

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Дбар Сария Джоновна

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

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2023

Диссертация подготовлена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель – **Стоянова Лидия Григорьевна**, доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты – **Ушакова Нина Александровна** - доктор биологических наук, ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН», заведующая лабораторией инновационных технологий, главный научный сотрудник

Садыкова Вера Сергеевна - доктор биологических наук, доцент, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе», заместитель директора по научной работе, отдел микробиологии, лаборатория таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов, заведующая лабораторией

Жиленкова Ольга Геннадьевна – кандидат биологических наук, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского», руководитель лаборатории биологии бифидобактерий, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «13» февраля 2024 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

Е-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.2/2781>

Автореферат разослан «20» декабря 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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* ssp. *lactis*, которым присвоен статус “GRAS” (Generally Recognized As Safe), что определяет их как абсолютно безопасные для здоровья человека и животных, способны к синтезу бактериоцинов (Rattanachaiakunsorn, 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* ssp. *lactis* против грамотрицательных микроорганизмов и микроспоров 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), 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.

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), 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 (Стоянова, Егоров, 1998; патент РФ № SU 1687616 A1, 1989; патент РФ № RU 2374320 C2, 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.

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 впервые оценено влияние наиболее эффективного природного 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. Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием соискателя. Достоверность полученных результатов обусловлена значительным количеством проведенных экспериментальных исследований и статистической обработкой результатов. Основные положения и результаты научно - квалификационной работы были представлены на конференциях разного уровня, посвященных проблемам микробиологии, биотехнологии и медицины: Материалы XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2017); Материалы конгресса Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (Москва, 2017); International conference on radiation and dosimetry in various fields of research - 2017 (Черногория, 2017); «Food quality and safety, health and nutrition» (Skopje, 2017); Всероссийская конференция с международным участием «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019); Материалы V Национального конгресса бактериологов (Москва, 2019); «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пушино, 2021); «3-й Российский микробиологический конгресс» (Псков, 2021); «5th Euro - Asian summit of experts on pneumococcal infection» (Russia, 2021); «Ломоносов 2021» (Москва, 2021); «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно - санитарной экспертизы и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции» (Москва, 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); «Ломоносов 2022» (Москва, 2022); «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно - санитарной экспертизы и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции» (Москва, 2023); XV Ежегодный Всероссийский Конгресс 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 2. Материалы и методы исследования

Штаммы и культивирование. Штаммы 194, F-119 и F-116 *L. lactis* subsp. *lactis*, хранившиеся в лиофильном состоянии в условиях бытового холодильника при -18°C, восстанавливали в обрате (обезжиренном молоке), являющимся лучшей средой для культивирования молочнокислых бактерий. Из обраты лактококки пересевали в посевную среду, приготовленную на водопроводной воде с дрожжевым экстрактом (20 г/л) и глюкозой (10 г/л), pH 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; K_2HPO_4 - 20,0; NaCl - 2,0; MgSO_4 - 0,2; дрожжевой экстракт - 20,0; pH 6,8 - 7,0 (Стоянова, 2005).

Определение уровня антимикробной активности штаммов *L. lactis* subsp. *lactis*. Уровень антимикробной активности МКБ определяли методом диффузии в агар с измерением зон подавления роста тест - культуры в мм (Егоров, 2004). Для полного извлечения антимикробного комплекса из клеток проводили экстракцию ацетон - уксусной смесью АВК (ацетон - уксусная кислота - вода) в соотношении 4:1:5. Для определения спектра антимикробного действия штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* в качестве тест-культур использовали: грамположительную бактерию (*Staphylococcus aureus* AP017922.1), грамотрицательную бактерию (*Escherichia coli* 52), микроскопические грибы и дрожжи (*Aspergillus niger* INA 00760, *Candida albicans* INA 00763). Бактерии выращивали на МПА, микроскопические грибы и дрожжи выращивали на среде Сабуро. Активность рассчитывали по стандартной кривой с учетом разведений стандартных антибиотиков, специфичных для каждой группы микробов (Устюгова и др., 2012).

Определение концентрации биогенных аминов. В динамике роста лактококков содержание нейромедиаторов определяли в культуральной жидкости (КЖ) - супернатанте и в клетках, которые разрушали ультразвуком (22 кГц; 2-3 мин обработке при охлаждении до 0°C). Их количество определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией на хроматографе LC-304Т, "BAS", WestLafayette, США с инжектором Rheodyne 7125, петля для нанесения образцов 20 мкл (Кудрин и др., 1988).

Метод определения короткоцепочечных жирных кислот. КЦЖК определяли с помощью газожидкостной хроматографии на приборе «Кристалл 2000 М» (Россия), оснащённом микрокапиллярной (15м×0,32мм×0,50мкм) колонкой ZB-FFAP (Zebron, США). 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).

Определение адгезионной способности штаммов *L. lactis* subsp. *lactis*. Наличие бактериальной биопленки на абиотических поверхностях фиксировали по методу (Диденко и др., 2015).

Разработка и оптимизация условий хранения препарата (БАДа). Штамм *L. lactis* subsp. *lactis* 194 лиофилизировали на вакуумной установке LABCONCO FreeZone1 (США) с температурой конденсора - 52°C. Сравнивали влияние 4-х защитных сред, добавляемых перед замораживанием, на выживаемость и сохранение физиолого-биохимических свойств лактококков в процессе лиофилизации и последующего длительного хранения: физраствор, обезжиренное молоко, 10% сахарозы+5% желатин и криопротектор на основе бентонита ($Al_2[Si_4O_{10}](OH)_2 \cdot nH_2O$; Bento Health Ltd. София, Болгария), в концентрациях от 0 до 10%. Регистрировали время образования сгустка, изменение рН, выживаемость, уровень и спектр антимикробной активности до/после лиофилизации и после года хранения.

Метод определения токсичности. Токсичность криопротектора бентонита и подбор его оптимальных концентраций проводили с использованием тест - системы «Эколюм-08» (Сорокина, Зарубина, 2017). 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 (Образцова и др., 2009).

Апробация лабораторного образца в модельных опытах на крысах препубертатного периода. Работа проводилась на нелинейных белых крысах обоего пола - 33 крысы (4 выводка). Животных разделяли на 3 группы: «контроль - обрат», «контроль - вода» и «опыт - бактерии». 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. Условия содержания животных и использованные экспериментальные процедуры были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ (рег. №12.3 от 17.11.2022 г.) В качестве поведенческих тестов использовали «Открытое поле» (бесстрессогенная и стрессогенная модификации), «Светлая - темная камера» (Насоёт, Bourin, 2001, Нотова и др., 2018).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel, "Statistica 10.0", Microsoft Excel, GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). При обработке результатов поведенческих тестов вначале проверили данные на нормальность распределения по критерию Шопиро-Уилка. При сравнении характеристик массивов данных использовали t-test Стьюдента (параметрические критерии), точный метод Фишера, критерий Манна-Уитни и Краскела - Уоллиса (непараметрические критерии), а также дисперсионный анализ (ANOVA) с применением поправки Dunn (Dunn's multiple comparisons test).

Глава 3. Результаты и обсуждение

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

Штаммы 194, F-116 и F-119 обладают широким спектром антимикробного действия, ингибируя рост грамположительных, грамотрицательных бактерий и микромицетов. 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 и соответствует экспоненциальной фазе роста, а у штаммов F-116 и F-119 приходится на 15 и 18 ч культивирования.

Отличительным признаком молочнокислых бактерий является высокая потребность в сложных питательных веществах: пуринах, пиримидинах, аминокислотах, витаминах. Этим, в значительной мере, объясняется влияние на их рост добавления к средам различных растительных экстрактов - дрожжей, картофеля, моркови, кукурузы (Стойнова, 2017). Известно, что аминокислоты являются необходимыми компонентами питания для лактококков, а также структурными компонентами бактериоцинов пептидной природы, поэтому они способны усилить их антимикробную активность. В связи с этим, было проведено исследование влияния различных аминокислот на антимикробную активность штаммов *L. lactis subsp lactis*. На основании полученных результатов (Рисунки 1 и 2), 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 МЕ/мл по низину. Штаммы F-116 и F-119 повысили активность при добавлении изолейцина и аланина на 45% и 33% соответственно (2400 и 2625 МЕ/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).

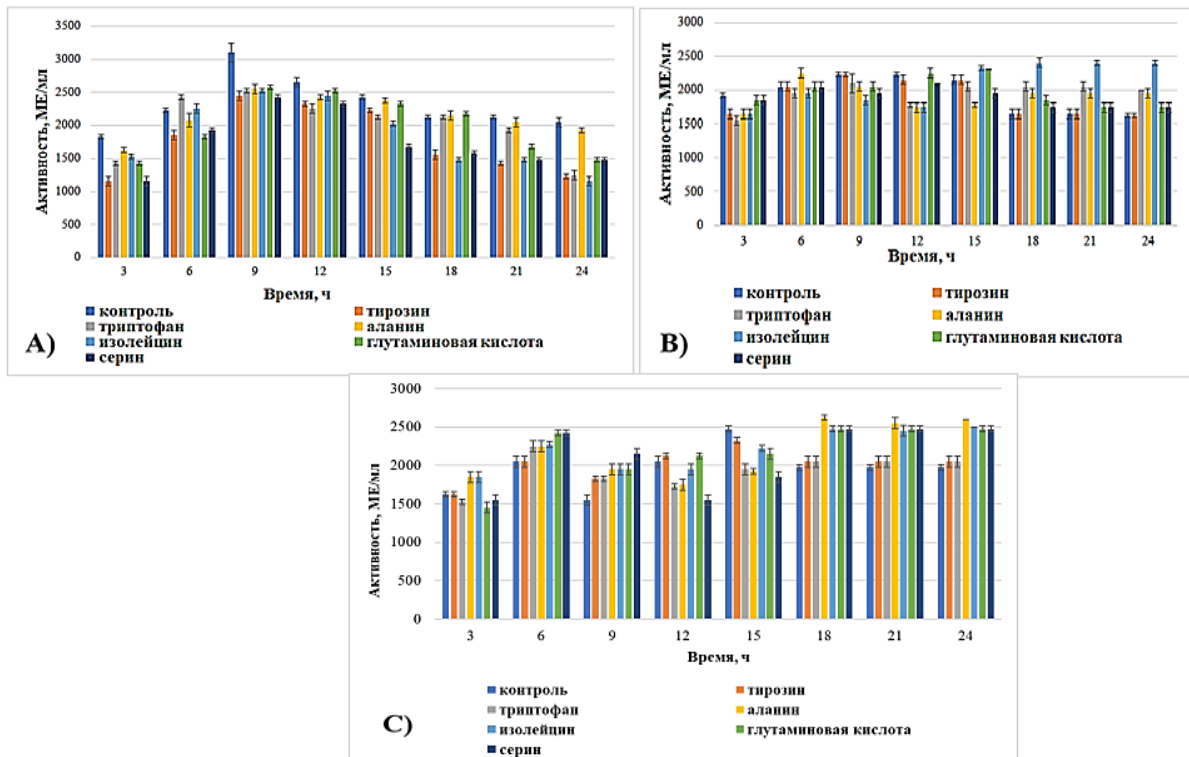


Рисунок 1. Бактерицидная активность *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штаммов 194 (А), F-116 (В) и F-119 (С) против *S. aureus* AP017922.1, в динамике роста в среде с добавлением аминокислот. Контроль – штамм без добавления аминокислот

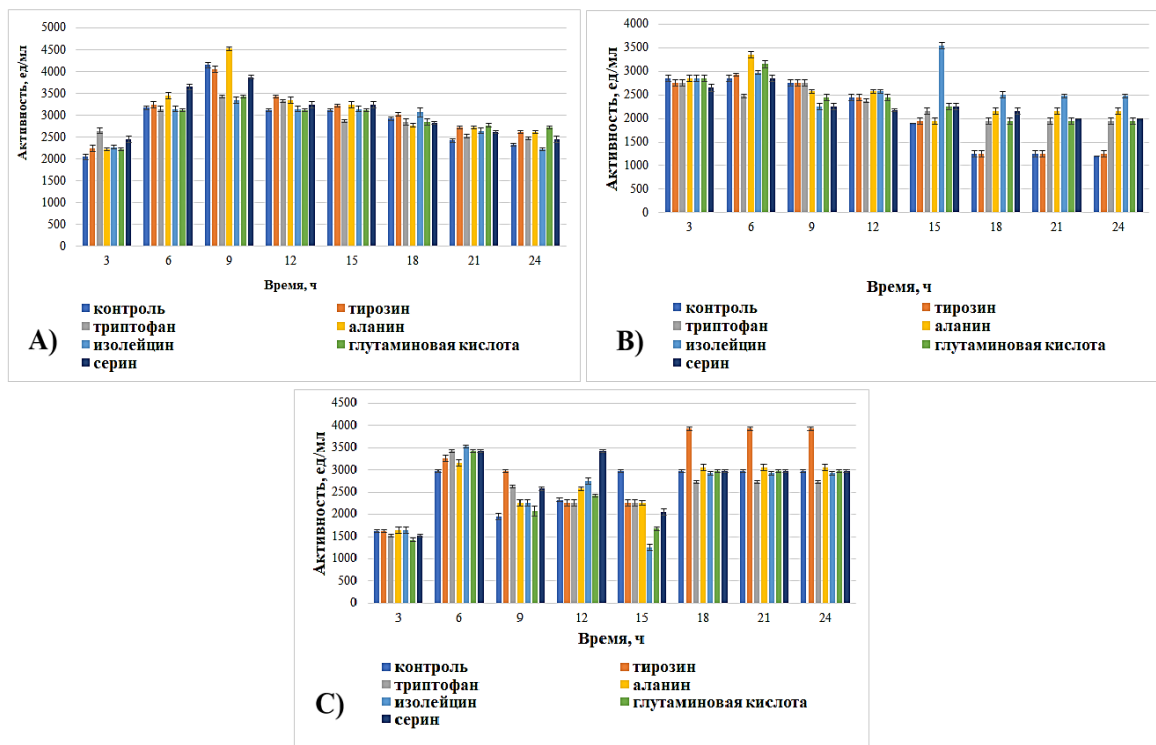


Рисунок 2. Бактерицидная активность *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штаммов 194 (А), F-116 (В) и F-119 (С) против *E. coli* 52, в динамике роста в среде с добавлением аминокислот. Контроль – штамм без добавления аминокислот

Ранее было установлено, что бактерицидная активность природного штамма 194, направленная на грамположительные бактерии, связана с продукцией двух бактериоцинов, один из которых является низином А ($M=3353$ Да), второй - пептидом ($M=2538$ 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.

Результаты экспериментов также указали на способность штаммов лактококков проявлять фунгицидную активность против тест-культур *Aspergillus niger* INA 00760 и дрожжей *Candida albicans* INA 00763 (активность в образцах рассчитана по нистатину). 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 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/мл) и F-119 – в присутствии триптофана (3950 ед/мл), на 25% и 30% соответственно (Рисунки 3 и 4).

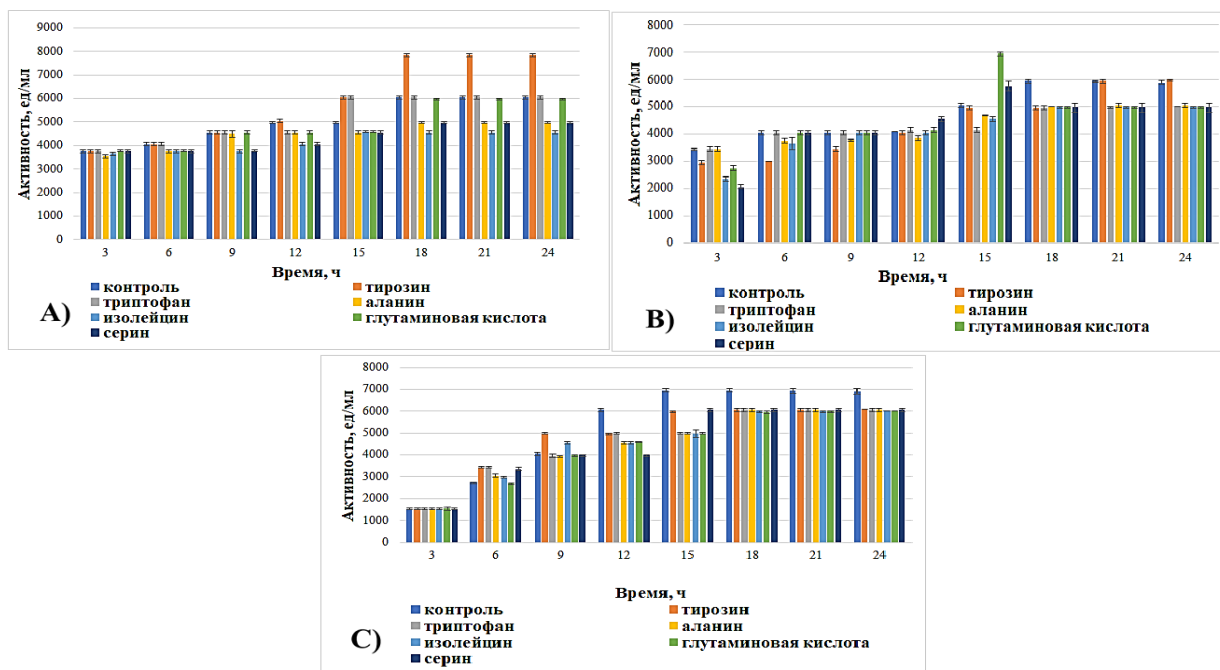


Рисунок 3. Антимикотическая активность *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штаммов 194 (А), F-116 (В) и F-119 (С) против *C. albicans* INA 00763, в динамике роста в среде с добавлением аминокислот. Контроль - штамм без добавления аминокислот

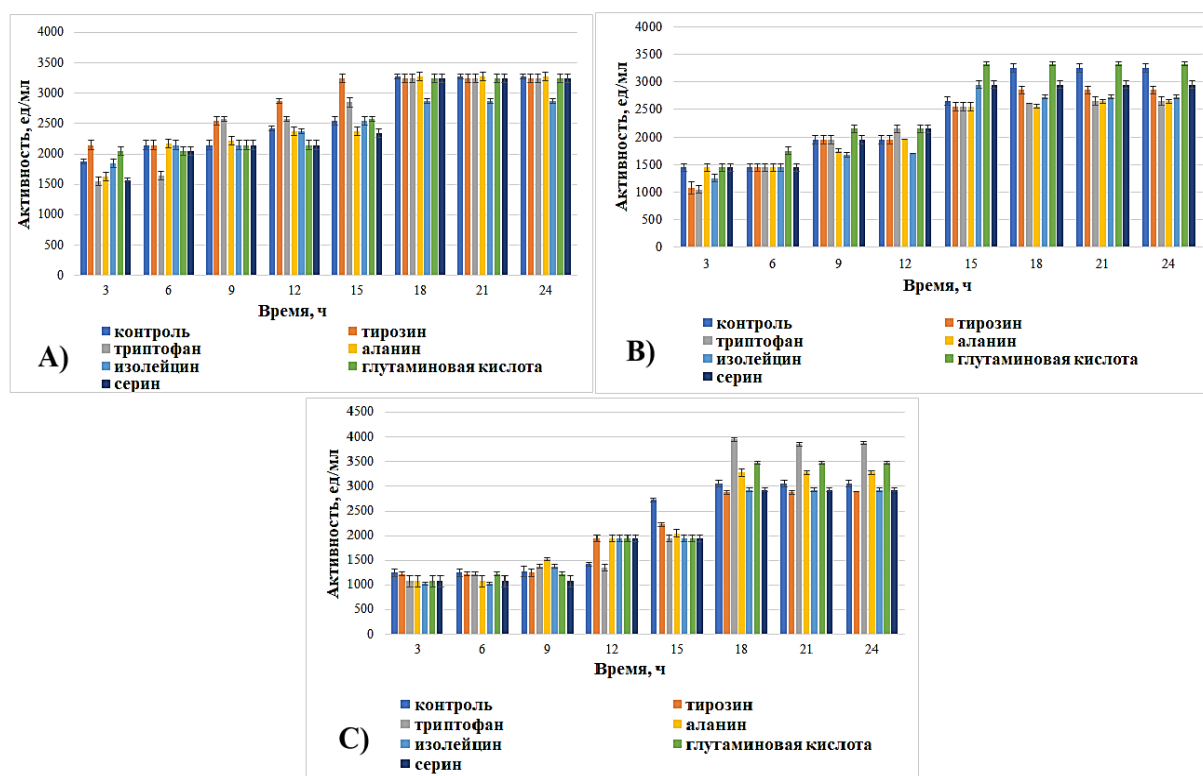


Рисунок 4. Антимикотическая активность *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штаммов 194(А), F-116 (В) и F-119 (С) против *A. niger* INA 00760, в динамике в среде с добавлением аминокислот. Контроль – штамм без добавления аминокислот

Установленная у исследуемых лактококков антимикотическая 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, поэтому 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.

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

Установлено, что исследуемые штаммы лактококков способны как к внутри-, так и внеклеточной продукции нейромедиаторов на разных этапах роста. Из полученных результатов видно, что штаммы 194, F-116 и F-119 внутри- и внеклеточно за 9 часов культивирования повышали концентрацию 5-НТР - предшественника серотонина (Рисунки 5-7А и С), а за 24 ч культивирования синтезировали катехоламины - адреналин и дофамин (Рисунки 5-7В и D). Так, 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). 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).

Также из Рисунков 5-7 видно, что аминокислоты не влияют на внутри- и внеклеточную концентрацию у лактококков предшественника 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.

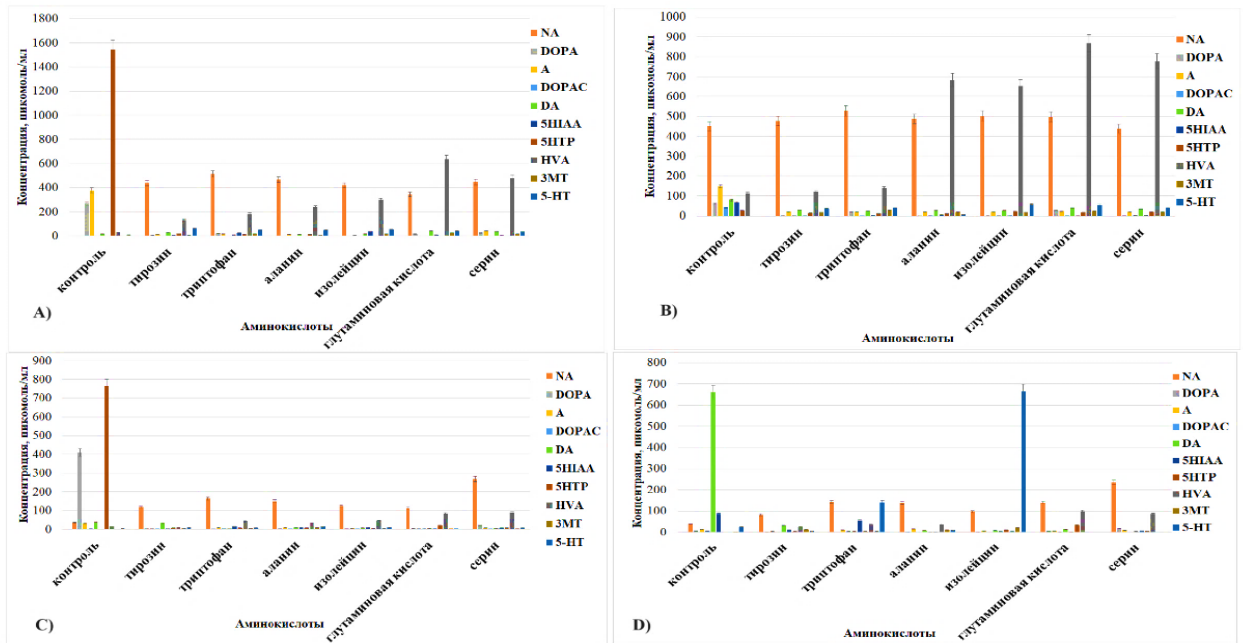


Рисунок 5. Влияние аминокислот на внеклеточную (А и В) и внутриклеточную (С и Д) концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма 194 за 9 и 24 ч культивирования. Контроль – штамм без добавления аминокислот; DOPAC - 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота, HVA - гомовалиновая кислота, NA - норадреналин, DA - дофамин, 3-МТ - 3 - метокситирамин, DOPA - дигидроксифенилаланин, 5НІАА - 5 – оксииндолуксусная кислота, 5-НТ - серотонин, А - адреналин, 5НТР- 5 – гидрокситриптофан

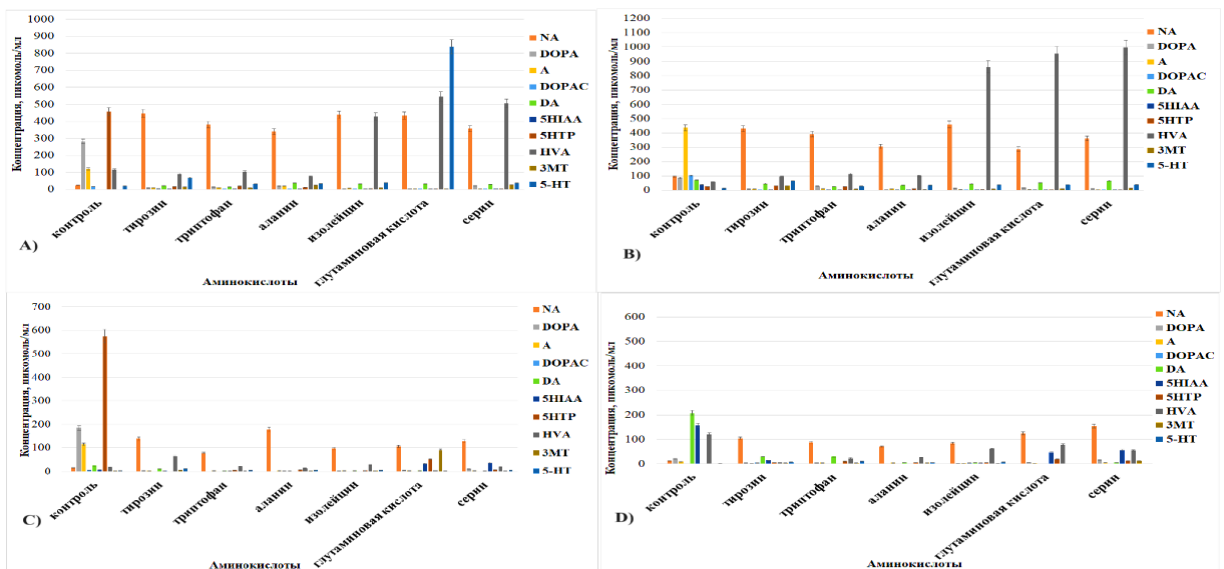


Рисунок 6. Влияние аминокислот на внеклеточную (А и В) и внутриклеточную (С и Д) концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма F-116 за 9 и 24 ч культивирования. Контроль – штамм без добавления аминокислот; DOPAC - 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота, HVA - гомовалиновая кислота, NA - норадреналин, DA - дофамин, 3-МТ - 3 - метокситирамин, DOPA - дигидроксифенилаланин, 5НІАА - 5 – оксииндолуксусная кислота, 5-НТ - серотонин, А - адреналин, 5НТР- 5 – гидрокситриптофан

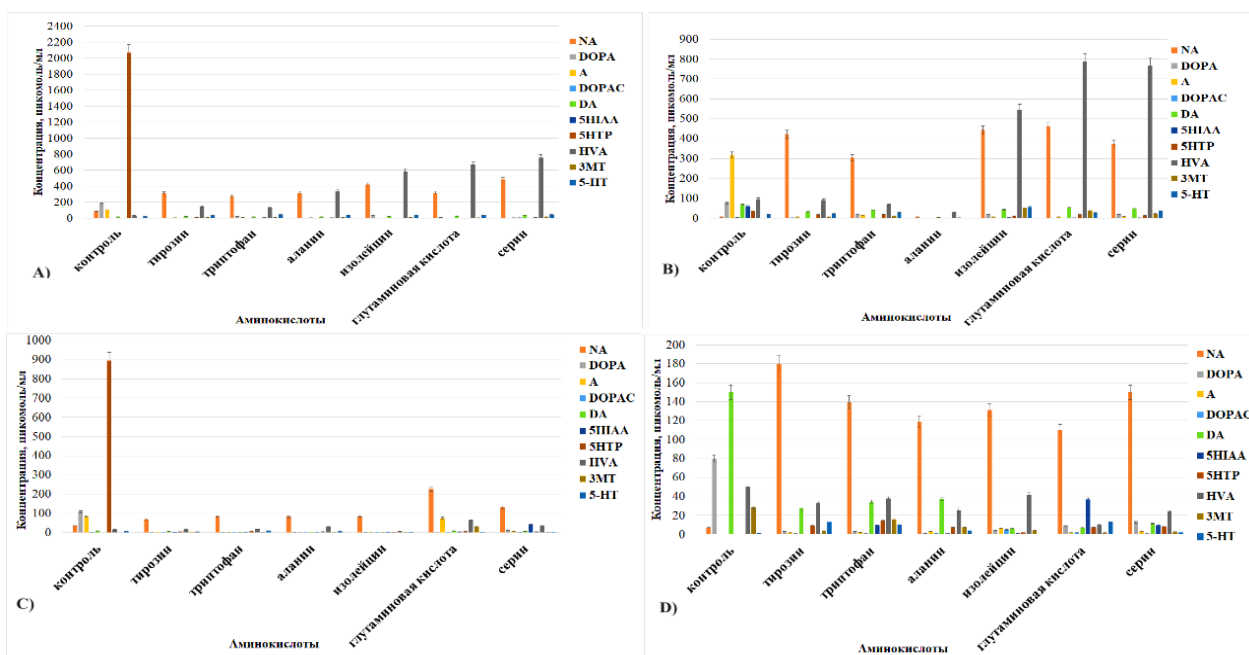


Рисунок 7. Влияние аминокислот на внеклеточную (А и В) и внутриклеточную (С и Д) концентрацию нейромедиаторов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамма F-119 за 9 и 24 ч. Контроль – штамм без добавления аминокислот; DOPAC - 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота, HVA - гомовалининовая кислота, NA - норадреналин, DA - дофамин, 3-МТ - 3 - метокситирамин, DOPA - дигидроксифенилаланин, 5HIAA - 5 – оксииндолуксусная кислота, 5-НТ - серотонин, А - адреналин, 5НТР- 5 – гидрокситриптофан

Суточные культуры исследуемых штаммов при добавлении в среду аминокислот как предшественников нейромедиаторов в разной степени (как вне-, так и в клетке) образуют гомовалининовую кислоту, серотонин и норадреналин. У штамма F-116 серин и глутаминовая кислота стимулировали образование гомовалининовой 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 (Рисунок 6А) 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 (Рисунок 5D), связано с тем, что помимо таких свойств, как: синтез гемоглобина, регуляция и стабилизация содержания сахара в крови, участие в процессах энергоснабжения, данная аминокислота может принимать активное участие в регуляции синтеза серотонина (Кузьмин и др., 2022).

Изучение состава короткоцепочечных жирных кислот, синтезируемых лактококками

Как показали результаты ГЖХ, количество уксусной, пропионовой, изомаляной, масляной, изовалериановой кислот в культуральной жидкости всех штаммов лактококков увеличивалось в экспоненциальной фазе роста, а длинноцепочечных жирных кислот (C₅ - C₇) уменьшалось. 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. У штамма 194 максимальная концентрация масляной кислоты составила 0,085 ммоль/л, а изомаляной кислоты 0,119 ммоль/л за 5 и 9 ч культивирования. Содержание изовалериановой кислоты было повышено у штамма F-116 (0,116 ммоль/л) за 5 ч культивирования. Пропионовая, масляная и валериановая кислоты участвуют в синтезе нейромедиаторов. В следовых количествах капроновая кислота обнаружена в лаг-фазе роста *L. lactis* subsp. *lactis* у штаммов F-116 и F-119 (Таблица 1).

Таблица 1.

Короткоцепочечные жирные кислоты, образуемые *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* в динамике роста в биосинтетической среде

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	0,024 ± 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	0,025 ± 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	0,020 ± 0,01	0,045 ± 0,01	0,050± 0,01	0	0,014 ± 0,01	0	0

C2 - уксусная кислота, C3 - пропионовая кислота, C4. - изомасляная кислота, C4 - масляная кислота, C5. - изовалериановая кислота, C5 - валериановая кислота, C6. - изокапроновая кислота, C6 - капроновая кислота, C7- 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 толстом кишечнике, а капроновая кислота и более длинноцепочечные жирные кислоты наиболее эффективны в качестве антимикробных соединений (Sjögren et al., 2003). Известно, что КЦЖК (пропионовая, масляная и валериановая кислоты) могут напрямую влиять на мозг, пересекая гемато - энцефалический барьер (ГЭБ), усиливая целостность ГЭБ, модулируя нейротрансмиссию, влияя на уровни нейротрофических факторов и способствуя биосинтезу серотонина (Mohajeri et al., 2018).

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

Одним из условий отбора пробиотических культур является наличие у микроорганизмов колонизационного потенциала, то есть способности сохраняться в пищеварительном тракте до достижения максимального положительного действия (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 (Рисунок 8А). 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 8В).

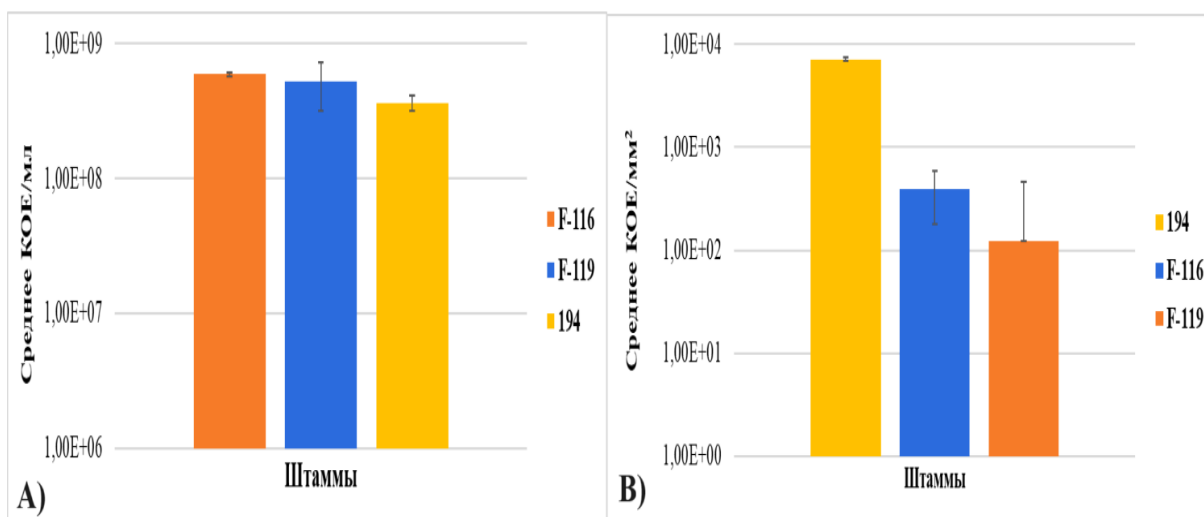


Рисунок 8. Количество КОЕ в культуре (А) и в биопленке (В) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штаммов 194, F-116, F-119

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.

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

На основании полученных результатов был отобран штамм 194 как основа для создания БАД. Штамм 194 лиофилизировали с использованием криопротекторов, которые оценили на биотоксичность с помощью тест - системы «Эколюм-08». В качестве криопротекторов использовались: физраствор, обезжиренное молоко, 10% сахара+5% желатин и бентонит в концентрациях от 1 до 10%.

При экспресс-исследовании в течение 30 мин 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 (Таблица 2).

Оценка биологической активности сред с помощью бактериально-люминесцентного теста «Эколюм-08» по интенсивности свечения и определение индекса токсичности

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

Исходя из требований, предъявляемым к БАДам, сохранение жизнеспособности при транспортировке и длительном хранении является важным показателем. 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 3 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%.

Таблица 3.

Оценка жизнеспособности *Lactococcus. lactis* ssp. *lactis* штамма 194

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. Сам бентонит обладает полезными для организма человека свойствами: высокой сорбционной активностью в отношении токсинов, солей тяжелых металлов, патогенной микробиоты, способен интенсифицировать обменные процессы в организме (Данилов, Воробьев, 2012). 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.

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

Были проведены тесты «Открытое поле» (бесстрессорная и стрессогенная модификации) и «Светлая-темная камера», используемых в нейробиологических и психофармакологических исследованиях, с помощью которых можно оценить выраженность и динамику отдельных поведенческих элементов, уровень эмоционально - поведенческой и исследовательской активностей (Yang et al., 2011).

Данные по латентному периоду (выход из центрального отсека камеры) демонстрируют быстроту реакции «избегания» (уход на безопасную половину камеры) и большей способности к выживанию у крыс опытной группы. Другим важным элементом являются стойки (подъем на задние лапы) - комплекс врожденных действий, позволяющих животному осуществлять контакт с элементами среды (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 животных в первую минуту. На Рисунке 9 видно, что лучшие показатели по латентному периоду выхода и стойкам в первую минуту в тесте «Открытое поле» - бесстрессогенная модификация были у крыс группы «опыт - бактерии», которых кормили культуральной жидкостью штамма 194 ($0,4 \times 10^7$ КОЕ/мл). Таким образом, животные из опытной группы демонстрируют повышенный уровень ориентировочно-исследовательской активности и пониженный уровень тревожности.

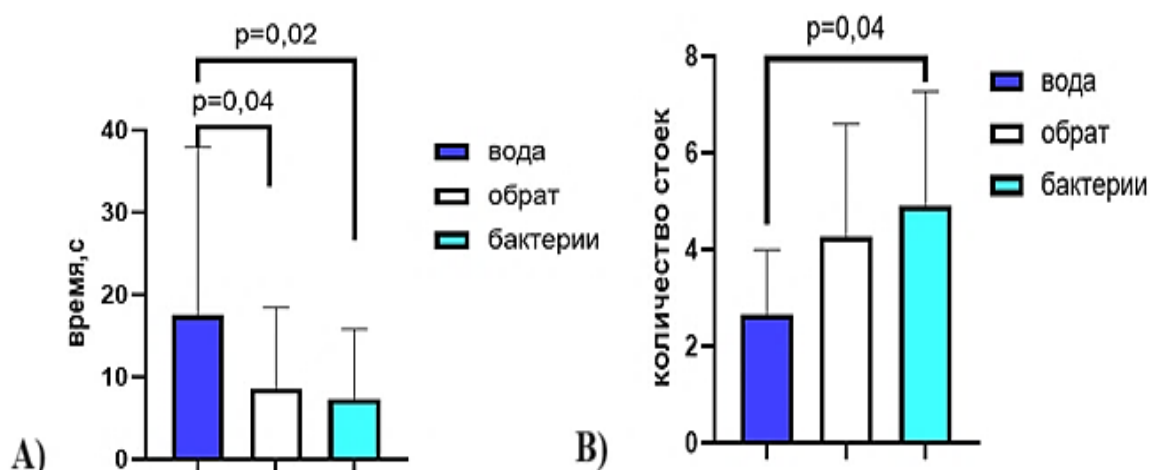


Рисунок 9. Латентный период выхода (А) и стойки (В) крысят в первую минуту в тесте «Открытое поле» - бесстрессогенная модификация на 30-й постнатальный день (ПНД) Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего, Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparisons ($p \leq 0,04$)

Результаты по другому варианту теста «Открытое поле» - стрессогенная модификация и тесту «Светлая - темная камера» показали, что крысы из группы «опыт - бактерии» демонстрировали снижение актов груминга (умывания). Как известно, груминг является специфической поведенческой реакцией грызунов на стрессовую ситуацию. Подтверждением этого мнения является тот факт, что анксиолитические (противотревожные) препараты приводят к уменьшению продолжительности груминга (Kametani, 1988). Таким образом, полученные данные свидетельствуют об уменьшении эмоциональности даже при внешнем стрессоре (красная лампа, электрический звонок) и, как следствие, снижении уровня тревожности (Рисунок 10). Вероятнее всего бактерии оказывают противотревожное действие на животных.

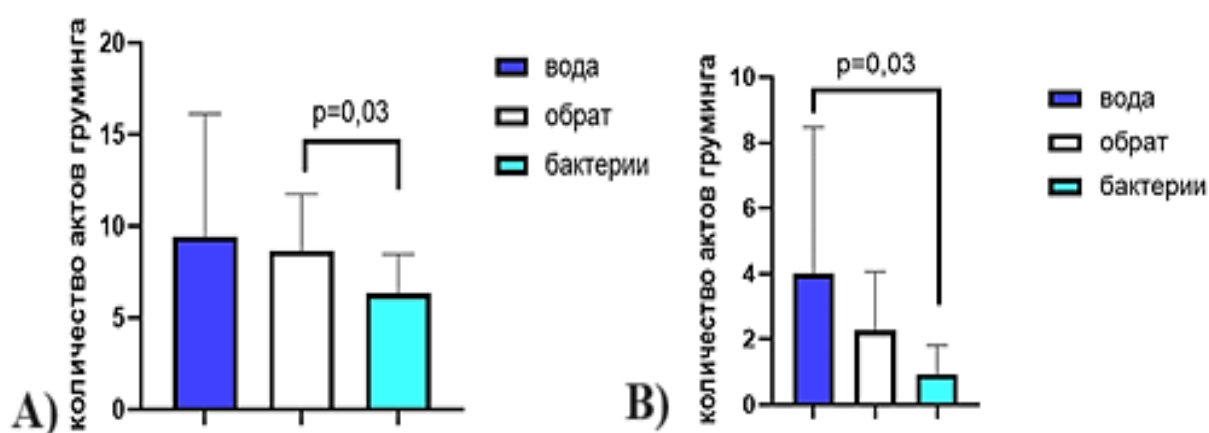


Рисунок 10. Суммарное количество актов груминга крысят в тесте «Открытое поле»-стрессогенная модификация на 34 ПНД (А) и акты груминга в тесте «светлая - темная камера» на 33 ПНД (В)

Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего, Mann-Whitney test ($p \leq 0,03$) и тест one-way ANOVA ($p \leq 0,03$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для исследований были отобраны 3 штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ранее выделенные из коровьего молока фермы из Бурятии и 2 штамма, полученные методом слияния протопластов близкородственных штаммов этого же подвида с низкой низинсинтезирующей активностью. Перед проведением экспериментов штаммы восстановили из лиофильного состояния. Была исследована их антимикробная активность и влияние аминокислот, вводимых в среду культивирования, на рост и продукцию антимикробных компонентов широкого спектра действия на *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* и *Aspergillus niger*. Показана способность штаммов лактококков к синтезу нейромедиаторов, их предшественников и продуктов метаболизма в динамике роста, а также влияние аминокислот на вне- и внутриклеточное содержание штаммами нейроактивных соединений. 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. Исследована способность штаммов *L. lactis* ssp. *lactis* к синтезу короткоцепочечных жирных кислот, влияющих на синтез нейромедиаторов и препятствующих размножению гнилостных и патогенных микробов. Штамм 194 синтезировал масляную и изомасляную кислоты, штамм F-116 - изовалериановую кислоту. Показана способность штаммов лактококков к формированию биопленок на абиотических поверхностях (адгезионные показатели), по результатам исследования лучшим был *L. lactis* ssp. *lactis* штамм 194. С учетом анализа пробиотических показателей, был отобран природный штамм *L. lactis* ssp. *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. Разработанная полифункциональная пищевая добавка на основе *L. lactis* ssp. *lactis* штамма 194 показала повышение ориентировочно-исследовательской активности и снижение тревожности у крыс препубертатного периода, 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных
Scopus, WoS 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. Вклад автора в печатных листах: (0,885/0,708) (Здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. **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. (1,919/1,535)
3. 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. (0,894/0,447)
4. 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. (0,809/0,404)

Прочие публикации:

1. Стоянова Л.Г., Сорокина Е.В., **Дбар С.Д.** Скрининг перспективных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* для создания нетоксичных антимикотиков // Проблемы медицинской микологии. – 2020. – Т. 22. – №. 4. – С. 46 - 53. DOI: 10/24412/1999-6780-2020-4-46-53. IF (РИНЦ) - 0,333.