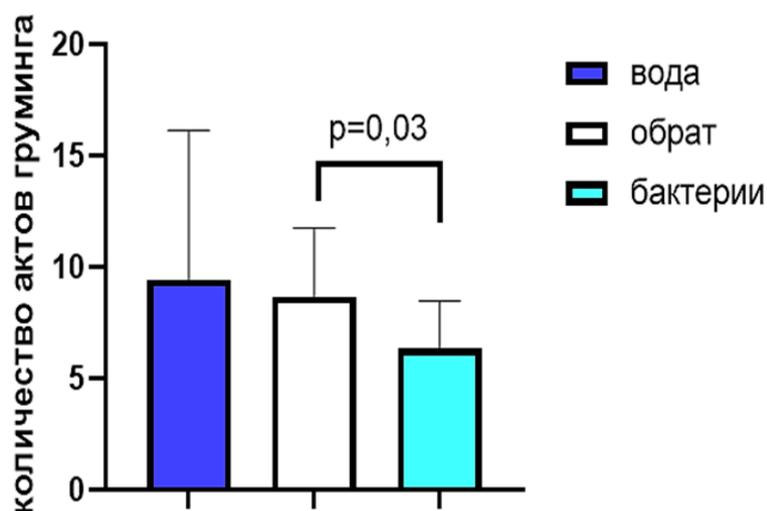


Рисунок 49. Суммарное количество актов груминга крысят в тесте «Открытое поле» - стрессогенная модификация на 34 ПНД. Примечание: данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего, Mann-Whitney test ($p \leq 0,03$)

Как известно, груминг является специфической поведенческой реакцией грызунов на стресс. Изменения его основных характеристик (длительность, количество эпизодов), имеющие место при помещении экспериментальных животных в «открытое поле» или под влиянием агонистов и антагонистов дофаминовых рецепторов, трактуются по-разному. Одна группа ученых считает, что груминг «замещает» проявление других форм поведения (например, исследовательской активности и т.д.), временно заингибированных страхом и тревогой (Moody et al., 1988). Подтверждением этого мнения является тот факт, что анксиолитические (противотревожные) препараты вместе со снижением уровня тревожности животных приводят к уменьшению продолжительности груминга (Kametani, 1988). Вероятнее всего бактерии оказывают противотревожное действие на животных.

Также были оценены результаты по тесту «Светлая - темная камера», применяющийся для выявления изменений в поведении грызунов разных опытных групп в состоянии стресса. Тест позволяет оценить предпочтение животным темноты или света, а также выявить динамику поведения (выглядывания).

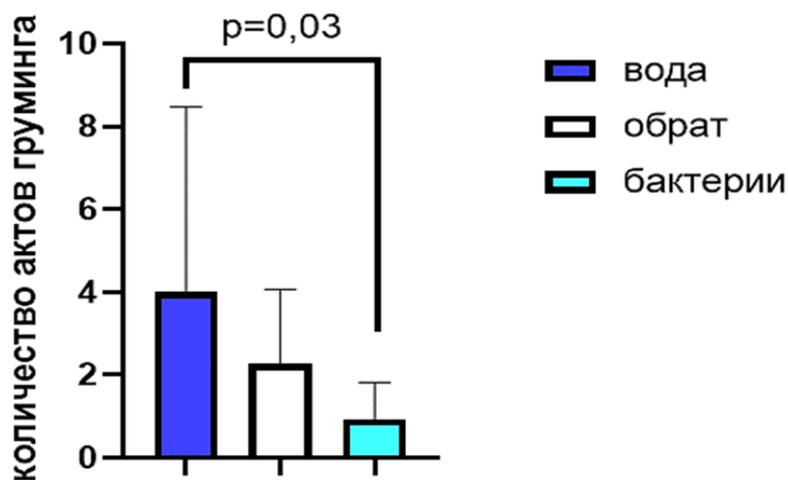


Рисунок 50. Акты груминга в тесте «Светлая - темная камера» на 33 ПНД.

Примечание: данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего, тест one-way ANOVA ($p \leq 0,03$)

Из результатов следует, что крысы из группы «опыт - бактерии» совершают меньше актов груминга ($p=0,03$), что говорит о пониженной эмоциональности, а это, в свою очередь, указывает на пониженный уровень тревожности (Рисунок 50).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время, все больше обращают внимание на достижения науки о питании, учитывая возможность применения полученных результатов для укрепления здоровья населения. Так, согласно распоряжению Правительства РФ от 29 июня 2016 г. N 1364-р «О стратегии повышения качества пищевой продукции в РФ до 2030 г.», уделяется особое внимание качеству пищевой продукции как важнейшего составляющего укрепления здоровья, проведению профилактики заболеваний, обусловленных неправильным питанием, увеличению продолжительности и повышения качества жизни населения. Согласно ГОСТ Р 52349 «Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения» функциональный пищевой продукт – это специальный пищевой продукт, предназначенный для систематического употребления в составе пищевых рационов всеми возрастными группами здорового населения. При создании пищевых продуктов функционального и специализированного назначения особая роль отведена биологически активным добавкам, являющимся ценными источниками комплекса физиологически функциональных ингредиентов. А физиологически функциональный пищевой ингредиент – это вещество или комплекс веществ животного, растительного, микробиологического, минерального происхождения или идентичные натуральным, а также живые микроорганизмы, входящие в состав функционального пищевого продукта в количестве от 10 до 15 % от суточной физиологической потребности в расчёте на одну порцию продукта. К таким ингредиентам относят пищевые волокна, витамины, минеральные вещества, полиненасыщенные жирные кислоты, пробиотики, пребиотики или синбиотики. Функциональное питание должно позволить в будущем не только сохранить здоровье, но и в определенной мере заменить лекарственные препараты.

Исследованные в данной работе штаммы *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* хранились в лиофилизированном состоянии в течение 20 лет. После восстановления штаммы сохранили свою физиолого-биохимическую и антимикробную активности. Для полного восстановления физиолого-

биохимических свойств лиофильно - высушенных культур требовалось подращивание их в среде как селективной среде их обитания.

Одним из главных свойств штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* является их способность к синтезу антимикробных метаболитов – бактериоцинов. В настоящее время известно большое количество новых бактериоцинов, продуцируемых молочнокислыми бактериями. Они представляют собой гетерогенную группу физико-химически разнообразных пептидов или белков, синтезированных на рибосомах, обладающих узким или широким спектром антимикробной активности в отношении грамположительных бактерий. Была исследована антимикробная активность лактококков и влияние аминокислот, вводимых в среду культивирования, на рост и продукцию антимикробных компонентов широкого спектра действия на *Staphylococcus aureus* AP017922.1, *Escherichia coli* 52, *Candida albicans* INA 00763 и *Aspergillus niger* INA 00760.

Известно, что пищеварительный тракт по содержанию регуляторных аминов, пептидов и нейропептидов стоит на втором месте после мозговой ткани, причем на количество этих соединений активно влияет кишечная микробиота, которая сама синтезирует большое количество биологически активных веществ, в том числе гормонов и нейромедиаторов. В связи с чем, в последнее время появился термин «психобиотики» и активно изучается ось микробиота-кишечник-мозг в контексте борьбы с депрессивными расстройствами. Один из способов воздействия психобиотиками, их способность синтезировать несколько молекул с нейроактивной функцией, такие как дофамин, норадреналин, серотонин и другие. Показана способность штаммов лактококков к синтезу нейромедиаторов, их предшественников и продуктов метаболизма, а также влияние аминокислот на вне- и внутриклеточное содержание штаммами нейроактивных соединений. Когда эти нейротрансмиттеры секретируются в кишечнике, они побуждают клетки в пределах оболочки кишечника, освободить молекулы, которые передают сигналы мозгу и влияют на поведение. В данном случае, ключевым медиатором функционирования оси микробиота–кишечник–мозг является серотонин, который

регулирует в ЖКТ секреторную активность, перистальтику, тонус сосудов и восприятие болевых раздражителей. Стоит заметить, что серотонин синтезируется как в ЖКТ, так и в головном мозге, однако сам он не может пройти через гематоэнцефалический барьер, в отличие от его предшественника - 5-НТР. Полученные результаты в большей степени интересны ввиду способности штаммов лактококков к синтезу 5-НТР, ведь известно, что пробиотики, влияющие на состояние серотонергической системы оказывают анксиолитический и антидепрессивный эффект у пациентов с тревожной депрессией. Использование штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* как психобиотиков может стать многообещающей стратегией для улучшения качества жизни людей, страдающих нейродегенеративными заболеваниями и нарушениями развития нервной системы.

Помимо синтеза бактериоцинов, пробиотики оказывают защитное действие по отношению к патогенной и условно-патогенной микробиоте, вырабатывая метаболиты, подавляющие ее рост (короткоцепочечные жирные кислоты, молочная кислота, перекись водорода). Производство антагонистических веществ живыми организмами является консервативной характеристикой на протяжении всей эволюции и представляет собой эффективный наследственный защитный механизм. Исследована способность штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* к синтезу короткоцепочечных жирных кислот, участвующих в синтезе нейромедиаторов. Штамм 194 синтезировал масляную и изомасляную кислоты, штамм F-116 - изовалериановую кислоту.

Известно, что при выборе пробиотического препарата все чаще стоит вопрос о выживаемости микроорганизмов в условиях желудочно-кишечного тракта. В связи с чем на первое место выходит способность пробиотиков к адгезии или, если точнее, прикреплению к эпителиальным клеткам кишечника. Известно также, что адгезия играет не мало важную роль при выявлении связи кишечной системы человека с полезными/вредными микроорганизмами. Показана способность штаммов лактококков к формированию биопленок на абиотических поверхностях (адгезионные показатели), по результатам исследования лучшим был *L. lactis* subsp.

lactis штамм 194. Изучение и объяснение механизмов прикрепления молочнокислых бактерий также поможет выяснить механизмы, с помощью которых кишечные патогенные микроорганизмы связываются и проникают в организм человека. Таким же образом будут определяться и меры, препятствующие связыванию возбудителей различных заболеваний. Выявление биохимических механизмов и генетических детерминант адгезии также будет способствовать разработке новых антибиотиков.

С учетом анализа пробиотических показателей, был отобран природный штамм *L. lactis* subsp. *lactis* 194 как основа для создания полифункционального сухого препарата БАД. Разработана схема лиофилизации с использованием различных защитных сред. Впервые проведены эксперименты по использованию бентонита в качестве криопротектора для лиофилизации лактококков *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194. Оценена его эффективность по выживаемости до/после лиофилизации и после 1 года хранения при сохранении биотехнологических показателей (скорость образования молочного сгустка, антимикробная активность). К тому же бентонит может обогатить препарат микро- и макроэлементами как нутрицевтик и помочь при интоксикации кишечника.

Создан лабораторный образец полифункциональной пищевой добавки на основе *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194, соответствующий предъявляемым требованиям к БАД. Пероральное введение нелинейным белым крысам, полученной биологически активной пищевой добавки параллельно с водой и обратом, и последующее проведение поведенческих тестов показали существенные результаты по латентному периоду, суммарному количеству стоек и актам груминга. Крысы более склонны к выживанию, у них повышена ориентировочно-исследовательская активность и понижена тревожность, из чего следует, что выбранная пробиотическая культура способна оказывать существенное анксиолитическое воздействие.

ВЫВОДЫ

1. Изучаемые штаммы *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (природный штамм 194 и полученные слиянием протопластов штаммы F-116 и F-119) показывают высокую антимикробную активность широкого спектра действия на грамположительные, грамотрицательные бактерии и микромицеты.
2. Внесение аминокислот в биосинтетическую среду культивирования лактококков положительно влияет на антимикробную активность исследуемых штаммов: изолейцин увеличил бактерицидную активность штаммов F-119 и F-116 против *S. aureus*, тирозин – активность штамма F-119 против *E. coli*; глутаминовая кислота повысила фунгицидную активность штамма F-116 против *A. niger* и *C. albicans*, тирозин – активность штамма 194 против *A. niger* и *C. albicans*, а триптофан повысил активность F-119 против *A. niger*.
3. Штаммы лактококков при культивировании в биосинтетической среде способны к синтезу нейромедиаторов. Наибольшая вне- и внутриклеточная концентрация 5-НТР как предшественника серотонина была у штаммов F-119 и 194, наименьшая у F-116.
4. Добавление в среду аминокислот влияет на вне- и внутриклеточную концентрацию нейромедиаторов у лактококков. Серин и глутаминовая кислота способствует увеличению содержания гомовалиновой кислоты и серотонина в среде у штамма F-116, а триптофан влиял на образование норадреналина штаммом 194.
5. По результатам изучения пробиотических свойств лактококков (антимикробная активность и синтез нейромедиаторов с аминокислотами и без них, синтез КЦЖК, адгезионные свойства) наиболее перспективным для использования в качестве биологически активной пищевой добавки следует считать штамм 194.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для усиления бактерицидной и антимикотической активностей штаммов лактококков можно рекомендовать добавление в среду культивирования аминокислот по целевому назначению в количестве 0,01 г/мл.
2. Уникальные свойства лактококков - широкий спектр бактерицидного и фунгицидного действия, синтез КЦЖК и нейромедиаторов, наличие адгезивных свойств, отсутствие токсичности позволяют рекомендовать их в качестве полифункциональной пищевой добавки - пробиотика (живая пробиотическая культура), так и метабиотика (неживые клетки с их метаболитами).
3. Полученные результаты по лиофилизации штамма 194 с использованием бентонита как криопротектора могут быть рекомендованы для создания комплексного органо-минерального препарата, показывающего максимальную выживаемость при сохранении биотехнологических показателей (скорость образования молочного сгустка, антимикробная активность).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфарная кислота

АКТГ – аденокортикотропный гормон

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

ВЗ – воспалительные заболевания кишечника

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

БА – болезнь Альцгеймера

БАДы – биологически активные добавки

БП – болезнь Паркинсона

ГАМК – гамма - аминomásляная кислота

ГГНО – гипоталамо - гипофизарно - надпочечниковая ось

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ГЖХ – газо-жидкостная хроматография

ГЭБ – гемато - энцефалический барьер

ЖКТ – желудочно - кишечный тракт

КЖ – культуральная жидкость

КМО – кишечно - мозговая ось

КРФ – кортикотропин - рилизинг фактор

КЦЖК – короткоцепочечные жирные кислоты

МКБ – молочнокислые бактерии

ПНД – постнатальный день

РАС – расстройство аутистического спектра

СПН – сигнальные пептиды насыщения

СРК – синдром раздраженного кишечника

ЦНС – центральная нервная система

ц-АМФ – циклический аденозинмонофосфат

ц-ГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЭПС – экзополисахарид

А – адреналин

АМГ – амигдала

BDNF (brain - derived neurotrophic factor) – нейротропный фактор мозга

DA – дофамин

DOPAL – диоксифенилаланин

DOPAC – доксифенилуксусная кислота

5-НТ – 5 - гидрокситриптамин

5-НТР – 5 - гидрокситриптофан

НИАА – 5 - оксииндолуксусная кислота

НІРР – гиппокамп

НУР – гипоталамус

НВА – гомовалиновая кислота

3-МТ – 3 - метокситирамин

NA – норадреналин

PPP – пентозофосфатный путь

SIRT (silent information regulator proteins) – семейство эволюционно консервативных НАД-зависимых белков

TAAR1 (trace amine-associated receptor 1) – рецептор следовых аминов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент РФ № RU 2374320 С2, 27.11.2009.
2. Патент РФ № SU 1687616 А1, 18.08.89.
3. Аверина О. В., Даниленко В.Н. Микробиота кишечника человека: роль в становлении и функционировании нервной системы // Микробиология. – 2017. – Т. 86. – №. 1. – С. 5 - 24. doi: 10.7868/S0026365617010050
4. Ардатская М. Д., Дубынин А. В., Минушкин О. Н. Дисбактериоз кишечника: современные аспекты изучения проблемы, принципы диагностики и лечения // Терапевтический архив. – 2001. – Т. 2. – С. 67 - 72.
5. Арутюнян А. В., Керкешко Г.О., Степанов М. Г., Корневский А. В., Айламазян Э.К. Роль биогенных аминов в гипоталамической регуляции репродуктивной функции // Обзоры поклинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2004. – Т.3. – №1. – С. 15 - 23.
6. Афиногенова А. Г., Даровская Е. Н. Микробные биопленки ран: состояние вопроса //Травматология и ортопедия России. – 2011. – №. 3. – С. 119 - 125.
7. Ашмарин И. П., Стукалова П. В. Нейрохимия. Учебник для биол. и мед. вузов // М.: Изд-во Инбиомед. химии РАМН, 1996. – 460 с.
8. Беляева Л. Е. Способно ли регулярное потребление «функциональной пищи» замедлить скорость атерогенеза? / Л. Е. Беляева // Вестн. ВГМУ. – 2012. – Т. 11 – № 3. – С. 15 - 27.
9. Бец Л. В. " Гормональный портрет" человека // Спец. Выпуск к 250-летию МГУ им. М.В. Ломоносова. – Москва: Природа. – 2005. – №. 1. – С. 61 - 69.
10. Бурова Т. Е. Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания: учебник / Т. Е. Бурова. - Санкт-Петербург: Лань, 2020. – 364 с.
11. Воеводкина А. Ю., Хайтович А. Б. Микробиом и его влияние на здоровье человека // Актуальная медицина. – 2018. – С. 283 - 289.

12. Горина А. С., Кулинский В., Колесниченко Л. С., Михнович В. И. Изменения содержания триптофана и его метаболитов у детей с ранним детским аутизмом // Сибирский научный медицинский журнал. – 2010. – Т. 30. – №. 5. – С. 19 - 24.
13. Горина А. С., Колесниченко Л. С., Бормотова Н. Н. Содержание аминокислот и нейромедиаторов в сыворотке крови детей с синдромом дефицита внимания/гиперактивности // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 109. – №. 2. – С. 82 - 84.
14. Громова О. А., Торшин И. Ю., Гусев Е. И., Никонов А. А., Лиманова, О. А. Молекулярные механизмы воздействия аминокислот в составе Церебролизина на нейротрансмиссию. Нейротрофические и нейропротективные эффекты аминокислот // Трудный пациент. – 2010. – Т. 8. – №. 4. – С. 25 - 31.
15. Данилов М. С., Воробьёв А. Л. Сравнительная характеристика некоторых минеральных соединений Восточного Казахстана // Вестник Омского государственного аграрного университета. – 2012. – №. 1 (5). – С. 41 - 44.
16. Диденко Л. В., Автандилов Г. А., Ипполитов Е. В., Царева Е. В., Смирнова Т. А., Шевлягина Н. В., Царев В. Н. Формирование биопленок на стоматологических полимерных материалах как основа персистенции микроорганизмов при патологии зубов и пародонта // Эндодонтия Today. – 2015. – №. 4. – С. 13 - 17.
17. Дубынин В. А., Сивоглазов В. И., Каменский В. В. Регуляторные системы организма // М.: Дрофа, 2003. – 386 с.
18. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Издательство МГУ, 2004. – 67 с.
19. Ефремова К.А., Столбова М.Г. К вопросу устойчивости иммобилизованных бифидобактерий к биологическим жидкостям // Вестник Пермской

- Государственной фармацевтической академии. – 2012. – Т. 1. – №. 9. – С. 225 – 227.
20. Зорина З.А., Полетаева И.И., Резникова Ж.И. Основы этологии и генетики поведения // Из-во Московского университета «Высшая школа», 2002. – 383 с.
21. Ивашкин В. Т., Зольникова О. Ю. Синдром раздраженного кишечника с позиций изменений микробиоты // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2019. – Т. 29. – №. 1. – С. 84 - 92. doi.org/10.22416/1382-4376-2019-29-1-84-92
22. Ивашкин В. Т., Ивашкин К. В. Психобиотические эффекты пробиотиков и пребиотиков // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2018. – Т. 28. – №. 1. – С. 4 - 12. doi.org/10.22416/1382-4376-2018-28-1-4-12
23. Каладзе Н. Н., Нуволи А. В., Голубова Т. Ф. Влияние дельфинотерапии на нормализацию моноаминергической и гормональной систем у детей с расстройством аутистического спектра // Вестник физиотерапии и курортологии. – 2021. – Т. 27. – №. 1. – С. 40 - 45.
24. Кирпиченко А. А. Новейший антидепрессант агомелатин в лечении расстройств аффективного спектра / А.А. Кирпиченко // Психиатрия, психотерапия и клин. психология. – 2014. – № 2. – С. 87 - 91.
25. Конакова А. В., Кушакова К. А. Парафармацевтическая продукция // Инновации. Наука. Образование. – 2020. – №. 21. – С. 1571 - 1575.
26. Кондрахин И. П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник — М: Колос, 2004 — 520 с.
27. Кудрин В. С., Мирошниченко И. И., Раевский К. С. Различия в механизмах ауторецепторной регуляции биосинтеза и высвобождения дофамина в подкорковых структурах мозга крыс // Нейрохимия. – 1988. – Т. 1. – С. 3 - 8.

28. Кузьмин С. В., Шеенкова М. В., Яцына И. В., Русаков В. Н., Сеницина О. О., Истомин А. В., Майзель С.Г., Алешкин В. А. О возможности использования пищевого продукта на основе молозива для диетического профилактического питания работающих во вредных условиях труда (обзор литературы) // Гигиена и санитария. – 2022. – Т. 101. – №. 4. – С. 412 - 417. doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-4-412-417
29. Ленгелер Й., Древис Г., Шлегель Г. Общая микробиология: Прокариоты. М.: Мир, 2012. – 656 с.
30. Николлс Д.Г., Мартин А.Р., Валлас Б. Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. М: ЛКИ, 2008. – 672 с.
31. Нотова С. В., Казакова Т. В., Маршинская О. В. Современные методы и оборудование для оценки поведения лабораторных животных (обзор) // Животноводство и кормопроизводство. – 2018. – Т. 101. – №. 1. – С. 106 - 115.
32. Образцова Е. А., Лукашев Е. П., Зарубина А. П., Пархоменко И. М., Яминский И. В. Бактерицидное действие одностенных углеродных нанотрубок // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия. – 2009. – №. 3. – С. 81 - 84.
33. Олескин А. В. Биополитический подход к реабилитологии: потенциальная роль микробной нейрхимии / А. В. Олескин, Б. А. Шендеров // Вестн. восстановит. медицины. – 2013. – № 1. – С. 60 - 67.
34. Опарин Ю. Г. Повреждение и защита биоматериалов при замораживании и лиофилизации //Биотехнология. – 1996. – Т. 7. – С. 3 - 11.
35. Осадчая А. И., Кудрявцев В. А., Сафронова Л. А. Влияние некоторых факторов на криорезистентность и сохранение жизнеспособности при лиофилизации культур *Bacillus subtilis* // Биотехнология. – 2002. – №. 3. – С. 45 - 54.

36. Полуэктова Е. А., Бениашвили А. Г., Масленников Р. В. Нутрицевтики и «фармацевтики» // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2020. – Т. 30. – №. 2. – С. 68 - 75. doi.org/10.22416/1382-4376-2020-30-2-68-75
37. Разумовский Н., Соболев Д. Аминокислоты–заменяемые и незаменимые // Животноводство России. – 2020. – №. 2. – С. 59 - 62.
38. Расторгуева А. Е., Лосевская С. А. Нутрицевтики как функциональная еда // Современные тенденции развития науки и мирового сообщества в эпоху цифровизации. – 2022. – С. 140 - 144.
39. Родионова О. Н., Трубина Н. В., Реутова Э. Ю., Видикер Р. В., Бабаева А. Р. Особенности нарушений нейрогуморальной регуляции, цитокинового и тиреоидного статуса у больных с функциональными расстройствами желудочно-кишечного тракта // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. – 2009. – №. 1. – С. 51 - 57.
40. Романцова С. Н., Лосевская С. А. Пищевые добавки в продуктах питания, их влияние на здоровье человека // Цифровизация современной науки: стратегии, инновации. – 2022. – С. 303 - 305.
41. Рябиченко Е. В. Кишечно-мозговые взаимоотношения в норме и патологии / Е. В. Рябиченко, В. М. Бондаренко // Верхневолж. мед. журн. – 2013. – Т. 11. – № 1. – С. 34 - 39.
42. Савельев А. В. Источники вариаций динамических свойств нервной системы на синаптическом уровне в нейрокомпьютинге // Искусственный интеллект. – 2006. – №. 4. – С. 323 - 338.
43. Садртдинова Г. Р. Агрегация бактерий *Klebsiella oxytoca* и *Klebsiella pneumoniae* под влиянием химического фактора // Инфекция и иммунитет. – 2015. – Т. 5. – №4. – С. 377 - 381.

44. Семененко М. П., Кононенко С. И., Тяпкина Е. В., Кузьминова Е. В. Энтеросорбция как метод общей детоксикации организма при сочетанных микотоксикозах у животных // *Инновации в АПК: проблемы и перспективы.* – 2017. – №. 4. – С. 177 - 184.
45. Скрипченко Н. В., Украинцев С. Е., Макарова Е. Г., Скрипченко Е. Ю. Научные перспективы изучения причинно-следственной связи микробиоты кишечника и состояния нервной системы // *Журнал инфектологии.* – 2018. – Т. 10. – №. 3. – С. 41 - 44. doi.org/10.22625/2072-6732-2018-10-3-41-44
46. Сорокина Е. В., Зарубина А.П. Биотестирование с использованием бактериального люминесцентного теста: достоинства и усовершенствования метода // *Успехи современной биологии.* – 2017. – Т. 137. – № 6. – С. 613 - 620. doi: 10.7868/S0042132417060084
47. Стоянова Л. Г., Егоров Н. С. Получение низинпродуцирующих бактерий методом слияния протопластов двух родственных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, низкоактивных по синтезу низина // *Микробиология.* – 1998. – Т. 67. – №. 1. – С. 47 - 54.
48. Стоянова Л.Г. Молочнокислые бактерии // *Практикум по микробиологии.* Под ред. А. И. Нетрусова. М.: Академия. – 2005. – С. 467 - 468.
49. Стоянова Л. Г., Устюгова Е. А., Нетрусов А. И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2012. – Т. 48. – №. 3. – С. 259 - 275.
50. Стоянова Л. Г., Габриэлян Н. И. Перспективность использования пробиотических штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* при лечении госпитальных инфекций // *Журнал инфектологии.* – 2017. – Т. 4. – № 38. – С. 18 - 24.
51. Стоянова Л. Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с антимикробным действием // *Известия*

- Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2017. – №. 5. – С. 41 - 61.
doi 10.26897/0021-342X-2017-5-41-61
52. Тец В. В., Тец Г. В. Микробные биопленки проблемы антибиотикотерапии // Практическая пульмонология. – 2013. – №. 4. – С. 60 - 65.
53. Тихомирова Н. А. Продукты функционального питания // Молочная промышленность. – 2013. – №. 6. – С. 46 - 49.
54. Устюгова Е. А., Федорова Г. Б., Катруха Г. С., Стоянова Л. Г. Изучение антибиотического комплекса, образуемого *lactococcus lactis* ssp. *lactis* 194, вариант-к // Микробиология. – 2011. – Т. 80. – №. 5. – С. 644 - 650.
55. Устюгова Е. А., Тимофеева А. В., Стоянова Л. Г., Нетрусов А. И., Катруха Г. С. Характеристика и идентификация бактериоцинов, образуемых *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – №. 6. – С. 618 - 625.
56. Фефелова Ю. А., Сергеева Е. Ю., Новикова Л. В., Климина Г. М. Влияние характера питания на SIRTUIN1-опосредованное изменение метаболических процессов // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – №. 4. – С. 1 - 9.
57. Фещенко А. В., Война Ю. С. Классификация и оборот биологически активных добавок // 71-я научно-техническая конференция учащихся, студентов и магистрантов. – 2020. – С. 189 - 193.
58. Шендеров Б. А., Манвелова М. А., Степанчук Ю. Б., Скиба Н. Э. Пробиотики и функциональное питание // Антибиотики и химиотерапия. – 1997. – Т. 42. – №. 7. – С. 30 - 34.
59. Шендеров Б.А. Кишечная микробиота человека и нейродегенеративные // Поликлиника. – 2016. – № 1/1. – С. 7 - 13.
60. Шептулина А. Ф., Ивашкин В. Т. Синдром раздраженного кишечника через призму кишечного микробиома // Российский журнал гастроэнтерологии,

гепатологии, колопроктологии. – 2016. – Т. 26. – №. 6. – С. 120 - 123.
doi.org/10.22416/1382-4376-2016-6-120-123

61. Яшин А. Я., Яшин Я. И. Аналитические возможности жидкостного хроматографа «ЦветЯуза» с электрохимическими детекторами // Российский химический журнал. – 2002. – Т. 16. – №. 4. – С. 109 - 115.
62. Agahi A., Hamidi G.A., Daneshvar R., Hamdieh M., Soheili M., Alinaghipour A., Taba S.M.E., Salami M. Does severity of Alzheimer's disease contribute to its responsiveness to modifying gut microbiota? A double-blind clinical trial // *Frontiers in neurology*. – 2018. – V. 9. – P. 662 - 670.
doi.org/10.3389/fneur.2019.00031
63. Aguirre M., Collins M. D. Lactic acid bacteria and human clinical infection // *Journal of Applied Bacteriology*. – 1993. – V. 75 (2). – P. 95 - 107.
doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02753.x
64. Allen A.P., Hutch W., Borre Y.E., Kennedy P.J., Temko A., Boylan G., Murphy E., Cryan J. F., Dinan T.G., Clarke G. *Bifidobacterium longum* 1714 as a translational psychobiotic: modulation of stress, electrophysiology and neurocognition in healthy volunteers // *Translational psychiatry*. – 2016. – V. 6. – №. 11. – P. 939 - 946. doi:10.1038/tp.2016.191
65. Anderl J. N., Franklin M. J., Stewart P. S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2000. – V. 44. – №. 7. – P. 1818 - 1824.
doi.org/10.1128/aac.44.7.1818-1824.2000
66. Ansari A., Liong M. T. Bacteriocin from LAB for medical and health applications // *Beneficial Microorganisms in Medical and Health Applications*. – Cham: Springer International Publishing Beneficial. – 2015. P. 199 - 221.
doi.org/10.1007/978-3-319-23213-3_10

67. Aydemir D. H. Bakteriyal biyofilmlerin biyolojik önemi ve etkili kontrol stratejileri // Turkish Journal of Life Sciences. – 2018. – V. 3. – №. 1. – P. 218-230.
68. Azm S. A. N., Djazayeri A., Safa, M., Azami K., Ahmadvand B., Sabbaghziarani F., Sharifzadeh M., Vafa M. Lactobacilli and bifidobacteria ameliorate memory and learning deficits and oxidative stress in β -amyloid (1–42) injected rats // Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. – 2018. – V. 43. – №. 7. – P. 718 - 726. doi.org/10.1139/apnm-2017-0648
69. Barrett E., Ross R. P., O'toole P. W., Fitzgerald G. F., Stanton C. γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine // Journal of applied microbiology. – 2012. – V. 113. – №. 2. – P. 411 - 417. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x
70. Baumgarten T., Sperling S., Seifert J., von Bergen M., Steiniger F., Wick L. Y., Heipieper H. J. Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – V. 78. – №. 17. – P. 6217 - 6224. doi.org/10.1128/AEM.01525-12
71. Belguesmia Y., Naghmouchi K., Chihib N. E., Drider D. Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives // Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. – 2011. – P. 171 - 195. doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5_10
72. Battaglia F. C., Regnault T. R. H. Placental transport and metabolism of amino acids // Placenta. – 2001. – V. 22. – №. 2-3. – P. 145 - 161. doi.org/10.1053/plac.2000.0612
73. Benton D. Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition / D. Benton, C. Williams, A. Brown // Eur. J. Clin. Nutr. – 2007 Mar. – V. 61. – №. 3. – P. 355 - 361. doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602546

74. Bermudez-Brito M., Plaza-Díaz J., Muñoz-Quezada S., Gómez-Llorente C., Gil A. Probiotic mechanisms of action // *Annals of Nutrition and Metabolism*. – 2012. – V. 61. – №. 2. – P. 160 - 174. doi.org/10.1159/000342079
75. Bonfili L., Cecarini V., Cuccioloni M., Angeletti M., Berardi S., Scarpona S., Rossi G., Eleuteri A.M. SLAB51 probiotic formulation activates SIRT1 pathway promoting antioxidant and neuroprotective effects in an AD mouse model // *Molecular neurobiology*. – 2018. – V. 55. – №. 10. – P. 7987 - 8000. doi.org/10.1007/s12035-018-0973-4
76. Botzabadi S., Oryan S., Eidi A., Aghadavod E., Kakhaki R. D., Tamtaji O. R., Taghizadeh M., Asemi Z. The Effects of Probiotic Supplementation on Gene Expression Related to Inflammation, Insulin and Lipid in Patients with Parkinson's Disease: A Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial // *Archives of Iranian Medicine (AIM)*. – 2018. – V. 21. – №. 7. – P. 289 - 295.
77. Brachkova M.I., Duarte A., Pinto J.F. Evaluation of the viability of *Lactobacillus* spp. after the production of different solid dosage forms // *J. Pharm. Sci.* – 2009. – V. 98. – №. 9. – P. 3329 – 39. doi: 10.1002/jps.21609
78. Cenac N., Andrews H.N., Holzhausen M., Chapman K., Cottrell G., Andrade-Gordon P., Steinhoff M., Giovanni B., Beck P., Bunnett N.W., Sharkey K.A., Ferraz G.J.P., Shaffer E., Vergnolle N. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome // *The Journal of clinical investigation*. – 2007. – V. 117. – №. 3. – P. 636 - 647. doi.org/10.1172/JCI29255
79. Cheng L. H., Liu Y. W., Wu C. C., Wang S., Tsai Y. C. Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders // *Journal of Food and Drug Analysis*. – 2019. – V. 27. – P. 1 - 17. doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.002
80. Chua A., Tran T. T., Pu S., Park J. W., Hadinoto K. Lyophilization of Curcumin–Albumin Nanoplex with Sucrose as Cryoprotectant: Aqueous Reconstitution, Dissolution, Kinetic Solubility, and Physicochemical Stability // *International*

Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V. 23. – №. 19. – P. 11731 - 11747.
doi.org/10.3390/ijms231911731

81. Clarke M. B., Hughes D. T., Zhu C., Boedeker E. C., Sperandio V. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – V. 103. – P. 10420 - 10425. doi.org/10.1073/pnas.0604343103
82. Collado M. C., Grześkowiak Ł., Salminen S. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa // Current microbiology. – 2007. – V. 55. – P. 260 - 265. doi.org/10.1007/s00284-007-0144-8
83. Collins S. M., Surette M., Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain // Nature Reviews Microbiology. – 2012. – V. 10. – №. 11. – P. 735 - 742. doi.org/10.1038/nrmicro2876
84. Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – V. 11. – №. 2. – P. 95 - 105. doi.org/10.1038/nrmicro2937
85. Cuzzo S. A., Sesma F. J., Holgado A. A. P. D. R., Raya R. R. Methods for the detection and concentration of bacteriocins produced by lactic acid bacteria // Food Microbiology Protocols. – 2001. – P. 141 - 146. doi.org/10.1385/1-59259-029-2:141
86. Dalile B., Van Oudenhove L., Vervliet B., Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication // Nature reviews Gastroenterology & hepatology. – 2019. – V. 16. – №. 8. – P. 461 - 478. doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3
87. De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli // Journal of applied Bacteriology. – 1960. – V. 23. – №. 1. – P. 130 - 135. doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x
88. Denou E., Pridmore R. D., Berger B., Panoff J. M., Arigoni F., Brüssow H. Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the

- probiotic *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis // *Journal of bacteriology*. – 2008. – V. 190. – №. 9. – P. 3161-3168. doi.org/10.1128/jb.01637-07
89. De Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Gioncalves D., Viners J., Zitoun C., Duchampt A., Backhed F., Mithieux G. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits // *Cell*. – 2014. – V. 156. – №. 1. – P. 84 - 96. doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.016
90. Dinan T. G., Stilling R. M., Stanton C., Cryan J. F. Collective unconscious: how gut microbes shape human behavior // *Journal of psychiatric research*. – 2015. – V. 63. – P. 1 - 9. doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.02.021
91. Dobson A., Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? // *Applied and environmental microbiology*. – 2012. – V. 78. – №. 1. – P. 1 - 6. doi.org/10.1128/AEM.05576-11
92. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) et al. Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use // *EFSA Journal*. – 2017. – V. 15. – №. 12. – P. 9 - 11. doi: 10.2903/j.efsa.2017.5063
93. Essien B. E. Grasberger H., Romain R.D., Law D. J., Veniaminova N.A., Saqui-Salces M., El-Zaatari M., Tessier A., Hayes M. M., Yang A. C., Merchant J. L. ZBP-89 regulates expression of tryptophan hydroxylase I and mucosal defense against *Salmonella typhimurium* in mice // *Gastroenterology*. – 2013. – V. 144. – №. 7. – P. 1466 - 1477. e9. doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.057
94. Espín J. C., García-Conesa M. T., Tomás-Barberán F. A. Nutraceuticals: facts and fiction // *Phytochemistry*. – 2007. – T. 68. – №. 22-24. – P. 2986 - 3008. doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.014

95. Fasano A., Visanji N. P., Liu L. W., Lang A. E., Pfeiffer R. F. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease // *The Lancet Neurology*. – 2015. – V. 14. – №. 6. – P. 625 - 639. doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00007-1
96. Fernstrom J. D. Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain // *Physiological reviews*. – 1983. – V. 63. – №. 2. – P. 484 - 546. doi.org/10.1152/physrev.1983.63.2.484
97. Fernstrom J. D. Large neutral amino acids: dietary effects on brain neurochemistry and function // *Amino acids*. – 2013. – V. 45. – P. 419 - 430. doi.org/10.1007/s00726-012-1330-y
98. Feurté S., Gerozissis K., Regnault A., Paul F. M. Plasma TRP/LNAA ratio increases during chronic ingestion of an α -lactalbumin diet in rats // *Nutritional neuroscience*. – 2001. – V. 4. – №. 5. – P. 413 - 418. doi.org/10.1080/1028415X.2001.11747377
99. Foster J. A., Neufeld K. A. M. V. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression // *Trends in neurosciences*. – 2013. – T. 36. – №. 5. – P. 305 - 312
100. Gabrielsen C., Brede D. A., Hernández P. E., Nes I. F., Diep D. B. The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2012. – V. 56. – №. 6. – P. 2908 - 2915. doi.org/10.1128/aac.00314-12
101. Gershon M. D., Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders // *Gastroenterology*. – 2007. – V. 132. – №. 1. – P. 397 - 414. doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.002
102. Gilbert J. A., Blaser M. J., Caporaso J. G., Jansson J. K., Lynch S. V., Knight R. Current understanding of the human microbiome // *Nature medicine*. – 2018. – V. 24. – №. 4. – P. 392 - 400. doi.org/10.1038/nm.4517

103. Gobbetti M., Cagno R. D., De Angelis M. Functional microorganisms for functional food quality // *Critical reviews in food science and nutrition*. – 2010. – V. 50. – №. 8. – P. 716 - 727. doi.org/10.1080/10408398.2010.499770
104. González-Rodríguez I., Sánchez B., Ruiz L., Turróni F., Ventura M., Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., Margolles A. Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation // *Applied and environmental microbiology*. – 2012. – V. 78. – №. 11. – P. 3992 - 3998. https://doi.org/10.1128/AEM.08024-11
105. Grandy A. S., Wieder W. R., Wickings K., Kyker-Snowman E. Beyond microbes: Are fauna the next frontier in soil biogeochemical models? // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2016. – V. 102. – P. 40 - 44. doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.008
106. Grundgeiger T., Bayen U. J., Horn S. S. Effects of sleep deprivation on prospective memory // *Memory*. – 2014. – V. 22. – №. 6. – P. 679 - 686. doi.org/10.1080/09658211.2013.812220
107. Harding K. L., Judah R. D., Gant C. E. Outcome-based comparison of Ritalin® versus food-supplement treated children with AD/HD // *Alternative Medicine Review*. – 2003. – V. 8. – №. 3. – P. 319 - 330.
108. Hascoët M., Bourin M. The mouse light-dark paradigm: a review // *Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2001. – V. 25. – №. 1. – P. 141 - 166. doi.org/10.1016/S0278-5846(00)00151-2
109. Havenaar R. Intestinal health functions of colonic microbial metabolites: a review // *Beneficial microbes*. – 2011. – V. 2. – №. 2. – P. 103 - 114. doi.org/10.3920/BM2011.0003
110. He Q., Wang L., Wang F., Li Q. Role of gut microbiota in a zebrafish model with chemically induced enterocolitis involving toll-like receptor signaling pathways // *Zebrafish*. – 2014. – V. 11. – №. 3. – P. 255 - 264. https://doi.org/10.1079/9780851996547.0103

111. Héchard Y., Sahl H. G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria // *Biochimie.* – 2002. – V. 84. – №. 5-6. – P. 545 - 557. doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01417-7
112. Ho S. T., Hsieh Y. T., Wang S. Y., Chen M. J. Improving effect of a probiotic mixture on memory and learning abilities in d-galactose-treated aging mice // *Journal of dairy science.* – 2019. – V. 102. – №. 3. – P. 1901 - 1909. doi.org/10.3168/jds.2018-15811
113. Hu J., Lin S., Zheng B., Cheung P. C. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism // *Critical reviews in food science and nutrition.* – 2018. – V. 58. – №. 8. – P. 1243 - 1249. doi.org/10.1080/10408398.2016.1245650
114. Hueston C. M., Deak T. The inflamed axis: the interaction between stress, hormones, and the expression of inflammatory-related genes within key structures comprising the hypothalamic-pituitary-adrenal axis // *Physiology & behavior.* – 2014. – V. 124. – P. 77 - 91. doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.10.035
115. Hungin A. P. S., Mulligan C., Pot B., Whorwell P., Agreus L., Fracasso P., Lionis C., Mendive J., de Foy J-M. P., Rubin G., Winchester C., de Wit N. Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice—an evidence-based international guide // *Alimentary pharmacology & therapeutics.* – 2013. – V. 38. – №. 8. – P. 864 - 886. doi.org/10.1111/apt.12460
116. Iversen S. D., Iversen L. L. Dopamine: 50 years in perspective // *Trends in neurosciences.* – 2007. – V. 30. – №. 5. – P. 188 - 193. doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.002
117. Jalanka-Tuovinen J., Salojarvi J., Salonen A., Immonen O., Garsed K., Kelly F.M., Zaitoun A., Palva A., Spiller R.C., de Vos W.M. Faecal microbiota composition and host-microbe crosstalk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome // *Gut.* – 2014. – V. 63. – P. 1737 - 1745. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306434

118. Joseph N., Vasodavan K., Saipudin N. A., Yusof B. N. M., Kumar S., Nordin S. A. Gut microbiota and short-chain fatty acids (SCFAs) profiles of normal and overweight school children in Selangor after probiotics administration // *Journal of Functional Foods*. – 2019. – V. 57. – P. 103 - 111. doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.042
119. Kametani H. Analysis of Age-related Changes in Stress-induced Grooming in the Rat: Differential Behavioral Profile of Adaptation to Stress // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1988. – V. 525. – №. 1. – P. 101 - 113. doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb38599.x
120. Kasper S. Depression and anxiety-separate or continuum? // *The World Journal of Biological Psychiatry*. – 2001. – V. 2. – №. 4. – P. 162 - 163. doi.org/10.3109/15622970109026804
121. Kassinen A., Krogius-Kurikka L., Makivuokko H., Rinttila T., Paulin L., Corander J., Malinen E., Apajalahti J., Palva A. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects // *Gastroenterology*. – 2007. – V. 133. – №. 1. – P. 24 - 33. doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.005
122. Kitaoka K., Uchida K., Okamoto N., Chikahisa S., Miyazaki T., Takeda E., Séi H. Fermented ginseng improves the first-night effect in humans // *Sleep*. – 2009. – V. 32. – №. 3. – P. 413 - 421. doi.org/10.5665/sleep/32.3.413
123. Kuczyńska B., Wasilewska A., Biczysko M., Banasiewicz T., Drews M. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe—mechanizmy działania, potencjalne zastosowania kliniczne oraz zalecenia dietetyczne // *Nowiny Lekarskie*. – 2011. – V. 80. – №. 4. – P. 299 - 304.
124. Kumar A., Singh A. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update // *Pharmacological Reports*. – 2015. – V. 67. – №. 2. – P. 195 - 203. doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004

125. Kwak M. K., Liu R., Kim M. K., Moon D., Kim A. H., Song S. H., Kang S. O. Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit the proliferation of pathogenic fungi // *Journal of Microbiology*. – 2014. – V. 52. – P. 64-70. doi.org/10.1007/s12275-014-3520-7
126. Leblhuber F., Steiner K., Schuetz B., Fuchs D., Gostner J. M. Probiotic supplementation in patients with Alzheimer's dementia-an explorative intervention study // *Current Alzheimer Research*. – 2018. – V. 15. – №. 12. – P. 1106 - 1113. doi.org/10.2174/1389200219666180813144834
127. Li Q, Wang C, Tang C, Li N, Li J. Molecular-phylogenetic characterization of the microbiota in ulcerated and non-ulcerated regions in the patients with Crohn's disease // *PloS one*. – 2012. – V. 7. – №. 4. – P. e34939 - e34952. doi.org/10.1371/journal.pone.0034939
128. Liu X., Piao F., Li Y. Protective effect of taurine on the decreased biogenic amine neurotransmitter levels in the brain of mice exposed to arsenic // *Taurine 8: Volume 2: Nutrition and Metabolism, Protective Role, and Role in Reproduction, Development, and Differentiation*. – New York, NY : Springer New York, 2013. – P. 277 - 287. doi.org/10.1007/978-1-4614-6093-0_26
129. Liu W., Pang H., Zhang H., Cai Y. Biodiversity of lactic acid bacteria // *Lactic acid bacteria: fundamentals and practice*, 2014. – 536 p. doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0_2
130. Liu X. X., Zhang B., Ai L. Z. Advances in the microbial synthesis of 5-hydroxytryptophan // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – V. 9. – P. 624503. doi.org/10.3389/fbioe.2021.624503
131. Malempati S., Singhal M., Gavit P. R., Satyanarayana G. *Basics of Biochemistry* // Academic Guru Publishing House, 2023. – 212 p.
132. Markus C. R., Panhuysen G., Tuiten A., Koppeschaar H., Fekkes D., Peters M. Does carbohydrate-rich, protein-poor food prevent a deterioration of mood and cognitive

- performance of stress-prone subjects when subjected to a stressful task? // *Appetite*. – 1998. – V. 31. – №. 1. – P. 49 - 65. doi: 10.1006/appe.1997.0155.
133. Markowiak-Kopeć P., Śliżewska K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome // *Nutrients*. – 2020. – V. 12. – №. 4. – P. 1107 - 1129. doi.org/10.3390/nu12041107
134. Martinowich K., Lu B. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders // *Neuropsychopharmacology*. – 2008. – V. 33. – №. 1. – P. 73 - 83. doi.org/10.1038/sj.npp.1301571
135. Matsumoto M., Kibe R., Ooga T., Aiba Y., Sawaki E., Koga Y., Benno Y. Cerebral low-molecular metabolites influenced by intestinal microbiota: a pilot study // *Frontiers in systems neuroscience*. – 2013. – V. 7. – P. 9 - 28. doi.org/10.3389/fnsys.2013.00009
136. Mayer E. A., Savidge T., Shulman R. J. Brain–gut microbiome interactions and functional bowel disorders // *Gastroenterology*. – 2014. – V. 146. – №. 6. – P. 1500 - 1512. doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.037
137. McDougle C., Naylor S. T., Cohen D. J., Aghajanian G. K., Heninger G. R., Price L. H. Effects of tryptophan depletion in drug-free adults with autistic disorder // *Archives of general psychiatry*. – 1996. – V. 53. – №. 11. – P. 993 - 1000. doi:10.1001/archpsyc.1996.01830110029004
138. McLoughlin K., Schluter J., Rakoff-Nahoum S., Smith A. L., Foster K. R. Host selection of microbiota via differential adhesion // *Cell host & microbe*. – 2016. – V. 19. – №. 4. – P. 550 - 559. doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.021
139. Medani M., Collins, D., Docherty, N. G., Baird, A. W., O'Connell, P. R., Winter D. C. Emerging role of hydrogen sulfide in colonic physiology and pathophysiology // *Inflammatory bowel diseases*. – 2010. – V. 17. – №. 7. – P. 1620 - 1625. doi.org/10.1002/ibd.21528

140. Messaoudi M., Lalonde R., Violle N., Javelot H., Desor D., Nejdi A., Bisson J-F., Rougeot C., Pichelin M., Cazaubiel M., Cazaubiel J-M. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects // *British Journal of Nutrition*. – 2011. – V. 105. – №. 5. – P. 755 - 764. doi:10.1017/S0007114510004319
141. Miller T. L., Wolin M. J. Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora // *Applied and environmental microbiology*. – 1996. – V. 62. – №. 5. – P. 1589 - 1592. doi.org/10.1128/aem.62.5.1589-1592.1996
142. Moens F., Van den Abbeele P., Basit A. W., Dodoo C., Chatterjee R., Smith B., Gaisford S. A four-strain probiotic exerts positive immunomodulatory effects by enhancing colonic butyrate production in vitro // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2019. – V. 555. – P. 1 - 10. doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.020
143. Mohajeri M. H., La Fata G., Steinert R. E., Weber P. Relationship between the gut microbiome and brain function // *Nutrition reviews*. – 2018. – V. 76. – №. 7. – P. 481 - 496. doi.org/10.1093/nutrit/nuy009
144. Mohammadi A.A., Jazayeri S., Khosravi-Darani K., Solati Z., Mohammadpour N., Asemi Z., Adab Z., Dialali M., Tehrani-Doost M., Hosseini M., Eghtesadi S. The effects of probiotics on mental health and hypothalamic–pituitary–adrenal axis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in petrochemical workers // *Nutritional neuroscience*. – 2016. – V. 19. – №. 9. – P. 387 - 395. doi.org/10.1179/1476830515Y.0000000023
145. Moll G. N., Konings W. N., Driessen A. J. M. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation // *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the Sixth Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 19–23 September 1999, Veldhoven, The Netherlands*. – Springer Netherlands. – 1999. – P. 185 - 198. doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4_8

146. Montalto M., D'onofrio F., Gallo A., Cazzato A., Gasbarrini G. Intestinal microbiota and its functions // Digestive and Liver Disease Supplements. – 2009. – V. 3. – №. 2. – P. 30 - 34. doi.org/10.1016/S1594-5804(09)60016-4
147. Moody T. W., Merali Z., Crawley J. N. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1988. – V. 525. – P. 281 - 290. doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb38613.x
148. Morrison D. J., Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism // Gut microbes. – 2016. – V. 7. – №. 3. – P. 189 - 200. doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082
149. Nes I. F., Yoon S. S., Diep D. B. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review // Food Science and Biotechnology. – 2007. – V. 16. – №. 5. – P. 675 - 690.
150. Neufeld K. M., Kang N., Bienenstock J., Foster J. A. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice // Neurogastroenterology & Motility. – 2011. – V. 23. – №. 3. – P. 255 - 265. doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x
151. Ochoa - Reparaz J., Mielcarz D.W, Begum-Haque S., Kasper L.H. Gut, bugs, and brain: role of commensal bacteria in the control of central nervous system disease // Annals of neurology. – 2011. – V. 69. – №. 2. – P. 240 - 247. doi.org/10.1002/ana.22344
152. Orosco M., Rouch C., Beslot F., Feurte S., Regnault A., Dauge, V. Alpha-lactalbumin-enriched diets enhance serotonin release and induce anxiolytic and rewarding effects in the rat // Behavioural brain research. – 2004. – V. 148. – №. 1-2. – P. 1 - 10. doi: 10.1016/s0166-4328(03)00153-0.
153. Ortega M.A., Alvarez-Mon M.A., García-Montero C., Fraile-Martinez O., Guijarro L.G., Lahera G., Monserrat J., Valls P., Mora F., Rodríguez-Jiménez R., Quintero J., Álvarez-Mon M. Gut microbiota metabolites in major depressive disorder—

- Deep insights into their pathophysiological role and potential translational applications // *Metabolites*. – 2022. – V. 12. – №. 1. – P. 50. doi.org/10.3390/metabo12010050
154. O'Shea E. F., O'Connor P. M., O'Sullivan O., Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. Bactofencin A, a new type of cationic bacteriocin with unusual immunity // *MBio*. – 2013. – V. 4. – №. 6. – P. e00498 - 13. doi.org/10.1128/mbio.00498-13
155. O'Toole G., Kaplan H. B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development // *Annual Reviews in Microbiology*. – 2000. – V. 54. – №. 1. – P. 49 - 79. doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49
156. Parada J. L., Caron C. R., Medeiros A. B. P., Soccol C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives // *Brazilian archives of Biology and Technology*. – 2007. – V. 50. – P. 512 - 542. doi.org/10.1590/S1516-89132007000300018
157. Piche T., Saint-Paul M.C., Dainese R., Marine-Barjoan E., Iannelli A., Montoya M.L., Peyron J.f., Czerucka D., Cherikh F., Filippi J., Tran A., Hébuterne X. Mast cells and cellularity of the colonic mucosa correlated with fatigue and depression in irritable bowel syndrome // *Gut*. – 2008. – V. 57. – №. 4. – P. 468 - 473. doi.org/10.1136/gut.2007.127068
158. Rampello L., Alvano A., Battaglia G., Bruno V., Raffaele R., Nicoletti F. Tic disorders: from pathophysiology to treatment // *Journal of neurology*. – 2006. – V. 253. – №. 1. – P. 1 - 15. doi.org/10.1007/s00415-005-0008-8
159. Rattanachaikunsopon P., Phumkhachorn P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production // *Ann Biol Res*. – 2010. – V. 1. – №. 4. – P. 218 - 228.
160. Ríos-Covián D., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Gueimonde M., De Los Reyes-gavilán C. G., Salazar N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet

- and human health // *Frontiers in microbiology*. – 2016. – V. 7. – P. 1 - 9. doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185
161. Rook G.A., Lowry C.A., Raison C.L. Lymphocytes in neuroprotection, cognition and emotion: is intolerance really the answer? // *Brain, behavior, and immunity*. – 2011. – V. 25. – №. 4. – P. 591 - 601. doi.org/10.1016/j.bbi.2010.12.005
162. Round J. L. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease / J. L. Round, S. K. Mazmanian // *Nat. Rev. Immunol.* – 2009 May. – V. 9. – № 5. – P. 313 - 323. doi.org/10.1038/nri2515
163. Rousseaux C., Thuru X., Gelote A., Barnich N., Neut C., Dubuquoy L., Dubuquoy C., Merour E., Geboes K., Chamailard M., Ouwehand A., Leyer G., Carcano G., Colombel J-F., Ardid D., Desreumaux P. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors // *Nature medicine*. – 2007. – V. 13. – №. 1. – P. 35 - 37. doi.org/10.1038/nm1521
164. Rouxinol-Dias A. L., Pinto A. R., Janeiro C., Rodrigues D., Moreira M., Dias J., Pereira P. Probiotics for the control of obesity—Its effect on weight change // *Porto Biomedical Journal*. – 2016. – V. 1. – №. 1. – P. 12 - 24. doi.org/10.1016/j.pbj.2016.03.005
165. Sakala R. M., Hayashidani H., Kato Y., Hirata T., Makino Y., Fukushima Yamada T., Kaneuchi C., Ogawa M. Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage // *International journal of food microbiology*. – 2002. – V. 74. – №. 1 - 2. – P. 87 - 99. doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00732-2
166. Salminen S., Bouley C., Boutron M.- C., Cummings J. H., Franck A., Gibson G. R., Isolauri E., Moreau M.- C., Roberfroid M., Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function // *British journal of nutrition*. – 1998. – V. 80. – №. S1. – P. S147 - S171. doi:10.1079/BJN19980108

167. Sanz Y., Rastmanesh R., Agostonic C. Understanding the role of gut microbes and probiotics in obesity: how far are we? // *Pharmacological Research*. – 2013. – V. 69. – №. 1. – P. 144 - 155. doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.021
168. Sekirov I., Russell S. L., Antunes L. C. M., Finlay B. B. Gut microbiota in health and disease // *Physiological reviews*. – 2010. – V. 90. – P. 859 - 904. doi.org/10.1152/physrev.00045.2009
169. Serpa J., Caiado F., Carvalho T., Torre C., Gonçalves L. G., Casalou C., Lamosa P. Rodrigues M., Zhu Z., Lam E. W. F., Dias S. Butyrate-rich colonic microenvironment is a relevant selection factor for metabolically adapted tumor cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V. 285. – №. 50. – P. 39211 - 39223. doi.org/10.1074/jbc.M110.156026
170. Sokol H., Pigneur B., Watterlot L., Lakhdari O., Bermúdez-Humarán L. G., Gratadoux J. J., Blugeon S., Bridonneau C., Furet J-P., Corthier G., Grangette C., Vasquez N., Pochart P., Trugnan G., Thomas G., Blottière H.M., Doré J., Marteau P., Seksik P., Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – V. 105. – №. 43. – P. 16731 - 16736. doi.org/10.1073/pnas.080481210
171. Soltani S., Hammami R., Cotter P. D., Rebuffat S., Said L. B., Gaudreau H. Bédard F., Biron E., Drider D., Fliss, I. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2021. – V. 45. – №. 1. – P. 1 - 24. doi.org/10.1093/femsre/fuaa039
172. Sampson T. R., Mazmanian S. K. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome // *Cell host & microbe*. – 2015. – V. 17. – №. 5. – P. 565 - 576. doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.011
173. Sarkar A., Lehto S. M., Harty S., Dinan T. G., Cryan J. F., Burnet P. W. Psychobiotics and the manipulation of bacteria–gut–brain signals // *Trends in*

- neurosciences. – 2016. – V. 39. – №. 11. – P. 763 - 781.
doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.002
174. Savignac H. M., Kiely, B., Dinan, T. G., Cryan, J. F. *Bifidobacteria* exert strain-specific effects on stress-related behavior and physiology in BALB/c mice // *Neurogastroenterology & Motility*. – 2014. – V. 26. – №. 11. – P. 1615 - 1627. doi.org/10.1111/nmo.12427
175. Sengupta R., Altermann E., Anderson R. C., McNabb W. C., Moughan P. J., Roy N. C. The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract // *Mediators of inflammation*. – 2013. – V. 2013. P. 1 - 16. doi.org/10.1155/2013/237921
176. Sharma A., Smith M. A., Muresanu D. F., Dey P. K., Sharma H. S. 5-Hydroxytryptophan: a precursor of serotonin influences regional blood-brain barrier breakdown, cerebral blood flow, brain edema formation, and neuropathology // *International Review of Neurobiology*. – Academic Press, 2019. – V. 146. – P. 1 - 44. doi.org/10.1016/bs.irm.2019.06.005
177. Sherwin E., Sandhu K. V., Dinan T. G., Cryan J. F. May the force be with you: the light and dark sides of the microbiota–gut–brain axis in neuropsychiatry // *CNS drugs*. – 2016. – V. 30. – №. 11. – P. 1019 - 1041. doi.org/10.1007/s40263-016-0370-3
178. Silverman M. N., Sternberg E. M. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2012. – V. 1261. – №. 1. – P. 55 - 63. doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06633.x
179. Spiller R., Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome // *Gastroenterology*. – 2009. – V. 136. – №. 6. – P. 1979 - 1988. doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.074
180. Srivastava R. K. Enhanced shelf life with improved food quality from fermentation processes // *J. Food Technol. Preserv.* – 2018. – V. 2. – P. 8 - 14.

181. Staff I. M. Soaking it up: Bentonite's global reach // *Industrial Minerals Magazine* June Issue. – 2016. – P. 37 - 42.
182. Stanton C., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Van Sinderen D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites // *Current opinion in biotechnology*. – 2005. – V. 16. – №. 2. – P. 198 - 203. doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.008
183. Stoyanova L. G., Napalkova M. V., Netrusov A. I. The creating a new biopreservative based on fusant strain *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* F-116 for food quality and its safety // *Journal of Hygienic Engineering and Design*. – 2016. – V. 16. – P. 19-27.
184. Sun Z., Yu J., Dan T., Zhang W., Zhang H. Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria // *Lactic acid bacteria*. – Springer, Dordrecht, 2014. – 536 p. doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0_1
185. Sun Z., Wang X., Zhang X., Wu H., Zou Y., Li P., Wang D. Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – V 45. – №. 3. – P. 213 - 227. doi.org/10.1007/s10295-018-2008-6
186. Taher M., Leen W. G., Wevers R. A., Willemsen M. A. Lactate and its many faces // *European Journal of Paediatric Neurology*. – 2016. – V. 20. – №. 1. – P. 3 - 10. doi.org/10.1016/j.ejpn.2015.09.008
187. Tamtaji O. R., Taghizadeh M., Kakhaki R. D., Kouchki E., Bahmani F., Botzabadi S., Oryan S., Mifi A., AsemiZ. Clinical and metabolic response to probiotic administration in people with Parkinson's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *Clinical Nutrition*. – 2018. – V.38. – №2. – P. 203 - 206. doi.org/10.1016/j.clnu.2018.05.018
188. Teuber M. Genus II. *Lactococcus* // *Bergey's manual of systematic bacteriology*. – 2009. – V. 3. – P. 711 - 722.

189. Viswanathan J., Haapasalo A., Kurkinen K.M.A., Natunen T., Mäkinen P., Bertram L., Soininen H., Tanzi R.E., Hiltunen M. Ubiquilin-1 modulates γ -secretase-mediated ϵ -site cleavage in neuronal cells // *Biochemistry*. – 2013. – V. 52. – №. 22. – P. 3899 - 3912. doi.org/10.1021/bi400138p
190. Vlisidou I., Lyte M, van Diemen P. M., Hawes P., Monaghan P., Wallis T. S., Stevens M.P. The neuroendocrine stress hormone norepinephrine augments *Escherichia coli* O157:H7-induced enteritis and adherence in a bovine ligated ileal loop model of infection // *Infect. Immun.* – 2004. – V. 72. – P. 5446 - 5451. doi.org/10.1128/iai.72.9.5446-5451.2004
191. Vuotto C., Battistini L., Caltagirone C., Borsellino G. Gut microbiota and disorders of the central nervous system // *The Neuroscientist*. – 2020. – V. 26. – №. 5 - 6. – P. 487 - 502. doi.org/10.1177/1073858420918826
192. Wall R., Cryan, J. F., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Dinan T. G., Stanton, C. Bacterial neuroactive compounds produced by psychobiotics // *Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease* // Springer, New York, NY. – 2014. – P. 221 - 239. doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_10
193. Wang L. W., Tancredi D. J., Thomas D. W. The prevalence of gastrointestinal problems in children across the United States with autism spectrum disorders from families with multiple affected members // *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*. – 2011. – V. 32. – №. 5. – P. 351 - 360. doi:10.1097/DBP.0b013e31821bd06a
194. Wang L., Christophersen C.T., So rich M.J., Gerber J.P., Angley M.T., Conlon Increased abundance of *Sutterella* spp. and *Ruminococcus torques* in feces of children with autism spectrum disorder // *Molecular autism*. – 2013. – V. 4. – №. 1. – P. 42 - 44. doi.org/10.1186/2040-2392-4-42
195. Wasilewski A., Zielińska M., Storr, M., Fichna, J. Beneficial effects of probiotics, prebiotics, synbiotics, and psychobiotics in inflammatory bowel disease

- //Inflammatory bowel diseases. – 2015. – V. 21. – №. 7. – P. 1674 - 1682.
doi.org/10.1097/MIB.0000000000000364
196. Wells J. M., Rossi O., Meijerink M., van Baarlen P. Epithelial crosstalk at the microbiota–mucosal interface // *Proceedings of the national academy of sciences.* – 2011. – V. 108. – №. Supplement 1. – P. 4607 - 4614.
doi.org/10.1073/pnas.1000092107
197. Williams N. T. Probiotics // *American Journal of Health-System Pharmacy.* – 2010. – V. 67. – №. 6. – P. 449 - 458. doi.org/10.2146/ajhp090168
198. Yadav K., Bhardwaj A., Kaur G., Iyer R., De S., Malik R. K. Potential of *Lactococcus lactis* as a probiotic and functional lactic acid bacteria in dairy industry // *International Journal of Probiotics and Prebiotics.* – 2009. – V. 4. – №. 3. – P. 219 - 228.
199. Yang M., Silverman J. L., Crawley J. N. Automated three-chambered social approach task for mice // *Current protocols in neuroscience.* – 2011. – V. 56. – №. 1. – P. 8.26. 1 - 8.26. 16. doi.org/10.1002/0471142301.ns0826s56
200. Yano M. J., Yu K., Donaldson G.P., Shastri G.G., Phoebe A., Ma L., Nagler C.R., Ismagilov R.F., Mazmanian S.K., Hsiao E.Y. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis // *Cell.* – 2015. – V. 161. – №. 2. – P. 264 - 276. doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047
201. Yu J., Song Y., Ren Y., Qing Y., Liu W., Sun Z. Genome-level comparisons provide insight into the phylogeny and metabolic diversity of species within the genus *Lactococcus* // *BMC microbiology.* – 2017. – V. 17. – №. 1. – P. 1-10. doi 10.1186/s12866-017-1120-5
202. Zhao H., Shi Y., Luo X., Peng L., Yang Y., Zou L. The effect of fecal microbiota transplantation on a child with tourette syndrome // *Case reports in medicine.* – 2017. – V. 2017. – P. 1 - 3. doi.org/10.1155/2017/6165239
203. URL: <https://medlineplus.gov/ency/article/002222.htm>

ПРИЛОЖЕНИЯ

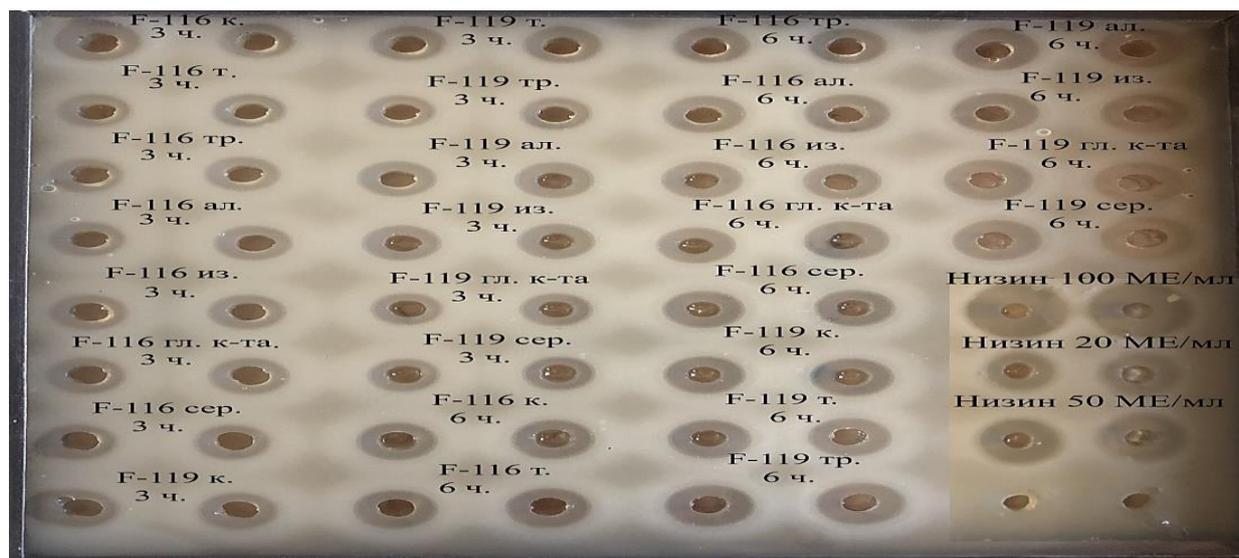


Рисунок 1. Зоны подавления роста *L. lactis* subsp. *lactis* штаммов F-116 и F-119 в динамике в ферментационной среде с аминокислотами. Примечание: тест-культура – *Staphylococcus aureus* AP017922.1, стандарт - Низин. Обозначения: к - контроль, т - тирозин, тр - триптофан, ал -аланин, из - изолейцин, гл. к-та - глутаминовая кислота, сер – серин

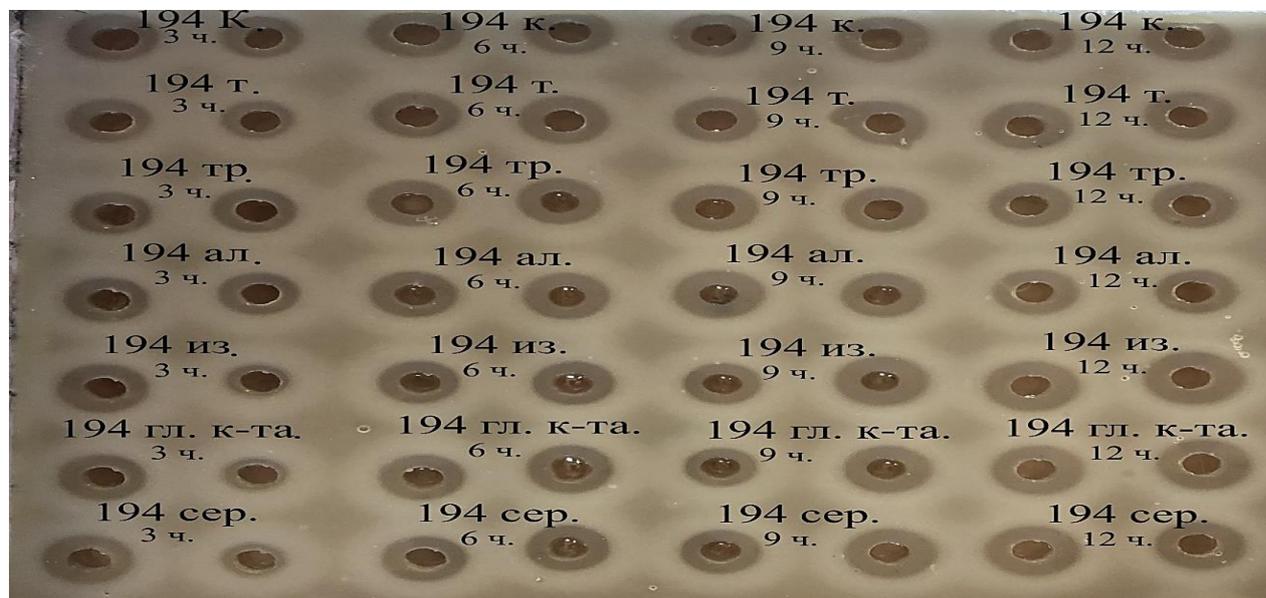


Рисунок 2. Зоны подавления роста *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 в динамике в ферментационной среде с аминокислотами. Примечание: тест-культура – *Staphylococcus aureus* AP017922.1, стандарт -Низин. Обозначения: к - контроль, т - тирозин, тр - триптофан, ал -аланин, из - изолейцин, гл. к-та - глутаминовая кислота, сер - серин

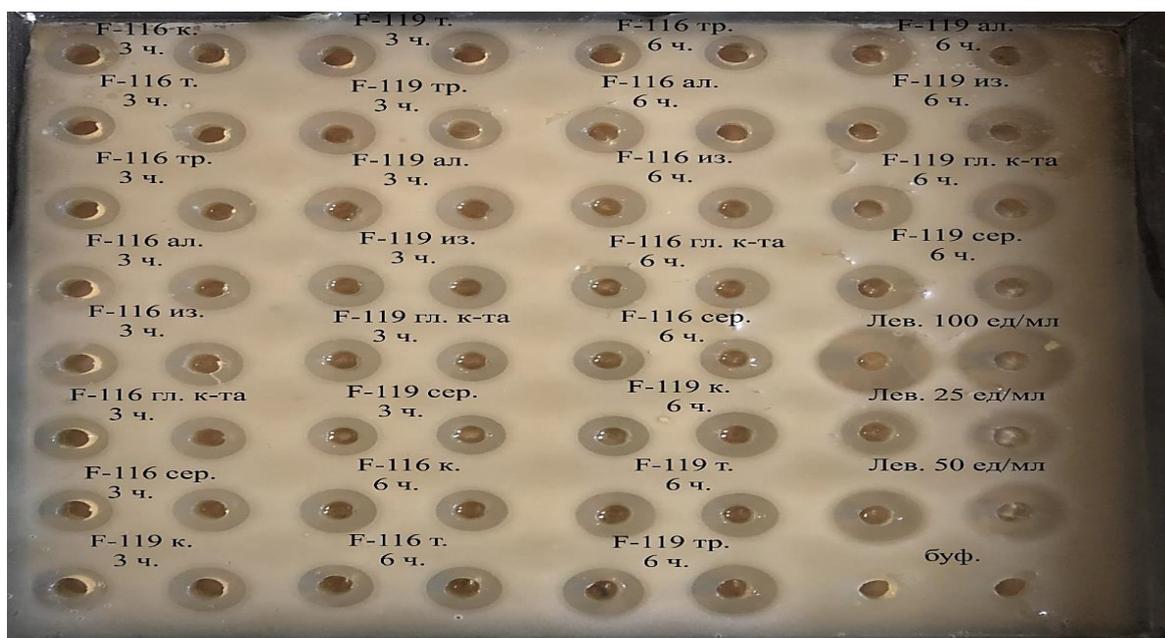


Рисунок 3. Зоны подавления роста *L. lactis subsp. lactis* штаммов F-116 и F-119 в динамике в ферментационной среде с аминокислотами. Примечание: тест-культура – *Escherichia coli* 52, стандарт - Левомецетин. Обозначения: к - контроль, т - тирозин, тр - триптофан, ал -аланин, из - изолейцин, гл. к-та - глутаминовая кислота, сер – серин



Рисунок 4. Зоны подавления роста *L. lactis subsp. lactis* штамма 194 в динамике в ферментационной среде с аминокислотами. Примечание: тест-культура – *Escherichia coli* 52, стандарт - Левомецетин. Обозначения: к - контроль, т - тирозин, тр - триптофан, ал -аланин, из - изолейцин, гл. к-та - глутаминовая кислота, сер - серин

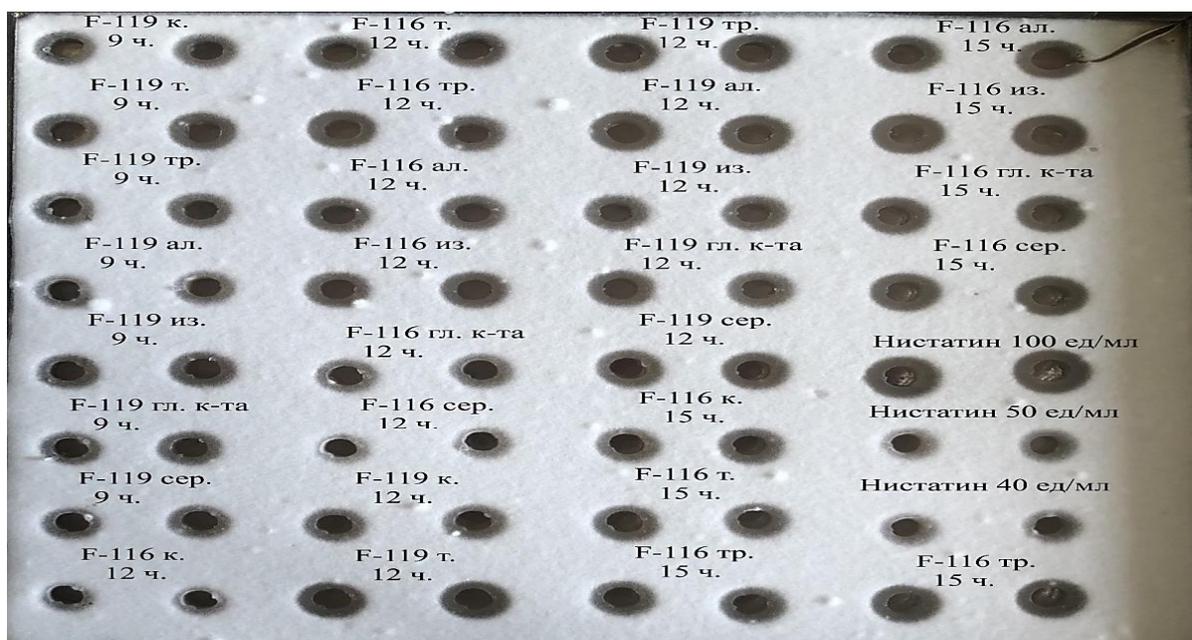


Рисунок 5. Зоны подавления роста *L. lactis* subsp. *lactis* штаммов F-116 и F-119 в динамике в ферментационной среде с аминокислотами. Примечание тест-культура – *Candida albicans* INA 00763, стандарт - Нистатин. Обозначения: к - контроль, т - тирозин, тр - триптофан, ал -аланин, из - изолейцин, гл. к-та - глутаминовая кислота, сер – серин

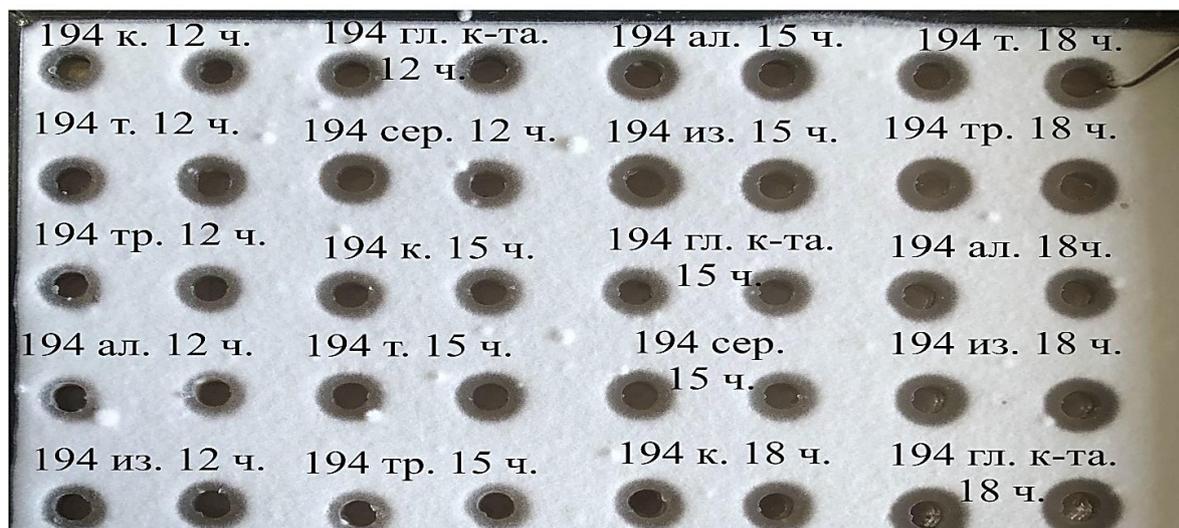


Рисунок 6. Зоны подавления роста *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 в динамике в ферментационной среде с аминокислотами. Примечание тест-культура – *Candida albicans* INA 00763, стандарт - Нистатин. Обозначения: к - контроль, т - тирозин, тр - триптофан, ал -аланин, из - изолейцин, гл. к-та - глутаминовая кислота, сер - серин

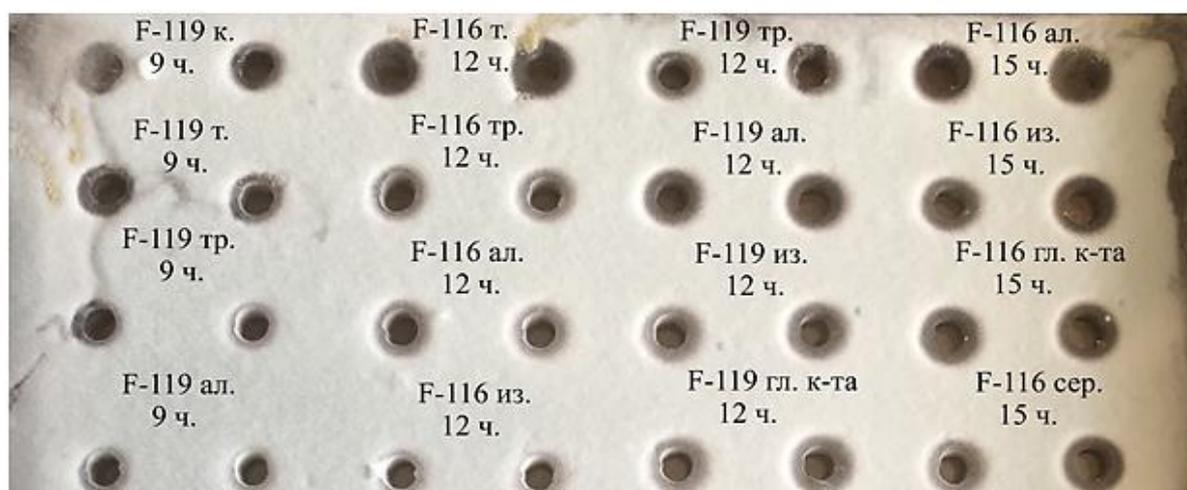


Рисунок 7. Зоны подавления роста *L. lactis* subsp. *lactis* штаммов F-116 и F-119 в динамике в ферментационной среде с аминокислотами. Примечание: тест-культура – *Aspergillus niger* INA 00760, стандарт - Нистатин. Обозначения: к - контроль, т - тирозин, тр - триптофан, ал - аланин, из - изолейцин, гл. к-та - глутаминовая кислота, сер – серин

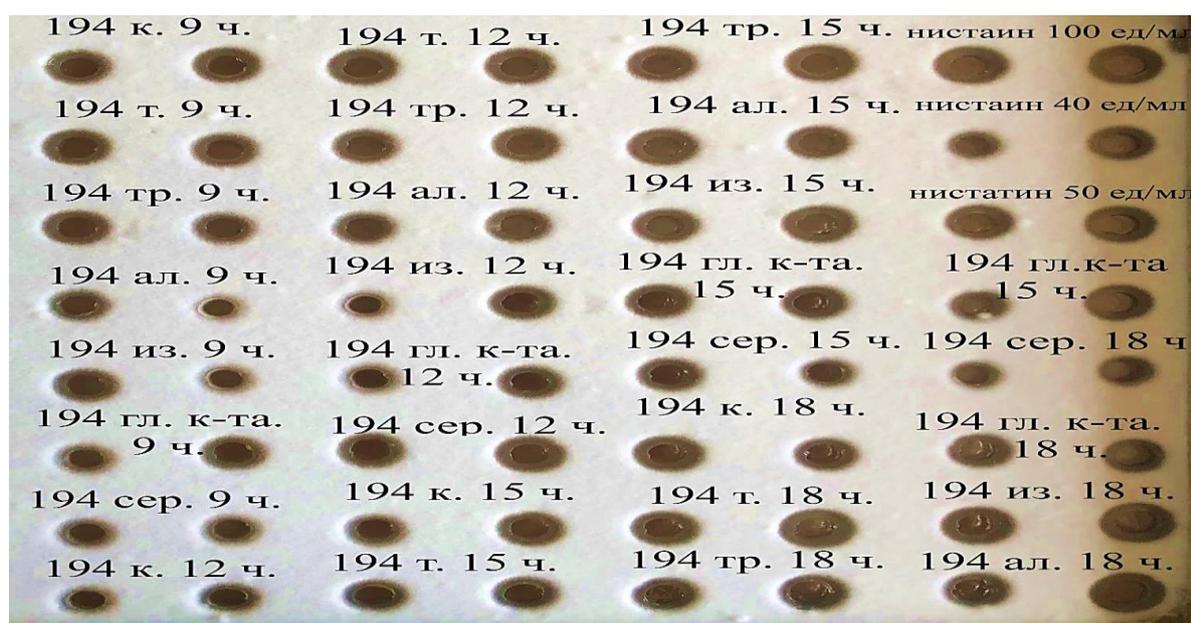


Рисунок 8. Зоны подавления роста *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194 в динамике в ферментационной среде с аминокислотами. Примечание: тест-культура – *Aspergillus niger* INA 00760, стандарт - Нистатин. Обозначения: к - контроль, т - тирозин, тр - триптофан, ал - аланин, из - изолейцин, гл. к-та - глутаминовая кислота, сер – серин

akvion.ru

Адрес: 123112, г. Москва, Пресненская набережная,
дом 8, строение 1, 8 этаж, помещение IN - комната 11
Тел.: +7 (495) 780-72-34
e-mail: corp@akvion.ru



Утверждаю

Генеральный директор АО «АКВИОН»

Д. В. Катков

«29» ноября 2023г.

Акт

Апробации применения бактериоцинопродуцирующего штамма

Lactococcus lactis subsp. *lactis* 194

от 29.11.2023

Мы, нижеподписавшиеся сотрудники АО «АКВИОН» Покровская Т.М., Белоусова Ю.В., представители кафедры микробиологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова ведущий научный сотрудник Стоянова Л.Г. и аспирантка Дбар С.Д. составили акт о том, что 16.12.2021 была проведена апробации штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 по стабильности его физиолого-биохимических свойств после хранения лиофильно высушенного образца (защитная среда обрат) в течение 1 года:

1. Количество клеток составляет $2,4 \cdot 10^8$ КОЕ/г, что соответствует требованиям к пробиотическим препаратам.
2. Время образования сгустка при культивировании в обрате при температуре 30°C составила 10 ч, что характерно для мезофильных лактококков этого подвида.
3. Уровень антимикробной активности по отношению к разным группам микроорганизмов соответствует заявленному: 4100 МЕ/мл по низину (*St. aureus*); 2900 ед/мл по левомецетину (*E. coli*); 4000 ед/мл по нистатину (*A. niger*); 7000 ед/мл по нистатину (*C. albicans*).

Директор отдела развития Покровская Т.М.

Менеджер проектов Белоусова Ю.В.

Ведущий научный сотрудник Стоянова Л.Г.

Аспирантка Дбар С.Д.



Акционерное общество «АКВИОН»
Юр. адрес: 123112, г. Москва, Пресненская набережная, дом 8,
строение 1, 8 этаж, помещение IN - комната 11
ИНН 7703346654 КПП 770301001 ОГРН 1027739039195

Рисунок 9. Акт апробаций применения *L. lactis* subsp. *lactis* штамма 194



ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР
Общество с ограниченной ответственностью «ТЕСТ КАЧЕСТВА»
(ИЦ ООО «ТЕСТ КАЧЕСТВА»)
Юридический/фактический адрес места осуществления деятельности:
111673, г. Москва, ул. Салтыковская, дом 8, эт. 1, пом. 106
Телефон +7(495)1337254, электронная почта: labtk@yandex.ru
Уникальный номер записи об аккредитации в реестре аккредитованных лиц
№ РОСС RU.0001.21ПГ10 от 06.05.2019 г.



ПТВЕРЖДАЮ
Руководитель ИЦ ООО «ТЕСТ КАЧЕСТВА»
О.Н. Чуприкова
16.12.2021 г.

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 071239/21
от 16.12.2021 г.

1. Наименование образца*: Бактериальный концентрат *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194.
2. Номер (код) образца: 0739/12.
3. Маркировка*: дата изготовления – 01.2021 г., номер партии №001, хранение при температуре 3-5 °С.
4. Упаковка, вес образца*: 20 г.
5. Состояние образца: удовлетворительное.
6. Заявитель*: ООО «АКВИОН», РФ.
7. Изготовитель*: ООО «Компонент-Лактис», РФ.
8. Предъявитель образцов: образцы предоставлены ООО «АКВИОН», РФ.
Информация об отборе образца предоставлена заказчиком. Лаборатория не осуществляет отбор образцов и не несет ответственности за стадию отбора образцов и информацию, предоставленную заказчиком.
9. Дата получения образца: 07.12.2021 г.
10. Даты проведения испытаний: начало – 07.12.2021, окончание – 16.12.2021.
11. Цель проведения испытаний: соответствие требованиям ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».
12. Общее количество страниц: 1 стр.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ:

Наименование определяемых показателей	НД на методы испытаний	Гигиенический норматив	Результат испытания
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ:			
Содержание <i>Lactococcus</i>	ГОСТ Р 56139-2014	от $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г до $2,0 \times 10^9$ КОЕ/г	$2,4 \times 10^8$ КОЕ/г

*Данные предоставлены заказчиком

Ответственный за оформление протоколов

И.Г. Кириченко

Конец протокола испытаний

Результаты испытаний относятся только к объектам, прошедшим испытания.
Протокол испытаний не должен быть воспроизведен не в полном объеме без разрешения лаборатории.
Протокол испытаний № 071239/21 от 16.12.2021 г.

Страница 1 из 1