

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Климко Алёна Игоревна

**АДАПТАЦИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ МОЛОЧНОКИСЛОЙ БАКТЕРИИ
LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS КМ МГУ 529 К РОСТУ В
АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ**

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

Нетрусов Александр Иванович;

кандидат биологических наук, доцент

Брюханов Андрей Леонидович

Москва – 2023 г.

Оглавление

Глава 1. Введение	7
Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.....	7
Цель и задачи работы	8
Объект и предмет исследования.....	9
Научная новизна исследования.....	9
Теоретическая и практическая значимость работы	10
Личный вклад автора.....	11
Методология и методы исследования	11
Степень достоверности и апробация результатов	11
Благодарности.....	12
Структура и объем диссертации.....	12
Публикации	12
Глава 2. Обзор литературы	13
2.1. Молочнокислые бактерии (МКБ) как пробиотики.....	13
2.2. Представители семейства <i>Lactobacillaceae</i>	14
2.3. Свойства лактобацилл	24
2.3.1. Биохимические свойства.....	25
2.3.1.1. Пути сбраживания гексоз	25
2.3.2. Общие механизмы действия пробиотических лактобактерий на организм хозяина. Адаптация и пробиотические факторы лактобацилл	29
2.3.3. Адгезия.....	30
2.3.3.1. Строение клеточной стенки	32
2.3.3.2. Взаимодействие клеток молочнокислых бактерий с ЖКТ.....	36
2.3.3.3. Образование биоплёнок, гидрофобность, агглютинация.....	38
2.3.4. Антимикробные свойства	42
2.3.5. Выживаемость пробиотических микроорганизмов в отделах ЖКТ	45
2.4. Отношение молочнокислых бактерий к кислороду	46
2.4.1. Токсичность аэробных условий для молочнокислых бактерий.....	49
2.4.1.1. Электрон-транспортные цепи, участвующие в поглощении кислорода клетками МКБ	51
2.4.1.2. Действие активных форм кислорода на клетки	55
2.4.1.3. Ферменты антиоксидантной защиты в клетках МКБ.....	60
2.4.1.4. Химические элементы и вещества, обеспечивающие антиоксидантную защиту в клетках МКБ.....	67
2.4.1.5. Регуляторный белок СсрА.....	69
2.4.1.6. Некоторые гены МКБ, потенциально отвечающие за дыхание	71
2.4.2. Адаптации МКБ к стрессовым воздействиям	74
2.4.3. Взаимодействие клеток МКБ с аскорбиновой кислотой.....	75

2.5. Применение антиоксидантных свойств МКБ в пищевой промышленности и медицине.....	76
2.5.1. Пробиотический потенциал <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	79
Глава 3. Материалы и методы	82
3.1. Штаммы МКБ и их культивирование	82
3.2. Определение адгезивных свойств у МКБ	84
3.2.1. Измерение гидрофобности клеточной поверхности	84
3.2.2. Определение способности к агглютинации клеток МКБ с конканавалином А	85
3.2.3. Определение способности МКБ к образованию биоплёнок.....	86
3.3. Определение антимикробной активности МКБ	86
3.4. Определение ингибирования автоокисления аскорбата.....	87
клетками МКБ	87
3.5. ПЦР с вырожденными праймерами для поиска генов антиоксидантной защиты.....	87
3.5.1. Выделение хромосомной ДНК	87
3.5.2. ПЦР	88
3.6. Определение активностей ферментов антиоксидантной защиты.....	90
3.6.1. Определение супероксиддисмутазной (СОД) активности.....	90
3.6.2. Определение каталазной активности.....	91
3.6.3. Определение пероксидазной активности	92
3.7. Культивирование <i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529 и <i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 161, физиолого-биохимический анализ	93
3.7.1. Получение мембранных фракций	94
3.7.2. Полярографический анализ	94
3.7.3. Измерение спектров поглощения.....	95
3.7.4. Определение глюкозы	95
3.7.5. Определение сухой биомассы и белка	95
3.8. Масс-спектрометрический анализ	96
3.8.1. MALDI-TOF MS/MS.....	96
3.8.2. Безметочная количественная масс-спектрометрия	96
3.9. Статистический анализ.....	97
Глава 4. Результаты и обсуждение.....	99
4.1. Пробиотические свойства МКБ. Адгезивные свойства.....	99
4.1.1. Гидрофобность клеточной поверхности	99

4.1.2.Агглютинация с лектинами	102
4.1.3.Образование биоплёнок	103
4.2.Антимикробная активность МКБ в отношении условно-патогенных микроорганизмов	106
4.3.Ингибирование автоокисления аскорбата клетками МКБ	108
4.4.Гены антиоксидантной защиты в геномах лактобацилл, найденные с помощью вырожденных ПЦР-праймеров.....	110
4.5.Активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты в клетках исследуемых МКБ	114
4.6.Влияния аэробных и дыхательных условий культивирования на рост <i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	116
4.6.1. Разностные спектры поглощения мембранных фракций <i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	118
4.6.2.Потребление кислорода препаратами мембран, выделенных из <i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	120
4.6.3.Механизмы адаптации <i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529 к аэробному росту	122
Заключение	141
Выводы	142
Список литературы.....	144

Список использованных сокращений

α -АЛС – α -ацетолактатсинтаза

МД – малатдегидрогеназа

ОС – олигосахарид

АГ – арабиногалактан

АДГ – алкогольдегидрогеназа

АК – ацетаткиназа

АЛД – α -ацетолактатдекарбоксилаза

АЛС – α -ацетолактатсинтаза

АМК – активные метаболиты кислорода

АР – ацетоинредуктаза

АФК – активные формы кислорода

АЦДГ – ацетальдегиддегидрогеназа

БДД – бутандиолдегидрогеназа/диацетилредуктаза

ГАФДН – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа
ГоПС – гомополисахарид
ГОС – глюкоолигосахарид
ГСН – галактоолигосахарид камедь
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
КАТ – каталаза
ЛДГ – лактатдегидрогеназа
ЛО – лактатоксидаза
ЛТК – липотейхоевая кислота
МКБ – молочнокислые бактерии
ОАД – оксалоацетатдекарбоксилаза
ПГ – пептидогликан
ПДГ – пируватдегидрогеназа
ПК – пируваткарбоксилаза
ПО – пируватоксидаза
ПФЛ – пируват-формиат-лиаза
СОД – супероксиддисмутаза
СТК – стеновые ТК
ТК – тейхоевая кислота
ФОС – фруктоолигосахарид
ФП – фосфокетотазный путь
ФТА – фосфотрансацетилаза
ЦЛ – цитратлиаза
ЭПС – экзополисахарид
ЭТЦ – электрон-транспортная цепь
CbsA – коллаген-связывающий белок
CydA – цитохром *d*-оксидаза
GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа
GlcNAc – N-ацетилглюкозамин
GSH – глутатион
GshR – глутатионредуктаза
IMOS – изомальтозо-олигосахарид
Mn-Kat – марганец-содержащая каталаза
MQ (MX) – менахинон
MQH₂ – менахинол

MRC – питательная среда Мана-Рогозы-Шарпа

NOX – НАДН-оксидаза

PD– полидекстроза

PHGG – частично гидролизованная гуаровая камедь

PTS – фосфотрансферазные системы

RS – резистентный крахмал

TRX –тиоредоксинредуктаза

XOS – ксило-олигосахарид

Глава 1. Введение

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Молочнокислые бактерии (МКБ) или лактобактерии широко используют во многих ферментационных процессах при приготовлении разнообразных продуктов питания, включающих в себя не только молочные и мясные, но также и овощные продукты. Основной функцией МКБ является синтез молочной кислоты (в качестве основного метаболита), которая снижает pH среды и предотвращает рост гнилостных бактерий. Продукты брожения, такие как уксусная кислота, этанол и экзополисахариды, являются полезными для создания желаемого вкуса и текстуры ферментированных продуктов (De Angelis, Gobbetti, 2004; Gänzle, 2015).

Стоит отметить, что данные микроорганизмы широко применяются и в медицине. Так, употребление пробиотиков способствует улучшению здоровья организма-хозяина. Они способны положительно влиять на состав кишечной микробиоты и синтезируют биоактивные соединения, обладающие активностью в отношении различных патогенных и условно-патогенных бактерий, грибов или вирусов (Guo et al., 2013; Нохха et al., 2023). Пробиотический микроорганизм должен обладать рядом определённых качеств, среди которых необходимо отметить способность к адгезии с эпителиальными клетками кишечника организма-хозяина и антимикробные свойства (Zawistowska-Rojek et al., 2022).

Для того, чтобы лактобактерии смогли оказать положительное влияние на организм хозяина, они должны образовывать ассоциации с эпителиальными клетками ЖКТ человека и животных. Эти ассоциации обладают характеристиками бактериальных биопленок (Walter et al., 2008). Таким образом, биопленки представляют собой естественную форму клеточной иммобилизации, в том числе и в ЖКТ (Kumar, Anand, 1998; Gao et al., 2022a).

МКБ могут эффективно подавлять рост различных патогенных микроорганизмов (в частности, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* и *Salmonella* spp.) за счет синтеза антимикробных веществ: кислот, бактериоцинов, пероксида водорода и т.д. (De Vuyst, Leroy, 2007; Нохха et al., 2023). Но данные положительные качества МКБ как пробиотиков индивидуальны для каждого штамма. Кроме того, в ходе промышленных биотехнологических процессов (сепарация, распылительная сушка) лактобактерии часто подвергаются окислительным стрессам, которые возникают из-за накопления активных форм кислорода (АФК) внутри клеток. АФК образуются в результате неполного восстановления молекулярного кислорода до супероксид-радикала ($O_2^{\cdot-}$), пероксида водорода (H_2O_2) или гидроксильного радикала (OH^{\cdot}); они вызывают повреждения клеточных макромолекул (белков, липидов и нуклеиновых кислот), что, в свою очередь,

может привести к подавлению роста культуры и последующей гибели клеток (Guo et al., 2023). Поэтому способность противостоять негативным последствиям окислительных стрессов является очень важным свойством.

МКБ относят к аэротолерантным анаэробам. У МКБ отсутствуют гены полного пути биосинтеза гема, лишь представители некоторых родов, включая *Lactococcus*, синтезируют менахинон (Pedersen et al., 2012). При дыхательном культивировании (в присутствии гемина и/или менахинона) у некоторых МКБ функционирует электрон-транспортная цепь (ЭТЦ), состоящая из НАДН-дегидрогеназы, менахинона и хинолоксидазы *bd*.

По современным представлениям перспективными технологичными способами получения стартовых и пробиотических культур МКБ является культивирование в аэробных и дыхательных условиях. В последнем случае МКБ выращивают в присутствии экзогенного гемина (лактококки) или гемина и менахинона (лактобациллы) (Zotta et al., 2017; Siciliano et al., 2019; Johanson et al., 2020). МКБ, выращенные в аэробных/дыхательных условиях, образуют больше ароматических соединений, демонстрируют повышенную устойчивость к окислительным стрессам, замораживанию, лиофильной сушке и длительному хранению, а в случае дыхательного культивирования дают более высокий выход биомассы по сравнению с анаэробными культурами. В этой связи аэробное/дыхательное культивирование рассматривают как перспективный подход для получения, хранения и реализации замороженных или лиофилизированных заквасок и пробиотических культур МКБ.

В связи с вышесказанным механизмы адаптации МКБ к аэробному росту требуют всестороннего изучения. В настоящее время влияние аэробноза на метаболизм наиболее охарактеризовано у *Lactococcus lactis* (Larsen et al., 2016), *Lactiplantibacillus plantarum* (Stevens et al., 2008; Mazzeo et al., 2012) и *Lacticaseibacillus casei* (Siciliano et al., 2019). В данной работе, используя протеомный, геномный и биохимический анализ, была впервые исследована адаптация *Lacticaseibacillus rhamnosus* к аэробному росту, а также впервые продемонстрировано функционирование ЭТЦ у МКБ на уровне мембран.

Цель и задачи работы

Целью данной работы являлся поиск штамма МКБ с выраженными пробиотическими свойствами, а также обладающего высокой степенью адаптации к присутствию кислорода.

В соответствии с целью решали следующие задачи:

1. Исследование пробиотических свойств различных видов и штаммов МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.
2. Изучение влияния аэробных/дыхательных условий культивирования на рост *L. rhamnosus* КМ МГУ 529.
3. Изучение механизмов адаптации *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к росту в аэробных условиях.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования являлись 33 штамма МКБ из коллекции микроорганизмов (КМ) кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. Основным объектом служил штамм *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529, выделенный на кафедре микробиологии из фекального образца четырёхмесячного младенца.

Предметом исследования являлось изучение пробиотических свойств МКБ, механизмов адаптации *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к росту в аэробных условиях, строения и функционирования ЭТЦ данной лактобациллы.

Научная новизна исследования

Были изучены штаммоспецифичные пробиотические свойства МКБ (адгезия, способность к образованию биоплёнок, антимикробная и антиоксидантная активности) из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. Впервые исследована адаптация *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529 к росту в аэробных условиях.

Протеомный анализ помог выявить некоторые молекулярные механизмы такой адаптации. Для 39 из 57 белков, уровень которых изменялся при аэробном культивировании с перемешиванием по сравнению со статичным ростом, впервые показан O_2 -чувствительный синтез у МКБ. Среди белков, уровень которых в клетках возрастал, следует выделить следующие: родственный пиридоксин-5'-фосфат-оксидазе белок, шаперонин GroES, универсальный стрессовый белок, белок семейства ThiJ/PfpI, НАДН:флавин-оксидоредуктазу семейства ОУЕ, дегидрогеназу β -гидроксикислот, регулятор транскрипции фактора устойчивости к органическим гидропероксидам, связывающийся с рибосомой фактор А и тРНК-сульфотрансферазу. Уровень ряда ферментов, таких, как аспартатаминотрансфераза, алкилгидропероксидредуктаза С, аденозилкобаламин-зависимая рибонуклеозидтрифосфатредуктаза, дезоксиаденозинкиназа/дезоксигуанозинкиназа в аэрируемых клетках *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 снижался. Впервые показано

повышение уровня ферментов пути синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов при аэробном росте у МКБ.

Впервые была измерена активность ЭТЦ на препаратах мембран у МКБ. При этом продемонстрировано *in vitro* свойство экзогенного менахинона переносить электроны от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинолоксидазе *bd* у МКБ.

Были впервые сконструированы вырожденные праймеры для поиска ключевых генов антиоксидантной защиты, кодирующих супероксиддисмутазу (*sod*), каталазу (*cat*), Fe-содержащую пероксидазу (*per*) и пероксиредоксин (*prx*) в клетках лактобацилл, а также определены активности соответствующих ферментов антиоксидантной защиты в различных клеточных фракциях.

Теоретическая и практическая значимость работы

Расшифрованы новые молекулярные механизмы адаптации МКБ к условиям аэробного роста, что открывает пути к лучшему пониманию природы аэротолерантности МКБ и клеточного ответа на окислительные стрессы. Факт, что синтез восьми белков с неизвестной функцией чувствителен к аэрации у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529, поможет в дальнейшем определить их физиологическую роль в метаболизме МКБ. Демонстрация *in vitro* способности экзогенного менахинона переносить электроны от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинолоксидазе *bd* позволила впервые подтвердить функционирование дыхательной цепи у МКБ на уровне ферментативной активности мембран.

Показано, что важнейшие пробиотические свойства МКБ (гидрофобность клеточной поверхности, образование биоплёнок, антимикробная активность, ингибирование автоокисления аскорбата, наличие генов и ферментов антиоксидантной защиты) являются штаммоспецифичными.

Практическая значимость работы заключается в выявлении штамма МКБ с выраженными пробиотическими свойствами и высокой степенью адаптации к аэробному культивированию, что важно на различных стадиях биотехнологических процессов получения, хранения и транспортировки пробиотических препаратов. Аэробное выращивание *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 позволит повысить устойчивость биопрепарата на его основе к окислительным стрессам, а аэробное выращивание в присутствии гемина и менахинона (дыхательный режим культивирования) может служить перспективным технологическим подходом для повышения выхода биомассы этого потенциального пробиотика.

Личный вклад автора

А.И. Климко внесла существенный вклад в планирование и проведение экспериментальной части работы, анализ данных и подготовку публикаций к печати по материалам исследования. Ею написаны диссертация и автореферат к ней.

Методология и методы исследования

Автором выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, планирование и проведение экспериментальной и теоретической частей работы с использованием современных методов микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, молекулярной биофизики и биоинформатики. Полученные результаты были проанализированы, систематизированы и изложены в тексте данной работы, сформулированы выводы.

Положения, выносимые на защиту

1. Лактобациллы, хранящиеся в коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, обладают следующими пробиотическими свойствами, выраженными в разной степени и имеющими штаммоспецифичный характер: адгезией, способностью к образованию биоплёнок, а также антимицробной и антиоксидантной активностями.

2. В случае аэробного культивирования в присутствии гемина и менахинона (дыхательные условия) *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 реализует дыхательный метаболизм. При этом выход биомассы увеличивается на 27%. Дыхательная цепь *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 состоит из НАДН-дегидрогеназы 2, менахинона и хинолоксидазы *bd*, и характеризуется высокой НАДН-оксидазной и хинолоксидазной активностями.

3. *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 обладает высокой степенью адаптации к присутствию кислорода, выражающейся в перестройке углеродного метаболизма, индукции биосинтеза флавиновых оксидаз, ферментов, участвующих в детоксикации АФК, стрессовых белков, ферментов пути синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов.

Степень достоверности и апробация результатов

При выполнении диссертационного исследования использованы современные и адекватные поставленным задачам микробиологические, биохимические и молекулярные методы. Достоверность представленных данных подтверждается достаточным количеством повторностей (не менее трёх) при проведении экспериментов и использованием методов статистической обработки. При написании обзора литературы и обсуждении результатов использованы современные источники по теме исследования в рецензируемых журналах.

Достоверность полученных результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах. Результаты диссертации были представлены на следующих международных конференциях: «Ломоносов-2021» (Москва, 2021), «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019), «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2015 и 2017).

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность к.б.н., доц. Андрею Леонидовичу Брюханову и д.б.н., проф. Александру Ивановичу Нетрусову за руководство данной работой, всестороннюю методическую и моральную поддержку. Всем сотрудникам кафедры микробиологии, в первую очередь, к.б.н. Татьяне Юрьевне Динариевой и к.б.н. Татьяне Андреевне Чердынцевой за неоценимую помощь в выполнении экспериментальной части данной работы.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов работы и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 182 страницах, содержит 15 рисунков, 19 таблиц и 1 приложение. Список литературы включает 308 источников.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 статей 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.

Глава 2. Обзор литературы

2.1. Молочнокислые бактерии (МКБ) как пробиотики

Сегодня в мире очень широко распространены про- и пребиотические препараты. Основной составной частью многих из них являются представители семейства *Lactobacillaceae*.

Пробиотики – живые микроорганизмы, которые положительно влияют на здоровье человека или животных (Guarner, Schaafsma, 1998; Hill et al., 2014; Zielińska et al., 2018). Микроорганизмы, используемые в качестве пробиотиков, классифицируют на 4 основные группы:

- микроорганизмы, продуцирующие молочную и пропионовую кислоты (*Lactobacillaceae*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* и др.);
- спорообразующие аэробы рода *Bacillus*;
- дрожжи родов *Saccharomyces* и *Candida*;
- комбинации перечисленных организмов.

Пробиотические организмы должны отвечать следующим требованиям:

- пробиотические микроорганизмы должны быть живыми;
- благотворное влияние пробиотика на организм человека или животных должно быть документально подтверждено;
- пробиотики нужно применять в тех количествах, для которых показан положительный эффект;
- пробиотики должны быть чётко идентифицированы, отправлены в мировую коллекцию, чтобы исследователи могли повторить опубликованные результаты;
- пробиотики не должны обладать патогенными и токсичными свойствами;
- пробиотики должны сохраняться в течение срока годности конечного продукта.

Надо отметить, что в этот список не включили такие требования, как: способность прикрепления микроорганизмов к клеткам кишечника, устойчивость к желчи и кислотам, синтез бактериоцинов, антиоксидантную, антипатогенную активность и выживаемость в кишечном тракте. Не сделали этого потому, что круг хозяев пробиотиков широк, а поле деятельности в организме и способы их доставки к мишени разнообразны, и, следовательно, некоторые из перечисленных выше критериев будут важны только для отдельной группы пробиотиков.

Пробиотики используют для подавления патогенной, условно патогенной микрофлоры и восстановления нормальной микробиоты кишечника при острых кишечных инфекциях и дисбактериозах у детей и взрослых. В частности, *L. rhamnosus* GG обладает способностью предотвращать обострение язвенного колита, вызываемого *Clostridium difficile*, оказывает терапевтический эффект при диарее у новорожденных различной патологии (Mathipa-Mdakane, Thantsha, 2022).

Но, как показали исследования последних лет, действие пробиотиков не ограничивается коррекцией микробиоты, их клиническая эффективность основана также на иммуномодулирующих функциях и участии в обмене веществ (He, Shi, 2017; Azad et al., 2018). Выявленные области применения пробиотиков позволяют расширить показания к их назначению и конструировать препараты с заданными свойствами. В медицине первоочередным направлением является создание определенных композиций и удобных лекарственных форм препаратов. При выборе пробиотических микроорганизмов необходимо одновременно учитывать степень их устойчивости к неблагоприятным условиям пищеварительного тракта человека.

2.2. Представители семейства *Lactobacillaceae*

Род *Lactobacillus* входит в семейство *Lactobacillaceae*, порядок *Lactobacillales*, класс *Bacilli*, филум *Firmicutes*, домен *Bacteria* (Mekadim et al., 2018). Данная классификация была предложена Бейеринком в 1901 г. и включала в себя грамположительных, факультативно анаэробных и неспорообразующих бродильщиков. Она была основана на фенотипических признаках, включая оптимальную температуру роста, использование сахаров и спектры продуцируемых метаболитов. В 2020 г. в результате таксономической реорганизации молочнокислых бактерий более 300 видов из 7 родов и 2 семейств были реклассифицированы в одно семейство *Lactobacillaceae*, включающее 31 род, в том числе *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus*, *Convivina*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* и 23 новых рода, которые включают организмы, ранее классифицированные как виды *Lactobacillus* (Zheng et al., 2020).

Семейство *Lactobacillaceae* описано на основе филогеномного анализа и включает в себя все роды, ранее принадлежащие семейству *Lactobacillaceae* и *Leuconostocaceae*, т. е. *Convivina*, *Fructobacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus* и *Weissella*. Это грамположительные, неспорообразующие факультативные или строгие анаэробные бактерии. Клетки кокковидной или палочковидной формы, которые могут образовывать цепочки, пары или тетрады (род *Pediococcus*). Основным продуктом

брожения является лактат, другими продуктами могут быть ацетат, этанол, CO₂, формиат или сукцинат. Нуждаются в аминокислотах, пептидах, производных нуклеиновых кислот, витаминах, солях, жирных кислотах или сложных эфирах жирных кислот и углеводах. *Lactobacillaceae* – единственное семейство *Lactobacillales*, которое включает гомоферментативные и гетероферментативные микроорганизмы.

Таблица 1 (продолжение)

Таблица 1. Представители лактобактерий по Zheng et al., 2020

Род	Описание	Типовой штамм	Старое название (<i>Lactobacillus</i>)
Гомоферментативное брожение			
<i>Lactobacillus</i>	Грамположительные, термофильные и неспорообразующие палочки. Большинство видов <i>Lactobacillus</i> не способны потреблять пентозы, т.к. ни один из организмов не содержит гены пентозо-фосфатного пути или пируватформиатлиазы. Виды <i>Lactobacillus</i> адаптированы к хозяину и способны использовать в качестве субстратов для брожения широкий спектр углеводов. Обладают штаммоспецифической способностью сбраживать внеклеточные фруктаны, крахмал или гликоген	В исправленное описание рода включены все организмы, ранее отнесенные к группе <i>L. delbrueckii</i> .	-
<i>Amylolactobacillus</i>	Грамположительные, каталазоотрицательные, оксидазоотрицательные, неспорообразующие, неподвижные тонкие палочки (шириной 0,5–0,9 мкм и длиной 1,2–3 мкм), встречающиеся поодиночке и в коротких цепочках. Представители <i>Amylolactobacillus</i> обладают внеклеточной амилолитической активностью.	<i>Amylolactobacillus amylophilus</i> ,	<i>L. amylophilus</i> .
<i>Bombilactobacillus</i>	Термофилы, связаны с насекомыми. В качестве субстратов используют достаточно узкий спектр углеводов. Были выделены из желудка и задней кишки медоносных пчёл (<i>Apis mellifera</i>) и шмелей, где они связаны с гетероферментативным сестринским родом <i>Apilactobacillus</i> .	<i>Bombilactobacillus mellifer</i> comb. nov.	<i>L. mellifer</i>
<i>Companilactobacillus</i>	Грамположительные, неспорообразующие палочки. Требования к температуре для роста непостоянны: штаммы растут при температуре от 15 до 45°C. Способность к сбраживанию пентоз видо- или	<i>Companilactobacillus alimentarius</i> comb. nov.	<i>L. alimentarius</i> .

Таблица 1 (продолжение)

	штаммоспецифична. Информации об экологии или образе жизни <i>Companilactobacillus</i> немного: штаммы были выделены из ферментированных овощей, в частности из горчицы и зеленого лука, фруктов (17 штаммов; пять из них – из ферментированной горчицы и лука), заквасок или ферментированных зерновых культур (7 штаммов) колбасных или мясных изделий (семь типов штаммов) или других растительных источников. Один изолят получен из кисломолочного продукта. <i>Companilactobacillus</i> , по-видимому, не доминирует ни в одном из этих продуктов, но встречается постоянно. <i>Companilactobacillus metriopterae</i> была выделена из кузнечика.		
<i>Lapidilactobacillus</i>	Грамположительные палочки или кокки, неподвижные, неспорообразующие, факультативно анаэробные и каталазоотрицательные. Сбраживают пентозы. Диапазон рН для роста зависят от штамма, но оптимальный рН составляет от 6,0 до 7,0. В основном продуцируют L-молочную кислоту. Оптимальная температура для роста 30–37°C. Из аргинина не образуется аммиак.	<i>Lapidilactobacillus concavus</i> comb. nov.	<i>L. concavus/ dextrinicus</i>
<i>Agrilactobacillus</i>	Грамположительные, палочковидные, каталазоотрицательные, гомоферментативные, аэротолерантные микроорганизмы. Происхождение, физиологические свойства и особенности генома предполагают свободноживущий образ жизни представителей рода. Выделен из компоста, пюре сётю и из овощей в Индонезии и Китае.		<i>A. composti.</i>
<i>Schleiferilactobacillus</i>	Грамположительные, палочковидные, каталазоотрицательные и аэротолерантные микроорганизмы. Рост наблюдается в интервале 15–42°C, для брожения используют широкий спектр углеводов, включая пентозы, гексозы и олигосахариды Штаммы рода были выделены из испорченных напитков, включая	<i>S. perolens</i> comb. nov.	<i>L. perolens.</i>

Таблица 1 (продолжение)

	пиво и кисломолочные напитки, ферментированных овощей и злаков.		
<i>Lacticaseibacillus</i>	Неподвижные, оксидазоотрицательные палочки, часто продуцируют D(-)- и L(+)-молочную кислоту из глюкозы. Температурный диапазон для роста варьируется, но никогда не ниже 10°C и не выше 45°C. Один подвид выживает при температуре 70°C в течение 40 с. Наиболее распространенным типом пептидогликана в клеточной стенке является Lys-d-Asp. Некоторые виды сбраживают пентозы по фосфокетотлазному пути. Этот род имеет большое экономическое значение, поскольку включает в себя несколько видов, которые используются в качестве заквасочных культур при производстве молочных продуктов и в качестве пробиотиков.	<i>Lacticaseibacillus casei</i> comb. nov.	<i>L. casei</i>
<i>Latilactobacillus</i>	Штаммы вида ведут свободноживущий образ жизни и являются мезофилами. Многие штаммы являются психротрофами и растут при температуре ниже 8°C. Продуцируют D(-)- и L(+)-молочную кислоту, за исключением <i>L. fuchuensis</i> , который продуцирует только L(+)-изомер. Практическое значение в составе мясных заквасок имеют <i>L. sakei</i> и <i>L. curvatus</i> .	<i>Latilactobacillus sakei</i> comb. nov.	<i>L. sakei</i>
<i>Loigolactobacillus</i>	Неподвижные, неспорообразующие, грамположительные, каталазоотрицательные палочки, встречающиеся поодиночке и парами. Продуцируют как D(-)-, так и L(+)-молочную кислоту из D-маннозы и D-маннита. Сбраживание пентозы видоспецифично.	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> comb. nov.	<i>L. coryniformis</i>
<i>Dellaglioia</i>	Факультативно анаэробные, психрофильные, неподвижные палочки. Штаммы единственного вида, входящего в род, психротрофы и являются возбудителями порчи мяса.	<i>Dellaglioia algida</i>	
<i>Liquorilactobacillus</i>	Большинство видов подвижны, за исключением <i>L. cacaonum</i> , <i>L. hordei</i> , <i>L. mali</i> . В клеточной стенке содержат мезодиаминопимелиновую кислоту. Многие штаммы <i>Liquorilactobacillus</i> продуцируют декстран из сахарозы.	<i>Liquorilactobacillus mali</i> comb. nov.	<i>L. salivarius</i>

Таблица 1 (продолжение)

	Виды <i>Liquorilactobacillus</i> в основном были выделены из сброженного растительного сырья и водного кефира.		
<i>Ligilactobacillus</i>	Несколько видов <i>Ligilactobacillus</i> включают с себя подвижные штаммы. Некоторые штаммы экспрессируют гены, кодирующие уреазу. Большинство видов <i>Ligilactobacillus</i> были выделены из животных и человека. Некоторые представители <i>Ligilactobacillus</i> spp. также часто встречаются в ферментированных пищевых продуктах и используются в коммерческих целях в качестве заквасочных или пробиотических культур.	<i>Ligilactobacillus</i> comb. nov.	<i>salivarius</i> <i>L. salivarius</i>
<i>Lactiplantibacillus</i>	Грамположительные, неспорообразующие и неподвижные палочки. Виды <i>Lactiplantibacillus</i> сбраживают широкий спектр углеводов; большинство метаболизирует фенольные кислоты за счет активности эстеразы, декарбоксилазы и редуктазы. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> нетипичен из-за своей псевдокаталазной активности и восстановления нитратов. Виды выделяют из многих ферментированных пищевых продуктов, включая овощи, мясо, молочные продукты и злаки. Также обнаруживаются в средах обитания, связанных с насекомыми, или в качестве временных резидентов кишечной микробиоты позвоночных. Встречаются свободноживущие виды. <i>Lp. plantarum</i> широко используется в качестве модельного вида для метаболических, экологических и генетических исследований лактобактерий, имеет коммерческое значение в качестве закваски для многократной ферментации пищевых продуктов и применяется в качестве пробиотической культуры.	<i>Lactiplantibacillus</i> comb. nov.	<i>plantarum</i> <i>L. plantarum</i>
<i>Holzapfelia</i>	Грамположительные, каталазоотрицательные, гомоферментативные и аэротолерантные палочки. Типовой штамм единственного вида рода выделен из горных цветов, остальные штаммы идентифицированы в личинках пчел. <i>H. floricola</i> растет при 15°C, сбраживают	<i>H. floricola</i>	

Таблица 1 (продолжение)

	только глюкозу и фруктозу. Источники выделения, а также геномные и физиологические свойства организма указывают на насекомо- и цветочно-ассоциированный образ жизни рода.		
Гетероферментативное брожение			
<i>Furfurilactobacillus</i>	Гетероферментативные и аэротолерантные палочки. Рост наблюдается при 15°C и 37°C. Виды этого рода были выделены из закваски или испорченного пива и обладают исключительной способностью метаболизировать фенольные соединения. Экология этого рода остается в значительной степени неизученной, но, по-видимому, похожа на кочевой образ жизни <i>Lp. plantarum</i> .	<i>Furfurilactobacillus Rossiae</i> comb. nov.	<i>L. Rossiae</i> .
<i>Paucilactobacillus</i>	Грамположительные, каталазоотрицательные и аэротолерантные палочки. Рост наблюдается при температуре от 20°C до 37°C. Некоторые виды являются психротрофами, но <i>Paucilactobacillus suebicus</i> растет при 45°C. На адаптацию к обедненным гексозой местообитаниям указывает отсутствие маннитдегидрогеназы у многих штаммов этого рода. Виды <i>Paucilactobacillus</i> преимущественно сбраживают пентозы, многие штаммы не ферментируют дисахариды. Данные МКБ были выделены из ферментированного растительного материала, включая силос, соленья и фруктовые пюре.	<i>Paucilactobacillus vaccinostercus</i> comb. nov.	<i>L. vaccinostercus</i> .
<i>Limosilactobacillus</i>	Грамположительные, каталазоотрицательные, анаэробные или аэротолерантные палочки или кокки. Рост наблюдается при 37°C, а у большинства видов — при 45°C. Сбраживают относительно широкий спектр углеводов, однако некоторые виды не могут использовать глюкозу. Кислоторезистентность обычно опосредована экспрессией уреазы, глутаминазы, глутаматдекарбоксилазы и/или аргининдезимины. За исключением <i>Lm. fermentum</i> и <i>Lm. secaliphilus</i> , штаммы этого рода были выделены из кишечника. <i>Lm. reuteri</i> и	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> comb. nov.	<i>Lactobacillus reuteri</i>

Таблица 1 (продолжение)

	<p>другие штаммы этого рода продуцируют экзополисахариды из сахарозы для поддержки образования биопленок на несекреторном эпителии в верхних отделах кишечника. Виды <i>Limosilactobacillus</i>, особенно <i>Lm. reuteri</i>, производятся в промышленных масштабах для использования в качестве закваски и пробиотической культуры. Образуют ассоциации с видами <i>Lactobacillus</i>.</p>		
<i>Secundilactobacillus</i>	<p>Грамположительные и каталазаотрицательные палочки. Большинство штаммов растут при 15°C, диапазон роста рН сильно варьируется. Метаболические свойства <i>Secundilactobacillus</i> spp. соответствуют адаптации к среде обитания, обедненной гексозой. Многие штаммы этого рода не восстанавливают фруктозу до маннита, что отличает <i>Secundilactobacillus</i> от всех других гетероферментативных лактобактерий, кроме <i>Paucilactobacillus</i>. Представители этого рода метаболизируют диолы через диолгидратазу и имеют агматин-деиминазный путь. Штаммы обычно содержат гены, кодирующие трансальдолазу/транскетолазу, которые опосредуют метаболизм пентоз в пируват. Представители <i>Secundilactobacillus</i> spp. ведут свободный образ жизни и были выделены из продуктов вторичного брожения, из обеднённых гексозой мест обитания, включая силос, пиво, ликерные пюре и яблочный сидр.</p>	<i>Secundilactobacillus malefermentans</i> comb. nov.	<i>Lactobacillus collinoides</i>
<i>Levilactobacillus</i>	<p>Грамположительные и каталазоотрицательные палочки. Большинство штаммов растут при 15°C в диапазоне рН 4,0–7,0, устойчивы к кислотам. Продуцируют DL-молочную кислоту. Штаммы этого рода обычно содержат гены, кодирующие трансальдолазу/транскетолазу, которые опосредуют метаболизм пентоз в пируват. Данные МКБ ведут свободноживущий образ жизни и были выделены из закваски или ферментированных овощных продуктов, но также встречаются в качестве</p>	<i>Levilactobacillus brevis</i> comb. nov.	<i>L. brevis</i>

Таблица 1 (продолжение)

	<p>микроорганизмов, вызывающих порчу алкогольных напитков. <i>Levilactobacillus brevis</i> используется в качестве закваски в пищевых продуктах и кормах.</p>		
<i>Fructilactobacillus</i>	<p>Грамположительные, каталазоотрицательные и аэротолерантные палочки. Рост наблюдается при 15°C. По сравнению с другими молочнокислыми бактериями, связанными с насекомыми, представители этого рода сбраживают лишь небольшое количество углеводов: мальтозу и сахарозу. Большинство штаммов этого вида являются фруктофилами и используют фруктозу в качестве акцептора электронов, а не в качестве источника углерода. Несколько видов этого рода являются основными представителями микробиоты кишечника насекомых и были выделены из насекомых, цветов и испорченных или ферментированных пищевых продуктов.</p>	<i>Fructilactobacillus fructivorans</i> comb. nov.	<i>L. fructivorans</i>
<i>Acetilactobacillus</i>	<p>Грамположительные и каталазоотрицательные палочки. Мезофилы, с узким температурным диапазоном роста, кислотоустойчивы: оптимальный pH = 4,0. Спектр углеводов, поддерживающих кислотообразование, необычен, так как включает сахарные спирты и дисахариды, но исключает большинство гексоз и все пентозы. Необычные требования к субстрату и оптимальный pH для роста могут отражать экологическую связь с уксуснокислыми бактериями. Единственный представитель рода был выделен из браги из зернового уксуса.</p>	<i>Acetilactobacillus jinshanensis</i> sp. nov.	
<i>Apilactobacillus</i>	<p>Грамположительные палочки. Рост обычно наблюдается в диапазоне 15–37°C. Многие штаммы растут при pH ниже 3,0. Все штаммы этого рода превращают фруктозу в маннит и сбраживают очень мало углеводов, включая пыльцу и углеводы, связанные с пчелами, фруктозу, глюкозу и сахарозу, но не мальтозу или пентозу. По сравнению с <i>Fructilactobacillus</i>, <i>Apilactobacillus</i> ведет</p>	<i>Apilactobacillus kunkeei</i> comb. nov.	<i>L. kunkeei</i>

Таблица 1 (продолжение)

	<p>образ жизни, связанный с насекомыми, и встречается на цветках, которые служат центром распространения лактобацилл и насекомых. В отличие от <i>Fructilactobacillus</i>, <i>Apilactobacillus</i> адаптировался к пчелам, включая медоносных (<i>A. apinorum</i>, <i>A. kunkeei</i>) и диких пчёл (<i>A. timberlakei</i>, <i>A. micheneri</i>, <i>A. quenuiae</i>). В кишечнике пчёл и шмелей <i>Apilactobacillus</i> ассоциируется со своим гомоферментативным сестринским родом <i>Bombilactobacillus</i>.</p>		
<p><i>Lentilactobacillus</i></p>	<p>Грамположительные и каталазаотрицательные палочки. Большинство штаммов растут при 15°C, а некоторые растут при 45°C. Диапазон pH для роста сильно варьируется, но оптимальный рост обычно наблюдается при pH ниже 6,0. Виды <i>Lentilactobacillus</i> обычно метаболизируют широкий спектр пентоз, гексоз и дисахаридов. Большинство видов метаболизируют лактат в 1,2-пропандиол и/или 1,2-пропандиол в пропанол и пропионат, преобразуют агматин. Представители данных МКБ используются в промышленности в качестве закваски для силоса, а также в производстве некоторых молочных и зерновых продуктов. Штаммы этого рода были выделены из силоса, ферментированных овощей, испорченного вина и зернового сула. Как правило, штаммы этого вида ведут свободный образ жизни, но могут и адаптироваться к хозяину (<i>Ln. senioris</i>).</p>	<p><i>Lentilactobacillus</i> <i>buchneri</i> comb. nov.</p>	<p><i>L. buchneri.</i></p>

2.3. Свойства лактобацилл

В состав микробиоты кишечника в основном входят анаэробы, которые составляют до 90% от всех микроорганизмов (*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*), остальные 10% принадлежат факультативным анаэробам, таким как *Lactobacillaceae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*. Наибольшая концентрация бактерий обнаружена в толстом кишечнике (Yadav et al., 2018).

Помимо толстой кишки, микроорганизмы также есть в желудке и в тонкой кишке, но в меньших количествах. В желудке обитают лактобактерии, стрептококки и грибы, способные существовать условиях пониженной кислотности (Rossi et al., 2019).

Бактерии собраны в микроколонии, образующие биопленку, покрывающие слизистые оболочки и комочки пищи. Такую биопленку можно рассматривать как первичную структуру, которая вовлекается в процессы распознавания, метаболизации, абсорбции и транслокации как полезных, так и вредных объектов (Шендеров, 2001). Сбраживание сахаров происходит более эффективно в биопленках, нежели в планктонной культуре (Macfarlane, Macfarlane, 2006).

В процессе метаболизма МКБ продуцируют органические кислоты (главным образом, молочную), перекиси, антибиотики и бактериоцины. Образование этих компонентов расценивается как критерий антагонистической активности лактобактерий, что обеспечивает их антибактериальный эффект по отношению к представителям патогенной и условно-патогенной микрофлоры (Нохна et al., 2023).

В толстой кишке пробиотические бактерии, а также сахаролитическая микробиота (бифидобактерии, лактобактерии, стрептококки), поглощают углеводы, которые не подвергаются гидролизу под действием пищеварительных ферментов человека и не поглощаются через тонкую кишку, а также пищевые волокна. В результате чего образуются короткоцепочечные жирные кислоты (уксусная, пропионовая, масляная, молочная), которые быстро всасываются в кровь и являются основным источником энергии для клеток слизистой толстого кишечника.

Пребиотики и неперевариваемые пищевые ингредиенты, которые благоприятно влияют на организм хозяина путем селективного стимулирования роста и/или активности одного или ограниченного числа пробиотических бактерий в толстой кишке, улучшают состояние здоровья хозяина. Сложные углеводы стимулируют, преимущественно, рост бифидобактерий и молочнокислых бактерий (Utami, Wahyono, 2018).

2.3.1. Биохимические свойства

2.3.1.1. Пути сбраживания гексоз

Классическое разделение лактобактерий базируется на следующих типах брожения: 1) облигатно гомоферментативное, 2) факультативно гетероферментативное и 3) облигатно гетероферментативное. Однако пентозофосфатный путь гомоферментативного брожения пентоз (рисунок 1) не вписывается в эту классификацию (Gänzle, 2015).

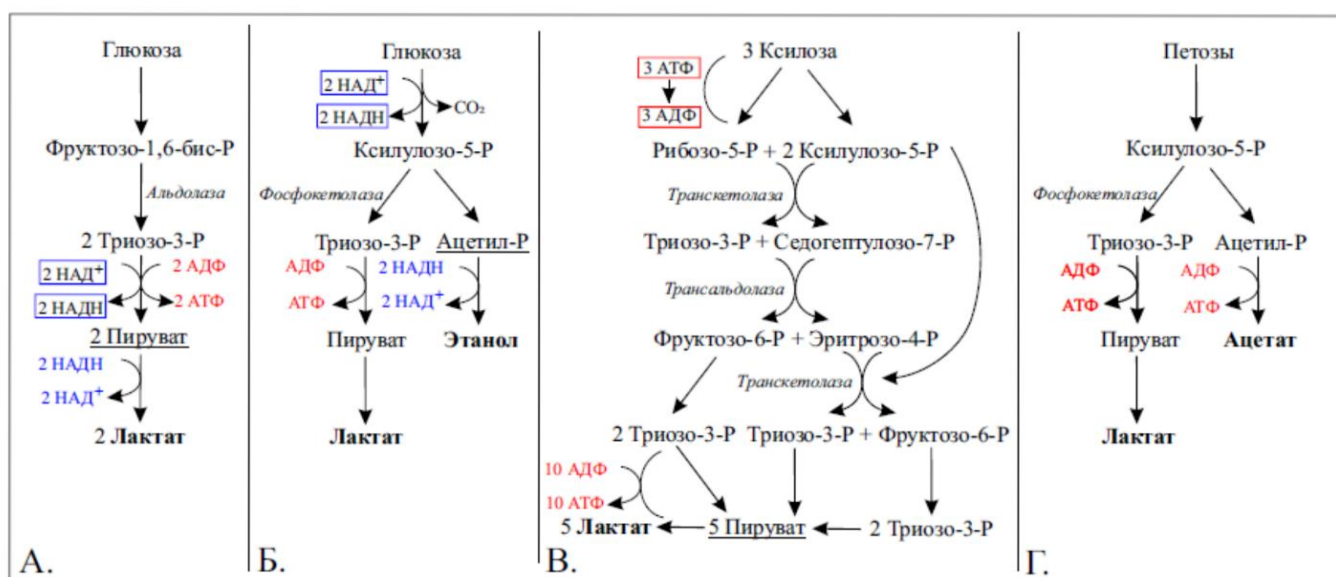


Рисунок 1. Молочнокислородное брожение углеводов. Жирным шрифтом выделены основные конечные продукты метаболизма. Подчеркнуты точки ветвления метаболизма или «метаболические переключатели». А. Гомоферментативный метаболизм гексоз по пути Эмбдена-Мейергофа. Б. Гетероферментативный метаболизм гексоз по фосфокетотазному пути. В. Гомоферментативный метаболизм пентоз по пентозофосфатному пути. Г. Гетероферментативный метаболизм пентоз по фосфокетотазному пути (Gänzle, 2015)

Так, у МКБ, потребляющих глюкозу по гликолитическому пути (рисунок 1А), углеводы предпочтительно транспортируются фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферной системой (PTS), метаболизм других сахаров подвергается катаболитной репрессии, пируват является точкой переключения метаболического пути, а фруктоза используется исключительно как источник углерода.

У МКБ, потребляющих глюкозу по фосфокетотазному пути (рисунок 1Б), не функционирует PTS, таким образом идёт активное потребление дисахаридов, а не глюкозы. Центральной точкой разветвления метаболизма является ацетилфосфат, а фруктоза

преимущественно или исключительно восстанавливается до маннита (Gänzle, 2015; Bosma et al., 2017).

Гомоферментативное брожение

В гомоферментативном брожении пируват выступает в роли центральной точки переключения метаболических потоков: в анаэробных условиях, при недостатке субстрата и под действием пируватформиатлиазы он переходит в ацетил-КоА. Конечными продуктами этого пути являются этанол и ацетат (Tanaka et al., 2002; Gänzle, 2015). В условиях анаэробнозиса, но при избытке углеводов, основным продуктом является лактат (рисунок 2Б).

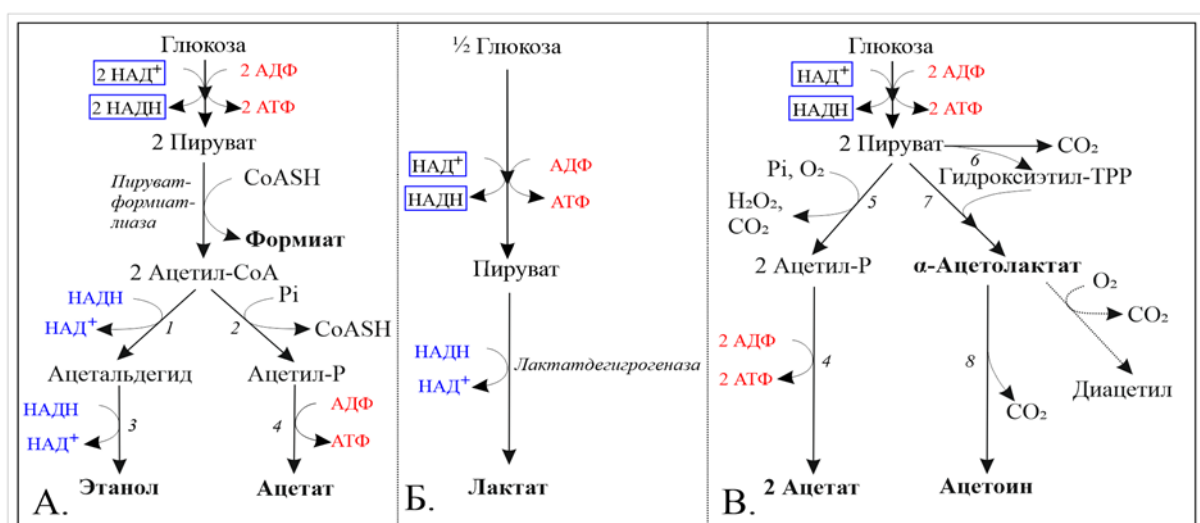


Рисунок 2. Метаболизм пирувата у гомоферментативных МКБ. Жирным шрифтом выделены основные конечные продукты метаболизма. Пунктирные стрелки указывают на неферментативные реакции. А. Метаболизм с помощью пируватформиатлиазы. Равные пропорции пирувата восстанавливаются до этанола, для регенерации восстановленных кофакторов, или окисляются до ацетата, где происходит синтез АТФ. Пируватформиатлиаза ингибируется избытком субстрата, низким рН и инактивируется кислородом. Б. Метаболизм с помощью лактатдегидрогеназы. Этот метаболический путь является доминирующим в анаэробных или аэробных условиях в избытке субстратов. В. Метаболизм пируватоксидазой или α -ацетолактатсинтазой. Ацетат и ацетоин являются второстепенными продуктами большинства организмов в аэробных условиях. Ферменты: 1 — ацетальдегиддегидрогеназа; 2 — алкогольдегидрогеназа; 3 — фосфотрансацетилаза; 4 — ацетаткиназа; 5 — пируватоксидаза; 6, пируватдегидрогеназа; 7 — ацетолактатсинтаза; 8 — ацетолактатдекарбоксилаза (Gänzle, 2015)

В аэробных условиях осуществляется альтернативная регенерация кофакторов под действием НАДН-оксидазы и НАДН-пероксидазы, но лактат, обычно, остается основным

метаболизмом большинства МКБ, растущих в присутствии кислорода (рисунок 2В; Pedersen et al., 2012; Gänzle, 2015).

Как уже было сказано выше, МКБ являются аэротолерантным анаэробами с ферментативным метаболизмом. Они являются ауксотрофами по гему (все) и менахинону (некоторые), но доступность гема (и менахинона) в сбраживаемом субстрате поддерживает рециркуляцию кофакторов и экспорт протонов при дыхании. Кислород смещает гомоферментативный метаболизм в сторону ацетата и ацетоина в качестве основных метаболитов (Engels et al., 2011).

Гомоферментативный метаболизм пентоз первоначально наблюдался у *Liquorilactobacillus vini* (*Lactobacillus vini*) (Kandler, 1983), но сам метаболический путь описан у *Lc. lactis* и энтерококков (рисунок 1В). Конверсия 3 моль пентоз с помощью транскетолазной и трансальдолазной реакций дает 5 моль триозофосфата. Таким образом, чистый прирост энергии в этом пути (7 моль АТФ на 3 моль пентозы) немного выше по сравнению с катаболизмом пентозы через фосфокетолазный путь (рисунок 1Г). При метаболизме пентоз по пентозофосфатному пути у *Lc. lactis* и энтерококков значительная часть пирувата метаболизируется пируватформатлиазой (рисунок 2А; Tanaka et al., 2002).

Дыхательный метаболизм способствует лучшей выживаемости замороженных и лиофилизированных культур, повышению устойчивости к окислительным стрессам и повышает урожайность при крупномасштабном выращивании культур (Pedersen et al., 2012; Gänzle, 2015; Zotta et al., 2017). Таким образом, культуры, которые могут выживать в присутствии кислорода и противостоять окислительному стрессу и факторам, ограничивающими срок годности замороженных или высушенных МКБ, являются более приоритетными в качестве стартовых или пробиотических культур.

Гетероферментативный метаболизм гексоз и пентоз

При гетероферментативном брожении МКБ используют для метаболизма гексоз фосфокетолазный путь (рисунки 1 и 3А). Энергетический выход этого пути составляет только один моль АТФ на глюкозу, поэтому большинство гетероферментативных МКБ плохо растут с глюкозой в качестве единственного источника углерода (Gänzle et al., 2007). В связи с этим МКБ, осуществляющие данный вид брожения, имеют две метаболические стратегии: 1) фосфоролитическое расщепление дисахаридов, что способствует устранению необходимости фосфорилирования за счет АТФ (Gänzle et al., 2012) и 2) использование альтернативных акцепторов электронов для превращения ацетилфосфата в ацетат, вместо этанола. Всё это приводит к увеличению выхода АТФ до 2,5 моль на 1 моль глюкозы. Метаболизм мальтозы,

сахарозы и раффинозы дисахаридфосфорилазами, а также метаболизм пентоз не репрессируется глюкозой (Gänzle, 2015).

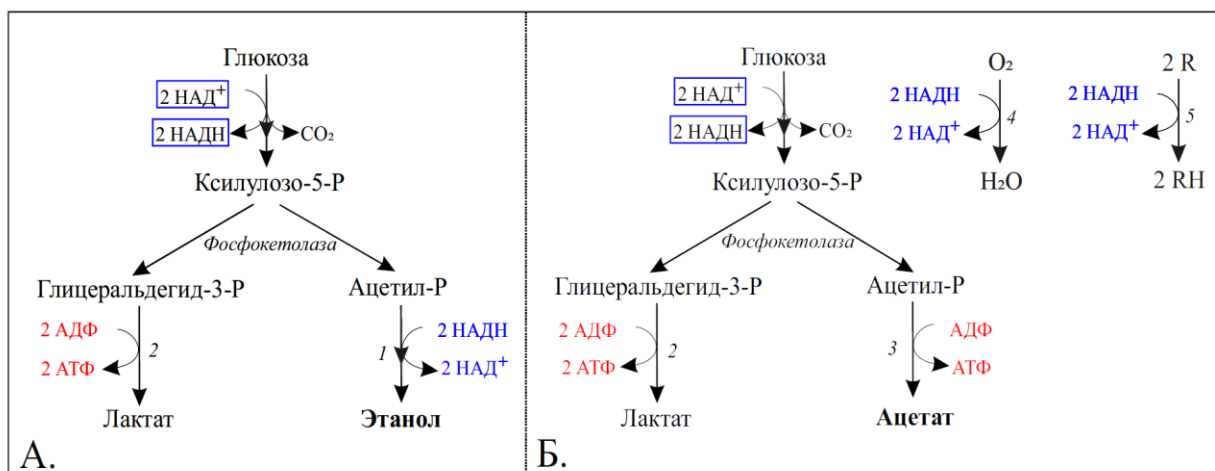


Рисунок 3. Роль ацетилфосфата в метаболизме гексоз гетероферментативными МКБ. Жирным шрифтом выделены основные конечные продукты метаболизма. **А.** Анаэробный метаболизм в отсутствие альтернативных акцепторов электронов. **Б.** Метаболизм в присутствии альтернативных акцепторов электронов. Ферменты: 1 — фосфотрансацетилаза, ацетальдегиддегидрогеназа и алкогольдегидрогеназа; 2 — ферменты пути Эмдена—Мейергофа и лактатдегидрогеназа; 3 — ацетаткиназа; 4 — НАДН-оксидаза, НАДН-пероксидаза или дыхательная цепь; 5 — НАД(Ф)Н-зависимые дегидрогеназы восстанавливают органические субстраты: фруктозу, окисленный глутатион, широкий спектр альдегидов и кетонов, включая альдегиды, образующиеся в результате окисления липидов, и α -кетокислоты, образующиеся в результате трансаминирования аминокислот, хинную кислоту и гидроксикоричные кислоты (Gänzle, 2015)

Использование альтернативных акцепторов электронов для окисления восстановленных кофакторов, таких как фруктоза, кислород, глутатион и длинноцепочечные альдегиды, позволяет гетероферментативным МКБ использовать ацетилфосфат для синтеза АТФ (Gänzle et al., 2012). Некоторые гетероферментативные молочнокислые бактерии не содержат алкогольдегидрогеназы и не используют глюкозу в отсутствие альтернативных акцепторов электронов (Endo et al., 2014). Кислород и фруктоза являются наиболее важными акцепторами электронов для рециркуляции восстановленных кофакторов (рисунок 3Б). Поэтому, неудивительно, что многие штаммы способны расти в присутствии кислорода, кроме некоторых штаммов группы *Lm. reuteri* (Gänzle, 2015).

Другими соединениями, которые восстанавливаются при сопутствующем окислении НАД(Ф)Н, являются окисленный глутатион, широкий спектр альдегидов и кетонов, включая

альдегиды, образующиеся в результате окисления липидов, α -кетокислоты, образующиеся в результате переаминирования аминокислот и хинная кислота. Исследования показывают, что восстановление гидроксикоричных кислот также способствует рециркуляции кофакторов (Gänzle, 2015).

Гетероферментативные молочнокислые бактерии встречаются при брожении большинства растений: при производстве вина, сидра, зерновых каш и заквасок, а также квашеной капусты или кимчи. Доступность мальтозы, сахарозы или раффинозы и альтернативных акцепторов электронов отражает их конкурентоспособность в растительных субстратах (Lin et al., 2014).

Рециркуляция кофактора у гетероферментативных МКБ влияет на качество пищевых продуктов, поскольку увеличивается производство ацетата, что сильно влияет на окислительно-восстановительный потенциал, а также на антиоксидантную способность ферментированных пищевых продуктов. Ацетат обладает антибактериальной и противогрибковой активностью и влияет на вкус – чрезмерное образование ацетата при производстве алкогольных напитков считается причиной их порчи (Garai-Ibabe et al., 2008). Однако умеренное количество ацетата улучшает вкус выпечки. Образование уксусной кислоты в закваске легко регулируется добавлением сахарозы (Gänzle et al., 2007).

Необходимость регенерации кофактора для достижения эффективного гетероферментативного метаболизма гексоз действует на окислительно-восстановительный потенциал брожения, что, в свою очередь, влияет на формирование вкуса и аромата, действуя на пути окисления липидов а также в реакциях тиолового обмена. Последние, катализируемые гетероферментативными МКБ, устраняют аллергенные белки при ферментации пищевых продуктов (Gänzle, 2015).

2.3.2. Общие механизмы действия пробиотических лактобактерий на организм хозяина. Адаптация и пробиотические факторы лактобацилл

Пробиотически бактерии способствуют укреплению здоровья организма-хозяина. В основу данного явления лежат следующие механизмы, которые способствуют (Boirivant, Strober, 2007; Lebeer et al., 2008):

- антогонистической активности по отношению к патогенным микроорганизмам и восстановлению микробного гомеостаза посредством межбактериальных взаимодействий;
- усилению функций эпителиального барьера;
- модуляции иммунных ответов.

Учитывая сложность этих трех основных функций, можно понять, что разные штаммы действуют на организм хозяина не одинаково: результаты, полученные для одного конкретного штамма лактобактерий не могут быть обобщены. Таким образом, в ходе молекулярных исследований лактобактерий необходимо тщательно обращать внимание на специфические для штамма свойства.

Молекулярные исследования пробиотиков с акцентом на лактобактерии направлены на выявление факторов, способствующих выживанию, адаптации и колонизации хозяина (адаптационные факторы) и факторов, которые непосредственно влияют на укрепление здоровья (пробиотические факторы). Как правило, пробиотические лактобактерии изучаются в их связи с ЖКТ (Lebeer et al., 2008).

Термин «адаптационные факторы» обозначает факторы, которые вносят вклад в пробиотические эффекты и при этом сами по себе не способствуют укреплению здоровья, хотя различие между этими двумя категориями иногда провести трудно. Адаптационные факторы включают стрессоустойчивость, активный метаболизм, адаптированный к окружающей среде хозяина, и способность взаимодействовать со слизистой оболочкой кишечника.

Пробиотические факторы включают в себя три основных механизма пробиотического действия: поддержание микробного баланса, эпителиальной защиты и иммуномодуляции.

Можно провести параллель между нежелательным проникновением с пищей таких патогенов ЖКТ как *Salmonella enterica serovar typhimurium* и энтеропатогенных *Escherichia coli*, и целевым потреблением пробиотиков. Бактериям необходимо выжить в суровых условиях ЖКТ и иметь возможность взаимодействовать с хозяином, однако в случае патогенных и условнопатогенных микроорганизмов это взаимодействие характеризуется механизмами инвазии и патогенеза, а в случае пробиотиков – подразумевает укрепление здоровья, от которого выигрывают оба партнера: микробы и хозяин.

Таким образом, можно провести аналогию между факторами вирулентности патогенных бактерий и адаптационными, пробиотическими факторами, только первые способствуют возникновению различных заболеваний ЖКТ, а вторые – адгезии полезных штаммов в организме хозяина (Lebeer et al., 2008).

2.3.3. Адгезия

Одним из потенциально важных пробиотических свойств лактобаццилл является взаимодействие этих бактерий с эпителиальными клетками кишечника, что может способствовать удерживанию их в организме хозяина и взаимодействию с коренными

бактериями ЖКТ (Buck et al., 2005). Это взаимодействие осуществляется с помощью адгезии, которая является фактором, способствующим исключению патогенов (Dertli et al., 2015; Zawistowska-Rojek et al., 2022). Благодаря адгезии пробиотические микроорганизмы эффективно колонизируют ЖКТ с минимальными потерями, которые могут быть вызваны перистальтическим движением кишечника (Kos et al., 2003; Muñoz-Provencio et al., 2009). Таким образом, тесное взаимодействие с тканями организма-хозяина может обеспечивать пробиотикам эффективное занятие экологических ниш в ЖКТ и взаимодействие с клетками слизистой оболочки кишечника (Buck et al., 2005).

Стоит отметить, что способность МКБ прилипать к поверхностям кишечника потенциально является основным критерием отбора бактерий в качестве пробиотических штаммов (Sokovic et al., 2019).

Доказано, что адгезия, а также гидрофобность, способность к аутоагрегации, наличие S-слоя (белков клеточной поверхности) и образование экзополисахаридов участвуют в дифференциальной модуляции иммунного ответа хозяина (Kotzamanidis et al., 2010).

Адгезия представляет собой сложный процесс, который зависит от свойства клеточной поверхности, типа ткани хозяина, а также условия окружающей среды (Dertli et al., 2015). Это многоступенчатый процесс, который включает в себя специфический контакт мембраны бактериальной клетки (через адгезины) и дополнительных рецепторов с клетками ЖКТ (Alp, Kuleaşan, 2019). Физико-химические свойства бактерий могут определять бактериальную адгезию к эпителиальным клеткам, а аутоагрегация может быть важным фактором, как для колонизации, так и для способности ингибировать колонизацию патогенных бактерий в ЖКТ (Dertli et al., 2015).

Так, многие исследования физико-химических свойств поверхности микробных клеток показали, что чем больше белков содержит клеточная поверхность, тем гидрофобнее будет сама бактериальная клетка. Чем больше сахаров входит в состав клеточной стенки, тем гидрофильнее будет клетка (Kos et al., 2003).

Кроме того, некоторые штаммы МКБ ингибируют адгезию патогенов. Например, было обнаружено, что некоторые штаммы лактобактерий ингибируют адгезию *E. coli* к энтероцитам свиньи: супернатант культуры *Lm. fermentum* предотвращает прикрепление *E. coli* к слизистой толстого кишечника свиньи (Ouwehand, Conway, 1996; Alp, Kuleaşan, 2019).

2.3.3.1. Строение клеточной стенки

Адгезивная способность МКБ, как было сказано выше, связана с их поверхностными свойствами, что, в свою очередь, отражается на составе, структуре и организации клеточной стенки (Deerika et al., 2009).

У грамположительных бактерий клеточная стенка состоит из нескольких характерных компонентов: толстого многослойного пептидогликана (ПГ), белков, тейхоевых кислот и полисахаридов. У некоторых видов присутствует внешняя оболочка из белков, которые упакованы в паракристаллический слой (S-слой; рисунок 2; Lebeer et al., 2008).

Клеточная стенка лактобактерий состоит из различных макромолекул, вместе определяющих специфические для штамма свойства, которые включают адаптацию к изменяющейся окружающей среде в организме хозяина, взаимодействие с иммунными рецепторами и эпителиальными клетками. Несмотря на консервативный состав клеточной стенки грамположительных бактерий, составляющие гликополимеры демонстрируют структурное разнообразие не только между видами, но и между штаммами бактерий. В частности, это касается тейхоевых кислот и полисахаридов (Lebeer et al., 2008; Martínez et al., 2020).

Свойства поверхности микроорганизмов зависят от различных факторов, в том числе среды роста, условий роста и времени (Nachtigall et al., 2020).

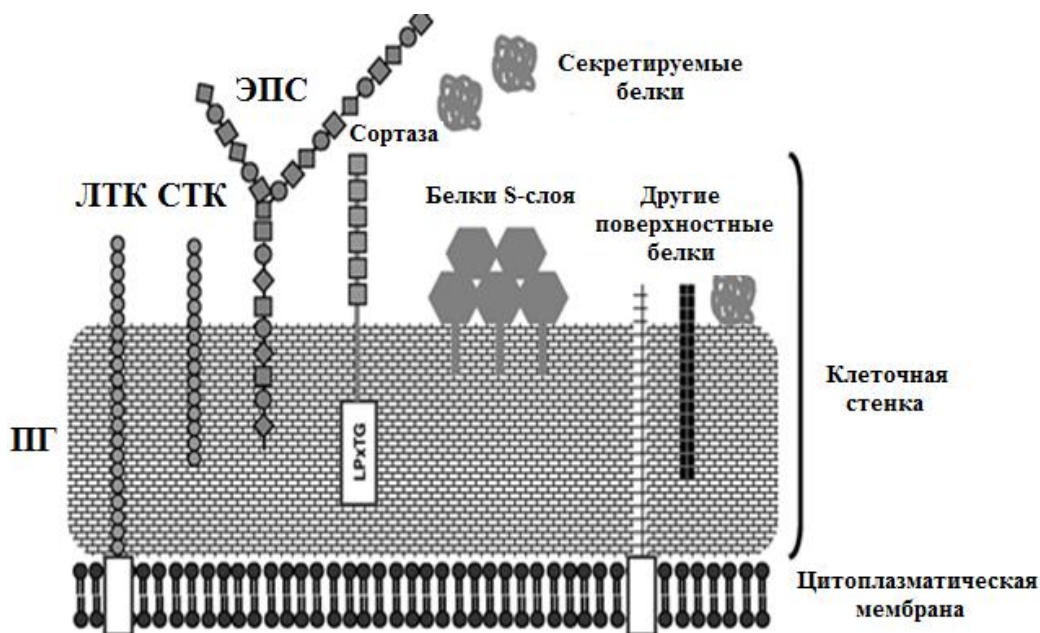


Рисунок 4. Архитектура клеточной поверхности лактобактерий (Lebeer et al., 2008). ПГ – пептидогликан; СТК – стеновые тейхоевые кислоты; ЛТК – липотейхоевые кислоты; ЭПС – экзополисахариды

2.3.3.1.1. Пептидогликан

Клеточная стенка лактобактерий характеризуется толстым слоем ПГ (толщиной от 20 до 100 нм), который играет ключевую роль в структурной целостности и защищает клетку от лизиса. ПГ клеточной стенки ковалентно и нековалентно связан с тейхоевыми кислотами, полисахаридами и белками (рисунок 4).

ПГ состоит из гликановых цепей: β -1,4-связанного *N*-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и *N*-ацетилмурамовой кислоты (MurNAc), которые сшиты двумя боковыми цепями пентапептида. В частности, у МКБ следующая последовательность аминокислот в пентапептиде: L-аланин, D-глутамат-мезо-диаминопимелиновой кислоты или L-лизин, D-аланин, D-аланин, (причем чаще встречается L-лизин). У *L. casei* и *Lp. plantarum*, C-концевой остаток D-аланина заменён D-лактатом. Такая структура носит название пентадепептид. Именно он придает устойчивость к антибиотику гликопептиду-ванкомицину (Martínez et al., 2020).

2.3.3.1.2. Тейхоевые кислоты

Тейхоевые кислоты (ТК) являются вторым основным компонентом клеточных стенок большинства грамположительных бактерий. Эти анионные полимеры обычно состоят из повторяющихся звеньев полиглицерофосфата или полирибитолфосфата, ковалентно закрепленных либо с ПГ (стенные ТК [СТК]), либо с цитоплазматической мембраной (липотейхоевые кислоты [ЛТК]). СТК и ЛТК часто замещены гликозильными или D-аланиловыми (D-Ala) сложными эфирами.

Существуют значительные различия между молекулами СТК и ЛТК штаммов лактобактерий (Lebeer et al., 2008). Более того, хотя у всех лактобактерий в клеточных стенках имеются ТК, не все стенки лактобактерий содержат СТК. Например, клеточные стенки многих штаммов *L. rhamnosus* и *L. casei* содержат только ЛТК, в отличие от большинства штаммов *Lp. plantarum*, которые содержат два типа ТК (Martínez et al., 2020).

Предполагается, что ЛТК вносит вклад главным образом в адгезию неспецифическим образом и является основным гидрофобным компонентом клеточной оболочки лактобактерий, хотя это зависит от замен D-аланиновых эфиров (Lebeer et al., 2008).

2.3.3.1.3. Экзополисахариды

Полисахариды также являются распространенными компонентами клеточной стенки лактобактерий, в дополнение к ПГ и ТК. Принято различать между собой капсульные полисахариды, которые образуют толстую внешнюю оболочку, тесно связанную с клеточной стенкой (ковалентно), и полисахариды, которые слабо связаны с клеткой. Некоторые внеклеточные полисахариды также выделяются в среду (Lebeer et al., 2008).

Для некоторых представителей лактобактерий идентифицирован другой класс «неклассических» полимеров вторичных клеточных оболочек, который участвует в закреплении белков S-слоя на поверхности бактериальных клеток. В частности, у *Lentilactobacillus buchneri* было показано, что гидроксильные группы полисахарида нейтральной клеточной стенки ответственны за прикрепление белка S-слоя к клеточной стенке (Schaffer, Messner, 2005; Lebeer et al., 2008).

Для лактобактерий термин экзополисахариды (ЭПС) является предпочтительным и относится к внеклеточным полисахаридам, которые могут быть прикреплены к клеточной стенке или секретироваться в окружающую среду. ЭПС лактобактерий представляют собой сложные структуры, которые отличаются не только мономерами сахаров, но и их способами сцепления, разветвления и замещения, что в значительной мере способствует структурному разнообразию клеточной стенки лактобактерий. ЭПС лактобактерий, как правило, представляют собой гетерополисахариды (ГПС), состоящие из глюкозы, галактозы, рамнозы, GlcNAc и N-ацетилгалактозамина). Также могут присутствовать такие остатки, как глюкуроновая кислота и глицерол-3-фосфат, фосфатные и ацетильные группы (De Vuyst et al., 2001; Alp, Ertürkmen, 2017).

Недавно было показано, что пробиотический штамм *L. rhamnosus* GG имеет два основных класса поверхностных полисахаридов: длинные (богатые галактозой молекулы ЭПС) и более короткие (богатые глюкозой и/или маннозой) полисахариды неизвестной природы. Предварительные эксперименты показали, что некоторые полисахаридные цепи могут присутствовать в виде гликопротеинов, что добавляет сложности к архитектуре клеточной стенки *Lactobacillaceae* (Francius et al., 2008).

В отличие от типичных гетерополимерных молекул ЭПС, некоторые представители *Lactobacillaceae* могут также синтезировать гомополисахариды (глюканы или фруктаны) из сахарозы при однократном действии внеклеточных гликозилтрансфераз, называемых гликозилтрансферазами или фруктозилтрансферазами, соответственно (Lebeer et al., 2008).

ЭПС обычно играет определенную роль в неспецифических взаимодействиях лактобактерий с абиотическими и биотическими поверхностями, внося вклад в физико-химические свойства поверхности клетки. Было показано, что полисахариды оказывают косвенное влияние на адгезию, защищая другие адгезины клеточной поверхности (Lee et al., 2008; Alp, Ertürkmen, 2017).

ЭПС может оказывать положительное или отрицательное воздействие на адгезию пробиотиков и энтеропатогенов к слизистой оболочке кишечника. Как правило, преобладают специфические механизмы. Однако, молекулы ЭПС также могут действовать как лиганды для хозяина или патогенных лектинов (о которых будет рассказано ниже), опосредующих специфическую адгезию и коагрегацию (Angelin, Kavitha, 2020).

Стоит отметить, что ЭПС играет не последнюю роль в процессе формирования микроколоний и биопленок, хотя сам процесс достаточно сложный и зависит от множества внешних и внутренних факторов. Опыты, проведенные на мутантных штаммах *Lp. plantarum* WCFS1 показали, что уменьшение синтеза ЭПС способствует уменьшению биопленкообразования (Lebeer et al., 2008).

2.3.3.1.4. Белки клеточной поверхности

Бактериальная оболочка лактобактерий может содержать различные белки, связанные с клеточной стенкой. Они часто представляют собой крупные белки, состоящие из повторяющихся модулей или конкретных доменов. Клеточные поверхностные белки могут быть прикреплены к клеточной стенке различными способами: одиночными N- или C-концевыми трансмембранными, липопротеиновыми (липобокс) якорями или другими доменами связывания клеточной стенки, такими как домены LysM (интегральный мембранный белок без киназного домена) или глицин-триптофановые дипептидные мотивы. Другие белки выделяются в окружающее пространство и обеспечивают взаимодействие с окружающей средой вне зависимости от прямого контакта с клеткой (Lebeer et al., 2008).

Некоторые специфические штаммы лактобактерий окружены поверхностным слоем, S-слоем, состоящим из белковых субъединиц, которые упакованы в паракристаллический гексагональный или тетрагональный монослой. К таким штаммам относятся представители *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. gasseri*, *Lb. johnsonii*, *Lv. brevis*, *Lb. helveticus*, и *Lb. crispatus* (Lebeer et al., 2008).

Белки S-слоя обычно представляют собой небольшие и высокоосновные белки от 40 до 60 кДа с, как правило, высокостабильными третичными структурами. Они нековалентно

связаны с клеточной стенкой, главным образом с полимерами вторичной клеточной стенки (ЛТК, СТК и нейтральными полисахаридами) и собираются в поверхностные слои с высокой степенью позиционного порядка, часто полностью закрывая клеточную стенку.

До настоящего времени детальная структура гликана в белках S-слоя была исследована только для *Ln. buchneri*. Тем не менее, у некоторых лактобактерий, таких как *L. rhamnosus* GG, на поверхности клеток имеются гликопротеины (Francius et al., 2008).

Считается, что белки S-слоя вовлечены в адгезию лактобактерий, хотя они присутствуют у немногих представителей МКБ. Так, на примере штамма *Lb. crispatus* JCM 5810 было показано, что S-слой действует как специфический адгезин, поскольку он способствует связыванию с компонентами внеклеточного матрикса клеток-мишеней *in vitro*, в частности, с коллагеном. Доменную структуру этого коллаген-связывающего белка, CbsA, анализировали после гетерологичной экспрессии в *E. coli* и *L. casei*. Установлено, что CbsA имеет N-концевой узел сборки, проявляющий сродство к компонентам перичеселлюлярной ткани (коллагены и ламинин) и катионный C-концевой домен, связывающийся с отрицательно заряженной ЛТК (Lebeer et al., 2008; Alp, Ertürkmen, 2017).

Эксперименты по выделению жгутиков также показали, что клеточный поверхностный белок SlpA *Lv. brevis* ATCC 8287 имеет N-концевой адгезивный домен, но со сродством к эпителиальным клеткам и фибронектину (Lebeer et al., 2008).

2.3.3.2. Взаимодействие клеток молочнокислых бактерий с ЖКТ

Слой слизи, связанный с эпителием ЖКТ, представляет собой гелевую матрицу, состоящую в основном из сложных гликопротеинов, которая действует как барьер для защиты хозяина от вредных антигенов и способствует просветной подвижности. Именно данный слой является первым физическим барьером между организмом хозяина и бактериями. Поэтому адгезия к этой слизи является первым шагом, необходимым для взаимодействия пробиотических организмов с клетками хозяина и получения какого-либо конкретного ответа. В кишечном тракте человека слой слизи может варьироваться по толщине от 30 до 300 мкм, обычно увеличиваясь в толщине от тонкого кишечника до прямой кишки, но слой слизи, наиболее тесно связанный с эпителиальным слоем, редко содержит какие-либо бактерии (Van Tassell, Miller, 2011).

Эпителиальная ткань, которая формирует подкладку кишечника, состоит из различных типов столбчатых клеток, так называемых бокаловидных клеток. Эти клетки являются

одноклеточными железами, которые продуцируют гликопротеины, муцины, придающие слизи характерные вязкоупругие свойства.

Секретируемые муцины полимеризуются с образованием матрицы, которая обеспечивает структурную основу слоя слизи, приводящую к защите от патогенов, ферментов, токсинов, обезвоживания и истирания. Бокаловидные клетки продуцируют секреторный муцин на базальном уровне в нормальных физиологических условиях, чтобы поддерживать этот защитный слой слизи, который подвергается воздействию суровой просветной среды и постоянно разрушается просветными частицами и перистальтикой кишечника (Akiba et al., 2000; Grondin et al., 2020).

Большинство клинических исследований по стойкости пробиотиков и колонизации показывают, что пробиотические организмы не постоянно колонизируют ЖКТ и продолжают предоставлять своим хозяевам преимущества только в течение коротких периодов после того, как они перестали вводиться. Мало что известно о том, что делают пробиотические организмы столь неустойчивыми в кишечнике по сравнению с комменсалами. Поэтому при изучении пробиотических микроорганизмов важно учитывать факторы, влияющие на их способность прикрепляться к эпителиальным клеткам кишечника и сохраняться там как можно дольше (Van Tassell, Miller, 2011).

Неспецифические физические взаимодействия, такие как стерические и гидрофобные, способствуют первоначальному прикреплению микроорганизмов к эпителию ЖКТ. Благодаря гидрофобности клеточной поверхности, пробиотические микроорганизмы способны эффективно колонизировать отделы кишечника (Farid et al., 2021).

Взаимодействие лактобактерий с ЖКТ может так же осуществляться с помощью больших поверхностных белков с повторяющимися структурами, которые участвуют в слизистой адгезии (MacKenzie et al., 2009; Etienne-Mesmin, 2019) и играют ключевую роль во взаимодействии с олигосахаридами муцина. Множество белков, связывающихся со слизистым слоем, содержат области, гомологичные доменам других подобных известных белков, таких, как лектины (Van Tassell, Miller, 2011; Monteagudo-Mera et al., 2019).

Эволюция лектиноподобных адгезинов в эндосимбиотических бактериях, возможно, благоприятствовалась наличием поливалентных субстратов, таких как муцины, обнаруженные в ЖКТ. Сродство лектинов к многовалентным гликопротеинам может быть выше в 50 – 100 раз по сравнению со сродством к отдельным углеводным остаткам. Недавно был выделен ряд белков, связывающихся со слизью. Стоит отметить, что некоторые из них проявляют лектиноподобные взаимодействия и способны сохранять активность после прохождения через отделы ЖКТ у многих представителей лактобацилл (Van Tassell, Miller, 2011).

2.3.3.3. Образование биоплёнок, гидрофобность, агглютинация

2.3.3.3.1. Гидрофобность

Клеточная адгезия представляет собой сложный процесс, включающий контакт между бактериальной клеткой и поверхностью прикрепления. Физические и химические характеристики поверхности клетки можно оценить на основе гидрофобности поверхности бактериальных клеток (зависит от поверхностных компонентов бактерий) и электрической подвижности/заряда (скорость миграции в электрическом поле из-за поверхностных зарядов бактерий).

Как гидрофобность, так и электрический заряд являются следствием химического состава бактериальных поверхностей. Микробная адгезия является результатом электростатических, ван-дер-ваальсовых и других взаимодействий. На основании этого считается, что клетки с высоким сродством к неполярным растворителям – углеводородам – гидрофобные, а с низким сродством – гидрофильные (Duary et al., 2011).

Была высказана гипотеза, что бактериальная адгезия является результатом двух существенно разных механизмов: специфического и неспецифического связывания. Неспецифическое связывание включает в себя электростатические или гидрофобные взаимодействия с более низким сродством, чем при специфическом связывании. На прочность адгезии влияет не только гидрофобность (Piette et al., 1992), но и поверхностный заряд клетки (Duary et al., 2011), который зависит от заряда белков на её поверхности. Типичный S-слой лактобактерий образует двумерную структуру примерно по всей поверхности клетки (Schär-Zammaretti, Ubbink 2003). Он обычно имеет высокое содержание гидрофобных аминокислот и молекулярную массу в диапазоне от 25 до 71 кДа. Однако в большинстве случаев он находится между 40 и 48 кДа.

Помимо белков S-слоя на поверхности клеток некоторых лактобактерий, таких как *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. crispatus* и *Lv. brevis*, были обнаружены ковалентно связанные белки, которые участвуют в процессе прилипания к конкретным мишеням (компонентам) ЖКТ (Velez et al., 2007; Monteagudo-Mera, 2019).

Доказано (Boonaert, Rouxhet, 2000) на примере *Lactococcus lactis*, что процент гидрофобности зависит от фазы роста бактерий что, скорее всего, связано с присутствием нейтральных и анионных полисахаридов на поверхности клетки. По мере роста данной культуры с 4 до 13 часов гидрофобность увеличивалась и достигала максимума к концу 13 ч. Таким образом, были сделаны выводы, что в случае ранней экспоненциальной фазы

поверхностный заряд клетки в значительной степени определялся анионными гидрофильными компонентами (Deerika et al., 2009). Стоит отметить, что гидрофобность клеточной поверхности варьирует в широком диапазоне в пределах родов и сильно зависит от штамма (Nachtigall et al., 2020).

2.3.3.3.2. Образование биоплёнок

Бактерии семейства *Lactobacillaceae* являются типичными представителями кишечной микробиоты и преобладают в проксимальных отделах ЖКТ. Высокий уровень популяции лактобактерий в кишечнике животных сохраняется благодаря бактериальному прилипанию к несекреторному многослойному плоскому эпителию, присутствующему в преджелудке, пищеводе и зобах мышей и крыс, свиней и кур, соответственно. Механизмы, посредством которых лактобактерии образуют эти эпителиальные ассоциации, демонстрирующие характеристики бактериальных биопленок (Walter et al., 2008), изучены недостаточно хорошо, но предварительные исследования *in vitro* показали, что вероятно, в этом участвуют молекулы углеводов и высокомолекулярный поверхностный белок Lsp (Walter et al., 2005).

Биопленки определяются как пространственно и метаболически структурированные сообщества бактерий, которые заключены во внеклеточный полимерный матрикс на границе раздела двух фаз (Николаев и Плакунов, 2007). Внеклеточные полисахариды ЭПС синтезируются достаточно широким спектром микроорганизмов, включая и МКБ. Именно данные соединения способствуют формированию зубной биопленки и агрегации клеток стрептококков. Многие штаммы лактобактерий продуцируют гомополисахариды (ГоПС) и олигосахариды (ОС), состоящие либо из остатков глюкозы (глюканы и глюкоолигосахариды, ГОС), либо из фруктозных остатков (фруктаны и фруктоолигосахариды, ФОС). Таким образом, можно предположить, что образование ЭПС является важным фенотипическим признаком МКБ ЖКТ. Кроме того, было доказано участие данных соединений в агрегации клеток и в образовании биопленок (Walter et al., 2008; Nachtigall et al., 2020).

В последнее время удалось доказать, что бактериальная агрегация представляет собой интегральный процесс образования биопленки. Однако сам процесс прикрепления и коагрегации остаются не до конца изученными для синантропных бактерий, обитающих в кишечнике человека (Walter et al., 2008).

После первоначального контакта с поверхностью субстрата микроорганизмы начинают производить тонкие волокна, о чем свидетельствует сканирующий электронный микроскопический анализ. Эти волокна становятся толще со временем, приводя к

образованию матрицы биопленки. Там дочерние клетки также могут попасть в ловушку, что увеличивает толщину биопленки (Kumar, Anand, 1998).

Полисахариды капсул, гликокаликса, а также другие специально синтезируемые полисахариды формируют каркас матрикса и всей биопленки. В состав матрикса также входят белки, нуклеиновые кислоты, липиды и другие соединения (Zhurina et al., 2014).

ЭПС, продуцируемые микроорганизмами, играют важную роль как в начальной адгезии, так и в устойчивом закреплении бактерий на твердых поверхностях. Они могут защитить бактерии от обезвоживания, так как удерживают воду в несколько раз больше своей собственной массы. Кроме того, полисахариды биопленки имеют решающее значение для устойчивости и выживания в неблагоприятных условиях. Это также помогает улавливать и удерживать питательные вещества для роста биопленок и защищать клетки от действия противомикробных агентов (Kumar, Anand, 1998).

Таким образом, биопленки представляют собой естественную форму клеточной иммобилизации, в том числе и в ЖКТ. Способность МКБ образовывать данные сообщества в организме хозяина помогает ему противостоять многим патогенным микроорганизмам. Кроме того, лактобактерии могут более эффективно проявлять свои полезные пробиотические свойства (Kumar, Anand, 1998).

2.3.3.3. Агглютинация с лектинами

Лектины являются углеводсвязывающими белками, отличными от иммуноглобулинов, которые не проявляют ферментативной активности по отношению к связанным сахарам. Данные белки можно найти у всех живых организмов: от вирусов и бактерий до растений и животных. Таким образом, лектины представляют собой весьма разнообразную группу белков, состоящую из многих семейств. Биологические функции, связанные с углеводсвязывающей активностью этих белков, разнообразны (Loris, 2002). В данной работе особое внимание будет уделено лектинам растений и их взаимодействию с МКБ.

Лектины растений представляют собой белки или гликопротеины неиммунного происхождения, обладающие по крайней мере одним некаталитическим доменом, который обратимо связывается с конкретным моно- или олигосахаридом посредством водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Они находятся во всех частях растений: корни, листья, цветы, луковицы и корневища, но в большем количестве в семенах (Zarate, Perez Chaia, 2009).

Лектины участвуют в механизмах защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов, насекомых и нематод (Ripoll et al., 2003). Попадая в ЖКТ растительноядных животных, эти гликопротеины с высокой стабильностью в большом диапазоне рН и стойкостью к протеолитическим ферментам взаимодействуют с углеводами, расположенными на поверхности эпителиальных клеток.

Опасность лектинов для организма-хозяина состоит в том, что их связывание с эпителием кишечника вызывает в нём морфологические и физиологические изменения. Эти изменения включают в себя:

- ингибирование пищеварительных ферментов;
- разрушение мембран щеточной каёмки и укороченность микроворсинок, что способствует снижению абсорбционной функции;
- использования питательных веществ и увеличению пролиферации клеток.

Негативный эффект, проявляемый каждым лектином растения, зависит от их устойчивости к деградации в кишечнике и специфичности к фрагментам мембранных углеводов, экспрессируемых эпителиальными клетками.

Более того, значительная часть растительных лектинов являются митогенами (арахисовый лектин) и действуют как опухолевые промоторы, стимулируя клеточную пролиферацию (Zarate, Perez Chaia, 2009; Lucius, 2020).

В ЖКТ человека лектины поступают вместе с пищей: овощи, фрукты, крупы, бобы, грибы. Также известно, что растительные лектины обладают способностью взаимодействовать с бактериальной поверхностью и осаждать полисахариды бактериальной природы. К примеру, конканавалин А, выделенный из мечевидной канавалии (*Canavalia ensiformis*), связывается с арабиногалактаном микобактериальных клеточных стенок, что способствует агглютинации клеток микроорганизмов. Лектин также агглютинирует клетки *Actinomyces* и осаждает полигликозилглицеролфосфат-тейхоевую кислоту из *Bacillus subtilis* (Zarate, Perez Chaia, 2009).

В кишечной экосистеме, где микробиота обитает в просвете или прилипает к поверхности слизистой оболочки, гликопротеины могут взаимодействовать с бактериальными клетками в зависимости от углеводов на их поверхности. Это взаимодействие «лектин-бактерии» может нарушать взаимодействие эпителиальных клеток и лектинов, предотвращая токсические эффекты. Если исходить из этой концепции, некоторые бактерии с подходящими (соответствующими) углеводными остатками в клеточной стенке могут потребляться и быть частью человеческой или животной диеты для того, чтобы помешать взаимодействию между лектинами и кишечными эпителиальными клетками (Lucius, 2020).

Было доказано, что галактоза-N-ацетилгалактозамин-связывающие пищевые лектины, например, агглютин арахиса, могут действовать в качестве опухолевых промоторов. Однако высокое диетическое потребление галактозо-содержащих углеводов будет обеспечивать защиту от этих путем связывания свободного лектина в просвете ободочной кишки (Zarate, Perez Chaia, 2009). Такую же роль могут играть бактерии с галактозосодержащими рецепторами. В глобальном масштабе подходящие сахара на поверхности бактерий будут ингибировать взаимодействие между диетическими лектинами и клетками толстой кишки, конкурируя за участки связывания с молекулами. Это должно исключить токсичность некоторых лектинов в отношении эпителиальных клеток кишечника и последующее губительное действие для людей и животных.

В данной работе использовали конканавалин А (Con A). Дело в том, что среди различных антипитательных факторов Con A является наиболее вредным, поскольку он вызывает широкий спектр физиологических и биохимических изменений в клетках. Так, Мендес и соавторы (Mendez et al., 1998) сообщили, что после непрерывной диеты, которая содержала бобовые лектины, в течение 6 недель, происходят гистологические изменения на слизистой оболочке кишечника цыплят (Zarate, Perez Chaia, 2009).

ConA известен как специфический зонд для остатков сахара. Сайтами связывания конканавалина А являются полисахариды с α -D-глюкопиранозильными или α -D-маннопиранозильными заместителями, в частности, тейхоевая кислота у грамположительных бактерий обладает такими сайтами связывания с данными белками.

Агглютинация данного лектина с МКБ тесно связана с бактериальной поверхностью: капсулами, фимбриями и полисахаридами, которые содержит гликокаликс данных микроорганизмов.

Таким образом, потребление лектинов совместно с пробиотическими микроорганизмами способствуют уменьшению токсического действия агглютининов (Kim et al., 2006).

2.3.4. Антимикробные свойства

МКБ оказывают антогонистическую активность по отношению к условнопатогенным микроорганизмам в пищевой среде и проявляют антимикробные свойства в отношении сохранения и безопасности пищевых продуктов. Например, некоторые пробиотические штаммы способны подавлять рост желудочно-кишечных патогенных микроорганизмов, таких как *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, и *Salmonella* spp.

МКБ синтезируют достаточно широкий спектр антимикробных соединений. Среди них стоит особое внимание уделить молочной и уксусной кислотам (Hoxha et al., 2023). К примеру, лактат, образуемый *L. rhamnosus* GG проявляется сильную антимикробную активность против *S. typhimurium*.

До сих пор точно не изучено, как именно молочная кислота действует на патогенные микроорганизмы. Есть данные, что она действует на экспрессию факторов вирулентности и рост сальмонелл. Помимо осуществления своей активности путем снижения рН, молочная кислота действует как пермеабиллизатор грамотрицательной бактериальной наружной мембраны, что позволяет другим соединениям действовать синергически с молочной кислотой. Кроме того, как молочная кислота, так и другие органические кислоты, могут захватывать элементы (например, железо), необходимые для роста, т.к. они обладают хелатирующими свойствами (Lebeer et al., 2008).

Помимо данных соединений некоторые штаммы МКБ, как известно, производят биологически активные молекулы, такие как этанол, муравьиная кислота, жирные кислоты, пероксид водорода, диацетил, реутерин и реатерициллин (Hoxha et al., 2023).

Производство АФК, в частности, пероксида водорода, относится к механизмам антимикробной активности. Установлена роль данного соединения у *Lb. johnsonii* NCC533 *in vitro* по отношению к сальмонеллам (Pridmore et al., 2008): при аэробном культивировании лактобактерия способна образовывать в миллимолярных концентрациях пероксид водорода, который действует на клетки патогена. Однако генетическая основа такого явления не ясна.

Были созданы мутанты этого штамма для изучения роли различных ферментов в ликвидации пероксида водорода: пируват-оксидазы, лактат-оксидазы, НАДН-оксидазы и цитохром-*d*-убихинол оксидазы. Мутанты по одному из этих ферментов продуцировали пероксид водорода на прежнем уровне, но сочетание всех четырёх мутаций в результате блокировало синтез H₂O₂. Однако и мутанты со всеми четырьмя мутациями при дальнейшем культивировании начинали продуцировать пероксид (Lebeer et al., 2008).

Как известно, многие МКБ синтезируют на рибосомах антимикробные пептиды, которые обладают активностью в отношении близкородственных грамположительных бактерий, в то время как клетка-продуцент имеет иммунитет к своему собственному продукту (De Vuyst, Leroy, 2007). Эти белки получили название бактериоцины (Lebeer et al., 2008).

Антибактериальный спектр данных соединений часто включает в себя микроорганизмы, ответственные за порчу продуктов и заболевания ЖКТ: *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*. Считается, что помимо антимикробного действия в отношении нежелательных бактерий бактериоцины способствуют повышению

конкурентоспособности клеток-продуцентов. Активность данных соединений против грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli* и *Salmonella* была показана, но, только тогда, когда целостность внешней мембраны была нарушена (осмотическим шоком, низкими значениями pH и т.д.; De Vuyst, Leroy, 2007).

Синтез бактериоцина у многих штаммов контролируется, подобно плотности популяции, с использованием пептидного феромона, задействованного в системе QS. Такая чувствительность к плотности клеток, которая сопоставима с чувствительностью родственных видов, позволяет организму-продуценту переключаться на производство бактериоцина в моменты, когда конкуренция за питательные вещества станет более тяжелой (Lebeer et al., 2008).

Среди бактериоцинов МКБ можно выделить:

1) лантибиотики или небольшие, термостабильные, содержащие лантионин, одно- и двухпептидные бактериоцины (класс I), чьи неактивные препептиды подвергаются широкой посттрансляционной модификации (De Vuyst, Leroy, 2007);

2) пептидные бактериоцины или малые, термостабильные, не-лантионин-содержащие бактериоцины (класс II), в том числе педиоцина-подобные или *Listeria*-активных бактериоцинов (класс IIa), два-пептидные бактериоцины (класс IIb), и круговые бактериоцины (класс IIc);

3) бактериолизины или большие, термолабильные литические белки, часто гидролазы муреина (класс III).

Большинство бактериоцинов класса I и класса II активны в наномолярном диапазоне, вызывая мембранную пермеабиллизацию, приводящую к диссипации мембранного потенциала и утечки ионов, АТФ и других жизненно важных молекул из бактерий-мишеней (Klaenhammer, 1988).

Помимо бактериоцинов, многие штаммы МКБ продуцируют антимикробные пептиды, которые проявляют антибактериальную активность и могут способствовать сохранению и безопасности пищевых продуктов. Например, штаммы *Lp. plantarum*, выделенных из закваски и силоса, демонстрируют противогрибковую активность за счет синтеза органических кислот и других низкомолекулярных метаболитов или циклических дипептидов (De Vuyst, Leroy, 2007).

2.3.5. Выживаемость пробиотических микроорганизмов в отделах ЖКТ

Для пробиотических микроорганизмов необходимы приспособления для выживания в агрессивной среде ЖКТ человека. pH базальной части желудка у здоровых людей, как правило, колеблется около 1,8, но может увеличиваться до 3-5 после еды. Время опорожнения желудка составляет 20-120 минут, в зависимости от количества жидкости и от состава, концентрации и размеров твердых частиц пищи (Meuer, 1987).

В большинстве исследований, посвященных желудочной толерантности пробиотиков, использовались статические модели с pH в диапазоне от 1,5 и 3 (Chung et al., 1999; Crittenden et al., 2001).

Было обнаружено, что в условиях, приближенных к реальным, выживаемость *Lp. plantarum* LP 1, *S. thermophilus* Z 57, и *B. lactis* B 933 сохраняется практически на неизменном уровне (Pereira, Gibson, 2002; Vernazza et al., 2006). Удалось экспериментально доказать, что толерантность к кислотам у лактобактерий выше в конце экспоненциальной и в стационарной фазах (van de Guchte et al., 2002; Maus, Ingham, 2003). Однако результаты, полученные *in vitro* нельзя сопоставлять с результатами, полученными *in vivo*, т.к. на выживаемость микроорганизма влияет множество факторов помимо pH (Masco et al., 2007; Prete et al., 2020).

Другим важным параметром служит способность лактобактерий колонизировать поверхность слизистой оболочки. Они должны обладать высокой адгезией к слизистым оболочкам, что способствует образованию поверхностного защитного биослоя, благодаря чему они особенно важны при патологии ЖКТ и урогенитального тракта. Установлено, что некоторые виды лактобактерий уменьшают риск камнеобразования в почках, обладая оксалат-модифицирующей активностью (Асташкина, 2010).

Адгезивные свойства определяются специфической адгезией к остаткам маннозы – сахару, который в больших количествах входит в состав гликокаликса клеток. Наилучшую способность к адгезии проявляют виды, выделенные непосредственно из организма-хозяина (автохтонные виды). Экзогенные штаммы и виды бактерий, обитающие вне ЖКТ, также проявляют способность к адгезии при исследованиях *in vitro*, особенно в присутствии ионов Ca^{2+} , но такие штаммы сохраняются в организме не более недели (Alander et al., 1999). Это является проблемой всех пробиотических видов. В настоящее время сохранение пробиотиков в течение длительного времени в ЖКТ показано лишь для некоторых штаммов и видов, например, для штамма *L. rhamnosus* GG (Dunne, 2001). Учеными из Голландии был обнаружен ген, отвечающий за адгезию. Он был найден в *Lp. plantarium* и маркирован, как lp_1229.

Направленная мутация этого гена приводила к полной потере адгезивных свойств (Pretzer et al., 2005).

Употребление синбиотика (пробиотика в сочетании с подходящим пребиотиком) может привести к синергическим эффектам за счет улучшения роста этих бактерий в толстой кишке, а также к увеличению количества автохтонных бифидобактерий. Одновременное введение трудноперевариваемого субстрата с пробиотиком дает преимущества в росте и метаболической активности введённых в кишечник пробиотиков. В перспективе, для того чтобы из *Lp. plantarum* LP 1, *Streptococcus thermophilus* и *Bifidobacterium lactis* В 933 создать эффективный синбиотик, необходимо исследовать их углеводные предпочтения. Все штаммы были не способны синтезировать, или синтезировали в ограниченной степени инулин, декстран, арабиногалактан (АГ), частично гидролизованную гуаровую камедь (PHGG) и резистентный крахмал (RS 1), ксило-олигосахариды (XOS). Помимо вышперечисленных веществ штаммы были способны синтезировать некоторые производные глюкозы на основе непереваживаемых углеводов: изомальтозо-олигосахариды (IMOS), полидекстрозы (PD) и резистентный крахмал (RS 2), которые были использованы только *Lp. plantarum* LP 1 и *B. lactis* В 933.

Способность бифидобактерий, лактобактерий и *S. thermophilus* сбраживать ФОС и ГСН описана многими авторами (Smart et al., 1993). Так, ФОС широко используют в качестве пребиотических ингредиентов в диетических или фармацевтических целях, а ГСН был введен в качестве пребиотика в последние несколько десятилетий (Fanaro et al., 2005; Whisner, Castillo, 2018).

2.4. Отношение молочнокислых бактерий к кислороду

МКБ – микроорганизмы с бродильным типом метаболизма, которые не нуждаются в кислороде для роста. Однако, они могут расти и в аэробных условиях, поскольку пируват, образующийся в реакциях пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса или фосфокетотазного пути, может метаболизироваться аэробно, превращаясь в ацетилфосфат и ацетат (Kandler, 1983; Guidone et al., 2013). Так, в присутствии кислорода у *Lactocaseibacillus casei* происходит изменение путей конверсии пирувата с уменьшением синтеза молочной кислоты и образованием ацетата, ацетоина и диацетила для поддержания восстановительного баланса. В условиях поглощения кислорода наблюдалось увеличение экспрессии генов, кодирующих пируватоксидазу, ацетаткиназу, α -ацетолактатдекарбоксилазу, ацетолактатсинтазу и оксалоацетатдекарбоксилазу, в то время как экспрессия генов, кодирующих L-

лактатдегидрогеназу, пируватформиатлиазу, пируваткарбоксилазу и фосфатацетилтрансферазу, снижалась (Ricciardi et al., 2019).

Многие рода семейства *Lactobacillaceae* и близкородственных родов (Zheng et al., 2020), традиционно классифицируемых как аэротолерантные анаэробные микроорганизмы, могут использовать кислород в качестве субстрата для реакций, которые катализируются флавиновыми оксидазами, а в ряде случаев способны к синтезу минимальной дыхательной электрон-транспортной цепи. Штаммы таких широко распространенных видов, как *L. casei*, *Lactiplantibacillus plantarum* и *Latilactobacillus sakei*, хорошо приспособлены к аэробному росту (Zotta et al., 2017).

МКБ, нашедшие применение в качестве одного из наиболее распространенных пробиотиков в ферментированных продуктах и напитках, а также используемые в качестве полезных для здоровья пищевых добавок, обладают многочисленными пробиотическими свойствами, одними из которых являются аэротолерантность клеток (Брюханов, Нетрусов, 2007) и способность к повышению антиоксидантного статуса организма хозяина (Noureen et al., 2019).

На ряде штаммов *Lp. plantarum*, *Lactiplantibacillus paraplantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus* и *L. casei* было показано (Watanabe et al., 2012; Guidone et al., 2013; Ianniello et al., 2016), что культивирование с аэрацией увеличивает выход биомассы в стационарной фазе роста, особенно в случае внесения в питательную среду гемина и менахинона (для формирования ЭТЦ, что значительно повышало устойчивость клеток к пероксидному и кислородному стрессам). МКБ образуют H_2O_2 только в аэробных условиях, причём способность к синтезу пероксида водорода является важным пробиотическим свойством, поскольку приводит к гибели патогенной микробиоты, в частности, *Salmonella enterica* (Pridmore et al., 2008).

МКБ подразделяют на гомоферментативные и гетероферментативные виды. Среди гомоферментативных лактобактерий способность расти аэробно была обнаружена у *Lactobacillus johnsonii* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. У *Lb. johnsonii* отсутствуют пируватдегидрогеназа и пируват-формиат-лиаза, а CO_2 образуется через пируват-оксидазный и ацетат-киназный пути (Zotta et al., 2017).

Среди представителей МКБ, осуществляющих гетероферментативное молочнокислое брожение, были также обнаружены лактобактерии, способные расти в присутствии кислорода. К ним относят *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Limosilactobacillus panis*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Limosilactobacillus reuteri* и *Levilactobacillus spicheri*. У *F. sanfranciscensis* и *L. panis*, применяемых в производстве заквасок, аэробный рост увеличивал энергетический выход

метаболических процессов и продукцию биомассы, тогда как активность НАДФН-оксидазы и NPR (non-expressor pathogen-related genes – регуляторный белок, содержащий тиоловые группы) влияла на клеточный баланс НАДН/НАД⁺ и устойчивость к окислительным стрессам (Zotta et al., 2017).

В клетках молочнокислых бактерий НАДН-оксидазная/НАДН-пероксидазная система является альтернативным путем для регенерации НАД⁺, наряду с конверсией пирувата в лактат и этанол. Пируват затем конвертируется в ацетат, что выражается в дополнительном моле АТФ. Оксидазные активности приводят к образованию АФК, токсичных для клетки. Поэтому наличие кислорода индуцирует специфические клеточные ответы. Микроорганизмы могут использовать ферментативные (супероксиддисмутаза, каталаза, НАДН-оксидаза, НАДН-пероксидаза) или неферментативные (Mn²⁺, аскорбат, токоферолы, глутатион) механизмы для удаления кислородных радикалов (De Angelis, Gobbetti, 2004).

Некоторые штаммы *Lm. reuteri* способны расти в условиях пероксидного стресса за счёт активности 1,3-пропандиол: НАД⁺ оксидоредуктазы, кодируемой геном *dhaT* и способной к инактивации H₂O₂ в присутствии НАДН (Arcanjo et al., 2019).

Необходимо отметить, что отношение МКБ к воздействию активных форм кислорода, которые образуются в ходе промышленных процессов или во время прохождения клеток по желудочно-кишечному тракту, очень часто является штаммоспецифическим свойством, что выражается в различной экспрессии генов, кодирующих белки метаболизма, окислительных стрессов, транскрипции, формирования клеточной стенки и др. (Marques Da Silva et al., 2019). Были показаны значительные штаммовые различия между представителями семейства *Lactobacillaceae* и *Lactococcus* spp. в отношении их антиоксидантных свойств: способности к элиминации свободных радикалов, ингибирования окисления аскорбиновой и линолевой кислоты, внутриклеточного содержания супероксиддисмутазы (СОД) и глутатиона (Amaretti et al., 2013; Chooruk et al., 2017). Штаммы *Limosilactobacillus fermentum*, *Lacticaseibacillus paracasei* и *L. rhamnosus* с наиболее высокими антиоксидантными активностями обладали и хорошей устойчивостью к окислительным стрессам (8-ч инкубации с 1 мМ H₂O₂ или 1-ч инкубации с 1 мМ OH^{*}) (Chooruk et al., 2017). Также хорошим антиоксидантным потенциалом в качестве пробиотических культур обладали некоторые штаммы *Lb. acidophilus* и *Lv. brevis* (Amaretti et al., 2013). Улучшение антиоксидантных свойств штаммов (например, наличие в клетках ферментов окислительного стресса с высокими активностями, а также тиолов), в том числе и с помощью методов геной инженерии, представляет собой очень эффективный подход к повышению выживаемости штаммов МКБ в окружающей среде.

2.4.1. Токсичность аэробных условий для молочнокислых бактерий

Кислород поступает через клеточную мембрану в виде молекулы, растворенной в воде. В восстановленной среде внутри микробных клеток молекулы кислорода могут получить один или два дополнительных электрона и стать намного более реакционноспособными (супероксид-анион радикал и пероксид водорода). В свою очередь, супероксид-анион радикал может приводить к образованию еще более реакционноспособного гидроксильного радикала и молекулы синглетного кислорода. Накопление таких АФК, повреждающих макромолекулы клетки, может привести к интоксикации организма, если он не имеет соответствующих защитных систем, которые превращают продукты неполного восстановления кислорода в менее токсичные соединения (Condon, 1983).

Увеличение образования радикалов и снижение целостности мембраны у клеточных бродильщиков было постепенным, тогда как у дышащих клеток в условиях критического уровня рН наблюдалось более выраженное увеличение продукции радикалов и нарушение целостности мембраны. Это говорит о том, что устойчивость к кислотности среды связано с этими факторами. Более того, различия в выживаемости в кислых условиях при разных режимах роста при понижающемся уровне рН приблизительно соответствовали уровню образования радикалов и целостности мембраны (дышащие клетки демонстрировали сдвиг в области высокого рН). АФК образуются из-за нарушения ЭТЦ и утечки электронов, и могут нанести значительный ущерб различным клеточным структурам, таким как нуклеиновые кислоты, белки и фосфолипиды (Watanabe et al., 2012).

Культуры МКБ, нечувствительные к кислороду воздуха, не накапливают в клетках пероксид водорода, или накапливают его в небольших количествах, которые не наносят существенного вреда клеткам. Накопление пероксидов зависит от углеводов, которые метаболизируют бактерии. Клетки, растущие в аэробных условиях на глюкозе, способны накопить до 0,2 мМ пероксида водорода, в то время как растущие на галактозе – до 0,4 мМ (Condon, 1983).

Образование пероксида водорода специфичным штаммом может дать ему определенное преимущество в смешанной популяции. Известно несколько примеров того, как образование пероксида водорода одной культурой МКБ ингибировало рост другой культуры (Condon, 1983).

Молочнокислые бактерии потребляют молекулярный кислород посредством действия флавопротеиновых оксидаз, включающих НАДН-оксидазу, пируватоксидазу, глицерофосфатоксидазу, оксидазу L-аминокислот и лактатоксидазу (Lopez de Felipe, Gaudu,

2009). НАДН-оксидазы МКБ катализируют восстановление молекулярного кислорода двумя или четырьмя электронами, что ведет к образованию H_2O_2 или H_2O соответственно и регенерации $НАД^+$, требующегося для нормального функционирования гликолитического пути. В аэробных условиях пируват может катаболизироваться в ацетилфосфат ферментом пируватоксидазой (ПО) или в реакциях пируватформиатлиазо-фосфотрансацетилазного пути. Затем ацетилфосфат трансформируется ацетаткиназой в ацетат с сопутствующим синтезом АТФ (Lopez de Felipe, Gaudu, 2009). Накопление ацетата вместо лактата может оказывать положительный эффект на клетки МКБ, обеспечивая постоянство уровня рН и лучшее выживание в течение стационарной фазы роста (Konings et al., 1997).

Действие пируватоксидазы и флавопротеиновых оксидаз приводит к образованию H_2O_2 , и для того, чтобы его нейтрализовать, некоторые МКБ синтезируют ферменты, расщепляющие H_2O_2 . К таким ферментам относятся НАДН-пероксидазы и каталазы (Sakamoto, Komagata, 1996). Типичные каталазы имеют гемовую простетическую группу (так называемые, истинные или гем-зависимые каталазы) в активном центре и формируют гомотетрамер. В отличие от них, марганец-содержащие каталазы (псевдокаталазы) содержат двухядерный марганцевый активный центр на месте гема и формируют гексамерную структуру (Signorella et al., 2018). Активность марганец-содержащей каталазы отмечалась у некоторых штаммов *Lp. plantarum* (Kono, Fridovich, 1983). В геномах *Latilactobacillus sakei* и *Lp. plantarum* присутствует ген *kat*, кодирующий истинную каталазу. Активный фермент синтезируется при наличии экзогенного гема в среде (Frankenberg et al., 2002; Abriouel et al., 2004; An et al., 2010).

В присутствии кислорода и при истощении запасов глюкозы в среде главным конечным продуктом брожения в ЛДГ (лактатдегидрогеназном), ПО (пируват-оксидаза) и АК (ацетаткиназном) путях является ацетат. Параллельно идет образование АТФ, что повышает выживаемость клеток в стационарной фазе роста (Goffin et al., 2004; Quatravaux et al., 2006). Синтез ПО (кодируемой генами *rohB* и *rohF*) индуцируется кислородом или H_2O_2 и контролируется углеродной катаболитной репрессией (Lorquet et al., 2004; Goffin et al., 2006). Таким образом, накопление H_2O_2 в отсутствие гема в стационарной фазе роста может снижать выживаемость и активность клеток МКБ. В присутствии гемина и менахинона *Lp. plantarum* синтезирует неполную электрон-транспортную цепь и, в отличие от *L. lactis*, демонстрирует дополнительные дыхательные метаболические реакции с нитратредуктазой, требующей гем в качестве конечного акцептора электронов (Brooijmans et al., 2009b; Guidone et al., 2013).

2.4.1.1. Электрон-транспортные цепи, участвующие в поглощении кислорода клетками МКБ

Электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) клеток *Lp. plantarum* WCFS1, формируемая в аэробных дыхательных условиях (после добавления в среду гема и менахинона) содержит НАДН-дегидрогеназу (Ndh1), пул менахинонов (витамин K₂) и цитохромов *bd*-типа. Данный участок ЭТЦ способен активироваться и восстанавливать низкие концентрации кислорода. Однако следует подчеркнуть, что оксидаза *bd*-типа из клеток *Lp. plantarum* WCFS1 не была выделена, и очищена для сравнения её свойств с классическими цитохромоксидазами *bd* (рисунок 5; Brooijmans et al., 2009a).

Одной из предложенных классификаций МКБ (таблица 2) является ранжирование видов по их способности к восстановлению кислорода в зависимости от наличия или отсутствия генов *cydABCD*, кодирующих синтез цитохром *bd*-оксидазного комплекса (Pedersen et al., 2012). Те МКБ, которые не способны к внутриклеточному восстановлению кислорода, не имеют генов *cyd*. Необходимо отметить, что близкородственные виды не обязательно находятся в одной категории по наличию ферментов восстановления O₂.

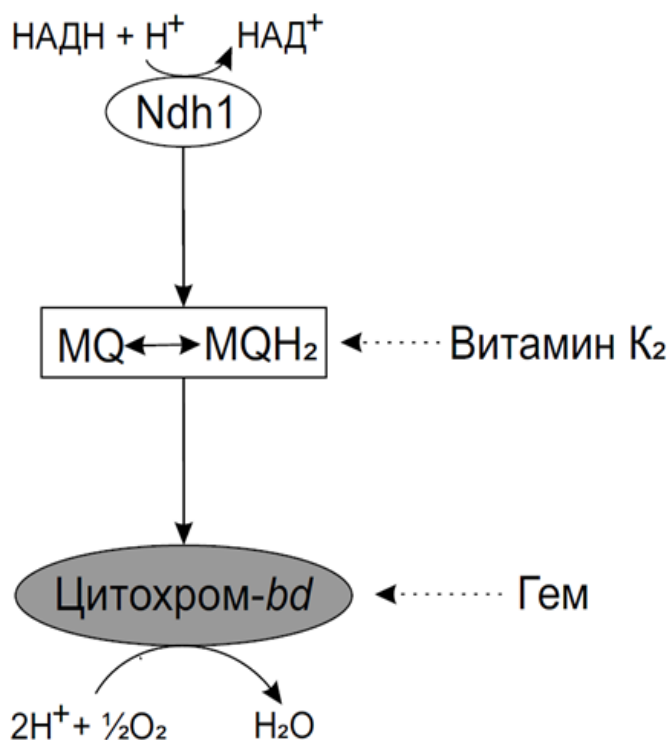


Рисунок 5. Предполагаемая электрон-транспортная цепь у *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1, разветвленная на уровне оксидаз. Пунктирные стрелки показывают внеклеточное

происхождение менахинона и гема. Ndh – НАДН-дегидрогеназа, MQ – менахинон, MQH₂ – менахинол (по Brooijmans et al. 2009a)

Таблица 2. Примеры молочнокислых бактерий в зависимости от прогнозируемого (наличие генов *судABCD*) или подтвержденного способа восстановления кислорода (по Pedersen et al. 2012)

	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Лактобактерии</i> (прежнее название – <i>Lactobacillaceae</i>)
Восстановление кислорода в присутствии экзогенного гема	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus garviae</i>	
Восстановление кислорода в присутствии экзогенного гема и менахинона		<i>Limosilactobacillus antri</i> (<i>Lactobacillus antri</i>) <i>Levilactobacillus brevis</i> (<i>Lactobacillus brevis</i>) <i>Lentilactobacillus buchneri</i> (<i>Lactobacillus buchneri</i>) <i>Lacticaseibacillus casei</i> (<i>Lactobacillus casei</i>) <i>Loigolactobacillus coryniformis</i> (<i>Lactobacillus coryniformis</i>) <i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (<i>Lactobacillus fermentum</i>) <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lentilactobacillus hilgardii</i> (<i>Lactobacillus hilgardii</i>) <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Limosilactobacillus oris</i> (<i>Lactobacillus oris</i>) <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (<i>Lactobacillus paracasei</i>) <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (<i>Lactobacillus plantarum</i>)

Таблица 2 (продолжение)

		<i>Limosilactobacillus reuteri</i> (<i>Lactobacillus reuteri</i>) <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>) <i>Ligilactobacillus salivarius</i> (<i>Lactobacillus salivarius</i>) <i>Lactobacillus ultunensis</i> <i>Limosilactobacillus vaginalis</i> (<i>Lactobacillus vaginalis</i>)
Отсутствие внутриклеточного восстановления кислорода		<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactobacillus iners</i> <i>Latilactobacillus sakei</i>

Анализ данных, приведенных в таблице 2, показывает, что для восстановления кислорода представителям семейства *Streptococcaceae* необходим экзогенный гем в питательной среде, тогда как для основного пула изученных культур МКБ, относящихся к семейству *Lactobacillaceae*, необходимо внесение еще и менахинона. Интересно отметить, что патогенные стрептококки, приспособившись к развитию в организмах животных, утратили гены, необходимые для восстановления кислорода. Этот факт подтверждает предположение, выдвинутое голландской группой (Brooijmans et al., 2009a), что эволюционные предшественники МКБ имели группы генов, кодирующих оксидазы, однако, со временем утеряли их вследствие множественных делеций при переходе к преимущественно анаэробному образу жизни. Те же МКБ, которые сохранили способность к аэробному росту, рассматривают в настоящее время как потенциально активные пробиотические и стартовые культуры для молочной и мясной промышленности из-за их большей устойчивости к кислородным стрессам.

2.4.1.1.1. Гем как вспомогательный компонент электрон-транспортной цепи

Процесс восстановления кислорода у факультативно анаэробной МКБ *Lc. lactis* можно индуцировать добавлением предшественников гема, что приводит к повышению эффективности роста культуры с удвоением выхода биомассы, а также выживаемости клеток в условиях аэрации. У лактококков улучшается рост в присутствии O₂ и протопорфирина IX в

среде из-за адаптивной перестройки метаболизма с брожения на дыхание (Duwat et al., 2001; Shi et al., 2016). Показано, что ген *cydA*, кодирующий цитохром *d*-оксидазу и непосредственно участвующий в поглощении кислорода, а также ген *hemZ*, кодирующий феррохелатазу (конвертирует протопорфирин IX в гем), экспрессируются в поздней логарифмической стадии роста культур *Lc. lactis* в аэробных условиях (Duwat et al., 2001).

Как биоактивная молекула, гем может вовлекаться не только в процесс восстановления кислорода. Например, некоторые лактобактерии, включая и тех, что неспособны к поглощению O₂, синтезируют активную гем-зависимую каталазу при росте в аэробных условиях в присутствии гематина, защищающую клетки от эндогенного H₂O₂ (Wolf et al., 1991; Frankenberg et al., 2002). Ни один представитель молочнокислых бактерий не способен к синтезу гема, поэтому им необходима транспортная система, обеспечивающая его поглощение. Например, у *Lc. lactis* эту функцию выполняет оперон *fhuDBAR* (Gaudu et al., 2003; Pedersen et al., 2012). Затем гему необходимо связаться с мембраной клетки. Он может быть включен в состав белков-шаперонов. Хорошим кандидатом на роль гем-связывающего белка является алкилгидропероксидредуктаза (AhpC, один из ключевых белков окислительного стресса), которая способна защитить внутриклеточный гем от деградации (Lechardeur et al., 2010). Другой комплекс – CydCD, который входит в состав цитохром *bd*-оксидазы вместе с CydAB, активен в восстановленных условиях и транспортирует цистеин и глутатион, которые могут способствовать взаимодействию CydAB с гемом (Pittman et al., 2005).

Несмотря на то, что гем имеет важное значение в реакциях поглощения и элиминации токсичного кислорода (Kumar, Vandyopadhyay, 2005), клеткам необходимо также наличие механизмов, обеспечивающих выведение гема, во избежание токсических эффектов самого гема (Pedersen et al., 2012). Так, *Lc. lactis* обладает специальной системой оттока гема (HrtRVA), максимальная активность которой наблюдается во время избытка гема, что препятствует накоплению последнего. Следует отметить, что среди многочисленных МКБ, обладающих системами HrtRVA и/или Pef (менее строгая система, выводящая из клеток помимо гема еще и протопорфирин IX), некоторые штаммы не обладают способностью поглощать кислород (Pedersen et al., 2012).

2.4.1.1.2. Восстановление кислорода с участием менахинонов

Менахиноны (МХ) – это ассоциированные с мембранами сложные органические соединения с окислительно-восстановительными свойствами, относящиеся к витаминам типа К₂. Они представляют собой нафтоидное кольцо, ковалентно связанное с гидрофобной изопреноидной цепью, состоящей из повторяющихся изопреновых единиц. В качестве центрального компонента ЭТЦ менахиноны переносят электроны от восстановителей (например, дегидрогеназ) к оксидоредуктазам (например, CydAB). Инактивация синтеза нафтоидных колец у *Lc. lactis* препятствует дальнейшему процессу восстановления кислорода, но только если в комплекс не входит экзогенный менахинон (Rezaïki et al., 2008; Brooijmans et al., 2009b).

Можно предположить, что каждый тип менахинона выполняет определенную функцию, так как их биосинтез не прекращается даже в отсутствие кислорода. Помимо ЭТЦ с участием CydAB, экзогенные менахиноны переносят электроны от белковых комплексов, таких как нитратредуктазы и фумаратредуктазы, в процессах анаэробного дыхания у *Lp. plantarum* (Brooijmans et al., 2009b). Кроме того, менахиноны снижают внутриклеточную концентрацию меди и железа (Rezaïki et al., 2008; Tachon et al., 2009).

Таким образом, молочнокислые бактерии, не способные к синтезу необходимых для восстановления кислорода соединений, используют для активации этого процесса экзогенный гем или, в случае некоторых видов, гем и менахинон (Pedersen et al., 2012; Lin et al., 2016). Активация гемом и/или менахиноном процесса поглощения кислорода уменьшала его негативное воздействие за счет положительной регуляции центрального углеводного и энергетического метаболизма и сохранения оптимального окислительно-восстановительного баланса, что приводило к улучшению роста и повышению аэротолерантности ряда штаммов МКБ (Siciliano et al., 2019).

2.4.1.2. Действие активных форм кислорода на клетки

На молекулярном уровне продукты неполного восстановления кислорода или, как их еще называют, активные формы кислорода ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} и H_2O_2) могут вступать в реакции с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами. Супероксид анион-радикал имеет умеренный окислительный потенциал и может взаимодействовать с полифенолами, аскорбатом и катехоламинами, а также с молекулами нуклеиновых кислот (Fridovich, 1998). Кроме того, $O_2^{\cdot-}$, быстро диффундирующий в клетки, повреждает белки, содержащие [Fe-S]-кластеры,

например, фумаразу или фумаратредуктазу (Amanatidou et al., 2001). Воздействие H_2O_2 приводит к карбонилированию белков и непосредственному окислению цистеиновых остатков в белковых молекулах, таким образом, приводя к инактивации многих ферментов (Storz, Imlay, 1999; Arcanjo et al., 2019). Пероксид водорода также может вступать в реакцию с катионами, такими как Fe^{2+} и Cu^+ , и приводить к образованию OH^\bullet по реакции Фентона (Duwat et al., 1995; Fridovich, 1998). Гидроксил-радикал, образуемый в реакции супероксид анион-радикала с пероксидом водорода, является сильным и весьма реакционноспособным окислительным агентом, который может окислять большинство органических соединений и разрывать (а также модифицировать) цепи ДНК и РНК, особенно опасно его воздействие на гемопротеины и липиды (Czapski, 1984; Fridovich, 1998; Kang et al., 2013).

Активные формы кислорода у бифидо- и лактобактерий могут образовываться через НАД(Ф)Н-оксидазные системы (рисунок 6). В частности, у *Bifidobacterium bifidum* основным продуцентом H_2O_2 является дигидрооротатдегидрогеназа типа *b*, очищенная из НАДН-оксидазной фракции белков (Satoh et al., 2019), а у *B. longum* ssp. *infantis* аэробное образование H_2O_2 обусловлено НАДФН-оксидазой (Tanaka et al., 2018).

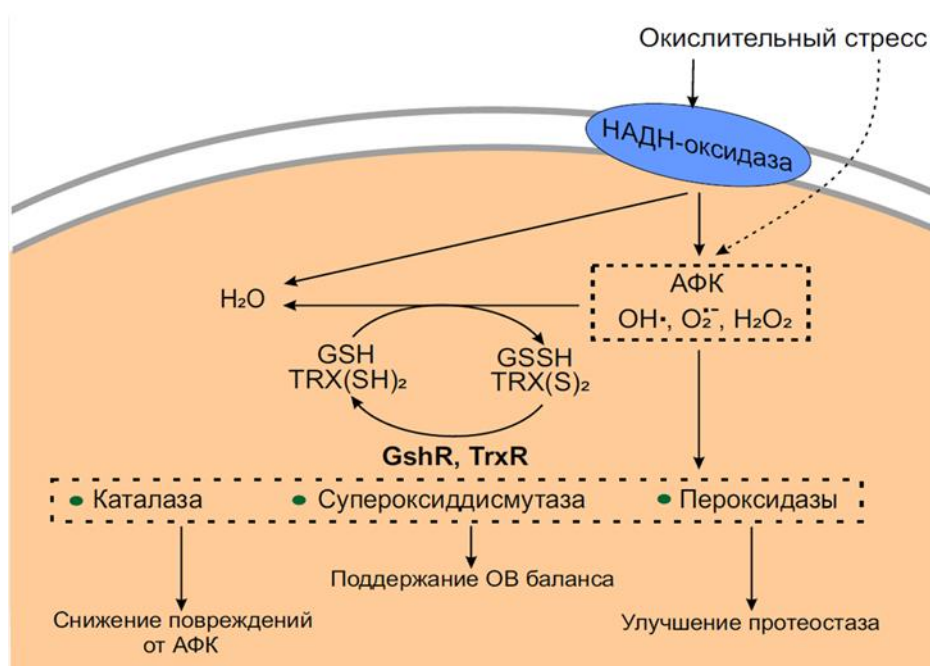


Рисунок 6. Антиоксидантные системы в клетках молочнокислых бактерий. АФК – активные формы кислорода, GSH – глутатион, TRX – тиоредоксин (по Zhang, Li, 2013)

Многие виды микроорганизмов, в том числе и МКБ, в ходе эволюции сформировали эффективные и тонко регулируемые антиоксидантные системы защиты, такие, как внутриклеточные окислительно-восстановительные циклы с участием тиолов (глутатиона [GSH] и тиоредоксина [TRX]), ферменты антиоксидантной защиты (каталаза и супероксиддисмутаза, которые играют взаимодополняющую и синергичную роль в

биохимических путях удаления АФК) и электрон-транспортные цепи восстановления кислорода (с участием гема и/или менахинона). Эти системы защищают клетки от окислительных стрессов, уменьшая потенциальные повреждения макромолекул от АФК, и помогают поддерживать оптимальный окислительно-восстановительный потенциал, что способствует защите клеток и от многочисленных иных стрессовых воздействий в окружающей среде – осмотических, кислотных, температурных и т.д. (Zhang, Li, 2013).

2.4.1.2.1. Влияние окислительных стрессов на метаболизм МКБ

Многие последствия влияния кислорода и его активных форм заметны и на метаболическом уровне. Например, *Lc. lactis* в анаэробных условиях способен преобразовывать различные углеводы в молочную кислоту. В этих условиях две молекулы НАДН, полученные в ходе окисления глицеральдегид-3-фосфата, окисляются, чтобы способствовать превращению пирувата в молочную кислоту под действием лактатдегидрогеназы. Соотношение НАДН/НАД⁺ играет определяющую роль в контроле сдвига от молочнокислого к смешанному брожению у *Lc. lactis* (Garrigues et al., 1997). Пируватдегидрогеназный комплекс катализирует восстановление НАД⁺ при окислении пирувата. Функционирование этого пути также подтверждается накоплением ацетата. Кроме того, ацетатный путь производит одну молекулу АТФ, что энергетически выгодно по сравнению с образованием молочной кислоты (Vido et al., 2004; Rezaïki et al., 2008). Таким образом, уменьшение содержания НАДН в клетке коррелирует с уменьшением образования лактата в условиях дыхания по сравнению с брожением.

При культивировании пробиотических МКБ *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium* spp. в присутствии кислорода (5-21%) образование молочной кислоты клетками *Lb. acidophilus* уменьшалось с возрастанием концентрации O₂, как и соотношение лактат/ацетат для бифидобактерий; специфические активности НАДН-оксидазы и НАДН-пероксидазы в аэробных условиях у многих МКБ были существенно выше, чем при анаэробии (Talwalkar, Kailasapathy, 2003).

Исследования, проведенные на *Lp. plantarum* показали, что в дополнение к использованию O₂ (через цитохром *bd*-оксидазу) эта бактерия может также использовать фумарат и нитрат в качестве акцепторов электронов. Такое анаэробное дыхание по-прежнему требует гема в качестве кофактора. Инактивация НАДН-дегидрогеназы у *Lp. plantarum* делает невозможным аэробное дыхание, однако при этом не влияет на анаэробное нитратное

дыхание, что говорит о наличии других доноров электронов при анаэробном метаболизме (Pedersen et al., 2012).

Анализируя энергетический метаболизм *Lc. lactis* (рисунок 7), можно предположить, что ингибирование молочнокислого брожения (обычно гомоферментативного) в процессе дыхания и в присутствии гема способствует окислению НАДН в цепи переноса электронов с помощью цитохром *bd*-оксидазы (Arioli et al., 2013).

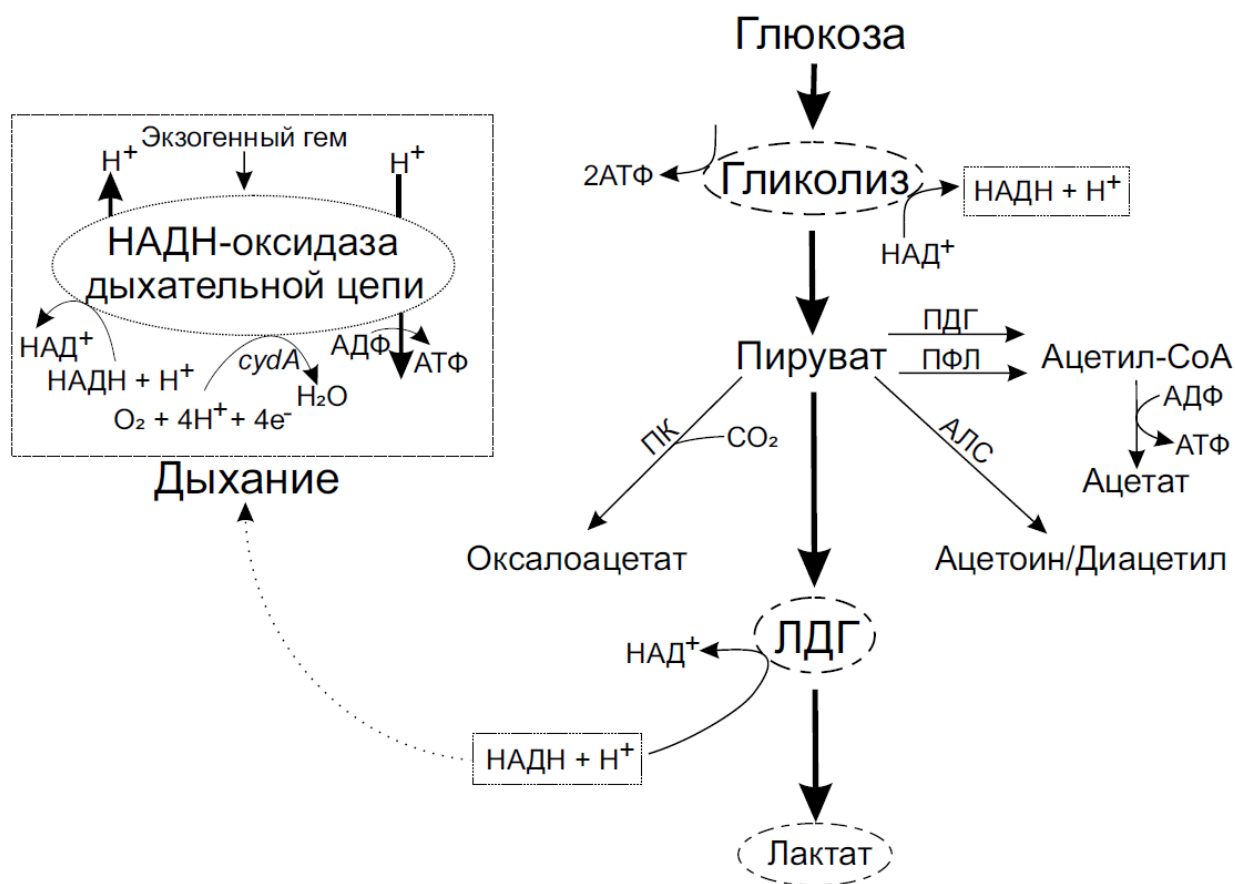


Рисунок 7. Упрощенное представление гомоферментативного и гетероферментативного видов молочнокислого брожения и гем-зависимого дыхания у *Lc. lactis* П1403 (по Arioli et al. 2013). Стрелки показывают метаболические потоки. Глюкоза катаболизируется до пирувата посредством гликолиза с образованием АТФ и НАДН. Регенерация НАД⁺ происходит во время зависящего от гема дыхания. Избыток пирувата может метаболизироваться пируватформатлиазой (ПФЛ), пируватдегидрогеназой (ПДГ) и ацетолактатсинтазой (АЛС). Также показана анаплеротическая реакция, катализируемая пируваткарбоксилазой (ПК). Ген субъединицы I цитохромоксидазы обозначен как *cydA*. ЛДГ – лактатдегидрогеназа

Таким образом, можно сделать вывод, что в аэробных условиях НАДН-оксидаза и НАДН-пероксидаза (см. таблицу 3) конкурируют с лактатдегидрогеназой (ЛДГ) в отношении

НАДН (Murphy, Condon, 1984). Следовательно, синтез молочной кислоты при аэробнозе уменьшается, и гликолитический поток смещается в сторону продукции ацетата, этанола, ацетоина, диацетила и CO₂ (смешанное брожение) под действием пируватдегидрогеназы, пируват-формиат-лиазы и α-ацетолактатсинтазы (рисунок 7).

Таблица 3. Ключевые ферментативные реакции с участием кислорода у молочнокислых бактерий (по Miyoshi et al. 2003)

Ферментативные реакции	Ферменты
$\text{НАДН} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{НАД}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$	НАДН : H ₂ O ₂ -оксидаза
$2 \text{НАДН} + 2 \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{НАД}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$	НАДН : H ₂ O-оксидаза
пируват + фосфат + O ₂ → ацетилфосфат + CO ₂ + H ₂ O ₂	Пируватоксидаза
α-глицерофосфат + O ₂ → дигидроксиацетонфосфат + H ₂ O ₂	α-глицерофосфатоксидаза
$2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	Супероксиддисмутаза
$\text{НАДН} + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{НАД}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$	НАДН-пероксидаза

Эти изменения также приводят к образованию пероксида водорода, который вызывает замедление роста культур *Lc. lactis* и даже их гибель. Концентрация около 0,2 мМ H₂O₂ ингибирует рост этой бактерии на 50%, а концентрации свыше 1,15 мМ могут поставить под угрозу жизнеспособность клеток (Duwat et al., 1999). Хотя НАДН-пероксидаза (таблица 3) способствует уменьшению содержания пероксида водорода в клетках, её роль в противодействии пероксидным стрессам в целом невелика (в 10-30 раз ниже, чем у НАДН-оксидазы), поэтому высокие концентрации H₂O₂ часто вызывают гибель клеток МКБ (Condon, 1987; Maresca et al., 2018).

В целом, определение метаболитов и анализ метаболических потоков *L. paracasei* показал, что в аэробных условиях метаболизм пирувата переключается с образования молочной кислоты на синтез ацетата для обеспечения процесса роста клеток достаточной энергией при высоких скоростях поглощения кислорода. Когда культуры достигают стационарной фазы роста в таких условиях, происходит значительное подавление поглощения и последующего метаболизма глюкозы из-за накопления в клетках АФК, которые ингибируют ключевой фермент гликолиза – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу; синтез молочной кислоты также продолжает снижаться. Необходимо отметить, что внутриклеточный восстановительный баланс на примере *L. paracasei* сильно зависит от ацетил-КоА (ацетат/этанол) в экспоненциальной фазе роста и от ацетоина (ацетоин/2,3-бутандиол) в стационарной фазе роста (Tian et al., 2018).

2.4.1.3. Ферменты антиоксидантной защиты в клетках МКБ

2.4.1.3.1. НАДН-оксидаза / НАДН-пероксидаза

Наиболее распространенным ферментативным механизмом устойчивости к окислительным стрессам, который был обнаружен у многих МКБ, является наличие в клетках НАДН-оксидазной и НАДН-пероксидазой системы (Condon, 1987). Вначале кислород может удаляться из клеток за счет функционирования НАДН-оксидазы, которая использует O_2 для окисления НАДН в $НАД^+$, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации H_2O_2 . Пероксид водорода, в свою очередь, разлагается НАДН-пероксидазой, и в результате образуется H_2O . Это было показано у аэротолерантных штаммов *L. casei*, обладающих мощной НАДН-пероксидазой (Npr), которая играет решающую роль в механизмах противодействия пероксидным стрессам (Naraki et al., 2020).

Было показано, что при высокой скорости гликолиза в аэробной культуре *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 (не имеющей НАДН-пероксидазную активность, но содержащей НАДН-оксидазу) образующийся в качестве конечного продукта гликолиза пируват взаимодействует в ходе неферментативной реакции с пероксидом водорода, образуя ацетат, CO_2 и H_2O (van Niel et al., 2002). Таким образом, это можно рассматривать в качестве альтернативного способа защиты лактококков от внутриклеточного пероксида водорода, накопление которого в культурах резко снижает их скорость роста (Miyoshi et al., 2003).

НАДН-оксидазы (NOX, кодируемые генами *noxE*, *nox2* и/или *nox*), как правило, относятся к флавопротеинам и участвуют в обеспечении аэротолерантности стационарных МКБ (Tachon et al., 2010; Tachon et al., 2011; Jänsch et al., 2011; Derr et al., 2012). NOX, в основном, отвечает за быстрое удаление кислорода и играет важную роль в поддержании внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса (Tachon et al., 2010; Naraki et al., 2020).

Было обнаружено, что в делеционных штаммах МКБ по гену *nox* наблюдалось повышенное содержание СОД и глутатионредуктазы. В связи с этим устойчивость к окислительному и кислотному стрессам у таких мутантных штаммов была лучше (Jänsch et al., 2011). Интересно, что действие НАДН-оксидазы связано с использованием клетками сахаров. Мутанты *F. sanfranciscensis* с подавленной экспрессией гена *nox* не росли на питательной среде MRC в аэробных условиях, если в среду дополнительно не добавляли фруктозу (Zhang, Li, 2013).

2.4.1.3.2. Супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутаза (СОД) является металлоферментом, который катализирует реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала в пероксид водорода и молекулярный кислород: $2 O_2^{\cdot -} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (McCord, Fridovich, 1969). Существуют четыре типа фермента, которые отличаются по наличию атомов металла в активном центре: железо-содержащие (Fe-СОД), марганец-содержащие (Mn-СОД), медь/цинк-содержащие (Cu/Zn-СОД) и никель-содержащие (Ni-СОД). СОД присутствует у большинства организмов, некоторые бактерии (например, *E. coli*) могут обладать одновременно несколькими типами СОД (Bruno-Bárcena et al., 2004). Подавляющее большинство строго анаэробных микроорганизмов содержат в клетках Fe-СОД. У многих представителей родов *Streptococcus* и *Lactococcus* удаление супероксидного анион-радикала происходит, в основном, за счет функционирования Mn-СОД, однако большинство лактобактерий лишены супероксиддисмутазной активности (Bruno-Bárcena et al., 2004; Marques Da Silva et al., 2019).

Важная роль СОД в обеспечении выживаемости клеток МКБ в условиях сильных кислородных стрессов была показана, в частности, на *Lt. sake*. Штамм NCFB 2813, обладавший в 10-20 раз (в зависимости от фазы роста культуры) более высокой активностью СОД по сравнению со штаммом DSM 6333, показывал гораздо более высокую скорость роста в присутствии 90% O_2 , а концентрация $O_2^{\cdot -}$ в цитозоле клеток этого аэротолерантного штамма была в 9-10 раз ниже, чем у кислород-чувствительного (Amanatidou et al., 2001).

Mn-содержащая СОД так же способна обеспечивать дополнительную защиту от пероксидного стресса (Serata et al., 2018). Так, экспрессия гена *sodA*, кодирующего Mn-СОД *S. thermophilus*, в клетках *Lb. gasseri* и *Lb. acidophilus* значительно повышала их устойчивость к H_2O_2 (Bruno-Bárcena et al., 2004). Известно, что негативные эффекты пероксида водорода на рост и выживаемость клеток в значительной степени зависят от наличия «свободного» растворимого железа в виде Fe(II), которое может высвобождаться из лабильных [4Fe-4S]-кластеров белков, окисляемых супероксидными радикалами (Flint et al., 1993; Keyer, Imlay, 1996; Bruno-Bárcena et al., 2004). Ион железа Fe^{2+} реагирует с пероксидом водорода с образованием крайне реакционноспособного гидроксил-радикала (OH^{\cdot}) по реакции Фентона. Непрерывное образование OH^{\cdot} требует поступления Fe(II), которое может образовываться также через восстановление Fe(III) с помощью $O_2^{\cdot -}$, а СОД, удаляя супероксид-радикал, препятствует формированию восстановительного цикла железа (Bruno-Bárcena et al., 2004). Восстановление Fe(III) может также осуществляться за счет различных восстановителей –

глутатиона, тиоредоксина, флавоферментов и т.д. (Halliwell, Gutteridge, 1990; Kakhlon, Cabantchik, 2002; Petrat et al., 2003).

Таким образом, защита клеток молочнокислых бактерий от АФК и их аэротолерантность может быть достигнута: дисмутацией $O_2^{\cdot-}$ посредством СОД, удалением H_2O_2 благодаря каталазе и/или гидропероксидазе, включением свободного железа в форме Fe(II) в железо-хелатирующий агент или в железо-связывающие белки (например, белок Drg у грамположительных бактерий), наличием белков-протекторов для [Fe-S]-кластеров и функционированием репарационных механизмов для удаления повреждений макромолекул клетки (Bruno-Bárcena et al., 2004).

2.4.1.3.3. Каталаза

Каталаза играет важную роль в снижении негативных эффектов пероксидного стресса на клетку путем разложения пероксида водорода в реакции $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$. Известно два типа каталаз: гем-зависимые (истинные каталазы) и марганец-содержащие (псевдокаталазы). Активная гем-зависимая каталаза гомотетрамерной структуры обнаружена у многих видов МКБ, но лишь при условии наличия гема или гематина в питательной среде. Каталазам второго типа для проявления активности не требуется наличие гема или гематина, но такие Mn-содержащие каталазы (MnKat), обладающие гексамерной структурой, у молочнокислых бактерий встречаются достаточно редко (Noonprakdee et al., 2004; Glorieux, Calderon, 2017).

Считается, что наличие каталазы у штаммов МКБ является одним из полезных свойств для получения заквасок, используемых в пищевой промышленности (Zotta et al., 2017), однако такая необходимая при производстве многих ферментированных мясных продуктов стартовая культура, как *L. rhamnosus*, не обладает каталазной активностью (An et al., 2010). В связи с этим создано большое количество рекомбинантных штаммов стартовых культур МКБ, устойчивых к длительному аэробнозису. В качестве примера можно привести каталазо-отрицательный штамм *Lp. plantarum* TISTR850, в котором был клонирован и экспрессирован под сильным промотором ген *kataA*, кодирующий гем-зависимую каталазу из *Latilactobacillus sakei* SR911 – полученный рекомбинантный штамм *Lp. plantarum* с высокой каталазной активностью, сохранявший жизнеспособность в течение 60 ч в условиях аэрации и при дефиците глюкозы, использовали для снижения процесса окисления липидов при хранении ферментированных мясных продуктов (Noonprakdee et al., 2004). Гетерологичная экспрессия гена *kataA* из *Latilactobacillus sakei* YSI8 в клетках *L. rhamnosus* приводила к чрезвычайному усилению устойчивости к пероксидному стрессу у рекомбинантного штамма, вплоть до 10^4

раз по сравнению с исходным штаммом для клеток из стационарной фазы роста (An et al., 2010). Аналогичные эксперименты были проведены также на *L. casei* MCJΔ1, трансформированной плазмидами с геном *katE* из *Lp. plantarum* или *Lv. brevis*, кодирующим гем-зависимую каталазу. Выживаемость рекомбинантных штаммов при 1-часовой инкубации с 2 mM H₂O₂ оказалась в 270-300 раз выше, чем у исходного каталазо-отрицательного штамма, а в условиях 96-часовой аэрации культур – в 146-190 раз выше, что свидетельствует о важной роли каталазы в обеспечении аэротолерантности клеток (Lin et al., 2016).

Создание рекомбинантных штаммов лактобактерий с гетерологичной экспрессией негемовой каталазы дает большое преимущество в том, что в этом случае не требуется добавлять гем в питательную среду для синтеза клетками активного фермента. К настоящему времени удалось показать, как можно защитить один вид МКБ от повреждающего воздействия H₂O₂ и повысить устойчивость к аэрации с помощью синтеза гетерологичной каталазы другим видом-партнером в смешанной культуре. Эти эксперименты были проделаны на смешанных культурах продуцирующей пероксид водорода, но чувствительной к нему *Lb. bulgaricus* и *L. casei*, в клетках которой был экспрессирован ген, кодирующий негемовую Mn-содержащую каталазу из *Lp. plantarum* ATCC 14431 (Rochat et al., 2006).

Аналогичные подходы применяют и в случае бифидобактерий, которые, как правило, чувствительны к различным окислительным стрессам. Так, гетерологичная экспрессия гена *LpKatL*, кодирующего гем-зависимую каталазу у *Lp. plantarum*, в клетках *Bifidobacterium longum* NCC2705 приводила к быстрому разложению экзогенного H₂O₂ и иных пероксидов, которые образовывались в качестве побочных продуктов при аэробном культивировании (Zuo et al., 2014).

Синтез активной истинной каталазы у некоторых МКБ, как уже указывалось выше, возможен в присутствии экзогенного гема, так как сами МКБ не способны к его синтезу (Noonprakdee et al., 2004; Ricciardi et al., 2018). Но дело в том, что добавление гема в сырьё для ферментативных процессов в молочной или мясной промышленности не всегда представляется возможным. Поэтому сегодня все большее применение находят штаммы МКБ, обладающие Mn-содержащей каталазой (Mn-Kat). Этот фермент разлагает H₂O₂, используя марганец как каталитический редокс-кофактор, таким образом, не испытывая потребности в геме. Субъединицы Mn-содержащих каталаз меньше по размеру, чем таковые у обычных гемовых каталаз (примерно 27 и 60 кДа соответственно), и Mn-Kat более устойчивы к повышенным температурам (Kono, Fridovich, 1983). Важно отметить, что Mn-содержащая каталаза – это цитоплазматический фермент, который не выделяется клетками в

культуральную жидкость, и его активность проявляется лишь у штаммов, обладающих высоким внутриклеточным содержанием Mn (Rochat et al., 2006).

2.4.1.3.4. Тиоредоксинредуктаза

С помощью фермента тиоредоксинредуктазы (TR) происходит окисление тиоредоксина (TRX) с использованием НАДФН в качестве кофактора. На протяжении многих лет исследований роли тиоредоксина в клеточном метаболизме было выяснено, что он в качестве дисульфидной оксидоредуктазы играет важную роль в различных восстановительных процессах, таких, как антиоксидантная защита клетки, восстановление белков и биосинтез нуклеиновых кислот (Serrano et al., 2007; Lu, Holmgren, 2014; Jastrzab et al., 2021).

Снижение активности тиоредоксинредуктазной и глутатион-редоксиновой систем имеет важное значение для всех живых организмов. Эти две системы обеспечивают поддержание цитоплазмы в восстановленном состоянии (Scharf et al., 1998). Избыток тиоредоксина у *Lp. plantarum* WCFSI увеличивал устойчивость клеток к окислительным стрессам, создаваемым пероксидом водорода или диамидом (Serrano et al., 2007).

Анализ полного генома *Lp. plantarum* WCFSI показал, что тиоредоксинредуктазная система у этого микроорганизма состоит из шести открытых рамок считывания. Непосредственно тиоредоксинредуктазу кодируют четыре гена из шести: *trxA1* (lp_0236), *trxA2* (lp_2270), *trxA3* (lp_3437) и *trxH* (lp_2633). Два других гена, *trxB1* (lp_0761) и *trxB2* (lp_2585), определены, соответственно, как кодирующие тиоредоксин и нуклеотид-дисульфид-оксидоредуктазу. Эти шесть генов распределены по геному и высоко консервативны у всех исследуемых штаммов *Lp. plantarum* независимо от их местообитаний (Molenaar et al., 2005).

Было показано, что уровни транскрипции гена *gapB* (гликолитический ген, участвующий в энергетическом метаболизме) и активность глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (ГАФДГ – ключевого фермента гликолиза по своему месторасположению в пути и по количеству связанных с ним регуляторных взаимодействий) у *Lp. plantarum* возрастали в несколько раз при сверхэкспрессии гена *trxB1* в условиях пероксидного стресса (Serrano et al., 2007). Эта способность предотвращает окисление белка GapB и поддерживает синтез активной формы ГАФДГ. Вероятно, усиленный синтез тиоредоксина у *Lp. plantarum* WCFSI защищает ГАФДГ в условиях окислительных стрессов, вызываемых пероксидами. Тиоредоксинредуктазная система (гены *trxA2* и *trxB1*) у *Lp. plantarum* WCFSI индуцируется

именно пероксидными стрессами и является ключевой в антиоксидантной защите у этого штамма (Serrano et al., 2007).

Исследования, проведенные Ван Нилем с соавторами (van Niel et al., 2002), показали, что ГАФДГ у *Lc. lactis* действительно является наиболее чувствительным для окислительных стрессов (в частности, при обработке клеток 2,2 мМ H₂O₂) белком из всех ферментов гликолиза.

Также тиоредоксинредуктаза была обнаружена в клетках типового вида рода *Bifidobacterium* – *B. bifidum*, способной к статичному росту (при 5% O₂), но из-за накопления H₂O₂ прекращающей рост при концентрациях кислорода свыше 10%. Экспрессия гена, кодирующего эту тиоредоксинредуктазу, индуцировалась кислородом. Интересно, что разложение H₂O₂ у данной бифидобактерии происходило с участием системы тиоредоксинредуктаза-алкилгидропероксидредуктаза (Sato et al., 2019).

2.4.1.3.5. Другие белки МКБ, вовлечённые в окислительные стрессы

Ещё одним механизмом обеспечения стресс-устойчивости клеток МКБ является поддержание активности белка RecA. Этот белок широко распространен у бактерий, например, в клетках *E. coli*, где он играет ключевую роль в SOS-ответах и гомологичной рекомбинации (Miller, Коkjоhn, 1990; Walker, 1996). На мутантном штамме *Lc. lactis* с введенным геном *recA* было показано, что RecA обеспечивает устойчивость к окислительному и термическому воздействиям (Duwat et al., 1995). В отсутствие активности RecA гидроксил-радикалы, образующиеся в реакции Фентона, вызывали в ДНК необратимые повреждения (Miyoshi et al., 2003).

Lactobacillus helveticus, часто применяемая в качестве закваски в молочной промышленности, относится к термотолерантным молочнокислым бактериям, которые не требуют строго анаэробных условий для роста и получают большую часть энергии, осуществляя молочнокислое брожение (Guerzoni et al., 2001). Хотя в присутствии кислорода эти бактерии и образуют пероксид водорода в реакции с НАДН, тем самым уменьшая внутриклеточную концентрацию молекулярного O₂, в их клетках не было обнаружено активностей ключевых ферментов антиоксидантной защиты, таких, как СОД или каталаза (Cerra et al., 2005). Однако клетками *Lb. helveticus* были выработаны различные способы защиты генома, и одним из наиболее важных является нуклеотид-эксцизионная репарация ДНК при различных стрессовых воздействиях (Goosen, Moolenaar, 2001; Cerra et al., 2005).

Белки эндонуклеазного эксцизионного комплекса UvrABC определяют и разрезают поврежденную ДНК в многоступенчатой реакции, обладая способностью восстанавливать единичные одноосновные модификации, массивные нуклеотидные аддукты, нековалентные модификации, а также внутри- и межнитевые кросс-связи (Cappa et al., 2005). Анализ транскрипции гена *uvrA*, кодирующего субъединицу А эндонуклеазы эксцизии, показал, что воздействие на клетки низкого рН 5,0 или 2,6 мМ H₂O₂ индуцирует резкое увеличение экспрессии гена *uvrA* через 15 мин после начала стресса и этот высокий уровень экспрессии поддерживается, по крайней мере, в течение 80 мин, обеспечивая устойчивость *Lb. helveticus* к кислотным и окислительным стрессам (Cappa et al., 2005).

Кроме того, у *Lb. helveticus* в ответ на пероксидный и температурный стрессы активируется десатуразная система, поглощающая кислород и повышающая содержание ненасыщенных жирных кислот в клеточной мембране, что защищает клетки от токсичных активных форм кислорода и высоких температур (Guerzoni et al., 2001).

В опытах с делеционным по гену *rpoN* (кодирует альтернативный σ -фактор 54) штаммом *Lp. plantarum* было показано, что его чувствительность к пероксиду водорода возросла в 100 раз по сравнению с исходным штаммом. Это связано со снижением экспрессии маннозного оперона фосфотрансферазной системы (ФТС), регулируемой, в частности, σ^{54} и необходимой, в том числе, для получения клеткой энергии при формировании адаптивного ответа на воздействие пероксидов (Stevens et al., 2008).

Интересный механизм антиоксидантной защиты, включающий транспортные белки цистина ABC (кодируются генным кластером *суиABC*) и цистатионин γ -лиазу (кодируется геном *cgl*), был показан для нескольких штаммов *Lm. reuteri* – при поглощении экзогенного цистина с помощью белка-транспортера СуиС клетки в аэробных условиях секретировали большое количество восстановительных эквивалентов, представлявших собой тиолы, включая H₂S как продукт разложения цистина и мощный антиоксидант цистеин (Lo et al., 2009). Протеомный анализ *Lb. acidophilus* выявил, что в условиях пероксидного стресса в клетках резко возрастает содержание цистеинсинтазы, необходимой для формирования пула цистеина, обеспечивающего стабильность белков, протекание метаболических реакций и функционирование пути восстановления дисульфидов; также в клетках возрастало содержание ферментов репарации ДНК и белков с цистеиновыми остатками в активном центре (Calderini et al., 2017).

2.4.1.4. Химические элементы и вещества, обеспечивающие антиоксидантную защиту в клетках МКБ

2.4.1.4.1. Глутатион

Глутатион (GSH) – наиболее распространенный и обнаруженный почти у всех живых организмов (Allocati et al., 2012), в том числе и у МКБ (например, у *Lc. lactis*, *Lm. fermentum* ME-3; Kullisaar et al., 2010), небелковый тиол. Он играет важную роль в ответах на многие стрессы (окислительные, кислотные, осмотические), защищая клетку от свободных радикалов и определяя редокс-статус внутриклеточной среды (Kim et al., 2012).

Сравнительный протеомный анализ с использованием клеток *Lc. lactis* SK11, выращенных с добавлением и без добавления глутатиона, показал, что глутатион стабилизировал ферменты гликолиза, что и объясняло устойчивость клеток *Lc. lactis* SK11 с высоким содержанием глутатиона к различным стрессам. Это свидетельствует о том, что глутатион может эффективно использоваться в качестве универсального защитного химического вещества для улучшения выживаемости и сохранности молочных заквасочных культур (Zhang, Li, 2013; Al-Madboly et al., 2020).

Помимо защиты клеток МКБ от неблагоприятных воздействий глутатион способствует усилению роста культур *Ligilactobacillus salivarius* (Lee et al., 2010) или может быть использован в качестве источника серы, как в случае *Lm. reuteri* (Zhang, Li, 2013).

Глутатион синтезируется в клетке либо с помощью двух ферментов, осуществляющих последовательные реакции (глутамин-цистеин-синтетазы и глутатионсинтетазы), либо путем использования бифункционального фермента глутамат-цистеин-лигазы / глутатионсинтетазы (Allocati et al., 2012; Pophaly et al., 2017; Xiong et al., 2018).

Гомологи глутатионредуктазы (GshR) широко представлены в клетках МКБ и являются важными компонентами GSH-зависимых окислительно-восстановительных систем. У *Lp. plantarum* было найдено две глутатионредуктазы, которые защищали клетки от воздействия солей желчных кислот (Hamon et al., 2011). Инактивация гена *gshR* увеличивала накопление дисульфида глутатиона (GSSG) и приводила к снижению устойчивости клеток *F. sanfranciscensis* к окислительным стрессам (Jänsch et al., 2007).

Предшественники глутатиона (цистеин и γ -глутамилцистеин) также участвуют в антиоксидантной защите. При использовании экзогенного цистеина возможен аэробный рост *F. sanfranciscensis* с инактивированной глутатионредуктазой (Jänsch et al., 2007; Zhang, Li, 2013).

2.4.1.4.2. Марганец как антиоксидантный агент в клетках МКБ

Как было сказано выше, у некоторых представителей лактобактерий, в частности, у *Lp. plantarum*, отсутствует истинная СОД. Но, несмотря на это, данный микроорганизм обладает аэротолерантностью при росте на глюкозе, а при росте на многоатомных спиртах вообще является облигатным аэробом. Защита от токсического эффекта O_2 связана, вероятно, с активным процессом аккумуляции $Mn(II)$ в клетках. Многие представители МКБ проявляют достаточно высокие ростовые потребности к марганцу, который не является необходимым элементом для других гетеротрофных бактерий (Serata et al., 2018). Рост *Lp. plantarum* в Mn -дефицитной питательной среде приводил к формированию клеток, которые обладали повышенной чувствительностью к O_2 (Archibald, Fridovich, 1981a).

Необычно высокая внутриклеточная концентрация $Mn(II)$ не является единственной интересной особенностью *Lp. plantarum* и, возможно, родственных ей лактобактерий. В частности, у *Lp. plantarum* отсутствует потребность в железе. Таким образом, у данной МКБ не происходит образование пероксида водорода в реакциях типа Фентона и Габера-Вейса. Этот факт, в дополнение к значительному содержанию Mn (~9 мкг/мг белка в экстрактах клеток), может объяснять высокую устойчивость к кислороду *Lp. plantarum*, не обладающей активностью СОД (Archibald, Fridovich, 1981a). В ходе так называемого дыхательного роста (аэробноз в присутствии гема и витамина K_2 в качестве источника менахинона) с внесением марганца в питательную среду культуры *Lp. plantarum* достигали наибольшего выхода биомассы (Watanabe et al., 2012).

К внутриклеточному аккумуляции марганца, эффективно удаляющего супероксид анионы при аэробном росте, способны и представители группы *L. casei* – *L. paracasei*. За поглощение марганца у них отвечает система многочисленных Mn -транспортных белков NRAMP-типа (кодируемых генами *mntH1* и *mntH2*) и ABC-типа (кодируемых кластером *mtsCBA*), подверженных общей регуляции (Serata et al., 2018).

Необходимо отметить, что большинство штаммов молочнокислых бактерий, которые аккумулялировали высокие внутриклеточные уровни $Mn(II)$, были лишены активности истинной СОД, хотя и были способны к росту при аэробнозе. Напротив, те лактобактерии, которые обладали СОД-активностью и лучше росли в аэробных условиях, чем в анаэробных, не содержали в клетках $Mn(II)$ в высоких концентрациях (Kono et al., 1976; Archibald, Fridovich, 1981b; Serata et al., 2018). Это говорит о том, что марганец в миллимолярных концентрациях в клетках МКБ может заменять собой СОД и служит для эффективного удаления эндогенного супероксид аниона, обеспечивая определённый уровень аэротолерантности клеток. Это

происходит благодаря взаимодействию супероксид аниона с марганцем и окислению последнего. В присутствии пирофосфатов (никлеозидтрифосфаты, динуклеотидные коферменты) трехвалентный марганец стабилизируется и может накапливаться в клетке. В отсутствие таких стабилизирующих хелатирующих агентов образуется MnO^{2+} , который тут же распадается на MnO_2 , $Mn(II)$ и O_2 (Kono et al., 1976).

По всей видимости, замена функции СОД высокими, вплоть до 25 мМ, концентрациями $Mn(II)$ у ряда штаммов аэротолерантной *Lp. plantarum* является адаптацией к существованию в растительном материале, т.к. у штаммов *Lp. plantarum*, обитающих в молочных продуктах, не было выявлено высокой внутриклеточной концентрации данного металла (Archibald, Fridovich, 1981b).

2.4.1.5. Регуляторный белок CcpA

Фосфотрансферазные системы (PTS) необходимы не только для транспорта веществ в клетку, но и для передачи сигналов внешней среды. У грамположительных бактерий к PTS-системам относится большая часть транспортёров, которые участвуют в переносе сахаров. Фосфотрансферазная система состоит из трёх компонентов: фермента I (EI), HPr белка и субстрат-специфичного фермента II (EII). У многих грамположительных бактерий, например у *Lc. lactis*, гены, которые кодируют EI (*ptsI*) и HPr (*ptsH*), присутствуют в одной копии и организованы в оперон *ptsHI* (Gonzy-Treboul et al., 1989; Jault et al., 2000). Все вышеперечисленные белки, включая и CcpA, белок регуляции катаболизма А (CcpA – catabolite control protein A), о котором будет рассказано ниже, участвуют в катаболитной репрессии. Это регуляторный механизм, при котором клетка меняет свой метаболизм для максимально эффективной утилизации источников углерода и энергии (Fujita, 2009). Экспрессии генов катаболизма не происходит до тех пор, пока в среде присутствуют более предпочтительные источники углерода и энергии. Данный механизм, например, у *B. subtilis* осуществляется с помощью набора факторов транскрипции, главным из которых является глобальный регулятор – CcpA, принадлежащий к семейству факторов транскрипции LacI и являющийся высококонсервативным регулятором углеродного метаболизма в грамположительных бактериях (рисунок 8).

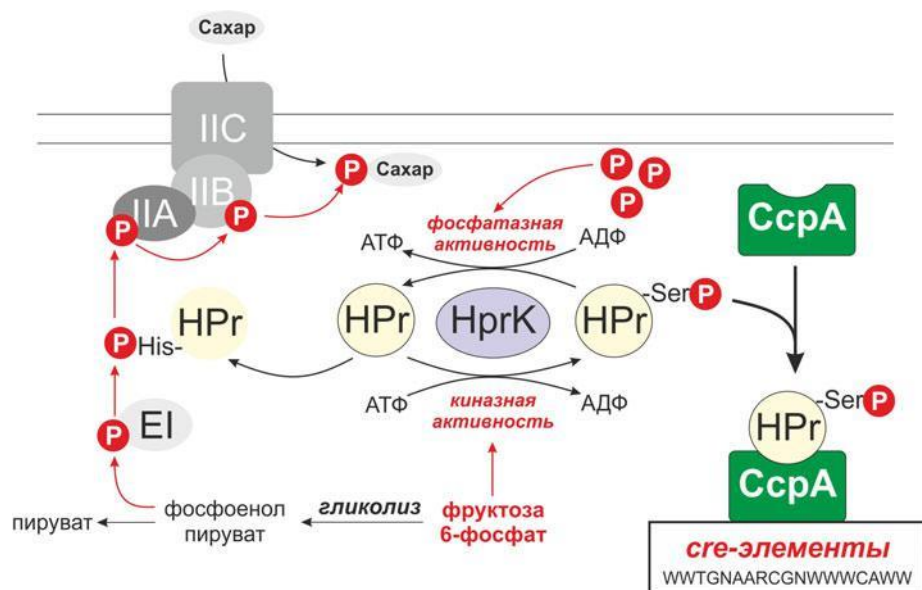


Рисунок 8. Механизм CsrA-зависимой катаболитной репрессии в *B. subtilis*. Фермент I фосфотрансферазная система – EI; гистидинсодержащий белок-фосфоноситель – HPr; субстрат-специфичный фермент II – EII (IIA, IIB, IIC); белок регуляции катаболизма A – CsrA; фосфат – P (по Fujita et al., 2009)

Экспрессия CsrA белка в клетке происходит конститутивно (Miwa et al., 1994), однако для правильного функционирования регулятора необходим ко-репрессор. Было показано, что белок HPr, фосфорилированный по остатку Ser46, способен взаимодействовать с CsrA, и данный белковый комплекс связывается с множественными *cre*-сайтами на ДНК (Fujita et al., 1995). Другим ко-репрессором для CsrA является белок Crh, который обладает сходством с HPr. У *Lc. lactis* потенциальные *cre*-сайты находятся рядом с генами, регулируемыми гликолизом, экспрессия которых зависит от источника углерода и *ptsH*. Наличие многочисленных потенциальных сайтов *cre* в геноме *Lb. lactis* предполагает, что CsrA регулирует и другие гены, особенно те, которые участвуют в метаболических путях (Galiniere et al., 1997).

Было обнаружено (Gaudu et al., 2003), что в мутантных штаммах *Lb. lactis*, в которых был инактивирован ген *csrA*, в аэробных условиях количество образующей H_2O НАДН-оксидазы и уровень транскрипции гена *noxE* увеличиваются в отсутствие CsrA по сравнению со штаммом дикого типа. Таким образом, в клетках увеличивается уровень НАДН-оксидазы, что создаёт конкуренцию с ЛДГ за НАДН. В связи с этим образуется меньшее количество продуктов брожения. Всё это говорит о том, что роль CsrA состоит в поддержании баланса активности метаболических ферментов путём подавления НАДН-оксидазы: на метаболическом уровне, NoxE и ЛДГ играют практически одну и ту же роль – они оба рециркулируют $НАД^+$, необходимые для синтеза АТФ в гликолизе. ЛДГ способствует

преобразованию пирувата, который переходит в лактат, тогда как NoxE способствует уменьшению концентрации кислорода и переводу его в нейтральное соединение – воду.

Белок CsrA является положительным регулятором FhuR (отвечает за транспорт гема), который способствует прекращению поглощения гема через *FHU*-оперон (*fhuB*, *fhuG* и *fhuD*). Таким образом, когда CsrA активен (т.е. когда глюкоза присутствует), экспрессия *fhuR* высока и поглощение гема является низким. Следовательно, дыхание невозможно, когда в среде присутствует глюкоза, независимо от наличия гема. Подавление транспорта гема на выходе из лаг-фазы может обеспечивать преимущество в росте для дикого штамма *Lc. lactis*. Во-первых, таким образом можно избежать токсического действия свободного гема, во-вторых, первоначальный ферментативный рост может быть необходимым шагом для дыхательной активности, поскольку при этом потребляется лактат, полученный в первой фазе. И, наконец, экспрессия некоторых генов, связанных с дыханием, активируется самим гемом (Duwat et al., 2001).

CsrA у *Lc. lactis* может участвовать в защите от гемо-индуцированного окислительного стресса посредством плейотропной регуляторной роли: путем увеличения пула НАДН посредством гликолиза и репрессии *noxE*, который необходим для работы пероксидаз; подавлением поглощения гема через *FhuR*, что предотвращает окислительный стресс, вызванный гемом; а также увеличением пула цистеина (*FhuR* также регулирует гены *metC-cysK*, необходимые для биосинтеза цистеина, являющегося хорошим восстановителем). Таким образом, CsrA играет важную роль в координации различных метаболических путей в *Lb. lactis* (Gaudu et al., 2003).

2.4.1.6. Некоторые гены МКБ, потенциально отвечающие за дыхание

Аэробные условия влияют на экспрессию генов стрессового ответа у МКБ. Некоторые из них кодируют ферменты детоксикации АФК (например, *ahpCF*, *gshR*, *pmsX*, *qor*, *sodA* и *ugmK*). Физиологические исследования у МКБ показали, что ген *sodA*, экспрессия которого увеличивается в 6 раз при аэрации по сравнению с трехкратным увеличением при дыхании, необходим для выживания в условиях аэрации, но не дыхания (Duwat et al., 2001; Pedersen et al., 2008).

Цитоплазматический НАДН-оксидазный ген *noxE* является одним из наиболее сильно индуцируемых генов (в 15 раз) при аэробном росте МКБ. NoxE участвует в переходе от гомоферментативного к гетероферментативному брожению (Pedersen et al., 2008).

У лактобактерий, в частности, у *Lc. lactis*, из шести универсальных стрессовых генов было описано три, которые наиболее выражены в условиях аэрации: *yahB*, *yjaB* и *yobA*. Среди них белок, кодируемый *yahB*, вначале был идентифицирован как индуцируемый белок у кислород-чувствительного мутантного штамма *Lc. lactis* с дефицитом тиоредоксин-редуктазы *trxB1* (Vido et al., 2004).

Белки, реагирующие на окислительные стрессы, могут претерпевать конформационные изменения, связанные с образованием дисульфидных связей. Экспрессия шести генов, потенциально кодирующих белки, которые содержали дисульфидные связи, изменяется, в основном, при росте в аэробных условиях (*fadA*, *gshR*, *nifJ*, *osmC*, *YbjA* и *yfiE*; Kavanagh, Hill, 1993).

Многочисленные гены, которые реагируют на аэриобиоз, вероятно, задействованы в аэробном метаболизме *Lc. lactis*. Кислород присутствует при аэробном и дыхательном культивировании, но дифференцированная экспрессия ряда генов указывает на разные физиологические процессы в этих двух типах условий. Очень хороший рост и выживаемость, как ранее было показано на *Lc. lactis*, при дыхании в присутствии гема по сравнению с аэробным (без гема) ростом коррелирует с явно более низкой индукцией генов стрессового ответа (Pedersen et al., 2008).

По сравнению с ростом в статичных условиях, при аэриобиозе без гема и с гемом (дыхание) одинаково изменялась экспрессия 59 генов у *Lc. lactis*, большинство из которых вовлечены в центральный метаболизм и транспорт. Механизм действия этих генов на аэробный рост и дыхание ещё не изучен. Однако было выяснено, что регуляция нескольких генов может быть чувствительна к кислороду и они могут реагировать не только на присутствие O_2 , но и на НАД⁺ (внутриклеточный уровень которого растет в аэробных условиях) или на CO_2 , которые тоже присутствуют в данных условиях (Pedersen et al., 2008). Так, пируватформатлиаза, кодируемая *pfl*, очень чувствительна к кислороду, поэтому она ингибируется и при аэробном культивировании, и при дыхании, что говорит о том, что для инактивации экспрессии *pfl* достаточно очень низких концентраций O_2 . Однако, было замечено, что количество белка Pfl в стационарной фазе дышащих культур МКБ увеличилось, что, вероятно, связано с экспрессией генов *cydA* в конце стационарной фазы роста, продукты которых могут эффективно удалять O_2 (Pedersen et al., 2008).

Для активной дыхательной цепи у *Lc. lactis* требуются: донор электронов, возможно, кодируемый геном *noxB*, промежуточный акцептор электронов и переносчик (гены *men*-оперона, а также *ispA* и *ispB*; Rezaïki et al., 2008) и конечный акцептор электронов (кодируемый структурными генами *cydAB* и требующий гены *cydCD* для сборки; Duwat et al., 2001). Кроме

того, *Lc. lactis* необходимо получать гем извне с помощью *fhu* оперона (Gaudu et al., 2003; Pedersen et al., 2008). Было подтверждено, что гены, кодирующие компоненты ЭТЦ, экспрессируются независимо от условий роста. Более того, клетки могут достаточно быстро перейти на дыхание при условии наличия в среде гема и O₂. Таким образом, ЭТЦ может немедленно активироваться в клетках, выращенных в статичных/анаэробных условиях, при добавлении гема (Pedersen et al., 2008).

По сравнению со статичным ростом дыхание приводит к увеличению продукции ацетоина и диацетила, а количество лактата в клетках уменьшается. Несмотря на эти значительные изменения в метаболизме пирувата, экспрессия *als* (ген, кодирующий АЛС) и *aldBC* (ген АЛД) не была дифференциальной в дыхательных условиях. Экспрессия *ackA1A2* (ген АК) и *pta* (ген фосфатацетилтрансферазы), которые участвуют в синтезе ацетилфосфата из ацетата или из ацетил-КоА, соответственно, наблюдалась аналогичным образом при всех трех условиях: анаэробных, аэробных и респираторных. Таким образом, был сделан вывод, что метаболические потоки от пирувата можно контролировать с помощью окислительно-восстановительного баланса (Pedersen et al., 2008).

Ген *adhE* кодирует АДГ, которая использует НАДН в качестве кофактора для превращения ацетил-КоА в ацетальдегид, а затем – в этанол. Экспрессия *adhE* у *Lc. lactis* была в 91 раз ниже при дыхании и в 23 раза ниже при аэрации. Поскольку активность НАДН-оксидазы высока как в аэробных, так и в дыхательных условиях, более репрессивный эффект условий дыхания на экспрессию *adhE* может указывать на то, что подавление связано с ограничением количества НАДН, а не O₂ (Pedersen et al., 2008).

Анаэробные условия подавляют транскрипцию гена *pox* (кодирует пируватоксидазу), в то время как внесение кислорода способствует экспрессии гена и соответствующей ферментативной активности (Eikmeyer et al., 2015; Ianniello et al., 2016; Zotta et al., 2017). Экспрессия гена *pdh* (кодирует ПДГ), по меньшей мере, у некоторых штаммов *L. rhamnosus* и *Lv. spicheri*, регулируется аэробными состоянием (Zotta et al., 2017).

Гены НАДН-оксидазы (*nox*) достаточно редко встречаются у лактобацилл. Так, H₂O-образующий NOX широко распространен в группе *L. casei* в то время, как только пять штаммов *Lp. plantarum* содержат несколько генов NOX (*nox1*, *nox2*, *nox3*, *nox4*, *nox5*, *nox6*).

У всех лактобацилл отсутствуют гены для биосинтеза глутатиона, и только представители групп *Lv. brevis*, *Ln. buchneri/parabuchneri*, *Lp. plantarum* и *L. casei* содержат в геноме последовательности *gro* и *gro*. Эти штаммы, которые также содержат переносчик CysDC, могут импортировать глутатион из окружающей среды и использовать его для удаления H₂O₂ (Zotta et al., 2017).

Как уже было сказано выше, для активации дыхательной цепи МКБ необходимо добавление гема и/или менахинона. Все лактобактерии, по сути, являются ауксотрофами по гему, и большинству из них не хватает комплекса генов для биосинтеза хинонов. Однако некоторые штаммы, принадлежащие родам *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* и *Weissella*, имеют комплекс биосинтеза (уби/мена)хинона и могут образовывать ЭТЦ даже тогда, когда в питательной среде присутствует только гем. Минимальная дыхательная цепь МКБ включает в себя донор электронов (НАДН-дегидрогеназа), хинон (менахинон) и терминальную оксидазу (гем-связывающую цитохром *bd-I*-оксидазу; Lechardeur et al., 2011; Pedersen et al. 2012). Цитохром *bd-I*-оксидаза является единственной хинолоксидазой в дыхательной цепи МКБ (Borisov et al., 2011; Pophaly et al., 2012).

У *Lv. spicheri* и у некоторых представителей группы *L. casei*, транскрипция *cydA* или полного оперона *cydABCD* регулировалась как добавлением гема, так и кислородом, и происходила в экспоненциальной фазе роста. Никаких транскрипционных регуляторов *cydABCD* пока не выявлено у способных к дыханию лактобацилл (Zotta et al., 2017).

Результаты исследований показывают, что сдвиг в сторону аэробного (транскрипция *rox*) и дыхательного (транскрипция *cydABCD*) роста происходит в экспоненциальной фазе. Это говорит о том, что аэробное дыхание может быть альтернативным благоприятным метаболическим путем у способных к дыханию штаммов МКБ, и не является исключительно вторичным процессом для поддержания роста в условиях недостатка сахаров, как считалось ранее (Ianniello et al., 2016).

2.4.2. Адаптации МКБ к стрессовым воздействиям

Другой механизм сопротивления токсичному действию АФК у МКБ – адаптация на физиологическом уровне. Хорошо известно, что в ответ на неблагоприятные изменения в окружающей среде, организмы могут использовать различные адаптивные механизмы, которые позволяют клеткам сохранять жизнеспособность (Condon, 1987; Miyoshi et al., 2003). Было показано, что лактококки, прединкубированные в присутствии сублетальных доз H_2O_2 , приобретали способность к росту в присутствии ранее летальных для них концентраций ($\geq 1,15$ мМ) пероксидов (Condon, 1987).

Адаптации к конкретному типу стрессов, например, к УФ-излучению, лимитированию по субстратам, кислороду или высокой температуре, могут привести к приобретению устойчивости клеток МКБ по отношению к указанным воздействиям, вероятно, из-за

индукции соответствующих генов, имеющих общие функции в механизмах антистрессовой защиты (Duwat et al., 1995; Miyoshi et al., 2003).

АФК, образуемые в результате обычных реакций при дыхании у аэробных организмов, могут вызывать повреждения белков, мутации в ДНК, окисление мембранных фосфолипидов и модификацию липопротеинов низкой плотности. Чтобы нейтрализовать молекулы реакционноспособных окислителей, человеческий организм синтезирует антиоксидантные ферменты и молекулы, которые вместе с антиоксидантами, содержащимися в пище, образуют биологический антиоксидантный барьер. Однако при определенных обстоятельствах такая система не защищает клетки и ткани от окислительных стрессов. Следовательно, возможность повышения антиоксидантной защиты считается очень важной для поддержания здоровья человека и профилактики многих заболеваний (Amaretti et al., 2013).

Среди положительных эффектов пробиотиков некоторые исследователи отмечают защиту от окислительных стрессов и способность снизить риск накопления АФК. Было подтверждено, что у МКБ, в частности у многих штаммов лактобацилл и бифидобактерий, есть хорошо выраженная антиоксидантная активность и они могут быть использованы для производства пробиотических и ферментированных продуктов, которые смогут улучшить общий антиоксидантный статус (Virtanen et al. 2007).

Антиоксидантные свойства пробиотиков могут быть отнесены к ликвидации АФК, хелатированию ионов металлов, ингибированию ферментов в путях синтеза АФК, а также к способности ингибирования автоокисления аскорбиновой кислоты (Nishikimi, 1975). Витамин С является активным в окисленной форме. Более того, он влияет на продукцию и сохранение коллагена, что крайне важно для поддержания тонуса ЖКТ. Пробиотические метаболические активности могут оказывать антиоксидантное воздействие путем удаления окислителей или предотвращения их образования в кишечнике (Virtanen et al. 2007; Azcárate-Peril et al., 2011; Njus et al. 2020).

2.4.3. Взаимодействие клеток МКБ с аскорбиновой кислотой

Как уже было сказано выше, АФК, образуемые в результате обычных реакций при дыхании у аэробных организмов, могут вызывать повреждения белков, мутации в ДНК, окисление мембранных фосфолипидов и модификацию липопротеинов низкой плотности. Чтобы нейтрализовать молекулы реакционноспособных окислителей, человеческий организм синтезирует антиоксидантные ферменты и молекулы восстановителей, которые вместе с антиоксидантами, содержащимися в пище, образуют биологический антиоксидантный барьер.

Однако при определенных обстоятельствах такая система не защищает клетки и ткани от окислительных стрессов. Следовательно, возможность повышения антиоксидантной защиты считается очень важной для поддержания здоровья человека и профилактики многих заболеваний (Amaretti et al., 2013).

Антиоксидантные свойства пробиотиков могут быть отнесены к процессам ликвидации АФК, хелатированию ионов металлов, в частности, Cu(II) и Fe(II), снижению активности некоторых ферментов в путях образования АФК, а также к способности ингибирования автоокисления аскорбиновой кислоты (Nishikimi, 1975). Многие пробиотики способствуют сокращению выброса аскорбата (природного восстановителя) и ингибированию его самоокисления. Витамин С требуется для нормального функционирования соединительной и костной ткани. В частности, он влияет на биосинтез и сохранение коллагена, что важно и для поддержания тонуса желудочно-кишечного тракта (Virtanen et al., 2007; Azcárate-Peril et al., 2011). В восстановленной форме аскорбат способствует лучшему усвоению организмом железа, защищает липиды от перекисного окисления, участвует в различных нейрофизиологических процессах (Rahate et al., 2021). Таким образом, способность МКБ к ингибированию автоокисления аскорбата, относящегося к ряду жизненно необходимых соединений, является одним из их важных пробиотических свойств (Azcárate-Peril et al., 2011; Hou et al., 2019; Zhitkovich et al., 2020).

Однако под действием АФК витамин С окисляется, что ведет к потере его функциональных качеств в организме (Nishikimi, 1975). Поэтому поддержание данного химического вещества в активной форме является очень важным процессом.

По мнению Спиропулоса и соавторов (Spyropoulos et al., 2011) пробиотические штаммы могут в значительной мере усиливать антиоксидантную защиту клеток хозяина, синтезируя и высвобождая глутатион и аскорбат, которые абсорбируются и распределяются в организме (Amaretti et al., 2013).

2.5. Применение антиоксидантных свойств МКБ в пищевой промышленности и медицине

Активные формы кислорода могут вызывать окислительные повреждения макромолекул клетки, а иногда непосредственно приводят к гибели клеток (Kehrer, 1993). Такие болезни, как атеросклероз, различные онкологические заболевания, ожирение, эмфизема, цирроз печени, артрит, болезнь Крона, воспалительные заболевания ЖКТ и др. напрямую соотносятся с окислительными повреждениями клеток соответствующих тканей

(Kehrer, 1993; Grajek et al., 2005; LeBlanc et al., 2011; Basu Thakur et al., 2019; Vasquez et al., 2019; Kim et al., 2021). Таким образом, токсическое воздействие АФК играет значимую патологическую роль. Надо также принимать во внимание, что такие окислители, как пероксид водорода и хлорноватистая кислота, вырабатываются врождённой иммунной системой в качестве антимикробных агентов в процессе воспаления (Basu Thakur et al., 2019).

Прием пищи, в состав которой входят антиоксидантные добавки, может уменьшить уровень АФК в тканях и значительно снизить риск окислительных повреждений организма человека и животных. Наиболее известными антиоксидантами являются аскорбиновая кислота (витамин С), токоферол (витамин Е), β -каротин (провитамин А), холекальциферол (витамин D₃), кофермент Q₁₀, каротиноидный пигмент ликопин. К природным антиоксидантам также относят полифенолы – флавин и флавоноиды (часто встречаются в овощах), танины (присутствуют в какао, кофе, чае), антоцианы (присутствуют в красных ягодах), линолевую кислоту (входит в состав многих растительных масел и животных жиров), белковые фракции (в особенности, содержащие казеин, лактоферрин).

Молочнокислые бактерии являются идеальными объектами для доставки ферментов антиоксидантной защиты (в частности, СОД и каталазы) в желудочно-кишечный тракт для предотвращения или лечения различных воспалительных патологических процессов в нём (LeBlanc et al., 2011). Показано, что пробиотическая МКБ *L. reuteri*, колонизирующая кишечник, обладает сложными регуляторными системами ответа на различные окислительные стрессы, которых нет у *E. coli* и других энтеробактерий и которые включают, в частности, белок теплового шока Lо18, полифосфаткиназу 2 и уникальный регуляторный белок RsiR (Basu Thakur et al., 2019).

К настоящему времени доказано, что антиканцерогенными, антимикробными, гипополидемическими, иммуномодуляторными и антиоксидантными свойствами обладают живые клетки и экстракты клеток многих штаммов МКБ, а также, в некоторых случаях, их фракции растворимых экзополисахаридов (Choi et al., 2006; Guo et al., 2013; Li et al., 2014; Yamamoto et al., 2019).

Lp. plantarum C88, выделенная из тофу (традиционного китайского ферментированного пищевого продукта из соевых бобов) и обладающая повышенной ингибиторной активностью в отношении гидроксил-радикала и высокой устойчивостью к пероксиду водорода, предложена как эффективный пробиотик-антиоксидант, в частности, ингибирующий перекисное окисление липидов (Li et al., 2012). Введение клеток *Lp. plantarum* штаммы C88 и MA2 (Li et al., 2012; Tang et al., 2016) или *Lv. brevis* MG000874 (Noureen et al., 2019) старым мышам, подвергнутым индуцированному D-галактозой окислительному стрессу, приводило к

значительному усилению активностей каталазы, СОД и глутатионпероксидазы в сыворотке крови и клетках печени мышей, восстанавливая антиоксидантный статус организма. Пробиотические йогурты и ферментированное молоко, в особенности, содержащие клетки *L. casei* и *Lb. acidophilus*, обладают высоким антиоксидантным потенциалом за счёт высвобождения антиоксидантных пептидов в процессе протеолиза (Fardet, Rock, 2018).

Недавними исследованиями было показано, что *Limosilactobacillus frumenti* увеличивает активности ряда антиоксидантных ферментов и снижает общий уровень активных форм кислорода за счёт активации NO-синтазы 1 в эпителиальных клетках тонкого кишечника млекопитающих (Nie et al., 2019). Пробиотические препараты на основе *Lactobacillus gasseri* усиливают защиту от окислительных стрессов, активируя в клетках млекопитающих редокс-чувствительную сигнальную систему Nrf2/ARE (Kobatake et al., 2017).

МКБ являются неотъемлемой частью микробиоты ЖКТ человека и играют значимую роль для здоровья хозяина. Пробиотические штаммы, способные ограничивать накопление чрезмерного количества активных радикалов в тканях хозяина, могут способствовать предотвращению либо контролю заболеваний, связанных с различными окислительными стрессами. Таким образом, с помощью пробиотических бактериальных штаммов появляется возможность повысить уровень клеточной антиоксидантной защиты хозяина (Guo et al., 2013; Tang et al., 2016). Стоит напомнить, что антиоксидантные активности (ферментативное удаление АФК, ингибирование перекисного окисления липидов и т.д.) являются, как правило, штаммоспецифичными, поэтому для использования МКБ в качестве максимально эффективных медицинских или ветеринарных пробиотических добавок нужно предварительно проводить комплексные исследования большой коллекции штаммов по выявлению необходимых свойств *in vitro* и оценке их потенциала в профилактике и лечении заболеваний *in vivo* (Noureen et al., 2019).

Результаты последних исследований свидетельствуют о новых перспективах в использовании пробиотических штаммов МКБ в качестве защитных компонентов в желудочно-кишечной микробной экосистеме для снижения негативных эффектов и последствий окислительных стрессов, а также для оздоровления не только ЖКТ, но и печени, почек, плазмы крови и повышения общего уровня антиоксидантного статуса организма хозяина (Li et al., 2014; Yamamoto et al., 2019). Кроме того, аэротолерантные МКБ в качестве стартовых культур улучшают органолептические свойства ферментированных продуктов (в частности, за счёт образования летучих соединений в процессе аэробного роста) и значительно повышают их рекомендуемые сроки хранения. В целом, антиоксидантные эффекты

пробиотиков чрезвычайно широки – от быстрого биохимического удаления высокорекреационноспособных активных форм кислорода до индуцирования через различные регуляторные и сигнальные молекулы цитопротекторной и иммунной системы организма хозяина (Guo et al., 2013; Feng, Wang, 2020; Averina et al., 2021).

2.5.1. Пробиотический потенциал *Lacticaseibacillus rhamnosus*

МКБ семейства *Lactobacillaceae* адаптировались к различным экологическим нишам, в том числе они являются частью микробиоты человека (Petrova et al., 2021). В частности, представители группы *Lacticaseibacillus casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* и *L. zeae*) включают штаммы, которые эффективно колонизируют ЖКТ человека и оказывают пробиотическое действие на организм, оздоравливая его. Стоит отметить, что влияние штаммов на организм человека зависит от штаммоспецифичных пробиотических свойств, поэтому для промышленных производств важно выбирать МКБ с повышенным пробиотическим потенциалом (Rossi et al., 2022). Представители *Lacticaseibacillus* spp. содержат гены, отвечающие за адаптацию к разным условиям аэробноза, а так же к растениям, насекомым и животным (Hatti-Kaul et al., 2018).

Наиболее изученным видом является *L. rhamnosus* GG (LGG; ATCC 53103; Capurso et al., 2019). Эти бактерии используются в пробиотических препаратах и могут быть в составе микробиоты ферментированных продуктов, в том числе и в традиционных (Del Matto et al., 2021).

Как было сказано выше, штаммы *L. rhamnosus* могут занимать разнообразные ниши. Их приспособленность к разным условиям прослеживается на примере LGG и LGR (*Lacticaseibacillus rhamnosus* GR-1, выделенный из уретры здоровой женщины). Было показано, что *L. rhamnosus* GG, выделенная из кишечника человека, устойчива к желудочному соку и эффективна в качестве пищевой добавки как *in vitro*, так и *in vivo*. Как терапевтическое средство, штамм LGG оказывает противовоспалительное и антиоксидантное действие при диетах с высоким содержанием жиров, а также способствует улучшению липидного обмена и облегчению диареи (Zhao et al., 2023), чего не наблюдалось в случае штамма LGR. Наиболее очевидная разница заключалась в том, что гены, кодирующие ворсинки, которые участвуют в адгезии к кишечной слизи, были обнаружены только в геноме штамма LGG. Это говорит о том, что образование пилей более важно в желудочно-кишечном тракте, где пробиотические бактерии должны конкурировать с весьма разнообразным микробным сообществом. Основываясь на сравнении геномов 100 различных штаммов *L. rhamnosus*, было выяснено, что

кишечные штаммы с большей вероятностью содержат гены, кодирующие пили, тогда как их вагинальные аналоги — нет. Штамм LGR-1 также демонстрирует более универсальную способность к утилизации углеводов, чем штамм LGG, и обладает способностью утилизировать лактозу, рибозу, мальтозу и рамнозу (все сложные углеводные остатки, обычно встречающиеся в тканях влагалища человека) *in vitro* (Petrova et al., 2018).

Еще одно существенное различие между штаммами LGR-1 и LGG заключается в их молекулах внеклеточного полисахарида (EPS), что продемонстрировано молекулярно-генетическими анализами (Petrova et al., 2018). Геном штамма LGR-1 кодирует молекулы EPS, богатые глюкозой, в которых отсутствует рамноза, тогда как геном штамма LGG кодирует уникальные молекулы EPS, богатые галактозой и рамнозой. Это подчеркивает специфичность штамма, уникальное распознавание хозяина и микроба и вероятность предоставления различных преимуществ для здоровья организма хозяина (Petrova et al., 2021).

Представители *Lactocaseibacillus* spp. имеют разный генотип и фенотип в зависимости от мест обитания, где на них оказывают влияние разного рода стрессовые воздействия. Характеристика стрессовой физиологии штаммов необходима для открытия новых стратегий поддержания активности конкретного штамма. Фенотипическая изменчивость штамма частично вызвана различиями в наличии/транскрипции генов. Стрессоустойчивость организма является жизненно важным физиологическим атрибутом для его выживания. Интересно, что устойчивость к тому или иному стрессу можно вызвать за счёт перекрестной экспрессии генов в ответ на меньший стресс. То есть клетки, подвергнутые воздействию легкого стресса, проявляют более сильную устойчивость против летальных доз другого стресса (Serrazanetti et al., 2013).

Тепловой стресс (HSP) и окислительный стресс (OSR) распространены в процессах производства и хранения, особенно при распылительной сушке. Выживаемость штаммов при сушке четко коррелирует с комбинированной устойчивостью к тепловому и окислительному стрессу (Dijkstra et al., 2014). Так, были изучены гены у МКБ, транскрипция которых усиливается под влиянием стресса. К генам, реагирующим на тепловой стресс, относятся регуляторы (*ctsR*, *hrcA*, *ccpA*), шаперонины (*dnaK*, *dnaJ*, *groES*, *groEL*) и протеазы (*clp*, *ftsH*) (Papadimitriou et al., 2016). Однако после теплового воздействия на *L. rhamnosus* HN001 были идентифицированы только 4 белка с повышенной экспрессией: GroEL и DnaK, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и гистидинсодержащий белок (Prasad et al., 2003).

Окислительный стресс, вызванный у *L. rhamnosus* hsryfm 1301, способствовал изменению экспрессии 341 гена, которые отвечают за мембранный транспорт, метаболизм кофакторов и витаминов, метаболизм нуклеотидов. В частности, OSR способствовал

усилению транскрипции 2 генов, *pgmB* (β -фосфоглюкомутаза) и *yedF* (β -глюкозид-специфический компонент ПАВС, фосфотрансферазная система), участвующих в биосинтезе трегалозы, которая является сигнальной молекулой и поглотителем свободных радикалов, защищая бактерии от неблагоприятного воздействия различных стрессов. Однако транскрипция наиболее распространенных генов OSR (отвечающих за детоксикацию АФК и репарацию ДНК) не подвергалась влиянию окислительного стресса (Larsen et al., 2016; Zhang et al., 2020).

Уровень белка, наряду с регулируемой экспрессией генов, играет ключевую роль в адаптации к стрессу. Чжан и соавтор. (Zhang et al., 2020) провели сопоставление транскриптома и фенотипа с помощью секвенирования мРНК и показали, что 97,4% перекрывающихся различно экспрессируемых генов участвуют в координированной регуляции, которая приводит к механизму перекрестной адаптации против теплового и окислительного стрессов у *L. rhamnosus*. Таким образом, бактерии достигают лучшей выживаемости при различных экологических и производственных стрессах, используя сходные защитные механизмы, широко известные как перекрестная защита (Gao et al., 2022b).

Штаммы *Lactocaseibacillus* spp. имеют важное практическое значение. В настоящее время существует множество исследований, посвященных изучению их полезных свойств (Rossi et al., 2022). Так, штамм LGG предотвращает колонизацию *H. pylori* на поверхности слизистого слоя желудка и двенадцатиперстной кишки, которая часто возникает в детстве (13–15 лет) (Westerik et al., 2018). Представители *L. rhamnosus* способны эффективно подавлять образование биопленок *Salmonella enterica* ser. *typhimurium*, *C. albicans* на абиотических поверхностях за счет ингибирования роста, снижения дифференцировки гиф и подавления генов, участвующих в формировании биопленки, а также *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* (Petrova et al., 2021).

Помимо этого, естественная резистентность данных МКБ, в частности штамма LGR-1, к ванкомицину, канамицину, метронидазолу, норфлоксацину и триметоприму/сульфаметоксазолу, а также к спермициду ноноксинол-9 позволяет проводить совместную терапию пробиотиками и противомикробными препаратами. (Petrova et al., 2021).

Штаммы *Lactocaseibacillus rhamnosus* продемонстрировали большой потенциал и экономическую ценность в качестве пробиотического штамма в пищевой промышленности. Таким образом, поиск новых перспективных и стрессоустойчивых представителей *Lactocaseibacillus* spp., выделенных из разных ниш, имеет важное практическое значение.

Глава 3. Материалы и методы

3.1. Штаммы МКБ и их культивирование

Штаммы и культивирование. Штаммы МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии (КМ) биологического факультета МГУ выращивали на питательной среде MRS (Merck KGaA, Германия) следующего состава (г/л): гидролизат казеина – 10,0; мясной экстракт – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; глюкоза – 20,0; ацетат натрия – 5,0; цитрат аммония – 2,0; Твин-80 – 1 мл; K_2HPO_4 – 2,0; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,2; $MnSO_4 \times 4 H_2O$ – 0,05, начальное значение pH 6,5. В случае твердой питательной среды добавляли 2% (вес/об) агара.

Lp. plantarum КМ МГУ 161 выращивали в статичных и аэробных условиях при 37°C в течение 24–30 ч. Статичные условия: культивирование в закрытых резиновой пробкой и алюминиевым колпачком флаконах объёмом 12 мл с 10 мл питательной среды без перемешивания. Аэробные условия: культивирование в колбах объёмом 250 мл с 15 мл питательной среды и перемешиванием (200 об/мин).

L. rhamnosus КМ МГУ 529 выращивали в статичных, аэробных и дыхательных условиях. Статичные и аэробные условия создавали так же, как и для *Lp. plantarum* КМ МГУ 161. Дыхательные условия: культивирование в колбах объёмом 250 мл с 15 мл питательной среды и перемешиванием (200 об/мин) в присутствии 38 мкМ гемина и 18 мкМ витамина K_2 как источника менахинона. Посевным материалом во всех случаях (10% об/об) служила суточная культура, выращенная в статичных условиях.

Таблица 4. Штаммы МКБ и место их выделения

№	Наименование культуры	Место выделения культуры
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> КМ МГУ 146	Россия, Ярославская область, Угличский район, Углич, сыр
2	<i>Lb. acidophilus</i> КМ МГУ 148	Россия, Ярославская область, Угличский район, Углич, сыр
3	<i>Lb. delbrueckii</i> КМ МГУ 571	страна происхождения неизвестна, эмменталь
4	<i>Lb. delbrueckii</i> 20072Т	Армения, Ереван, кисломолочный продукт
5	<i>Lb. caucasicus</i> КМ МГУ 155	Россия, Москва, кефирный гриб
6	<i>Lacticaseibacillus casei</i> КМ МГУ 154	Россия, Ярославская область, Угличский район, Углич, сыр
7	<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 528	Россия, Москва, новорожденный, 4 месяца
8	<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	Россия, Москва, новорожденный, 6 дней
9	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 527	Россия, Москва, сметана
10	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 531	Россия, Москва, анаэробное микробное сообщество, разлагающее азокрасители и аминокислоты
11	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 544	Россия, Московская область, сметана
12	<i>Levilactobacillus brevis</i> КМ МГУ 160	Россия, Москва, квасное сусло
13	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 521	Армения, Ереван, домашний сыр
14	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 535	Россия, Московская область, домашний сыр
15	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 538	Россия, Московская область, кефир
16	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 540	Россия, Московская область, творог
17	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 541	Россия, Московская область, кисломолочный продукт
18	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 542	Россия, Московская область, творог
19	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> КМ МГУ 161	Роженица, 25 лет
20	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 162	Россия, Московская область, силос
21	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 508	Россия, Московская область, домашний сыр
22	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 520	Россия, Москва, новорожденный, 3 дня (роженице 23 года)
23	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 533	Россия, Москва, анаэробное микробное сообщество, разлагающее азокрасители и аминокислоты

Таблица 4 (продолжение)

24	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 566	Россия, Москва, новорожденный, 5 дней
25	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 567	Россия, Москва, новорожденный, 6 дней
26	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 568	Россия, Москва, новорожденный, 6 дней
27	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 569	Россия, Москва, новорожденный, 6 дней (роженице 29 лет)
28	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 590	Россия, Московская область, ряженка
29	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 17938	Перу, эмменталь
30	<i>Lm. reuteri</i> КМ МГУ 570	Россия, Московская область, козий помет
31	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> КМ МГУ 163	Россия, Москва, кисломолочный продукт
32	<i>Lc. lactis</i> КМ МГУ 167	Россия, Ярославская область, Угличский район, г. Углич, кисломолочный продукт
33	<i>Lc. lactis</i> КМ МГУ 170	Россия, Ярославская область, Угличский район, г. Углич, кисломолочный продукт

У данных представителей МКБ ранее не были изучены пробиотические свойства. Колонизация отделов ЖКТ происходит благодаря адгезии (Zawistowska-Rojek et al., 2022), поэтому в данной работе был проведён скрининг МКБ по данному свойству. Помимо этого, исследовали антагонистическую способность по отношению к условно-патогенным микроорганизмам, обитающим в кишечнике и пагубно влияющим на здоровье человека (Нохна et al., 2023), взаимодействие с АФК и кислородом, а также рост при различных условиях культивирования, что способствует увеличению выхода биомассы и важно для производства пробиотических и функциональных продуктов (LeBlanc et al., 2011; Zotta et al., 2017; Siciliano et al., 2019; Johanson et al., 2020).

3.2. Определение адгезивных свойств у МКБ

3.2.1. Измерение гидрофобности клеточной поверхности

Гидрофобность клеточной поверхности определяли в соответствии с методом микробной адгезии к углеводам (Vinderola, Reinheimer, 2003), с помощью гексадекана в качестве растворителя. Бактерии выращивали в бульоне

MRS в течение 16–18 ч при 37°C. Далее, выращенную культуру дважды отмывали в 60 мМ калий-фосфатном буферном растворе, рН 6,5. При λ 560 нм измеряли начальную оптическую плотность клеток (A_0) и доводили её до 0,9–1,1 единиц в 3 мл буферного раствора. К полученным пробам добавляли 600 мкл гексадекана. Закрытые флакончики встряхивали в течение 2 мин и выдерживали в течение 1 ч при 37°C, чтобы произошло разделение фаз. Нижнюю водную фазу осторожно удаляли с помощью стерильного шприца и измеряли оптическую плотность клеток при λ 560 нм (A_1). Гидрофобность клеточной поверхности в процентах ($\Gamma\%$) рассчитывали с использованием формулы (1). Чем выше процент, тем сильнее гидрофобность клеточной поверхности.

$$\Gamma\% = \left(1 - \frac{A_0}{A_1}\right) \times 100\% \quad (1)$$

3.2.2. Определение способности к агглютинации клеток МКБ с конканавалином А

Бактериальные штаммы выращивали в бульоне MRS при 37°C в течение 18 ч. Клетки собирали центрифугированием (2000 g, 10 мин, 20°C) и промывали три раза стерильным 0,01 М фосфатным буферным раствором (PBS). Добавляли 3 мл буферного раствора, чтобы сконцентрировать культуру и сделать густую суспензию (около 6×10^{10} кл./мл). Конканавалин А (ConA) растворяли в PBS до концентрации 0,1563 мг/мл. Далее, 25 мкл суспензии клеток распределяли в микротитровальных пластинах. К ней же добавляли 25 мкл разведённого ConA и аккуратно перемешивали. Стерильный буферный раствор использовали в качестве отрицательного контроля. Планшеты оставляли при комнатной температуре в течение 1 ч. Склеивание бактериальных клеток наблюдали при 40-кратном увеличении светового микроскопа и выражали как отсутствие агглютинации (-) и наличие данного свойства (+). Эксперименты проводили в трех повторностях (Kim et al., 2006).

3.2.3. Определение способности МКБ к образованию биоплёнок

Бактериальные штаммы культивировали в жидкой питательной среде MRS при 37°C в течение 24 ч в химически чистых флаконах (очищенных с использованием бихромата калия в серной кислоте) объемом 12 мл с 20 химически чистыми тефлоновыми кубиками. Затем бактериальную культуру аккуратно удаляли и 2 раза аккуратно промывали блочки стерильной водой. Проводили фиксацию с помощью 96%-ного этанола (15 мин в 3 мл). После фиксации отмывали от спирта и удаляли излишки воды. Далее проводили окрашивание 1%-ным раствором кристаллического фиолетового (КФ, 3 мл) в течение 15 мин. Промывали 3 раза водой и экстрагировали краситель с кубиков с помощью 96%-ного этанола в течение 30 мин. Измерения ОП проводили на ФЭК при λ 590 нм против контроля без клеток микроорганизмов (Мартьянов и соавт., 2015).

3.3. Определение антимикробной активности МКБ

Бактериальные штаммы МКБ культивировали на чашках Петри со средой MRS в течение 3 сут. Затем стерильным пробочным сверлом ($\varnothing = 0,6$ см) вырезали агаровый блок с выросшей культурой лактобактерии и помещали его в другую чашку Петри на поверхность агаризованной питательной среды, только что засеянной культурой тестового микроорганизма: *Escherichia coli* КМ МГУ 85, *Pseudomonas aeruginosa* КМ МГУ 47 или *Staphylococcus aureus* КМ МГУ 144. Полученные чашки культивировали при 37°C в течение 24 ч. О степени антагонистической активности испытуемой лактобактерии судили по величине зоны ингибирования роста тест-штамма вокруг агарового блока (Аникиев и Лукомская, 1977).

3.4. Определение ингибирования автоокисления аскорбата клетками МКБ

Анализ проводили по модифицированному методу Mishra и Kovachich (1984). Бактериальные штаммы культивировали в течение 20 ч в жидкой питательной среде MRS в статичных условиях. Клетки три раза промывали 0,2 М фосфатным буферным раствором (рН 7,0). Затем к 4,9 мл этого раствора добавляли 100 мкл 5 мМ аскорбата и 100 мкл культуры. В течение 30 мин с интервалом в 30 сек измеряли оптическую плотность суспензии при λ 265 нм. Итоговое значение выражали в виде процента ингибирования автоокисления аскорбата (ИАА), которое рассчитывали по формуле (2), где A_1 – раствор аскорбата натрия без суспензии клеток, A_2 – раствор аскорбата натрия с суспензией клеток:

$$\text{ИАА}\% = \left(1 - \frac{A_2}{A_1}\right) \times 100\% \quad (2)$$

3.5. ПЦР с вырожденными праймерами для поиска генов антиоксидантной защиты

3.5.1. Выделение хромосомной ДНК

По итогам предыдущих экспериментов (определение гидрофобности клеточной поверхности, способности к образованию биоплёнок и антимикробной активности) было отобрано 8 штаммов лактобацилл. МКБ культивировали в течение 24 ч при 37°C в статичных условиях. Затем 1,5 мл каждой культуры центрифугировали на настольной центрифуге при 10000 g для получения биомассы и удаляли супернатант. К осадку клеток добавляли 200 мкл стерильной воды и 400 мкл лизирующего раствора из набора для выделения ДНК «GeneJET Genomic DNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific, США). Пробирки со смесью оставляли в термостате при 65°C на 5-10 мин. После этого

быстро добавляли 600 мкл хлороформа, аккуратно перемешивали и центрифугировали на настольной центрифуге при 10000 g в течение 2 мин. Затем добавляли свежеприготовленный преципитирующий раствор, аккуратно перемешивали в течение 2 мин и снова центрифугировали при 10000 g. Супернатант сливали и к осадку добавляли 100 мкл NaCl, аккуратно перемешивали. К этому объёму добавляли 300 мкл ледяного этанола и инкубировали при -20°C не менее 30 мин для осаждения ДНК. Далее, пробы центрифугировали при 10000 g в течение 3-4 мин, удаляли супернатант и высушивали осадок ДНК при 37°C. После этого к полученному осадку ДНК добавляли 50 мкл стерильной деионизованной воды. Хранили пробы хромосомной ДНК при +4°C.

3.5.2. ПЦР

Для поиска ключевых генов антиоксидантной защиты в геномах лактобацилл использовали сконструированные с помощью пакетов программ BLASTN и HYDEN вырожденные олигонуклеотидные праймеры, специфичные к соответствующим генам *Lactobacillaceae* (рисунок 9).

Catalase consensus gene sequence for *Lactobacillaceae*.

ATGACnGAyAAryTnACnACnGnGARgGnCArgCnTGGGcnGAyAAyAAyCaywswyTnACnGcnGcnGAmGnGGnCcnGtnyTnTnCArGAYtAyCAryTnyTnGARAAryTnGcncAyTtYAAymGnGARmGnAThCcnArGmGnGnTnGtnCAyGcnAArGnGcncGnGcnAArGGnGtnTtYAAryTnACnCAyAAyATGAArGcnTAYACnAArGcnGAYyTnTtYAAyGgGnGtngGnAArGARACnCCnAThYtnmGnTtYwscnArGtnGcnGnGARwsnGnTAYCCnGAYACnAThmGnGAYGtmGnGGnTtYgCnyTnAArTtYtAxCnArGcnGnAAyTAYGAYAThGtnGnAAyAAyACnCCnGtnTtYtYgTnAAyGAYCCnyTnAArTtYCCnGAYtTyAThCAywsnCArAArmGnGAYCCnmGnACnCAymGnmGnGAyAAyAAyATGCARtGGGAYtYtYGGCnCAywsnCcnGARwsnACnCAyCArGTnACnTAYyTnATGGnGAYmGnGnAAyCCnGcnwstAYmGnACnATGAAyGGnTAYGnwsnCAyACnTtYAArTGGGTnAAyGcnCArGnGARgCnTAYTGGGTnAArTAYCAYTtYAThwsnCnArGnGtnCArGATGACnGAyGARgTnGcnGcnAArATHGcncGnACnGAyACnGAyTAYyTnCArAAyGAYyTnTtYwscnGcnATHGARACnGGnAAyTtYCCnAArTGGACnGTnTAYGtnCArATHyTnCCnTAYCArGARGGnyTnGAYtAYAArTAYGAYAThTtYGAyGtACnAArGtnGtwnsCAyCAyGAyTAYCCnyTnATHGARtngGnGARtTYACnyTnAAyGARAAyCCnGARAAyTAYtTYACnGAYGtnGARgCnGcncTtYwscnCCnGnAAyTtYGtnCCnGnATHGARcncwstCCnGAYAAryTnyTnCArGnmmGnyTnTtYGGnTAYAArGAYGcnGARmGnTAYmGnyTnGnGcncAAyTAYGARCAryTnCCnTnAAymGnCCnyTnAAyCCnGtnCAyAAyTAYGcncmGnGAYGgnTtYATGGCnGnAArCArGAYmGnwsnGtnAAyTAYGARCCnAAywsnCAYGGnGcncGARArGARAYCAywsnGcncmGnATHCAyCArGAYGcnGTnAAyGGnAArATHGGnAAyTAYAArCCnTAYGAYGARAYAAyTtYwscnGcnGcnGnmGnyTnTAYmGnGtnATGwscnGARAYGARmGnACnmGnyTnGtnACnACnATHGtnAAyAAyTnAAyCArGTnACnwsnCnGARGTmGnATHyTnGcncCAyAAyTtYtAYCArGcnGAYCCnGARtAYGnwsnmGnATHGcncGARCAryTnGGnyTmGnATHGARAYGtnAArGcnGGnAArGcnGARcnc

Superoxide dismutase consensus gene sequence for *Lactobacillaceae*.

ATGACnTtYgTnyTnCCnAAyTnCCnTtYgAYGcncGcnGtnGARcncTAYAThGAYGcnACnACnATGCAyTnCAyCAyGAYAArCAyCAyCArACnTAYAThGAyAAryTnAAyGcncAThYtnGAyGnGtnCCnCArGcncGnGARwsnATHGARCAryTnTGcnGnGnyTnGAYGcnyTnCCnGARwsnGtmGnGTnwsnGtmGnAAyAAyGGnGGnCAyTAYAAyCAywsnTnTtYGGACnATGTYtnwsnCCnGARwsnACnA

DyP-type peroxidase consensus gene sequence for *Lactobacillaceae*.

ATGACnGtnGAyAThAArAArGcncARgAYGtnTAYAArGAYGcnGGnGARwsnGtnATHtYACnAcyTnATGtyTnAAyCAyAArGAYyTnAArGcncGARAArGAYGcncATHGcncArTtYwscnGAYATGwsnAAywsnATHAAywsnATGmGnAThmGnGAYCCnGARGcncARGCnCAyATHGcnTGmGnwsnAArAArATGGcncGTnTgyTAYGARYtnATGGAYCArTtYATGGGnATHymGnCCnATHACnwsnGtnGARAYGARACnCAyGGnTtYmGnTAYAThGARgmmGnGcncATHATGGnTtYATHGAYGnCArAAyCCnGcnGnGTnGARwsnATGGAYTAYACnyTnATHGAYGAYCCnGARtYtYAAyAAyGnwsnTAYGcncTtYgCnCArAArTAYATHCAyAAyATGGARGCnTGGAArwsnTnAArACnGARAYCArGARAArGcncATHGmmGncAYAArTtYwscnGAYmGnGAYTnGcncGAYGARAAryTnCCnAAyGcncCAyAAyGtnGcnwsnAArGAYGARARgcnGnGtnGArcnCAyAArATHGTmGnATGAAYGtnCCnTtYwscnGAYCCnGcncAArGAYATHcngGncnTAYtTYATHGnTAywsnAArGAYTtYGcncTnACnAAymGnATGTYnACnAAyATGTtYACnAArwsnGAYmGnyTnGAYtTtYwscnACnCCnATHACnGnAAyTnTtYtYATHCCnwsnAArACnACnyTnGARAArATHGcncAYGnGARtY

Peroxiredoxin consensus gene sequence for *Lactobacillaceae*.

ATGGARgTnACnmGnyTnGnAArAArATGwsnyTnGcncGnGARyTnCCnGcncGTnGGnGAYmGnyTnCCnAArTtYAAryTnTtYgAYCArCArAAyGARAArAArTnAArACnGcnGAYyTnATHGcnCArGtnGcnyTnATHwscnGtnGtnCCnGAYyTnAAyACnCCnGTnTgyACnyTnCArACnmGnAArTtYACnCArCArGcnGAYCAyTtYCCnGcncGcnAArTtYtAYACnGtnwsnAAyAAywsnGtnGcnGARArACnGGnTGGTgYGcncGARGnGtnAAyAAyGtnGAYyTnTnwsnGAYGARAYTnwsnTtYgGnTAYGARACnGnyTnTAYGtnCCnAAyTnGnAAyTnGCnmGnwsnATHGGATHtGAyGAYCArcnGGnAArATHGtnTAYmGncARGTnGtnGtnGARcArwsnGAYGARcncnGAyTAYTnGcncnGnyTnGcnGcnyTnGARAAryTnGtnCCnmGnGTnGAYGAY

Рисунок 9. Пример конструирования вырожденных ПЦР-праймеров для поиска ключевых генов антиоксидантной защиты в геномах лактобацилл

Реакционная смесь для ПЦР (25 мкл) содержала 25 нг хромосомной ДНК, 2,0 mM MgCl₂, 400 мкM дНТФ (Thermo Fisher Scientific, США), по 500 нM каждого вырожденного праймера (Синтол, Россия) и 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США). ПЦР проводили с использованием амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США) при следующем режиме: 5 мин при 95°C; 35 циклов – 30 сек при 95°C, 60 сек при температуре отжига соответствующей пары праймеров (таблица 5), 120 сек при 72°C; 7 мин при 72°C.

Продукты амплификации выявляли с помощью агарозного электрофореза в 1 × TAE буферном растворе (pH 8,0) с последующей окраской геля бромистым этидием (0,5 мкг/мл) и визуализацией полос под проходящим УФ светом (λ 254 нм). В качестве маркера для определения размера амплифицированных участков ДНК использовали MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, США).

Таблица 5. Температуры отжига сконструированных вырожденных ПЦР-праймеров для поиска ключевых генов антиоксидантной защиты в геномах лактобацилл

Кодируемый фермент	$T_a, ^\circ\text{C}$
Каталаза	55
Супероксиддисмутаза	58
Гемовая пероксидаза	58
Пероксиредоксин	55

3.6. Определение активностей ферментов антиоксидантной защиты

У двух отобранных культур МКБ (*L. rhamnosus* КМ МГУ 529, *Lp. plantarum* КМ МГУ 161) были проведены измерения активностей ключевых ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и пероксидаз.

3.6.1. Определение супероксиддисмутазной (СОД) активности

Супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1) – классический фермент антиоксидантной защиты, широко распространенный среди организмов различных физиологических групп. В данной работе использовали ксантинооксидазо-цитохромный метод (McCord, Fridovich, 1969) определения супероксиддисмутазной активности, основанный на проведении следующих реакций:

- $\text{Ксантин} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{мочевая кислота} + \text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}^+$ (осуществляет фермент ксантинооксидаза);
- $\text{Цитохром}^{3+} c + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{цитохром}^{2+} c + \text{O}_2$;
- $2 \text{O}_2^{\bullet-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (реакция супероксиддисмутации).

Для определения активности СОД рассчитывали степень ингибирования реакции восстановления окисленного цитохрома *c* супероксидным анион-радикалом. При этом регистрировали поглощение восстановленного цитохрома *c* при λ 550 нм.

Реактивы:

1) 216 мМ натрий-фосфатный буферный раствор (рН 7,8), содержащий 0,1 мМ ЭДТА. Буферный раствор перед опытом аэрировали путем перемешивания на магнитной мешалке.

2) 0,108 мМ свежеприготовленный водный раствор ксантина (Sigma, США). Растворяли ксантин при перемешивании, внося в раствор по каплям 1 М NaOH.

3) 1,1 мМ свежеприготовленный водный раствор цитохрома *c* (Sigma, США).

4) Препарат ксантиноксидазы с активностью 170 мЕ/мл (Sigma, США).

Ход определения:

Реакционная смесь объемом 2,8 мл содержала 0,06 мМ ксантина; 0,01 мМ цитохрома *c* и 1,7 мЕ ксантиноксидазы. Реакционную смесь немедленно тщательно перемешивали, вносили препарат (полученный экстракт клеток или клеточную фракцию) и измеряли поглощение восстановленного цитохрома *c* на спектрофотометре при длине волны λ 550 нм в течение 3 мин относительно контроля – реакционной смеси, содержащей вместо препарата СОД соответствующий объем деионизованной воды. За 1 единицу активности СОД принимали такое количество фермента, которое ингибировало скорость восстановления цитохрома *c* на 50% в парной системе, включающей ксантин и ксантиноксидазу, при рН 7,8 и температуре 25°C.

3.6.2. Определение каталазной активности

Каталаза (КФ 1.11.1.6) – классический фермент антиоксидантной защиты, осуществляющий разложение пероксида водорода по реакции $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Для определения каталазной активности использовали спектрофотометрический метод (Beers, Sizer, 1952; Nelson, Kiesow, 1972). Метод основан на определении скорости разложения пероксида водорода каталазой с

образованием воды и кислорода, при этом проводят измерение уменьшения поглощения пероксида водорода в реакционной смеси при λ 240 нм.

Реактивы:

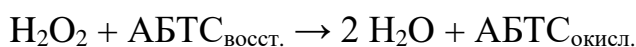
- 1) 50 мМ натрий-фосфатный буферный раствор (рН 7,0).
- 2) 0,036%-ный свежеприготовленный раствор H_2O_2 в 50 мМ натрий-фосфатном буферном растворе. Поглощение раствора при λ 240 нм должно находиться в диапазоне 0,420–0,550.

Ход определения:

В кварцевую кювету ($l = 1$ см) вносили 2,9 мл 0,036%-ного раствора пероксида водорода и 100 мкл препарата с каталазной активностью (конечный объем реакционной смеси – 3 мл). Полученную реакционную смесь немедленно тщательно перемешивали и проводили измерение уменьшения поглощения H_2O_2 на спектрофотометре при длине волны λ 240 нм в течение 5 мин относительно 50 мМ натрий-фосфатного буферного раствора (рН 7,0). За одну единицу каталазной активности принимали такое количество фермента, которое разлагает 1 мкмоль H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 39,4 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) за 1 мин при рН 7,0 и температуре 25°C.

3.6.3. Определение пероксидазной активности

Пероксидазы (КФ 1.11.1.7) разлагают пероксид водорода (H_2O_2) до воды с использованием различных восстановленных субстратов (RH_2). В данной работе в качестве субстрата использовали 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновую кислоту), АБТС. Метод определения пероксидазной активности (Gallati, 1979) основан на спектрофотометрическом измерении при λ 405 нм поглощения образующегося окисленного АБТС – продукта следующей реакции:



Реактивы:

- 1) 100 мМ натрий-фосфатный буферный раствор (рН 5,0).

2) 9 мМ свежеприготовленный раствор АБТС в 100 мМ натрий-фосфатном буферном растворе.

3) 0,3%-ный свежеприготовленный водный раствор H_2O_2 .

Ход определения:

Реакционная смесь объемом 2 мл содержала 13,6 мМ АБТС и 0,04% пероксида водорода. Реакционную смесь немедленно тщательно перемешивали, вносили препарат с пероксидазной активностью (500 мкл) и проводили измерение увеличения поглощения окисленного АБТС на спектрофотометре при длине волны λ 405 нм в течение 5 мин. Контролем служила реакционная смесь без добавления пероксида водорода. За одну единицу пероксидазной активности принимали такое количество фермента, которое окисляет 1 мкмоль АБТС ($\epsilon_{405} = 36,8 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) за 1 мин при рН 5,0 и температуре 25°C.

3.7. Культивирование *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 и *Lp. plantarum* КМ МГУ 161, физиолого-биохимический анализ

Статические условия создавали за счёт культивирования МКБ в пенициллиновых флаконах объёмом 12 мл, закрытых резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками, с 10 мл питательной среды MRS при 37°C в течение 24 ч. Аэробные культуры выращивали в колбах объёмом 250 мл с 15 мл питательной среды MRS при 37°C и 200 об/мин в течение 24 ч. Посевным материалом (10% об/об) служила суточная культура, выращенная при 37°C в статических условиях. Клетки из поздней экспоненциальной фазы роста собирали центрифугированием (4000 g, 10 мин, 4°C) и промывали 3 раза деионизированной водой. Полученную биомассу промывали 3 раза (4000 g, 10 мин, 4°C) 1 мл холодного ацетона, сушили на воздухе и хранили при 25°C.

3.7.1. Получение мембранных фракций

Культуру *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 из конца логарифмической фазы роста (1 л) осаждали центрифугированием (4000 g, 10 мин, 4°C), затем клетки трижды отмывали 50 mM К-фосфатным буферным раствором (pH 7,0). Впоследствии клетки осаждали и отмывали, используя тот же режим центрифугирования. Полученные осадки клеток суспендировали в К-фосфатном буферном растворе и разрушали в ледяной бане на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т (У-РосПрибор, Россия) мощностью 150 Вт с частотой 22 кГц в течение 10 мин (20 × 30 с) в присутствии 1 mM фенилметансульфонилфторида с последующим центрифугированием (20000 g, 40 мин, 4°C). Полученные экстракты клеток подвергали ультрацентрифугированию (150000 g, 3 ч, 4°C), после чего осадки мембран трижды отмывали буферным раствором при тех же условиях, суспендировали в буферном растворе и хранили при -20°C.

3.7.2. Полярографический анализ

Скорость поглощения кислорода целыми клетками и препаратами мембран *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 измеряли с помощью кислородного электрода типа Кларка (Rank Brothers Ltd., Великобритания) в ячейке объемом 2 мл при 37°C. Отмытые от среды клетки или мембраны вносили в ячейку, содержащую 2 мл 50 mM К-фосфатного буферного раствора (pH 7,0). Реакцию начинали добавлением субстратов в конечных концентрациях: для мембран – 10 mM дитиотреитола (ДТТ) + 0,75 mM дурухинона, 1 mM НАДН и 0,2 mM витамина К₂, а для клеток – 10 mM глюкозы. Скорости потребления O₂ рассчитывали, исходя из того, что в 1 мл буферного раствора при 37°C растворено 210 нмоль O₂.

3.7.3. Измерение спектров поглощения

Разностные спектры поглощения мембранных препаратов *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 регистрировали на однолучевом спектрофотометре Specord 50 (Analytik Jena AG, Германия) при комнатной температуре в 50 мМ К-фосфатном буферном растворе (рН 7,0). Измерения проводили в диапазоне длин волн 390–675 нм при длине оптического пути 1 см.

3.7.4. Определение глюкозы

Глюкозу в культуральной жидкости измеряли с помощью ФАД-зависимой глюкозодегидрогеназы из *Aspergillus* sp. при рН 7,0 и 30°C, используя глюкометр Contour TS (Bayer AG, Германия). Культуральные жидкости разводили 100 мМ К-фосфатным буферным раствором (рН 7,0) до конечных концентраций глюкозы 4–20 мМ.

3.7.5. Определение сухой биомассы и белка

Культуру *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 (объемом 10–15 мл) осаждали центрифугированием (4000 g, 10 мин, 4°C) и трижды отмывали осадок клеток деионизованной водой. Массу центрифужных пробирок, пустых и с биомассой, доводили до постоянного веса при 90°C. Белок определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976), используя бычий сывороточный альбумин (фракция V) в качестве стандарта.

3.8. Масс-спектрометрический анализ

3.8.1. MALDI-TOF MS/MS

Культуру *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 (объёмом 15 мл) осаждали центрифугированием и трижды отмывали клетки от питательной среды деионизованной водой. Осадки клеток суспендировали в 1 мл ацетона при -20°C , трижды отмывали ацетоном и сушили на воздухе при комнатной температуре до полного испарения ацетона. Для идентификации ферментов ЭТЦ сухие клетки суспендировали в 130–200 мкл 2%-ного лаурилсульфата натрия и инкубировали 20 мин при 95°C с последующим центрифугированием (20000 g, 20 мин, 4°C). Подготовку проб полученных экстрактов клеток для нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии (нано-ВЭЖХ) проводили по методу, изложенному ранее (Teteneva et al., 2020). Нано-ВЭЖХ и последующую времяпролётную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS/MS) проводили, как указано ранее (Wagner et al., 2017), с помощью масс-анализатора 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems, США). Масс-спектры анализировали с помощью внутренних баз данных, используя пакеты программ Scaffold (Proteome Software, Inc., США) и Sequest (Eng et al., 1994). Достоверными считали те белки, для которых были идентифицированы 2 и более триптических пептида с параметром достоверности идентификации (score) $\geq 25\%$.

3.8.2. Безметочная количественная масс-спектрометрия

Для изучения адаптации *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к аэробному росту сухие клетки (4,0–5,6 мг) суспендировали в 300 мкл 2%-ного (вес/об) раствора дезоксихолата натрия в 100 мМ бикарбонате аммония и инкубировали 50 мин при 90°C с последующим центрифугированием (20000 g, 5 мин, 4°C).

Подготовку проб и нано-ВЭЖХ проводили, как указано выше, используя хроматограф Ultimate 3000, совмещённый с масс-спектрометром Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Германия). Масс-спектры получали при разрешении 60,000 в диапазоне масс 350–1650 м/з, при тандемной масс-спектрометрии использовали разрешение 15,000. Масс-спектры анализировали с помощью внутренней базы данных белков с помощью пакета Sequest, встроенного в программное обеспечение Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Германия), и Scaffold (v. 5.0.1). В качестве эталонного стандарта использовали протеом *L. rhamnosus* LRHMDP2 (Uniprot ID:UP000009330). Частота ложноположительных результатов (FDR) составляла 1%, а минимальное количество пептидов для идентификации белка – 1. Кроме того, для количественного и статистического анализа данных использовали программы MaxQuant (v. 2.0.1.0) и SaveQuant (v. 2.3.5).

Белки с параметром достоверности $\text{score} > 75$, кратностью изменения уровня 1,5 (\log_2 кратности изменения $\geq 0,6$ или $\leq -0,6$), со значениями p и $q \leq 0,05$ рассматривались как изменившиеся в количестве в ответ на аэрацию относительно статичного роста. Кратность изменения количества белков рассчитывали, исходя из средних интенсивностей проб, полученных в ходе трёх независимых культивирований ($cv \leq 0,3$). Идентифицированные белки были классифицированы согласно их биологическим функциям с помощью базы данных кластеров ортологических групп (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>). Функции белков определяли, используя сайт <https://www.uniprot.org>.

3.9. Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. Данные представлены как «среднее \pm стандартное отклонение» по результатам, полученным на основе трёх независимых культивирований. Для оценки значимости различий использовали t-критерий Стьюдента.

Анализируемые выборки происходили из генеральной совокупности, имеющей нормальное распределение в соответствии с W -критерием Шапиро-Уилка, $p > 0,05$ (Statistica v. 10.0).

Глава 4. Результаты и обсуждение¹

4.1. Пробиотические свойства МКБ. Адгезивные свойства

4.1.1. Гидрофобность клеточной поверхности

¹ 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. Dinarieva T.Yu, **Klimko A.I.**, Kahnt J., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Adaptation of *Lactocaseibacillus rhamnosus* CM MSU 529 to aerobic growth: a proteomic approach // *Microorganisms*. 2023. Vol. 11. № 2. P. 313–327. DOI: 10.3390/microorganisms11020313. IF (SJR) = 0,862. Q2. Вклад автора в печатных листах: (0,88/0,31) (здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).

2. Динариева Т.Ю., **Климко А.И.**, Чердынцева Т.А., Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Витамин K₂ является медиатором транспорта электронов от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинолоксидазе *bd*-типа у *Lactocaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529 // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2022. Т. 77. № 3. С. 188–194. IF РИНЦ = 0,630. [Dinarieva T.Yu, **Klimko A.I.**, Bryukhanov A.L., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Vitamin K₂ mediates electron transport from NADH dehydrogenase 2 to *bd*-type quinol oxidase in *Lactocaseibacillus rhamnosus* CM MSU 529 // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2022. Vol. 77. № 3. P. 172–177. DOI: 10.3103/S0096392522030038. IF (SJR) = 0,189]. Q3. (0,38/0,17)

3. Брюханов А.Л., **Климко А.И.** Нетрусов А.И. Антиоксидантные свойства молочнокислых бактерий // *Микробиология*. 2022. Т. 91. № 5. С. 519–536. DOI: 10.31857/S0026365622100329. IF РИНЦ = 1,550 [Bryukhanov A.L., **Klimko A.I.**, Netrusov A.I. Antioxidant properties of lactic acid bacteria // *Microbiology*. 2022. Vol. 91. № 5. P. 463–478. DOI: 10.1134/s0026261722601439. IF (SJR) = 0,341]. Q3-Q4. (1,06/0,53)

4. **Климко А.И.**, Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И., Брюханов А.Л. Ингибирование автоокисления аскорбата новыми штаммами молочнокислых бактерий // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2021. Т. 76. № 4. С. 278–282. IF РИНЦ = 0,630 [Klimko A.I., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I., Bryukhanov A.L. Inhibition of ascorbate autoxidation by new strains of lactic acid bacteria // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2021. Vol. 76. № 4. P. 249–252. DOI: 10.3103/S0096392521040052. IF (SJR) = 0,189]. Q3. (0,18/0,15)

5. **Klimko A.I.**, Cherdyntseva T.A., Bryukhanov A.L., Netrusov A.I. *In vitro* evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2020. Vol. 12. № 3. P. 1139–1148. DOI: 10.1007/s12602-019-09599-6. IF (SJR) = 0,812. Q2. (0,56/0,39)

Из литературных данных известно (Salas-Jara et al., 2016), что клеточная адгезия представляет собой сложный процесс, включающий контакт между мембраной бактериальных клеток и поверхностью прикрепления. Гидрофобность клеточной поверхности зависит от поверхностных компонентов бактериальных клеток. Микробная адгезия является результатом электростатических, ван-дер-ваальсовых и других взаимодействий. Считается, что клетки с высоким сродством к неполярным растворителям-углеводородам – гидрофобные, а с низким сродством – гидрофильные (Duany et al., 2011). На основании этого факта был проведён эксперимент по измерению гидрофобности по отношению к неполярному растворителю-гексадекану (таблица 6). Чем выше сродство к гексадекану – тем выше процент гидрофобности клеточной поверхности.

Таблица 6. Процент клеток МКБ, связавшихся с гексадеканом. Цветом выделены штаммы, имеющие процент ≥ 50

№	Микроорганизм	Процент клеток, связавшихся с гексадеканом (%)
1	<i>Lb. acidophilus</i> КМ МГУ 146	89,2 ± 4,5
2	<i>Lb. acidophilus</i> КМ МГУ 148	19,3 ± 2,6
3	<i>Lb. caucasicus</i> КМ МГУ 155	70,1 ± 3,2
4	<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> КМ МГУ 571	57,3 ± 2,1
5	<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM 20072	17,3 ± 2,5
6	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 160	11,1 ± 0,5
7	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 521	27,4 ± 1,2
8	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 535	2,2 ± 0,1
9	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 538	20,2 ± 1,8
10	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 540	3,3 ± 0,5
11	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 541	10,0 ± 1,0
12	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 542	25,3 ± 1,3
13	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 161	9,2 ± 0,6
14	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 162	15,1 ± 0,8
15	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 508	78,5 ± 3,7
16	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 520	13,3 ± 0,6
17	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 533	41,4 ± 3,2

Таблица 6 (продолжение)

18	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 566	2,0 ± 0,2
19	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 567	2,3 ± 0,2
20	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 568	13,1 ± 1,5
21	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 569	4,3 ± 0,6
22	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 590	1,0 ± 0,1
23	<i>L. casei</i> КМ МГУ 154	27,3 ± 0,6
24	<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 528	7,3 ± 0,6
25	<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	10,9 ± 0,2
26	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 527	85,4 ± 4,3
27	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 531	18,6 ± 1,2
28	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 544	4,3 ± 0,6
29	<i>Lm. reuteri</i> DSM 17938	9,2 ± 1,8
30	<i>Lm. reuteri</i> КМ МГУ 570	15,3 ± 1,2
31	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> КМ МГУ 163	10,0 ± 1,0
32	<i>Lc. lactis</i> КМ МГУ 167	23,3 ± 1,5
33	<i>Lc. lactis</i> КМ МГУ 170	15,3 ± 0,8

Как видно из таблицы 6, всего пять штаммов лактобактерий обладают средством выше 50% к гексадекану. В работе Duany и др. (2011) процент гидрофобности у 7 штаммов *Lp. plantarum* варьирует в пределах от 25,06% до 35,73%. Штаммы *L. casei* ssp. *casei*, *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *L. rhamnosus* показали не очень высокий процент гидрофобности: от 2,7% у *L. casei* ssp. *casei* ATCC 27139 до 26,5% у *L. rhamnosus* DN116.030 (Pelletier et al., 1997), однако достаточно высокий процент гидрофобности продемонстрировали другие штаммы *L. rhamnosus*, *Lp. plantarum* и *L. paracasei* в работе Colloca и др. (2000) – от 65% до 95%. *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* и *Lv. brevis* так же обладали способностью к связыванию с гексадеканом: 70%, 90% и 52% соответственно (Colloca et al., 2000).

Всё это говорит о том, что данный способ адгезии является достаточно специфическим и характеризуется в пределах штаммовых различий. В пределах одного вида гидрофобность клеточной поверхности может разительно отличаться. Возможно, данные различия обусловлены местообитанием каждого конкретного штамма и биосинтезом совершенно различных поверхностных

молекул в клетках, что говорит о большом количестве механизмов модификации поверхности в клетках МКБ, которые включаются и выключаются в зависимости от условий окружающей среды.

4.1.2. Агглютинация с лектинами

Агглютинация МКБ с лектинами зависит от компонентов клеточной стенки бактерий (Zarate, Perez Chaia, 2009). В ходе работы нами была исследована агглютинация штаммов из коллекции кафедры микробиологии МГУ с конканавалином А (таблица 7).

Таблица 7. Агглютинация МКБ с конканавалином А. Цветом выделены штаммы, обладающие способностью к агглютинации

№	Микроорганизм	Агглютинация
1	<i>Lb. acidophilus</i> КМ МГУ 146	-
2	<i>Lb. acidophilus</i> КМ МГУ 148	-
3	<i>L. casei</i> КМ МГУ 154	-
4	<i>Lb. caucasicus</i> КМ МГУ 155	+
5	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 160	-
6	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 521	+
7	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 535	-
8	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 538	-
9	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 540	-
10	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 541	-
11	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 542	-
12	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 161	-
13	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 162	-
14	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 508	-
15	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 520	-
16	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 533	-
17	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 566	-
18	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 567	-
19	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 568	-
20	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 569	-
21	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 590	-
22	<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 528	-
23	<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	-
24	<i>Lm. reuteri</i> DSM 17938	-

Таблица 7 (продолжение)

25	<i>Lm. reuteri</i> КМ МГУ 570	-
26	<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> КМ МГУ 571	-
27	<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM 20072	-
28	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 527	-
29	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 531	-
30	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 544	-
31	<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> КМ МГУ 163	-
32	<i>Lc. lactis</i> КМ МГУ 167	-
33	<i>Lc. lactis</i> КМ МГУ 170	-

Конканавалин А (ConA) известен как специфический зонд на присутствие остатков сахаров с α -D-глюкопиранозильными или α -D-маннопиранозильными заменами. В частности, тейхоевая кислота грамположительных бактерий обладает сайтами связывания с данным лектином. Были проведены исследования, согласно которым агглютинацией с ConA обладали представители *Lp. plantarum*, *Lt. buchneri*, *Lm. reuteri*, *Lb. johnsonii* (Kim et al., 2006), а также некоторые штаммы *Lb. kunkeei* (Janashia et al., 2016).

В результате нашего эксперимента было показано, что агглютинация к конканавалину А – достаточно редкое явление и так же является штаммоспецифичным свойством: из коллекции МКБ всего два штамма обладают способностью к агглютинации – *Lb. caucasicus* КМ МГУ 155 и *Lv. brevis* КМ МГУ 521. Это говорит о том, что в их клеточной стенке содержатся специфические для данного лектина сайты связывания, и что данные штаммы способны таким образом инактивировать вредное воздействие лектинов на здоровье организма хозяина, что делает их перспективными компонентами пробиотических препаратов (Chen et al., 2016; Lucius, 2020).

4.1.3. Образование биоплёнок

Бактерии семейства *Lactobacillaceae* являются типичными представителями кишечной микробиоты и преобладают в проксимальных

отделах ЖКТ. Для того, чтобы микроорганизм смог противостоять жестким условиям в ЖКТ организма хозяина, он должен обладать способностью к образованию биоплёнок (Walter et al., 2008). В ходе работы была изучена способность МКБ из коллекции кафедры микробиологии МГУ образовывать биоплёнки на тефлоновых кубиках. Данный носитель обладает неровной поверхностью, что способствует образованию биоплёнок клетками, т.к. степень микробной колонизации возрастает по мере увеличения шероховатости поверхности носителя (Donlan, 2002).

Таблица 8. Значения оптической плотности экстракта КФ из биоплёнок МКБ при λ 590 нм. Цветом выделены штаммы, для которых $ОП_{590} > 0,5$

№	Микроорганизм	Средняя $ОП_{590}$
1	<i>Lb. acidophilus</i> КМ МГУ 146	0,12 ± 0,01
2	<i>Lb. acidophilus</i> КМ МГУ 148	0,66 ± 0,03
3	<i>L. casei</i> КМ МГУ 154	0,45 ± 0,06
4	<i>Lb. caucasicus</i> КМ МГУ 155	0,25 ± 0,01
5	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 160	0,55 ± 0,03
6	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 521	1,21 ± 0,05
7	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 535	1,15 ± 0,04
8	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 538	0,28 ± 0,02
9	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 540	0,35 ± 0,01
10	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 541	0,44 ± 0,02
11	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 542	0,99 ± 0,05
12	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 161	0,73 ± 0,04
13	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 162	0,74 ± 0,04
14	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 508	0,42 ± 0,02
15	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 520	0,63 ± 0,03
16	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 533	0,41 ± 0,06
17	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 566	0,38 ± 0,03
18	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 567	0,13 ± 0,01
19	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 568	0,45 ± 0,03
20	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 569	0,39 ± 0,05
21	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 590	0,22 ± 0,01
22	<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 528	0,11 ± 0,05
23	<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	1,34 ± 0,07
24	<i>Lm. reuteri</i> DSM 17938	0,26 ± 0,03
25	<i>Lm. reuteri</i> КМ МГУ 570	0,24 ± 0,04
26	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> КМ МГУ 571	0,79 ± 0,04

Таблица 8 (продолжение)

27	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 20072	0,24 ± 0,02
28	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 527	0,57 ± 0,03
29	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 531	0,46 ± 0,01
30	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 544	0,68 ± 0,03
31	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> КМ МГУ 163	0,53 ± 0,04
32	<i>Lc. lactis</i> КМ МГУ 167	0,85 ± 0,03
33	<i>Lc. lactis</i> КМ МГУ 170	0,61 ± 0,03

Наиболее интенсивное окрашивание кристаллическим фиолетовым (КФ) коррелировало с мощностью биоплёнки. Наибольшую ОП продемонстрировали штаммы *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 и *Lv. brevis* КМ МГУ 521. Стоит отметить, что типовой штамм *L. rhamnosus* (*L. rhamnosus* GG) способен образовывать биоплёнки не только на биотических (эпителий кишечника человека), но и на абиотических поверхностях (полистирол, тефлон) *in vitro* (Salas-Jara et al., 2016), что не коррелирует с величиной гидрофобности его клеточной поверхности – 18% (Kim et al., 2020).

МКБ, которые демонстрировали ОП₅₉₀ КФ выше 0,5, нами рассматривались как микроорганизмы с высокой способностью к биоплёнкообразованию. В ходе экспериментов было показано, что даже внутри одного вида штаммовые различия в образовании биоплёнок могут быть весьма существенными. Вероятно, как и в случае с гидрофобностью поверхности клеток, это может быть связано с местообитанием каждого конкретного штамма МКБ и его физиолого-биохимическими свойствами. Однако корреляции между высокой гидрофобностью и интенсивным образованием биоплёнок не наблюдается, что говорит, во-первых, о необходимости детального и всестороннего анализа штаммов МКБ при подборе оптимальных пробиотических штаммов, а во-вторых, подтверждает сложность процесса образования биоплёнок.

4.2. Антимикробная активность МКБ в отношении условно-патогенных микроорганизмов

МКБ способны ингибировать рост различных микроорганизмов и проявлять антимикробные свойства в отношении сохранения и безопасности пищевых продуктов. К примеру, некоторые пробиотические штаммы способны подавлять рост желудочно-кишечных патогенных микроорганизмов, таких, как *Helicobacter pylori*, *E. coli* и представители рода *Salmonella* (Нохха et al., 2023).

МКБ синтезируют достаточно широкий спектр антимикробных соединений: бактериоцины, органические кислоты, пероксид водорода и т.д. Это помогает им успешно колонизировать ЖКТ, конкурируя и подавляя рост патогенной микробиоты (De Vuyst, Leroy, 2007).

По результатам предыдущих опытов (определение гидрофобности клеточной поверхности, способности к образованию биоплёнок и агглютинации с конканавалином А) было отобрано 15 штаммов МКБ, на которых была исследована антимикробная активность по отношению к *E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* (таблица 9).

Таблица 9. Антибактериальная активность МКБ

№	Микроорганизм	Диаметр ингибирования роста тестового микроорганизма (мм)*		
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1	<i>Lb. acidophilus</i> КМ МГУ 146	8,3 ± 0,6	17,3 ± 0,6	31,7 ± 0,6
2	<i>Lb. caucasicus</i> КМ МГУ 155	11,3 ± 0,6	16,0 ± 0,0	26,3 ± 0,6
3	<i>Lb. delbrueckii</i> КМ МГУ 571	10,7 ± 0,6	13,3 ± 0,6	25,3 ± 0,6
4	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 160	9,0 ± 1,0	13,7 ± 0,6	26,0 ± 1,0
5	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 521	10,3 ± 0,6	15,3 ± 0,6	28,7 ± 0,6
6	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 535	9,3 ± 0,6	10,3 ± 0,6	30,7 ± 0,6
7	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 542	11,3 ± 0,6	13,0 ± 0,0	25,3 ± 0,6
8	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 161	14,0 ± 1,0	14,3 ± 0,6	13,3 ± 0,6
9	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 162	11,7 ± 0,6	16,3 ± 0,6	19,0 ± 0,0

Таблица 9 (продолжение)

10	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 508	11,3 ± 0,6	15,3 ± 0,6	13,3 ± 0,6
11	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 520	10,0 ± 0,0	16,7 ± 0,6	20,0 ± 1,0
12	<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	9,3 ± 0,6	15,0 ± 0,0	28,7 ± 0,6
13	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 527	14,3 ± 0,6	14,0 ± 1,0	13,3 ± 0,6
14	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 544	8,7 ± 0,6	4,3 ± 0,6	21,7 ± 0,6
15	<i>Lactococcus lactis</i> КМ МГУ 170	12,3 ± 0,6	15,3 ± 0,6	21,3 ± 0,6

* – диаметры зон подавления роста *E. coli* КМ МГУ 85, *P. aeruginosa* КМ МГУ 47 и *S. aureus* КМ МГУ 144 в присутствии диска с гентамицином (10 мкг) в аналогичных условиях составляли 20,0 ± 1,0, 18,0 ± 1,0 и 19,7 ± 0,6 мм соответственно.

Большая часть штаммов проявляла свою антимикробную активность по отношению к грамположительному *S. aureus*. Наиболее эффективным в отношении подавления роста как грамположительного, так и грамотрицательных микроорганизмов является *Lb. acidophilus* КМ МГУ 146.

Поскольку бактериоцины, которые потенциально могут быть причиной подавления роста, как правило, действуют на относительно близкородственные микроорганизмы, скорее всего, ингибирование роста условно-патогенных бактерий является результатом комплексного воздействия метаболитов МКБ (антимикробные вещества, снижение рН среды и т.д.). Кроме того, подавление роста связано с тем, какой вид брожения осуществляют те или иные представители лактобактерий: гомоферментативное или гетероферментативное, то есть со спектром кислот, продуцируемых ими. Высокой антибактериальной активностью обладают молочная и уксусные кислоты, которые являются продуктами гетероферментативного брожения (Lebeer et al., 2008). Способность подавлять рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов также является штаммовой характеристикой и различается среди штаммов одного вида МКБ (Aljebourya et al., 2020; Hojjati et al., 2020; Yang et al., 2020).

4.3. Ингибирование автоокисления аскорбата клетками МКБ

Аскорбиновая кислота (витамин С) относится к ряду жизненно необходимых соединений. Она требуется для нормального функционирования соединительной и костной ткани. Так, в частности, витамин С влияет на продукцию и сохранение коллагена, что важно для поддержания тонуса ЖКТ (Virtanen et al., 2007; Azcárate-Peril et al., 2011). Однако под действием активных форм кислорода (АФК) аскорбат окисляется и теряет активность (процесс автоокисления), что ведет к потере его функциональных качеств в организме. Также аскорбат может связываться с ионами металлов (железо, медь), что также ведет к потере его активности. Поэтому поддержание данного вещества в активной форме является очень важным процессом в организме. Мы проанализировали способность МКБ из коллекции кафедры микробиологии МГУ замедлять процесс окисления аскорбата (таблица 10), что является важным пробиотическим свойством.

Таблица 10. Замедление автоокисления аскорбиновой кислоты в присутствии клеток МКБ

№	Микроорганизм	Ингибирование автоокисления аскорбата Na, %
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> КМ МГУ 146	0
2	<i>Lb. caucasicus</i> КМ МГУ 155	0,15 ± 0,01
3	<i>Lb. delbrueckii</i> КМ МГУ 571	17,01 ± 0,83
4	<i>Levilactobacillus brevis</i> КМ МГУ 160	4,02 ± 0,19
5	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 521	15,51 ± 0,78
6	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 535	20,72 ± 1,04
7	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 542	11,21 ± 0,55
8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> КМ МГУ 161	43,13 ± 2,13
9	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 162	0
10	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 508	33,03 ± 1,65
11	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 520	36,64 ± 1,81
12	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> КМ МГУ 529	0

Таблица 10 (продолжение)

13	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 527	38,12 ± 1,91
14	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 544	0,13 ± 0,01
15	<i>Lactococcus lactis</i> КМ МГУ 170	0

Замедление автоокисления аскорбата определяется снижением концентрации АФК: считается, что чем медленнее аскорбат окисляется, тем эффективнее системы антиоксидантной защиты в клетках (Imer et al., 2008). Аскорбат натрия, таким образом, используется в качестве стандартной аналитической системы, которая позволяет определить возможный потенциал антиоксидантного статуса у микроорганизмов. В нашем случае наиболее эффективно замедлял автоокисление аскорбата штамм *Lb. plantarum* КМ МГУ 161. Штамм *Lv. brevis* КМ МГУ 521 показал средние результаты. Также, исходя из полученных данных, видно, что практически все исследованные штаммы МКБ из коллекции кафедры микробиологии МГУ обладают данным свойством, что свидетельствует о том, что многие МКБ могут эффективно противостоять АФК (Zanoni et al., 2008).

Полученные результаты мы сравнили с известными литературными данными (таблица 11). Некоторые штаммы МКБ из коллекции кафедры микробиологии МГУ показали более высокий процент ингибирования автоокисления аскорбата. В частности, это относится к штаммам *Lv. brevis* и *Lb. plantarum*. Однако штамм *Lactococcus lactis*, напротив, не проявил этой активности.

Таким образом, указанные штаммы из коллекции кафедры микробиологии МГУ могут составить по своему антиоксидантному статусу хорошую конкуренцию описанным штаммам из мировых коллекций и, в дальнейшем, могут быть использованы для создания эффективных пробиотических препаратов.

Таблица 11. Сравнение экспериментальных и литературных (Amaretti et al., 2013) данных по ингибированию клетками одинаковых видов МКБ

автоокисления аскорбата натрия. Цветом выделены штаммы из коллекции каф. микробиологии МГУ, которые показали более высокий процент ингибирования по сравнению с литературными данными

Микроорганизмы в данном исследовании	Ингибирование автоокисления аскорбата Na, %	Микроорганизм (Amaretti et al., 2013)	Ингибирование автоокисления аскорбата Na, % (Amaretti et al., 2013)
<i>Lb. acidophilus</i> КМ МГУ 146	0	<i>Lb. acidophilus</i> DSMZ 23033	20,0
		<i>Lb. acidophilus</i> ATCC 4356	82,0
<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 521	15,5	<i>Lv. brevis</i> DSMZ 23034	16,0
<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 535	20,7		
<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 542	11,2		
<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 161	43,1	<i>Lp. plantarum</i> LN 3	15,0
		<i>Lp. plantarum</i> LP 1	16,0
<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 162	0		
<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 508	33,0	<i>Lp. plantarum</i> MB 395	5,0
<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 520	36,6		
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> КМ МГУ 170	0	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> ATCC 19257	35,0
		<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 19435	25,0

4.4. Гены антиоксидантной защиты в геномах лактобацилл, найденные с помощью вырожденных ПЦР-праймеров

Для поиска генов, кодирующих ключевые ферменты антиоксидантной защиты в геномах лактобацилл, были сконструированы вырожденные праймеры. Эксперимент проводили на 8 представителях МКБ из коллекции кафедры

микробиологии МГУ, которые обладали наиболее выраженным спектром пробиотических свойств (адгезией, способностью к образованию биоплёнок, агглютинацией к конканавалину А, антимикробными свойствами и способностью к ингибированию автоокисления аскорбата Na) (рисунок 10; таблица 12).

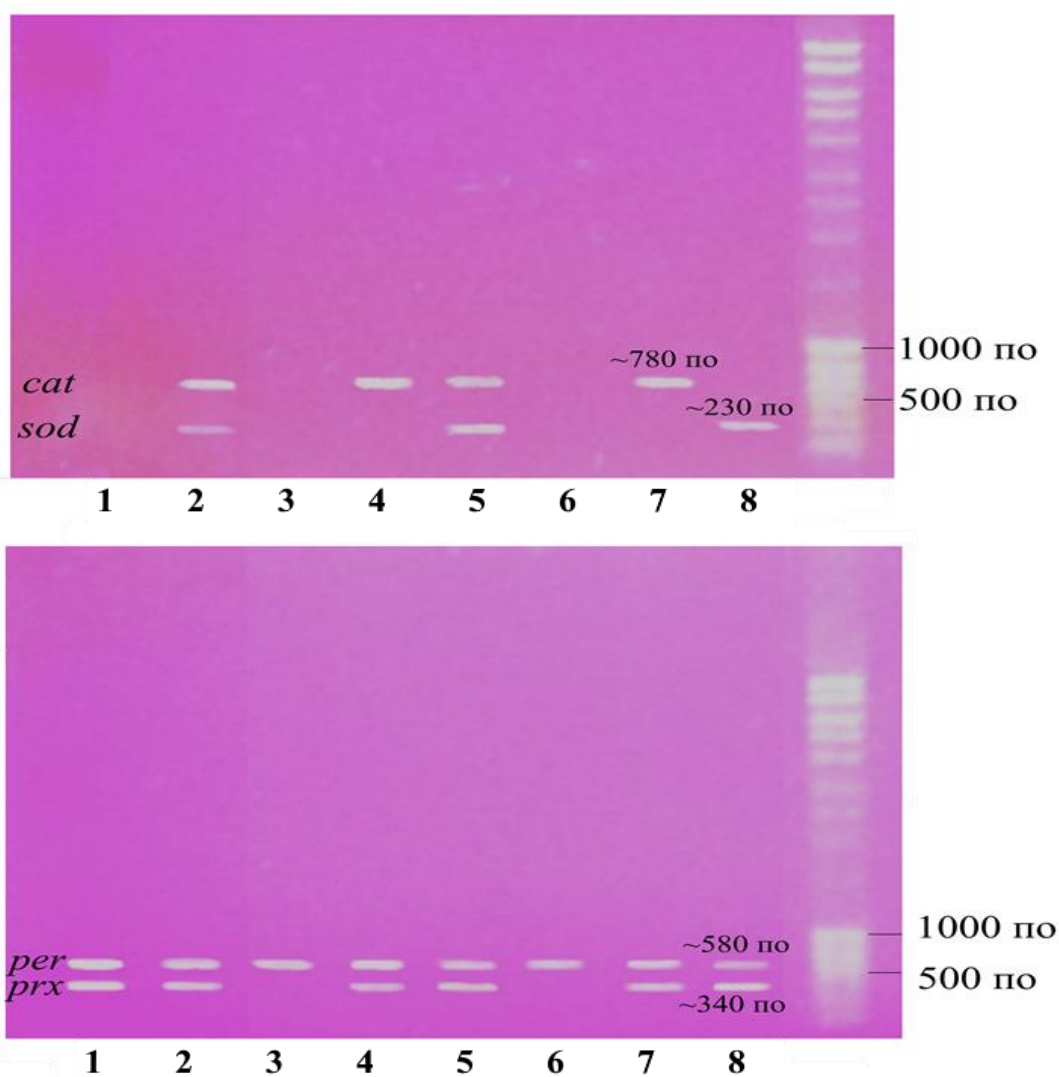


Рисунок 10. Результаты электрофореза в агарозном геле после проведения ПЦР с вырожденными праймерами на ключевые гены антиоксидантной защиты у лактобацилл. 1 – *L. rhamnosus* КМ МГУ 529; 2 – *Lp. plantarum* КМ МГУ 161; 3 – *Lb. delbrueckii* КМ МГУ 571; 4 – *Lp. plantarum* КМ МГУ 508; 5 – *L. paracasei* КМ МГУ 527; 6 – *Lb. caucasicus* КМ МГУ 155; 7 – *Lv. brevis* КМ МГУ 521; 8 – *L. paracasei* КМ МГУ 544; *cat* – кодирует каталазу; *sod* – кодирует

супероксиддисмутазу; *per* – кодирует гемовую пероксидазу; *prx* – кодирует пероксиредоксин

Таблица 12. Результаты ПЦР с вырожденными праймерами на ключевые гены антиоксидантной защиты у лактобацилл

№	Микроорганизм	<i>cat</i> (каталаза)	<i>sod</i> (СОД)	<i>per</i> (гемовая- пероксидаза)	<i>prx</i> (перокси- редоксин)
1	<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	-	-	+	+
2	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 527	+	+	+	+
3	<i>L. caucasicus</i> КМ МГУ 155	-	-	+	-
4	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 544	-	+	+	+
5	<i>Lb. delbrueckii</i> КМ МГУ 571	-	-	+	-
6	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 521	+	-	+	+
7	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 161	+	+	+	+
8	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 508	+	-	+	+

Как видно из полученных результатов, наличие того или иного гена, кодирующего СОД, каталазу, гемовую пероксидазу или пероксиредоксин, в геномах лактобацилл зависит от штамма, что коррелирует с литературными данными. Так, наличие генов, кодирующих СОД, относительно редко для МКБ и встречается у ряда штаммов *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*), *Latilactobacillus sakei* (Zotta et al., 2017) и *Lp. plantarum* (Suryavanshi et al., 2017; Liu et al., 2019). Ген, кодирующий гемовую каталазу, присутствует у ряда штаммов *Lv. brevis*, *Lp. plantarum*, у представителей подгруппы *L. casei* (Zotta et al., 2017).

Гемовая (Fe-содержащая) пероксидаза, в отличие от СОД и каталазы, является более распространённым ферментом защиты от АФК в клетках

лактобацилл (Zotta et al., 2017). Гены, кодирующие пероксиредоксин, были обнаружены у 6 штаммов МКБ из 8 протестированных. Данный белок участвует в инактивации пероксида водорода и был обнаружен у *L. rhamnosus*, а также у ряда других лактобацилл (Averina et al., 2021).

По результатам проведённых экспериментов для дальнейших исследований было выбрано два штамма МКБ: *Lp. plantarum* КМ МГУ 161 и *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. Первый штамм продемонстрировал хорошую способность к ингибированию автоокисления аскорбата Na, однако по способности к образованию биоплёнок и антимикробной активности он имел средние значения. Второй штамм не обладал способностью к замедлению автоокисления аскорбата Na, но образовывал мощные биоплёнки и обладал выраженной антимикробной активностью по отношению к *S. aureus*. К достоинствам штамма *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 как потенциального пробиотика следует также отнести тот факт, что он был выделен из фекального образца четырёхмесячного здорового младенца, т.к. представители данного вида, выделенные из кишечника, обладают более выраженными адгезивными свойствами по сравнению с представителями, выделенными из других источников (Petrova et al., 2021).

Кроме того, у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 были обнаружены гены, кодирующие гемовую пероксидазу и пероксиредоксин, а у *Lp. plantarum* КМ МГУ 161 – все гены ключевых ферментов, отвечающих за инактивацию АФК (*cat, sod, per, prx*), что полностью совпало с нашими данными по измерению ферментативных активностей (см. подглаву 4.5.).

4.5. Активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты в клетках исследуемых МКБ

Lp. plantarum КМ МГУ 161 и *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 выращивали в аэробных условиях в присутствии гемина. Активности ферментов измеряли в экстракте клеток, а также в растворимой и мембранной фракциях (таблица 13).

Таблица 13. Активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты в клетках МКБ: 1 – экстракт клеток; 2 – растворимая фракция; 3 – мембраны

Микроорганизм	Активность СОД, ед./мг белка			Активность каталазы, ед./мг белка			Активность пероксидаз, ед./мг белка		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 161	1,12 ± 0,05	0,65 ± 0,02	0,16 ± 0,01	52,14 ± 2,82	68,56 ± 3,32	<1,0	11,59 ± 1,34	20,16 ± 2,36	46,62 ± 3,11
<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	13,21 ± 1,25	<1,0	14,69 ± 1,54

В аэробных условиях при росте в присутствии гемина у *Lp. plantarum* КМ МГУ 161 были обнаружены активности всех ключевых ферментов антиоксидантной защиты (что совпадает с данными ПЦР-анализа), но активности СОД и каталаз в экстракте клеток были в несколько раз ниже по сравнению с *Lp. plantarum* LP2, *Lp. plantarum* WCFS1 и *L. casei* N87 (Chen et al., 2019; Liu et al., 2022; Ianniello et al., 2016).

Пероксидазная активность в экстракте клеток у *Lp. plantarum* КМ МГУ 161 и *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 была в несколько раз выше по сравнению с *Lp. plantarum* C17 (Zotta et al., 2013), *L. casei* N87 и *L. rhamnosus* GG (Ianniello et al., 2015; Ianniello et al., 2016). Стоит отметить, что ген *per*, кодирующий гемовую пероксидазу, был обнаружен в геномах этих двух МКБ из коллекции кафедры микробиологии МГУ (таблица 12).

Эти данные хорошо согласуются с тем фактом, что культуры *Lp. plantarum* КМ МГУ 161 в питательной среде MRS с гемином, необходимым, в частности,

для функционирования гем-зависимой каталазы, были способны сохранять высокую скорость роста даже в присутствии 7 мМ H₂O₂ (рисунок 11).

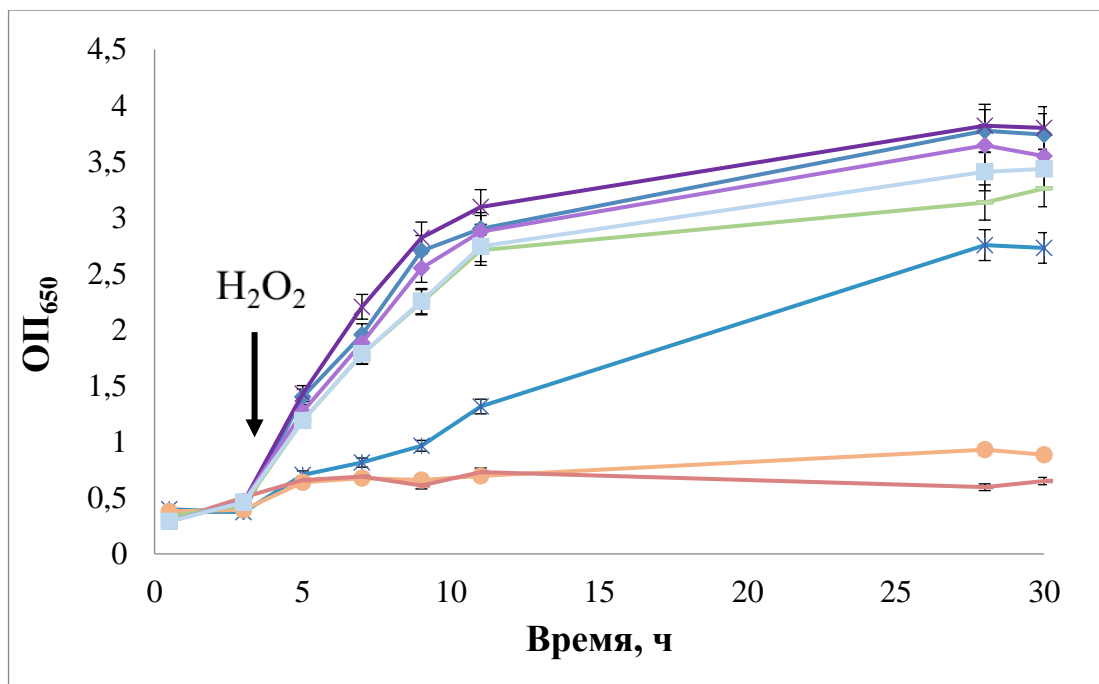


Рисунок 11. Рост культуры *L. plantarum* КМ МГУ 161 в присутствии гемина, менахинона (МХ) и H₂O₂: 1 – контроль (без H₂O₂); 2 – 5 мМ H₂O₂; 3 – 7 мМ H₂O₂; 4 – МХ + 7 мМ H₂O₂; 5 – гемин + 7 мМ H₂O₂; 6 – гемин + МХ; 7 – гемин + МХ + 5 мМ H₂O₂; 8 – гемин + МХ + 7 мМ H₂O₂. Стрелкой показан момент внесения в питательную среду раствора пероксида водорода

Полученные результаты позволяют предположить локализацию ферментов, отвечающих за инактивацию АФК, в клетках лактобацилл. Однако для более детального исследования функционирования антиоксидантных систем необходимо провести анализ экспрессии соответствующих генов в условиях различных окислительных стрессов и более детально оценить роль метаболитов в ликвидации АФК.

Несмотря на наличие каталазной и пероксидазной активностей, а также выраженную способность к ингибированию автоокисления аскорбата Na, аэрация существенно (более, чем в 2 раза по ОП) угнетала рост *Lp. plantarum* КМ

МГУ 161. Напротив, аэробные условия культивирования совершенно не влияли на рост *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. (таблица 14).

Таблица 14. Рост *Lp. plantarum* КМ МГУ 161 и *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 при разных условиях аэробноза

Условия культивирования	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 161		<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	
	ОП, 0 ч	ОП, 24 ч	ОП, 0 ч	ОП, 24 ч
Статичные	0,29 ± 0,03	5,15 ± 0,38	0,25 ± 0,02	4,47 ± 0,20
Аэробные	0,28 ± 0,02	2,42 ± 0,16	0,26 ± 0,03	4,49 ± 0,22

В этой связи для изучения механизмов адаптации к росту в аэробных условиях был выбран штамм КМ МГУ 529.

4.6. Влияния аэробных и дыхательных условий культивирования на рост *L. rhamnosus* КМ МГУ 529

Штамм КМ МГУ 529 выращивали в статичных и аэробных условиях культивирования. При этом интенсивная аэрация не оказывала существенного влияния на выход биомассы *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 (таблица 15). Для активации дыхательного метаболизма лактобациллу культивировали при интенсивной аэрации в присутствии гемина и витамина К₂ (менахинона). Контролем служили аэробные культуры, выращенные без гемина и менахинона. Добавление в среду гемина или менахинона по отдельности не оказывало существенного влияния на выход биомассы и значения молярных экономических коэффициентов $Y_{P/S}$ по истечении 18 ч культивирования. Однако совместное их внесение в среду (дыхательные условия) приводило к увеличению этих показателей на 27 и 20% по сравнению с контролем (аэробные условия) соответственно.

Таблица 15. Влияние аэрации на рост *L. rhamnosus* КМ МГУ 529

Условия культивирования	Биомасса, г сух. Кл./л	Y _{P/S} , г/моль глюкозы	pH, 24 ч
Статичные	1,93 ± 0,04	25,2 ± 0,7	3,92 ± 0,03
Аэрация: контроль	1,92 ± 0,07	20,9 ± 0,2	4,02 ± 0,16
Аэрация: гемин	1,93 ± 0,05	20,7 ± 0,1	4,03 ± 0,13
Аэрация: K ₂	2,05 ± 0,04	23,5 ± 0,6	3,94 ± 0,12
Дыхательные: гемин+ K ₂	2,44 ± 0,04*	25,2 ± 0,4*	4,25 ± 0,03*

Примечание: * – статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$.

Значения выхода биомассы и Y_{P/S} приведены для 18 ч культивирования, а pH – для 24 ч культивирования.

По истечении 24 ч в аэробных условиях выход биомассы штамма КМ МГУ 529 составлял $2,26 \pm 0,01$ г сухих клеток/л, а в дыхательных – $2,86 \pm 0,05$ г сухих клеток/л ($p < 0,05$), или на 27% больше. В аэробных условиях в присутствии гемина и менахинона клетки полностью потребляли глюкозу к 24 ч, тогда как в аэробных условиях остаточное содержание глюкозы в среде составляло $14,7 \pm 0,5$ ммоль/л, или около 10% от исходной концентрации. После 18 ч культивирования в аэробных условиях оставалось около 25% от исходного содержания глюкозы в среде, а в дыхательных условиях – около 15%. Более эффективное использование глюкозы лактобациллой, выращенной в присутствии гемина и менахинона, очевидно, связано с получением клетками дополнительной энергии за счёт окислительного фосфорилирования в ЭТЦ (Pedersen et al., 2012).

Стоит отметить, что так же менялось и значение pH: в дыхательных условиях по прошествии 24 ч культивирования штамма КМ МГУ 529 pH культуральной жидкости было несколько выше по сравнению с контролем (таблица 9). Такой же эффект наблюдали в случае *Lm. reuteri* FUA3168, *Lm. reuteri* DSM20016 и *Lv. spicheri* FUA3125 (Ianniello et al., 2015a). При этом в дыхательных условиях указанные культуры образовывали меньше лактата и ацетата, чем при росте в аэробных условиях на среде с менахиноном. Такое изменение pH, скорее всего, обусловлено тем, что в условиях функционирования ЭТЦ меньше пирувата превращается лактатдегидрогеназой (Ldh) в молочную

кислоту. Как следствие этого, больше пирувата может окисляться пируватдегидрогеназой (Pdh) до ацетил-КоА и НАДН. При этом НАДН, который не пошёл на образование лактата, вместе с НАДН, полученным в результате активности Pdh, может впоследствии окисляться в ЭТЦ. В пользу этой гипотезы свидетельствует тот факт, что ингибирование Ldh оксаматом натрия при росте *Lc. lactis* IL1403 в дыхательных условиях сопровождалось стимуляцией аэробного дыхания и повышением выхода биомассы (Arioli et al., 2013). Снижение активности Ldh и повышение выхода биомассы наблюдали также у *L. casei* N87 при переходе от аэробных к дыхательным условиям в контролируемой периодической культуре с 30%-ным насыщением кислородом (Ianniello et al., 2016). Напротив, по данным протеомного анализа уровень компонента E3 Pdh у *L. casei* N87 был выше в дыхательных условиях по сравнению с аэробными (Siciliano et al., 2019). Повышение уровня экспрессии генов *pdh* в дыхательных условиях по сравнению с аэробными показано у *L. rhamnosus* N132 (Ianniello et al., 2016).

Исходя из результатов предыдущих экспериментов для последующих анализов был выбран *L. rhamnosus* КМ МГУ 529.

4.6.1. Разностные спектры поглощения мембранных фракций *L. rhamnosus* КМ МГУ 529

Компоненты ЭТЦ *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 исследовали с помощью спектрального анализа и масс-спектрометрии. На рисунке 12 приведены разностные спектры поглощения препаратов мембран, выделенных из клеток конца логарифмической фазы роста, выращенных аэробно в присутствии гемина. Известно, что в этих условиях уровень экспрессии гена *cydA*, кодирующего субъединицу I хинолоксидазы *bd*, был максимальным у *Lv. spicheri* LP38, *L. rhamnosus* N132 и *L. casei* N87 (Ianniello et al., 2015a; Ianniello et al., 2016). На нижнем спектре, когда цитохромы *b*-типа только частично восстановлены,

хорошо виден широкий максимум при 617 нм, скорее всего, соответствующий α -полосе цитохрома d -типа. Последующее полное восстановление препаратов мембран дитионитом натрия выявило на верхнем спектре максимум поглощения при 559 нм, плечо при 533 нм и пик при 427 нм, принадлежащие α -, β - и γ -полосам цитохромов b -типа соответственно. Полученные спектральные характеристики близки к аналогичным значениям для очищенного цитохромного комплекса bd из *Bacillus stearothermophilus* (Sakamoto et al., 1999), то свидетельствует в пользу присутствия хинолоксидазы bd -типа в мембранах *L. rhamnosus* КМ МГУ 529.

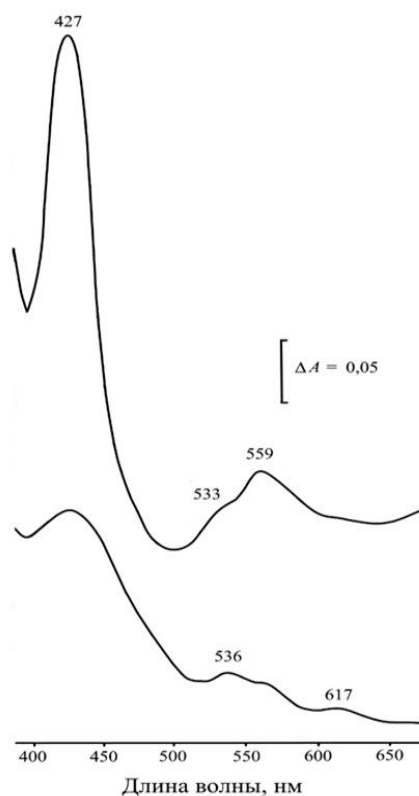


Рисунок 12. Разностные спектры поглощения (восстановление дитионитом натрия минус окисление персульфатом аммония) мембранных фракций из *L. rhamnosus* КМ МГУ 529, выращенной в присутствии гемина. Нижний спектр – неполное восстановление цитохромов b -типа, верхний – полное восстановление. Мембраны суспендированы (2,0 мг белка/мл) в 50 мМ К-фосфатном буферном растворе, pH 7,0

4.6.2. Потребление кислорода препаратами мембран, выделенных из *L. rhamnosus* КМ МГУ 529

Для обнаружения компонентов ЭТЦ у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 был проведён эксперимент с мембранами данного штамма в присутствии НАДН, менахинона, дуροхинона и ДТТ.

Препараты мембран штамма КМ МГУ 529 окисляли донор электронов для хинолоксидазы (ДТТ/дуροхинон) с высокой скоростью – $256,4 \pm 19,7$ нмоль O_2 /мин \times мг белка (таблица 16). НАДН-оксидазную активность мембран изучали на препаратах из клеток, выращенных аэробно в присутствии гемина. Мембраны окисляли 1 мМ НАДН с относительно высокой скоростью. Последующее внесение в реакцию смесь 0,2 мМ витамина K_2 сопровождалось увеличением скорости потребления кислорода мембранами в 4,6 раза. По всей вероятности, экзогенный менахинон переносит электроны от НАДН-дегидрогеназы к хинолоксидазе *bd*, которая в свою очередь непосредственно восстанавливает кислород.

Таблица 16. Поглощение кислорода препаратами мембран, выделенными из клеток *L. rhamnosus* КМ МГУ 529

Субстрат	Поглощение кислорода (нмоль O_2 /мин \times мг белка)
ДТТ + дуροхинон	$256,4 \pm 19,7$
НАДН	$89,4 \pm 5,1$
НАДН + менахинон	$411,9 \pm 24,8$

Ферменты, участвующие в окислении мембранами НАДН, были идентифицированы с помощью MALDI-TOF тандемной масс-спектрометрии (таблица 17). Nox-2 переносит электроны и протоны от НАДН непосредственно на кислород с образованием воды (Averina et al., 2021). Ndh-2 передает электроны и протоны от НАДН на хинон, который затем окисляется хинолоксидазой *bd*-

типа с образованием протондвижущей силы (Marreiros et al., 2016). Из соотношения скоростей следует заключить, что при этом 80% транспорта электронов от НАДН к кислороду шло через Ndh-2, менахинон и хинолоксидазу и только 20% – через Nox-2. Результаты изучения влияния дыхательного метаболизма на потребление *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 кислорода в присутствии глюкозы приведены на рисунке 13.

Таблица 17. Ферменты, участвующие в окислении мембранами НАДН у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529

Фермент	АС ¹	Ген	Пептиды ²	Mw ³ , kDa	Score ⁴	% сходства ⁵
Пиридиннуклеотид-дисульфид-оксидоредуктаза	C2K0C6	<i>nox_2</i>	9	49,1	71,9	40,6
НАДН-дегидрогеназа 2	F3MUB2	<i>ndh_2</i>	13	48,1	85,9	41,6
Субъединица I хинолоксидазы <i>bd</i>	A0A249N3D0	<i>cydA</i>	5	53,2	31,8	18,0

Примечания: ¹ – идентификатор белка в базе данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>);

² – число уникальных для данного белка пептидов;

³ – теоретический молекулярный вес;

⁴ – параметр достоверности идентификации белков;

⁵ – % сходства с белком по уникальным пептидам.

Целые клетки штамма КМ МГУ 529, выращенные аэробно на среде с гемином, активно потребляли кислород в присутствии глюкозы. Внесение в ростовую среду менахинона сопровождалось двукратным увеличением скорости окисления клетками глюкозы, что, очевидно, является результатом встраивания менахинона в ЭТЦ и переноса им электронов от Ndh-2 к хинолоксидазе *bd*-типа. После хранения клеточных суспензий при 0°C в течение 24 ч скорость окисления глюкозы снижалась на 75% у клеток из среды с гемином и лишь на 30% у клеток из среды с гемином и менахином. Таким образом, выращенные в дыхательных условиях клетки лактобактерий способны дольше сохранять метаболическую активность по отношению к глюкозе по сравнению с аэробными клетками, выращенными на среде с гемином. Интересно, что клетки *Lc. lactis* IL1403 с

активированным дыхательным метаболизмом оставались жизнеспособными после хранения при 4°C в течение нескольких месяцев, тогда как клетки с броидильным метаболизмом – менее 20 сут. Жизнеспособность клеток определяли путём посева разведений на твёрдую питательную среду (Duwat et al., 2001; Johanson et al., 2020).

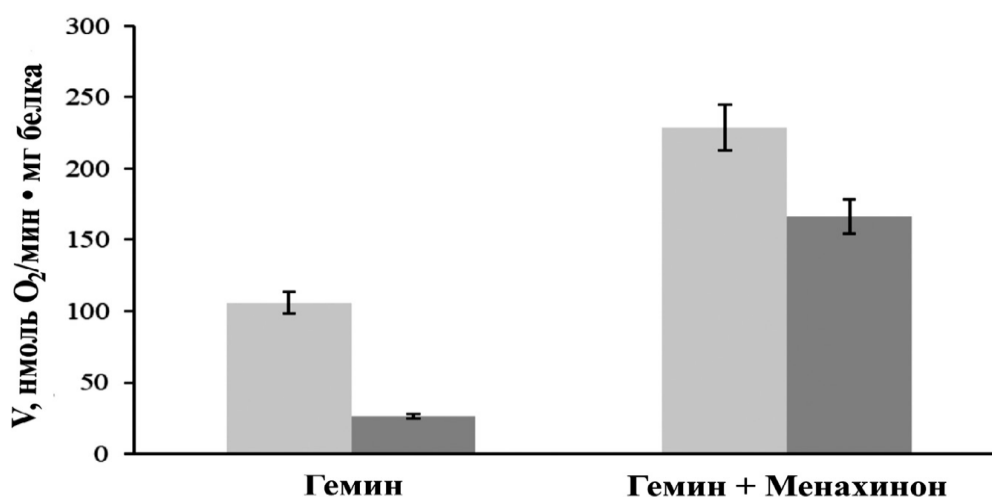


Рисунок 13. Потребление кислорода целыми клетками *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в присутствии глюкозы. Среда культивирования содержала гемин или гемин + менахинон; потребление кислорода отмытыми от среды клетками обозначено светлым цветом, а клетками после хранения при 0°C в течение суток – темным цветом. Реакционные смеси содержали 0,3–0,5 мг белка/мл

4.6.3. Механизмы адаптации *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к аэробному росту

Для изучения молекулярных механизмов адаптации *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к аэробному росту применили протеомный анализ лизатов клеток, выращенных в статичных и аэробных условиях. При этом использовали суточные культуры конца логарифмической фазы роста (рисунок 14).

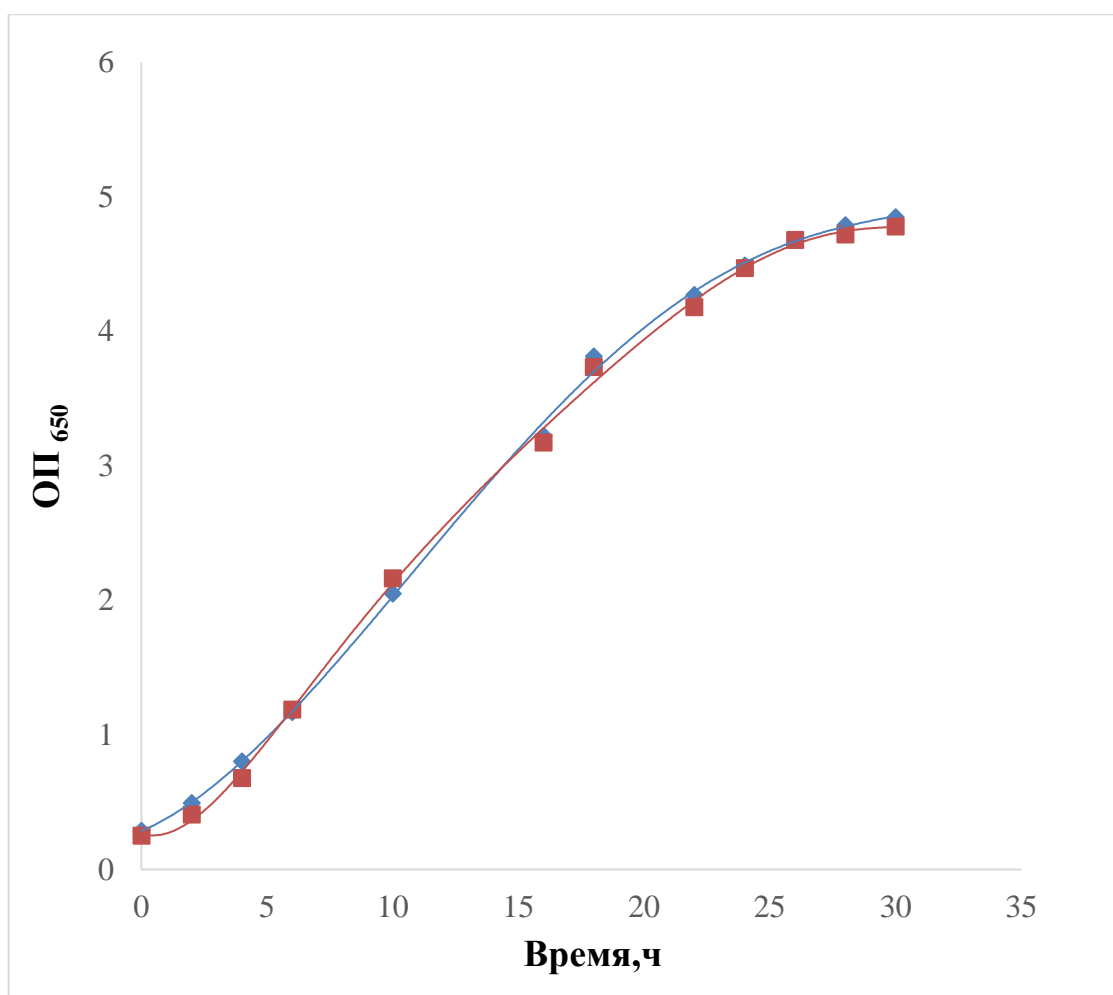


Рисунок 14. Рост *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в статичных (■) и аэробных (◆) условиях

Аэробные условия существенно не влияли на оптическую плотность культуры. Конечная концентрация кислорода по истечении 24 ч культивирования составляла 0 и 40–50% насыщения для статичных и аэробных условий соответственно.

Аэрация в значительной мере оказывала влияние на протеом штамма КМ МГУ 529. Из 57 белков, изменившихся в количестве при интенсивной аэрации по сравнению со статичным ростом, уровень 43 белков повысился, а 14 – понизился. Проведена филогенетическая классификация белков на основании сходства их последовательностей с тем или иным кластером ортологических групп (COG, таблица 18).

Аэрация существенно повлияла на протеом *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. В частности, она способствовала увеличению синтеза фосфокетолазы (Xfp), ключевого фермента пентозофосфатного пути (рисунок 15), в то время как уровни ферментов, участвующих в образовании оксалоацетата, цитратлиазы (CitE) и аспаратаминотрансферазы (AvtA), снижались в аэробных условиях. При этом количество CitE в клетках значительно уменьшалось (в 7,5 раза). Таким образом, аэробное культивирование существенно влияет на углеродный метаболизм *L. rhamnosus* КМ МГУ 529: пируват образуется гликолизом и пентозофосфатным путём, а не гликолизом и цитрат-оксалацетатным путем, как в случае статичного культивирования. Подобный эффект наблюдали и у *L. casei* N87: при аэрации увеличивался синтез Xfp и уменьшался синтез CitE (Siciliano et al., 2019). Пируват является центральным промежуточным продуктом молочнокислого брожения и может быть дальше преобразован с помощью лактатдегидрогеназы (Ldh) в лактат, пируватформиатлиазы (PflB) в формиат и ацетил-КоА, пируватоксидазы (Pox) в ацетилфосфат и CO₂, пируватдегидрогеназного комплекса (Pdh) в ацетил-КоА и НАДН и α-ацетолактатсинтазой (AlsS) в ацетолактат и CO₂. В аэробных условиях у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 наблюдали сверхсинтез AlsS (в 7,5 раза), увеличение количества Pox, PdhD, AlsD, в то время как уровень PflB снижался. Таким образом, образование ацетил-КоА было в основном обусловлено активностью PflB во время статичного роста и активностью Pdh, Pox/фосфат-ацетилтрансферазы (Pta) или Xfp/Pta во время аэробного роста. В то же время, ацетилфосфат, продуцируемый Pox и Xfp, может быть дополнительно преобразован в ацетат ацетокиназой (AckA), играющей важную роль в получении дополнительной энергии при аэробнозе у лактобактерий (Zotta et al., 2017), с образованием АТФ. Однако в случае *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 эта реакция похоже не играла существенной роли в энергетическом метаболизме

штамма, т.к. содержание AskA в протеоме было относительно низким (score < 50; таблица 19).

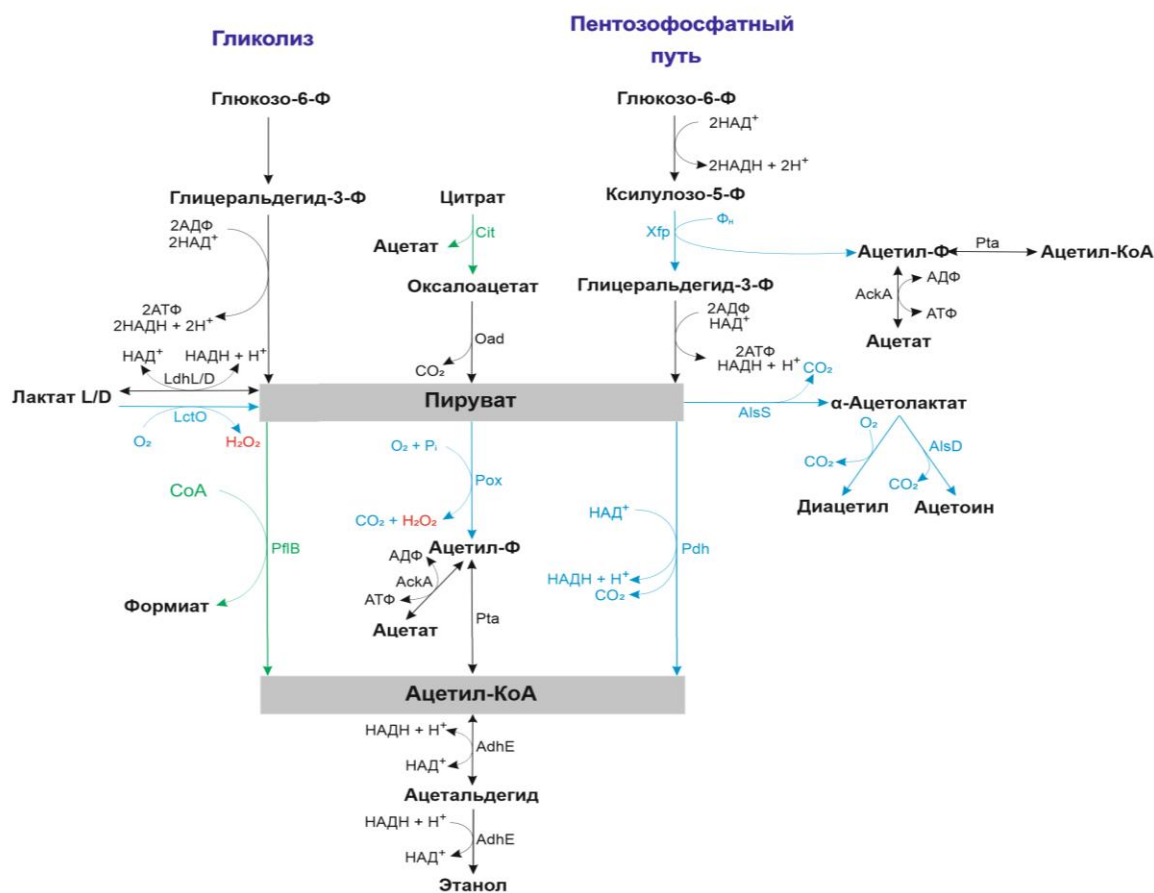


Рисунок 15. Пути превращения пирувата у *L. rhamnosus* KM MГУ 529. LdhL/D – лактатдегидрогеназа; LctO – лактатоксидаза; Cit – цитратлиаза; Xfr – фосфокетолаза; AskA – ацетаткиназа; Oad – оксалоацетатдекарбоксилаза; Pox – пируватоксидаза; PflB – пируватформиатлиаза; Pta – фосфат-ацетилтрансфераза; Pdh – пируватдегидрогеназный комплекс; AlsS – α-ацетолактатсинтаза; AlsD – α-ацетолактатдекарбоксилаза; AdhE – ацетальдегид/алкоголдегидрогеназа. Ферменты с повышенным уровнем в аэробных условиях выделены синим, с пониженным уровнем – зеленым (таблица 18), а другие идентифицированные ферменты — черным (таблица 19).

Таблица 18. Ферменты/белки, уровень которых меняется у *L. rhamnosus* KM МГУ 529 при интенсивной аэрации по сравнению со статичными условиями культивирования согласно данным безметочной количественной масс-спектрометрии

Идентифицированные белки	АС ¹	Ген	Score/% Сходства	MW ² , кДа	log ₂ A/C ³
КЛЕТОЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ И СИГНАЛИНГ					
[D] Контроль клеточного цикла, деление клеток					
Белок клеточного деления SepF	K8QLA2	LRHMDP2_1118 (<i>sepF</i>)	179,4/92,1	16,8	0,6
[O] Посттрансляционная модификация, обмен белков, шапероны					
Тиоредоксин	K8Q3Z2	LRHMDP2_2372 (<i>trxA</i> , <i>trxA_2</i>)	323,3/76,7	11,5	1,2
Тиолпероксидаза Трх-типа	K8QQU7	LRHMDP2_391 (<i>tpx</i>)	323,3/67,3	18,5	1,6
10 kDa шаперон	K8QSC4	LRHMDP2_689 (<i>groES</i> , <i>groS</i>)	323,3/100, 0	10,0	0,9
[T] Механизмы передачи сигнала					
Универсальный стрессовый белок	K8QLD2	LRHMDP2_1718	116,9/60,8	18,2	0,7
[V] Защитные механизмы					
Белок семейства ThiJ/PfpI	K8QE31	LRHMDP2_2144 (<i>yfkM</i> , <i>pfpI</i>)	323,3/67,3	18,4	0,7
Алкилгидропероксидредуктаза С	K8QI55	LRHMDP2_2046 (<i>ahpC</i>)	308,3/70,1	20,5	-0,9
ХРАНЕНИЕ ИНФОРМАЦИИ И ПРОЦЕССИНГ					
[J] Трансляция, структура и биогенез рибосом					

Таблица 18 (продолжение)

Связывающийся с рибосомой фактор А	K8QHI9	LRHMDP2_796 (<i>rbfA</i>)	234,9/60,3	16,7	0,7
Предполагаемая тРНК-сульфотрансфераза	K8QLD7	LRHMDP2_1148 (<i>thiI</i>)	77,4/37,5	45,2	0,6
Белок, содержащий домен β-лактамазы	K8QEJ1	LRHMDP2_1441 (<i>vicX</i>)	210,7/15,0	46,3	0,9
[К] Транскрипция					
Регулятор транскрипции фактора устойчивости к органическим гидропероксидам	K8QM79	LRHMDP2_1420 (<i>ohrR</i>)	142,7/37,1	16,1	0,8
Регулятор транскрипции, семейство MarR	K8QLH4	LRHMDP2_405	323,3/78,9	17,4	-0,6
МЕТАБОЛИЗМ					
[С] Получение и преобразование энергии					
НАДН-дегидрогеназа	K8Q7J1	LRHMDP2_2182	323,3/50,9	42,7	1,0
Дигидролипоилдегидрогеназа (Е3)	K8QFD2	LRHMDP2_1084 (<i>pdhD, lpdA</i>)	140,9/28,9	49,1	1,2
НАДН: флавиноксидоредуктаза, семейство ОУЕ	K8Q900	LRHMDP2_1924 (<i>namA, yqiG</i>)	187,1/52,5	41,8	1,3
Предполагаемая НАД(ФАД)-зависимая дегидрогеназа	K8QIY4	LRHMDP2_17 (<i>nox_2</i>)	323,3/39,1	49,1	1,7
L-лактатоксидаза	K8Q6V5	LRHMDP2_1980 (<i>lctO</i>)	323,3/72,2	39,3	1,2
НАДН-пероксидаза Npx	K8QQ66	LRHMDP2_166 (<i>npx, npr</i>)	323,3/56,1	49,3	2,5
Пируватоксидаза [С/Н/Р]	K8QGХ3	LRHMDP2_203 (<i>ydaP, cidC</i>)	323,3/52,7	62,7	2,2
Алкогольдегидрогеназа	K8QNN2	LRHMDP2_1305 (<i>xylB_1, xylB_3</i>)	272,5/43,4	39,8	-1,6
Пируватформиатлиаза	K8QD01	LRHMDP2_2896 (<i>pflB</i>)	145,4/40,6	85,2	-1,4
[Е] Транспорт и метаболизм аминокислот					

Таблица 18 (продолжение)

Малая цепь карбамоилфосфатсинтазы [E/F]	K8Q6G7	LRHMDP2_2442 (<i>carA</i>)	323,3/36,9	39,4	0,9
Большая цепь карбамоилфосфатсинтазы [E/F]	K8QCB0	LRHMDP2_2441 (<i>carB</i>)	323,3/54,3	116,2	1,5
Катаболическая ацетолактатсинтаза [E/H]	K8QB15	LRHMDP2_2651 (<i>alsS</i>)	308/55,0	60,5	2,9
АВС транспортер, периплазматический олигопептид-связывающий белок OppA	K8QLE7	LRHMDP2_1733 (<i>oppA</i> , <i>oppA_2</i>)	221,1/37,0	60,4	1,0
Нейтральная эндопептидаза	K8Q9I4	LRHMDP2_2878 (<i>pepO</i>)	224,9/49,1	71,7	0,6
H-белок системы расщепления глицина	K8QLC1	LRHMDP2_1703 (<i>gcvH</i>)	323,3/100, 0	10,8	0,6
Цистеинсинтаза	K8QQD2	LRHMDP2_241 (<i>cysK</i>)	323,3/76,4	32,6	0,7
Регулятор транскрипции, домен семейства GntR/аспартатаминотрансфераза [E/K]	K8Q1F8	LRHMDP2_2770 (<i>avtA</i>)	323,3/60,0	44,2	-0,9
Аргининосукцинатсинтаза	K8QAT7	LRHMDP2_2687 (<i>argG</i>)	323,3/61,6	44,7	-0,7
АВС-транспортер клеточного деления, АТФ-связывающий белок FtsE	K8QCV1	LRHMDP2_1050 (<i>glnQ</i>)	323,3/83,1	27,3	-0,7

[F] Транспорт и метаболизм нуклеотидов

Оротатфосфорибозилтрансфераза	K8Q3P7	LRHMDP2_2438 (<i>pyrE</i>)	88,95/25,0	22,4	2,3
Дигидрооротаза	K8Q3Q2	LRHMDP2_2443 (<i>pyrC</i>)	222,8/47,2	45,1	1,8
Аспартаткарбамоилтрансфераза	K8QFX4	LRHMDP2_2444 (<i>pyrB</i>)	323,3/62,6	35,1	1,4
Бифункциональный белок PyrR	K8QCB4	LRHMDP2_2446 (<i>pyrR</i>)	241,8/82,9	19,2	1,6
Дезоксирибозо-фосфат-альдолаза	K8QGF6	LRHMDP2_13 (<i>deoC</i>)	323,3/65,2	23,0	1,1
Аденозилкобаламинзависимая рибонуклеозид-трифосфат-редуктаза	K8Q4T0	LRHMDP2_2712 (<i>rtpR</i> , <i>nrdJ</i>)	323,3/52,8	82,5	-2,0
Дезоксиаденозинкиназа/ дезоксигуанозинкиназа	K8QBP7	LRHMDP2_1731	279,2/69,8	27,2	-1,1

[G] Транспорт и метаболизм углеводов

Таблица 18 (продолжение)

Вероятная фосфокетозаза	K8Q7D7	LRHMDP2_1766 (<i>xfp, xpkA</i>)	323,3/50,4	89,8	1,2
Белок биосинтеза гликогена GlgD, семейство глюкозо-1-фосфат-аденилилтрансфераз	K8QJ10	LRHMDP2_490 (<i>glgD</i>)	246,5/40,6	43,1	0,9
Пируватоксидаза [G/H/R]	K8Q595	LRHMDP2_2599 (<i>spxB, pox</i>)	282,4/47,9	64,0	1,0
Субстрат-связывающий белок ABC-транспортера	K8QJU7	LRHMDP2_357	323,3/68,0	34,0	-1,1
β -Цепь цитратлиазы	K8Q549	LRHMDP2_2632 (<i>citE</i>)	272/73,6	31,4	-2,9
[H] Транспорт и метаболизм коферментов					
Липоатпротеинлигаза	K8Q5G3	LRHMDP2_2877 (<i>lplJ, lplA</i>)	323,3/82,8	38,4	0,9
[I] Транспорт и метаболизм липидов					
Дегидрогеназа β -гидроксикислоты, родственная 3-гидроксиизобутиратдегидрогеназе	K8QD39	LRHMDP2_2289	113,4/26,1	30,1	1,3
[P] Транспорт и метаболизм неорганических ионов					
Фосфат-связывающий белок	K8QH56	LRHMDP2_1112 (<i>pstS</i>)	213,8/57,1	32,0	-0,8
[Q] Биосинтез, транспорт и катаболизм вторичных метаболитов					
Оксидоредуктаза семейства альдо/кеторедуктаз, подгруппа 1	K8Q5E9	LRHMDP2_2527 (<i>dkgA, yqhE</i>)	323,3/60,8	31,6	0,7
α -Ацетолактатдекарбоксилаза	K8QD20	LRHMDP2_2886 (<i>budA, alsD</i>)	209,4/47,5	25,7	1,2
ПЛОХО ОХАРАКТЕРИЗОВАННЫЕ БЕЛКИ					

Таблица 18 (продолжение)

[R] Предсказана только общая функция					
Фавин-нуклеотид-связывающий белок, родственный пиридоксин-5'-фосфат-оксидазе V	K8Q7A0	LRHMDP2_2560	323,3/91,7	14,7	2,9
[S] Функция неизвестна					
Белок UPF0297	K8QCI9	LRHMDP2_2365 (<i>alaRS</i>)	323,3/98,8	10,1	1,1
Белок UPF0291	K8QHM8	LRHMDP2_821 (<i>ynzC</i>)	95,4/74,1	9,7	0,7
Белок, содержащий домен DUF124	K8QS65	LRHMDP2_624 (<i>yfhL</i>)	93,6/29,9	25,9	0,9
Белок, содержащий домен мульти-ubiq	K8Q6T6	LRHMDP2_1960	323,3/51,4	20,1	1,7
Белок, содержащий домен YfIT	K8QDE0	LRHMDP2_784	323,3/78,0	14,3	1,2
Белок, содержащий домен Fe-S_biosyn (DUF1797(YkuJ) семейство белков)	K8Q441	LRHMDP2_2812 (<i>ykuJ</i>)	252,6/46,2	10,5	0,9
Предполагаемый липопротеин феромона (ФМН-связывающий домен белка)	K8Q706	LRHMDP2_2035 (<i>cad</i>)	323,3/68,9	32,6	-0,9
Дополнительный липопротеиновый компонент предполагаемого переносчика кобаламина ECF (DUF4430)	K8Q211	LRHMDP2_2713	84,7/44,6	14,3	-1,8

Примечания: ¹- Идентификатор белка в базе данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>);

² - Mw – теоретический молекулярный вес идентифицированного белка;

³ - log₂ кратное изменение A/C, log₂ изменения кратности белка в аэробных по сравнению со статическими условиями.

Жирным шрифтом выделены значения log₂ для значительно отличающихся по количеству белков; жёлтым показано увеличение уровня ферментов, а голубым – снижение.

Протеом *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 содержит две пируватоксидазы, CidC и Pox (таблица 19), синтез которых увеличивался в условиях аэробно-анаэробного роста. Первая является пируват:убихинон-оксидоредуктазой, а последняя окисляет пируват до ацетилфосфата, CO₂ и H₂O₂. В данной работе показано, что штамм КМ МГУ 529 осуществляет дыхательный метаболизм в присутствии экзогенного гемина и менахинона в питательной среде (Dinariëva et al., 2022). При интенсивной аэрации в 4,6 раза увеличивалось количество CidC, которая, вероятно, является компонентом ЭТЦ у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. Это говорит о том, что некоторые компоненты ЭТЦ у МКБ могут быть активированы в присутствии кислорода. Активация экспрессии гена *pox* в аэробных условиях известна у *Lp. plantarum* Lp80 (Lorquet et al., 2004), *Lp. plantarum* WCFS1 (Bron et al., 2012), *Lt. buchneri* CD034 (Eikmeyer et al., 2015), *L. rhamnosus* N132, *Lv. spicheri* LP38 (Ianniello et al., 2015a), *L. casei* N87 (Ianniello et al., 2016) и *Lv. brevis* ATCC 367 (Guo et al., 2017). У последних двух видов также наблюдали индукцию активности Pox при аэробно-анаэробном росте. При аэробно-анаэробном росте по сравнению с анаэробно-анаэробным у *Lp. plantarum* WCFS1 был повышен уровень Pox5 (PoxB), участвующий в конверсии пирувата в ацетат (Mazzeo et al., 2012). В дополнение к Pox у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 наблюдали в аэробных условиях повышенный синтез H₂O₂-продуцирующих флавинозависимых оксидаз – L-лактатоксидазы (LctO) и предсказанной пиридоксин-5'-фосфат-оксидазы V (ПФО; увеличение в 7,5 раза). LctO окисляет лактат в пируват, перенаправляя конечный продукт молочнокислого брожения обратно в углеродный и энергетический обмен. Кислород так же индуцировал транскрипцию гена *lctO* у *Lt. buchneri* CD034 (Eikmeyer et al., 2015). ПФО представляет собой ФМН-связывающий флавопротеин, который катализирует окисление пиридоксин-5'-фосфата и пиридоксамин-5'-фосфата в пиридоксаль-5'-фосфат с образованием H₂O₂ у *Escherichia coli* (di Salvo et al., 2003).

Таблица 19. Ферменты метаболизма пирувата *L. rhamnosus* КМ МГУ 529

Белок	АС ¹	Ген	MW ² , кДа	Число уникальных пептидов	Score/% Сходства
L –лактатдегидрогеназа	K8Q510	<i>ldh</i>	35,5	32	323,3/76,4
D-лактатдегидрогеназа	K8Q7H2	LRHMDP2_1801	37,1	15	323,3/55,3
E1-α- субъединица пируватдегидрогеназного комплекса	K8QH33	<i>pdhA</i>	40,7	27	323,3/81,6
E1-β- субъединица пируватдегидрогеназного комплекса	K8QPT7	LRHMDP2_1086	35,2	17	323,3/60,9
Дигидролипоамидацетилтрансферазный компонент пируватдегидрогеназного комплекса	K8QCY2	LRHMDP2_1085	57,5	30	323,3/71,6
Фосфат-ацетилтрансфераза	K8QMA9	LRHMDP2_1450	35,2	25	323,3/85,8
Альдегид-алкогольдегидрогеназа	K8QQY4	LRHMDP2_421	94,6	42	323,3/53,8
α-цепь оксалоацетат-декарбоксилазы	K8Q6U9	LRHMDP2_2635	51,8	14	70,9/42
Ацетаткиназа	K8QJE3	<i>ackA</i>	41,8	9	44,6/33,9

Примечания: ¹- Идентификатор белка в базе данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>);

² - Mw – теоретический молекулярный вес идентифицированного белка.

Аэробное культивирование способствовало увеличению синтеза AlsS (в 7,5 раз) и α -ацетолактатдекарбоксилазы (AlsD, в 2,3 раза) у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. AlsS превращает пируват в α -ацетолактат и CO₂, а AlsD декарбоксилирует α -ацетолактат в ацетоин. Так же, α -ацетолактат в присутствии кислорода может быть превращен в диацетил путем неферментативного декарбоксилирования. В протеоме штамма *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 отсутствуют бутандиолдегидрогеназа и диацетилредуктаза, поэтому ацетоин и диацетил являются вероятными конечными продуктами данного метаболического пути. Активация Als в присутствии кислорода была показана у *Leuconostoc gelidum* subsp. *gelidum* TMW2.1618 и у *Ln. gelidum* subsp. *gasicomitatum* TMW2.1619, выращенных в среде с добавлением гема (Kolbeck et al., 2020).

В протеоме *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 были обнаружены две тиолспецифичные пероксидазы – TrxA-зависимая Trx-типа и НАДН-зависимая алкилгидропероксидредуктаза С (AhpC) – синтез которых повышался и понижался под действием O₂ соответственно. Количество тиоредоксина (TrxA), небольшого дисульфидсодержащего белка, было выше в условиях аэробноза. Восстановленный TrxA обладает Trx-дисульфидредуктазной активностью и обеспечивает функционирование Trx (Zotta et al., 2017). В свою очередь, роль TrxA-редуктазы, поддерживающей внутриклеточный баланс дисульфид-дителиола у штамма *L. rhamnosus* КМ МГУ 529, может играть НАДН-дегидрогеназа с ФАД/НАД(Ф)-связывающим доменом (K8Q7J1), синтез которой увеличивается в аэробных условиях. Также в этих условиях увеличивалось образование НАДН-пероксидазы Npr в 5,7 раз. Как уже было сказано выше, присутствие кислорода приводило к индукции синтеза оксидаз (LctO, Rox и ПФО), что способствует образованию пероксида водорода. Пероксидазы Trx и Npr, очевидно, играют ключевую роль в эффективном разложении H₂O₂. Стоит отметить, что гены, кодирующие TrxA, Trx и Npr, широко распространены среди лактобактерий (Zotta et al., 2017). У штаммов *L. rhamnosus* отсутствуют гены, кодирующие каталазу и супероксиддисмутазу. Таким образом, Trx и Npr могут участвовать в

детоксикации H_2O_2 и органических гидроксипероксидов у штамма КМ МГУ 529 преимущественно в аэробных условиях, тогда как AhpC выполняет эту функцию во время статичного роста. В условиях аэробноза повышалось количество НАДН-пероксидазы Npr2 (по сравнению с анаэробнозом) у *Lp. plantarum* WCFS1 (Mazzeo et al., 2012). Экспрессия гена *ahpC* активировалась в ответ на холод у *Lc. lactis* MCC866 при совместном культивировании с бифидобактериями после хранения в холодильнике в ферментированном молоке (Odamaki et al., 2011). Биосинтез AhpC индуцировался холодом и у *Leuconostoc mesenteroides* NH04 (Goto et al., 2015).

При интенсивной аэрации у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 повышался уровень цистеинсинтазы (CysK). Это хорошо согласуется с увеличением TrxA и Trx, поскольку эти белки содержат остатки Cys в своих активных центрах. Кроме того, Cys сам по себе является сильным антиоксидантом (Averina et al., 2021). Сверхсинтез ПФО (в 7,5 раза) в аэробных условиях по сравнению со статичным ростом, скорее всего, призван обеспечить кофактором пиридоксаль-5'-фосфат-зависимую CysK. Количество CysK увеличивалось в контролируемой периодической культуре *L. casei* N87 при аэробнозе по сравнению с анаэробнозом (Siciliano et al., 2019).

Оксидоредуктазы семейства альдо/кеторедуктаз (DkgA) катализируют НАДФН-зависимое восстановление 2,5-дикетоглюконовой кислоты до 2-кетоглуконовой кислоты, ключевого промежуточного продукта в синтезе L-аскорбиновой кислоты. У *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в аэробных условиях наблюдалось увеличение количества DkgA, что может усиливать антиоксидантные свойства штамма наравне с другими ферментами, участвующими в ликвидации АФК.

Аэробное культивирование *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 способствовало увеличению количества стрессовых белков: небольшого цитоплазматического АТФ-зависимого шаперона (10 кДа, GroES), универсального стрессового белка (USP), белков семейства ThiJ/PfpI и НАДН: флавиноксидоредуктазы семейства OYE (YqiG). Предполагаемый белок теплового шока GroES был среди

белков, синтез которых индуцировался в ответ на кислотный стресс у *Lb. acidophilus* CRL 639 (Lorca et al., 2002) и *Lb. bulgaricus* (Fernandez et al., 2008). До сих пор неизвестны роль и механизм действия USPs в реакции на стресс у грамположительных бактерий. Так, сверхэкспрессию гена *usp1* наблюдали при стрессовой реакции на фенольную кислоту у *Lp. plantarum* (Gury et al., 2009). Способность Usp1 инактивировать репрессор реакции на стресс фенольной кислоты PadR предполагает, что он может быть медиатором в ответной реакции на кислотный стресс. Белки семейства ThiJ/PfpI могут участвовать в защите клеток от различных стрессов окружающей среды (Bankaralli et al., 2020). Они разнообразны по структуре и функциям и включают в себя белок теплового шока 31 (Hsp31), шаперон и пептидазу, *E. coli* (Sastry et al., 2004), PH1704, термофильную протеазу/пептидазу археи *Pyrococcus horikoshii* OT3 (Zhan et al., 2014) и YhbO, который участвует в реакции на гиперосмотический и кислотный стрессы у *E. coli* (Weber et al., 2006). Паралог Hsp31 с глиоксалазной активностью противостоит окислительному стрессу у *Saccharomyces cerevisiae* (Bankaralli et al., 2015). ФМН-зависимые OYEs восстанавливают широкий спектр активированных C=C связей в α,β -ненасыщенных карбонильных соединениях до их насыщенных аналогов (Scholtissek et al., 2017) и участвуют в реакции на стресс. Так, экспрессия гена *ofrA*, кодирующего OYE у *S. aureus*, была индуцирована гипохлоритом, окислительным и электрофильным стрессами (Ibrahim et al., 2022). YqiG, по-видимому, играет важную роль в поддержании внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса, уменьшая уровень электрофильных карбонильных соединений, образующихся у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в результате интенсивной аэрации. Также следует рассматривать в качестве стрессового белка НАДФ⁺-зависимую дегидрогеназу β -гидроксикислот, родственную 3-гидроксиизобутиратдегидрогеназе, синтез которой повышается у штамма КМ МГУ 529 при аэрации. Функция 3-гидроксиизобутиратдегидрогеназы/дегидрогеназы β -гидроксикислот, восстанавливающей полуальдегид янтарной кислоты (сукциниловый полуальдегид) и глиоксилат до γ -гидроксибутирата и гликолата соответственно,

заключается в детоксикации обоих альдегидов во время стрессового ответа у *Arabidopsis* (Allan et al., 2011). Филогенетически родственные глиоксилатредуктазы/сукцинат-полуальдегидредуктазы были обнаружены и у бактерий: очищенные белки типа 3-гидроксиизобутират-дегидрогеназы из *Geobacter* spp. (Zhang et al., 2011) и *Gluconobacter oxydans* 621H (Meyer et al., 2015) имели сукцинат-полуальдегидредуктазную активность. Кроме того, НАД(Ф)Н-зависимая глиоксилатредуктаза с высокой субстратной специфичностью к глиоксилату была недавно охарактеризована у *Acetobacter acetii* JCM20276 (Kumsab et al., 2020).

Увеличение продукции рибосомсвязывающего фактора A (RbfA) может быть важно для созревания свободной 30S рибосомной субъединицы у *L. rhamnosus* KM МГУ 529 в аэробных условиях. В то время как повышение синтеза РНК-связывающего белка, содержащего домен β-лактамазы (VicX), с экзонуклеазной активностью может обеспечить стабильность 70S рибосомной субъединицы. тРНК-сульфотрансфераза (ThiI) переносит серу на тРНК и на белок-переносчик серы ThiS, образуя ThiS-тиокарбонилат, который является стадией синтеза тиазола в процессе биосинтеза тиаминпирофосфата (ТПФ). Таким образом, более высокий уровень ThiI обеспечивает повышенный синтез ТПФ-зависимых ферментов (Pox, AlsS) у *L. rhamnosus* KM МГУ 529 во время аэробного роста. Кроме того, белок, содержащий домен биосинтеза Fe-S (YkuJ) с неизвестной функцией, может быть вовлечен в синтез кластера [2Fe-2S] ферредоксина, необходимого для сульфотрансферазной активности ThiI.

Наличие кислорода при культивировании *L. rhamnosus* KM МГУ 529 способствовало изменению количества двух регуляторов транскрипции, принадлежащих к семейству MarR. При интенсивной аэрации OhrR участвовал в реакции на окислительный стресс, а регулятор транскрипции, гомологичный продукту гена LRHMDP2_405, напротив, подавлялся. Из литературных данных известно, что регуляторы транскрипции семейства MarR являются репрессорами генов, активирующих регулоны окислительного стресса. OhrR является репрессором транскрипции белка устойчивости к органическому

гидропероксиду (OhrA): *ohrR*-дефицитный мутант *L. casei* IGM394 продемонстрировал сильную устойчивость к H₂O₂ (Naraki et al., 2020). Однако OhrA не был обнаружен в данном исследовании.

Аэробноз способствовал увеличению уровня PdhD у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. Количество PdhD также увеличилось в протеоме *L. casei* N87 в периодической культуре при аэробнозе по сравнению с анаэробнозом (Siciliano et al., 2019). Экспрессия генов *pdh*, а также активность Pdh была выше при аэробном культивировании у *Lv. brevis* ATCC 367 на поздней фазе экспоненциального роста (Guo et al., 2017).

Белок системы расщепления глицина Н (GcvH) является компонентом системы, катализирующей обратимое окисление глицина до метиленовой группы, аммиака и CO₂. Таким образом, повышенный уровень GcvH может обеспечивать гомеостаз pH у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в условиях аэробноза. Другим механизмом, предотвращающим внутриклеточное подкисление при аэрации, является индукция синтеза ферментов пируват-диацетил/ацетоинового пути: AlsS и AlsD. Этот путь способствовал регуляции гомеостаза pH в условиях кислотного стресса у *Lc. lactis* (Zuljan et al., 2014).

При аэрации *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 увеличивается количество липоат-протеинлигазы (LplA), ответственной за АТФ-зависимое липоилирование белка по экзогенному пути. Этот факт хорошо согласуется с индукцией синтеза липоат-зависимых белков, GcvH и PdhD.

Количество карбамоилфосфатсинтазы (CarAB) увеличивалось в аэробных условиях по сравнению со статичными, а продукция аргининосукцинатсинтазы (ArgG) снижалась при интенсивной аэрации у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. Пути биосинтеза аргинина и пиримидина имеют общего предшественника – карбамоилфосфат. Увеличение CarAB и уменьшение ArgG у МКБ в аэробных условиях означает, что происходит сдвиг от синтеза L-аргинина к синтезу пиримидиновых нуклеотидов. Более высокие уровни фосфорибозилтрансферазы (PurE; в 4,9 раза), дигидрооротаза (PurC), аспаргаткарбамоилтрансферазы (PurB) и бифункционального белка PurR, участвующих в биосинтезе пиримидина, в

аэробных условиях по сравнению со статичным ростом подтверждают этот вывод. Синтез карбамоилфосфата и уридин-5-монофосфата (УМФ) зависит от концентрации растворенной формы CO_2 (HCO_3^-) в питательной среде: у 74 из 207 штаммов лактобактерий была обнаружена высокая потребность в CO_2 для биосинтеза аргинина и пиримидина (Bringel et al., 2003). Таким образом можно предположить, что увеличение количества ферментов, продуцирующих CO_2 (Pox, AlsS, AlsD и GcvH), способствует биосинтезу пиримидиновых нуклеотидов у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в аэробных условиях. Индукция биосинтеза CarAB и PycECBR у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 под действием O_2 довольно необычна. Интересно, что у *Lc. lactis* при аэрации была подавлена экспрессия генов *carB* и *pyrC* (Larsen et al., 2016). Количество CarB также уменьшилось в периодической культуре *L. casei* N87 в условиях аэробноза по сравнению с анаэробнозом (Siciliano et al., 2019). У *Carnobacterium divergens* TMW2.1577 при культивировании в среде, имитирующей мясо, содержание Pyc было ниже в кислородных условиях по сравнению с бескислородными (Kolbeck et al., 2020). Увеличение количества PycECBR не приводило к увеличению выхода биомассы у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в условиях аэробноза. Вместо этого, повышение уровня белка биосинтеза гликогена GlgD свидетельствует в пользу активации процесса биосинтеза гликогена при аэрации у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529.

Дезоксирибозо-фосфат-альдолаза (DeoC) обратимо разлагает 2-дезоксидрибозо-5-фосфат до D-глицеральдегид-3-фосфата и ацетальдегида, обеспечивая синтез и катаболизм нуклеозидов. В последнем случае D-глицеральдегид-3-фосфат поступает в центральные пути метаболизма углерода в качестве источника углерода и энергии (рисунок 15). Мутанты *E. coli*, лишенные DeoC, не были способны катаболизировать дезоксирибозную часть дезоксирибонуклеозидов, в то время как не было никаких существенных изменений в клеточных пулах НТФ и дНТФ (Munch-Petersen, 1970), что указывает на катаболическую функцию DeoC. Активность DeoC, выделенной из *Lp. plantarum* и печени крысы, сильно зависела от присутствия поликарбоновых кислот (Pricer, Horecker, 1960; Jiang, Groth, 1962). В этой связи снижение уровня

CitE при аэрации у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 может способствовать активации DeoC цитратом во время аэробного роста. Интересно, что количество DeoC было ниже при аэробнозе по сравнению с анаэробнозом у *C. divergens* TMW2.1577 (Kolbeck et al., 2020).

Рибонуклеозидредуктаза восстанавливает нуклеозиды (U, A, G и C) до соответствующих дезоксинуклеозидов (Kilstrup et al., 2005). Аденозилкобаламин-зависимая рибонуклеозид-трифосфат-редуктаза (RtpR) *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 катализирует эту реакцию на уровне НДФ и НТФ, используя TrxA в качестве донора электронов. Уменьшение уровня RtpR в 4 раза при аэробнозе может способствовать поддержанию в клетках оптимальных концентраций НДФ/НТФ для биосинтеза РНК, призванного обеспечить синтез индуцируемых в условиях аэрации ферментов. Подавление активности дезоксиаденозинкиназы/дезоксигуанозинкиназы приводит к снижению концентраций дАМФ/дГМФ, предшественников дАТФ/дГТФ, во время аэробного роста *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. Этот факт хорошо согласуется с низким уровнем фосфат-связывающего белка (PstS) при аэрации.

Количество олигопептид-связывающего белка OppA, компонента системы транспорта олигопептидов из окружающей среды внутрь клетки, и нейтральной эндопептидазы PerO увеличивалось, в то время как количество АТФ-связывающего белка GlnQ, участвующего в транспорте глутамина, уменьшалось в клетках штамма КМ МГУ 529 в условиях аэробноза, что свидетельствует о переключении углеродного метаболизма с аминокислот на олигопептиды. Усиление импорта олигопептидов, по-видимому, поддерживает биосинтез индуцированных белков у лактобациллы в аэробных условиях. Это подтверждается и на других представителях лактобактерий. Так, экспрессия гена *oppA3* у *Lt. buchneri* CD034 была выше в аэробных условиях по сравнению с анаэробным ростом (Eikmeyer et al., 2015). Аэробные условия также стимулировали экспрессию гена *perO1* у *Lc. lactis* MG1363 в сравнении со статическими условиями (Vido et al., 2004). Напротив, экспрессия гена *glnQ* была

ниже при культивировании *Lc. lactis* в присутствии кислорода по сравнению со статическими условиями (Pedersen et al., 2008).

Аэрация благоприятно сказывается на окислительно-восстановительном гомеостазе (НАДН/НАД⁺) *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. В аэробных условиях регенерацию НАД⁺ обеспечивают повышенные уровни НАДН-зависимых ферментов: НАДН-дегидрогеназа (ген LRHMDP2_2182), YqiG, НАДН-оксидаза Noh-2 и Npr. В стационарных условиях эту функцию выполняют главным образом НАДН-зависимые Ldh и бифункциональная ацетальдегид/алкогольдегидрогеназа AdhE.

Аэробное культивирование вызывало индукцию синтеза ферментов, ответственных за потребление кислорода, конверсию ксилулозо-5-фосфата и пирувата, защиту от АФК, общую реакцию на стресс, продукцию антиоксидантов, биосинтез пиримидинов, транспорт и метаболизм олигопептидов, стабилизацию рибосом, внутриклеточный рН и окислительно-восстановительный гомеостаз. При этом, несмотря на то что интенсивная аэрация нарушала цитратно–пируватный путь, биосинтез аргинина и ДНК, это никак не влияло на выход биомассы. Исходя из полученных данных можно заключить, что метаболизм *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 «подстраивается» под концентрацию кислорода в окружающей среде таким образом, чтобы поддерживать энергетический статус клетки, необходимый для достижения оптимальной биомассы при интенсивной аэрации.

Заключение

В результате скрининга 33 штаммов МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова в качестве потенциального пробиотика был выбран штамм с наиболее выраженной способностью к биоплёнкообразованию и относительно высокой антимикробной активностью по отношению к *S. aureus*: *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. С целью изучения механизмов адаптации этого штамма к присутствию кислорода исследовали влияние аэробных/дыхательных условий культивирования на его рост.

Показано, что у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 выход биомассы не снижался в ответ на интенсивную аэрацию. При этом в случае аэробного культивирования в присутствии гемина и менахинона (дыхательные условия) выход биомассы увеличивался на 27% по сравнению со статичными и аэробными (без гемина и менахинона) условиями за счёт функционирования дыхательной цепи, состоящей из НАДН-дегидрогеназы 2, менахинона и хинолоксидазы *bd*. Всё это свидетельствует в пользу высокой степени адаптации исследуемого штамма к аэробнозису. Для изучения молекулярных механизмов такой адаптации использовали протеомный анализ. Установлено, что адаптация *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к аэробному росту в периодической культуре на питательной среде MRS заключается в перестройке углеродного метаболизма: снижении потребления цитрата и увеличении потребления ксилулозо-5-фосфата. При этом в метаболизме пирувата происходит снижение роли пируватформиатлиазы, повышение роли пируватоксидазы и пируватдегидрогеназного комплекса, а также индукция синтеза ферментов пути, ведущего к образованию летучих продуктов ацетона/диацетила.

Кроме того, в аэробных условиях происходила индукция биосинтеза O₂-зависимых ферментов, ферментов пути синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов, а также подавление синтеза ДНК и переключение питания с аминокислот на олигопептиды. В клетках *L. rhamnosus* КМ МГУ 529,

выращенных аэробно, повышалось содержание ферментов, участвующих в детоксикации H_2O_2 (тиоредоксин, тиолпероксидаза, НАДН-пероксидаза), а также стрессовых белков по сравнению с клетками, выращенными статично. Однако данный штамм лишен супероксиддисмутазной и каталазной активностей, в его геноме также не были обнаружены соответствующие гены *sod* и *cat*.

Таким образом, аэробное культивирование можно рассматривать как перспективный методологический подход для повышения устойчивости *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к окислительным стрессам, что, в свою очередь, благоприятно сказывается на антиоксидантных свойствах и аэротолерантности данной бактерии. Культивирование этого штамма в дыхательных условиях позволило повысить выход биомассы почти на 30% по сравнению со статичными и аэробными условиями культивирования. При этом молярный экономический коэффициент $Y_{P/S}$ совпадал по значению с таковым в условиях статичного роста. Полученные данные позволяют заключить, что *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 является потенциальной пробиотической культурой с высокой степенью адаптации к аэробнобиозу.

Выводы

1. В результате скрининга пробиотических свойств 33 штаммов МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова для изучения адаптации к аэробному росту был выбран штамм с наиболее выраженной способностью к биоплёнкообразованию и относительно высокой антимикробной активностью по отношению к *S. aureus* – *L. rhamnosus* КМ МГУ 529.

2. С помощью сконструированных вырожденных ПЦР-праймеров обнаружены гены, кодирующие ключевые ферменты антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, каталаза, гемовую пероксидазу, пероксиредоксин) у ряда представителей лактобацилл из коллекции кафедры микробиологии МГУ.

Измерены активности соответствующих ферментов антиоксидантной защиты во фракциях клеток *Lp. plantarum* КМ МГУ 161 и *L. rhamnosus* КМ МГУ 529.

3. Показано, что у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 выход биомассы не снижался при аэробном культивировании в периодической культуре на питательной среде MRS. На основании данных протеомного анализа установлены возможные механизмы адаптации к аэробному росту данного штамма, которые заключаются в перестройке углеводного метаболизма, индукции биосинтеза флавиновых оксидаз, образующих H₂O₂, и ферментов, участвующих в его детоксикации, а также индукции синтеза стрессовых белков. Впервые показано повышение уровня ферментов пути синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов у МКБ в ответ на аэробноз.

4. Установлено, что у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 при росте в присутствии гемина и менахинона функционирует дыхательная цепь, состоящая из НАДН-дегидрогеназы 2, менахинона и хинолоксидазы *bd*. Впервые продемонстрирована *in vitro* способность экзогенного менахинона переносить электроны от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинолоксидазе *bd* у МКБ.

5. Культивирование *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в дыхательных условиях позволило повысить выход биомассы на 27% по сравнению со статичными и аэробными условиями. При этом молярный экономический коэффициент $Y_{P/S}$ был близок по значению к таковому в условиях статичного роста ($25,2 \pm 0,4$ г сух. кл./моль глюкозы).

Список литературы:

1. Аникиев В. В., Лукомская К. А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии-2-е изд. – Москва, 1977. – 130 с.
2. Асташкина А. П. Современные взгляды на биологическую роль бифидо – и лактобактерий // Вестн. ВГУ. Сер. «Химия. Биология. Фармация». – 2010. – №1 – С. 133–139.
3. Брюханов А. Л., Нетрусов А. И. Аэротолерантность строго анаэробных микроорганизмов: факторы защиты от окислительного стресса (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43. – №. 6. – С. 635-652.
4. Мартьянов С. В., Журина М. В., Эль-Регистан Г. И., Плакунов В. К. Активирующее действие азитромицина на формирование бактериальных биопленок и борьба с этим явлением // Микробиология – 2015. – Т. 84. – № 1. – С. 27–36.
5. Николаев Ю. А., Плакунов В. К. Биопленка – «Город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. – 2007. – Т. 70. – № 2. – С. 149–163.
6. Шендеров Б. А. Микробиоценоз человека и функциональное питание // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2001. – Т. 4. – № 11. – С. 78–90.
7. Abriouel H., Herrmann A., Stärke J., Yousif N. M. K., Wijaya A., Tauscher B., Holzapfel W., Franz C. M. A. P. Cloning and heterologous expression of hematin dependent catalase produced by *Lactobacillus plantarum* CNRZ 1228 // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – V. 70. – P. 603–606.
8. Akiba Y., Guth P. H., Engel E., Nastaskin I., Kaunitz J. D. Dynamic regulation of mucus gel thickness in rat duodenum // The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2000. – V. 279. – P. G437–G447.
9. Alander M., Satokari R., Korpela R., Saxelin M., Vilpponen-Salmela T., Mattila-Sandholm T., von Wright A. Persistence of colonisation of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – V. 65. – P. 351–354.

10. Aljebourya G.H., Mahmouda S.N. Evaluation of antagonistic potential of *Lactobacillus* isolates against phytopathogenic fungi and pathogenic bacteria *in vitro* // Syst. Rev. Pharmacy. – 2020. – V. 11. – P. 1699–703.
11. Allan W. L., Breitzkreuz K. E., Waller J. C., Simpson J. P., Hoover G. J., Rochon A., Wolyn D. J., Rentsch D., Snedden W. A., Shelp B. J. Detoxification of succinate semialdehyde in *Arabidopsis* glyoxylate reductase and NAD kinase mutants subjected to submergence stress // Botany. – 2011. – V. 90. – P. 51–61.
12. Allocati N., Federici L., Masulli M., Di Ilio C. Distribution of glutathione transferases in Gram-positive bacteria and *Archaea* // Biochimie. – 2012. – № 94. – P. 588–596.
13. Al-Madboly L. A., Ali S. M., Fakharany E. M. E., Ragab A. E., Khedr E. G., Elokely K. M. Stress-based production, and characterization of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase enzymes from *Lactobacillus plantarum* // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – V. 8. – P. 78.
14. Alp D., Ertürkmen P. Probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* spp. suşlarının kolesterol düşürücü etkileri ve olası mekanizmalar // Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. – 2017. – V. 8. – №. 1. – P. 108-113.
15. Alp D., Kuleaşan H. Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2019. – V. 35. – P. 1-9.
16. Amanatidou A., Bennik M. H., Gorris L. G., Smid E. J. Superoxide dismutase plays an important role in the survival of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen // Archives of microbiology. – 2001. – V. 176. – P. 79-88.
17. Amaretti A., di Nunzio M., Pompei A., Raimondi S., Rossi M., Bordoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2013. – V. 97. – P. 809–817.
18. An H., Zhou H., Huang Y., Wang G., Luan C., Mou J., Luo Y., Hao Y. High-level expression of heme-dependent catalase gene *katA* from *Lactobacillus sakei* protects *Lactobacillus rhamnosus* from oxidative stress // Mol. Biotechnol. – 2010. – V. 45. – P. 155–160.

19. Angelin J., Kavitha M. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – V. 162. – P. 853–865.
20. Arcanjo N. O., Andrade M. J., Padilla P., Rodríguez A., Madruga M. S., Estevez, M. Resveratrol protects *Lactobacillus reuteri* against H₂O₂-induced oxidative stress and stimulates antioxidant defenses through upregulation of the *dhaT* gene // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2019. – V. 135. – P. 38-45.
21. Archibald F. S., Fridovich I. Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum* // *Journal of Bacteriology*. – 1981a. – V. 145. – № 1. – P. 442–451.
22. Archibald F. S., Fridovich I. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria // *Journal of Bacteriology*. – 1981b. – V. 146– № 3. – P. 928–936.
23. Arioli S., Zambelli D., Guglielmetti S., De Noni I., Pedersen M. B., Pedersen P. D., Bello F. D., Mora D. Increasing the heme-dependent respiratory efficiency of *Lactococcus lactis* by inhibition of lactate dehydrogenase // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 79 – № 1. – P. 376–380.
24. Averina O. V., Poluektova E. U., Marsova M. V., Danilenko V. N. Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic lactobacilli and bifidobacteria of the human gut microbiota // *Biomedicines*. – 2021. – V. 9. – P. 1340.
25. Azad M. A. K., Sarker M., Li T., Yin J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview // *BioMed research international*. – 2018. – V. 2018.
26. Azcárate-Peril M. A., Sikes M., Bruno-Bárcena J. M. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? // *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2011. – V. 301. – P. G401–G424.
27. Bankapalli K., Saladi S., Awadia S. S., Goswami A. V., Samaddar M., D'Silva P. Robust glyoxalase activity of Hsp31, a ThiJ/DJ-1/PfpI family member protein, is critical for oxidative stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V. 290. – P. 26491–26507.

28. Bankapalli K., Vishwanathan V., Susarla G., Sunayana N., Saladi S., Peethambaram D., D'Silva P. Redox-dependent regulation of mitochondrial dynamics by DJ-1 paralogs in *Saccharomyces cerevisiae* // *Redox Biol.* – 2020. – V. 32. – P. e101451.
29. Basu Thakur P., Long A. R., Nelson B. J., Kumar R., Rosenberg A. F., Gray M. J. Complex responses to hydrogen peroxide and hypochlorous acid by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* // *mSystems.* – 2019. – V. 4. – №. 5. – P. e00453–19.
30. Beers R. F., Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // *J Biol chem.* – 1952. – V. 195. – №. 1. – P. 133–140.
31. Boirivant M., Strober W. The mechanism of action of probiotics // *Current Opinion in Gastroenterology.* – 2007. – V. 23. – P. 679–692.
32. Boonaert C. J. P., Rouxhet P. G. Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2000. – V. 66. – P. 2548–2554.
33. Borisov V. B., Gennis R. B., Hemp J., Verkhovsky M. I. The cytochrome-*bd*-respiratory oxygen reductases // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2011. – V. 1807. – P. 1398–1413.
34. Bosma E. F., Forster J., Nielsen A. T. Lactobacilli and pediococci as versatile cell factories—evaluation of strain properties and genetic tools // *Biotechnology Advances.* – 2017. – V. 35. – №. 4. – P. 419–442.
35. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry.* – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
36. Bringel F., Hubert J. C. Extent of genetic lesions of the arginine and pyrimidine biosynthetic pathways in *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, and *L. casei*: Prevalence of CO(2)-dependent auxotrophs and characterization of deficient arg genes in *L. plantarum* // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2003. – V. 69. – P. 2674–2683.

37. Bron P. A., Wels M., Bongers R. S., van Bokhorst-van de Veen H., Wiersma A., Overmars L., Kleerebezem M. Transcriptomes reveal genetic signatures underlying physiological variations imposed by different fermentation conditions in *Lactobacillus plantarum* // PLoS ONE. – 2012. – V. 7. – P. e38720.
38. Brooijmans R. J., de Vos W. M., Hugenholtz J. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 electron transport chains // Applied and Environmental Microbiology. – 2009a. – V. 75. – P. 3580–3585.
39. Brooijmans R., Smit B., Santos F., van Riel J., de Vos W. M, Hugenholtz J. Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria // Microbial Cell Factories. – 2009b. – V. 8 – № 1. – P. 1–11.
40. Bruno-Bárcena J. M., Andrus J. M., Libby S. L., Klaenhammer T. R., Hassan H.M. Expression of a heterologous manganese superoxide dismutase gene in intestinal lactobacilli provides protection against hydrogen peroxide toxicity // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – V. 70. – P. 4702–4710.
41. Buck B. L., Altermann E., Svingerud T., Klaenhammer T. R. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – V.71 – № 12. – P. 8344–8351
42. Calderini E., Celebioglu H. U., Villarroel J., Jacobsen S., Svensson B., Pessione E. Comparative proteomics of oxidative stress response of *Lactobacillus acidophilus* NCFM reveals effects on DNA repair and cysteine de novo synthesis // Proteomics. – 2017. – V. 17. – №. 5. – P. 1600178.
43. Cappa F., Cattivelli D., Cocconcelli S. P. The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156 // Research in Microbiology. – 2005. – V. 156. – P. 1039–1047.
44. Capurso L. Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: a review // Journal of clinical gastroenterology. – 2019. – V. 53. – P. S1–S41.
45. Chen K., Li J., Li S., Feng J., Wu L., Liu T., Guo C. 15d-PGJ2 alleviates ConA-induced acute liver injury in mice by up-regulating HO-1 and reducing hepatic cell autophagy // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2016. – V. 80. – P. 183–192.

46. Chen Y., Li Q., Xia C., Yang F., Xu N., Wu Q., Zhou M. Effect of selenium supplements on the antioxidant activity and nitrite degradation of lactic acid bacteria // World journal of microbiology and biotechnology. – 2019. – V. 35. – P. 1– 13.
47. Choi S. S., Kim Y., Han K. S., You S., Oh S., Kim S. H. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro* // Letters in Applied Microbiology. – 2006. – V. 42. – P. 452–458.
48. Chooruk A., Piwat S., Teanpaisan R. Antioxidant activity of various oral *Lactobacillus* strains // Journal of applied microbiology. – 2017. – V. 123. – №. 1. – P. 271-279.
49. Chung H. S., Kim Y. B., Chun S. L., Ji G. E. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria // International Journal of Food Microbiology. – 1999. – V. 47. – P. 25–32.
50. Colloca M. E., Ahumada M. C., López M. E., Nader-Macias M. E. Surface properties of lactobacilli isolated from healthy subjects // Oral diseases. – 2000. – V. 6. – №. 4. – P. 227–233.
51. Condon S. Aerobic metabolism of lactic acid bacteria // Irish Journal of Food Science and Technology. – 1983. – V. 7. – P. 15–25.
52. Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen // FEMS Microbiol. Rev. – 1987. – V. 46. – P. 269–280.
53. Crittenden R. G., Morris L. F., Harvey M. L., Tran L. T., Mitchell H. L., Playne M.J. Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt // Journal of Applied Microbiology. – 2001. – V. 90. – P. 268–278.
54. Czapski G. Reaction of OH• // Methods in Enzymology. – 1984. – V. 105. – P. 209–215.
55. De Angelis M., Gobbetti M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review // Proteomics. – 2004. – V. 4. – P. 106–122.
56. De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F., Degeest B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria // International Dairy Journal. – 2001. – V. 11. – P. 687–707.

57. De Vuyst L., Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. – 2007. – V. 13. – P. 194–199.
58. Deepika G., Green R. J., Frazier R. A., Charalampopoulos D. Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG // *Journal of Applied Microbiology*. – 2009. – V. 107. – P. 1230–1240.
59. Del Matto I., Rossi F., Iannitto G., Petrone D., Mastrodomenico M. T., Alessiani A., Marino L. Variability of the microbiota in traditional Caciocavallo, Scamorza and Caciotta cheeses manufactured with raw milk and natural cultures // *International Journal of Dairy Technology*. – 2021. – V. 74. – №. 3. – P. 564–574.
60. Derr A. M., Faustoferri R. C., Betzenhauser M. J., Gonzalez K., Marquis R. E., Quivey R. G. Mutation of the NADH oxidase gene (*nox*) reveals an overlap of the oxygen- and acid-mediated stress responses in *Streptococcus mutans* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – V. 78. – P. 1215–1227.
61. Dertli E., Mayer M. J., Narbad A. Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* FI9785 // *BMC Microbiology*. – 2015. – V. 15 – № 1. – P. 1–9.
62. di Salvo M. L., Safo M. K., Musayev F. N., Bossa F., Schirch V. Structure and mechanism of *Escherichia coli* pyridoxine 50-phosphate oxidase // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2003. – V. 1647. – P. 76–82.
63. Dijkstra A. R., Setyawati M. C., Bayjanov J. R., Alkema W., van Hijum S. A., Bron P. A., Hugenholtz J. Diversity in robustness of *Lactococcus lactis* strains during heat stress, oxidative stress, and spray drying stress // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – V. 80. – №. 2. – P. 603–611.
64. Donlan R. M. Biofilms: microbial life on surfaces // *Emerging infectious diseases*. – 2002. – V. 8. – №. 9. – P. 881.
65. Duary R. K., Rajput Y. S., Batish V. K., Grover S. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells // *Indian Journal of Medical Research*. – 2011. – V. 134 – № 11. – P. 664–671.

66. Dunne C. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder // *Inflammatory bowel diseases*. – 2001. – V. 7. – №. 2. – P. 136-145.
67. Duwat P., Ehrlich S. D., Gruss A. Effects of metabolic flux on stress response pathways in *Lactococcus lactis* // *Molecular Microbiology*. – 1999. – V. 31. – P. 845–858.
68. Duwat P., Ehrlich S. D., Gruss A. The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress // *Molecular Microbiology*. – 1995. – V. 17. – P. 1121–1131.
69. Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., Le Loir Y., Violet F., Loubiere P., Gruss A. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – V. 183. – P. 4509–4516.
70. Eikmeyer F. G., Heintz S., Marx H., Puhler A., Grabherr R., Schluter A. Identification of oxygenresponsive transcripts in the silage inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 by RNA sequencing // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10 – № 7. – P. e0134149.
71. Endo A., Tanaka N., Oikawa Y., Okada S., Dicks L. Fructophilic characteristics of *Fructobacillus* spp. may be due to the absence of an alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*) // *Curr. Microbiol.* – 2014. – V. 68. – P. 531–535.
72. Eng J. K., McCormack A. L., Yates J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database // *Journal of the american society for mass spectrometry*. – 1994. – V. 5. – №. 11. – P. 976-989.
73. Engels C., Schieber A., Gänzle M. G. Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.) // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – V. 77. – №. 7. – P. 2215–2223.
74. Etienne-Mesmin L., Chassaing B., Desvaux M., De Paepe K., Gresse R., Sauvaitre T., Forano E., Wiele Van de T., Schüller S., Juge N., Blanquet-Diot S. Experimental models to study intestinal microbes–mucus interactions in health and disease // *FEMS microbiology reviews*. – 2019. – V. 43 – № 5. – P. 457–489.

75. Fanaro S., Boehm G., Garssen J., Knol J., Mosca F., Stahl B., Vigi V. Galacto-oligosaccharides and longchain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: a review // *Acta Paediatr. Suppl.* – 2005. – V. 94. – P. 22–26.
76. Fardet A., Rock E. In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: a narrative review of evidence // *Nutrition research reviews.* – 2018. – V. 31. – №. 1. – P. 52–70.
77. Farid W., Masud T., Sohail A., Ahmad N., Naqvi S. S., Khan S., Ali A., Khalifa S. A., Hussain A., Ali S., Saghir S. M., Siddeeg A., Manzoor M. F. Gastrointestinal transit tolerance, cell surface hydrophobicity, and functional attributes of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from Indigenous Dahi // *Food Science & Nutrition.* – 2021. – V. 9. – №. 9. – P. 5092–5102.
78. Feng T., Wang J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review // *Gut Microbes.* – 2020. – V. 12 – № 1. – P. 1801944.
79. Fernandez A., Ogawa J., Penaud S., Boudebouze S., Ehrlich D., van de Guchte M., Maguin E. Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus* // *Proteomics.* – 2008. – V. 8. – P. 3154–3163.
80. Flint D. H., Tuminello J. F., Emptage M. H. The inactivation of Fe-S clusters containing hydro-lyases by superoxide // *Journal of Biological Chemistry.* – 1993. – V. 268. – P. 22369–22376.
81. Francius G., Lebeer S., Alsteens D., Wildling L., Gruber H.J., Hols P., De Keersmaecker S.C.J., Vanderleyden J., Dufrene Y.F. Detection, localization and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria // *ACS Nano.* – 2008. – V. 2. – P. 1921–1929.
82. Frankenberg L., Brugna M., Hederstedt L. *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase // *Journal of Bacteriology.* – 2002. – V. 184. – P. 6351–6356.
83. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation // *Journal of Experimental Biology.* – 1998. – V. 201. – P. 1203–1209.
84. Fujita Y. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* – 2009. – V. 73. – P. 245–259.

85. Fujita Y., Miwa Y., Galinier A., Oeutscher J. Specific recognition of the *Bacillus subtilis* gnt cis-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr // *Molecular Microbiology*. – 1995. – V. 17 – № 5. – P. 953–960.
86. Galinier A., Haiech J., Kilhoffer M. C., Jaquinod M., Stulke J., Deutscher J., Martin-Verstraete I. The *Bacillus subtilis* *crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – V. 94. – P. 8439–8444.
87. Gallati H. Horseradish peroxidase: a study of the kinetics and the determination of optimal reaction conditions, using hydrogen peroxide and 2, 2'-azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) as substrates (author's transl) // *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry. Zeitschrift fur klinische Chemie und klinische Biochemie*. – 1979. – V. 17. – №. 1. – P. 1–7.
88. Gänzle M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage // *Current Opinion in Food Science*. – 2015. – V. 2. – P. 106– 117.
89. Gänzle M. G., Follador R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review // *Frontiers in microbiology*. – 2012. – V. 3. – P. 340.
90. Gänzle M. G., Vermeulen N., Vogel R. F. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough // *Food microbiology*. – 2007. – V. 24. – №. 2. – P. 128-138.
91. Gao J., Sadiq F. A., Zheng Y., Zhao J., He G., Sang Y. Biofilm-based delivery approaches and specific enrichment strategies of probiotics in the human gut // *Gut Microbes*. – 2022a. – V. 14. – №. 1. – P. 2126274.
92. Gao X., Kong J., Zhu H., Mao B., Cui S., Zhao J. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Lactococcus* response to environmental stress: mechanisms and application of cross-protection to improve resistance against freeze-drying // *Journal of Applied Microbiology*. – 2022b. – V. 132. – №. 2. – P. 802–821.
93. Garai-Ibabe G., Ibarburu I., Berregi I., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Irastorza A., Dueñas M. T. Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in

cidermaking // International Journal of Food Microbiology. – 2008. – V. 121. – №. 3. – P. 253–261.

94. Garrigues C., Loubiere P., Lindley N. D., Cocaign-Bousquet M. Control of the shift from homolactic acid to mixed -acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio // Journal of Bacteriology. – 1997. – V. 179. – P. 5282–5287.

95. Gaudu P., Lamberet G., Poncet S., Gruss A. CcpA regulation of aerobic and respiration growth in *Lactococcus lactis* // Molecular Microbiology. – 2003. – V. 50 – № 1. – P. 183–192.

96. Glorieux C., Calderon P. B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach // Biological chemistry. – 2017. – V. 398. – №. 10. – P. 1095-1108.

97. Goffin P., Lorquet F., Kleerebezem M., Hols P. Major role of NAD-dependent lactate dehydrogenases in aerobic lactate utilization in *Lactobacillus plantarum* during early stationary phase // Journal of Bacteriology. – 2004. – V. 186. – P. 6661–6666.

98. Goffin P., Muscariello L., Lorquet F., Stukkens A., Prozzi D., Sacco M., Kleerebezem M., Hols P. Involvement of pyruvate oxidase activity and acetate production in the survival of *Lactobacillus plantarum* during the stationary phase of aerobic growth // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – V. 72. – P. 7933–7940.

99. Gonzy-Treboul G., Zagorec M., Rain-Guion M. C. Steinmetz M., Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence of *ptsX*, *ptsH* and the 5'-end of *ptsI* and evidence for a *ptsHI* operon // Molecular Microbiology. – 1989. – V. 3. – P. 103–112.

100. Goosen N., Moolenaar G.F. Role of ATP hydrolysis by UvrA and UvrB during nucleotide excision repair // Research in Microbiology. – 2001. – V. 152. – P. 401–409.

101. Goto S., Kawamoto J., Sato S. B., Iki T., Watanabe I., Kudo K., Esaki N., Kurihara T. Alkyl hydroperoxide reductase enhances the growth of *Leuconostoc*

- mesenteroides* lactic acid bacteria at low temperatures // AMB Express. – 2015. – V. 5. – P. 11.
102. Grajek W., Olejnik A., Sip A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods // Acta Biochimica Polonica. – 2005. – V. 52. – №. 3. – P. 665–671.
103. Grondin J. A., Kwon Y. H., Far P. M., Haq S., Khan W. I. Mucins in intestinal mucosal defense and inflammation: learning from clinical and experimental studies // Frontiers in immunology. – 2020. – V. 11. – P. 2054.
104. Guarner F., Schaafsma G. J. Probiotics // International Journal of Food Microbiology. – 1998. – V. 39. – P. 237–238.
105. Guerzoni M. E., Lanciotti R., Cocconcelli P. S. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus* // Microbiology. – 2001. – V. 147. – №. 8. – P. 2255-2264.
106. Guidone A., Ianniello R. G, Ricciardi A., Zotta T., Parente E. Aerobic metabolism and oxidative stress tolerance in the *Lactobacillus plantarum* group // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2013. – V. 29. P. 1713–1722.
107. Guo H., Yu L., Tian F., Chen W., Zhai Q. The Potential Therapeutic Role of *Lactobacillaceae rhamnosus* for Treatment of Inflammatory Bowel Disease // Foods. – 2023. – V. 12. – № 4. – P. 692.
108. Guo T., Zhang L., Xin Y., Xu Z., Kong J. Oxygen-inducible conversion of lactate to acetate in heterofermentative *Lactobacillus brevis* ATCC 367 // Applied and Environmental Microbiology. – 2017. – V. 83. – P. e01659-17.
109. Guo Y., Pan D., Li H., Sun Y., Zeng X., Yan B. Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* // Food chemistry. – 2013. – V. 138 – № 1. – P. 84–89.
110. Gury J., Seraut H., Tran N. P., Barthelmebs L., Weidmann S., Gervais P., Cavin J.F. Inactivation of PadR, the repressor of the phenolic acid stress response, by molecular interaction with Usp1, a universal stress protein from *Lactobacillus plantarum*, in *Escherichia coli* // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – V. 75. – P. 5273–5283.

111. Halliwell B., Gutteridge J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview // *Methods in Enzymology*. – 1990. – V. 186. – P. 1–85.
112. Hamon E., Horvatovich P., Izquierdo E., Bringel F., Marchioni E., Aoude-Werner D., Ennahar S. Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance // *BMC Microbiol.* – 2011. – V. 11 – № 1. – P. 1–11.
113. Hatti-Kaul R., Chen L., Dishisha T., Enshasy H. E. Lactic acid bacteria: From starter cultures to producers of chemicals // *FEMS Microbiology Letters*. – 2018. – V. 365. – №. 20. – P. fny213.
114. He M., Shi B. Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics // *Cell & bioscience*. – 2017. – V. 7, № 1. – P. 1–14.
115. Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G. R., Merenstein D. J., Pot B., Sanders M. E. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic // *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. – 2014. – V. 11. – P. 506 – 514.
116. Hojjati M., Behabehani B.A., Falah F. Aggregation, adherence, anti-adhesion and antagonistic activity properties relating to surface charge of probiotic *Lactobacillus brevis* gp104 against *Staphylococcus aureus* // *Microbial Pathogenesis*. – 2020. – V. 147. – P 104420.
117. Hou Y., Li X., Liu X., Zhang Y., Zhang W., Man C., Jiang Y. Transcriptomic responses of Caco-2 cells to *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus plantarum* J26 against oxidative stress // *Journal of dairy science*. – 2019. – V. 102. – №. 9. – P. 7684–7696.
118. Hoxha R., Todorov D., Hinkov A., Shishkova K., Evstatieva Y., Nikolova D. In vitro screening of antiviral activity of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods // *Microbiology Research*. – 2023. – V. 14. – №. 1. – P. 333–342.
119. Ianniello R. G., Zheng J., Zotta T., Ricciardi A., Gänzle M. G Biochemical analysis of respiratory metabolism in the heterofermentative *Lactobacillus spicheri* and

Lactobacillus reuteri // Journal of applied microbiology. – 2015a. – V. 119. – №. 3. – P. 763–775.

120. Ianniello R. G., Zotta T., Matera A., Genovese F., Parente E., Ricciardi A. Investigation of factors affecting aerobic and respiratory growth in the oxygen-tolerant strain *Lactobacillus casei* N87 // PLoS ONE. – 2016. – V. 11. – № 11. – P. e0164065.

121. Ianniello R.G., Ricciardi A., Parente E., Tramutola A., Reale A., Zotta T. Aeration and supplementation with heme and menaquinone affect survival to stresses and antioxidant capability of *Lactobacillus casei* strains // LWT-food Science and Technology. – 2015b. – V. 60. – №. 2. – P. 817–824.

122. Ibrahim E. S., Ohlsen K. The old yellow enzyme OfrA fosters *Staphylococcus aureus* survival via affecting thiol-dependent redox homeostasis // Front. Microbiol. – 2022. – V. 13. – P. e888140.

123. Imer F., Aldemir E., Kiliç H., Sonmezoğlu I., Apak R. The protective effect of amino acids on the copper (II)-catalyzed autoxidation of ascorbic acid // Journal of Food and Drug Analysis. – 2008. – V. 16. – №. 6. – P. 3.

124. Janashia I., Carminati D., Rossetti L., Zago M., Fornasari M.E., Haertlé T., Giraffa G. Characterization of fructophilic lactic microbiota of *Apis mellifera* from the Caucasus Mountains // Annals of Microbiology. – 2016. – V. 66. – №. 4. – P. 1387–1395.

125. Jänsch A., Freiding S., Behr J., Vogel R. F. Contribution of the NADH-oxidase (Nox) to the aerobic life of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451(T) // Food microbiology. – 2011. – V. 28. – P. 29–37.

126. Jänsch A., Korakli M., Vogel R.F., Ganzle M. G., Glutathione reductase from *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451(T): contribution to oxygen tolerance and thiol exchange reactions in wheat sourdoughs // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – V. 73. – P. 4469–4476.

127. Jastrząb A., Skrzydlewska E. Thioredoxin-dependent system. Application of inhibitors // Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. – 2021. – V. 36. – № 1. – P. 362–371.

128. Jault J. M., Fieulaine S., Nessler S., Gonzalo P., Di Pietro A., Deutscher J., Galinier A. The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – V. 275. – P. 1773–1780.
129. Jiang N. - S., Groth D. P. Polycarboxylic acid activation of rat liver deoxyribose phosphate aldolase // *Journal of Biological Chemistry*. – 1962. – V. 237. – P. 3339–3341.
130. Johanson A., Goel A., Olsson L., Franzén C. J. Respiratory physiology of *Lactococcus lactis* in chemostat cultures and its effect on cellular robustness in frozen and freeze-dried starter cultures // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2020. – V. 86. – P. e02785–19.
131. Kakhlon O., Cabantchik Z. I. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes // *Free Radic. Biol.Med.* – 2002. – V. 33. – P. 1037–1046.
132. Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 1983. – V. 49. – P. 209–224.
133. Kang T. S., Korber D. R., Tanaka T. Influence of oxygen on NADH recycling and oxidative stress resistance systems in *Lactobacillus panis* PM1 // *Amb Express*. – 2013. – V. 3. – №. 1. – P. 1-9.
134. Kavanagh E. P. and Hill S. Oxygen inhibition of nitrogenase activity in *Klebsiella pneumonia* // *Journal of General Microbiology*. – 1993. – V. 139 – № 6. – P. 1307–1314.
135. Kehrer J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease // *Critical reviews in toxicology*. – 1993. – V. 23. – №. 1. – P. 21–48.
136. Keyer K., Imlay J. A. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free iron // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – V. 93. – P. 13635–13640.
137. Kilstrup M., Hammer K., Jensen P. R., Martinussen J. Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2005. – V. 29. – P. 555–590.

138. Kim J. E., Eom H. J., Kim Y., Ahn J. E., Kim J. H., Han N. S. Enhancing acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* with glutathione // *Biotechnology Letters*. – 2012. – V. 34. – P. 683–687.
139. Kim K. T., Kim J. W., Kim S. I., Kim S., Nguyen T. H., Kang C. H. Antioxidant and anti-inflammatory effect and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from canine and feline feces // *Microorganisms*. – 2021. – V. 9. – №. 9. – P. 1971.
140. Kim S. Y., Ogawa Y., Adachi Y. Canine intestinal lactic acid bacteria agglutinated with concanavalin A // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2006. – V. 68 – № 12. – P. 1351–1354.
141. Kim T.R., Choi K.S., Ji Y., Holzapfel W.H., Jeon M.G. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus reuteri* LM1071 via MAP kinase pathway in IL-1 β -induced HT-29 cells // *Journal of Animal Science and Technology*. – 2020. – V. 62. – №. 6. – P. 864.
142. Klaenhammer T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria // *Biochimie*. – 1988. – V. 70. – P. 337–349.
143. Kobatake E., Nakagawa H., Seki T., Miyazaki T. Protective effects and functional mechanisms of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 against oxidative stress // *PloS one*. – 2017. – V. 12. – №. 5. – P. e0177106.
144. Kolbeck S., Ludwig C., Meng C., Hilgarth M., Vogel R. F. Comparative proteomics of meat spoilage bacteria predicts drivers for their coexistence on modified atmosphere packaged meat // *Front. Microbiol.* – 2020. – V. 11. – P. e209.
145. Konings W. N., Lolkema J. S., Bolhuis H., van Veen H. W., Poolman B., Driessen A. J. The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multidrug resistance // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 1997. – V. 7. – P. 117–128.
146. Kono Y., Fridovich I. Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum* // *Journal of Biological Chemistry*. – 1983. – V. 258. – P. 6015–6019.

147. Kono Y., Takahasi L., Asada K. Oxidation of Mn(II) pyrophosphate by superoxide radicals and illuminated chloroplasts // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1976. – V. 174. – P. 454–462.
148. Kos B., Suskovic J., Vukovic S., Simpraga M., Frece J., Matosic S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 // Journal of Applied Microbiology. – 2003. – V. 94. – P. 981–987.
149. Kotzamanidis C., Kourelis A., Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N., Yiangou M. Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains // International Journal of Food Microbiology. – 2010. – V. 140. – P. 154–163.
150. Kullisaar T., Songisepp E., Aunapuu M., Kilk K., Arend A., Mikelsaar M., Rehema A., Zilmer M. Complete glutathione system in probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2010. – V. 46. – P. 481–486.
151. Kumar C. G., Anand S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review // International Journal of Food Microbiology. – 1998. – V. 42. – P. 9–27.
152. Kumar S., Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human // Toxicology Letters. – 2005. – V. 157. – P. 175–188.
153. Kumsab J., Tobe R., Kurihara T., Hirose Y., Omori T., Mihara H. Characterization of a novel class of glyoxylate reductase belonging to the β -hydroxyacid dehydrogenase family in *Acetobacter aceti* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2020. – V. 84. – P. 2303–2310.
154. Larsen N., Moslehi-Jenabian S., Werner B. B., Jensen M. L., Garrigues C., Vogensen F. K., Jespersen L. Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during milk acidification as affected by dissolved oxygen and the redox potential // International journal of food microbiology. – 2016. – V. 226. – P. 5–12.
155. Larsen N., Werner B. B., Jespersen L. Transcriptional responses in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* to the changes in oxygen and redox potential during milk acidification // Lett. Appl. Microbiol. – 2016. – V. 63. – P. 117–123.

156. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2008. – V. 72 – № 4. – P. 728–764.
157. LeBlanc J. G., del Carmen S., Miyoshi A., Azevedo V., Sesma F., Langella P., Bermúdez-Humarán L. G., Watterlot L., Perdigon G., de Moreno de LeBlanc A. Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice // *Journal of Biotechnology*. – 2011. – V. 151. – P. 287–293.
158. Lechardeur D., Cesselin B., Fernandez A., Lamberet G., Garrigues C., Pedersen M., Gaudu P., Gruss A. Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria // *Current Opinion In Biotechnology*. – 2011. – V. 22. – P. 143–149.
159. Lechardeur D., Fernandez A., Robert B., Gaudu P., Trieu-Cuot P. The 2-cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase c binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae* // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V. 285. – P. 16032–16041.
160. Lee K., Lee H. G., Pi K., Choi Y. J. Effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* // *Proteomics*. – 2008. – V. 8. – P. 1624–1630.
161. Lee K., Pi K., Kim E. B., Rho B. S., Kang S. K., Lee H. G., Choi Y. J. Glutathione-mediated response to acid stress in the probiotic bacterium, *Lactobacillus salivarius* // *Biotechnology Letters*. – 2010. – V. 32. – P. 969–972.
162. Li S., Huang R., Shah N. P., Tao X., Xiong Y., Wei, H. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315 // *Journal of Dairy Science*. – 2014. – V. 97. – №. 12. – P. 7334–7343.
163. Li S., Zhao Y., Zhang L., Zhang X., Huang L., Li D., Wang Q. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods // *Food chemistry*. – 2012. – V. 135. – №. 3. – P. 1914–1919.
164. Lin J., Zou Y., Cao K., Ma C., Chen Z. The impact of heterologous catalase expression and superoxide dismutase overexpression on enhancing the oxidative

- resistance in *Lactobacillus casei* // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2016. – V. 43. – №. 5. – P. 703–711.
165. Lin X. B., Gänzle M. G. Effect of lineage-specific metabolic traits of *Lactobacillus reuteri* on sourdough microbial ecology // Applied and environmental microbiology. – 2014. – V. 80. – №. 18. – P. 5782–5789.
166. Liu J., Tan F., Liu X., Yi R., Zhao X. Exploring the antioxidant effects and periodic regulation of cancer cells by polyphenols produced by the fermentation of grape skin by *Lactobacillus plantarum* KFY02 // Biomolecules. – 2019. – V. 9. – №. 10. – P. 575.
167. Liu L., Yu X., Wu M., Zhang K., Shang S., Peng S., Song W. Improved Tolerance of *Lactiplantibacillus plantarum* in the Presence of Acid by the Heterologous Expression of *trxA* from *Oenococcus oeni* // Fermentation. – 2022. – V. 8. – №. 9. – P. 452.
168. Lo R., Turner M. S., Barry D. G., SreeKumar R., Walsh T. P., Giffard P. M. Cystathionine γ -lyase is a component of cystine-mediated oxidative defense in *Lactobacillus reuteri* BR11 // Journal of bacteriology. – 2009. – V. 191. – №. 6. – P. 1827-1837.
169. Lopez de Felipe F., Gaudu P. Multiple control of the acetate pathway in *Lactococcus lactis* under aeration by catabolite repression and metabolites // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2009. – V. 82. – P. 1115–1122.
170. Lorca G. L., Font de Valdez G., Ljungh A. Characterization of the protein-synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – V. 4. – P. 525–532.
171. Loris R. Principles of structures of animal and plant lectins // Biochimica et Biophysica Acta. – 2002. – V. 1572. – P. 198–208.
172. Lorquet F., Goffin P., Muscariello L., Baudry J. B., Ladero V., Sacco M., Kleerebezem M., Hols P. Characterization and functional analysis of the *poxB* gene, which encodes pyruvate oxidase in *Lactobacillus plantarum* // Journal of Bacteriology. – 2004. – V. 186. – P. 3749–3759.

173. Lu J., Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2014. – V. 66. – P. 75-87.
174. Lucius K. Dietary lectins: gastrointestinal and immune effects // *Alternative and Complementary Therapies*. – 2020. – V. 26 – № 4. – P. 168–174.
175. Macfarlane S., Macfarlane G. Composition and metabolic activities of bacterial biofilms colonizing food residues in the human gut // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72 – № 9. – P. 6204–6211.
176. MacKenzie D. A., Tailford L. E., Hemmings A. M., Juge N. Crystal structure of a mucus binding protein repeat reveals an unexpected functional immunoglobulin binding activity // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – V. 284. – P. 32444–32453.
177. Maresca D., Zotta T., Mauriello G. Adaptation to aerobic environment of *Lactobacillus johnsonii/gasseri* strains // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 157.
178. Marques Da Silva, W., Oliveira, L. C., Soares, S. C., Sousa, C. S., Tavares, G. C., Resende, C. P., Azevedo, V. Quantitative proteomic analysis of the response of probiotic putative *Lactococcus lactis* NCDO 2118 strain to different oxygen availability under temperature variation // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 759.
179. Marreiros B. C., Sena F. V., Sousa F. M., Batista A. P., Pereira M. M. Type II NADH: quinone oxidoreductase family: phylogenetic distribution, structural diversity and evolutionary divergences // *Environmental microbiology*. – 2016. – V. 18. – № 12. – P. 4697–4709.
180. Martínez B., Rodríguez A., Kulakauskas S., Chapot-Chartier M. - P. Cell wall homeostasis in lactic acid bacteria: threats and defences // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2020. – V. 44 – № 5. – P. 538–564.
181. Marty-Teyssset C., De La Torre F., Garel J. R. Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – V. 66. – P. 262–267.

182. Masco L., Crockaert C., Van Hoorde K., Swings J., Huys G. *In vitro* assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of *Bifidobacterium* // Journal of Dairy Science. – 2007. – V. 90. – P. 3572–3578.
183. Mathipa-Mdakane M. G., Thantsha M. S. *Lacticaseibacillus rhamnosus*: a suitable candidate for the construction of novel bioengineered probiotic strains for targeted pathogen control // Foods. – 2022. – V. 11. – №. 6. – P. 785.
184. Maus J. E., Ingham S. C. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria // Journal of Applied Microbiology. – 2003. – V. 95. – P. 146–154.
185. Mazzeo M. F., Cacace G., Peluso A., Zotta T., Muscariello L., Vastano V., Parente E., Siciliano R. A. Effect of inactivation of *ccpA* and aerobic growth in *Lactobacillus plantarum*: A proteomic perspective // J. Proteom. – 2012. – V. 75. – P. 4050–4061.
186. McCord J. M., Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) // Journal of Biological Chemistry. – 1969. – V. 244. – P. 6049–6055.
187. Mekadim C., Killer J., Mrázek J., Bunešová V., Pechar R., Hroncová Z., Vlková E. Evaluation of the *infB* and *rpsB* gene fragments as genetic markers intended for identification and phylogenetic analysis of particular representatives of the order *Lactobacillales* // Archives of microbiology. – 2018. – V. 200. – P. 1427–1437.
188. Mendez A., Vargas R. E., Michelangeli C. Effects of concanavalin A, fed as a constituent of jack bean (*Canavalia ensiformis* L.) seeds, on the humoral immune response and performance of broiler chickens // Poultry Science. – 1998. – V. 77. – P. 282–289.
189. Meyer J. H. Gastric motility // In Physiology of the Gastrointestinal Tract, 2nd edn, 1, New York: Raven Press. – 1987. – P. 613–629.
190. Meyer M., Schweiger P., Deppenmeier U. Succinic semialdehyde reductase Gox1801 from *Gluconobacter oxydans* in comparison to other succinic semialdehyde-reducing enzymes // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – V. 99. – P. 3929–3939.

191. Miller R. V., Kokjohn T. A. General microbiology of *recA*: environmental and evolutionary significance // Annual Review of Microbiology. – 1990. – V. 44. – P. 365–394.
192. Mishra O. P., Kovachich G. B. Inhibition of the autoxidation of ascorbate and norepinephrine by extracts of *Clostridium butyricum*, *Megasphaera elsdenii* and *Escherichia coli* // Life Sciences. – 1984. – V. 35. – № 8. – P. 849–854.
193. Miwa Y., Saikawa M., Fujita Y. Possible function and some properties of the CcpA protein of *Bacillus subtilis* // Microbiology. – 1994. – V. 140 – № 10. – P. 2567–2575.
194. Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J. - J., Le Loir Y., Oliveira S. C., Langella P., Azevedo V. Oxidative stress in *Lactococcus lactis* // Genetics and Molecular Research. – 2003. – V. 2 – № 4. – P. 348–359.
195. Molenaar D., Bringel F., Schuren F. H., de Vos W. M., Siezen R. J., Kleerebezem M. Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays // Journal of Bacteriology. – 2005. – V. 187 – № 17. – P. 6119–6127.
196. Monteagudo-Mera A., Rastall R. A., Gibson G. R., Charalampopoulos D., Chatzifragkou A. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health // Applied microbiology and biotechnology. – 2019. – V. 103 – № 16. – P. 6463–6472.
197. Munch-Petersen A. Deoxyribonucleoside catabolism and thymine incorporation in mutants of *Escherichia coli* lacking deoxyriboaldolase // Eur. J. Biochem. – 1970. – V. 15. – P. 191–202.
198. Muñoz-Provencio D., Llopis M., Antolín M., de Torres I., Guarner F., Pérez-Martínez G., Monedero V. Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix // Archives of Microbiology. – 2009. – V. 191. – P. 153–161.
199. Murphy M. G., Condon S. Correlation of oxygen utilization and hydrogen peroxide accumulation with oxygen induced enzymes in *Lactobacillus plantarum* cultures // Archives of Microbiology. – 1984. – V. 138. – P. 44–48.

200. Nachtigall C., Vogel C., Rohm H., Jaros D. How capsular exopolysaccharides affect cell surface properties of lactic acid bacteria // *Microorganisms*. – 2020. – V. 8 – № 12. – P. 1904.
201. Naraki S., Igimi S., Sasaki Y. NADH peroxidase plays a crucial role in consuming H₂O₂ in *Lactobacillus casei* IGM394 // *Biosci. Microbiota Food Health*. – 2020. – V. 39. – P. 45–56.
202. Nelson D. P., Kiesow L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25C° (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV) // *Analytical biochemistry*. – 1972. – V. 49. – №. 2. – P. 474–478.
203. Nie Y., Hu J., Hou Q., Zheng W., Zhang X., Yang T., Yan, X. *Lactobacillus frumenti* improves antioxidant capacity via nitric oxide synthase 1 in intestinal epithelial cells // *The FASEB Journal*. – 2019. – V. 33. – №. 10. – P. 10705–10716.
204. Nishikimi M. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1975. – V. 63 – № 2. – P. 463–468.
205. Njus D., Kelley P. M., Tu Y. - J., Schlegel H. B. Ascorbic acid: the chemistry underlying its antioxidant properties // *Free Radic. Biol. Med*. – 2020. – V. 159. – P. 37–43.
206. Noonpakdee W., Sitthimonchai S., Panyim S., Lertsiri S. Expression of the catalase gene *katA* in starter culture *Lactobacillus plantarum* TISTR850 tolerates oxidative stress and reduces lipid oxidation in fermented meat product // *International Journal of Food Microbiology*. – 2004. – V. 95. – P. 127–135.
207. Noureen S., Riaz A., Arshad M., Arshad N. *In vitro* selection and *in vivo* confirmation of the antioxidant ability of *Lactobacillus brevis* MG000874 // *J. Appl. Microbiol*. – 2019. – V. 126. – P. 1221–1232.
208. Odamaki T., Xiao J. Z., Yonezawa S., Yaeshima T., Iwatsuki K. Improved viability of bifidobacteria in fermented milk by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* // *J. Dairy Sci*. – 2011. – V. 94. – P. 1112–1121.

209. Ouwehand A. C. and Conway P. L. Specificity of spent culture fluids of *Lactobacillus* spp. to inhibit adhesion of enteropathogenic fimbriated *Escherichia coli* cells // *Microbial Ecology in Health and Disease*. – 1996. – V. 9 – № 6. – P. 239–246.
210. Papadimitriou K., Alegría Á., Bron P. A., de Angelis M., Gobbetti M., Kleerebezem M., Kok J. Stress physiology of lactic acid bacteria // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2016. – V. 80. - № 3. – P. 837–890.
211. Pedersen M. B., Garrigues C., Tophile K., Brun C., Vido K., Bennedsen M., Møllgaard H., Gaudu P., Gruss A. Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: identification of a heme-responsive operon // *Journal of Bacteriology*. – 2008. – V. 190 – № 14. – P. 4903–4911.
212. Pedersen M. B., Gaudu P., Lechardeur D., Petit M. - A., Gruss A. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology // *Annual Review of Food Science and Technology*. – 2012. – V. 3. – P. 37–58.
213. Pelletier C., Bouley C., Cayuela C., Bouttier S., Bourlioux P., Bellon-Fontaine M. N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains // *Applied and environmental microbiology*. – 1997. – V. 63. – №. 5. – P. 1725–1731.
214. Pereira D. I., Gibson G. R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. V. 68. – P. 4689–4693.
215. Petrat F., Paluch S., Dogruoz E., Dorfler P., Kirsch M., Korth H. G., Sustmann R., Groot De H. Reduction of Fe(III) ions complexed to physiological ligands by lipoyl dehydrogenase and other flavoenzymes *in vitro*: implications for an enzymatic reduction of Fe(III) ions of the labile iron pool // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. – P. 46403–46413.
216. Petrova M. I., Macklaim J. M., Wuyts S., Verhoeven T., Vanderleyden J., Gloor G. B., Reid G. Comparative genomic and phenotypic analysis of the vaginal probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1278.

217. Petrova M. I., Reid G., Ter Haar J. A. *Lacticaseibacillus rhamnosus* GR-1, aka *Lactobacillus rhamnosus* GR-1: Past and future perspectives // Trends in Microbiology. – 2021. – V. 29. – №. 8. – P. 747–761.
218. Piette J. P. G., Idziak E. S. A model study of factors involved adhesion of *Pseudomonas fluorescens* // Applied and Environmental Microbiology. – 1992. – V. 58. – P. 2783–2791.
219. Pittman M. S., Robinson H. C., Poole R. K. A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm // Journal of Biological Chemistry. – 2005. – V. 280. – P. 32254–32261.
220. Pophaly S. D., Poonam S., Pophaly S. D., Kapila S., Nanda D. K., Tomar S. K., Singh R. Glutathione biosynthesis and activity of dependent enzymes in food-grade lactic acid bacteria harbouring multidomain bifunctional fusion gene (gshF) // Journal of applied microbiology. – 2017. – V. 123. – №. 1. – P. 194–203.
221. Pophaly S. D., Singh R., Pophal S. D., Kaushik J. K., Tomar S. K. Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria // Microbial Cell Factories. – 2012. – V. 11. – P. 114–128.
222. Prasad J., McJarrow P., Gopal P. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying // Applied and environmental microbiology. – 2003. – V. 69. – №. 2. – P. 917–925.
223. Prema P., Ranjani S.S., Kumar K.R., Veeramanikandan V., Mathiyazhagan N., Nguyen V.H., Balaji P. Microbial synthesis of silver nanoparticles using *Lactobacillus plantarum* for antioxidant, antibacterial activities // Inorganic Chemistry Communications. – 2022. – V. 136. – P. 109139.
224. Prete R., Long S. L., Gallardo A. L., Gahan C. G., Corsetti A., Joyce S. A. Beneficial bile acid metabolism from *Lactobacillus plantarum* of food origin // Scientific reports. – 2020. – V. 10 – № 1. – P. 1–11.
225. Pretzer G., Snel J., Molenaar D., Wiersma A., Bron P. A., Lambert W. M., Vos W., Meer R., Smits M. A., Kleerebezem M. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum* // Journal of Bacteriology. – 2005. – V. 187 – № 17. – P. 6128–6136.

226. Pricer W. E., Horecker B. L. Deoxyribose aldolase from *Lactobacillus plantarum* // J. Biol. Chem. – 1960. – V. 235. – P. 1292–1298.
227. Pridmore R. D., Pittet A. C., Praplan F., Cavadini C. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity // FEMS Microbiology Letters. – 2008. – V. 283. – P. 210–215.
228. Quatravaux S., Remize F., Bryckaert E., Colavizza D., Guzzo J. Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters // Journal of Applied Microbiology. – 2006. – V. 101. – P. 903–912.
229. Rahate K. A., Madhumita M., Prabhakar P. K. Nutritional composition, anti-nutritional factors, pretreatments-cum-processing impact and food formulation potential of faba bean (*Vicia faba* L.): a comprehensive review // Lwt. – 2021. – V. 138. – P. 110796.
230. Rezaïki L., Cesselin B., Yamamoto Y., Vido K., van West E., Gaudu P., Gruss A. Respiration metabolism reduces oxidative and acid stress to improve long-term survival of *Lactococcus lactis* // Molecular Microbiology. – 2004. – V. 53 – № 5. – P. 1331–1342.
231. Rezaïki L., Lamberet G., Derre A., Gruss A., Gaudu P. *Lactococcus lactis* produces short-chain quinones that cross-feed group B *Streptococcus* to activate respiration growth // Molecular Microbiology. – 2008. – V. 67. – P. 947–957.
232. Ricciardi A., Ianniello R. G., Parente E., Zotta T. Factors affecting gene expression and activity of heme- and manganese-dependent catalases in *Lactobacillus casei* strains // International journal of food microbiology. – 2018. – V. 280. – P. 66–77.
233. Ricciardi A., Zotta T., Ianniello R. G., Boscaino F., Matera A., Parente E. Effect of respiratory growth on the metabolite production and stress robustness of *Lactobacillus casei* N87 cultivated in cheese whey permeate medium // Frontiers in microbiology. – 2019. – V. 10. – P. 851.
234. Ripoll C., Favery B., Lecomte P., Van Damme E., Peumans W., Abad P., Jouanin L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to

protect plants against root-knot nematodes // *Plant Science*. – 2003. – V. 164. – P. 517–523.

235. Rochat T., Gratadoux J. - J., Gruss A., Corthier G., Maguin E., Langella P., van de Guchte M. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72 – № 8. – P. 5143–5149.

236. Rossi F., Amadoro C., Colavita G. Members of the *Lactobacillus* genus complex (LGC) as opportunistic pathogens: a review // *Microorganisms*. – 2019. – V. 7 – № 5. – P. 126.

237. Rossi F., Amadoro C., Pallotta M. L., Colavita G. Variability of Genetic characters associated with probiotic functions in *Lacticaseibacillus* species // *Microorganisms*. – 2022. – V 10. – №. 5. – P. 1023.

238. Sakamoto J., Koga E., Mizuta T., Sato C., Noguchi S., Sone N. Gene structure and quinol oxidase activity of a cytochrome *bd*-type oxidase from *Bacillus stearothersophilus* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 1999. – V. 1411. – №. 1. – P. 147–158.

239. Sakamoto M., Komagata K. Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria // *Journal of Fermentation and Bioengineering*. – 1996. – V. 82. – P. 210–216.

240. Salas-Jara M.J., Ilabaca A., Vega M., García A. Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics // *Microorganisms*. – 2016. – V. 4. – №. 3. – P. 35.

241. Sastry M. S. R., Quigley P. M., Hol W. G. J., Baneyx F. The linker-loop region of *Escherichia coli* chaperone Hsp31 functions as a gate that modulates high affinity substrate binding at elevated temperatures // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – V. 101. – P. 8587–8592.

242. Satoh T., Todoroki M., Kobayashi K., Niimura Y., Kawasaki S. Purified thioredoxin reductase from O₂-sensitive *Bifidobacterium bifidum* degrades H₂O₂ by

- interacting with alkyl hydroperoxide reductase // *Anaerobe*. – 2019. – V. 57. – P. 45-54.
243. Schaffer C. and Messner P. The structure of secondary cell wall polymers: how gram-positive bacteria stick their cell walls together // *Microbiology*. – 2005. – V. 151. – P. 643–651.
244. Scharf C., Riethdorf S., Ernst H., Engelmann S., Völker U., Hecker M. Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis* // *Journal of bacteriology*. – 1998. – V. 180. – №. 7. – P. 1869-1877.
245. Schär-Zammaretti P., Ubbink J. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations // *Biophysical Journal*. – 2003. – V. 85. – №. 6. – P. 4076-4092.
246. Scholtissek A., Tischler D., Westphal A. H., van Berkel W. J. H., Paul C. E. Old yellow enzyme-catalysed asymmetric hydrogenation: linking family roots with improved catalysis // *Catalysts*. – 2017. – V. 7. – P. 130.
247. Serata M., Yasuda E., Sako T. Effect of superoxide dismutase and manganese on superoxide tolerance in *Lactobacillus casei* strain Shirota and analysis of multiple manganese transporters // *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. – 2018. – V. 37. – №. 2. – P. 31-38.
248. Serrano L. M., Molenaar D., Wels M., Teusink B., Bron P.A., de Vos W. M., Smid E. Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 // *Microbial Cell Factories*. – 2007. – V. 6 – № 1. – P. 1–14.
249. Serrazanetti D. I., Gottardi D., Montanari C., Gianotti A. Dynamic stresses of lactic acid bacteria associated to fermentation processes // *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. – IntechOpen, 2013. – P. 539 – 570.
250. Shi W., Li Y., Gao X., Fu R. Improvement of the respiration efficiency of *Lactococcus lactis* by decreasing the culture pH // *Biotechnology Letters*. – 2016. – V. 38 – № 3. – P. 495–501.

251. Siciliano R. A., Pannella G., Lippolis R., Ricciardi A., Mazzeo M. F., Zotta T. Impact of aerobic and respirative life-style on *Lactobacillus casei* N87 proteome // Int. J. Food Microbiol. – 2019. – V. 298. – P. 51–62.
252. Signorella S., Palopoli C., Ledesma G. Rationally designed mimics of antioxidant manganoenzymes: role of structural features in the quest for catalysts with catalase and superoxide dismutase activity // Coordination Chemistry Reviews. – 2018. – V. 365. – P. 75–102.
253. Smart J. B., Pillidge C. J., Garman J. H. Growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria on lactose and lactose-related mono-, di- and trisaccharides and correlation with distribution of beta-galactosidase and phosphobeta-galactosidase // Journal of Dairy Research. – 1993. – V. 60. – P. 557–568.
254. Sokovic Bajic S., Djokic J., Dinic M., Veljovic K., Golic N., Mihajlovic S., Tolinacki M. GABA-Producing natural dairy isolate from artisanal zlatar cheese attenuates gut inflammation and strengthens gut epithelial barrier *in vitro* // Frontiers in Microbiology. – 2019. – V. 10. – P. 527.
255. Spyropoulos B. G., Misiakos E. P., Fotiadis C., Stoidis C. N. Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation-induced enteritis and colitis // Digestive Diseases and Sciences. – 2011. – V. 56. – P. 285–294.
256. Stevens M. J. A., Wiersma A., de Vos W. M., Kuipers O. P., Smid E. J., Molenaar D., Kleerebezem M. Improvement of *Lactobacillus plantarum* aerobic growth as directed by comprehensive transcriptome analysis // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – V. 74. – P. 4776–4778.
257. Storz G., Imlay J. A. Oxidative stress // Current Opinion in Microbiology. – 1999. – V. 2. – P. 188–194.
258. Suryavanshi M.V., Paul D., Doijad S.P., Bhute S.S., Hingamire T.B., Gune, R. P., Shouche Y.S. Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* strains E2C2 and E2C5 isolated from human stool culture // Standards in genomic sciences. – 2017. – V. 12. – P. 1–9.

259. Tachon S., Brandsma J. B., Yvon M. NoxE NADH oxidase and the electron transport chain are responsible for the ability of *Lactococcus lactis* to decrease the redox potential of milk // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2010. – V. 76. – P. 1311–1319.
260. Tachon S., Chambellon E., Yvon M. Identification of a conserved sequence in flavoproteins essential for the correct conformation and activity of the NADH oxidase NoxE of *Lactococcus lactis* // *Journal of Bacteriology*. – 2011. – V. 193. – P. 3000–3008.
261. Tachon S., Michelon D., Chambellon E., Cantonnet M., Mezange C., Henno L., Cachon R., Yvon M. Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis* // *Microbiology*. – 2009. – V. 155. – P. 2941–2948.
262. Talwalkar A., Kailasapathy K. Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen // *Journal of dairy science*. – 2003. – V. 86. – №. 8. – P. 2537–2546.
263. Tanaka K., Komiyama A., Sonomoto K., Ishizaki A., Hall S., Stanbury, P. Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1 // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – V. 60. – P. 160–167.
264. Tanaka K., Sato T., Kitahar J., Un, S., Nomur I., Kan Y., Kawasaki S. O₂-inducible H₂O₂-forming NADPH oxidase is responsible for the hyper O₂ sensitivity of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P. 10750.
265. Tang W., Xing Z., Hu W., Li C., Wang J., Wang Y. Antioxidative effects *in vivo* and colonization of *Lactobacillus plantarum* MA2 in the murine intestinal tract // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – V. 100. – P. 7193–7202.
266. Tatusov R. L., Galperin M. Y., Natale D. A., Koonin E. V. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution // *Nucleic acids research*. – 2000. – V. 28. – №. 1. – P. 33–36.

267. Teteneva N. A, Mart'yanov, S. V., Esteban-López, M., Kahnt, J., Glatter, T., Netrusov, A. I., Sourjik, V. Multiple drug-induced stress responses inhibit formation of *Escherichia coli* biofilms // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2020. – V. 86. – №. 21. – P. e01113-20.
268. Tian X., Wang Y., Chu J., Zhuang Y., Zhang S. Metabolite profiling coupled with metabolic flux analysis reveals physiological and metabolic impacts on *Lactobacillus paracasei* oxygen metabolism // *Process Biochemistry*. – 2018. – V. 68. – P. 1-11.
269. Utami M. M. D., Wahyono N. D. Supplementation of probiotic and prebiotic on the performance of broilers // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2018. – V. 207 – № 1. – P. 012024.
270. van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D., Maguin E. Stress responses in lactic acid bacteria // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2002. – V. 82. – P. 187–216.
271. van Niel E. W., Hofvendahl K., Hahn-Hagerdal B. Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 under different growth conditions // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – V. 68. – P. 4350–4356.
272. Van Tassell M. L., Miller M. J. *Lactobacillus* adhesion to mucus // *Nutrients*. – 2011. – V. 3. – P. 613–636.
273. Vasquez E. C., Pereira T., Peotta V. A., Baldo M. P., Campos-Toimil M. Probiotics as beneficial dietary supplements to prevent and treat cardiovascular diseases: uncovering their impact on oxidative stress // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2019. – V. 2019. – P. 1 – 11.
274. Velez M. P., De Keersmaecker S. C. J., Vanderleyden J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract // *FEMS Microbiology Letters*. – 2007. – V. 276. – P. 140–148.
275. Vernazza C. L., Gibson G. R., Rastall R. A. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium* // *Journal of Applied Microbiology*. – 2006. – V. 100. – P. 846–853.

276. Vido K., Le Bars D., Mistou M. Y., Anglade P., Gruss A., Gaudu P. Proteome analyses of heme-dependent respiration in *Lactococcus lactis*: involvement of the proteolytic system // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – V. 186 – № 6. – P. 1648–1657.
277. Vinderola C. G., Reinheimer J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance // *Food Research International*. – 2003. – V. 36. – P. 895–904.
278. Virtanen T., Pihlanto A., Akkanen S., Korhonen H. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria // *Journal of Applied Microbiology*. – 2007. – V. 102. – P. 106–115.
279. Wagner T., Wegner C. E., Kahnt J., Ermler U., Shima S. Phylogenetic and structural comparisons of the three types of methyl coenzyme M reductase from *Methanococcales* and *Methanobacteriales* // *Journal of bacteriology*. – 2017. – V. 199. – №. 16. – P. e00197-17.
280. Walker G. C. The SOS response of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* // *Cellular and Molecular Biology*. – 1996. – P. 1400–1416.
281. Walter J., Chagnaud P., Tannock G. W., Loach D. M., Dal Bello F., Jenkinson H.F., Hammes W.P., Hertel C. A highmolecular-mass surface protein (Lsp) and methionine sulfoxide reductase B (MrsB) contribute to the ecological performance of *Lactobacillus reuteri* in the murine gut // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71. – P. 979–986.
282. Walter J., Schwab C., Loach D. M., Ganzle M. G., Tannock G. W. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, *in vitro* biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract // *Microbiology*. – 2008. – V. 154. – P. 72–80.
283. Watanabe M., van der Veen S., Abee T. Impact of respiration on resistance of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 to acid stress // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – V. 78 – № 11. – P. 4062–4064.
284. Weber A., Kogl S. A., Jung K. Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 2006. – V, 188. – P. 7165–7175.

285. Westerik N., Reid G., Sybesma W., Kort R. The probiotic *Lactobacillus rhamnosus* for alleviation of *Helicobacter pylori*-associated gastric pathology in East Africa // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 1873.
286. Whisner C. M., Castillo L. F. Prebiotics, bone and mineral metabolism // *Calcified Tissue International*. – 2018. – V. 102 – № 4. – P. 443–479.
287. Wolf G., Strahl A., Meisel J., Hammes W. P. Heme-dependent catalase activity of lactobacilli // *International Journal of Food Microbiology*. – 1991. – V. 12. – P. 133–140.
288. Xiong Z. Q., Kong L. H., Wang G. Q., Xia Y. J., Zhang H., Yin B. X., Ai L. Z. Functional analysis and heterologous expression of bifunctional glutathione synthetase from *Lactobacillus* // *Journal of dairy science*. – 2018. – V. 101. – №. 8. – P. 6937–6945.
289. Yadav M., Verma M. K., Chauhan N. S. A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition // *Archives of microbiology*. – 2018. – V. 200 – № 2. – P. 203–217.
290. Yamamoto N., Shoji M., Hoshigami H., Watanabe K., Takatsuzu T., Yasuda S., Kinoshita H. Antioxidant capacity of soymilk yogurt and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria // *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. – 2019. – V. 38. – №. 3. – P. 97–104.
291. Yang Y., Babich O.B., Sukhikh S.A., Zimina M.I., Milentyeva I.S. Antibiotic activity and resistance of lactic acid bacteria and other antagonistic bacteriocin-producing microorganisms // *Foods and Raw materials*. – 2020. – V. 8. – №. 2. – P. 377–384.
292. Zanoni S., Pompei A., Cordisco L., Amaretti A., Rossi M., Matteuzzi D. Growth kinetics on oligo- and polysaccharides and promising features of three antioxidative potential probiotic strains // *Journal of Applied Microbiology*. – 2008. – V. 105 – № 5. – P. 1266–1276.
293. Zarate G., Perez Chaia A. Dairy bacteria remove *in vitro* dietary lectins with toxic effects on colonic cells // *Journal of Applied Microbiology*. – 2009. – V. 106. – P. 1050–1057.

294. Zawistowska-Rojek A., Kośmider A., Stępień K., Tyski S. Adhesion and aggregation properties of *Lactobacillaceae* strains as protection ways against enteropathogenic bacteria // Archives of Microbiology. – 2022. – V. 204. – №. 5. – P. 285.
295. Zeng H., Liu Y., Huang K., Chen H., Yang B., Wang J. *Lactiplantibacillus plantarum* A1, C1 and C10 are potential probiotics isolated from pineapple residual silage // Microorganisms. – 2022. – V. 11. – №. 1. – P. 29.
296. Zhan D., Bai A., Yu L., Han W., Feng Y. Characterization of the PH1704 protease from *Pyrococcus horikoshii* OT3 and the critical functions of Tyr120 // PLoS ONE. – 2014. – V. 9. – P. e103902.
297. Zhang C., Gui Y., Chen X., Chen D., Guan C., Yin B., Gu R. Transcriptional homogenization of *Lactobacillus rhamnosus* hsrlyfm 1301 under heat stress and oxidative stress // Applied microbiology and biotechnology. – 2020. – V. 104. – P. 2611–2621.
298. Zhang Y., Gao X., Zheng Y., Garavito R. M. Identification of succinic semialdehyde reductases from *Geobacter*: expression, purification, crystallization, preliminary functional, and crystallographic analysis // Acta Biochim. Biophys. Sin. – 2011. – V. 43. – P. 996–1002.
299. Zhang Y., Li Y. Engineering the antioxidative properties of lactic acid bacteria for improving its robustness // Current Opinion in Biotechnology. – 2013. – V. 24. – P. 142–147.
300. Zhao L., Zhang Y., Liu Y., Zhong J., Zhang D. Assessing the safety and probiotic characteristics of *Lactocaseibacillus rhamnosus* X253 via complete genome and phenotype analysis // Microorganisms. – 2023. – V. 11. – №. 1. – P. 140.
301. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C. M., Harris H. M., Mattarelli P., Lebeer S.A Taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2020. – V. 70. – №. 4. – P. 2782– 2858.

302. Zhitkovich A. Nuclear and cytoplasmic functions of vitamin C // *Chemical research in toxicology*. – 2020. – V. 33. – №. 10. – P. 2515–2526.
303. Zhurina M. V., Gannesen A. V., Zdrovenko E. L., Plakunov V. K. Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms // *Microbiology*. – 2014. – V. 83 – № 6. – P. 713–722.
304. Zielińska D., Sionek B., Kołożyn-Krajewska D. Safety of probiotics // *Diet, microbiome and health*. – 2018. – P. 131-161.
305. Zotta T., Guidone A., Ianniello R.G., Parente E., Ricciardi A. Temperature and respiration affect the growth and stress resistance of *Lactobacillus plantarum* C17 // *Journal of applied microbiology*. – 2013. – V. 115. – №. 3. – P. 848–858.
306. Zotta T., Parente E., Ricciardi A. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry // *J. Appl. Microbiol.* – 2017. – V. 122. – № 4. – P. 857–869.
307. Zuljan F. A., Repizo G. D., Alarcón S. H., Magni C. α -Acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* contributes to pH homeostasis in acid stress conditions // *Int. J. Food Microbiol.* – 2014. – V. 188. – P. 99–107.
308. Zuo F., Yu R., Feng X., Khaskheli G. B., Chen L., Ma H., Chen S. Combination of heterogeneous catalase and superoxide dismutase protects *Bifidobacterium longum* strain NCC2705 from oxidative stress // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – V. 98. – P. 7523–7534.

Приложение. Статистический анализ масс-спектрометрических данных по белкам *L. rhamnosus* КМ МГУ 529, уровень которых менялся в аэробных условиях по сравнению со статичными условиями роста.

АС ¹	Белок	Пептиды ²	Среднее ³ (А)	Среднее ³ (С)	Cv (А) ⁴	Cv (С) ⁴	p ⁵ А vs. С	q ⁶ А vs. С	log ₂ A/C ⁷
K8Q1F8	Регулятор транскрипции, домен семейства GntR/аспартатаминотрансфераза	22	220923333	419910000	0,089414	0,065718	0,000553	0,018694	-0,92814
K8Q211	Дополнительный липопротеиновый компонент предполагаемого переносчика кобаламина ECF	12	135876667	478203333,3	0,168657	0,201388	0,000179	0,009118	-1,81005
K8Q3P7	Оротатфосфорибозилтрансфераза	3	69392666,7	13718666,67	0,319088	0,219679	0,000329	0,0138	2,304882
K8Q3Q2	Дигидрооротаза	13	96793000	27711333,33	0,21066	0,327022	0,000957	0,026576	1,837197
K8Q3Z2	Тиоредоксин	16	818353333	362616666,7	0,208509	0,086135	0,001076	0,028365	1,157176
K8Q441	Белок, содержащий домен биосинтеза Fe-S кластера	11	1386933333	730836666,7	0,064244	0,102444	0,000642	0,019686	0,927124
K8Q4T0	Аденозилкобаламинзависимая рибонуклеозид-трифосфат-редуктаза	38	234873333	937553333,3	0,011241	0,038438	3,31E-06	0,001877	-1,99637
K8Q549	β-Цепь цитратлиазы	16	23628666,7	181926666,7	0,090401	0,151964	2,59E-06	0,001877	-2,93798
K8Q595	Пируватоксидаза (LRHMDP2_2599, рох)	27	124346667	61740666,67	0,055344	0,093686	0,000341	0,0138	1,01272
K8Q5E9	Оксидоредуктаза семейства альдо/кеторедуктаз, подгруппа 1	19	890360000	546566666,7	0,039776	0,051645	0,001283	0,030308	0,704538
K8Q5G3	Липоатпротеинлигаза	30	516203333	279693333,3	0,085027	0,037877	0,000577	0,018694	0,881231
K8Q6G7	Малая цепь карбамоилфосфатсинтазы	11	251890000	137656666,7	0,033212	0,116524	0,000837	0,024331	0,877463
K8Q6T6	Неохарактеризованный белок	12	1960633333	591536666,7	0,070222	0,091401	2,00E-05	0,003259	1,730285
K8Q6V5	L-лактатоксидаза	26	662603333	281056666,7	0,086922	0,027321	9,30E-05	0,006351	1,233906

K8Q706	Предполагаемый липопротеин феромона (ФМН-связывающий домен белка)	33	4892900000	8901866667	0,020181	0,078028	0,000556	0,018694	-0,8606
K8Q7A0	Фавин-нуклеотид-связывающий белок, родственный пиридоксин-5'-фосфат-оксидазе V	15	1420700000	190593333,3	0,154043	0,177191	7,15E-06	0,002702	2,901498
K8Q7D7	Вероятная фосфокетолаза	35	410770000	180580000	0,236824	0,108051	0,002128	0,037578	1,161614
K8Q7J1	НАДН-дегидрогеназа	19	219410000	107431333,3	0,14815	0,132574	0,001489	0,030692	1,028007
K8Q900	НАДН:флавиноксидоредуктаза, семейство OYE	16	84843666,7	35018000	0,063062	0,080346	8,82E-05	0,006351	1,277818
K8Q9I4	Нейтральная эндопептидаза	21	167990000	107842666,7	0,068655	0,082415	0,003477	0,045517	0,640562
K8QAT7	Аргининосукцинатсинтаза	22	251180000	413023333,3	0,043827	0,143994	0,004077	0,0491	-0,70822
K8QB15	Катаболическая ацетолактатсинтаза	21	229943333	31532000	0,137101	0,242728	2,33E-05	0,003259	2,889037
K8QBP7	Дезоксиаденозинкиназа/ дезоксигуанозинкиназа	17	209296667	441286666,7	0,107653	0,183899	0,001461	0,030692	-1,06526
K8QCB0	Большая цепь карбамоилфосфатсинтазы	50	123616667	41963666,67	0,248332	0,074449	0,000512	0,018694	1,529287
K8QCB4	Бифункциональный белок PrgR	15	408806667	135806666,7	0,167401	0,154411	0,000247	0,011674	1,587482
K8QCI9	Белок UPF0297	12	697113333	315896666,7	0,04405	0,07207	0,000127	0,007635	1,143575
K8QCV1	ABC-транспортер клеточного деления, АТФ-связывающий белок FtsE	16	199240000	327716666,7	0,076245	0,038691	0,001457	0,030692	-0,72001
K8QD01	Пируватформиатлиаза	24	62435666,7	160710000	0,02511	0,123912	9,52E-05	0,006351	-1,35682
K8QD20	α -Ацетолактатдекарбоксилаза	10	306343333	129190000	0,098354	0,06642	0,000128	0,007635	1,243189
K8QD39	Дегидрогеназа β -гидроксикислоты, родственная 3-гидроксиизобутиратдегидрогеназе	4	46379666,7	18534666,67	0,272687	0,192142	0,001999	0,035981	1,306827
K8QDE0	Белок, содержащий домен YfIT	18	3642666667	1613433333	0,065182	0,140015	0,000341	0,0138	1,182698
K8QE31	Белок семейства ThiJ/PfpI	10	1305833333	822903333,3	0,029939	0,04029	0,001457	0,030692	0,666536

K8QEJ1	Белок, содержащий домен β-лактамазы	4	69524666,7	38249000	0,025773	0,20394	0,002922	0,044606	0,881295
K8QFD2	Дигидролипоеилдегидрогеназа (E3)	15	587233333	263420000	0,155839	0,117262	0,000665	0,019858	1,152272
K8QFX4	Аспаргаткарбамоилтрансфераза	17	213466667	79516666,67	0,189917	0,050394	0,000296	0,013442	1,407005
K8QGF6	Дезоксирибозо-фосфат-альдолаза	13	317606667	141710000	0,296796	0,141446	0,004045	0,0491	1,134144
K8QGX3	Пируватоксидаза (LRHMDP2_203, ydaP, cidC)	24	205760000	43932000	0,13646	0,134258	1,80E-05	0,003259	2,228186
K8QH56	Фосфат-связывающий белок	15	86211666,7	153303333,3	0,104408	0,097408	0,001687	0,03266	-0,83129
K8QHI9	Связывающий рибосому фактор A	11	212573333	130030000	0,102794	0,053931	0,002483	0,041406	0,705362
K8QHM8	Белок UPF0291	12	1047346667	629163333,3	0,108003	0,0916	0,002815	0,04434	0,733685
K8QI55	Алкилгидропероксидредуктаза C	12	935526667	1752600000	0,055239	0,094142	0,000619	0,019489	-0,90295
K8QIY4	Предполагаемая НАД(ФАД)-зависимая дегидрогеназа	13	497436667	151503333,3	0,041796	0,192004	9,51E-05	0,006351	1,733588
K8QJ10	Белок биосинтеза гликогена GlgD, семейство глюкозо-1-фосфат-аденилилтрансфераз	13	91574666,7	47554333,33	0,051009	0,107754	0,000576	0,018694	0,949757
K8QJU7	Субстрат-связывающий белок ABC-транспортера	20	106423333	224586666,7	0,059555	0,04032	0,000146	0,008293	-1,07836
K8QLA2	Белок клеточного деления SepF	12	480606667	321883333,3	0,052026	0,021857	0,003132	0,044606	0,577239
K8QLC1	H-белок системы расщепления глицина	12	6845100000	4374300000	0,095295	0,061746	0,003738	0,047633	0,643334
K8QLD2	Универсальный стрессовый белок	9	271993333	166066666,7	0,022411	0,059006	0,001183	0,029288	0,713284
K8QLD7	Предполагаемая tPHK-сульфотрансфераза	13	64150333,3	40835666,67	0,119141	0,031534	0,004002	0,0491	0,645437
K8QLE7	ABC транспортер, периплазматический олигопептид-связывающий белок OppA	15	97932333,3	49492333,33	0,152916	0,131695	0,001593	0,032256	0,982087
K8QLH4	Регулятор транскрипции, семейство MarR	11	167930000	248263333,3	0,0393	0,022446	0,003157	0,044606	-0,5645

K8QM79	Регулятор транскрипции устойчивости к органическим гидропероксидам	5	151586667	85875000	0,120769	0,09923	0,00226	0,038247	0,817608
K8QNN2	Алкогольдегидрогеназа	16	234546667	677626666,7	0,23362	0,137518	0,000533	0,018694	-1,55046
K8QQ66	НАДН-пероксидаза Npx	23	502203333	90562333,33	0,177184	0,072098	1,20E-05	0,003259	2,457585
K8QQD2	Цистеинсинтаза	25	588060000	374550000	0,040119	0,10831	0,003321	0,045378	0,655459
K8QQU7	Тиолпероксидаза Трх-типа	11	1353866667	437286666,7	0,197823	0,075008	0,000185	0,009118	1,612451
K8QS65	Белок, содержащий домен DUF124	5	147173333	79509333,33	0,116773	0,178292	0,003492	0,045517	0,897643
K8QSC4	10 kDa шаперон	17	3950000000	21713666667	0,163524	0,115345	0,003127	0,044606	0,855822

Примечания: Для статистического анализа использовали программы MaxQuant (v. 2.0.1.0) и SaveQuant (v. 2.3.5);

¹ - Идентификатор белка в базе данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>);

² – Число уникальных пептидов;

³ – Среднее А или С – средние значения интенсивности в аэробных или стационарных условиях по результатам 3-х независимых экспериментов;

⁴ – Cv (A), Cv(C) – Коэффициенты вариации для интенсивностей по результатам 3-х независимых экспериментов для аэробных и стационарных условий;

⁵ – $p < 0,05$, статистически значимая разница между средними значениями из трёх групп согласно ANOVA-тесту;

⁶ – $q < 0,05$, минимальное значение ложноположительных результатов (FDR), при котором результат конкретного теста можно считать значимым;

⁷ – $\log_2 A/C$ – \log_2 изменения кратности белка в аэробных по сравнению со статичными условиями.