

На правах рукописи

Евдокимова Светлана Александровна

**МЕТОД КОНСТРУИРОВАНИЯ СИНБИОТИЧЕСКИХ
КОМПОЗИЦИЙ НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ
ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА ПАТОГЕНОВ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА - 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева».

Научный руководитель

Кареткин Борис Алексеевич

кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

**Официальные
оппоненты:**

Корнеева Ольга Сергеевна

доктор биологических наук, профессор, временно исполняющий обязанности ректора, заведующий кафедрой биохимии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Сорокина Елена Владимировна

кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет»

Защита состоится «27» февраля 2024 года в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 99.0.027.03 при РХТУ имени Д. И. Менделеева (125047, г. Москва, Миусская пл., 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ имени Д. И. Менделеева, а также на официальном сайте <http://diss.muctr.ru/>

Автореферат диссертации разослан « » января 2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 99.0.027.03

Кандидат технических наук, доцент



И.В. Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Нарушения состава микробиоты толстого кишечника приводят к снижению ее функциональной активности и другим тяжелым последствиям для макроорганизма хозяина. Для профилактики дисбиозов и восстановления нормальной структуры поврежденного сообщества с успехом применяются пробиотики, пребиотики и их комбинации – синбиотики, признаваемые наиболее перспективными (Swanson et al., 2020).

Хотя эффективность ряда полезных бактерий, пребиотических веществ и их комбинаций доказана экспериментально, вопрос о количественной оценке полезного действия и сравнения различных групп препаратов не решен окончательно. Согласно современному подходу, эффективность данных продуктов должна быть подтверждена клиническими испытаниями, однако такие исследования дорогостоящи, долгосрочны и имеют ряд этических ограничений. Для снижения затрат на завершающем этапе проверки рациональным является проведение предварительных исследований *in vitro* с применением количественных критериев. Существующие *in vitro* методы предполагают культивирование фекальных культур (Wang and Gibson, 1993; Rastall, 2003; Vulevic, 2004; Евдокимов, 2011; Вальшев, 2012) или отдельных членов микробиоты в моно- и смешанных культурах (Hutkins, 2007; Якуш, 2010; Корнеева, 2012, 2013; Gueimonde, 2016, 2020) в средах с пребиотиком. Критерии оценки основаны на сравнении роста пробиотических и непобиотических бактерий. Среди исследований *in vitro* одним из наиболее информативных, благодаря приближению к реальным условиям толстого кишечника, является ферментация фекальных культур в непрерывной трёхстадийной модели (Macfarlan, 1998; Fera-Gervasio, 2014; Wang, 2020; Sannasiddappa, 2011; Probert, 2004; Costabile, 2015; Cha, 2018; Liu, 2019). Однако, в разнообразном микробном сообществе сложно выделить конкретные пути взаимодействия. Поэтому для математического описания целесообразно рассмотреть один из наиболее распространенных типов связи, например, антагонизм.

Антагонизм пробиотиков в отношении непобиотических бактерий обусловлен, прежде всего, продуцированием органических кислот, которое может быть повышено введением пребиотика (Roberfroid, 2010). Воздействие данных метаболитов на непобиотик можно описать математически, с помощью констант ингибирования или минимальных ингибирующих концентраций, что позволяет предсказать исход совместного культивирования и разработать количественный критерий оценки, показывающий степень подавления роста непобиотика самим пробиотиком или в комбинации с пребиотиком.

Целью работы являлась разработка *in vitro* метода исследования пребиотиков и конструирования синбиотических композиций, основанного на математической модели

ингибирования роста патогена при совместном росте с пробиотиком, и ее проверка на модели кишечника *in vitro*.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Исследовать особенности ингибирования органическими кислотами (метаболитами бифидобактерий) роста тест-штаммов *Bacillus cereus* ВКПМ В-8076, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Salmonella enterica* ВКПМ В-5300.
2. Сравнить рост тест-штаммов в моно-культуре и в со-культуре с пробиотиком и оценить точность прогноза численности тест-штаммов в со-культуре с применением математических моделей ингибирования роста.
3. Разработать основанный на антагонизме пробиотика в отношении тест-штамма метод оценки эффективности и конструирования синбиотиков *in vitro*, а также количественный критерий на основании модели ингибирования.
4. Сравнить эффективность синбиотических композиций бифидобактерий с коммерческими пребиотиками с использованием данного метода.
5. С применением разработанного метода изучить воздействие синбиотических композиций *Bifidobacterium bifidum* 8 ВКПМ Ас-2136 с различными фракциями фруктанов, выделенных из растительного сырья, на тест-штаммы.
6. Исследовать влияние концентрации пребиотика в поступающей питательной среде на рост и образование метаболитов моно-культурой *Bifidobacterium adolescentis* ВКПМ 1662 при одностадийной непрерывной ферментации в условиях, приближенных к условиям кишечника.
7. Оценить влияние на параметры роста *Vac. cereus* кислот, продуцируемых *Bif. adolescentis* при со-культивировании в одностадийной непрерывной модели, разработать математическую модель динамики численности тест-штамма в указанных условиях и оценить точность прогноза.
8. Исследовать взаимодействие тест-штамма, пробиотика и фекального микробного сообщества в трехстадийной непрерывной функциональной модели кишечника и оценить точность прогноза модели ингибирования роста тест-штамма в данных условиях.

Научная новизна. На основании результатов экспериментов по совместному культивированию пробиотика и тест-штамма в присутствии пребиотика или без него предложен подход и создана математическая модель, описывающая ингибирование роста тест-штамма метаболитами пробиотика, из которой был выведен количественный критерий эффективности синбиотиков. Установленные закономерности являются теоретической основой для конструирования синбиотических композиций.

Исследовано влияние и установлены количественные взаимосвязи между начальными численностями пробиотика и тест-штамма и конечной численностью

последнего при совместном культивировании в среде с различными пребиотиками с применением методологии активного эксперимента.

Для исследования подавления пробиотиком тест-штамма в условиях, имитирующих толстый кишечник человека, проведено их совместное культивирование по схеме одностадийной непрерывной ферментации и разработана математическая модель, позволяющая установить количественные параметры воздействия на тест-штамм через константы ингибирования.

Впервые проведено сравнение влияния микробного контаминанта на биоценоз кишечника на фоне предварительного введения пробиотика с применением трехстадийной непрерывной *in vitro* модели толстого кишечника. Установлено, что математическая модель, основанная на константах ингибирования органическими кислотами, описывает подавление роста тест-штамма с приемлемой точностью.

Практическая значимость. Разработан метод оценки эффективности синбиотических композиций, основанный на периодическом совместном культивировании пробиотика и тест-штамма в среде с пребиотиком, и предложен количественный критерий, основанный на ингибировании роста тест-штамма. Метод позволяет выявить комбинацию пробиотика и пребиотика с максимальным воздействием на рост тест-штамма и может использоваться для сравнения большого количества комбинаций. Указанные метод и критерий применены для обоснования оптимального состава и конструирования синбиотической композиции на основе бифидобактерий и фруктанов, выделенных из растительного сырья.

Определенные параметры функций ингибирования роста тест-штаммов могут быть использованы для создания синбиотических композиций на основе других штаммов пробиотиков и пребиотических веществ.

Данные, полученные при одностадийном непрерывном культивировании, позволили расширить разработанную математическую модель и приблизить её к условиям кишечника, что является необходимым для детального изучения выбранных ранее синбиотических композиций.

Полученные в одностадийной и трёхстадийной функциональных моделях результаты и выявленные закономерности роста представляют ценность для понимания экологических взаимодействий в кишечном биоценозе.

Экспериментальные данные были использованы для создания специализированного Программно-алгоритмического обеспечения для нейросетевого моделирования микробиологических процессов. Данные модели могут быть применены для исследования процессов колонизации микробного сообщества микроорганизмами–симбионтами, а также его контаминации патогенами.

Методология и методы исследования. Культивирование микроорганизмов проводили в периодических и непрерывных (в одно- и трёхстадийной функциональных моделях кишечника) условиях. Для качественного и количественного определения углеводов и метаболитов использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и классические методы аналитики. Определение микробного состава фекальных культур проводили с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (qПЦР). Статистическую обработку результатов проводили с помощью инструментов Excel.

На защиту выносятся:

1. Кинетические закономерности роста при совместном и раздельном культивировании пробиотиков и тест-штаммов. Математическая модель для описания антагонизма пробиотика в отношении тест-штамма в присутствии пребиотика. Синбиотический фактор – количественный критерий сравнения синбиотиков и его применение.
2. Количественная оценка влияния различных факторов на эффективность синбиотических композиций на основе бифидобактерий и фруктанов растительного сырья.
3. Расширенная модель для описания роста тест-штамма при ингибировании метаболитами пробиотика в условиях одностадийной непрерывной модели, имитирующей проксимальный отдел толстого кишечника.
4. Результаты со-культивирования пробиотика и тест-штамма в непрерывной трёхстадийной модели кишечника в присутствии пребиотика и фекальных культур человека. Оценка влияния синбиотической композиции на контаминант и членов микробного сообщества человека. Оценка применимости разработанной математической модели в условиях, моделирующих кишечник.

Достоверность результатов обеспечивается большим объемом экспериментальных данных, для получения которых были использованы современные аналитические методы исследований, и их статистической оценкой. Результаты согласуются и не противоречат литературным данным.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на международных и всероссийских конференциях: на XVI и XVII Всероссийских конференциях молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием "ПИЩЕВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И BIOTEХНОЛОГИИ" (Казань, 2019, 2021); на II Школе молодых ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний» (Москва, 2019), на XXXIII Международной конференции молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2019» (Москва, 2019), на 18th, 19th, 20th и 21th International Multidisciplinary Scientific GeoConference (Албена, Болгария, 2018, 2019, 2020 и 2021), 33rd European Federation of Food Science and Technology (EFFoST) International Conference (Роттердам, Нидерланды, 2019).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, систематизации и интерпретации результатов, формулировке выводов, подготовке и оформлении материалов исследований для публикаций, а также их представлении на международных и российских конференциях.

Соответствие паспорту научной специальности. Работа соответствует паспорту научной специальности ВАК 1.5.6 - Биотехнология по п. 3 (в части: создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения), п.8 (в части: разработка научно-методических основ для применения стандартных биосистем на молекулярном, клеточном, тканевом и организменных уровнях в научных исследованиях, контроле качества и оценки безопасности использования пищевых биопрепаратов).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 22 работы, в том числе 1 публикация в журнале, рекомендованном к изданию ВАК, 10 публикаций в журналах, индексируемых международной системой SCOPUS и Web of Science, и получен 1 патент и 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 273 страницах печатного текста, состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы и приложений. Работа содержит 22 таблицы, 56 рисунков и фотографий, 10 приложений. Список использованной литературы включает 320 работ, в том числе 45 отечественных и 275 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении изложены актуальность работы, цель и поставленные задачи, научная новизна и практическая значимость результатов исследования.

В первой главе приведен обзор современной научной литературы по теме исследования. Представлены основные сведения о микробиоте толстого кишечника человека, ее свойствах, структуре, особенностях, взаимодействиях между ее членами и воздействие на макроорганизм. Приведена информация о про-, пре- и синбиотиках, включая экспериментальное подтверждение их положительного действия на микробиоту и организм человека. Рассмотрены основные *in vitro* методы, применяемые для их исследования, в том числе методы оценки эффективности пре- и синбиотиков и *in vitro* модели для исследования кишечного сообщества. В завершении главы сделан вывод о необходимости количественного критерия оценки эффективности пребиотиков и синбиотических композиций направленного действия для борьбы с кишечными патогенами и контаминантами пищи.

Во второй главе описаны микробные объекты исследования, коммерческие пребиотики и растительное сырье для их получения, метод выделения и очистки фруктанов инулинового типа, способы культивирования, микробиологические,

биохимические, физико-химические и математические методы анализа.

В третьей главе представлены основные результаты работы и их обсуждение. Для исследования антагонизма использовали промежуточный вариант между фекальными и моно-культурами: бинарную смешанную культуру, включающую один пробиотик и один тест-штамм в среде с пребиотиком – олигофруктозой (ОФ) (Рис. 1) или глюкозой. Для сравнения кинетики роста тест-штамм выращивали в моно-культуре. Начальную численность тест-штамма варьировали, а пробиотик инокулировали в равных количествах.

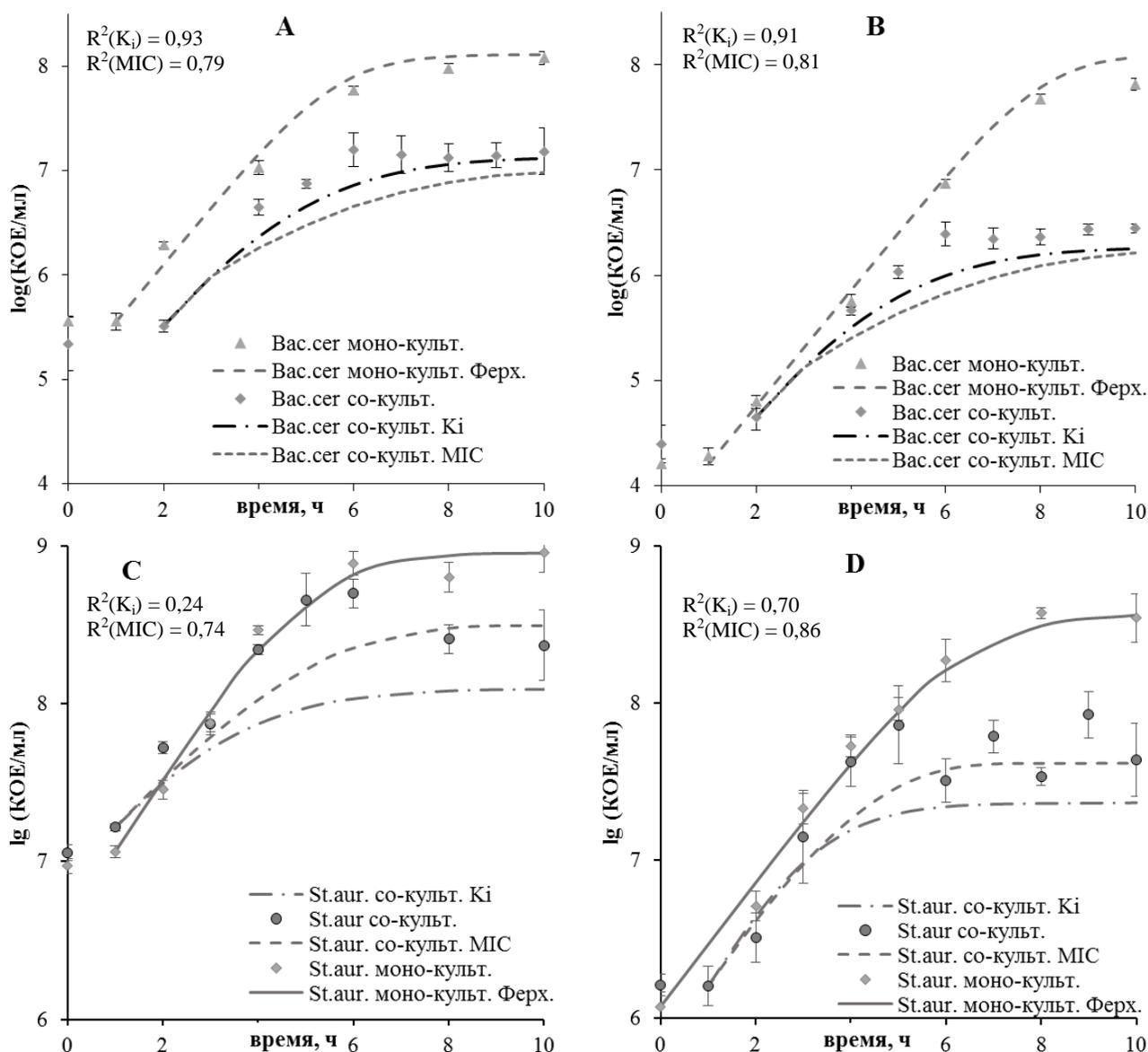


Рис. 1. Кривые роста тест-штаммов (экспериментальные данные (точки) и полученные с использованием моделей (линии)) в чистой (модель Ферхюльста) и в смешанной культуре в среде ОФ. А, В – начальная численность *B. cereus* 5,5 и 4,5 log (КОЕ/мл), соответственно; С, D – начальная численность *S. aureus* 7,0 и 6,0 log (КОЕ/мл), соответственно.

В смешанной культуре *Bifidobacterium adolescentis* и *B. cereus* (рис.1 А, В) рост бацилл прекращался после 6 часов, а конечная численность бацилл была на 1,5 - 2 lg(КОЕ/мл) ниже, чем в моно-культуре. При совместном культивировании увеличивается удельная скорость роста пробиотика и выход ингибирующих

метаболитов по сравнению с чистой культурой. В экспериментах с тест-штаммом *S. aureus* и пробиотиком *B. bifidum* (Рис. 1 С, D) различия в конечной численности тест-штамма в моно- и смешанной культуре выражены слабее. Экономические коэффициенты образования молочной и уксусной кислот при росте с пребиотиком были выше, чем в среде с глюкозой. Падение численности стафилококка в со-культуре на финальном участке кривой роста, видимо, связано с бактериолитическим действием кислот при высоких концентрациях (Charlier, 2009). При большем начальном количестве тест-штамм достигает большей конечной численности, близкой к моно-культуре, к 5-6 часам совместного культивирования, а при меньшем – гибель клеток начинается до достижения данного значения. Следовательно, эффективность действия синбиотической композиции сильно зависит от начальной численности патогена.

Для математического описания роста тест-штамма в условиях подавления пробиотиком были предложены модели, описывающие влияние концентраций кислот, продуцируемых пробиотиком, через константу ингибирования K_i (уравнение 1) или минимальные ингибирующие концентрации МИС (уравнение 2):

$$\frac{dX_{Npr}}{dt} = \mu_{NPr_{opt}} \cdot \frac{K_{iL}}{L + K_{iL}} \cdot \frac{K_{iA}}{A + K_{iA}} = \mu_{NPr_{opt}} SF_{K_i} \quad (1)$$

$$\frac{dX_{Npr}}{dt} = \mu_{NPr_{opt}} \cdot \frac{pH - pH_{min}}{pH_{opt} - pH_{min}} \cdot \left[1 - \left(\frac{[L]}{MIC_L} \right)^\alpha \right] \cdot \left[1 - \left(\frac{[A]}{MIC_A} \right)^\beta \right] = \mu_{NPr_{opt}} SF_{MIC} \quad (2)$$

где $\mu_{NPr_{opt}}$ – удельная скорость роста тест-штамма в оптимальных условиях, ч⁻¹; L, A – концентрации молочной и уксусной кислот соответственно, мг/мл; K_{iL} , K_{iA} – их константы ингибирования, г/л; [L], [A] – концентрации недиссоциированных молочной и уксусной кислот соответственно, мг/мл; МИС – их минимальные ингибирующие концентрации, мг/мл; pH_{min} – pH, при котором скорость роста минимальна; pH_{opt} – pH, при котором удельная скорость роста максимальна; α , β – константы; SF – синбиотический фактор.

Параметры модели определили для чистых культур выбранных тест-штаммов при добавлении соответствующих кислот в различных концентрациях (табл. 1).

Таблица 1 – Параметры моделей (1) и (2) для используемых тест-штаммов.

Тест-штамм	μ_{opt} , ч ⁻¹	Кислота	K_i - модель		МИС - модель				
			K_i , мг/мл	R ²	pH _{opt}	pH _{min}	МИС, мг/мл	α , β	R ²
<i>Bac. cereus</i> ATCC 9634	0,83	Молочная	0,27	0,95	7,0	4,9	3,48	0,25	0,91
		Уксусная	0,24	0,98			3,20	0,40	0,94
<i>St. aureus</i> ATCC 43300	0,98	Молочная	0,37	0,93	7,15	5,05	2,8	0,66	0,94
		Уксусная	0,14	0,98			2,0	0,55	0,89
<i>Sal. enterica</i> ВКПМ В-5300	1,15	Молочная	0,61	0,73	7,0	5,0	2,25	1,70	0,86
		Уксусная	0,29	0,83			1,77	0,9	0,91

Модели (1) и (2) были применены для описания роста *B. cereus* или *S. aureus* совместно с бифидобактериями (рис. 1) в среде с пребиотиком или глюкозой. Для бацилл K_1 -модель описывала экспериментальные данные точнее ($R^2 \geq 0,91$), чем МІС-модель. Наибольшие расхождения с экспериментом для обеих моделей наблюдали на 4-6 ч культивирования, в то время как прогноз конечных численностей был точнее. Хотя модель МІС (2) подразумевает возможность описания падения численности (отрицательное значение множителя), в случае стафилококка наблюдали расхождение экспериментальных и расчетных данных на конечном участке кривой роста. Рассчитанные значения количества тест-штамма не достигали максимальных, полученных экспериментально на 4-6 час роста. Однако, полученные значения R^2 МІС-модели для всех вариантов со-культуры с *S. aureus* были выше 0,74, что подразумевает высокую точность прогноза.

В заданный момент времени множители при $\mu_{NPr_{opt}}$ в уравнениях (1) и (2) становятся константой, показывающей, во сколько раз изменится удельная скорость роста тест-штамма в результате ингибирования метаболитами пробиотика. Поскольку в момент остановки роста пробиотика данный эффект будет наибольшим, эта константа – синбиотический фактор (SF), предложена как количественный критерий оценки эффективности синбиотических композиций. Для сравнения нескольких экспериментов может быть применен относительный синбиотический фактор (SF_{rel}) – SF выбранного пребиотика, отнесенный к SF стандартного субстрата (например, глюкозы). Учитывая биологический смысл критерия, эффективность синбиотической композиции тем выше, чем ниже значения SF, тогда как в случае SF_{rel} зависимость прямопропорциональная.

На основании этих результатов проверено антагонистическое действие в отношении тест-штаммов нескольких пробиотиков в синбиотических композициях с коммерческими пребиотиками (рис. 2) с использованием предложенного синбиотического фактора. При сопоставлении данных по изменению численности тест-штамма со значениями относительного SF, среднее значение корреляции для всех комбинаций составило -0,59. Наиболее сильная обратная корреляция была в случае со-культуры *B. bifidum* и *B. cereus* (-0,78). В среде с лактулозой изменение численности бацилл минимально, а относительный SF максимальный. Это показывает, что композиция *B. bifidum* с лактулозой наиболее эффективна для подавления роста *B. cereus*. Наиболее эффективные синбиотические композиции для подавления роста *S. aureus* – *B. bifidum* с лактулозой и ОФ, а *B. adolescentis* с ОФ; а *S. enterica* – *B. bifidum* с инулином или лактулозой.

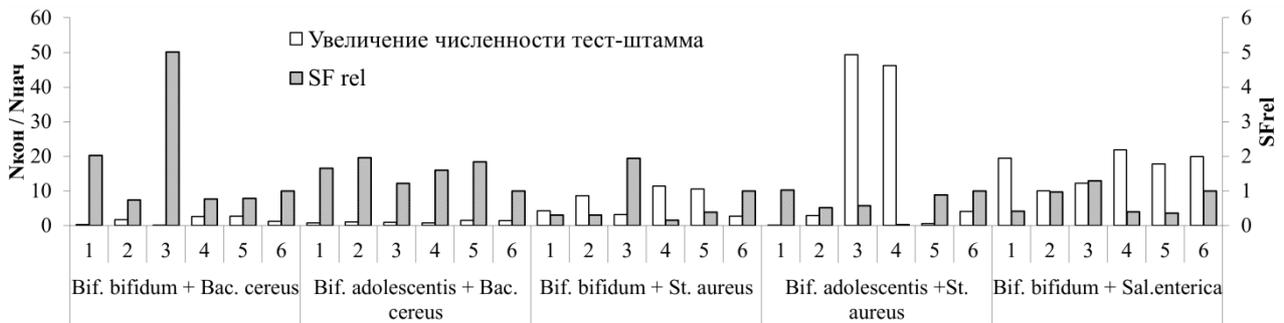


Рис. 2. Увеличение численности тест-штаммов при совместном росте с пробиотиком в среде с пребиотиком (1 – ОФ, 2 – инулин, 3 – лактулоза, 4 – палатиноза, 5 – раффиноза) или глюкозой (6) и относительные синбиотические факторы (по K_i -модели), рассчитанные для каждой комбинации пробиотик/пребиотик/тест-штамм.

На основании литературных данных и полученных результатов можно предположить, что исход антагонистического воздействия синбиотика на рост тест-штамма будет зависеть от соотношения численностей пробиотика и тест-штамма и природы пребиотического субстрата. Для установления количественных взаимосвязей между указанными факторами и эффективностью синбиотических композиций были проведены эксперименты по схеме ротatableльного центрального композиционного плана (РЦКП). Независимыми переменными были концентрация осадителя (x_1) (влияющая на степень полимеризации выделенных фруктанов), начальные численности бифидобактерий (x_2) и тест-штамма (x_3). В качестве функции отклика, определяющей антагонистическую активность синбиотика, выбрали синбиотический фактор (Y). Антагонизм в отношении *B. cereus* и *S. enterica* исследовали на примере синбиотических композиций *B. bifidum* с фруктанами растительного происхождения, полученными водной экстракцией из корней лопуха или клубней топинамбура по известной методике (Karetkin et al., 2015; Khrantsov et al., 2019), с некоторыми модификациями. Для разделения выделенных фруктанов на фракции с различной степенью полимеризации проводили осаждение с варьированием концентраций этанола (20%; 32,2%; 50%; 67,8%; 80%) при температуре 4 °С в течение 4 суток. Осажденные фракции отделяли центрифугированием и высушивали на лиофильной сушке. Спектры фракций, полученных с помощью ^{13}C -ЯМР, были характерными для фруктанов инулинового типа.

Поверхность отклика, полученная при исследовании антагонизма бифидобактерий в присутствии фруктанов корней лопуха в отношении бацилл представлена на рис. 3А, а сальмонелл – рис. 3В, С, D. В случае бацилл, SF имеет положительную линейную зависимость от концентрации осадителя (x_1), то есть наибольшей антагонистической активностью обладают композиции, включающие фруктаны, осажденные минимальной концентрацией этанола. Зависимость SF от начальной численности пробиотика (x_2) имеет параболический характер с минимумом при значении, соответствующим 7,69 lg(КОЕ/мл), при котором действие бифидобактерий будет наибольшим. Все коэффициенты уравнения при x_3 оказались незначимы.

D

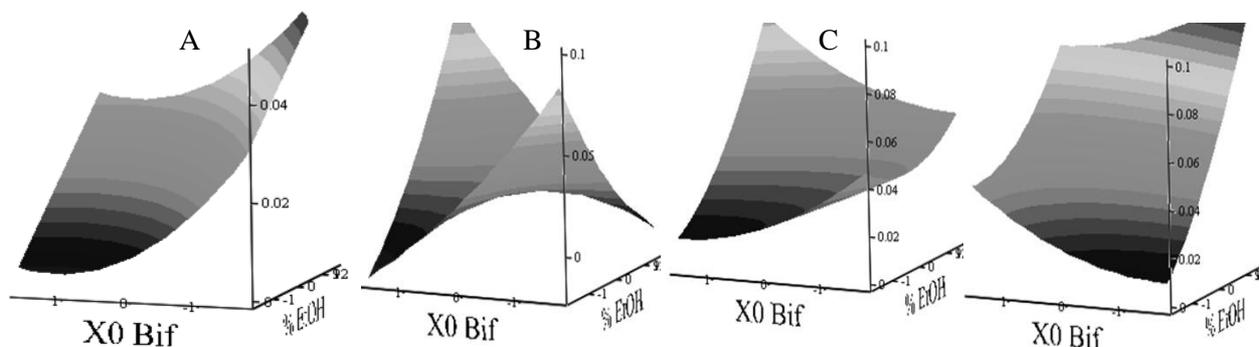


Рис. 3. Поверхности отклика SF синбиотической композиции *B. bifidum* и фруктанов лопуха против А – *B. cereus*, В, С, D – *S. enterica* при фиксированных значениях x_3 , равных -1,63; 0 и +1,63 соответственно.

В функции отклика для сальмонелл значимыми оказались коэффициенты при всех факторах, поэтому поверхности отклика построены при фиксированных значениях x_3 . При начальной численности сальмонелл 6,9 lg(КОЕ/мл) происходит изменение формы поверхности отклика, то есть характера влияния факторов на эффективность синбиотика. Таким образом, исследование функции отклика позволило установить критическое значение численности сальмонелл, выше которого для подавления патогена требуется максимальная доза бифидобактерий.

При совместном культивировании бацилл и бифидобактерий в среде с фруктанами топинамбура (рис. 4А) SF не зависел от начальной численности тест-штамма (x_3), как и в случае фруктанов лопуха. Поверхность отклика имеет вид параболоида с минимумом ($x_1 = -1,41$; $x_2 = 0,81$), который соответствует наибольшей эффективности композиции (фруктаны топинамбура, осажденные 24,9 %-ным этанолом и бифидобактерии в количестве 7,49 lg(КОЕ/мл)). В случае сальмонелл (рис. 4В, С, D) зависимость SF от их начального количества была линейной, а от остальных факторов – параболической. Наиболее эффективной оказалась комбинация бифидобактерий при начальном титре 7,62 lg(КОЕ/мл) и фруктанов топинамбура, осажденными 50 %-ным этанолом.

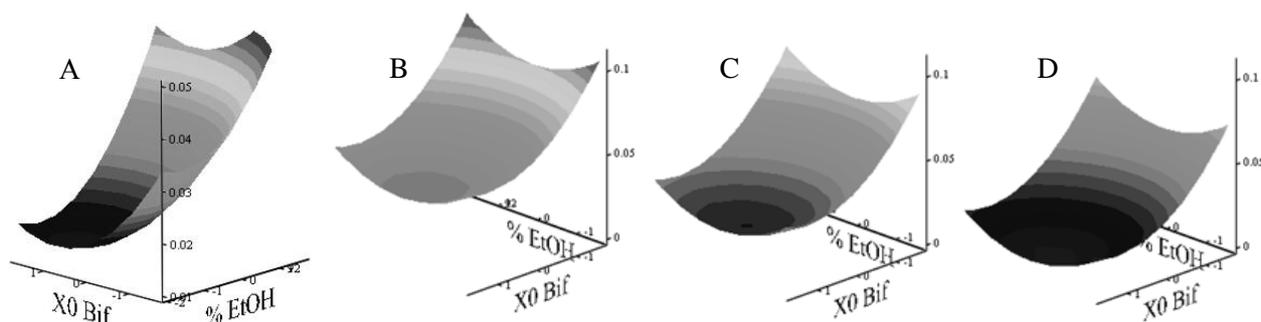


Рис. 4. Поверхности отклика SF синбиотической композиции *B. bifidum* и фруктанов топинамбура против А – *B. cereus*, В, С, D – *S. enterica*, при фиксированных значениях x_3 , равных -1,63; 0 и +1,63 соответственно.

Таким образом, повышение эффективности подавления роста тест-штамма синбиотиком происходит с увеличением средней степени полимеризации фруктанов (снижением концентрации этанола) и начального количества пробиотика.

Предложенный подход представляется достаточно информативным для обоснования состава новых синбиотиков.

Для проверки предложенной модели в условиях, имитирующих толстый кишечник, исследовали рост *B. adolescentis* и *B. cereus* совместно или отдельно при непрерывном культивировании в среде с различными концентрациями ОФ с применением одностадийной функциональной модели. Система состояла из одного реактора, имитирующего условия нисходящего отдела толстого кишечника человека (атмосфера – азот; рН 6,8; скорость разбавления среды $0,04 \text{ ч}^{-1}$; $37 \text{ }^\circ\text{C}$). В со-культуре, полученной контаминацией стационарной монокультуры бифидобактерий бациллами, при концентрациях пребиотика от 5 до 15 г/л отмечали более низкую численность тест-штамма в сравнении с чистой культурой (рис. 5). Концентрация ОФ влияла на ключевые параметры роста тест-штамма: время наступления динамического равновесия, скорость роста и длительность лаг-фазы за счет стимулирования синтеза кислот-ингибиторов пробиотиком.

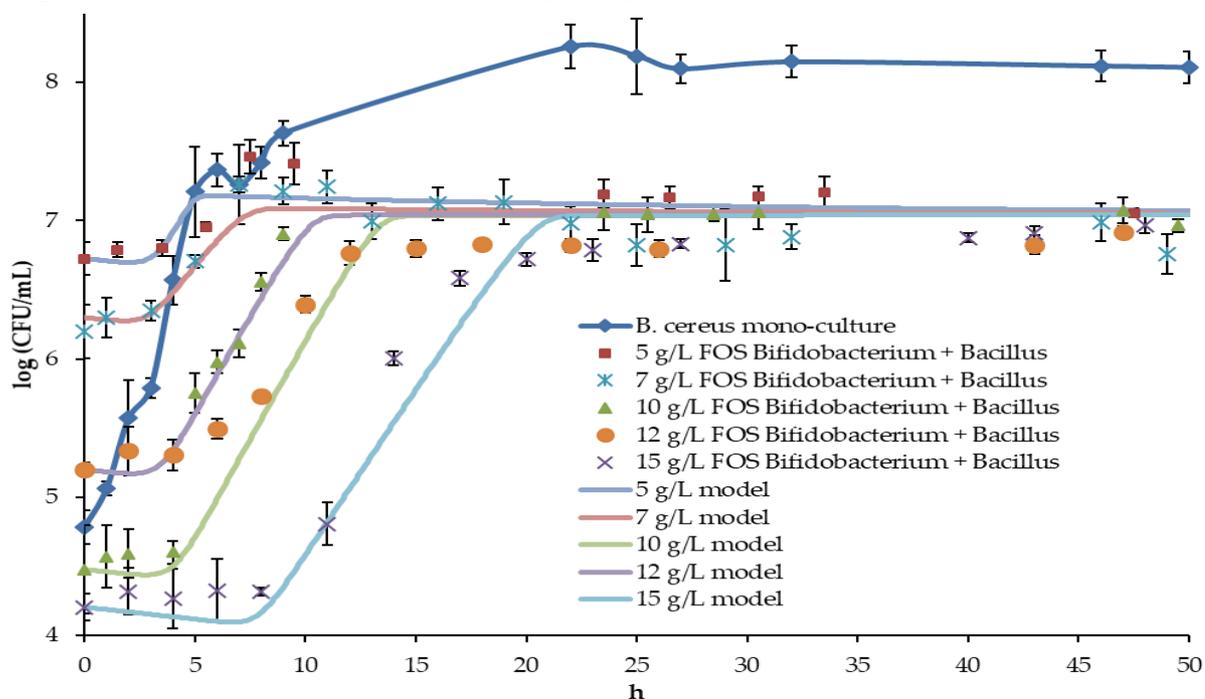


Рис. 5. Экспериментально определенная численность клеток *B. cereus* в монокультуре (точки и линия) и со-культуре (точки) после инокуляции к бифидобактериям, а также рассчитанные с помощью модели для со-культур кривые (линии).

Основываясь на установленных особенностях роста бацилл, была предложена система уравнений (3) для математического описания динамики численности с учетом предложенной ранее K_i -модели. Подавление роста тест-штамма зависит от концентраций метаболитов пробиотика и лимитирующих катаболизм аминокислот. Для расчета коэффициентов на основе экспериментальных данных применяли многопараметрический и регрессионный анализ, что позволило получить прогноз для длительности лаг-фазы и удельной скорости роста.

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu_{Bc} = \mu_{Bc \max} \cdot \alpha(t) \cdot \frac{K_{iBcL}}{K_{iBcL} + LA} \cdot \frac{K_{iBcA}}{K_{iBcA} + AA} \cdot \frac{AmA}{K_{S Bc Am} + AmA} \\ \alpha(t) = \frac{A \cdot e^{B \cdot (t-t_\lambda)}}{1 + A[e^{B \cdot (t-t_\lambda)} - 1]} \\ t_\lambda = C_L \cdot LA + C_A \cdot AA + C_{LL} \cdot LA^2 + C_{AA} \cdot AA^2 + C_{AL} \cdot LA \cdot AA \end{array} \right. \quad (3)$$

где $\mu_{Bc \max}$ – максимальная скорость роста бацилл, ч⁻¹; $\alpha(t)$ – коэффициент, учитывающий лаг-фазу; K_{iBcL} – константа ингибирования бацилл молочной кислотой, г/л; K_{iBcA} – константа ингибирования бацилл уксусной кислотой, г/л; $K_{S Bc Am}$ – константа Моно для лимитирующей рост бацилл аминокислоты, г/л; AmA – концентрация лимитирующей рост бацилл аминокислоты, г/л; A и B – эмпирические константы, определяющие крутизну сигмоиды; t_λ – длительность лаг-фазы, ч; C_k – коэффициенты регрессионного уравнения, для расчета которых применили метод наименьших квадратов и данные эксперимента.

Средние значения относительных ошибок между экспериментальными и рассчитанными значениями численностей бацилл колеблются от 0,74 до 2,78 %, что подразумевает высокую прогностическую ценность модели. Были спрогнозированы как длительность фазы задержки роста, так и скорость на стадии активного роста.

В заключение исследования проводили в трёхстадийной непрерывной модели кишечника. Функциональная модель представляла собой систему из трех последовательно соединённых реакторов, различающихся рН и кратностью замены среды (таблица 2), что соответствует трем отделам толстого кишечника. Контроль численности микроорганизмов проводили методом qПЦР, концентраций кислот – ВЭЖХ.

Таблица 2 – Характеристики реакторов, входящих в трёхстадийную непрерывную функциональную модель кишечника.

Обозначение	Имитируемый отдел	Объем, л	рН	Коэффициент разбавления, ч ⁻¹	Время полной замены среды, ч
R1	восходящий	1,65	5,5	0,06	16,5
R2	поперечный	2,40	6,2	0,04	24
R3	дистальный	2,40	6,8	0,04	24

В базальную среду (Macfarlan, 1998) дополнительно вносили 8 г/л ОФ (соответствует суточному потреблению примерно 20 г). Каждый ферментер инокулировали фекальными культурами из расчета 2 % масс. от объема питательной среды. Через 12 часов от засева начинали обмен среды. О наступлении стационарного состояния судили по концентрации кислот, которая должна была оставаться постоянной в течении более чем трех дней. Далее в основном эксперименте (I) начиная с 14 суток в течение 5 дней вносили в R1 инокулят *B. adolescentis* в дозе 9 lg(КОЕ) (соответствует суточной норме потребления пробиотика). На 22 сутки контаминировали R1 трехсуточной культурой *B. cereus*. Далее вели эксперимент до 28 суток. После первого добавления в систему бифидобактерий происходило скачкообразное увеличение их численности во всех реакторах, которая далее

практически не изменялась. Также изменялся профиль концентраций кислот. После внесения в систему бацилл происходило кратковременное увеличение их численности, за которым следовало элиминирование из системы, а длительность пребывания была связана прежде всего с рН (наибольшую наблюдали в R3).

В контрольном эксперименте (II), после установления равновесия (12,6 сут. от начала культивирования), контаминировали R1 спорами *B. cereus*. Далее вели эксперимент до 20 суток. Контаминация системы бациллами в данном случае также приводила к непродолжительному скачкообразному увеличению общей численности микроорганизмов и численности бифидобактерий. Характер динамики численности бацилл был схож для обоих экспериментов: происходило ее кратковременное увеличение, за которым следовало элиминирование из системы, а длительность пребывания была связана прежде всего с рН. В R3 при нейтральных значениях рН бациллы детектировались в период до 100 часов, в то время как в R1 они не были обнаружены уже спустя сутки. Однако, следует отметить, что в первом эксперименте рост численности бацилл после инокуляции был слабым, тогда как без предварительного внесения бифидобактерий численность бацилл в первые сутки повысилась примерно на 0,5 lg(клеток/мл).

Предложенная модель ингибирования роста кислотами была проверена на полученных данных (рис. 6). Как для K_i - модели, так и для MIC - модели ошибки при описании событий в R2 были выше, чем в R3. Относительные ошибки для K_i - модели в R3 были наименьшими (не более 11 %). Таким образом, данная модель применима для описания динамики численности бацилл в условиях модели толстого кишечника. В дальнейшем, определение констант ингибирования в условиях, соответствующих каждому из реакторов, позволит повысить точность прогноза для остальных реакторов.

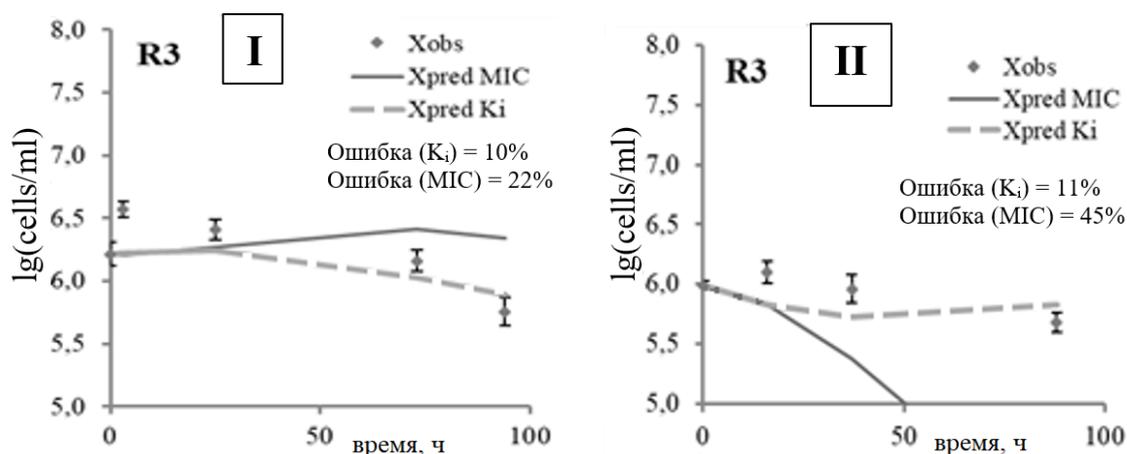


Рис. 6. Экспериментальные и рассчитанные значения динамики численности бацилл в системе трехстадийного непрерывного культивирования с предварительным внесением бифидобактерий (I) или без внесения (II) в R3 (рН=6,8). Для расчетов использованы K_i -модель и MIC-модель.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-79-20365).

ВЫВОДЫ

1. Исследования ингибирования роста тест-штаммов *Bac. cereus*, *St. aureus* и *Sal. enterica* органическими кислотами показали, что сальмонеллы являются наименее, а бациллы – наиболее устойчивыми как к молочной (МИС 2,25 и 3,48 г/л соответственно), так и к уксусной (МИС 1,77 и 3,20 г/л соответственно) кислоте.
2. Установлены различия в росте тест-штаммов в моно-культуре и со-культуре с бифидобактериями, которые объясняются ингибированием метаболитами пробиотика. Применение различных моделей для описания динамики численности тест-штамма в со-культуре показало, что Ki-модель точнее описывала рост *Bac. cereus* ($R^2 \geq 0,91$), а МИС-модель – *St. aureus* ($R^2 \geq 0,74$).
3. Разработан метод оценки эффективности синбиотиков *in vitro*, базирующийся на изучении антагонистического действия пробиотиков на тест-штаммы в со-культуре. Предложен количественный критерий эффективности синбиотиков, основанный на модели ингибирования роста тест-штамма.
4. Сравнение синбиотических композиций коммерческих пребиотиков и бифидобактерий предложенным методом показало, что наибольшей эффективностью характеризуются *Bif. bifidum* (SF = 0,059) с ОФ и лактулозой (SF = 0,024) и *Bif. adolescentis* с ОФ (SF = 0,002). При этом, корреляция между значениями относительного синбиотического фактора и увеличения численности тест-штамма была высокой и составила -0,59.
5. Исследование композиций *Bif. bifidum* и различных фракций фруктанов из корней лопуха и клубней топинамбура разработанным методом с применением центрального композиционного плана показало, что наибольшее подавление патогена (SF не более 0,01) проявляется в случае фруктанов с большей степенью полимеризации, осажденными 20 % этанолом, благодаря чему сконструирован новый синбиотик направленного действия.
6. Установлено, что концентрация кислот, образуемых *Bif. adolescentis* в моно-культуре в системе одностадийной непрерывной ферментации (в условиях, приближенных к кишечнику человека) прямо пропорциональна концентрации олигофруктозы в поступающей питательной среде, а также, что концентрация олигофруктозы от 5 до 15 г/л не влияет на стационарную численность пробиотика.
7. Показано, что концентрация кислот, образуемых бифидобактериями, в системе одностадийной непрерывной ферментации, влияет на длительность фазы задержки роста (до 8 часов), и удельную скорость роста *Bac. cereus* в со-культуре. Расширенная математическая модель динамики численности бацилл в со-культуре характеризуется относительной ошибкой не более 2,78 % и позволяет описать все стадии роста тест-штамма.

8. Исследования взаимодействия тест-штамма, пробиотика и фекального микробного сообщества в трехстадийной непрерывной функциональной модели кишечника показали на фоне поступления пребиотика, что pH влияет на рост и продолжительность пребывания *Bac. cereus* в каждом из реакторов. При pH 5,5 рост отсутствовал, при pH 6,2 вымывание происходило в течение 48-74 ч, а при pH 6,8 – в течение 95-98 ч. Для реактора с pH 6,8 относительная ошибка предложенной математической Ki-модели не превышала 11 %.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, индексируемых в международных базах данных

1. Fundamentals and Applications of Artificial Neural Network Modelling of Continuous Bifidobacteria Monoculture at a Low Flow Rate/ S. Dudarov, E. Guseva, **S. Evdokimova**, B. Karetkin et al.// Data. – 2022. – Т. 7. – №. 5. – С. 58.
2. A Study and Modeling of Bifidobacterium and Bacillus Coculture Continuous Fermentation under Distal Intestine Simulated Conditions/ **Evdokimova S.A.**, Karetkin B.A. et al. // Microorganisms. - 2022. - Т. 10. - №5. – С. 929.
3. An assessment of the influence of various factors to antagonistic activity of the synbiotics using the response surface methodology/ **Evdokimova S.A.**, Karetkin B.A. et al.// Foods and Raw Materials. – 2022.-Т.10. - №2. – P. 365-376.
4. A Study on the Synbiotic Composition of Bifidobacterium bifidum and Fructans from Arctium lappa Roots and Helianthus tuberosus Tubers against Staphylococcus aureus/ **Evdokimova S.A.**, Karetkin B.A. et al.//Microorganisms. – 2021. – Т. 9. – №. 5. – С. 930.
5. A quantitative model of *Bacillus cereus* ATCC 9634 growth inhibition by bifidobacteria for synbiotic effect evaluation / B.A. Karetkin, E.V. Guseva, **S.A. Evdokimova** et al. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. — 2019. — Vol. 35. — P. 89.
6. Study and modeling of pathogens growth inhibition in fecal culture / **Evdokimova S.A.**, Karetkin B.A. et al. // Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology. — 2020. — Vol. 127, no. S1. — P. 3–4.
7. A study on the honey compounds in synbiotic composition for microbial food contaminants growth inhibition/**Evdokimova S.A.**, Karetkin B.A. et al. //International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM. – 2020. – Vol. 20. – №. 6.1. – P. 159-164.
8. New approach for synbiotic composition development based on the model of opportunistic bacteria growth inhibition in mixed culture / B.A. Karetkin, V.I. Panfilov, **Evdokimova S.A.** et al. // 19th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2019. — Vol. 19 of Advances in Biotechnology. — Alexander Malinov Sofia, Bulgaria, 2019. — P. 805–812.
9. The study of pH adjustment effect to *Bacillus cereus* ATCC 11778 growth inhibited by bifidobacterium metabolites for prebiotic activity assessment / B.A. Karetkin, E.V. Guseva, **S.A. Evdokimova** et al.// 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018. — Vol. 18 of Advances in biotechnology. — Albena, Bulgaria, 2018. — P.

653–660.

10. The study and modeling of some gut microbiota bacteria growth in fructooligosaccharides contained medium / B.A. Karetkin, E.V. Guseva, **S.A. Evdokimova** et al. // 17th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2017. — Vol. 17 of Advances in Biotechnology. — Albena, Bulgaria, 2017. — P. 397–404

Публикации в рецензируемых изданиях из перечня ВАК:

11. Исследование взаимоотношений индигенных и транзиторных микроорганизмов в смешанной культуре на среде с пребиотиком / **С.А. Евдокимова**, Б.А. Кареткин и др. // Вестник Казанского технологического университета. — 2016. — Т. 19. — С. 165–169.

Публикации в других изданиях (тезисы докладов):

12. Исследование закономерностей роста и взаимодействия *Bifidobacterium adolescentis* и *Bacillus cereus* в условиях непрерывного культивирования на пребиотическом и непробиотическом субстратах / В.С. Нохаева, **С.А. Евдокимова** и др. // Успехи в химии и химической технологии. — Т. 33 из 5. — РХТУ им. Д. И. Менделеева Москва, 2019. — С. 9–11.

13. Выбор синбиотических композиций для подавления роста некоторых микробных патогенов/**С.А. Евдокимова** и др.//Сборник материалов II школы молодых ученых основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний. — г. Москва, 2019. - С. 23-25.

14. Обоснование повышения эффективности синбиотических композиций на основе *Bifidobacterium bifidum* 1 в исследованиях *in vitro* / **С.А. Евдокимова** и др.// В сборнике: Пищевые технологии и биотехнологии материалы XVI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященной 150-летию Периодической таблицы химических элементов: в 3 частях. 2019. — С. 272-276.

15. Кинетическая модель роста смешанной культуры бифидобактерий и бацилл для оценки пребиотической активности/**С.А. Евдокимова** и др. // Биотехнология: состояние и перспективы развития. Материалы международного форума. — ООО Русские Экспо Дни Групп Москва, 2018. — С. 626–628.

16. Влияние пребиотиков на рост пробиотических микроорганизмов в смешанной культуре/ **С.А. Евдокимова** и др.// Сборник материалов XV международной конференции молодых ученых Пищевые технологии и биотехнологии. — Т. 19. — Издательство Казанского национального исследовательского технологического университета Казань, 2016. — С. 274–276.

17. A Study and Neural Network Model of Bifidobacteria and Bacilli Co-culture Dynamics in Continuous Fermentation for Colonic Microbial Community Behavior Prediction (Стендовый)/ **Evdokimova S.** et al.//World Microbe Forum, online, June 20–24, 2021.

18. Minimum inhibitory concentrations of organic acids against foodborne opportunistic microbial pathogens (Устный)/ **Evdokimova S.**, Karetkin B. et al.// 21th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2021, Albena, Болгария, 14-22 августа 2021

19. Исследование подавления роста патогенных микроорганизмов синбиотическими

композициями на основе бифидобактерий и веществ из меда/ **С.А. Евдокимова** и др. // В сборнике: Пищевые технологии и биотехнологии материалы XVII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященная Году науки и технологий в Российской Федерации. 2021. — С. 562-570.

20. Исследование синбиотической эффективности комбинации бифидобактерии и фруктанов, экстрагированных из корней лопуха и топинамбура/ В.С. Нохаева, **С.А. Евдокимова** и др. // В сборнике: Пищевые технологии и биотехнологии материалы XVII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященная Году науки и технологий в Российской Федерации. 2021. — С. 591-598.

Авторские свидетельства или патенты:

21. Программно-алгоритмическое обеспечение для нейросетевого моделирования микробиологических процессов//Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021668003. Опубликовано: 09.11.2021. Бюл. № 11. Макляев И.В., Дударов С.П., Лемитюйнен Ю.А., Гусева Е.В., Кареткин Б.А., **Евдокимова С.А.**

22. Синбиотическая композиция для подавления микробных возбудителей кишечных инфекций и способ ее получения//Патент РФ № 2782196. Опубликовано: 24.10.2022. Бюл. № 30. **Евдокимова С.А.**, Кареткин Б.А. и др.