

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования "Российский химико-технологический университет
имени Д.И. Менделеева"

На правах рукописи

Евдокимова Светлана Александровна

**Метод конструирования синбиотических композиций
направленного действия для подавления роста патогенов**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель

к. т. н. Кареткин Б.А.

МОСКВА – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ	7
ВВЕДЕНИЕ	10
Глава 1. Обзор литературы	18
1.1 Микробиота кишечника человека	18
1.1.1 Состав микробиоты и, влияющие на него факторы	18
1.1.2 Взаимодействия между различными представителями микробиоты кишечника. Метаболизм микробиоты	23
1.1.3 Роль микробиоты кишечника в жизни человека	33
1.1.4 Нарушения качественного и количественного состава микробиоты	38
1.2 Модуляция микробиоты кишечника	42
1.2.1 Пробиотики	43
1.2.1.1 Бифидобактерии	50
1.2.1.2 Лактобактерии	56
1.2.2 Пребиотики	59
1.2.2.1 Некоторые пребиотические субстраты	64
1.2.2.2 Функциональные свойства экстрактов растений	69
1.2.2.3 Критерии оценки пребиотической активности веществ	74
1.2.3 Синбиотики	79
1.2.3.1 Принципы комбинирования пробиотиков и пребиотиков для получения синбиотических композиций	82
1.3 Методы исследования воздействия пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков на микробное сообщество кишечника	85
1.3.1 Периодические и непрерывные функциональные модели микробиоты	86

Глава 2. Материалы и методы исследования	92
2.1 Микробные объекты исследования	92
2.2 Контрольные и тестовые углеводные субстраты	92
2.3 Питательные среды и методы работы с культурами	93
2.3.1 Активация лиофилизированных культур	93
2.3.2 Количественный учет микроорганизмов	93
2.3.3 Среды для экспериментального культивирования	94
2.4 Выделение и очистка углеводных фракций с пребиотическим потенциалом из растительного сырья	95
2.4.1 Водная экстракция сырья	96
2.4.2 Отделение жома и очистка экстракта от высокомолекулярных и окрашенных примесей	96
2.4.3 Концентрирование очищенного экстракта на роторно-пленочном испарителе	98
2.4.4 Фракционирование и высушивание выделенных фруктанов	98
2.5 Биохимические, микробиологические и физико-химические методы анализа	100
2.5.1 Анализ структуры полученных фруктанов методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР)	100
2.5.2. Определение содержания углеводов по методу Бертрана и модифицированному методу Бертрана-Шорля	100
2.5.3 Определение содержания органических кислот и моносахаров с помощью высокоэффективной жидкослойной хроматографии (ВЭЖХ)	101
2.5.5 Качественное и количественное определение углеводов с помощью капиллярного электрофореза (КЭФ)	101

2.5.5	Качественное и количественное определение микроорганизмов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)	102
2.5.6	Определение β -фруктофуранозидазной активности клеток микроорганизмов	105
2.6	Экспериментальное культивирование микроорганизмов	105
2.6.1	Периодическое культивирование в CO ₂ инкубаторе	105
2.6.2	Периодическое культивирование в бутылках в атмосфере азота	106
2.6.3	Однстадийное непрерывное культивирование в ферментере в режиме протока	107
2.6.4	Непрерывное культивирование фекальной культуры в режиме протока по схеме three-stage continuous culture system (TSC)	109
2.7	Ротатабельный центральный композиционный план	113
2.8	Статистическая обработка экспериментальных данных	115
2.9	Корреляционный анализ	116
2.10	Регрессионный анализ	117
2.11	Многопараметрический анализ (метод пчелиного роя)	118
2.12	Применение математических моделей для расчета численностей тест-штаммов и пробиотиков при совместном культивировании в различных условиях	119
2.13	Оценка точности прогноза математических моделей	120
Глава 3. Результаты и обсуждение		122
3.1.	Исследование антагонизма в со-культуре пробиотиков и тест-штаммов при периодической ферментации	122
3.2.	Математическая модель со-культуры пробиотика и тест-штамма и количественный критерий эффективности синбиотиков на ее основе	131
3.3.	Определение параметров модели для тест-штаммов	136

3.4. Применение математической модели для описания роста смешанных культур <i>Bif. adolescentis</i> и <i>Bac. cereus</i> , <i>Bif. bifidum</i> и <i>St.aureus</i> в средах с пребиотиком или глюкозой	140
3.5. Определение синбиотического фактора для нескольких комбинаций пробиотиков и коммерческих пребиотических субстратов для подавления роста различных тест-штаммов	145
3.6. Исследование синбиотической эффективности композиций бифидобактерий и фруктанов, выделенных из растительного сырья	148
3.6.1. Исследование фракций фруктанов корня лопуха и клубней топинамбура с помощью ¹³ C-ЯМР	149
3.6.2. Исследование синбиотической эффективности композиций <i>Bif. bifidum</i> и фруктанов, выделенных из корней лопуха и клубней топинамбура, для подавления <i>St. aureus</i>	153
3.6.3. Антагонизм синбиотических композиций <i>Bif. bifidum</i> и фруктанов корней лопуха в отношении <i>Bac. cereus</i> и анализ поверхностей отклика	160
3.6.4. Антагонизм синбиотических композиций <i>Bif. bifidum</i> и фруктанов корней лопуха в отношении <i>Sal. enterica</i> и анализ поверхностей отклика	164
3.6.5. Антагонизм синбиотических композиций <i>Bif. bifidum</i> и фруктанов клубней топинамбура в отношении <i>Bac. cereus</i> и анализ поверхностей отклика	170
3.6.6. Антагонизм синбиотических композиций <i>Bif. bifidum</i> и фруктанов клубней топинамбура в отношении <i>Sal. enterica</i> и анализ поверхностей отклика	172
3.7. Исследование моно- и со-культур <i>Bif. adolescentis</i> и <i>Bac. cereus</i> при непрерывном культивировании в одностадийной модели толстого кишечника	176

3.7.1. Исследование роста монокультуры <i>Bifidobacterium adolescentis</i> при непрерывном культивировании с варьированием концентрации пребиотика	177
3.7.2. Исследование роста со-культуры <i>Bifidobacterium adolescentis</i> и <i>Bacillus cereus</i> при непрерывном культивировании с варьированием концентрации олигофруктозы	188
3.7.3. Исследование роста моно- и со-культур <i>Bif. adolescentis</i> и <i>Bacillus cereus</i> при непрерывном культивировании на глюкозе	198
3.7.4. Математическое моделирование роста бифидобактерий в монокультуре и бацилл в со-культуре в условиях, моделирующих нисходящий отдел толстого кишечника человека	202
3.8. Исследование воздействия <i>Bac. cereus</i> на фекальную микробиоту в непрерывной трехстадийной функциональной модели кишечника в присутствии синбиотика или пребиотика	214
3.8.1 Исследование влияния на микробиоту <i>Bac. cereus</i> на фоне предварительного внесения в систему <i>Bif. adolescentis</i>	215
3.8.2 Исследование влияния на микробное сообщество контаминанта <i>Bac. cereus</i> без предварительного внесения пробиотика	220
3.8.3. Математическое моделирование роста <i>Bacillus cereus</i> при непрерывном культивировании в системе TSC на фоне и без него предварительного внесения пробиотика	227
ВЫВОДЫ	229
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	231
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	235
ПРИЛОЖЕНИЯ	264

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

Bac. – *Bacillus*

Bact. – *Bacteroides*

BFM – Bifidobacterium medium

Bif. – *Bifidobacterium*

C. – *Clostridium*

E. – *Escherichia*

En. – *Enterococcus*

FISH – Флуоресцентная *in situ* гибридизация

GPR – G-protein receptor

IgA – Иммуноглобулины А

IL – Интерлейкин

ISAPP – Международная научная ассоциация пробиотиков и пребиотиков

K_i – Константа ингибирования

L. – *Lactobacillus*

LB – Lysogeny broth

MIC – Минимальная ингибирующая концентрация

MPE – Мера пребиотического эффекта

MSA – Mannitol Salt Agar

PAS – Prebiotic activity score

PI – Пребиотический индекс

QS – Quorum sensing

qПЦР – Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Sal. – *Salmonella*

SF – Синбиотический фактор

St. – *Staphylococcus*

Th – Т-хелпер

TSC – Three-Stage Continuous culture system

БАВ – Биологически активные вещества

БАД – Биологически активные добавки
БГКП – Бактерии группы кишечной палочки
ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГАМК – Гамма-аминомасляная кислота
ГОС – Галактоолигосахариды
ГХ-МС – Газовая хроматография / масс-спектрометрия
ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ – Желудочно-кишечный тракт
ИМО – Изомальтоолигосахаридов
ИН – Инулин
КЛК – Конъюгированная линолевая кислота
КОЕ – Колониеобразующая единица
КОС – Ксилоолигосахариды
КПС – Ксилополисахариды
КЦЖК – Короткоцепочные жирные кислоты
КЭФ – Капиллярный электрофорез
Л – Лопух
ЛК – Лактулоза
ЛПС – Липополисахарид
МКБ - Молочнокислые бактерии
МНК – Метод наименьших квадратов
МОС – Маннанолигосахариды
МПЧ – Метод пчелиного роя
ОГМ – Олигосахариды грудного молока
ОП – Оптическая плотность
ОФ – Олигофруктоза
ПЛ – Палатиноза
ПНЖК – Полиненасыщенные жирные кислоты

рРНК – Рибосомные рибонуклеиновые кислоты
РФ – Раффиноза
СВ – Сухой вес
СРК – Синдром раздраженного кишечника
сСП – Средняя степень полимеризации
США – Соединенные Штаты Америки
ТП – Топинамбур
ТСХ – Тонкослойная хроматография
ТХУ – Трихлоруксусная кислота
УФУ – Ультрафильтрационная установка
ФАО – Продовольственная и сельскохозяйственная организация
Объединённых Наций
ФК – Фазовый контраст
ФОС – Фруктоолигосахариды
ЦНС – Центральная нервная система
ЭПС – Экзополисахарид
ЯК – Язвенный колит
ЯМР – Ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Сообщество микроорганизмов толстого кишечника человека – микробиота, мощный метаболический инструмент, способствующий поддержанию здоровья человека [1]. Метагеномные исследования выявили более трёх миллионов неповторяющихся микробных генов 1500 различных видов. Было обнаружено, что более 10% метаболитов в крови млекопитающих продуцируются микробиотой кишечника. Эти метаболиты способны оказывать системное воздействие на организм хозяина [2]. Наличие у членов микробиоты гидролитических ферментов, отсутствующих у человека, значительно расширяет круг метаболизируемых питательных веществ для организма.

Помимо ферментативной активности и положительного воздействия кишечных метаболитов на различные системы человеческого организма (нервную, иммунную и т.п.), микробиота также играет огромную роль в защите кишечника от микробных патогенов и контаминантов пищи [3]. Члены кишечного сообщества биопленкой покрывают эпителий кишечника, не допуская развитие и прикрепление контаминантов, занимая сайты адгезии [4]. Также они продуцируют вещества, обладающие бактериолитическим или бактериостатическим действием: бактериоцины и короткоцепочные жирные кислоты (КЦЖК) [5, 6]. Кроме того, члены микробиоты конкурируют с патогенами и контаминантами за субстраты, препятствуя их развитию в толстом кишечнике [7].

Однако, все положительные свойства микробиота проявляет только в «здоровом» состоянии. Нарушения качественного и/или количественного состава микробного сообщества могут повлечь за собой такие заболевания, как болезнь Крона, язвенный колит, ожирение, диабет и другие [8]. В болезненном состоянии биопленки комменсальных бактерий (бифидо- и лактобактерий) разрушаются и заменяются на биопленки патогенов (энтеробактерий, стафилококков и других), что приводит к тяжелой интоксикации [4].

Негативным изменениям микробиоты способствуют неблагоприятная окружающая среда, нарушения режима питания, отсутствие пищевых волокон в рационе, стресс, приём антибиотиков и многое другое [9-11]. Поэтому проблема поддержания состава и стимулирования полезных членов микробиоты крайне актуальна, а количество работ, посвященных данной тематике, растет с каждым годом.

Признанным методом профилактики и лечения заболеваний, связанных с микробиотой кишечника, является введение в рацион пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков. Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу организму хозяина [12]. Пребиотики – это субстрат, который избирательно метаболизируется членами микробиоты, принося пользу организму хозяина [13]. Синбиотики – это комбинации пробиотиков и пребиотиков, полезное действие которых выше, чем при отдельном введении, за счет эффекта синергии [14]. Данные компоненты функционального питания активно исследуют в течение последних десятилетий. Особенно сильно на рынок пробиотиков и пребиотиков повлияла пандемия COVID-19: повышение применения антибиотиков повлекло за собой повышенный спрос на препараты и биологически активные добавки (БАД) для восстановления микробного баланса кишечника и облегчения симптомов заболевания [15]. Так, например, за 2020 год рынок пробиотиков и пребиотиков в нашей стране вырос на 17% (в проданных упаковках) [16]. По данным allied market research общемировой рынок пробиотиков к 2020 году составлял 34,1 миллиардов долларов США, и, при прогнозируемом ежегодном приросте на 8,6 %, должен был достигнуть 73,9 миллиардов долларов США к 2022 году [17].

Увеличение рынка пробиотиков и пребиотиков диктует необходимость применения критериев сравнения эффективности различных препаратов и БАД. При этом, процедура доказательства полезного действия пробиотика, пребиотика или их композиции достаточно сложна, а круг бактерий с потенциальными пробиотическими и веществ с потенциальными пребиотическими свойствами значительно расширился в результате изменений

в новых определениях [12, 13]. Окончательно их эффективность должна быть доказана в слепом плацебо-контролируемом исследовании с соответствующими критериями исключения и / или включения на людях. Такие исследования весьма дорогостоящи и требуют обширной базы предварительных испытаний *in vitro* и *in vivo* (в частности, на специальных лабораторных животных, например, гуманизированных крысах) [18]. Для эффективного сужения круга исследуемых веществ на конечном и наиболее дорогостоящем этапе, требуется введение критерия эффективности на ранних этапах в экспериментах *in vitro*.

Наиболее эффективными компонентами функционального питания являются синергетические синбиотики, поскольку они проявляют в себе как пребиотические, так и пробиотические свойства, усиленные за счет эффекта синергии [14]. Принципы конструирования синбиотиков, как правило, основаны на выявлении какого-либо конкретного усиленного действия композиции, по сравнению с отдельными компонентами и/или с другими композициями. Объектом сравнения в данном случае может являться метаболизм какого-либо субстрата, конечная численность и/или скорость роста пробиотического штамма в средах с исследуемым пребиотическим субстратом, стабильность (сохранение численности жизнеспособных клеток при хранении и в неблагоприятных условиях) пробиотика, антагонистическое действие пробиотика в отношении патогенных микроорганизмов и т.д. [12, 13]. Перечисленные признаки доступны для исследований *in vitro*, тогда как более глубокое воздействие на микробиоту и организм хозяина (влияние на α , β - разнообразие микробиоты, снижение симптомов каких-либо заболеваний, воздействие на иммунную или нервную систему) требует исследований *in vivo* (на животных) или *ex vivo* в сложных системах, моделирующих условия кишечника. Функциональные модели кишечника различаются по сложности и могут имитировать один или несколько отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), включая состав среды, разнообразие микробного сообщества, pH, температуру, и скорость протока содержимого (three-stage continuous culture system) [19-25]. Также применяют модели, включающие в себя клетки эпителия кишечника (Transwell, Host-

Microbiota Interaction, НохВan, НuMiX, Gut-on-chip) [8, 26], хотя последние более дорогостоящи.

В качестве критерия сравнения синбиотиков наибольшим потенциалом обладает антагонистическое действие композиции в отношении конкретного кишечного патогена или контаминанта пищи. Особенно актуально данное действие в контексте увеличения количества антибиотико-резистентных патогенов, появившихся в последние годы в связи с увеличенным применением антибиотиков. Антагонистическое действие синбиотика в отношении конкретного патогена может иметь количественную меру (например, за счет измеряемого количества ингибирующих патоген метаболитов пробиотика и констант ингибирования), что важно для сравнения различных композиций. Данная характеристика синбиотика также может быть измерена количественно с помощью современных анализов численности микроорганизмов (полимеразная цепная реакция в реальном времени (qПЦР), флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH)) и концентрации метаболитов в среде (тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография / масс-спектрометрия (ГХ-МС)), что делает данный критерий применимым на всех этапах доказательства эффективности синбиотика.

Таким образом, **целью данной 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 указанные условия 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.

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 Всероссийской конференция 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).

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).

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Микробиота кишечника человека

1.1.1 Состав микробиоты и, влияющие на него факторы

Тело человека является естественным ареалом обитания для огромного количества микроорганизмов. Их воздействие на организм хозяина варьируется от полезного симбиотического до патогенного и паразитического [27]. В связи с высокой скоростью движения веществ и агрессивной средой в желудке и тонком кишечнике основная масса микробов локализуется в подвздошной кишке и толстом кишечнике [28]. На участке от слепой до прямой кишки количество микроорганизмов достигает 10^{12} КОЕ/г содержимого [27]. Это означает, что около половины содержимого в толстом кишечнике и фекалиях представлено микроорганизмами.

Сообщество микроорганизмов кишечника включает в себя около 400-500 культивируемых видов бактерий [29], однако, молекулярные исследования свидетельствуют о том, что только малая часть микробиома может быть обнаружена культуральными методами анализа [28]. Кишечный микробиоценоз является открытой системой, на его состав и свойства влияет большое количество как внутренних (межпопуляционные взаимодействия), так и внешних (воздействие организма хозяина и среды, окружающей его) факторов. Однако, кишечное сообщество за счет механизмов саморегулирования достигает стабильного состояния – динамического равновесия, т.е. оно способно «подстраиваться» под изменения окружающей среды, сохраняя стабильность [30].

Кишечный микробиоценоз состоит из ряда микробиотопов: слизистый эпителий кишечника, слой слизи (муцина), поверхности частиц в просвете кишечника. Условия в каждом из этих микробиотопов могут постоянно меняться в результате метаболической активности микроорганизмов. Анализ биоптатов здоровых людей показал, что микробиота слизистой оболочки значительно отличается от микробиоты просвета [31]. Как правило, популяции микробов

хорошо структурированы в пространстве. При этом, популяции родственных видов чаще располагаются поблизости друг от друга. Это связано с вероятным вытеснением конкурентов за счет продуцирования метаболитов, более активного потребления конкретного субстрата [32]. Наиболее вероятная форма существования микроорганизмов в кишечнике – микроколонии, образующие в сумме биопленки. Обычно такие биопленки представляют собой сложные межвидовые консорциумы [28].

Исследование состава кишечной микробиоты осложнено из-за труднодоступности толстого кишечника. Доступ к пристеночному биотопу можно получить только в случае биопсии толстой кишки или ректальной биопсии [28]. В настоящий момент исследования состава микробиоты кишечника человека проводятся, главным образом, на образцах фекалий. Однако, фекальная микробиота, предположительно, соотносится в первую очередь с просветной микробиотой, тогда как некоторые исследования показали значительные различия между микроорганизмами в просвете кишечника и локализующимися у поверхности эпителия [31]. Основными методами для определения качественного и количественного состава являются сиквенс генов 16S рРНК, ПЦР в реальном времени, флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) [33].

С помощью ПЦР в реальном времени в образцах от пациентов, перенесших резекцию толстой кишки, было выявлено несколько закономерностей локализации бактерий на уровне рода и вида [33]. Представители рода *Bifidobacterium* распределялись по трем отделам толстой кишки равномерно, лактобактерии преобладали в поперечной и нисходящей толстой кишке, бактероиды, энтеробактерии и сульфатредуцирующие бактерии были равномерно распределены в толстой и подвздошной кишке. *Enterococcus faecalis* встречались в большем количестве в толстом кишечнике, чем в подвздошной кишке, в то время как *En. rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii* и *Clostridium clostridioforme* обнаруживались в большем количестве в восходящем и нисходящем толстом кишечнике [33]. С помощью FISH было установлено, что в

био пленке кишечника здорового человека преобладают микроорганизмы родов *Bacteroides* и *Bifidobacterium* [34].

Формирование микробиоты начинается с рождения. Первоначально донором микроорганизмов для ребенка является микробиота матери (не только кишечная, но и кожи, влагалища и т.п.), больничная среда и питание [35]. Однако, некоторые исследования свидетельствуют о том, что микроорганизмы кишечника матери более устойчивы в кишечнике ребенка и обнаруживаются чаще, чем полученные из других источников [36]. Парентеральное введение антибиотиков, кесарево сечение и искусственное вскармливание приводят к значительным различиям путей формирования микробиоты у детей [35, 37]. Например, с помощью FISH было обнаружено, что у младенцев, получавших смеси, было значительно меньше бифидобактерий (30 % от общего числа бактерий, против 70 % у детей на грудном вскармливании), и больше бактероидов (29 %, против 12 % на грудном вскармливании). Причем, исследования внутрипопуляционных различий рода бифидобактерий показали, что при грудном вскармливании бифидобактерии образуют более стабильную и однородную популяцию, чем при искусственном вскармливании. Также при искусственном вскармливании наблюдали статистически значимое повышение относительного содержания бактерий родов *Staphylococcus*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella* при снижении доли бифидо- и лактобактерий [37]. У детей, рожденных путем кесарева сечения, наблюдали повышенное содержание бацилл и энтеробактерий, в то время как содержание бифидобактерий и бактероидов было значительно ниже, чем у детей, рожденных естественным путем [35]. Антибиотики, назначаемые в раннем возрасте, оказываются сильным ударом для сообщества бифидобактерий и увеличивают численность клостридий, что, в дальнейшем, повышает риск избыточного веса [38] и приводит к появлению антибиотикорезистентных микроорганизмов в кишечнике [39].

Обычно в первые дни жизни в кишечном сообществе младенцев преобладают аэробные и факультативно анаэробные бактерии, такие как

стрептококки и энтеробактерии. Предполагается, что в дальнейшем среда кишечника становится все более анаэробной, что приводит к преобладанию бифидобактерий в течение первых недель жизни. У некоторых младенцев род *Bacteroides* с самого начала формируют значительную часть микробиоты [35].

Несколько видов *Bifidobacterium* и *Bacteroides* адаптированы к молочной диете младенцев, поскольку могут использовать олигосахариды грудного молока (ОГМ) [40], а также аналогичные вещества схожей структуры в слизи, продуцируемой хозяином. Когда в рацион младенца включается твердая пища, бактерии переходят на субстраты совершенно иного типа, что приводит к серьезным изменениям. В период отлучения от груди состав бифидобактерий переходит от детского типа (с преобладанием *Bif. infantis* и *Bif. breve*), к взрослому типу (с преобладанием *Bif. adolescentis* и *Bif. longum*) [41]. Общая численность бифидобактерий при этом уменьшается по мере их замещения клостридиями, специализирующимися на разложении полисахаридов растений [35]. В отечественном исследовании [42] было обнаружено, что видовой состав бифидобактерий существенно различается у детей двух возрастных групп: 3–5 лет и 1–18 месяцев. Всего было выделено 287 культур бифидобактерий, которые были идентифицированы до вида. У младшей группы культуры бифидобактерий преимущественно принадлежали к видам *Bif. ruminantium* – 23 %, *Bif. bifidum* – 20 %, *Bif. pseudocatenulatum* – 17 %. Существенная доля принадлежала также таким видам, как *Bif. adolescentis* (14 %), *Bif. longum* / *pseudocatenulatum* (10 %), *Bif. breve* (10 %). Обнаружены также виды *Bif. angulatum* (3 %) и *Bif. longum* (3 %). В то время, как видовой спектр у детей 3-5 лет был представлен лишь тремя видами: *Bif. longum* (72 %); *Bif. catenulatum* (14 %) и *Bif. animalis* (14 %). Примерно через 2–3 года после рождения микробиота кишечника ребенка приближается к взрослому типу [41]. Хотя у детей подросткового возраста относительная численность родов *Bifidobacterium* и *Clostridium* все еще выше, чем у взрослых (старше 18 лет) [43].

Микробиота кишечника взрослого человека представлена типом *Firmicutes* (~64%), включающим рода *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*,

Ruminococcus, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* и *Roseburia*. Вторым по относительной численности является тип *Bacteroidetes* (~23%), включающий рода *Bacteroides* и *Prevotella*, за ним следуют типы *Actinobacteria* (~3%) и *Verrucomicrobia* (~2%) [44]. Однако, на качественный и количественный состав микробиоты взрослого человека также влияет питание, стрессы, окружающая среда, географическое положение, лечение антибиотиками и ряд других факторов [44]. Было обнаружено, что катехоламины, выделяемые организмом человека при стрессе, играют важную роль как во внутри- и межвидовой микробной коммуникации, так и во взаимодействии микробиоты и хозяина [42]. Они могут повышать численность патогенов и усиливать их негативное воздействие на организм [45]. Введение инулина, фрукто- и галактоолигосахаридов, приводит к более высокой численности представителей родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, признанных полезными для здоровья человека [44]. В то время как диета, состоящая преимущественно из животного белка (западная диета), приводит к увеличению количества бактерий родов *Enterococcus*, *Streptococcus* и *Peptostreptococcus*, связанных с желудочно-кишечными заболеваниями, и снижению численности бифидобактерий и, соответственно, продуцирование короткоцепочных жирных кислот (КЦЖК) [46]. Стимулирующее воздействие на бифидобактерий и лактобактерий оказывало введение витаминов А и Е [47], а включение в рацион витамина D увеличивало долю бактерий родов *Bacteroides* и *Parabacteroides* [48]. Включение в рацион полифенолов из различных фруктов, овощей и ягод селективно стимулировало бифидо- и лактобактерии, снижая численность патогенных видов (например, *C. perfringens*) [49].

На качественный и количественный состав кишечного микробиоценоза людей также влияет географическое положение. Так, например, были выявлены статистически значимые различия в составе микробиоты жителей Санкт-Петербурга и Гвинейской Республики [50]. Предположительно, это связано с различиями в питании людей и состоянии окружающей среды.

Помимо бактерий в кишечном микробиоценозе обнаруживаются и микроскопические грибы. Доминирующими среди обнаруженных в образцах фекалий были дрожжи родов *Saccharomyces*, *Malassezia* и *Candida*. Было обнаружено, что *Candida albicans* является основным модулятором ответов человеческих клеток Т-хелперов 17 (Th17), которые отвечают за защитный иммунитет на участках кишечного барьера [51].

1.1.2 Взаимодействия между различными представителями микробиоты кишечника. Метаболизм микробиоты

Термин «микробиом» определяется как микробное сообщество, занимающее четко-определенную среду обитания, обладающее собственными физико-химическими свойствами. То есть, «микробиом» – это не только микробиота, но и весь спектр её функциональных свойств [52]. В кишечном микробиоме сосуществует огромное количество микроорганизмов, различающихся по ферментативной активности. Такое разнообразие обусловлено широким спектром поступающих в кишечник питательных веществ: олиго- и полисахариды клеточных стенок растений, устойчивые крахмалы, пептиды и протеины низкой молекулярной массы. В результате потребления данных веществ могут образовываться как восстановленные вещества (например, водород, лактат, сукцинат, бутират и этанол), так и окисленные (например, ацетат). Причем, в первом случае, продукты метаболизма являются донорами электронов для несакхаролитических членов микробиоты. Такое явление потребления одними микробами продуктов метаболизма других называется перекрестным кормлением (cross-feeding) [28]. Некоторые математические модели предсказали возможность существования обширных сетей перекрестного кормления в микробиоме млекопитающих [53]. Например, образуемые бифидо- и лактобактериями молочная и уксусная кислоты являются питательными веществами для микроорганизмов, образующих масляную кислоту [28, 54].

Перекрестное питание можно считать комменсальным (стимулирующим) или симбиотическим (обязательное метаболическое взаимодействие) взаимодействием, однако внутри микробиома кишечника существуют и другие типы взаимодействия [28]. S. Magnúsdóttir et al. выделили 6 типов взаимодействия в микробиоценозе кишечника: конкуренция (за питательные вещества, сайты адгезии на эпителии кишечника); паразитизм (стимулирование одного члена микробиоты, за счет подавления другого); аменсализм (один микроорганизм – ингибитор подавляет рост и развитие другого – аменсала); нейтрализм (взаимодействие минимально или отсутствует); комменсализм (стимулирование роста одного члена микробиоты при отсутствии стимулирования или угнетения другого); мутуализм (оба члена микробиоты растут быстрее в со-культурах, чем в моно-культурах) [55]. Причем, в исследованиях *in vitro* при культивировании синтетического сообщества из 12 видов было обнаружено, что 68 % всех взаимодействий приходится на конкуренцию и аменсализм, а мутуалистические и комменсальные составляют лишь 5 % [56]. Однако, более обширная модель, включающая 773 штамма из микробиоты человека, показала, что комменсализм был вторым по встречаемости типом взаимоотношений после паразитизма (Рисунок 1), что подтверждает гипотезу о существовании в микробиоте обширной сети перекрестного кормления [55].

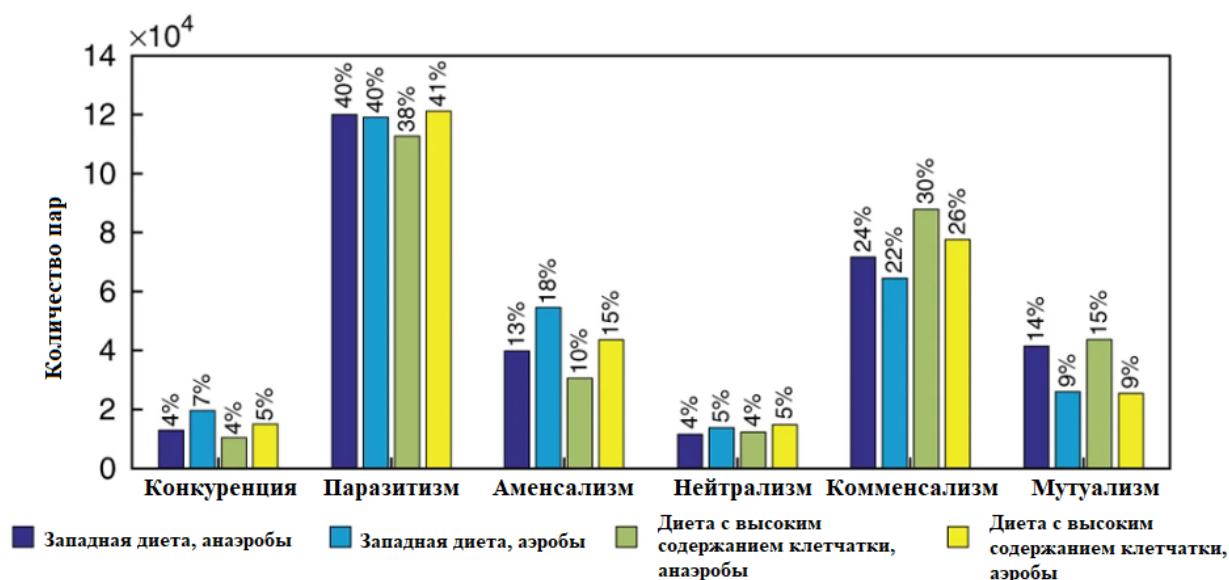


Рисунок 1 - Количество пар, в % от суммарного, проявляющих один из выявленных шести типов взаимодействий при моделировании *in silico* в условиях, имитирующих западную диету (повышенное содержание животных белков), или диету с высоким содержанием клетчатки, в присутствии кислорода или без него. (Приведено по [55])

Одной из форм антагонизма является конкуренция за питательный субстрат. Легкоусвояемый субстрат (например, глюкоза) будет потреблять в первую очередь микроорганизм, с наибольшей удельной скоростью роста при данных условиях [30].

Среди разнообразия метаболических путей в микробиоме кишечника особую роль играет продуцирование КЦЖК [1]. Они представляют собой летучие насыщенные жирные кислоты, которые имеют в алифатической цепи от 1 до 6 атомов углерода, в линейной или разветвленной конформации. К КЦЖК с неразветвленной цепью относят муравьиную, уксусную, пропионовую, масляную, валериановую и капроновую кислоты. Наиболее распространены уксусная, пропионовая и масляная кислота (в молярном соотношении 3: 1: 1), которые суммарно составляют до 95% КЦЖК в кишечнике человека. Еще одной значимой органической кислотой, продуцируемой, в основном, бифидо- и лактобактериями, является молочная кислота, не причисляемая в состав КЦЖК [57, 58]. Основными субстратами для продуцирования КЦЖК являются неперевариваемые углеводы: полисахариды клеточных стенок растений, устойчивый крахмал, растворимые

олигосахариды и муцин, получаемый микробиотой из слизи, продуцируемой эпителием кишечника [1, 58]. Однако, при недостатке углеводов некоторые члены микробиоты способны продуцировать КЦЖК при метаболизме аминокислот и белков, например, изовалерат, 2-метилбутират и изобутират [58].

КЦЖК играют важную роль в регуляции микробного сообщества кишечника. Так, например, было обнаружено, что бутират оказывает ингибирующее действие на рост грамотрицательных анаэробных членов микробиоты при поддержании pH 5,5 (восходящий отдел толстого кишечника), практически не снижая скорость роста грамположительных бактерий. Тогда как при pH 6,7 ингибирование было слабым. Таким образом, за счет продуцирования масляной кислоты могут образовываться ниши для развития грамположительных сахаролитических членов микробиоты в условиях пониженного pH [59]. Кроме того, бутират влияет на потребление кислорода эпителием и приводит к стабилизации фактора, индуцируемого гипоксией (HIF), фактора транскрипции, координирующего барьерную защиту [60]. При истощении бутирата, повышается концентрация кислорода в кишечной среде, что может привести к развитию патогенов, в частности, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [61].

Метаболизм моносахаридов начинается с фосфорилирования, в результате чего расходуется АТФ под действием фосфоглицераткиназ, пируваткиназ, ацетаткиназ или бутираткиназ. При сбраживании углеводов конечным акцептором электронов является пируват или соединения, которые из него образуются. Конечными продуктами ферментации являются различные короткоцепочные карбоновые кислоты (например, муравьиная, уксусная, молочная, масляная, пропионовая), CO₂, H₂, этанол, глицерин, ацетон, 2,3-бутандиол. После стадии фосфорилирования метаболизм следует по пути гликолиза, пути Энтнера-Дудова или бифидного шунта [57].

Гликолиз – основной путь катаболизма гексоз в толстом кишечнике. Встречается у энтеробактерий, клостридий, гомоферментативных молочнокислых бактерий и пропионовокислых бактерий. В результате

гликолиза образуется пируват в качестве продукта частичного окисления. Путь Энтнера–Дудорова используется такими микроорганизмами, как *Zyotomonas* (спиртовое брожение) и *Escherichia coli* (глюконовокислое брожение). Бифидный шунт осуществляется бактериями рода *Bifidobacterium*. В этом пути образуются две молекулы ацетата и одна лактата, а также дополнительная молекула ацетилфосфата [57]. Подробнее пути метаболизма, ведущие к продуцированию КЦЖК представлены на рисунке 2.

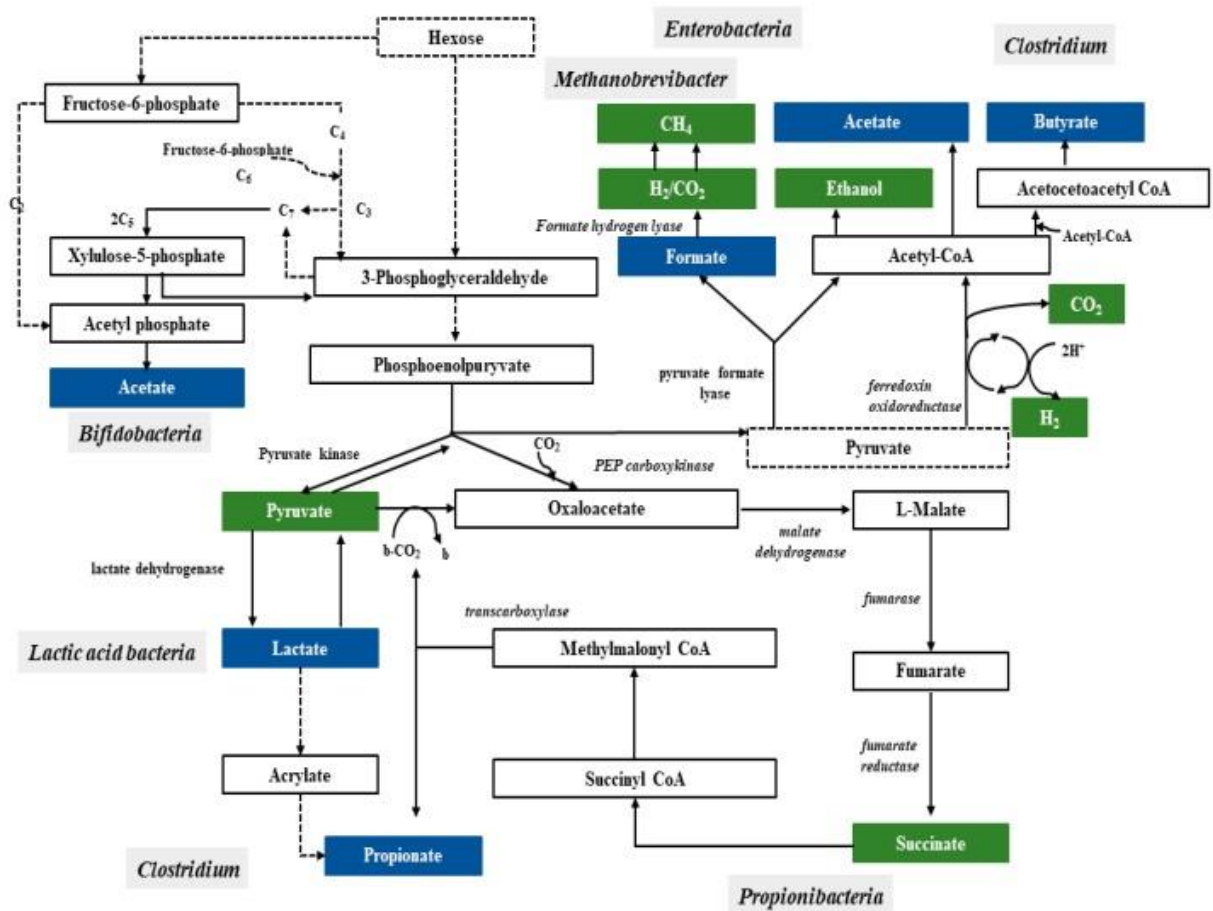


Рисунок 2 - Метаболические пути продуцирования короткоцепочных жирных кислот из гексоз различными представителями микробиоты кишечника. (Приведено по [57])

Продукты метаболизма некоторых членов микробиоты являются субстратами или вступают (в качестве промежуточных метаболитов) в метаболические пути других микроорганизмов, что приводит к последовательной ферментации субстратов. Например, в качестве субстратов для продуцирования КЦЖК используются лактат, этанол и пируват [57].

Уксусная кислота продуцируется посредством двух основных метаболических процессов. Чаще всего это ферментация неперевариваемых углеводов, и около 1/3 уксусной кислоты образуется в результате синтеза из водорода и углекислого газа или муравьиной кислоты ацетогенными бактериями по пути Вуда–Льонгдаля [57].

К маслянокислому брожению способны некоторые виды *Clostridium* (*C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. perfringens*), а также *Butyrivibrio fibrisolven*, *Fusobacterium nucleatum* и др. Конечными продуктами являются масляная кислота, небольшое количество уксусной кислоты, CO₂ и H₂. Некоторые виды также могут образовывать молочную кислоту и / или этанол. Также бактерии рода *Clostridium* способны метаболизировать аминокислоты с образованием CO₂, H₂, ацетата, а также аммиака и бутирата, которые имеют характерный неприятный запах [57].

При пропионовокислом брожении основными субстратами являются глюкоза и лактат. Данный метаболический путь может отличаться у разных видов бактерий и смещаться в сторону образования сукцината или акрилата [57].

Разнообразие представителей кишечной микробиоты предполагает сложную сеть метаболических путей ферментирования субстратов. При этом сложно выделить конкретные пути метаболизма того или иного вещества [62]. Огромную роль в формировании и поддержании состава микробиоты толстого кишечника играют сложные пищевые волокна. Род *Bacteroidetes* способен метаболизировать широкий спектр как растительных, так и животных запасующих веществ, в том числе гликаны. Другие представители кишечной микробиоты *Firmicutes* и *Actinobacteria* (особенно род *Bifidobacterium*) также способны метаболизировать гликаны, однако, для них наиболее предпочтительны полисахариды растений (крахмал, фруктаны) и олигосахариды (например, арабиноксиланы) [62].

Вторичные метаболиты играют важную роль в сложных межвидовых взаимодействиях и обеспечивают выживание в конкурентной среде. Quorum sensing (QS) – это тип передачи сигналов между клетками, зависящий от

плотности популяции, который вызывает изменения в поведении, когда популяция достигает критической плотности [63]. QS, индуцированный небольшими молекулами, такими как лактоны или пептиды N-ацилгомосерина, позволяет бактериям контролировать совместную деятельность и адаптировать свои фенотипы к биотической среде, что приводит, например, к коадгезии клеткам или образованию биопленок [52].

Определение функциональных взаимоотношений между различными группами микроорганизмов внутри микробиома кишечника и их влияние на организм хозяина – актуальная задача многих исследований в последние десятилетия. Широко применяется филогенетический подход – статистический анализ, включающий построение метаболических сетей взаимодействия [64]. Сети строят на основании данных о взаимной встречаемости различных видов, при этом обязательным условием является корреляционный анализ [53]. Так, например, путем выявления групп микроорганизмов кишечника, количество которых увеличивается в процессе выздоровления после кишечной инфекции, вызванной *Vibrio cholera*, был определен консорциум видов, которые способны ингибировать патоген [65].

Для построения сетей взаимодействия, как правило, используют математическую модель Лотки-Вольтера, которая устанавливает меру влияния на скорость роста конкретного таксона через коэффициенты, характеризующие его взаимодействие с другими членами микробиоты [66]. Предполагается, что в любом микробном сообществе есть ключевые виды (концентраторы, «краеугольные камни»), которые играют решающую роль во взаимодействиях различных членов популяции и оказывают большее влияние на производительность и динамику экосистемы, чем другие [52]. Некоторые исследования показывают, что основными движущими силами в динамике популяций микробиоценоза кишечника являются парные взаимодействия [67]. Однако, при построении метаболических сетей возможно искажение результатов из-за воздействия на рост микроорганизмов неучтенных внешних

факторов, например, антибиотиков [68]. Решением данной проблемы может являться расширение выборки данных.

Как правило, при построении метаболических сетей взаимодействий основное внимание уделяется наиболее многочисленным представителем, таким как *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Это обусловлено тем, что многочисленные сообщества метаболизируют основные питательные вещества, присутствующие в кишечнике. Однако, некоторые специфические функции, вероятно, выполняются малочисленными видами. Поэтому ожидается, что отсутствие или присутствие таких групп может стать маркером заболевания или дисфункции организма [69]. В этом случае предполагается, что модели совместного изменения численности среди малочисленных видов будут включать систематические, статистически значимые взаимодействия. Так, например, был предложен новый подход к построению сетей микробного взаимодействия – метод энтропийных сдвигов векторов изобилия при булевых операциях (ESABO) [64]. Данный подход предполагает построение сети на основе бинарных взаимодействий при объединении с помощью логических операций. Для каждой пары микроорганизмов строили векторы: (1;1) – в случае синергии и (1;0) / (0;1) – в случае антагонизма.

Другим способом получения данных о межмикробных взаимодействиях являются исследования на животных моделях *in vivo* [70, 71]. При этом среда и условия питания строго контролируются, что позволяет снизить погрешность в результате воздействия неучтенных факторов [53, 72]. Широкое применение в данном аспекте нашли гуманизированные мыши, кишечник которых населен представителями микробиоты человека, и стерильные мыши, кишечник не населен. Было показано, что мыши, моноколонизированные *Bacteroides thetaiotaomicron* подвергались более обширной контаминации *Sal. serovar Typhimurium* и *C. difficile*, чем стерильные мыши. Отслеживание изменений в экспрессии генов и продуцировании метаболитов привело к гипотезе о стимуляции данных патогенов бактериями *Bacteroides thetaiotaomicron* за счет двух типов перекрестного питания: продуцирование моносахаров при

расщеплении гликанов хозяина и ферментирование отходов жизнедеятельности [73, 74]. В подобных исследованиях было выявлено, что *Bact. thetaiotaomicron* также стимулирует за счет перекрестного кормления сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio piger* [75] и способствует колонизации кишечника бактериями *Faecalibacterium prausnitzii* [76].

Кроме того, существуют подходы, объединяющие фенотипический скрининг (выявление какого-либо признака в исследованиях *in vitro*) с биоинформатическим скринингом (выявление генов одного организма, связанных со специфическими механизмами взаимодействия в другом). С помощью данного подхода было выявлено множество механизмов интерференционной конкуренции внутри микробиоты [77]. Так, например, в образцах кишечной микробиоты человека более чем у половины штаммов порядка *Bacteroidales* были обнаружены гены секреции токсинов. Последующие функциональные анализы подтвердили роль этих генов во внутривидовой конкуренции в кишечнике [53].

В исследованиях функциональных свойств микробиоты кишечника также широко применяются искусственные сообщества микроорганизмов, выделенных из кишечника человека, которые, как предполагается, проявляют основные метаболические функции микробиоты [32, 55, 56, 67]. В частности, консорциум из 8 видов (*Anaerostipes caccae*, *Bact. thetaiotaomicron*, *Bif. longum*, *Blautia producta*, *C. butyricum*, *C. ramosum*, *E. coli* и *L. plantarum*) был использован для оценки метаболической активности в отношении нескольких экстрактов растений, относящихся к функциональным продуктам питания. Среди обнаруженных первичных метаболитов были органические кислоты, спирты, аминокислоты, жирные кислоты, неорганические соединения, азотистые соединения, нуклеиновые кислоты, фенольные смолы, стероиды и сахара [32].

В последние годы широкое распространение получили исследования кишечного микробиома на основе метогеномного анализа [78]. Данные работы посвящены выявлению различных генов из микробиоты, кодирующих те или иные ферменты. Одним из применяемых методов является «метагеномный

дробовик» («metagenome shot-gun»), при котором из образца извлекается вся ДНК и секвенируется [79]. С помощью данного подхода было выявлено, что в человеческом кишечном микробиоме кодируется более десяти миллионов различных бактериальных генов [80]. Однако, знаний о способности продуцирования тех или иных ферментов может оказаться недостаточно, и их вклад в те или иные функции может изменяться с течением времени. Так, например, гидролитические ферменты бифидобактерий, участвующие в разложении олигосахаридов грудного молока во время лактации, в более позднем возрасте могут разлагать муцины [81].

Антагонистическое воздействие внутри микробиоты зачастую связано с продуцированием ингибиторов роста, токсинов или бактериоцинов. Наиболее распространены, два типа воздействия: локальный (контактно-зависимое ингибирование роста) или нелокальный (диффундирующие токсины) [32]. Токсины, действующие локально, позволяют продуцирующему их штамму занять освободившееся пространство в структуре биопленки. Механизмы контактного ингибирования были обнаружены, например, у *E. coli* [32]. Активно исследуется способность различных членов микробиоты (в основном, бифидо- и лактобактерий) подавлять рост кишечных патогенов путем продуцирования молочной кислоты и/или бактериоцинов. Например, исследования *in vitro* показали, что бесклеточные супернатанты нескольких штаммов лактобактерий ингибируют рост *Staphylococcus aureus* и *E. coli*, а также снижают относительную численность в фекальных культурах родов бактерий, включающих патогенные виды (*Morganella*, *Leclercia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Vagococcus* и *Vibrio*) [82]. Подавление роста и активности патогенов представителями микробиоты будет рассмотрено подробнее в следующем разделе.

Важную роль в механизмах межвидовой конкуренции играют фенилкарбоновые кислоты. Так, например, фенилпропионовая и фенилуксусная кислоты подавляют рост *E. coli* и *St. aureus* [4].

1.1.3 Роль микробиоты кишечника в жизни человека

Роль микробиоты кишечника в жизни человека огромна. Среди различных представителей кишечного сообщества к «полезным» относят бактерии рода *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, а «вредным»/условно-патогенным — *Bacillus* spp., *Streptococcus pyogenes*, *St. aureus*, *Clostridium* spp. и др. [4]. Однако, это деление довольно условно, в частности, отнесение представителей рода *Bacteroides* к «полезным» спорно. Например, при оценке эффективности пребиотиков по известным методикам [83, 84] (подробное описание в п. 1.2.2.3), стимулирование роста бактероидов исследуемым веществом считается отрицательным эффектом. С одной стороны, представители этого рода играют важную роль в перекрестном кормлении, продуцируют некоторые витамины и выполняют ряд других ключевых функций в микробиоте. С другой стороны – среди бактероидов были обнаружены патогенные штаммы, некоторые представители способны к передаче факторов вирулентности соседним клеткам и значительное увеличение их относительной численности в микробиоте может привести к патологическим состояниям [85].

Как было сказано выше, микробы, населяющие желудочно-кишечный тракт человека являются мощным метаболическим инструментом для ферментации компонентов пищи, не усваиваемых собственной пищеварительной системой человека, в усваиваемые метаболиты. Помимо этого, они синтезируют необходимые витамины, удаляют токсичные соединения, противодействуют патогенам, укрепляют кишечный эпителиальный барьер, а также могут способствовать стимуляции и регуляции иммунной системы [44, 86]. Действие кишечной микробиоты способствует обновлению клеток, заживлению ран и регулирует свойства и секрецию слизи [44].

Представители микробиоты способны повышать эффективность гидролиза липидов, ингибируя липогенные ферменты [87]. Они играют важную роль в обеспечении макроорганизма витаминами группы В (биотином, никотиновой

кислотой, пантотеновой кислотой, пиридоксином и тиамином) и витамином К [88, 89].

Влияние кишечной микробиоты на иммунитет изучают в течение последних десятилетий. Было обнаружено, что члены микробиоты способствуют увеличению численности Т-клеток и врожденных лимфоидных клеток группы 3 в лимфоидных структурах кишечника, повышают уровень В-клеток для производства IgA [90]. Кроме того, некоторые метаболиты индуцируют синтез антимикробных белков, которые подавляют рост патогенных бактерий [91]. У 500 здоровых добровольцев различия в метаболических микробиомцитокин — ассоциированных путях приводили к дифференцированному запуску иммунного ответа на определенные виды микроорганизмов, такие как *St. aureus*, *E. coli*, *Bact. fragilis* и *Candida albicans* [92].

Помимо стимулирования иммунитета человека, микроорганизмы в кишечнике обладают широким спектром собственных механизмов подавления кишечных патогенов и микробных контаминантов пищи [3]. Некоторые из них способны продуцировать антимикробные пептиды – бактериоцины, обладающие бактерицидным действием в отношении патогенных бактерий и грибов [59]. *Bacteroides thuringiensis* может продуцировать бактериоцин (турицин), который непосредственно воздействует на спорообразующие бациллы и клостридии, включая *C. difficile*; *En. faecium* и *Pediococcus pentosaceus* способны продуцировать бактериоцины, подавляющие патогены рода *Listeria* [3]. В целом в исследованиях генома микробиоты человека (метагенома) было выявлено 74 кластера, предположительно кодирующих синтез бактериоцинов [5].

Важную роль в борьбе с патогенами играет конкуренция за питательные субстраты. Например, типичный представитель микробиоты *Bact. thetaiotaomicron* потребляет углеводы, используемые патогеном *Citrobacter rodentium*, что приводит к конкурентному исключению патогена из кишечника [7]. Масляная кислота, одна из КЦЖК, может подавлять экспрессию нескольких генов вирулентности *Sal. enterica* serovar *Enteritidis* и serovar *Typhimurium* [94] и подавляют рост энтерогеморрагической (патогенной) *E. coli* [95].

Одними из наиболее важных метаболитов микробиоты являются КЦЖК, играющие огромную роль во взаимоотношениях между различными членами микробного сообщества кишечника, между микробиотой и макроорганизмом, а также между микробиотой и некоммемсальными (транзиторными) микроорганизмами [1]. КЦЖК участвуют в регулировании pH, увеличивают абсорбцию кальция, железа и магния, а также они полезны для метаболизма глюкозы и белков в печени. Кроме того, эти кислоты влияют на поддержание нормальной структуры, целостности и функций кишечника [57]. Пропионат оказывает благотворное влияние при медикаментозном лечении синдрома раздраженного кишечника [96]. В целом, КЦЖК являются незаменимыми субстратами для клеток кишечника (колоноцитов) [93] и участвуют в иммуномодулирующих процессах, таких как дифференцировка Т-клеток [86]. Ацетат и пропионат могут достигать различных органов через кровотоки и служить субстратами для липогенеза и глюконеогенеза. Бутират является источником энергии для клеток эпителия толстой кишки, где он также может влиять на пролиферацию, дифференцировку и оказывать противовоспалительное действие [97]. Модулируя рост сапрофитной микрофлоры, КЦЖК подавляют развитие патогенных микроорганизмов, таких как *E. coli*, *Salmonella spp.* или *Campylobacter spp.*, конкурирующих за места колонизации [57]. Исследования показали, что масляная кислота стимулирует выработку муцина и создает слизистый слой, защищающий эпителий кишечника от контакта с токсинами и патогенными микроорганизмами [57].

Выделяют несколько возможных путей коммуникации микробиоты ЖКТ и мозга: нейроанатомический, нейроэндокринный, а также связанный с иммунной, метаболической и барьерной функцией кишечника. Прямая нервная связь между микробиотой и головным мозгом осуществляется в основном через блуждающий нерв за счет бактериальной стимуляции афферентных нейронов и вагусно-обусловленной модуляции воспалительного ответа [98]. КЦЖК модулируют проницаемость гематоэнцефалического барьера, который необходим для регулирования транспорта ионов, кислорода и питательных веществ между

кровью и центральной нервной системой (ЦНС) и защиты мозга, путем ограничения проникновения токсинов и патогенов [99]. Они регулируют симпатические системы через рецептор, связанный с G-белком (GPR41) и GPR43 [41]. Во время беременности КЦЖК, продуцируемые микробиотой матери, воспринимаются рецепторами GPR41 и GPR43 в симпатических ганглиях, клетках кишечника и клетках поджелудочной железы эмбриона, влияя на пренатальный метаболизм и развитие нервной системы [100]. Некоторые метаболиты микробиоты кишечника, помимо КЦЖК, также способны влиять на ЦНС, например, сероводород, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), серотонин, норадреналин, дофамин, ацетилхолин, гистамин и другие [41, 78, 101]. Среди продуцентов нейромедиаторов наиболее значимыми являются представители родов *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Escherichia* и *Lactobacillus*. Предположительно, перечисленные члены микробиоты могут послужить индикатором при диагностике патологий центральной и периферической нервных систем [101].

КЦЖК оказывают значительное влияние на моторику в нижних отделах ЖКТ и продуцирование слизи. В проксимальном отделе толстой кишки короткоцепочечные жирные кислоты стимулируют рецепторы L-клеток, вырабатывающие регуляторный пептид, замедляющий моторику как толстой, так и тонкой кишки [102]. В дистальном отделе КЦЖК стимулируют рецепторы энтерохромаффиноподобных клеток (ECL-клеток), вырабатывающих гистамин, который, действуя на 5-HT₄-рецепторы афферентных волокон блуждающего нерва, инициирует рефлекторное ускорение моторики [103]. Ацетат и бутират поддерживают баланс выработки и секреции слизи. *Bact. thetaiotaomicron* – продуцент ацетата и пропионата, способствует дифференцировке бокаловидных клеток и экспрессии генов, связанных с муцином. Напротив, *Faecalibacterium prausnitzii* – потребитель ацетата и продуцент бутирата, снижает эффект ацетата на слизь и предотвращает чрезмерное продуцирование слизи, тем самым поддерживая соответствующую структуру и состав эпителия кишечника [9].

Молочнокислые бактерии обладают антиоксидантными свойствами и в кишечнике человека способны предотвращать окислительные повреждения ДНК в клетках кишечного эпителия [104].

Огромную роль играет продуцирование кишечными микробами различных ферментов. При исследовании образцов фекалий здоровых людей наиболее распространенным ферментом была глутаматдегидрогеназа, участвующая в поддержании низкого окислительно-восстановительного потенциала [105]. В другом исследовании доминирующими ферментами были α -амилаза, α -1-антитрипсин и щелочная фосфатаза, которые, как предполагается, регулируют микробный баланс, баланс метаболизма белков и выполняют ряд других функций [50]. В частности, щелочная фосфатаза регулирует абсорбцию жирных кислот и абсорбцию кальция [106].

В ответ на негативное воздействие микробиом может продуцировать специфические метаболиты, которые можно использовать в качестве сигнальных (индикаторных) молекул при анализе состояния человека. Так, белок кальпротектин может служить индикатором воспаления кишечника [78]. Метаболический профиль кишечника может помочь не только в диагностике заболеваний человека, в частности колоректального рака, но и в выборе оптимального способа профилактики и лечения заболевания [1]. Например, снижение общего уровня бифидобактерий связывали с ухудшением состояния при синдроме раздраженного кишечника (СРК) [107], а снижение численности конкретно *Bif. bifidum*, среди других видов бифидобактерий, является симптомом язвенного колита (ЯК) [108]. В 2016 году было предложено использовать коэффициент отношения типов бактерий *Bacteroidetes* / *Firmicutes* для прогнозирования благоприятного исхода развития болезни у пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии. Было отмечено, что преобладание бактероидов характерно для критических состояний [109].

Некоторые представители кишечного микробиоценоза способны продуцировать экзополисахариды (ЭПС). Гены продуцирования ЭПС были обнаружены у лактобактерий и бифидобактерий (практически у всех

представителей, за исключением *Bif. bifidum*) [110]. Причем, у бифидобактерий данные гены были различными, что свидетельствует о том, что ЭПС, продуцируемые разными видами могут иметь различные структуры и длины цепей и, соответственно, выполнять различные функции в организме человека [110]. К функциям ЭПС можно отнести избирательное стимулирование роста и/или активности полезных бактерий, ингибирование бактериальной адгезии к кишечному эпителию, поддержание целостности кишечного барьера, влияние на иммунную систему путем прямого и косвенного взаимодействия с Toll-подобными рецепторами [110].

Микробиота кишечника способна защищать организм хозяина от негативного воздействия ионов тяжелых металлов, однако воздействие тяжелых металлов, в свою очередь изменяет метаболический профиль микробиоты и может привести к дисбактериозу [111]. Члены микробиоты способны аккумулировать или связывать тяжелые металлы, либо преобразовывать их путем различных ферментативных реакций. Некоторые виды кишечных бактерий, например, *Pseudomonas*, продуцируют сидерофоры – железо-хелатирующие молекулы. Эти молекулы могут образовывать нерастворимые комплексы с другими ионами тяжёлых металлов, что облегчает их выведение с фекалиями [112].

1.1.4 Нарушения качественного и количественного состава микробиоты

Выше было рассмотрено положительное взаимодействие микробиоценоза кишечника с организмом человека, однако, в случае болезненных состояний положительное действие нивелируется, и члены микробиоты будут поддерживать жизнедеятельность за счет организма хозяина [4]. В неблагоприятных условиях биопленки бифидо- и лактобактерий разрушаются, а пристеночный биотоп занимают энтеробактерии и стафилококки, что приводит к разрушению кишечного барьера и интоксикации [4]. В дальнейшем патогены

могут переходить из биопленок в планктонные формы и попадать в кровоток. Наиболее опасны в этом случае антибиотикорезистентные бактерии [113].

Одним из признаков «здоровой» микробиоты является биологическое разнообразие. α -разнообразие характеризует богатство и равномерность распределения бактериальных видов в сообществе. В большинстве случаев высокое α -разнообразие указывает на более здоровую и зрелую структуру микробиоты и часто количественно определяется индексом разнообразия Симпсона и индексом разнообразия Шеннона в исследованиях микробиоты кишечника человека. β -разнообразие показывает количество или наличие/отсутствие видов, общих для микробных сообществ, и оценивает степень различия между двумя или несколькими сообществами. β -разнообразие также используется для оценки изменений микробного сообщества кишечника с течением времени, то есть под воздействием окружающей среды или заболевания, и может быть количественно определено с помощью индекса Брея-Кертиса [11]. Наибольший удар по биологическому разнообразию наносит введение антибиотиков. В одном из недавних исследований влияния энтерального приема антибиотиков и антибактериальных препаратов широкого спектра (ванкомицин, метронидазол и ципрофлоксацин) в течение 7 дней было выявлено значительное снижение биоразнообразия кишечного микробиоценоза [10]. Похожий результат был получен при введении антибиотиков в рацион мышей: в течение 7 дней наблюдали элиминацию нормальной микробиоты и контаминацию кишечника условно патогенными микроорганизмами. Содержание *L. acidophilus* в фекалиях снизилось до 10^3 КОЕ/г, *Bif. bifidum* не обнаруживались совсем, а количество *E. coli* повысилось до 10^8 КОЕ/г [70]. Большой проблемой является то, что более 30% назначений антибиотиков не оправданы и, зачастую, влекут за собой ускорение распространения заболеваний и повышение смертности у пациентов стационара в результате патогеногенеза антибиотикорезистентных штаммов (например, *C. difficile*) [114].

К снижению биоразнообразия микробиоты ведет также снижение потребления пищевых волокон, в совокупности с повышенным потреблением

жира и сахара, характерное для западного образа жизни и диеты. При этом возможно даже полное вытеснение некоторых бактериальных таксонов. Данные изменения микробиоты могут повлечь за собой развитие хронических воспалительных заболеваний кишечника, аллергий, аутоиммунных заболеваний, ожирения и т.п. [9]. Было обнаружено, что снижение потребления пищевых волокон приводит к перестройке микробиоты в течение 24 часов. При этом снижалось количество бактерий, разлагающих полисахариды (рода *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Clostridium* и *Bifidobacterium*), одновременно с повышением численности представителей родов *Lactococcus*, *Eggerrthella* и *Streptococcus*, что привело к снижению продуцирования КЦЖК [115].

Повышение в микробиоте относительного числа оппортунистических патогенов родов *Serratia* и *Prevotella* у людей с ожирением приводит к повышенной проницаемости кишечного эпителия, эндотоксемии за счет высвобождения липополисахарида – компонента наружной мембраны [116].

Некоторые возрастные изменения в микробиоте и ее метаболической активности могут привести к развитию таких заболеваний, как, например болезнь Крона, язвенный колит, непереносимость глютена, ожирение, диабет второго типа и другие. Обычно, к таким последствиям приводит снижение численности *Bacteroides* и *Firmicutes*, в совокупности с возрастанием численности протеобактерий, фузобактерий и муцин-разлагающей бактерии *Ruminococcus gnavus* [8].

В результате нескольких исследований было доказано, что кишечная микробиота играет роль в возникновении метаболических заболеваний, отчасти из-за высвобождения липополисахаридов (ЛПС), которые вызывают хронические воспаления [117]. Кроме того, метаболическая эндотоксемия, вызванная грамотрицательными бактериями, может активировать воспалительную реакцию, приводящую к инсулинорезистентности [118].

Микробиота при дисбактериозе также может оказывать негативное влияние на сердечно-сосудистую систему. Это связано с метаболизмом холина и карнитина, продуктом которого является триметиламин. Триметиламин

окисляется флавиномонооксигеназами печени с образованием N-оксида триметиламина, являющегося проатерогенным и связан с риском сердечно-сосудистых заболеваний [119].

В целом, нарушения в качественном и количественном составе микробного сообщества кишечника приводят к потере всех или большинства полезных эффектов микробиоты, перечисленных в предыдущем разделе.

Таким образом, поддержание здоровья микробиоты кишечника – важная задача для современного человека. Под влиянием несбалансированной диеты, стрессов, переутомления, избыточного применения антибиотиков и ряда других факторов, нарушается качественный и количественный состав кишечного микробного сообщества. Состояние дисбиоза влечет за собой как утяжеление протекания несвязанных с кишечником заболеваний, так и возникновение новых заболеваний. Для модуляции кишечной микробиоты активно применяются пробиотики, пребиотики и синбиотики.

1.2 Модуляция микробиоты кишечника

Для поддержания и модуляции кишечной микробиоты активно применяются функциональные продукты питания. Это продукты и напитки, обогащенные каким-либо питательным веществом, играющим в организме особую физиологическую роль, положительно влияя на здоровье человека [120]. Предполагается, что диетическое вмешательство с использованием функциональных продуктов питания уменьшает биохимические отклонения и метаболическую эндотоксемию, а также вызывает изменения микробиоты кишечника, ведущие к более здоровому метаболическому профилю [119]. Наиболее активно развиваются и применяются такие компоненты функционального питания, как пробиотики, пребиотики и синбиотики [121]. Диетическое вмешательство с использованием функциональных продуктов питания значительно изменило фекальную микробиоту пациентов с диабетом второго типа за счет увеличения α -разнообразия и изменения численности конкретных бактерий, независимо от противодиабетических препаратов. Наблюдалось снижение *Prevotella copri* и увеличение *Faecalibacterium prausnitzii* и *Akkermansia muciniphila*, двух видов бактерий, обладающих противовоспалительным действием [119]. Функциональные продукты питания успешно применяются для нормализации микробиоты у людей с ожирением [122]. Некоторые функциональные продукты снижают уровень холестерина липопротеидов низкой плотности, что уменьшает риск сердечно-сосудистых заболеваний [123]. Также подтверждено экспериментально наличие широкого спектра механизмов положительного воздействия на иммунитет, в особенности, при введении пробиотиков и пребиотиков [124]. Функциональные продукты оптимизируют работу иммунной системы для предотвращения и контроля патогенных вирусных инфекций, что крайне актуально в последние годы [125]. В частности, лактобактерии, вносимые в качестве пробиотиков, могут стать источником биопротекторных агентов для профилактической терапии, что особенно важно для профилактики и борьбы с инфекциями в период пандемии

COVID-19 [126]. Также было представлено множество исследований, посвященных противовоспалительной активности функциональных продуктов питания [127].

1.2.1 Пробиотики

Первое применение микроорганизмов для модификации микробиоты кишечника было описано в Древнем Китае. Тогда были использованы человеческие фекалии для лечения инфекций или пищевых отравлений [128]. Однако первое определение пробиотиков, опубликованное в 1965 году, не включало живых бактерий, ограничиваясь продуцируемыми ими веществами, которые способствуют росту других бактерий [129].

В последующие десятилетия определение пробиотиков многократно модифицировалось. Понятие «живой микробный компонент» появилось только в 1989 г в работе R. Fuller [130], хотя идеи о возможности подавления и вытеснения вредных микроорганизмов в кишечнике человека с помощью введения «полезных», продвигались ещё в начале XIX века С. Carre, Н. Tissier и И.И. Мечниковым [131-133].

Обсуждение термина «пробиотик» было проведено Международной научной ассоциацией пробиотиков и пребиотиков (ISAPP) на съезде 23 октября 2013 г [12]. Последнее определение не отличалось значительно от принятого в 2001 году на консультационных съездах экспертов, организованных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и Продовольственной и Сельскохозяйственной организацией ООН (ФАО) [134]. Согласно данному определению, «пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу здоровью хозяина» [12].

Первые доступные пробиотики содержали только один вид микроорганизмов, в основном из родов *Saccharomyces* или *Lactobacillus* [128]. Последующие формы пробиотиков содержали большее разнообразие и количество микроорганизмов, от 10^8 до более 10^{10} КОЕ/доза. Пробиотики могут включать как один, так и несколько штаммов микроорганизмов. Однако, при

комбинировании консорциума необходимо исключить явление антагонизма между его членами. Так, например, при анализе 7 штаммов потенциально пробиотических бактерий, был разработан четырехштабмовый консорциум, включающий *L. plantarum* 314/8, *L. helveticus* R0052/6, *En. faecium* B-2240D, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* 103/27 [135].

Одной из проблем при разработке пробиотиков является значительная потеря жизнеспособных клеток при прохождении верхних отделов ЖКТ. Большинство штаммов пробиотиков были выбраны на основании их способности противостоять низкому рН желудочного сока, что привело к появлению множества вариантов с неизвестными физиологическими свойствами [128]. Одним из возможных путей решения является иммобилизация клеток в пищевых матрицах. Например, был выявлен потенциал капсулирования бифидобактерий в микрочастицах из альгината и вспомогательных природных полимеров (пектина, желатина, каррагинана, хитозана). Полученные частицы могут быть использованы в составе йогуртов, что не только повысит выживаемость пробиотика, но и улучшит текстуру продукта [136].

В нашей стране первым пробиотическим препаратом на основе бифидобактерий *Bif. bifidum* стал «Бифидумбактерин» разработанный под руководством Г.И. Гончаровой в Московском научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии в 1972 году [137].

В связи с разнообразием штаммов, широким спектром применимости и экспериментально подтвержденных положительных эффектов на организм человека существуют сложности в сравнении пробиотиков и их свойств, а также в доказательстве пробиотической природы новых штаммов. Среди вопросов, обсуждавшихся на съезде ISAPP, было уточнение спектра микроорганизмов, которые можно относить к пробиотикам. Например, конечным и необходимым этапом доказательства пробиотической природы микроорганизма является проведение должным образом контролируемых испытаний, доказывающих пользу для здоровья (слепое плацебо-независимое рандомизированное

испытание). К пробиотикам не относятся микроорганизмы, используемые для приготовления ферментированных продуктов (закваски). Также фекальная трансплантация не рассматривается в качестве пробиотического лечения. Было описано отличие комменсальных микроорганизмов от пробиотиков: «хотя комменсалы в кишечнике часто являются источником пробиотических штаммов, до тех пор, пока эти штаммы не будут изолированы, охарактеризованы и не будет представлен достоверный пример их воздействия на здоровье, их нельзя назвать пробиотиками» [12].

Таким образом, на сегодняшний день минимальными критериями для отнесения микроорганизма к классу пробиотиков являются (по [138]):

- Точное семантическое определение (род, вид, штамм);
- Жизнеспособность;
- Введение в соответствующей дозе, достаточной для обеспечения положительного эффекта до конца срока их хранения;
- Доказательство положительных эффектов в соответствующих испытаниях *in vivo* на людях.

К пробиотикам, полностью соответствующим последнему определению и принятым критериям, чаще всего относят представителей родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. Так, например, министерство здравоохранения Канады приняло в качестве пробиотиков следующие виды бактерий (при доставке в пищу в количестве 1×10^9 КОЕ/доза), в отношении которых могут быть сделаны неспецифические требования к штамму: *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve* и *longum*) и *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* и *salivarius*) [139]. Помимо бифидо- и лактобактерий в качестве пробиотиков применяются представители родов *Bacillus* [140], *Acetobacter* [141], *Streptomyces* [142], некоторые дрожжи рода *Saccharomyces* [143] и другие. Следует отметить, что представления о составе пробиотических препаратов с точки зрения эффективности и безопасности может значительно различаться в различных регионах.

Среди подтвержденных экспериментально полезных свойств пробиотиков можно выделить ингибирование потенциальных патогенов и/или продуцирование полезных биологически-активных соединений [144, 145]. Зафиксированные механизмы полезного действия перечислены в таблице 1.

Таблица 1 - Распределение пробиотиков по механизмам воздействия (приведено по [12])

Редкие Штамм-специфичные эффекты	Распространенные Видоспецифичные эффекты	Широко распространенные Среди исследуемых пробиотиков
<ul style="list-style-type: none"> • Неврологические, • Иммунологические, • Эндокринологические, • Продуцирование специфических БАВ. 	<ul style="list-style-type: none"> • Синтез витаминов, • Антагонизм, • Укрепление кишечного барьера, • Метаболизм кишечных солей, • Ферментная активность, • Нейтрализация канцерогенов. 	<ul style="list-style-type: none"> • Сопrotивление колонизации, • Продуцирование кислот и КЦЖК, • Регуляция кишечного транспорта, • Нормализация нарушений микробиоты (при дисбиозах), • Повышение обмена энтероцитов, • Конкурентное исключение патогенов.

Результатом комбинирования некоторых механизмов полезного воздействия пробиотиков может стать профилактика, облегчение симптомов или лечение какого-либо заболевания, связанного с микробиотой кишечника. Например, за счет антагонизма в отношении патогенных микроорганизмов и конкуренции с ними за сайты адгезии (антимикробной активности), участия в формировании муцинового слоя и снижения проницаемости эпителия кишечника (барьерной функции), а также модуляции иммунной системы желудочно-кишечного тракта (иммуномодуляции) пробиотические бифидо- и лактобактерии способствуют лечению и профилактике ожирения. Для нескольких видов было доказано подобное действие как на животных моделях [146], так и в экспериментах на людях [147-149].

Множество работ посвящены применению пробиотиков для борьбы с когнитивными нарушениями у людей пожилого возраста. Исследования показали, что введение пробиотиков снижает воспаление, повышает продуцирование антиоксидантных ферментов и способствует регуляции экспрессии нейротрофического фактора [150]. В исследованиях на животных было доказано стимулирование мозговой активности: при введении комбинаций пробиотиков, в основном, бифидо- и лактобактерий, нейротрофический фактор головного мозга пожилых крыс возвращался к значениям, характерным для молодых особей, что было связано с увеличением концентрации синаптического белка [151].

Активно изучается воздействие пробиотиков на настроение и эмоции. Доказано положительное воздействие пробиотических микроорганизмов на иммунную систему, которая, в свою очередь, играет важную роль в дифференцировке нейронов, развитии аксонов и синаптической пластичности, выступающей в качестве основного участника нейроиммунной интеграции [152]. В исследованиях на людях было показано, что пробиотики улучшают воспалительный статус синдрома раздраженного кишечника, снижают тревожность при синдроме хронической усталости и уровень психологического стресса у здоровых добровольцев, а также изменяют обработку эмоциональной информации мозгом [128].

В течение продолжительного времени исследовали влияние пробиотиков при лечении инфекционной диареи. Было доказано, что продолжительность госпитализации в стационаре в среднем была короче в группах, принимавших пробиотики, чем в контрольных группах [153].

Пробиотики обладают широким спектром механизмов для подавления роста, факторов патогенности и/или адгезии к эпителию кишечника бактериальных и грибных патогенов. Они способны продуцировать органические кислоты, перекись водорода и бактериоцины (в основном, характерно для лактобактерий), которые подавляют рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Продуцирование

молочной и уксусной кислот снижает внутриклеточный pH патогенов (например, *Salmonella* spp.), что приводит не только к бактериостатическому (ингибирующее действие), но и бактериолитическому (гибель клеток) действию. Немаловажным механизмом в данном аспекте является конкуренция пробиотиков с патогенами за сайты адгезии к эпителию кишечника. Пробиотики обладают поверхностными белковыми структурами связывания с рецепторами распознавания паттернов хозяина, такими как toll-подобные рецепторы, а также ферментами, нарушающими механизмы прикрепления патогенов. Кроме того, секреция антимикробных веществ делает среду неблагоприятной для развития нежелательных микроорганизмов [124].

Также активно исследуют иммуномодулирующие свойства пробиотиков. Механизмы прямой иммуномодуляции заключаются в стимулировании выработки иммуноглобулинов (IgG и IgA) эпителиальными клетками кишечника и интерлейкинов (IL-6, IL-12) дендритными клетками. Некоторые пробиотики способны стимулировать выработку антител и противовоспалительных цитокинов (например, фактора некроза опухоли). Кроме того, пробиотики улучшают барьерную функцию кишечника, снижая проницаемость эпителия [124].

Проводили исследования по повышению пищевой ценности некоторых продуктов путем включения пробиотиков. Так, например, наблюдали положительную динамику содержания сырого протеина, снижение уреазной активности и улучшение минерального состава при ферментировании пробиотическими бактериями соевого шрота для использования в качестве кормовой добавки [154].

Антибиотики – одна из наиболее часто назначаемых групп лекарственных средств. Однако лечение антибиотиками часто приводит к полному нарушению состава кишечной микробиоты и, как следствие, к тяжелой диарее [27]. Пробиотики признаны эффективными для предотвращения диареи, вызванной приемом антибиотиков. Результаты слепых плацебо-контролируемых исследований, показали достоверное снижение частоты возникновения диареи в

группе, принимавшей пробиотики (8%), по сравнению с контрольной группой (19%). Причем, наибольшее снижение частоты наблюдали в группах, получавших высокие дозы пробиотиков, что может свидетельствовать о дозозависимом эффекте [155]. При слепом, параллельном, плацебо-контролируемом исследовании было выявлено, что пробиотик, полученный комбинированием нескольких штаммов бифидо- и лактобактерий увеличивал временной интервал от приема антибиотика до наступления диареи более чем на 5 дней [156]. Кроме того, избыточное применение антибиотиков привело к появлению бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, таких как энтерококки, устойчивые к ванкомицину, энтеробактерии, продуцирующие карбапенемазу и штаммы, несущие бета-лактамазы расширенного спектра [157]. Даже временная колонизация кишечника бактериями, носящими гены устойчивости к антибиотикам, может привести к переносу генов резистентности комменсальным микроорганизмам, и далее, возможно, к патогенам, что будет причиной летального исхода при кишечной инфекции [158]. Использование пробиотических штаммов (относящихся к видам *L. plantarum* или *L. fermentum*), приводило к уменьшению колонизации кишечника антибиотикорезистентными патогенами, такими как *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* или *Candida albicans* [128]. Пробиотическая смесь, включающая *Bif. bifidum* и *L. acidophilus*, оказалось эффективной для предотвращения антибиотико-ассоциированной диареи, вызванной патогенами *C. difficile* или *Helicobacter pylori* [159]. Наличие широкого спектра механизмов подавления патогенов пробиотиками обсуждается в некоторых зарубежных [160] и отечественных [1, 126, 161] публикациях в ключе частичной замены антибиотиков пробиотическими культурами с высокой противомикробной активностью. Кроме того, были выделены бактерии с пробиотическим потенциалом, проявляющие фунгицидную активность. Например, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* проявлял штамспецифичный антагонизм в отношении конкретных грибов, колонизирующих продукты питания, и *Candida albicans* на уровне биотопов в

организме человека, что может быть использовано для профилактики микозов [162].

1.2.1.1 Бифидобактерии

Бифидобактерии преобладают в микробиоте младенцев [37], однако с возрастом их относительная численность в микробиоте падает. Они являются одними из первых микробов, колонизирующих кишечник новорожденных, и играют ключевую роль в развитии их физиологии, включая иммунную и пищеварительную системы (например, усваивание олигосахаридов грудного молока) [159]. В результате исследований образцов, полученных при биопсии кишечника, с помощью FISH было установлено, что в пристеночной биопленке бифидобактерии, наряду с бактероидами, преобладают и у взрослых людей [34]. Было показано, что в микробиоте детского типа бифидобактерии представлены, в основном видами *Bif. infantis* и *Bif. breve*, тогда как в кишечнике взрослых преобладают *Bif. adolescentis* и *Bif. longum* [41]. Масштабные исследования возрастных изменений в составе кишечной популяции бифидобактерий в Японии показали, что после 50 лет сокращается количество *Bif. breve* в совокупности с увеличением *Bif. dentium*, тогда как *Bif. longum* преобладает во всех возрастных группах. Также было обнаружено, что наличие видов *Bif. longum*, *Bif. bifidum*, *Bif. adolescentis* или *Bif. catenulatum* способствует более широкому разнообразию видов бифидобактерий, что, по-видимому, связано с синбиотическим взаимодействием [163].

Род *Bifidobacterium* принадлежит к типу *Actinobacteria* и включает в себя более 50 видов, однако с каждым годом число обнаруживаемых видов растет [159]. Морфологически бифидобактерии представляют собой грамположительные неподвижные слегка изогнутые палочки длиной 2-3 мкм иногда ветвящиеся на конце или с булабовидным утолщением; неспорообразующие [164]. В основном представители бифидобактерий являются облигатными анаэробами. В кишечнике человека бифидобактерии

могут занимать различные биотопы. Так, например, *Bif. longum* и *Bif. pseudocatenulatum* обычно выделяют как из слизистой оболочки, так и из образцов фекалий, а *Bif. bifidum* чаще обнаруживают в фекалиях (что соответствует просветной микробиоте) [159].

Преобладание бифидобактерий в кишечнике младенцев связано со способностью перерабатывать ОГМ, не усвояемые ребенком. Некоторые виды обладают гликозилгидролазами, которые расщепляют специфические связи внутри молекул ОГМ, причем наилучшими продуцентами этих ферментов являются *Bif. bifidum*, *Bif. longum* subsp. *infantis* и *Bif. breve* – самые распространенные виды у новорожденных при грудном вскармливании [159]. Напротив, геномы кишечных бифидобактерий, характерных для микробиоты взрослых людей, таких как *Bif. adolescentis*, не содержат генов, связанных с метаболизмом компонентов грудного молока, но они обладают обширным набором генов, предназначенных для метаболизма сложных углеводов, обычно присутствующих в диете взрослого типа (например, крахмала) [165].

Виды, принадлежащие к роду *Bifidobacterium*, обладают высоким сходством последовательностей 16S рРНК, составляя целостную филогенетическую единицу. В настоящее время доступно более 50 полных последовательностей геномов бифидобактерий. Недавний филогенетический анализ бифидобактерий, основанный на реконструкции известных геномных последовательностей выявил семь филогенетических групп, четыре из которых наиболее часто обнаруживаются в кишечной микробиоте: группа *Bif. pseudolongum* (особенно штаммы *Bif. animalis* subsp. *lactis*), группа *Bif. longum* (штаммы *Bif. breve* и *Bif. longum*), группа *Bif. bifidum* (штаммы *Bif. bifidum*) и группа *Bif. adolescentis* (штаммы *Bif. catenulatum*, *Bif. pseudocatenulatum* и *Bif. adolescentis*) [166]. Большинство пробиотических бактерий относится именно к этим видам [159].

Известно, что геномы бифидобактерий содержат множество генов (локусов) для метаболизма углеводов [40], что определяет их основную роль в толстом кишечнике [164]. Было обнаружено, что более 8% идентифицированных генов в большинстве изученных геномов бифидобактерий предположительно участвуют

в углеводном обмене, что примерно на 30% выше, чем у других членов микробиоценоза кишечника [164]. С метаболической точки зрения наиболее типичным признаком этого рода является катаболизм пентоз и гексоз. Бифидобактерии используют особый путь разложения моносахаридов, так называемый фруктозо-6-фосфатный путь или бифидный шунт. Основным ферментом этого пути является Фруктозо-6-фосфатфосфокетолаза. Она обладает двойной субстратной специфичностью в отношении фруктозо-6-фосфата или ксилулозо-5-фосфата. Конечными метаболитами этого пути являются короткоцепочечные жирные кислоты (в основном, ацетат и лактат) и этанол [159]. Данная особенность являлась фенотипическим признаком для идентификации бифидобактерий, поскольку не была обнаружена у других грамположительных членов микробиоты [159]. Однако, в настоящее время стандартным методом обнаружения бифидобактерий является FISH с использованием последовательности нуклеотидов Bif164 (5'-CATCCGGCATTTACCACCC-3') [30]. Метаболизм фруктозосодержащих углеводов осуществляется за счет фермента β -фруктофуранозидазы, который высвобождает остатки фруктозы из сахарозы, 1-kestозы, нистозы, инулина и раффинозы [167]. Бифидобактерии способны метаболизировать сложные углеводы, такие как муцин, ксилоолигосахариды, галактоолигосахариды, олигосахариды сои, мальтоолигосахариды, фруктоолигосахариды, пектин и другие олигосахариды растительного происхождения, хотя метаболизм конкретного углевода зависит от вида и штамма [164]. Схема углеводного метаболизма бифидобактерий представлена на рисунке 3.

Анализ данных метагеномных исследований кишечника жителей США выявил положительную корреляцию между количеством бифидобактерий и альфа-разнообразием микробиоты (в частности, с количеством бутират-продуцирующих бактерий), что признано одной из характеристик устойчивости микробного сообщества кишечника [168]. Это соотносится с тем фактом, что первичная колонизация кишечника бифидобактериями способствует дальнейшей колонизации другими микроорганизмами и, в последствии, формированию устойчивого разнообразного кишечного сообщества [159]. Бифидобактерии являются одними из наиболее важных «узлов» в сетях перекрестного кормления. Так, например, было обнаружено, что *Bif. breve* потребляет сахара, высвобождаемые *Bif. bifidum* при метаболизме муцина или ОГМ [169, 170]. Метаболическая активность *Bifidobacterium bifidum* была значительно выше при совместном культивировании с *Bifidobacterium breve*. Совместное внесение представителей этих видов в кишечник вызвало метаболический сдвиг в микробиоте за счет повышения продуцирования КЦЖК, а не за счет изменения количественного состава микробного сообщества [171]. Помимо межвидового стимулирования внутри сообщества бифидобактерий, есть множество примеров стимулирования роста других комменсальных микроорганизмов. В исследованиях на мышах было показано, что *Bacteroides thetaiotaomicron* более эффективно использует полисахариды в присутствии *Bif. longum* [159]. Многие представители бифидобактерий способны продуцировать разнообразные бактериальные ЭПС, которые могут стимулировать рост полезных бактерий [110].

Одним из немаловажных механизмов, определяющих применимость бифидобактерий как пробиотиков, является способность образования биопленок благодаря чему бифидосодержащие пробиотики способны закрепляться на кишечном эпителии. Механизм формирования биопленок малоизучен, однако, было обнаружено, что желчь и желчные соли в относительно высоких концентрациях (0,5% таурохолевой кислоты и 5% свиной желчи) индуцируют пленкообразование у бифидобактерий [172]. Данный факт, по-видимому,

означает, что пленкообразование для бифидобактерий является защитным механизмом для переживания неблагоприятных условий.

Бифидобактерии проявляют антимикробную активность в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов [173]. В результате углеводного метаболизма бифидобактерии продуцируют молочную и уксусную кислоты, которые подавляют рост нежелательных микроорганизмов. Так, например, была выявлена антимикробная активность у нескольких штаммов бифидобактерий в отношении *E. coli*, *Sal. Typhimurium*, *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium acnes*, и *Listeria monocytogenes*. Также *Bif. adolescentis*, *Bif. pseudocatenulatum* и *Bif. longum* ингибировали рост устойчивых к ванкомицину *St. aureus* и энтерококков [174]. Помимо этого, бифидобактерии способны конкурировать с патогенами за питательные вещества и сайты адгезии на эпителии кишечника. Антибактериальная активность бифидобактерий в отношении бактерий группы кишечной палочки (БГКП) была исследована для повышения пищевой безопасности говяжьих субпродуктов. Было обнаружено, что в результате ферментации *Bif. bifidum* количество БГКП в мясных субпродуктах снижается [175].

К другим положительным эффектам бифидобактерий можно отнести регуляцию ЦНС. По результатам анализа метагеномных данных было обнаружено, что бифидобактерии являются одними из основных продуцентов нейромедиаторов, что определяет их значительный вклад во взаимодействие микробиоты с ЦНС [101]. Кроме того, они способны производить некоторые водорастворимые витамины (тиамин, фолиевую и никотиновую кислоты, пиридоксин, В₁₂ и рибофлавин) [176-178]. Также бифидобактерии способны модулировать противоопухолевый иммунитет (например, в случае рака толстой кишки), проявлять противовоспалительные эффекты, облегчать симптомы язвенного колита, стимулировать восстановление кишечного эпителия и проявлять ряд других полезных свойств при различных нарушениях микробиоты кишечника и болезнях, связанных с ними [179]. Исследования показали, что *Bifidobacterium adolescentis* является одним из ключевых продуцентов ГАМК,

которая участвует в регуляции артериального давления и сердечного ритма, влияет на восприятие боли и беспокойства, контролирует секрецию гормона роста [180].

1.2.1.2 Лактобактерии

На ряду с бифидобактериями, представители рода *Lactobacillus* являются членами здоровой микробиоты кишечника и входят в состав многих пробиотических препаратов и биологически активных добавок к пище (БАД) [12]. Они принадлежат к типу *Firmicutes* и, относятся к молочнокислым бактериям [181]. В ЖКТ человека, в отличие от бифидобактерий, лактобациллы более распространены в двенадцатиперстной кишке, где их численность составляет около 6% от общего числа микроорганизмов, а в толстом кишечнике представители данного рода немногочисленны (около 0,3 %). В целом, лактобактерии обнаруживаются в теле человека во всех отделах ЖКТ, на коже и во влагалищной полости [182].

Лактобактерии – грамположительные, неспорообразующие, факультативно анаэробные бактерии (примерно 20 % видов, найденных в человеческом организме, облигатные анаэробы), которые представляют собой тонкие палочки различной длины. Они также могут иметь несколько изогнутую форму и тенденцию к цепочному росту [183].

Одним из наиболее изученных и широко применяемых в функциональных продуктах питания является вид *L. plantarum*. В основном, представители данного вида попадают в кишечник человека с ферментированными продуктами такими как, кисломолочные продукты, квашеная капуста, различные сыры, ферментированные колбасы и др. [181]. Интерес к поиску новых пробиотиков среди представителей данного вида не ослабевает. В недавнем исследовании была проведена оценка потенциальной пробиотической активности трех выделенных из различных кисломолочных продуктов штаммов *L. plantarum*. Полученные штаммы выживали в присутствии 1% солей желчных кислот,

обладали кислотообразующей способностью, антибактериальной активностью, значительно ослабляя рост *Sal. enterica* serovar Typhimurium [184].

Вид *L. plantarum* способен к продуцированию таких ферментов как α -амилаза (или 1,4- α -D-глюканглюканогидролаза) – гликозидгидролаза, ответственная за расщепление различных крахмалов с образованием мелких декстринов и олигосахаров; эстераза – гидролаза, расщепляющая сложные эфиры с образованием фенольных спиртов, эфиров с короткой цепью и жирных кислот; различные липазы; альфа- и бета-глюкозидазы; фосфокетолазы, субстрат-специфичные в отношении ксилулозо-5-фосфата, либо фруктозо-6-фосфата, играющие важную роль в энергетическом обмене; лактатдегидрогеназа – основной фермент гомоферментативного молочнокислого брожения, катализирующий восстановление пирувата до лактата. Также некоторые штаммы способны синтезировать такие витамины, как фолиевая кислота, рибофлавин, витамин B₁₂ и др. [181].

Несколько штаммов *Lactobacillus* spp. секретируют низкомолекулярные (менее 1 кДа) и высокомолекулярные (более 1 кДа) бактериоцины. Низкомолекулярные бактериоцины обладают антимикробной активностью за счет разрушения патогенных клеток-мишеней через образование пор или ингибирование синтеза клеточной стенки. Например, низин связывает липид-предшественник клеточной стенки спорообразующих бацилл, тем самым предотвращая ее биосинтез. Антимикробные пептиды встраиваются в мембраны бактериальной клетки, образуя поры, что нарушает целостность мембраны, ослабляет движущую силу протонов и, следовательно, вызывает гибель клеток [124].

Комбинации различных штаммов лактобактерий продемонстрировали высокий антагонизм в отношении *Sal. enterica* serovar Typhimurium. Наибольшее подавление роста (полное подавление) наблюдали при использовании комбинации *L. plantarum* и *L. paracasei* с *L. lactis*. Также штаммы *L. salivarius* C86 и *L. amylovorus* C94 полностью подавляли рост сальмонелл между 8 и 16 часами совместного культивирования [185]. Были проведены исследования

антагонистической активности молочнокислых лактобактерий, устойчивых к некоторым антибиотикам, в отношении тест-штамма *St. aureus*. Пробиотические микроорганизмы, устойчивые к антибиотикам, могут оказаться эффективными для поддержания микробиоты кишечника человека при антибиотико-терапии, однако в данном случае велик риск передачи генов резистентности патогенам, что является крайне опасным фактором [186]. Также была выявлена значительная антагонистическая активность штаммов лактобактерий, входящих в состав пробиотика «Лактобактерин» в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (*Serratia marcescens* chas 2, *E. coli* L1, *Klebsiella* L1, *St. epidermidis*, *St. aureus*, *Listeria monocytogenes* 88В-К, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp.) [180]. В ряде исследований была продемонстрирована способность некоторых штаммов лактобактерий ингибировать процесс пленкообразования и удалять уже сформировавшиеся биопленки, образованные *E. coli* с множественной лекарственной устойчивостью [174]. Также было обнаружено, что пробиотики на основе лактобацилл (*L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum* или *L. salivarius*) способны подавлять рост, образование биопленок и экспрессию генов патогеногенеза *Streptococcus mutans* [187].

Многие представители рода *Lactobacillus* способны к образованию ЭПС. Была выявлена антибактериальная активность ЭПС, продуцируемых бифидобактериями (*Bif. bifidum* WBIN03) и лактобактериями (*L. plantarum* R315) в отношении *Listeria monocytogenes*, *St. aureus*, *Bac. cereus* и *Sal. enterica* и других патогенов. Зона подавления *Cronobacter sakazakii* и *Shigella sonnei* ЭПС лактобацилл превышала таковую в случае ЭПС бифидобактерий. Подавление роста дрожжей *Candida albicans* продуктами метаболизма *L. plantarum* было аналогично действию ампициллина (50 мкг/мл) [188].

Некоторые лактобациллы увеличивают секрецию муцина эпителиальными клетками кишечника, что ограничивает адгезию и выживаемость патогенов [124].

Комменсальные виды *Lactobacillus* spp. могут восстанавливать гомеостаз при кишечных заболеваниях и, таким образом, играть защитную роль против

воспалений. Недавнее исследование показало, что пробиотические виды *L. acidophilus*, вводимые для лечения колита, вызванного декстрансульфатом натрия, восстанавливают баланс воспалительных цитокинов и клеток Th17 / Treg. Также было установлено, что *L. acidophilus* подавляет провоспалительные цитокины, такие как IL-6, фактор некроза опухоли-α и IL-1β в тканях толстой кишки [173].

1.2.2 Пребиотики

Хотя использование диетических олигосахаридов имеет давнюю историю, в основном в странах Азии, первое определение термина «пребиотик» было предложено в 1995 году G. Gibson и M. Roberfroid [189]. Тогда пребиотики были охарактеризованы как «неперевариваемые пищевые ингредиенты, которые благотворно влияют на хозяина, избирательно стимулируя рост и/или активность одного или ограниченного числа бактерий в толстой кишке, и таким образом улучшает здоровье хозяина».

В дальнейшем определение термина «пребиотик» было неоднократно пересмотрено. В 2004 году определение пребиотиков было изменено на «селективно ферментируемые ингредиенты, которые допускают определенные изменения как в составе, так и в активности микрофлоры желудочно-кишечного тракта, что способствует благополучию и здоровью хозяина» [190]. Согласно этому определению, для применения вещества в качестве пребиотика требовалось три критерия: отсутствие усвоения в верхних отделах ЖКТ; способность к ферментированию кишечными микроорганизмами; и избирательная стимуляция роста и / или активности кишечных бактерий, приносящих пользу макроорганизму. Основным выводом нового определения являлась необходимость продемонстрировать положительный эффект именно в экспериментах на людях. Широкому обсуждению подвергся постулат о селективном действии пребиотиков в связи с наличием большого числа экспериментальных подтверждений стимулирования нескольких таксонов, а не отдельных видов. В декабре 2016 года Международная научная ассоциация

пробиотиков и пребиотиков (ISAPP) созвала группу экспертов в области микробиологии, питания и клинических исследований для пересмотра определения и области применения пребиотиков [13]. Последнее определение звучало как «субстрат, который избирательно используется микроорганизмами хозяина, принося пользу для здоровья» [13]. В нашей стране более популярно было понятие бифидус- или бифидогенных факторов. К ним относили вещества, которые способствовали росту бифидобактерий как *in vivo*, так и *in vitro*, что послужило основой для методов оценки пребиотической активности через «бифидогенные свойства» [191], описанных далее (п. 1.2.2.3).

Последнее определение значительно расширило концепцию пребиотиков. Введение пребиотиков возможно не только перорально, но также и на кожу, в полость влагалища. Также область поиска пребиотиков больше не ограничена веществами углеводной природы (рисунок 4). К ним могут относиться полифенолы и полиненасыщенные жирные кислоты, преобразованные в соответствующие конъюгированные жирные кислоты, при условии доказательства пользы для организма. Окончательным этапом доказательства пребиотической природы вещества должно являться испытание на людях, проведенное должным образом (слепое плацебо-контролируемое исследование с соответствующими критериями исключения и / или включения), хотя предварительные эксперименты *in vitro* признаны полезными и даже необходимыми для углубленного исследования механизмов действия того или иного вещества. Стимулирование также не обязательно должно быть обращено на бифидо- и лактобактерий, так как, было признано, что польза для здоровья может быть получена и от воздействия на другие таксоны, включая (но не ограничиваясь) *Roseburia*, *Eubacterium* или *Faecalibacterium* spp. Однако, пребиотики не должны стимулировать членов микробиоты, приносящих негативные эффекты, таких как газообразующие клостридии. Также было постулировано, что полезное воздействие, не связанное с микробным метаболизмом, не является пребиотическим [13].



Рисунок 4 - Пребиотики и не пребиотики в соответствии с последним определением. КЛК - конъюгированная линолевая кислота; ПНЖК - полиненасыщенные жирные кислоты; ФОС - фруктоолигосахариды; ГОС - галактоолигосахариды; МОС - маннанолигосахариды; КОС - ксилоолигосахариды (приведено по [13]).

В настоящее время основными пребиотиками (обладающими достаточной доказательной базой) являются неперевариваемые углеводы, такие как фруктоолигосахариды (ФОС) и инулин, галактоолигосахариды (ГОС) и лактулоза. Также изучали потенциал пребиотического использования олигосахаридов сои, изомальтоолигосахаридов (ИМО), ксилоолигосахаридов (КОС), ксилополисахаридов (КПС), полидекстрозы, бета-глюканов и арабиноксиланов. Тем не менее, большая часть имеющихся в научной литературе данных о пребиотических эффектах относится к ФОС и инулину [192].

Положительное воздействие пребиотиков на здоровье человека может заключаться в пользе для желудочно-кишечного тракта (подавление патогенов, иммуностимуляция), кардиометаболизма (снижение уровня липидов в крови, влияние на инсулинорезистентность), психического здоровья (стимулирование выработки метаболитов, влияющих на функцию мозга, энергию и мыслительную активность) и костей (повышение биодоступности минералов) [192].

Влияние фукозы на микробиоту ЖКТ исследовали на опытных животных с экспериментальным дисбиозом (после приема антибиотиков) [70]. Пероральное введение мышам фукозы в различных дозах (0,01%, 0,02% и 0,04% от массы тела) приводило к увеличению количества бифидобактерий и молочнокислых бактерий уже на 7 сутки после введения. Оптимальной концентрацией фукозы, достаточной для коррекции дисбиоза, была принята 0,02% к массе тела опытных животных. Также было продемонстрировано положительное влияние фукозы на степень фукозилирования ооцитов, долю способных к оплодотворению яйцеклеток и уровень антител в сыворотке крови.

Пребиотическая активность полисахаридов зачастую связана с молекулярной массой. Причем, исследования показывают, что эффект введения более крупных молекул может быть выше. Например, было подтверждено экспериментально [193] повышение выживаемости *L. bulgaricus* при хранении кисломолочных продуктов путем добавления высокомолекулярного хитоза (350 кДа). Причем, концентрация живых клеток после 17 часов хранения при 4 ± 2 °C *L. bulgaricus* повышалась, а титруемая кислотность продукта снижалась, при повышении молекулярной массы и концентрации вносимого хитозана. Что, по-видимому, было связано со снижением метаболизирования лактозы в молочную кислоту.

Многочисленные исследования продемонстрировали способность пребиотиков повышать количество бифидобактерий в микробиоте, что коррелируется с другими изменениями в общем составе микробиоты и метаболизме. Стимулирование бифидобактерий с помощью пребиотиков, включая инулин, арабиноксиланы, ГОС и ФОС, также повышает долю представителей родов *Lactobacillus-Bifidobacterium* по отношению к *Enterobacteriaceae* и усиливает продуцирование КЦЖК [159].

Различия в молекулярной структуре пребиотиков определяют различия путей их метаболизма кишечными бактериями, что обуславливает вариабельность опосредованных приемом пребиотиков эффектов. Понимание механизмов, с помощью которых различные углеводы разлагаются

микробиотой, в частности, включаются ли они в сети перекрестного питания или используются исключительно одним видом организмов, имеет решающее значение для разработки нутрицевтических стратегий модуляции микробиоты кишечника. Например, комплексные глюкуроноарабинокслины способствуют росту бактерий *Bact. ovatus*, которые продуцирует пропионат, тогда как разложение простых ксиланов этим же микроорганизмом также способствует росту бифидобактерий и выработке бутирата. Таким образом, можно разработать индивидуальные диеты на основе ксилана, для направленного положительного влияния на здоровье человека [62].

Пребиотики стимулируют рост пробиотических бактерий и образование ими КЦЖК, тем самым способствуя положительному действию пробиотиков. Пробиотики и пребиотики можно рассматривать как возможные терапевтические агенты когнитивных нарушений [150].

Основными способами получения пребиотиков являются:

- Экстракция из растительного сырья (олигосахариды сои, инулин цикория и топинамбура);
- Ферментативный гидролиз полисахаридов (ФОС, КОС) [194];
- Ферментативный синтез из моносахаридов (ФОС, ГОС, лактосахара) [195];
- Химическая конверсия (лактолоза, лактитол) [196, 197].

1.2.2.1 Некоторые пребиотические субстраты

Инулин и ФОС

Инулин – полисахарид фруктанового типа, встречается во многих растениях в качестве запасного углевода. В промышленных масштабах инулин получают в основном из топинамбура и цикория, хотя он также был обнаружен более чем в 30 000 видов растений, включая чеснок, спаржу, лук и другие. Исследования показали, что инулин обладает широким спектром биологических свойств. Как пребиотик инулин используется для оптимизации микробиологического статуса кишечника, регуляции уровня сахара в крови, регуляции липидов в крови, антиоксиданта, противоопухолевого средства, средства для иммунной регуляции и т.д. В настоящее время инулин также широко используется в пищевой (загуститель, жиро-, сахарозаменитель, водоудерживающий агент) и фармацевтической (стабилизатор, носитель лекарственных средств, вспомогательный терапевтический агент при запоре, диабете и др.) промышленности [198]. В исследовании на самцах крыс Вистар было показано, что добавка инулина в рацион способствует более быстрому восполнению дефицита витаминов, однако, была отмечена необходимость детальных исследований влияния пребиотиков на усвоение витаминов организмом [199].

В молекуле инулина остатки фруктозы связаны между собой β -(2→1)-D-фруктозил-фруктозными связями. Обычно в молекуле присутствует концевая D-глюкоза с α -(1→2) связью (рисунок 5). Степень полимеризации инулина может варьироваться от 2 до 60, но обычно лежит в пределах 10-12 мономеров. Фруктаны с низкой степенью полимеризации (до 10) обычно называется олигофруктозой (ОФ) и широко применяется в качестве пребиотиков [198]. ОФ промышленно получают путем ферментативного гидролиза инулина. Коммерческая ОФ (Orafti® P95, Veneo-Orafti, Belgium) со степенью полимеризации от 2 до 8 наиболее часто применяется в исследованиях, посвященных оценке пребиотической активности веществ, в качестве контрольного (стандартного) пребиотика.

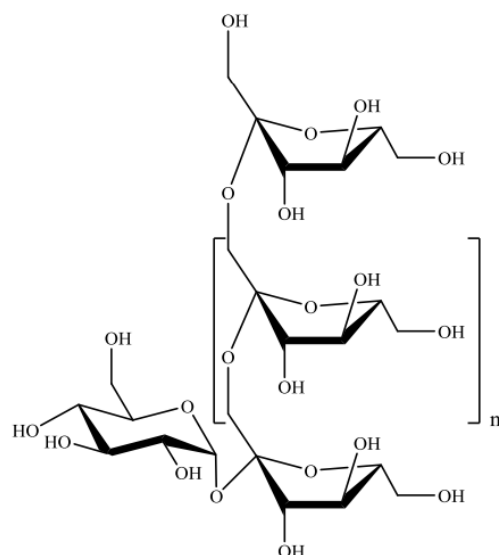


Рисунок 5 - Структурная формула инулина

Связи между мономерами в молекулах инулина и ОФ не гидролизуются пищеварительными ферментами человека, однако разрушаются под действием β -фруктанозидазы и β -галактозидазы, которые преобладают у бифидобактерий. Поэтому пребиотики инулинового типа стимулируют, в основном представителей данного рода. Причем, бифидобактерии предпочтительно метаболизируют инулины со степенью полимеризации от 4 до 30 [192].

Было выявлено, что введение водорастворимых волокон, таких как олигофруктоза и длинноцепочечный инулин, способствует восстановлению качественного и количественного состава микробиоты, уменьшает прибавку в весе, снимает воспаление, а также улучшает метаболизм глюкозы, что может быть связано со снижением кишечной проницаемости и эндотоксемии [9]. При исследовании реакции на введение различных доз инулина в питание детей на искусственном вскармливании было показано, что статистически значимое увеличение относительного содержания бифидобактерий было вызвано введением 0,4 г в 100 мл, тогда как введение 0,2 г в 100 мл не оказывало положительного эффекта, что свидетельствует о дозозависимом эффекте [200].

Олигосахариды грудного молока

ОГМ представляют собой водорастворимые углеводы, содержащие в качестве мономеров галактозу, глюкозу, фукозу, N-ацетилглюкозамин или сиаловую кислоту. Грудное молоко содержит три основных типа ОГМ: нейтральные (фукозилированные) (например, 2-фукозиллактоза), нейтральные N-содержащие (лакто-N-тетраоза) и кислые (сиалилированные) ОГМ (например, 3-сиалиллактоза) [201]. Эти углеводы особенно важны для развития микробиоты кишечника новорожденного, метаболической и иммунной систем. Потребление материнского молока, содержащего ОГМ, увеличивает долю бифидобактерий и бактериоидов в микробиоте. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (*Bif. infantis*) – единственный представитель рода *Bifidobacterium*, способный к полному метаболизму всех видов ОГМ [192].

ОГМ эффективно противодействуют прикреплению патогенов к эпителию кишечника как косвенным образом (через стимулирование антагонистических эффектов бифидо- и лактобактерий, описанное выше), так и напрямую – через взаимодействие с факторами адгезии патогена или проникновение в структуру биопленки, ингибируя адгезию. Такие механизмы были продемонстрированы, например, в отношении *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella fytis*, *Neisseria meningitidis*, *Acinetobacter baumannii* и других [201].

Раффиноза

Раффиноза ($C_{18}H_{32}O_{16}$) – это нередуцирующий трисахарид, состоящий из остатков D-галактозы, D-глюкозы и D-фруктозы (рисунок 6). Данный олигосахарид накапливается в семенах бобовых (преимущественно, в соевых бобах) во время созревания и используется в качестве источника углерода и энергии, особенно во время прорастания, когда ее содержание значительно снижается. Раффиноза не переваривается в верхних отделах ЖКТ и попадает в толстый кишечник в качестве субстрата для членов микробиоты, обладающих α -галактозидазой [202]. Пребиотический потенциал раффинозы был исследован в сравнении с лактулозой, схожей по структуре молекулы, методом *in vitro* с

использованием фекальных инокулятов человека. Введение данных пребиотиков вызвало увеличение относительной численности бифидо- и лактобактерий, повысило уровень КЦЖК в кишечнике, а также привело к снижению количества протеобактерий и энтеропатогенной кишечной палочки [203].

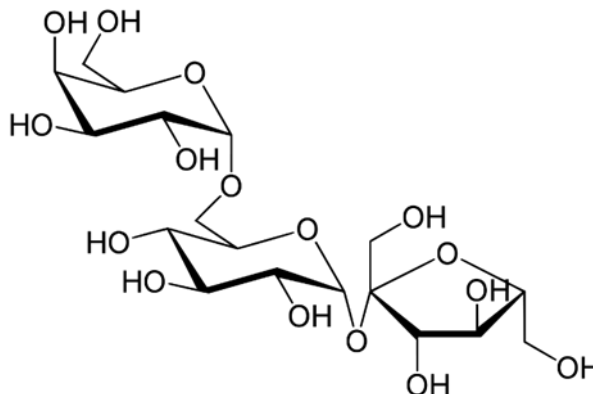


Рисунок 6 - Структурная формула раффинозы

Лактулоза

Лактулоза – дисахарид, состоящий из молекулы фруктозы и галактозы, соединенных бета-гликозидной связью (рисунок 7). Лактулозу промышленно получают путем изомеризации лактозы [196, 197, 204].

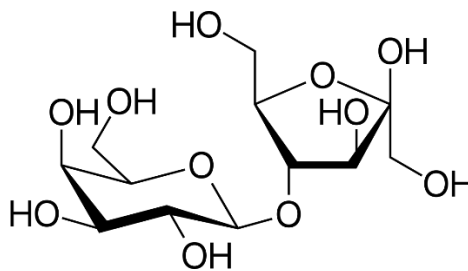


Рисунок 7 - Структурная формула лактулозы

При периодическом культивировании образцов фекалий *in vitro* было выявлено большее увеличение численности бифидобактерий в среде с лактулозой, чем в среде с инулином. Кроме того, продуцирование пропионата было значительно выше при использовании инулина и лактулозы, чем в контрольном эксперименте (без пребиотика), а количество лактата было выше, чем в среде с инулином [205]. Положительное воздействие лактулозы на

микробную популяцию влагалища оценивали *in vitro*. Использование лактулозы в качестве субстрата повышало максимальное количество лактобактерий и вызывало более значительное снижение pH, по сравнению со средой без пребиотика. Кроме того, лактулоза не стимулировала вагинальные патогены [206]. Также была продемонстрирована перспективность получения бифидогенных концентратов на основе молочной сыворотки, обогащенной лактулозой и молочными белками [204].

Изомальтулоза (палатиноза)

Изомальтулозу (рисунок 8) получают путем модификации гликозидных связей из α -1,2 в α -1,6 в сахарозе с помощью фермента α -гликозилтрансферазы с последующей кристаллизацией и концентрированием [196]. Коммерческое название – «Палатиноза». В природе изомальтулоза содержится в меде и соке сахарного тростника [207].

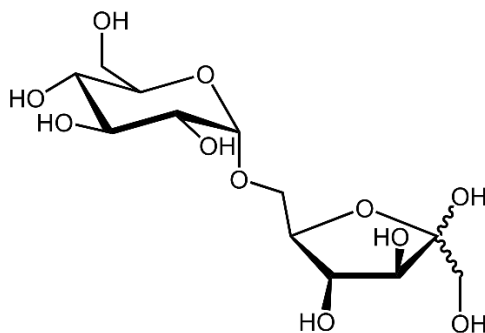


Рисунок 8 - Структурная формула изомальтулозы

Исследование пребиотического эффекта изомальтулозы *in vitro* проводили в четырех-стадийной полунепрерывной модели толстого кишечника [208]. Было выявлено стимулирование роста пробиотических штаммов лактобактерий и бифидобактерий. Кроме того, совместное внесение пробиотических лактобактерий и изомальтулозы снизило соотношение *Bacteroidetes* / *Firmicutes* при культивировании фекальных культур.

Исследование пребиотических свойств изомальтулозы *in vivo* было проведено на модели самцов крыс линии Sprague – Dawley. Было обнаружено

увеличение относительной численности полезных бактерий и снижение количества условных патогенов при потреблении изомальтулозы. В основном стимулирование было направлено на рода бактерий, продуцирующие бутират (*Faecalibacterium*, *Blautia*, *Phascolarctobacterium* и *Flavonifractor*), что было подтверждено как ПЦР-анализами, так и повышением концентрации масляной кислоты в образцах фекалий [207].

1.2.2.2 Функциональные свойства экстрактов растений

Большинство пищевых волокон обнаружено в различных растениях. Применение экстрактов растений имеет давнюю историю, особенно в Древнем Китае, однако активно развивается и в наши дни. Современные методы анализа химического состава различных веществ, присутствующих в растениях, помогли глубже понять механизмы их полезного действия и обосновать возможность применения в различных сферах, в том числе в качестве модуляторов кишечной микробиоты и для сохранения безопасности пищевых продуктов [209]. Экстракты растений – источников пребиотических веществ, могут содержать смесь полисахаридов различной молекулярной массы, а также неуглеводные вещества с потенциальным положительным эффектом на микробиоту (например, полифенолы), что обуславливает значительный интерес к ним как к функциональным ингредиентам [210].

Полисахариды фруктанового типа, выделенные из корней стевии, были исследованы *in vitro* для оценки пребиотического эффекта в отношении пробиотических штаммов бифидо- и лактобактерий. Штамм *Bif. bifidum* CCDM 559 продемонстрировал большее увеличение численности и продуцирования кислот при росте в среде с выделенными полисахаридами, осажденными из водного экстракта стевии этанолом (при соотношении объемов этанол: экстракт - 1:3), чем в среде с коммерческим пребиотиком ОФ (Orafti® P95). Однако результаты экспериментов с другими исследованными штаммами показали меньшее или равное стимулирование по сравнению с коммерческим

пребиотиком, что свидетельствует о штамм-специфичном эффекте [211]. В недавнем исследовании был продемонстрирован пребиотический потенциал водного экстракта артишока, хотя стимулирование бифидобактерий оказалось ниже, чем при использовании ОФ [212]. ФОС, выделенные из салатного цикория (*Cichorium endivia* L.), способствовали большему увеличению численности пробиотических штаммов лактобактерий, чем глюкоза (отрицательный контроль), а рост штамма *Bif. animalis* на полученных фруктанах близок к таковому в среде с коммерческой ОФ. Экстрагированные ФОС имели такую же химическую структуру, что и коммерческая ОФ, но с большим содержанием свободных углеводов [213]. Углеводная фракция, полученная водной экстракцией из обезжиренных желудей с последующим осаждением 80%-ным этанолом, продемонстрировала способность к стимулированию роста и стабильности нескольких штаммов лактобактерий. Культура, выросшая в среде с выделенными ФОС характеризовалась более высокой конечной численностью *L. plantarum* и стабильностью при длительном культивировании (72 ч). Полученные характеристики были выше, чем в среде с глюкозой, и сопоставимы с результатами, полученными с коммерческим инулином [214].

Особое значение имеют растения с высоким содержанием веществ с доказанной пребиотической активностью. Клубни топинамбура (*Helianthus tuberosus*) содержат до 21 % инулина (по сырой массе), а также гемицеллюлозу, клетчатку, маннозу, фруктозу и другие углеводы. Общее содержание углеводов в клубнях достигает 14% СВ [215]. В состав клубней входят также некоторые витамины (В₁, В₂ и С) и аминокислоты (в том числе, незаменимые) [215, 216]. Среди незаменимых аминокислот наибольшее содержание отмечается для аргинина (до 1,2 % СВ), а среди заменимых – для аспаргиновой и глютаминовой кислот [215].

В исследованиях на мышах было проведено сравнение действия различных экстрактов топинамбура с действием на микробиоту коммерческого инулина. Потребление топинамбура изменило состав микробиоты кишечника, снизило рН, за счет стимуляции продуцирования КЦЖК. Причем наибольшее влияние на

микробиоту оказывал экстракт, полученный с помощью органических растворителей, тогда как стимулирование синтеза КЦЖК, в основном, обеспечивалось водорастворимой фракцией. Было зафиксировано увеличение относительной численности бифидобактерий при добавлении экстракта топинамбура в диету мышей. В целом, эффективность экстрактов была выше, чем в случае использования коммерческого инулина [217]. Также было проведено исследование на лошадях, которое выявило повышение численности бактерий рода *Lactobacillus*, одновременно с понижением численности *Streptococcus* spp, и увеличение общего микробного разнообразия практически во всех отделах ЖКТ животных [218]. В других исследованиях на животных было показано, что топинамбур снижает уровень глюкозы в плазме, общего холестерина и триглицеридов, также в исследованиях на людях было обнаружено, что экстракт клубней топинамбура действует как цитотоксический агент против клеток рака груди [219]. Благодаря богатству химического состава топинамбур может быть использован в медицине и фармацевтической промышленности, поскольку он содержит фунгистатические, антиканцерогенные и антиоксидантные компоненты, а производство сырья является простым и недорогим. Он также выводит токсины из организма (например, алкоголь, тяжелые металлы, радионуклиды); снижает уровень мочевой кислоты; обладает иммуностимулирующими свойствами; защищает слизистую желудка, предотвращает запоры; улучшает обмен веществ при липидных нарушениях; помогает при сердечно-сосудистых заболеваниях, хронических инфекционных заболеваниях; синдроме хронической усталости [220].

Ещё одним растением с перспективами использования в функциональных целях является лопух (*Arctium lappa*). Лопух является одним из признанных лекарственных растений в азиатских странах, например, на протяжении более 3000 лет он применяется в традиционной китайской медицине, однако в западных странах интерес к данному растению появился сравнительно недавно [221]. В России корень лопуха включен в список лекарственных средств

(ФС.2.5.0025.15. Лопуха корни). Согласно данной статье в корне лопуха должно содержаться не менее 8% полисахаридов (в пересчете на фруктозу) и не менее 35% веществ, экстрагируемых водой [222]. Основными биоактивными соединениями в корне лопуха являются танин, арктигенин, арктиин, бета-эвдесмол, кофейная кислота, хлорогеновая кислота, инулин, трахелогенин 4, ситостерол-бета-D-глюкопиранозид, лаппаол и диарктигенин [221].

Экстракты из различных частей лопуха могут проявлять противовоспалительную, противоопухолевую, противодиабетическую, противомикробную и противовирусную активность. Противовоспалительный эффект (в основном обеспечивается действием лаппаола F, диарктигенина, арктигенина) может быть основан на блокаде цистеинил лейкотриенов (таких как гистамин и простагландины), ингибировании продуцирования NO, ингибировании пути ядерного фактора-каппа B, активации антиоксидантных ферментов или удалении свободных радикалов. Противоопухолевая (в частности, противораковая активность) опосредована действием арктигенина, проявляющего цитотоксичность в отношении раковых клеток при недостатке питательных веществ; полифенольных соединений, подавляющих метастазирование рака; танина (фенольного соединения), индуцирующего реакции макрофагов, ингибирующего рост опухоли и обладающего иммуномодулирующими свойствами. Противодиабетическая активность обеспечивается ситостерол-бета-D-глюкопиранозидом, ингибирующим α -гликозидазы; инулином, способствующим поддержанию уровня глюкозы в крови; лигнанами. Полиацетиленовые ингредиенты, извлеченные из корня лопуха, обладают мощной антибактериальной и противогрибковой активностью. Фенольные компоненты, такие как кофейная кислота и хлорогеновая кислота, обладают сильным ингибирующим действием на вирус герпеса (HSV-1, HSV-2) и аденовирус (ADV-3, ADV-11), а арктигенин продемонстрировал активность против вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) как *in vivo*, так и *in vitro* [221]. Следует отметить, что помимо разнообразия полезных свойств применение экстрактов корня лопуха может привести и к некоторым побочным

эффектам, таким как индукция контактного дерматита, аллергические реакции или пониженное давление [223]. В результате исследований на животных и на людях было обнаружено, что полисахариды, выделенные из корня лопуха, очищенные от белковых примесей, облегчают артериальный тромбоз за счет восстановления баланса тромботических / антитромботических факторов и ингибирования адгезии тромбоцитов [224].

Пребиотические свойства экстракта корня лопуха были исследованы на мышинной модели в сравнении с инулином и целлюлозой. В группе, получавшей корень лопуха, было зафиксировано снижение потребления пищи и дозависимое увеличение продуцирования КЦЖК и молочной кислоты. На уровне родов относительная численность *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. была увеличена в группе, получавшей лопух, по сравнению с группами целлюлозы и инулина, одновременно со снижением относительной численности *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Oscillospira* spp. Доля стафилококков в микробиоте была выше в группе, принимавшей инулин, по сравнению с группами, получавшими целлюлозу и корень лопуха. В целом результаты показали, что даже низкие дозы корня лопуха оказывают сильное влияние на микробиоту [225]. В слепом двойном рандомизированном плацебо-контролируемом клиническом исследовании была выявлена эффективность веществ из лопуха для подавления инфекции, вызванной *Helicobacter pylori*. Предварительно, в исследованиях *in vitro* было обнаружено, что соединения, выделенные из лопуха способны подавлять рост и адгезию патогена [226].

Выделение полисахаридов из корня лопуха осуществляется в несколько стадий, похожих на выделение инулина из топинамбура. Первоначально сырье обезжиривают в 95%-ном этаноле. Затем проводят экстракцию водой при 80 °С в течение 2 часов. Далее экстракт фильтруют и концентрируют до четверти от первоначального объема, обесцвечивают и удаляют белковые примеси по методу Севага (осаждение белков под действием хлороформа и бутанола). Выход неочищенных полисахаридов при экстракции составил 4,4 %. При хроматографическом анализе моносахаридов было выявлено, что извлеченные

полисахариды состоят из фруктозы и глюкозы. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) подтвердил, что основной структурной единицей выделенных полисахаридов является (2→1)-β-D-фруктофураноза, связанная с (2→1)-α-D-глюкопиранозой на нередуцирующем конце и (2→6)-β-D-фруктофуранозными разветвлениями, что соответствует структуре фруктанов инулинового типа. Выделенные фруктаны способствовали восстановлению регуляции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в исследованиях колита на мышах, а также способствовали значительному увеличению количества *Firmicutes*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* и *Lactobacillus*, при снижении *Proteobacteria*, *Alcaligenaceae*, *Staphylococcus* и *Bacteroidetes* [227].

1.2.2.3 Критерии оценки пребиотической активности веществ

Число веществ с предполагаемой пребиотической активностью растет с каждым годом. Значительному расширению сферы поиска способствовало решение не ограничивать исследования веществами углеводной природы, принятое в 2016 году на съезде ISAPP. Понимание необходимости сравнительного критерия оценки эффективности пребиотиков появилось вскоре после появления научной концепции. Был разработан ряд количественных критериев, базирующихся на свойствах пребиотиков, в частности, на избирательной стимуляции полезных членов микробиоты. Как правило, на первоначальных этапах разработки новых пребиотиков сравнение пребиотической активности проводят методами *in vitro*. Для этого проводят ферментации чистых культур конкретных микроорганизмов или фекальных культур в средах с исследуемым пребиотиком в качестве углеводного субстрата.

Первым разработанным количественным критерием оценки пребиотической активности был **пребиотический индекс (PI)** [83]. Метод определения пребиотического индекса основан на сравнении изменений относительных численностей положительных (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) и негативных (*Clostridium*, *Bacteroides*) членов бактериального сообщества в

конечный момент периодического культивирования фекальной культуры в среде с пребиотическим субстратом. Схема культивирования для определения PI может различаться, но, как правило, ферментацию проводят в условиях, близких к условиям кишечника (37 °С, анаэробные условия, специальный состав питательной среды, с поддержанием рН или без него) Формула расчета PI имеет следующий вид:

$$PI = \frac{Bif}{Total} - \frac{Bac}{Total} + \frac{Lac}{Total} - \frac{Clos}{Total} \quad (1)$$

где Bif, Bac, Lac, Clos, – это количество бифидобактерий, бактероидов, лактобацилл и клостридий, соответственно, в конкретный момент, отнесённое к их начальным титрам (в % или долях); Total – это общее количество бактерий в конкретный момент, отнесённое к начальному (в % или долях).

Формула расчета подразумевает, что если изменение относительной численности конкретной группы выше, чем увеличение численности всей популяции, то слагаемое для данной группы выше 1. Соответственно, если исследуемый пребиотический субстрат вызывает большее увеличение численности бифидо- и лактобактерий, чем клостридий и бактероидов, то PI положительный и вещество можно отнести к пребиотикам. Данный метод сравнительно прост, но имеет недостатки: 1) не учитывается концентрация пребиотика; 2) некоторые пребиотики могут стимулировать не рост членов микробиоты, а выработку ими полезных метаболитов, что не учитывается при расчете PI. Кроме того, не все бактероиды являются патогенными, их статус в микробиоте до конца не ясен [191].

На протяжении почти двух десятилетий данный метод широко применяется для сравнения пребиотиков по всему миру. Так, например, на основании оценки PI был подтвержден пребиотический потенциал бактериального гомополисахарида курдлана, состоящего из (1→3)-β-D-глюкановых фрагментов. PI выделенного полисахарида был положительным, хотя и несколько ниже значения, полученного в случае инулина [228]. При периодической ферментации фекальных культур с поддержанием рН был определен PI нескольких

очищенных бактериальных и коммерческих ГОС [229]. В отечественном исследовании провели сравнение PI олигофруктозы и олигогалактуронанов, полученных ферментативным гидролизом цитрусового и яблочного пектинов. Пребиотический индекс полученных производных оказался ниже значения, полученного для ОФ (0,118), но выше PI негидролизированных пектинов [230]. Подход к оценке PI, в особенности, способ культивирования, может отличаться в некоторых исследованиях, что приводит к ошибкам в терминологии. Так, например, в 2018 году было опубликовано исследование, посвященное оценке пребиотической активности полисахаридов, выделенных из женьшеня. Однако PI в данной работе рассчитывали на основании изменений численности лактобактерий и *E. coli* при отдельном культивировании, как отношение оптических плотностей [231]. Данный подход соответствует методу оценки prebiotic activity score.

В 2004 году метод определения PI был модифицирован путем учета скоростей роста популяций и продуцирования КЦЖК [84]. Новый критерий был назван «мера пребиотического эффекта» (МРЕ). Он показывает степень воздействия пребиотика на рост основных бактериальных групп, встречающихся в кишечнике человека, в экспоненциальной фазе с акцентом на увеличение численности бифидо- и лактобактерий и продуцирование КЦЖК. Предложенный критерий рассчитывается с помощью трёх уравнений, описывающих потребление субстрата, изменение численности бактерий (модифицированный пребиотический индекс (PI_m) и продуцирование кислот (уксусной, молочной, масляной и пропионовой). PI_m в данном случае рассчитывается как сумма максимальных удельных скоростей роста бифидо-, лактобактерий и эубактерий, за вычетом максимальных удельных скоростей роста бактероидов, клостридий, *E. coli* и сульфат-редуцирующих бактерий. Таким образом, данный критерий более полно описывает воздействие пребиотика на кишечную популяцию.

В зарубежной литературе примеров использования критерия МРЕ значительно меньше, чем PI. Данный критерий рассчитывали при исследовании

сыров, обогащенных пребиотиками и пробиотиками, однако, измеряемый эффект был скорее синбиотическим, чем пребиотическим [232]. В нашей стране метод оценки MPE применяли, например, для сравнения пребиотической активности лактитола (производное лактозы), сукцината, хитозана, рафтилозы (положительный контроль) и целлюлозы (отрицательный контроль) [233].

В 2007 году был предложен новый подход к оценке пребиотической активности веществ и, соответственно, новый критерий оценки – **prebiotic activity score (PAS)** [234]. PAS характеризует способность пребиотика стимулировать рост полезного микроорганизма (как правило, пробиотического штамма) по отношению к росту непробиотических бактерий (в частности, *E. coli*) в сравнении с ростом на непробиотическом субстрате (глюкозе). Принципиальным отличием данного метода является использование чистых культур микроорганизмов, а не фекальных культур. При этом, создатели критерия предположили, что конечная численность пробиотика при росте в среде с пребиотиком должна быть сравнима с таковой при росте на глюкозе. То есть, вещество может являться пребиотиком даже если его стимулирующее воздействие на пробиотик не превышает таковое в случае непробиотика при условии, что рост непробиотика на данном субстрате ниже, чем на глюкозе.

Данный подход более прост в исполнении по сравнению с перечисленными выше, не требует применения молекулярно-генетических анализов для определения численности микроорганизмов и достаточно часто применяется для сравнения различных пребиотиков, хотя имеет серьезные недостатки: не учитывается воздействие вещества на представителей микробиоты; не оценивается влияние пребиотика на продуцирование метаболитов. Определенная таким образом пребиотическая активность не иллюстрирует действие в реальном кишечном биоценозе, однако данный метод может применяться для выбора оптимальных синбиотических композиций пробиотика и пребиотика, в которых пребиотик будет стимулировать аллохтонный полезный микроорганизм (пробиотик).

PAS был применен для оценки пребиотической активности полисахаридов, выделенных из индийских съедобных морских водорослей. Все выделенные полисахариды стимулировали рост пробиотического штамма *L. plantarum* и подавляли рост *Sal. enterica* serovar Typhimurium [235]. Также данным методом исследовали пребиотическую активность ГОС, продуцируемых пропионовокислыми бактериями из лактозы и лактулозы [204], пектиновых олигосахаридов, выделенных из кожуры цитрусовых [236], инулина, выделенного из индийского проса [237].

В отечественной литературе широко применяется метод оценки «**бифидогенной активности**» или «бифидогенных свойств», являющийся частным примером пребиотической активности. Данный метод описан в ГОСТ Р 56201-2014 «ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ. Методы определения бифидогенных свойств» в нескольких вариантах [191, 238]. Первый вариант основан на выявлении *in vitro* стимулирования роста тест-штаммов микроорганизмов родов *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. и вида *Escherichia coli* функциональным пищевым продуктом по сравнению с контролем. Второй метод предусматривает изучение воздействия пребиотика на степень выживания представителей защитной микробиоты (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. и вида *Escherichia coli*) и их функциональные свойства (кислотообразование) в экспериментальной модели *in vitro* в условиях, имитирующих процесс прохождения через ЖКТ (с последовательным переносом инокулята в модельные питательные среды). Третий метод осуществляют *in vivo* на контрольных животных. Для этого производят посев содержимого толстой кишки лабораторных животных, получавших функциональный пищевой продукт с кормом, при сравнении с интактными контрольными животными. Изучение микробных популяций проводят с помощью соответствующих дифференциально-диагностических и селективных сред [191].

В отечественных исследованиях бифидогенной активности, обычно, не применяют количественные критерии, а степень воздействия оценивают путем

сравнения удельных скоростей роста, конечной численности, рН и/или концентрации кислот при выращивании моно-культуры какого-либо штамма бифидобактерий (чаще всего, коммерческих пробиотиков) в среде с потенциальными пребиотиками. Так, например, было проведено сравнение максимальной численности культуры *Bif. bifidum* в среде с гидролизатом маннана, маннозой, инулином (контроль-пребиотик) и лактозой (контроль-непребиотик). Было показано, что конечная численность бифидобактерий в среде с гидролизатом маннана, маннозой и инулином, значительно превышала таковую при росте на лактозе [239]. Аналогичным методом была исследована бифидогенная активность тагатозы (кетогексоза, производное лактозы), фукозы (компонент гликопротеидов) [240], биогеля из бурых водорослей [241], КОС из пшеничных и ржаных отрубей [242] и других веществ.

1.2.3 Синбиотики

Положительные эффекты пробиотиков и пребиотиков можно объединить и усилить, внося их совместно, в составе синбиотиков. Согласно последнему определению, принятому на съезде ISAPP в мае 2019 года, синбиотик – это «смесь, содержащая живые микроорганизмы и субстрат (субстраты), избирательно метаболизируемый микроорганизмами хозяина, которые приносят пользу для здоровья хозяина». При этом «микроорганизмы хозяина» включают как автохтонные (представители здоровой микробиоты), так и аллохтонные (поступающие извне, например, пробиотики) [14].

Синбиотики подразделяются на две категории: комплементарные и синергетические (рисунок 9). В комплементарных синбиотиках пребиотический субстрат может не стимулировать вводимый с ним пробиотический микроорганизм и метаболизироваться только автохтонной полезной микробиотой, тогда как в синергетических синбиотиках стимулирование вводимого пробиотика пребиотическим компонентом обязательно. Разумеется, пробиотики и пребиотики, составляющие синбиотик, должны соответствовать

всем критериям, описанным выше. Для синергетических синбиотиков доказательная база должна содержать также подтверждение того, что положительный эффект от введения комбинации выше эффектов от введения компонентов по-отдельности [14].



Рисунок 9 - Дизайн и механизмы действия комплементарных и синергетических синбиотиков (приведено по [185])

С целью исследования полезного воздействия предполагаемых синбиотиков на организм человека были проведены многочисленные рандомизированные контролируемые испытания на людях в различных популяциях, от здоровых людей до людей с острыми и хроническими заболеваниями. Согласно результатам исследований, представители родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Streptococcus* являются наиболее часто применяются в качестве живых пробиотических добавок и препаратов. Пребиотическими компонентами обычно являются галактоолигосахариды, инулин или фруктоолигосахариды, но дозы значительно различаются: от 100 мг до 10–15 г в день [14].

В результате исследований на мышах было показано, что совместное введение пребиотика тагатозы и пробиотика *Lactobacillus rhamnosus* GG способствует нормализации качественного и количественного состава микробиоты кишечника после колита, индуцированного декстрансульфатом натрия. Причем, наиболее близкие к нормальным (определенным для здоровой

микробиоты) значения измеряемых параметров были получены именно в случае введения синбиотика, тогда как введение пре- или пробиотика по-отдельности приводило к несколько большему отклонению от нормы [243]. В рандомизированном слепом плацебо-контролируемом параллельном клиническом исследовании на людях с ожирением было выявлено положительное влияние введения синбиотика на основе бифидобактерий и ГОС на проницаемость толстого кишечника, хотя эффекта синергии между компонентами не было [244].

При периодическом культивировании фекальных культур *in vitro* было обнаружено, что синбиотические композиции на основе штаммов *Bif. lactis* и ФОС оказывают большее положительное воздействие на микробное сообщество и продуцирование КЦЖК, чем индивидуальные пробиотики, однако степень воздействия была близка к результатам введения только пребиотика (хотя в этом случае также увеличивалось относительное содержание клостридий) [245].

В исследованиях синбиотиков большое внимание уделяется способности некоторых композиций подавлять рост, адгезию к клеткам эпителия кишечника и токсичность распространенных кишечных патогенов и контаминантов пищи. Так, например, была исследована антимикробная активность синбиотика на основе *Bif. longum* subsp. *infantis* СЕСТ7210 и ГОС в отношении нескольких кишечных патогенов (*E. coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes* и *Clostridium difficile*) при совместном культивировании. Наибольшее подавление роста патогена было выявлено в отношении *Cronobacter sakazakii* и *C. difficile* и наблюдалось только после 12 часов совместного роста [246]. В похожем исследовании *in vitro* было показано, что при совместном культивировании *Bif. longum* IPLA20022 или *Bif. breve* IPLA20006 с *C. difficile* в среде с коммерческим ФОС в качестве пребиотического углеводного субстрата значительно снижается не только рост патогена, но образование им токсинов [247]. Также было продемонстрировано подавление адгезии *Campylobacter jejuni* (вызывающего острое зоонозное заболевание ЖКТ) к эпителиальным клеткам кишечника на

42% синбиотиком (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 + олигосахариды козьего молока) по сравнению с введением одного пробиотика. Эффект синергии между пробиотиком и пребиотиком в данной синбиотической композиции проявлялся в увеличении конечной численности пробиотика (24 часа роста) и повышении продуцирования ацетата, лактата, формиата и этанола [248].

1.2.3.1 Принципы комбинирования пробиотиков и пребиотиков для получения синбиотических композиций

Задача выбора оптимальных синбиотических композиций для функционального использования достаточно сложна. В связи с последними принятыми определениями пробиотиков и пребиотиков область поиска потенциальных кандидатов значительно расширилась, что диктует необходимость определения четких критериев отбора. Многообразие возможных положительных эффектов подразумевает, что подобрать единый критерий для всех пробиотиков и пребиотиков не представляется возможным. Кроме того, существуют определенные трудности в количественной оценке некоторых эффектов (например, синбиотик может повышать продуцирование одной или нескольких КЦЖК, но не влиять на выработку других). Потенциальным путем решения данной проблемы является разделение эффектов от введения синбиотических комбинаций на организм человека на несколько групп, например, снижение или повышение α - и/или β -разнообразия микробиоты, подавление патогенов, повышение продуцирования КЦЖК, увеличение относительной численности бифидо- и/или лактобактерий и т.д. В отечественном исследовании было отмечено, что синергизм можно определить по изоболическому методу, основанному на изучении потенциальных синергетических эффектов, сравнивая такие дозы каждого соединения (про- и пребиотиков), которые необходимы для того, чтобы вызвать одну и ту же фиксированную реакцию. При этом взаимодействия можно условно представить

в следующем виде: аддитивное $(n + m) = 1$; антагонистическое $(n + m) = 0,5$; синергетическое $(n + m) = 2$, где n – пробиотический, а m – пребиотический компоненты. Следуя данной концепции, был разработан синбиотик на основе *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophiles* с добавлением 0,2 % пребиотика лактулозы [71].

В процессе разработки синергитических синбиотиков, важно подбирать композиции для достижения наилучшего эффекта синергии между компонентами. Для этого, в первую очередь, анализируют способность пробиотика эффективно метаболизировать пребиотический субстрат, также пребиотик может стимулировать выработку пробиотиком функциональных метаболитов (кислот, витаминов, бактериоцинов и др.) или улучшать адгезию к эпителию кишечника. Так, например, была предложена «стратегия обогащения in vitro» (IVE) [249] для подбора пробиотического штамма к конкретному пребиотику с целью конструирования синергитических синбиотиков. Данная стратегия основана на поэтапном культивировании фекальных культур in vitro на пребиотических ксилоолигосахаридах, конечным этапом которого было выделение представителей р. *Bifidobacterium* на селективной среде. Таким образом было получено 15 уникальных штаммов бифидобактерий, принадлежащих трем видам (*Bif. adolescentis*, *Bif. pseudocatenulatum* и *Bif. longum*). Один из выделенных штаммов в сочетании с КОС сохранял численность культуры на уровне, приблизительно, 10^7 КОЕ/мл при ферментации фекальных культур. Причем, стабильное состояние нарушалось при отсутствии пребиотика [249]. Также для разработки синергитических синбиотиков можно применять ранее описанные методы оценки PAS и бифидогенной активности.

Потенциальным инструментом при разработке синбиотиков может являться также оценка антагонистического действия комбинаций в отношении микробных кишечных патогенов и контаминантов пищи. Данное свойство, например, использовали при разработке комбинаций *Bif. longum* subsp. *infantis* СЕСТ7210 и ГОС [246], *Bif. longum* IPLA20022 или *Bif. breve* IPLA20006 и ФОС [247], *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 и олигосахариды

козьего молока [248]. Было показано, что конкретная комбинация может быть эффективна для подавления одного или нескольких патогенов, но не проявлять антагонизма в отношении других [246], однако такой подход может оказаться перспективным для выделения синбиотика, обладающего направленным действием на определенный патоген (например, *Bac. cereus*, *Listeria monocytogenes* и *Clostridium difficile*). Причем ингибирующее воздействие на рост патогена можно определить количественно, выразив через константы ингибирования K_i или минимальные ингибирующие концентрации MIC.

1.3 Методы исследования воздействия пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков на микробное сообщество кишечника

В последних определениях пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков постулируется, что конечным этапом разработки должно являться исследование на людях, однако данные исследования ограничены высокой стоимостью, этическими затруднениями, сложностью отбора проб из внутренних органов и значительными различиями в разнообразии состава микробиоты разных людей. В основном, при исследованиях на людях отбор проб ограничивают фекальными образцами (в этом случае невозможно проследить динамику воздействия при прохождении через ЖКТ), однако возможно использование пациентов с илеостомическими мешками, биопсия и отбор содержимого кишечника при операциях, хотя в данном случае анализируемый кишечник невозможно отнести к здоровому типу [250]. Модельные эксперименты позволяют более детально исследовать механизмы потребления пребиотического субстрата кишечными микробами, продуцирование метаболитов, взаимодействие между различными группами микробиоты и/или между пробиотиком и микробиотой (по крайней мере, изменения в относительных численностях популяций в результате воздействия) [14].

В связи с этим были разработаны различные подходы к исследованию функциональных добавок на моделях *in vitro*, *ex vivo*, *in silico*, на модельных животных и компьютерных моделях. Функциональные модели варьируются от периодических ферментаций до сложных проточных систем, имитирующих пищеварительную систему человека, эпителиальные клетки кишечника, слой муцина [250, 251]. В настоящее время распространены модели, имитирующие не только условия желудочно-кишечного тракта такие как pH, температура, анаэробные условия, но и взаимоотношения микробиоты с клетками эпителия кишечника хозяина, с муцином, иммунными реакциями: 1) Модель Transwell «Апикальная анаэробная модель кишечного эпителиального барьера», 2) модель Host-Microbiota Interaction (HMI), 3) модель «Human oxygen-Bacteria anaerobic»

(HoxBan), 4) устройство «кишечник-на-чипе» (gut-on-a-chip) и 5) модель HuMiX (рисунок 10) [8]. Однако, такие модели дорогостоящи, поскольку требуют наращивания клеточных линий таких как Caco-2, HT-29, T-84 и DLD-1.

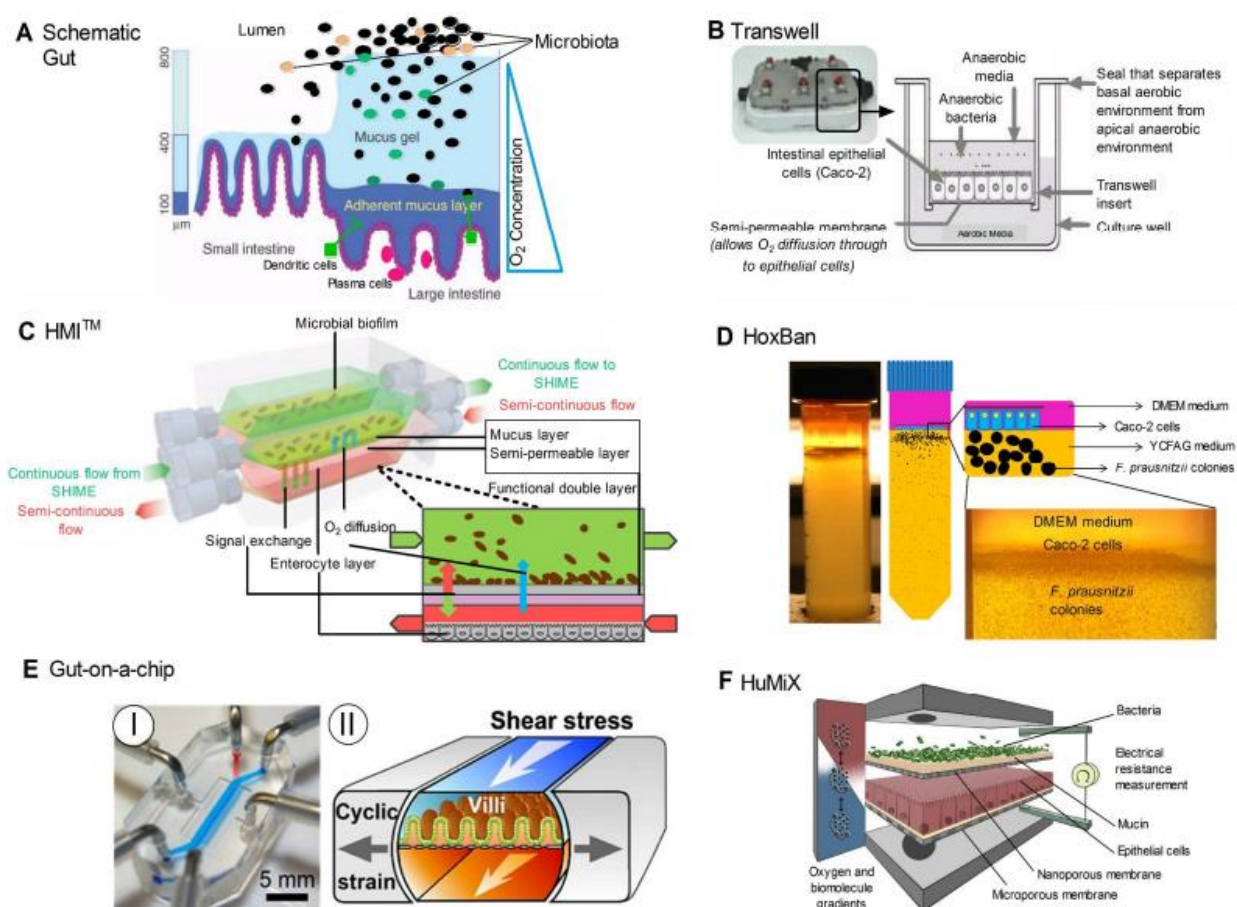


Рисунок 10 - Недавно разработанные анаэробные модели совместного культивирования бактерий и эпителия кишечника (приведено по [8])

1.3.1 Периодические и непрерывные функциональные модели микробиоты

Основным преимуществом функциональных моделей кишечника *in vitro* является возможность строгого контроля условий эксперимента и обеспечение более высокой воспроизводимости. Модели механистически проще анализировать, не требуют дорогостоящих и трудоемких процедур этического утверждения (как это требуется для клинических испытаний на людях или исследований на животных). Более того, поскольку фармацевтические процедуры и диетические исследования обычно занимают много лет,

репрезентативная модель *in vitro* может значительно ускорить получение результатов. Таким образом разработка моделей *in vitro*, имитирующих условия в желудочно-кишечном тракте, крайне актуальна [8].

Как правило, при исследованиях пробиотиков, пребиотиков и их композиций, моделируют те отделы ЖКТ, в которых обнаруживается наибольшая плотность популяции микроорганизмов-мишеней воздействия. В ЖКТ человека таковым является толстый кишечник, состоящий из восходящего (проксимального), поперечного и нисходящего (дистального) отделов [250]. Хотя есть и модели, имитирующие весь ЖКТ.

Наиболее простые модели, как правило включают одну ферментационную емкость, в которой осуществляется периодическое культивирование. При этом чаще всего имитируются условия дистального отдела толстого кишечника, а процесс культивирования ведут в течение 24-48 часов, что обусловлено быстрым достижением стационарной фазы культурой из-за истощения питательных веществ. Условия культивирования в таких моделях: анаэробные условия (барботирование бескислородным азотом, углекислым газом, реже, аргоном), поддержание физиологической температуры 37 °С, поддержание рН 6,8 (соответствует кислотности содержимого дистального отдела), перемешивание. Систему, чаще всего, инокулируют образцами фекалий от здоровых доноров, не подвергавшихся пробиотическому или антибиотическому вмешательству в течение 2-6 месяцев до отбора. Как правило, в таких моделях анализируют численность отдельных групп и общая численность кишечных микроорганизмов (qПЦР, FISH), продуцирование метаболитов и/или потребление субстрата (ТСХ, ВЭЖХ, ГХ-МС), а также газообразование. С помощью такой модели, например, было исследовано воздействие пребиотиков (коммерческой смеси инулина и олигофруктозы) на протеолиз белков микробиотой кишечника [252]. В недавней работе с помощью периодической фекальной ферментации было изучено влияние нескольких синбиотических композиций (2'-фукозиллактоза с одним или несколькими штаммами бифидо- или лактобактерий) на микробиоту пациентов с синдромом раздраженного кишечника. В качестве положительного

контроля использовали ОФ, в качестве отрицательного – среду без дополнительных углеводов [253]. Кроме того, периодические модели могут быть использованы для определения ранее описанных критериев оценки пребиотиков, например, пребиотического индекса [229].

Непрерывное культивирование с постоянным подводом свежей питательной среды и отводом продуктов метаболизма является более перспективной схемой исследования микробного сообщества, поскольку 1) соответствует движению веществ в реальном кишечнике, 2) позволяет наблюдать изменения в системе в течение длительного промежутка времени в динамике [8]. Одной из первых непрерывных функциональных моделей толстого кишечника была three-stage continuous culture system (TSC) (рисунок 11), созданная под руководством S. Macfarlane и соавторами в 1998 году [19]. Наиболее часто установки подобного типа применяется для исследования влияния на микробное сообщество пребиотиков (или кандидатов в пребиотики) [21, 23-25], однако есть примеры исследований и других факторов, например, контаминации патогенами [22]. Обычно, установка состоит из трех ферментационных емкостей, имитирующих восходящий (проксимальный), поперечный и нисходящий (дистальный) отделы толстого кишечника [20], однако, применяются также модели, состоящие из одного ферментера [21, 254]. В различных экспериментах объемы ферментационных емкостей могут различаться. Обычно используют небольшие объемы ферментеров – до 500 мл [19, 21, 255], хотя есть и исключения [20]. рН в реакторах должен соответствовать уровню кислотности восходящего, поперечного и нисходящего отделов толстого кишечника, поэтому поддерживается, соответственно, на значении 5,5 (первый реактор), 6,2 (второй реактор) и 6,8 (третий реактор) [19, 21, 256]. Как правило, установку инокулируют суспензией образца фекалий от здорового донора, после чего следует периодическое культивирование для наращивания микробной массы (от 18 до 48 часов). В исследовании [255] в качестве инокулята была использована иммобилизованная фекальная микробиота младенцев. Причем, фекальный инокулят вводится чаще всего во все

реакторы одновременно, тогда как пробиотические, пребиотические или синбиотические добавки вносят только в первый реактор, что соответствует логике движения по ЖКТ функциональных продуктов. Образцы фекалий получают от здоровых доноров, не подвергавшихся лечению антибиотиками или пробиотиками в течение, как минимум, трех месяцев до отбора [19, 21, 256]. Далее культивирование ведут в режиме протока, поддерживая скорость протока, аналогичную скорости движения среды в реальном толстом кишечнике. При этом в первый реактор (восходящий отдел) поступает свежая питательная среда, одновременно с отбором культуральной жидкости во второй реактор, из которого ферментационная среда переливается в третий. Из третьего реактора культуральная жидкость направляется в слив. Процесс осуществляется при 37 °С, перемешивании, в анаэробных условиях. Окончанием цикла после воздействия на систему является наступление стабильного состояния (динамического равновесия), которое оценивают по постоянству уровня короткоцепочных жирных кислот в течение трёх суток [19-24, 255, 256]. Скорость протока жидкости в установке обычно характеризуется временем удержания R (ч), показывающим за какой период времени полностью заменяется содержимое одного реактора или всей системы, и скорость разбавления D ($ч^{-1}$), равная отношению объема содержимого реактора (л) к скорости течения жидкости (л/ч). Последний критерий показывает долю содержимого реактора, заменяющуюся за один час. Как правило поддерживается невысокая скорость протока, хотя конкретные значения сильно разнятся в различных установках. Группа S. Macfarlane исследовала два варианта системы: при времени удерживания системы 27,1 ч (при D равном 0,14, 0,10 и 0,10 $ч^{-1}$ для первого, второго и третьего реактора, соответственно) и 66,7 ч (D реакторов 0,06, 0,04 и 0,04, соответственно) [19]. В более современных исследованиях применяются как модели со временем удерживания менее 50 часов [25, 257], так и более 70 ч [256].

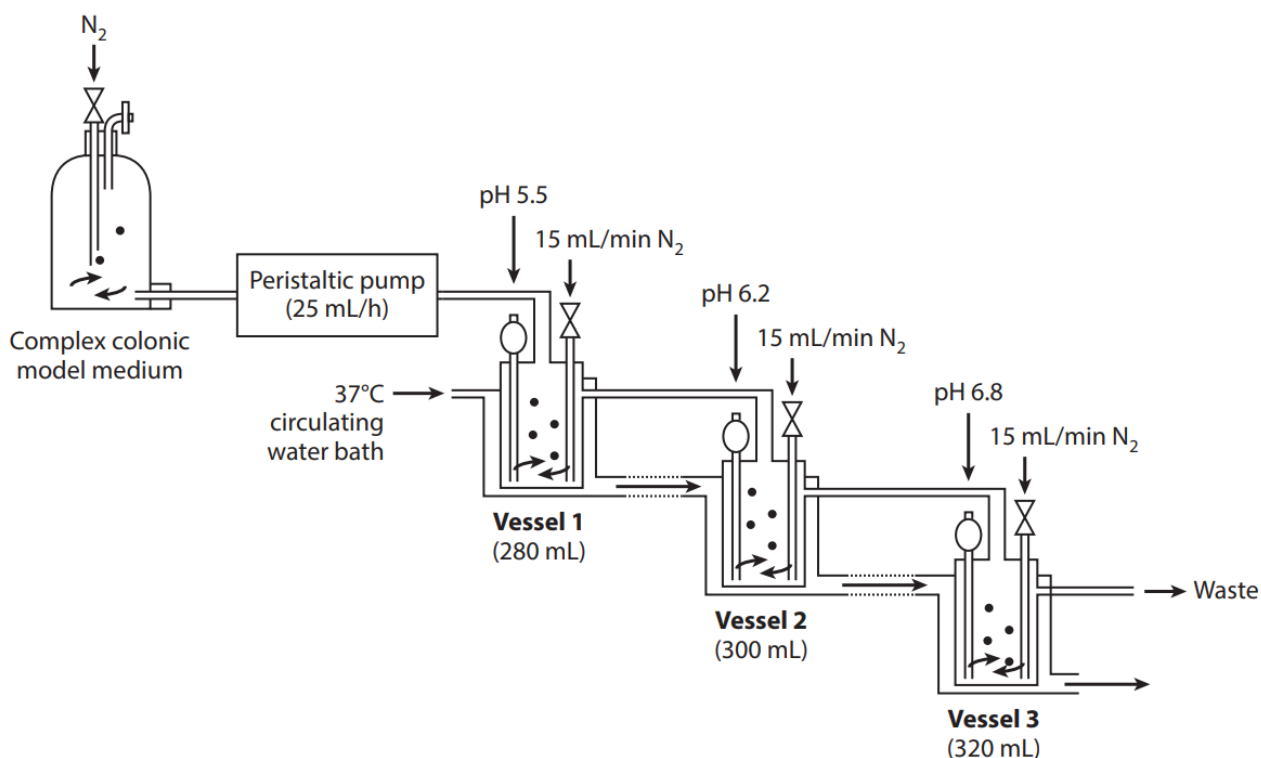


Рисунок 11 - Схема установки TSC (приведено по [19]), имитирующая восходящий (Vessel 1), поперечный (Vessel 2) и нисходящий (Vessel 3) отделы толстого кишечника

Таким образом, непрерывные фекальные ферментации являются полезным и универсальным инструментом для наблюдений межмикробных взаимодействий внутри кишечного биоценоза и их изменений при каком-либо вмешательстве. Отбор проб из каждого реактора в системе позволяет наблюдать динамику метаболизма пребиотических веществ при прохождении через толстый кишечник. Однако, одной из проблем непрерывных фекальных ферментаций является сложность в выявлении количественных критериев оценки воздействия на микробное сообщество. Перспективным критерием сравнения про- или пребиотического воздействия может являться время стабилизации системы и/или относительная численность конкретных групп (например, бифидо-, лактобактерий, клостридий, бактероидов), концентрации КЦЖК в состоянии динамического равновесия. К сожалению, в связи с расхождением методик проведения экспериментов и вариативностью состава фекальных образцов от разных доноров, результаты различных исследований зачастую трудно сопоставимы.

Модуляция кишечной микробиоты является не только важным аспектом поддержания здоровья человека, но и средством борьбы с различными заболеваниями или их симптомами. Наиболее эффективным считается воздействие на микробиоту кишечника синбиотиков, проявляющих свойства как пробиотиков, так и пребиотиков, усиленные за счет синергии. Разработка синбиотических композиций, является сложной многоступенчатой задачей. Предполагается, что первоначальным этапом разработки должно быть периодическое культивирование, с определением количественных критериев эффективности синбиотических композиций по конкретному признаку (например, антагонизму в отношении кишечного патогена или контаминанта пищи) для выделения наиболее перспективных комбинаций пробиотика и пребиотика. Оптимальный и универсальный критерий оценки синбиотической активности на данном этапе поможет сократить время и затраты на более сложные исследования. Действие выбранной композиции должно быть подтверждено в дальнейших испытаниях, например, при непрерывном культивировании в функциональных моделях типа *three-stage continuous*, за которым должны следовать испытания *in vivo* на людях.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1 Микробные объекты исследования

В качестве пробиотических штаммов (Pr) использовали *Bif. adolescentis* ВКПМ 1662 (АТСС 15703), *Bif. bifidum* ВКПМ АС-1666 (АТСС 29521), *Bif. bifidum* 8 ВКПМ Ас-2136 (получен из коллекции ООО «АВАН», Россия) - неспорообразующие, грамположительные палочки, облигатные анаэробы, некоторые из которых имеют характерные булавовидные утолщения или раздвоения на конце.

В качестве непровиотических (Npr) тест-штаммов (объектов ингибирования) использовали *Bacillus cereus* ВКПМ В-8076 (АТСС 11778), *Salmonella enterica* ВКПМ В-5300 и *Staphylococcus aureus* АТСС 43300 (получен из Американской коллекции типовых культур). *Bac. cereus* - грамположительные, палочковидные, подвижные, факультативно анаэробные, бета-гемолитические, спорообразующие бактерии, обычно встречающиеся в почве, пищевых продуктах и морских губках [258]. *Sal. enterica* - грамотрицательный кишечный бактериальный патоген [259], факультативный аэроб, подвижный, способен к пленкообразованию, антибиотикорезистентности, может вызывать гастроэнтерит, рвоту и диарею [260]. *St. aureus* – грамположительные кокки, неспорообразующие, факультативно аэробные, способны к пленкообразованию, зачастую антибиотикорезистентны, зачастую становятся причиной энтероколита и диареи после применения антибиотиков [261]. Все штаммы получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), за исключением *St. aureus*.

2.2 Контрольные и тестовые углеводные субстраты

В качестве контрольного пребиотика использовали олигофруктозу (ОФ) (Orafti® P95, BENEEO-ORAFТИ, Бельгия).

В качестве тестовых коммерческих пребиотиков использовали инулин HSI (ИН) Orafti (Beneo-Orafti, Бельгия), раффинозу-D гидрат (РФ) (Диаэм, Россия),

палатинозу (ПЛ) (Veneo-Palatinit GmbH, Германия) и лактулозу (ЛК) (ООО «Фелицата Холдинг», Россия).

В роли контрольного непробиотического углеводного субстрата выступала глюкоза (ГЛ) (декстроза, Roquette, Франция)

2.3 Питательные среды и методы работы с культурами

2.3.1 Активация лиофилизированных культур

После получения лиофилизатов из ВКПМ культуры хранили при температуре минус 35 °С. Непосредственно перед высевом лиофилизаты размораживали в течение часа при 2 – 8 °С и ресуспендировали с соблюдением правил асептики в небольшом количестве стерильного прогретого до 37 °С буферного физиологического раствора следующего состава (г/л): NaCl – 8,5; $\text{KН}_2\text{PО}_4$ – 0,5; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,12, pH 6,6-6,8 [262].

Суспензии бифидобактерий, вносили в полужидкую бифидум-среду [263] следующего состава (г/л): триптон казеиновый (Difco Laboratories) – 10; дрожжевой экстракт (Springer) – 5; глюкоза – 7,5; лактоза – 2,5; цистеин – 0,5; NaCl – 2,5; MgSO_4 – 0,5; кислота аскорбиновая (AppliChem) – 0,5; CH_3COONa – 0,3; агар – 1,75; pH 6,8-7,0. Культивирование проводили в плоскодонных колбах объемом 150 мл в 50 мл среды при 37 °С, без перемешивания в течение 48 ч.

Для активации культур тест-штаммов (*Bac. cereus*, *Sal. enterica*, *St. aureus*) использовали жидкую или плотную (15 г/л) среду LB следующего состава (г/л): глюкоза – 20; казеиновый триптон (Difco Laboratories) – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 2; pH 6,8-7,2 [262]. Культивирование вели в плоскодонных колбах объемом 150 мл в 50 мл в течение 24 - 30 ч. при 37 °С с перемешиванием 170 – 200 об/мин.

2.3.2 Количественный учет микроорганизмов

Количественный учет микроорганизмов проводили путем посева десятикратных разведений в буферном физиологическом растворе культур на

чашки Петри с селективными питательными средами с дальнейшим подсчетом колоний. Все высевы проводили не менее, чем в трёх повторностях.

Для количественного учета бифидобактерий использовали среду BFM по [264] следующего состава, г/л: пептон - 10; NaCl - 5; лактулоза - 5; цистеин-HCl - 0,5; рибофлавин - 0,01; дрожжевой экстракт - 7; мясной экстракт - 5; крахмал - 2; тиамин хлорид - 0,01; цитрат лития - 3,3; агар - 15. pH среды доводили до 5,5 путем добавления 5 мл/л пропионовой кислоты в асептических условиях, непосредственно перед розливом в чашки Петри. Чашки инкубировали в анаэробных условиях при 37 °С в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия) или в анаэробных контейнерах GasPak™. Подсчет колоний производили после 2-3 суток инкубирования.

Для количественного учета *St. aureus* высев производили на чашки с маннит-солевым агаром MSA [265] следующего состава (г/л): пептон - 8; дрожжевой экстракт - 2; лактальбумин - 3; NaCl - 30; маннитол - 10; феноловый красный - 0,023; LiCl - 7; глицин - 1; пируват натрия - 3; агар - 12, pH 7,4. Чашки инкубировали при 37 °С в аэробных условиях в течение суток. Колонии *Bac. cereus* и *Sal. enterica* выращивали в течение суток при 37 °С в аэробных условиях на чашках со средой MRS [266] с некоторыми модификациями, следующего состава (г/л): пептон - 10; мясной экстракт - 10; дрожжевой экстракт - 5; глюкоза - 20; аммония цитрат - 2; натрия ацетат - 5; MgSO₄ - 0,1; MnSO₄ - 0,05; Na₂HPO₄ - 2; агар - 12.

2.3.3 Среда для экспериментального культивирования

Для периодического культивирования и непрерывного культивирования в одностадийной функциональной модели (см. п.п. 2.6.1-2.6.3) моно- и смешанных культур и приготовления инокулятов использовали питательную среду по Rossi et al. [267] с некоторыми модификациями. Состав среды (г/л) был следующим: триптон казеиновый (Difco Laboratories) - 10; дрожжевой экстракт (Springer) - 7,6; мясной экстракт (Panreac) - 5; кислота аскорбиновая (AppliChem) - 1; натрий

уксуснокислый - 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5; мочеви́на - 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,007; NaCl – 0,01; Tween-80 – 1 (мл); цистеин – 0,5 (pH доводили до 7,0). Безуглеводную среду (в 90 % объема) и водный раствор углевода (в 10% объема) автоклавировали отдельно в течение 30 мин при 115 °С. Раствор углевода добавляли в среду, соблюдая правила асептики, непосредственно перед инокуляцией.

Для непрерывного культивирования в трех-стадийной модели толстого кишечника (TSC) (см. п. 2.6.4) использовали базальную среду по [268] следующего состава (г/л): триптон – 2; дрожжевой экстракт – 2; NaCl – 0,1; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,04; KH_2PO_4 – 0,04; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; NaHCO_3 – 2; цистеин – 0,5; витамин K_3 (водорастворимый) – 0,01; bile salt (соли желчи) – 0,5; гемин – 0,02; tween 80, мл – 2; камедь ксантановая – 1; пектин цитрусовый – 2; крахмал кукурузный – 2. Дополнительно в среду вносили 8 г/л ОФ. Для приготовления подпитки камедь, пектин и крахмал, растворенные при нагревании и интенсивном перемешивании в 60 % объема (pH = 7,5), щелочные растворы гемина и солей желчи (по 5 % объема на каждый), стерилизовали отдельно автоклавированием в течение 30 мин при 115 °С. Остальные компоненты среды растворяли в 30 % объема (pH 7,0) и стерилизовали пропусканием через фильтр 0,2 мкм. Все компоненты объединяли в бутыли объемом 5 л с соблюдением правил асептики. Аналогичным образом реактора автоклавировали со смесью камеди, пектина и крахмала. Автоклавированные и стерилизованные фильтрацией компоненты вносили через посевные колбы. pH в каждом реакторе доводили с использованием автоматической системы контроля до значений, соответствующих схеме эксперимента.

2.4 Выделение и очистка углеводных фракций с пребиотическим потенциалом из растительного сырья

Для выделения фруктанов использовали порошок корня лопуха (*Arctium lappa* L.) – лекарственное сырье, в соответствии с ФС 2.5.0025.15 Российской Фармакопеи (ООО «Кочкарев», Россия), и порошок клубней топинамбура

(*Helianthus tuberosus* L.) (ООО «Рязанские просторы», Россия). Выделение и очистку осуществляли по известной методике [215, 269] с некоторыми модификациями. Контроль каждой стадии осуществляли путем измерения объема, рН и концентрации углеводов методом Бертрана и модифицированным методом Бертрана-Шорля (по п.2.5.2).

2.4.1 Водная экстракция сырья

Навеску сухого порошка вносили при перемешивании в прогретую до 75 °С дистиллированную воду. Количество дистиллированной воды, необходимое для экстракции, рассчитывали по формуле:

$$m_{\text{воды}} = m_{\text{сырья}} \cdot \text{ГМ} \cdot \text{СВ} - m_{\text{сырья}}(1 - \text{СВ}) \quad (2),$$

где $m_{\text{воды}}$ – масса воды, необходимая для экстракции, кг; $m_{\text{сырья}}$ – масса сырья, кг; ГМ – гидромодуль; СВ – доля сухих веществ сырья. Гидромодуль – отношение сухой массы сырья к массе воды при экстракции, был выбран 12 по результатам предыдущих исследований экстракции инулина из клубней топинамбура, проведенных на кафедре Биотехнологии [215, 269].

Для предотвращения деполимеризации фруктанов рН экстракционной смеси доводили до 6,5, добавлением 20%-ного NaOH. Экстракцию проводили двукратно при постоянном перемешивании 300 об/мин с помощью погружной верхнеприводной лопастной мешалки и поддержании температуры 75 °С в течение 30 мин.

2.4.2 Отделение жом и очистка экстракта от высокомолекулярных и окрашенных примесей

Жом отделяли вакуум-фильтрацией через бельтинг и фильтр «черная лента». После осушения намывного слоя жом промывали дополнительным объемом дистиллированной воды с рН 6,5 и температурой 75 °С и экстрагировали повторно.

Для отделения высокомолекулярных примесей использовали ультрафильтрационную установку (УФУ) с половолоконным модулем (АР-0,5-

20ПС, НПО «Биотест», г. Кириши). Устройство волоконного модуля представлено на рисунке 12, гидравлическая схема установки представлена на рисунке 13.

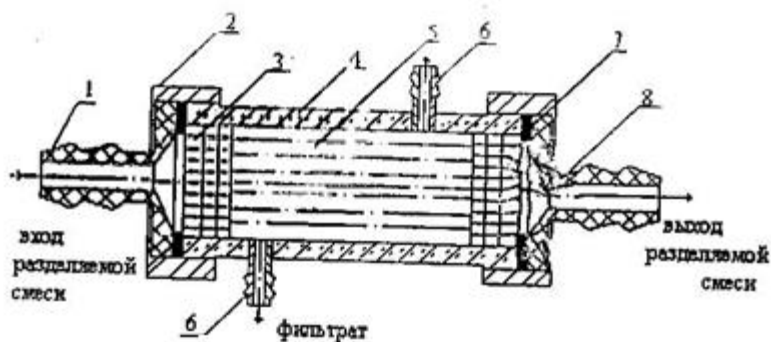


Рисунок 12 - Разделительный аппарат на полых волокнах типа АР. 1,8 – концевики входа и выхода разделяемой смеси; 2 – накидная гайка; 3 – заливочный компаунд; 4 – корпус; 5 – пучок полых волокон; 6 – штуцер выхода фильтрата (пермеата); 7 – уплотнение

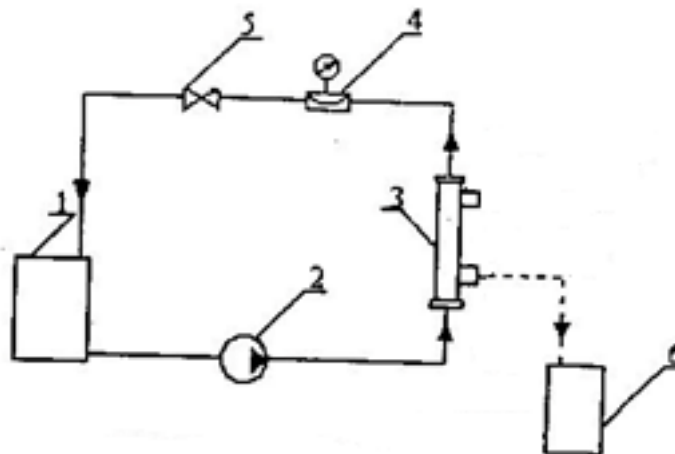


Рисунок 13 - Гидравлическая схема присоединения разделительного аппарата. 1 – ёмкость с рабочей смесью; 2 – насос; 3 – аппарат разделительный; 4 – разделитель с манометром; 5 – вентиль подпорный; 6 – емкость с пермеатом

Экстракт подавали насосом в каналы полых волокон разделительного аппарата УФУ. Пермеат, обогащенный компонентами с молекулярной массой менее 20 кДа, отбирали в чистую бутылку. Ультрафильтрацию прекращали при остатке ретентата в количестве 10 % от первоначального объёма.

Далее пермеат очищали от окрашенных примесей с использованием активированного угля марки ОУ-А (ГОСТ 4453-74) в количестве 15 г/л. Осветление проводили в течение 30 мин при комнатной температуре и интенсивном перемешивании с помощью магнитной мешалки. После осветления уголь отделяли вакуум-фильтрацией аналогично стадии отделения жома.

2.4.3 Концентрирование очищенного экстракта на роторно-пленочном испарителе

Очищенный от примесей экстракт концентрировали с помощью ротационного испарителя Hei-Var Advantage (модель 561-01110-00 с комплектом стекла G1, Heidolph, Германия). Устройство роторно-пленочного испарителя (РПИ) приведено на рисунке 14.

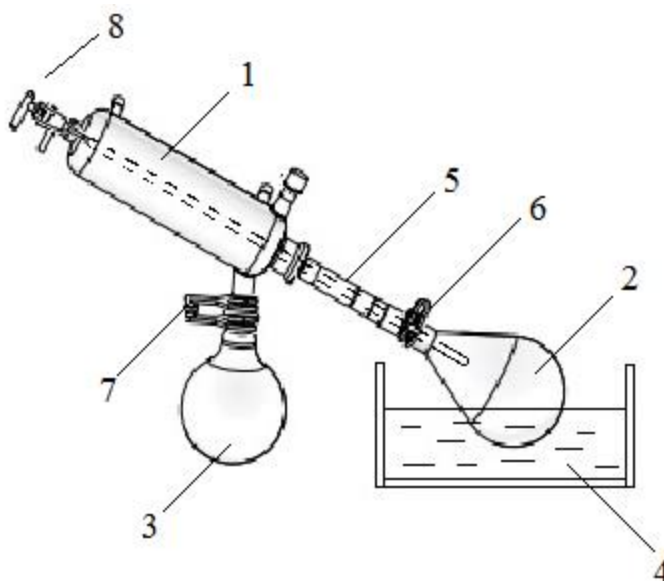


Рисунок 14 - Устройство РПИ. 1 – обратный холодильник; 2 – выпарная колба 2000 мл; 3 – приёмная колба 1000 мл; 4 – водяная баня; 5 – выпарная трубка; 6 - клипса Easy-Clip; 7 – металлическая клипса; 8 – кран для выравнивания давления с атмосферным.

Упаривание экстракта проводили при давлении минус $0,95 \text{ кгс/см}^2$ и перемешивании 80 об/мин с последовательным повышением температуры до $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Концентрирование экстракта проводили до итоговой концентрации углеводов 170-200 г/л.

2.4.4 Фракционирование и высушивание выделенных фруктанов

Для разделения углеводов экстракта на фракции с различной степенью полимеризации [270] проводили осаждение с варьированием концентрации этанола (20%; 32,2%; 50%; 67,8%; 80 %) при температуре $4 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 4 суток. Осадки отделяли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин и

высушивали на лиофильной сушке (ScanVac Coolsafe 100-9) при температурно-временных режимах: 0 °С – 8 ч, 5 °С – 8 ч, 10 °С – 6 ч, 15 °С – 6 ч, 20 °С – 6 ч.

Полученные таким образом очищенные от примесей, фракционированные по степени полимеризации, фруктаны хранили при 4 °С.

2.5 Биохимические, микробиологические и физико-химические методы анализа

2.5.1 Анализ структуры полученных фруктанов методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Анализ структуры выделенных фруктанов проводили с помощью ЯМР, по методике, описанной в [213]. Одномерные спектры ^{13}C -ЯМР получены при 298 К на ЯМР-спектрометре “BRUKER СХР- 200” (50,3 МГц) (Bruker, Германия) в растворе H_2O с добавкой D_2O . В качестве стандартного образца использовали инулин (Orafti ® HSI, BENEО-ORAFТИ, Бельгия) и олигофруктозу (Orafti ® P95, BENEО-ORAFТИ, Бельгия).

Анализ выполнен на базе Центра коллективного пользования РХТУ им. Д.И. Менделеева.

2.5.2. Определение содержания углеводов по методу Бертрана и модифицированному методу Бертрана-Шорля

Метод Бертрана основан на способности альдегидных групп редуцирующих сахаров при кипячении восстанавливать Cu^{2+} с образованием осадка закиси меди (Cu_2O), который затем растворяют в железоаммиачных квасцах ($\text{Fe}_2(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) или серно-кислом окисном железе ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$). При этом закись меди восстанавливает эквивалентное количество окиси железа в серно-кислую закись железа, количество которой определяют титрованием марганцово-кислым калием (KMnO_4). По количеству восстановленной меди находят содержание редуцирующих сахаров [271].

Для определения содержания олиго- и полисахаридов по методу Бертрана-Шорля пробы предварительно смешивали с 10% трихлоруксусной кислотой (ТХУ) в соотношении 1:1 и гидролизовали на кипящей водяной бане в течение 10 мин (олигосахариды) или 40 мин (полисахариды). Далее проводили титрование по методу Бертрана.

2.5.3 Определение содержания органических кислот и моносахаров с помощью высокоэффективной жидкослойной хроматографии (ВЭЖХ)

Оценку количества органических кислот (молочной и уксусной) проводили путем ВЭЖХ по существующей методике [272] с некоторыми модификациями. Пробы анализировали с помощью хроматографа Agilent 1220 Infinity (Agilent, Santa Clara, CA, USA) с установленной колонкой Agilent Hi-Plex H (250 × 4.6 мм). Содержание кислот рассчитывали по рефрактометрическому сигналу. Супернатант после центрифугирования при 12,000 об/мин в течение 15 мин фильтровали через целлюлозно-ацетатные мембраны 0.45 мкм (HAWP, MF-Millipore, St. Louis, MO, USA). Анализ проводили при 50 °С и скорости потока подвижной фазы (0.002 М H₂SO₄) 0,3 мл/мин. Для анализа вносили 3 мкл пробы. Калибровочные растворы органических кислот готовили путем разведения концентрированных кислот в 0,002 М H₂SO₄ для получения концентраций 1, 5 и 10 г/л. Качественная оценка вещества проводилась на основании времени удаления из колонки (retention time), а количественное определение – на основании площадей хроматографических пиков с использованием метода внутреннего стандарта.

2.5.5 Качественное и количественное определение углеводов с помощью капиллярного электрофореза (КЭФ)

Качественный анализ углеводов в пробах проводили путем КЭФ, согласно [273] и [274] с некоторыми модификациями. Для анализа использовали систему капиллярного электрофореза Capel-105M (Lumex®, Saint-Petersburg, Russia) с кварцевым капилляром длиной 75 см и внутренним диаметром 50 мкм. До проведения анализа пробы центрифугировали при 12 000 об/мин и 5 °С в течение 15 мин. Затем супернатант очищали от белковых примесей путем

центрифугирования при 5500 об/мин 10 °С 15 мин в центрифужных фильтрующих ячейках Amicon® Ultra-4 (Merck Millipore Ltd., Carrigtwohill, Ireland) с пропускной способностью 3 кДа. В качестве фонового электролита использовали 0,5 мМ раствор тетрадецилтриметиламмоний бромид (ТДТМАБ), 25 мМ дипиколиновой кислоты и 170 мМ NaOH. Для количественного определения использовали калибровочные растворы глюкозы, фруктозы, сахарозы, олигофруктозы и нистозы). Непрямое фотометрическое определение углеводов проводили при 20 °С и длине волны 230 нм.

2.5.5 Качественное и количественное определение микроорганизмов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Биомассу микроорганизмов в пробах с трех-стадийной непрерывной ферментации отделяли от культуральной жидкости путем центрифугирования (8500 об/мин, 15 мин), дважды промывали бесклеточным физиологическим раствором, ресуспендировали в смеси 1:1 физиологического раствора и глицерина и хранили при температуре минус 18 °С до проведения анализа.

Праймеры для качественного и количественного определения различных членов сообщества микроорганизмов, моделирующих микробиоту толстого кишечника, подбирали на основании литературных данных (таблица 2). Экстракцию ДНК проводили с использованием набора для выделения геномной ДНК из бактериальных клеток (Диаэм, Россия) согласно инструкции производителя. Для количественного определения различных групп микроорганизмов использовали стандартные ДНК-матрицы, соответствующие длине фрагмента целевой мишени. Нарботку стандартов осуществляли при помощи классической ПЦР с использованием набора реактивов для ПЦР с *Taq*-ДНК-полимеразой Hot Start ПЦР (Диаэм, Россия). Концентрацию ДНК определяли с использованием спектрофотометра NanoPhotometer N60-Touch (Implen, Германия). ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories,

США), при температурных режимах: предварительная денатурация (95 °С, 5 мин), затем 35 циклов, включающих денатурацию (95 °С, 15 с), отжиг (53 - 62 °С, 15 с) и элонгацию (72 °С, 15-35 с). Специфичность амплификатов устанавливали при помощи построения кривых плавления при нагревании проб в диапазоне температур 58-95°С с шагом 0,5 °С / 5 с. Начальные концентрации ДНК были рассчитаны программным обеспечением Bio-Rad CFX Manager 3.1 исходя из значений порогового цикла C_q , который соответствует пересечению кривой амплификации и пороговой линии. Молекулярную массу фрагментов ДНК рассчитывали в программе Oligo Calculator. Для пересчета концентрации ДНК в количество копий фрагментов использовали следующую формулу:

$$N = \frac{\text{Концентрация ДНК} \left(\frac{\text{Г}}{\text{мл}} \right) * N_A \left(\frac{\text{молекул}}{\text{моль}} \right)}{\text{Молярная масса фрагмента ДНК} \left(\frac{\text{Г}}{\text{моль}} \right)} * n \quad (3)$$

Где N – количество копий в 1 мл, N_A – число Авогадро ($6,02 * 10^{23}$), $n = 100$ – фактор разбавления.

Электрофорез амплификатов проводили в горизонтальной камере. 2,5% агарозный гель готовили на Трис-ацетатном-ЭДТА буфере (ТАЕ), в качестве электродного буфера также использовался ТАЕ. Визуализация продуктов электрофореза осуществлялась с помощью трансиллюминатора ЕСХ-F15.М (Vilber, Франция) и предварительного окрашивания геля бромистым этидием. Для определения молекулярной массы фрагментов ДНК применяли маркер Quick-Load 2-Log DNA Ladder (100-10000 п.н.).

Таблица 2 - Праймеры, использованные для qПЦР

Целевая группа бактерий	Название праймера	Последовательность 5'–3'	Длина продукта, п.н.	Темп. отжига, °С	Время элонгации, сек	Темп. пл., °С	Источник
<i>Bacteroidetes</i> phylum	Bact934F	GGARCATGTGGTTTAATTTCGATGAT	124	57	15	59.99	[275]
	Bact1060R	AGCTGACGACAACCATGCAG				60.95	
<i>Bifidobacterium</i> genus	Bif164F	GGGTGGTAATGCCGGATG	438-443	56	35	57.84	[276, 277]
	Bif601	TAAGCCATGGACTTTCACACC				58.21	
<i>Bacillus cereus</i>	Bcer-R	GAAAAGTACAGTGGCAAAAGTTGTTGCG	313	62	20	64.33	[278]
	Bcer-F	CGCTAACTCTTGCTGACGACGT				63.11	
<i>Clostridial</i> cluster IV (Clep)	Clep866mF	TTAACACAATAAGTWATCCACCTGG	314	56	25	57.07	[279]
	Clept1240mR	ACCTTCCTCCGTTTTGTCAAC				58.71	
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	C-cl-XIV-F	CGGTACCTGACTAAGAAGC	429	53	30	54.75	[279]
	C-cl-XIV-R	AGTTTTYATTCTTGCGAACG				54.38	
<i>Enterobacteriaceae</i>	Eco1457F	ACGTTACCCGCAGAAGAAGC	183	56	20	60.67	[277]
	Eco1652R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC				58.47	
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Fapra-F	CCCTTCAGTGCCGCGAGT	160	57	15	59.59	[278]
	Fapra-R	GTCGCAGGATGTCAAGAC				55.51	
<i>Lactobacilli</i>	Lacto-F	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	341	56	25	54.94	[275]
	Lacto-R	CACCGCTACACATGGAG				54.53	
Total bacteria	TBA-F	CGGCAACGAGCGCAACCC	145-147	60	15	64.99	[275]
	TBA-R	CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC				61.81	

2.5.6 Определение β -фруктофуранозидазной активности клеток микроорганизмов

Методику определения β -фруктофуранозидазной активности проводили по [267] с некоторыми модификациями. Суспензии микроорганизмов, находящихся на стадии экспоненциального роста, разделяли центрифугированием при 6000 об/мин 10 мин при 0 °С. Осадок дважды промывали буфером Z (0,1 М фосфатный буфер, pH 7, 10 мМ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 мМ CaCl_2) и ресуспендировали. Оптическую плотность суспензии доводили до 0,7, что соответствует приблизительно 10^8 КОЕ/мл. Лизис клеток осуществляли путём смешивания 0,5 мл суспензии с 0,5 мл Triton X-100 (5 об.%, в буфере Z) с последующим инкубированием при 37°С 10 мин.

Реакционная среда включала 300 мкл клеточной суспензии, 300 мкл буфера Z и 400 мкл раствора ОФ (20 об.%) и инкубировалась при 40°С 25 мин. Затем добавляли 1 мл раствора Рошеля (10 г/л 3,5-динитросалициловой кислоты; 300 г/л $\text{K,Na-тартрата} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,4 М NaOH) и прогревали на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Далее объем доводили до 10 мл бидистиллятом и измеряли светопоглощение при 540 нм. Линейную калибровку строили по светопоглощению растворов фруктозы в диапазоне концентраций от 0 до 100 мМ. Итоговая β -фруктофуранозидазная активность выражается как единица фермента (количество фермента требующееся для высвобождения 1 мкмоль редуцирующих сахаров за минуту из сахарозы) на мл клеточной суспензии.

2.6 Экспериментальное культивирование микроорганизмов

2.6.1 Периодическое культивирование в CO_2 инкубаторе

Культивирование и подготовку инокулятов для проведения экспериментов в периодических условиях проводили в конических колбах объёмом 150 мл в 50 мл среды в CO_2 -инкубаторе СВ-210 (Binder, Германия) на качалке (170 об/мин) в анаэробных условиях (2% CO_2 , 98% N_2) при 37 °С.

Колбы со средой автоклавировали 30 минут при 115 °С, растворы углеводов стерилизовали отдельно в 10% объёма среды, добавляли в среду непосредственно перед внесением инокулятов. Перед засевом определяли рН инокулятов (15 – 17 ч роста) и оптическую плотность (ОП) (600 нм, против дистиллированной воды) и микроскопировали для исключения наличия посторонней микрофлоры. Затем инокуляты фуговали при 6000 об/мин в течение 2 мин, промывали и ресуспендировали в стерильной безуглеродной среде до требуемой оптической плотности. Отбор проб проводили сразу после засева и по завершении культивирования (от 6 до 10 ч в зависимости от условий проведения эксперимента).

2.6.2 Периодическое культивирование в бутылках в атмосфере азота

Выращивание инокулятов и периодическое культивирование с целью оценки ростовых характеристик индивидуальных и смешанных культур проводили в бутылках (Simax, Чехия) объемом 500 мл в 300 мл среды (Рисунок 15). Культивирование проводили в атмосфере азота, при 37 °С и перемешивании 170 об/мин, без поддержания рН. Каждый из отводов был снабжен мембранным автоклавируемым вентиляционным фильтром (0,2 мкм) (Merck Millipore, Германия) (4) и зажимом (3). После внесения раствора углевода и инокулята в асептических условиях бутылку закрывали крышкой, среду барботировали аргоном 3-5 мин через линию 1 при открытых зажимах, затем зажимы закрывали и бутылки помещали в термостат при 37°С на качалку (170 об/мин) на 17-24 часа.

Для отбора проб с линии 1 снимали вентиляционный фильтр, подавали азот через линию 2 и вытесняли необходимый объем пробы давлением газа. Затем конец шланга 1 опускали в пробирку с 70 %-ным этанолом для сохранения стерильности пробоотборника. Последующие отборы проб начинали с промывки линии небольшим количеством культуральной жидкости.

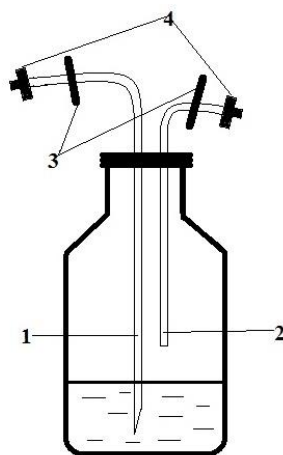


Рисунок 15 - Бутылка для выращивания инокулятов: 1 – отвод, опущенный в среду, 2 – газоотвод, 3 – зажимы, 4 – мембранные вентиляционные фильтры (0,2 мкм).

2.6.3 Одностадийное непрерывное культивирование в ферментере в режиме протока

Одностадийное непрерывное культивирование моно- и смешанных культур *Bif. adolescentis* и *Bac.cereus* проводили в биореакторе Minifors (Infors HT, Швейцария) при 37°C с перемешиванием (100 об/мин) в анаэробных условиях с поддержанием pH 6,8 (соответствует pH нисходящего отдела толстого кишечника человека). Схема установки представлена на рисунке 16, фотография - в приложении 1. Инокуляты для ферментации выращивали аналогично п. 2.6.2.

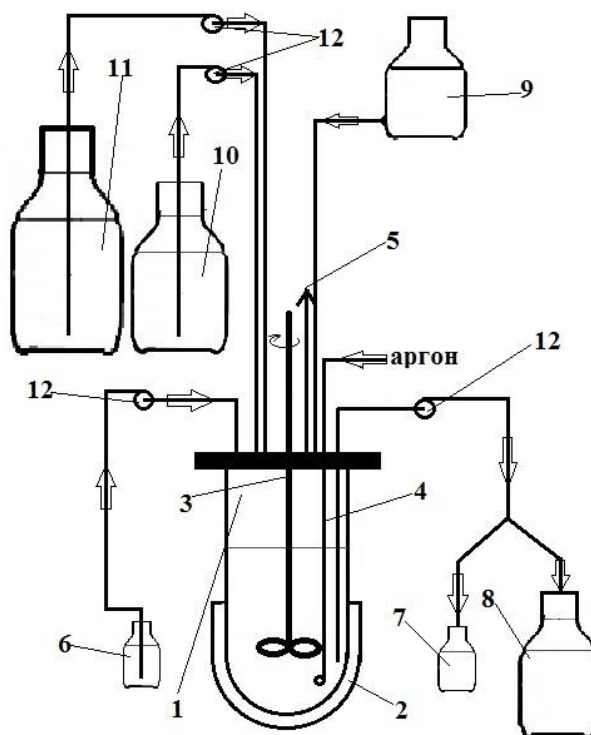


Рисунок 16 - Схема установки для моделирования условий толстого кишечника *in vitro*. 1 – ферментёр, 2 – рубашка, 3 – мешалка, 4 – система подачи инертного газа (аргона) через стерилизующий фильтр (0,2 мкм), 5 – выход газа через стерилизующий фильтр (0,2 мкм), 6 – бутылка с титрующим раствором, 7 – пробоотборник, 8 – бутылка для сбора биосуспензии, 9 – посевная колба, 10 – бутылка с углеводной подпиткой, 11 – бутылка с безуглеводной подпиткой, 12 – перистальтические насосы.

Ферментер автоклавировали с безуглеводной средой 30 мин при 117°C с открытой линией 5. Отдельно в колбах автоклавировали:

- раствор ОФ или глюкозы в дистиллированной воде (в 10 % от рабочего объема ферментера);
- раствор цистеина + ½ аскорбиновой кислоты в дистиллированной воде (5 % от рабочего объема ферментера);
- раствор $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + ½ аскорбиновой кислоты в дистиллированной воде (5 % от рабочего объема ферментера);
- раствор $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в дистиллированной воде (5 % от рабочего объема ферментера);
- раствор $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в дистиллированной воде с добавлением 1 капли конц. H_2SO_4 (5 % от рабочего объема ферментера).

Отдельно простерилизованные компоненты среды вносили в реактор через посевную колбу 9. Компоненты для безуглеродной основы подпитки вносили с соблюдением правил асептики в бутылку 11 и подсоединяли бутылки 10 и 11 к реактору в пламени. Далее рН в среде доводили стерильным 20%-ным раствором NaOH с помощью подключенной к ферментеру бутылки 6 до необходимого значения 6,8 в автоматическом режиме. До засева ферментационную среду нагревали до 37 °С с помощью рубашки 2 и барботировали азотом до минимального значения pO_2 . Засев проводили через посевную колбу 9 в асептических условиях. После засева культуральную жидкость повторно барботировали азотом до $pO_2 \leq 0,5$ (по показаниям датчика), после чего перекрывали подачу аргона и линию 5. Инокулированный ферментер выдерживали в течение часа (для адаптации культуры), после чего одновременно запускали подачу свежей питательной среды (из бутылки 11) и раствора углевода (из бутылки 10) и отъем культуральной жидкости в колбу 8 с помощью перистальтических насосов 12 (при этом отвод к пробоотборнику 7 пережат). Отбор проб проводили через пробоотборник 7 в пламени горелки. Скорость разбавления составляла $0,04 \text{ ч}^{-1}$, что соответствует скорости движения содержимого (химуса) в толстом кишечнике (полная смена объема реактора осуществлялась за 24 часа).

2.6.4 Непрерывное культивирование фекальной культуры в режиме протока по схеме three-stage continuous culture system (TSC)

Установка для трехстадийного непрерывного культивирования состояла из последовательно соединенных одного ферментера Biostat M (Sartorius, Германия) и двух ферментеров Minifors (Infors, Швейцария). Система имитировала условия восходящего, поперечного и нисходящего отделов толстого кишечника. Схема установки приведена на рисунке 17, фотография - в приложении 2. Данная установка соответствует параметрам, описанным в литературе [268]. В базальную среду (описана в п. 2.3.3) дополнительно вносили

8 г/л ОФ (соответствует суточному потреблению примерно 20 г/л). Образцы фекалий были получены от 3 здоровых доноров, не получавших антибиотикотерапию и не принимавших пробиотики в течение 3 месяцев, гомогенизированы в карбонатном буфере Рингера (6,5 г/л NaCl; 0,42 г/л KCl и 0,25 г/л CaCl₂) в атмосфере азота и отфильтрованы через 8 слоев стерильной марли с соблюдением правил асептики. Каждый ферментер инокулировали фекальными культурами из расчета 2 % масс. от объема питательной среды. Для создания анаэробных условий ферментер перед и непосредственно после инокулирования барботировали азотом, контролируя концентрацию кислорода по показаниям датчика pO₂ (0%). Через 12 часов от засева начинали подавать стерильную питательную среду в ферментер (R1) и далее перекачивать содержимое последовательно из R1 в R2, из R2 в R3 и далее в емкость-сборник (C). Рабочие объемы ферментеров составляли соответственно 1,65 л, 2,4 л и 2,4 л, что соответствовало коэффициенту разбавления 0,06 1/ч, 0,04 1/ч и 0,04 1/ч или времени полной замены среды 16 ч, 24 ч и 24 ч. pH среды поддерживали на уровне 5,5, 6,2 и 6,8, соответственно, добавлением раствора 20 % гидроксида натрия и 5 % раствора соляной кислоты.

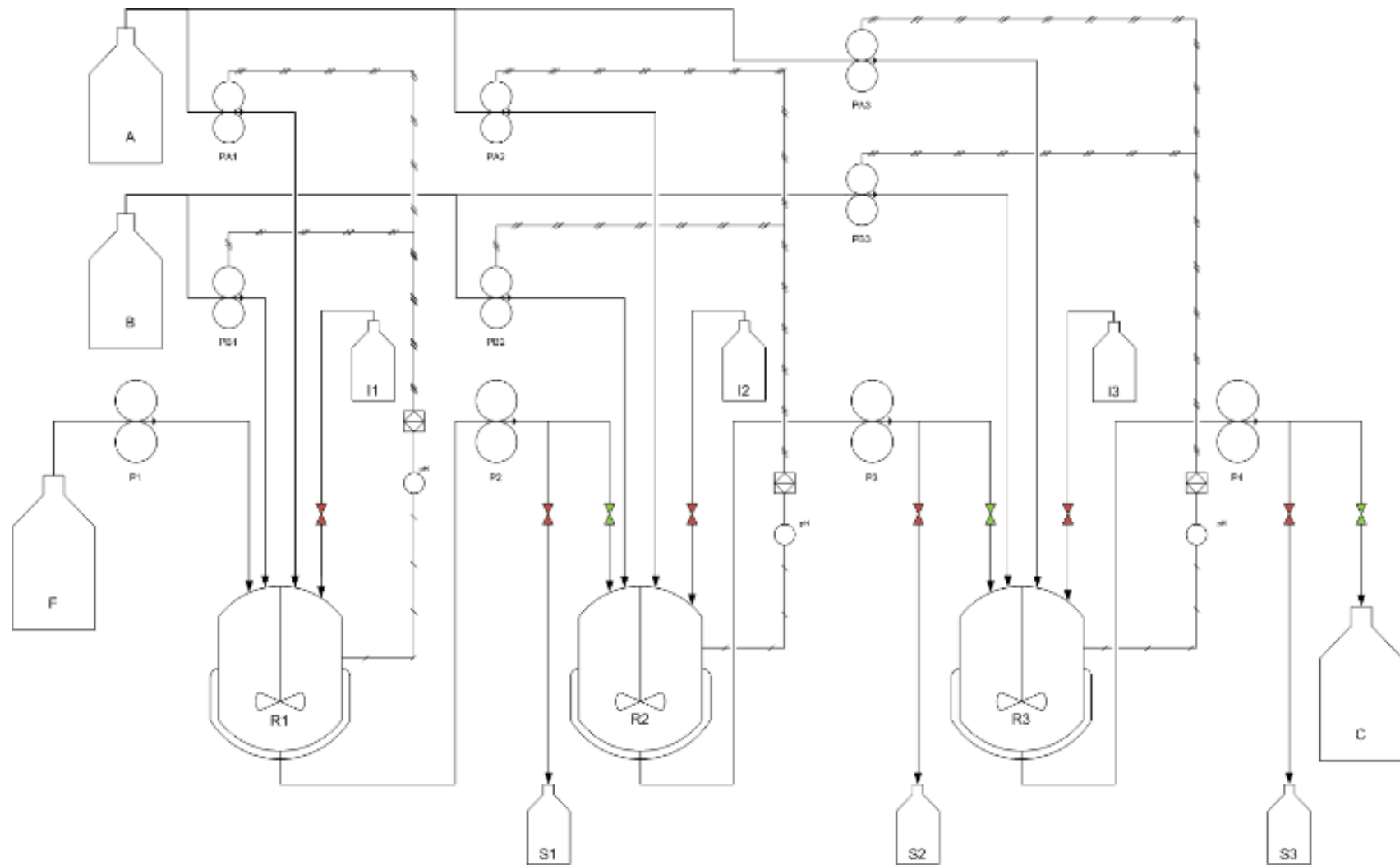


Рисунок 17 - Схема установки для трехстадийной непрерывной модели кишечника *in vitro*. R1-R3 – ферментёры; I1-I3 – посевные колбы; F – бутылка со средой; C – бутылка для сбора биосуспензии; S1-S3 – пробоотборники; P1-P4 – перистальтические насосы для подачи среды в R1 и перекачки биосуспензии из R1 в R2, из R2 в R3, из R3 в сборник; A – бутылка с раствором кислоты для поддержания pH; PA1-PA3 – перистальтические насосы для подачи раствора кислоты в ферментёры; B – бутылка с раствором щелочи для поддержания pH; PB1-PB3 – перистальтические насосы для подачи раствора щелочи в ферментёры.

Эксперимент I проводили в течение 28 суток. О наступлении стационарного состояния судили по концентрации кислот, которая должна была быть постоянной в течении более 3-х дней. После достижения равновесного состояния (на 14 сутки) в течение 5 дней в первый ферментер вносили культуру бифидобактерий штамма *Bif. adolescentis* в дозе 9 lg (КОЕ/мл), что соответствует суточной норме потребления. Затем на 22 сутки контаминировали R1 трехсуточной культурой *Bac. cereus* (преимущественно в споровой форме).

Для изучения воздействия периодически (1 раз в 1-2 дня) для каждого из реакторов проводили отбор проб. Определяли содержание молочной, уксусной, пропионовой и масляной кислот (методом ВЭЖХ), общей численности бактерий, численности бифидобактерий и бацилл, а также *Bacteroidetes*, *Clostridial cluster IV*, *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacilli*, типичных представителей кишечной микробиоты (методом qПЦР). Профиль гомологов ОФ и их потребление микроорганизмами определяли методом капиллярного электрофореза выборочно в реперных точках.

В контрольном эксперименте II R1 контаминировали трехсуточной культурой *Bacillus cereus* без предварительного внесения пробиотика, после достижения динамического равновесия (12,6 сутки от начала культивирования), фиксируемого по концентрациям кислот. Далее эксперимент вели до 20 суток.

2.7 Ротатабельный центральный композиционный план

Планирование экспериментов – удобный инструмент решения задач оптимизации процесса, вычисления меры влияния факторов на исследуемый параметр, поиска оптимальных значений факторов [280, 281]. Применение планирования экспериментов повышает их эффективность в совокупности с сокращением количества опытов. Результат проведения опытов называется **параметром оптимизации** или **откликом** системы на воздействие. Параметры процесса, влияющие на отклик системы называются **факторами** и обозначаются **X**, а математическая модель, описывающая влияние этих факторов называется – **функцией отклика Y** и в общем случае имеет вид:

$$Y = F (X_1, X_2, \dots X_k) \quad (4),$$

где k – количество факторов.

Пространство, образованное осями факторов, называется **факторным пространством**. Чтобы указать значения параметра оптимизации требуется еще одна ось координат – ось отклика. Геометрический объект подобного вида называют **поверхностью отклика**. Чтобы упростить процесс математического анализа данных, факторы кодируют в безразмерные величины. Операция кодирования заключается в линейном преобразовании факторного пространства с переносом начала координат в точку с координатами $(X_{1\text{ ср}}; X_{2\text{ ср}}; \dots X_{k\text{ ср}})$, где $X_{\text{ср}}$ – среднее между минимальным и максимальным значениями фактора.

Ротатабельные центральные композиционные планы (РЦКП) [280-283] обеспечивают одинаковую дисперсию прогноза при равных расстояниях от центра плана и состоят из точек центра плана N_0 , точек в ядре плана N_c и звездных точек N_α . При этом величина звездного плеча α вычисляется по формуле:

$$\alpha = \frac{2 (k - p)}{4} \quad (5),$$

где p – дробность факторного эксперимента.

При трехфактном эксперименте звездное плечо $\alpha = 1,682$; в центре плана 6 опытов (n_0), в ядре плана $N_c - 8$ опытов, а в звездных точках $N_\alpha - 6$ опытов, общее количество опытов $N = 20$.

В данной работе РКЦП был использован для исследования влияния концентрации осадителя (x_1) как параметра, определяющего фракционный состав (среднюю степень полимеризации) фруктанов лопуха, десятичного логарифма начальной численности бифидобактерий (x_2) и клеток тест-штамма (x_3) на исход совместного культивирования. В качестве функций отклика, определяющих антагонистическую активность синбиотика (как критерия его эффективности), выбрали синбиотический фактор (Y_1) и конечную численность клеток тест-штамма (Y_2). Уравнение полиномиальной регрессии имело следующий вид:

$$Y_k(x_1, x_2, x_3) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{23}x_2x_3 + b_{13}x_1x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (6)$$

Расчет коэффициентов уравнения (6) и дисперсии коэффициентов (s_j^2) проводили по уравнениям [282, с. 192-194]. Для оценки значимости коэффициентов уравнения их проверяли по критерию Стьюдента [282, с. 185] при уровне значимости $p = 0,05$:

$$t_j = \frac{b_j}{s_j} > t_p(f_{\text{восп}}) \quad (7)$$

где $f_{\text{восп}} = n_0 - 1$ – число степеней свободы дисперсии воспроизводимости; $t_p(f_{\text{восп}})$ – табличное значение коэффициента Стьюдента.

Дисперсию воспроизводимости ($s_{\text{восп}}^2$) определяли по данным в центре плана, согласно уравнению [282, с. 194]:

$$s_{\text{восп}}^2 = \frac{\sum_{u=1}^{n_0} (Y_u^o - \bar{Y}^0)^2}{n_0 - 1} \quad (8)$$

где \bar{Y}^0 – среднее значение параметра в центре плана.

Остаточную дисперсию ($s_{\text{ост}}^2$) определяли по уравнению [282, с. 194]:

$$s_{\text{ост}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{N - l} \quad (8)$$

где Y_i и \hat{Y}_i – экспериментальное и рассчитанное по функции отклика значения;
 l – количество значимых коэффициентов уравнения (6).

Дисперсию адекватности ($s_{\text{ад}}^2$) определяли по формуле [282, с. 195]:

$$s_{\text{ад}}^2 = \frac{s_{\text{ост}}^2 f_{\text{ост}} - s_{\text{воспр}}^2 f_{\text{воспр}}}{f_{\text{ост}} - f_{\text{воспр}}} \quad (9)$$

где $f_{\text{ост}} = N - l$ – число степеней свободы остаточной дисперсии.

Адекватность модели оценивали по критерию Фишера по отношению адекватности и дисперсии воспроизводимости [282, с. 194] при уровне значимости $p = 0,05$:

$$F = \frac{s_{\text{ад}}^2}{s_{\text{воспр}}^2} \leq F_{1-p}(f_{\text{ад}}, f_{\text{воспр}}) \quad (10)$$

где $f_{\text{ад}} = f_{\text{ост}} - f_{\text{воспр}}$ – число степеней свободы дисперсии адекватности.

Если расчетное значение критерия Фишера было меньше табличного, то уравнение считали адекватным.

Расчеты и построение поверхностей отклика проводили с помощью программного обеспечения MathLab. Для нахождения набора экстремальных значений факторов использовали метод сканирования с переменным шагом. Метод сканирования считается достаточно надежным для нахождения глобального оптимума в многоэкстремальных задачах с известными заранее границами и заключается в последовательном переборе точек в пространстве параметров. Метод был реализован с помощью пакета программ GeoGebra Classic версия 6.0.694.0.

2.8 Статистическая обработка экспериментальных данных

Точность результатов измерений, полученных в нескольких повторностях (3 и более), определяли по стандартному отклонению (дисперсии воспроизводимости) измеряемых величин и строили доверительные интервалы, в некоторых случаях определяли относительную ошибку [280].

Дисперсию воспроизводимости рассчитывали по формуле:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad (11),$$

где x_i – результат измерения, \bar{x} – среднее арифметическое всех значений в выборке; n – количество измерений (объем выборки).

Для построения доверительного интервала использовали распределение Стьюдента:

$$\bar{x} - t_{1-p/2} \frac{S_x}{\sqrt{n}} \leq m_x \leq \bar{x} + t_{1-p/2} \frac{S_x}{\sqrt{n}} \quad (12),$$

где m_x – математическое ожидание измеряемой величины; S_x – стандартное отклонение; $t_{1-p/2}$ – табличное значение квантиля при количестве степеней свободы $f = n - 1$ и уровне значимости p (расчёт вели для $p = 0,05$).

Каждый полученный результат представлял собой среднее \pm стандартное отклонение трех экспериментов. Данные анализировали с помощью ANOVA (дисперсионный анализ) с использованием программного обеспечения MathLab. Статистически значимым считался уровень $p = 0,05$.

2.9 Корреляционный анализ

Корреляционный анализ использовали для определения взаимосвязи между двумя массивами данных x и y [280-282]. Тесноту линейной связи определяли с помощью коэффициентов ковариации $cov_{x,y}^*$ (мера линейной зависимости двух случайных величин) и корреляции $r_{x,y}^*$ (статистическая взаимосвязь двух или нескольких случайных величин):

$$cov_{x,y}^* = \frac{1}{n - 1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \quad (13)$$

$$r_{x,y}^* = \frac{cov_{x,y}^*}{\sqrt{S_x^2 S_y^2}} \quad (14),$$

где S^2 – выборочная дисперсия.

Для биологических систем считали связь сильной (выраженной) при $|r_{x,y}| > 0,5$, слабой – при $|r_{x,y}| \leq 0,5$.

В случае положительных значений коэффициента корреляции взаимосвязь случайных величин считали прямой, а при отрицательных – обратной. В некоторых случаях при нелинейных функциональных зависимостях выборочный коэффициент корреляции может быть по абсолютному значению существенно меньше единицы.

2.10 Регрессионный анализ

Регрессионный анализ – это статистический метод исследования влияния одной или нескольких независимых переменных на зависимую переменную [280, 282]. В данной работе регрессионный анализ использовали для определения констант уравнения K_i (уравнение (22)), МІС (уравнение (23)), оптимальных скоростей роста тест-штаммов и пробиотиков. В одностадийной непрерывной функциональной модели при совместном культивировании бифидобактерий и бацилл коэффициенты квадратного уравнения (29) влияния концентрации молочной и уксусной кислот на параметр t_λ , учитывающий продолжительность лаг-фазы, также определяли с применением регрессионного анализа – методом наименьших квадратов (МНК).

МНК предполагает выбор в качестве уравнения приближенной регрессии такой функции $f(x)$, для которой сумма квадратов отклонений от измеренных величин будет минимальной:

$$\Phi = \sum_{i=1}^n [y_i - f(x_i)]^2 = \min \quad (15)$$

Определение коэффициентов по методу МНК сводится к определению минимума функций многих переменных $\hat{y} = f(x, b_0, b_1, \dots, b_k)$. Минимум функции будет достигаться при условии равенства нулю частных производных. В результате дифференцирования функции по каждой из переменных получают систему нормальных уравнений, количество которых равно числу неизвестных

коэффициентов, значение которых определяют путем решения полученной системы.

Для определения констант уравнения K_i , MIC и оптимальных скоростей роста, моно-культуры тест-штаммов выращивали в периодических условиях, без поддержания рН, с внесением в питательную среду различных концентраций молочной или уксусной кислот перед инокуляцией. В контрольном эксперименте кислоты не добавляли. Для каждого варианта концентрации ингибитора определяли удельную скорость роста тест-штамма (как тангенс угла наклона кривой изменения численности тест-штамма в экспоненциальной фазе роста в логарифмических координатах). Оптимальной скоростью роста тест-штамма считали удельную скорость роста, полученную в контрольных экспериментах (без добавления кислот). Полученные значения скоростей роста при определенных концентрациях кислоты подставляли в соответствующие уравнения, приведенные к линейному виду, и вычисляли коэффициенты путем решения системы уравнений относительно определяемых коэффициентов.

2.11 Многопараметрический анализ (метод пчелиного роя)

Для вычисления коэффициентов систем уравнения (24) применяли метод пчелиного роя (МПЧ) [284, 285]. В общем случае МПЧ применяют для решения проблем оптимизации – нахождения оптимальных параметров в многопараметрических математических моделях. Алгоритм предполагает перебор значений параметров, изменяемых подобно движению пчел в поиске нектара. Искусственный пчелиный рой разделяют на три группы особей – рабочие пчелы, пчелы-наблюдатели и пчелы-разведчики. Рабочие пчелы занимаются непосредственно добычей нектара и несут в себе информацию о его удаленности от улья, концентрации и удобстве добычи; их поведение характеризуется значением целевой функции. Пчелы-наблюдатели контролируют рабочих пчел и несут информацию о направлении источника от улья и его полезности. Пчелы-разведчики осуществляют поиск источников

нектара и передают информацию о пути к ним рабочим. При истощении источника рабочими пчелами пчелы-наблюдатели подают сигнал пчелам-разведчикам, после чего запускается алгоритм поиска нового источника. Алгоритм использования МПЧ соответствовал описанному в [284, 285].

В качестве критерия определения оптимальных значений констант была выбрана среднеквадратическая ошибка (RMSE).

2.12 Применение математических моделей для расчета численностей тест-штаммов и пробиотиков при совместном культивировании в различных условиях

Расчет численности тест-штамма в со-культуре с пробиотиком по полученным для периодических культур моделям K_i и MIC проводили методом итерации с шагом $\Delta t = 1$ ч, приводя уравнение экспоненциального роста в интегральную форму:

$$x_{t+1}^{Npr} = x_t^{Npr} \cdot \exp(\mu_t^{Npr} \cdot \Delta t) \quad (16),$$

где μ_t^{Npr} – удельная скорость роста тест-штамма, рассчитанная при условиях (концентрациях ингибиторов) в момент t по уравнению (22) или (23).

Численность пробиотика для каждого момента времени t определяли аналогичным образом, но удельную скорость роста принимали постоянной. Расчет начинали с экспериментально полученного значения начальных численностей микроорганизмов в со-культуре. Для каждого варианта со-культур экспериментально определяли экономический коэффициент образования молочной и уксусной кислот бифидобактериями по начальной и конечной точкам эксперимента (по данным ВЭЖХ). Остальные коэффициенты моделей были определены в предварительных экспериментах с чистыми культурами (см. разделы 2.10 и 3.3). Концентрации кислот в момент времени t рассчитывали через полученные экономические коэффициенты и численность пробиотика. Используя соответствующие концентрации кислот, определяли удельную

скорость роста тест-штамма, из данного значения определяли численность на каждом шаге по уравнению (16).

Расчет численности бифидобактерий и бацилл при совместном культивировании в одностадийной непрерывной функциональной модели проводили с использованием систем уравнений (24) и (26-29) в интегральной форме. В данном случае итерацию проводили с шагом $\Delta t = 0,1$ ч.

2.13 Оценка точности прогноза математических моделей

Для оценки качества модели множественной регрессии зачастую вычисляют коэффициент множественной корреляции (индекс корреляции) R и коэффициент детерминации R^2 . Квадрат коэффициента множественной корреляции $R^2_{j,1,2,\dots,j-1,j+1,\dots,m}$ называют **выборочным множественным коэффициентом детерминации** [281]. R^2 показывает, какую долю случайного разброса исследуемой величины X_j объясняет изменчивость остальных случайных величин X_1, X_2, \dots, X_m . Коэффициент детерминации является положительной величиной и принимает значения в интервале от 0 до 1. При приближении значения R^2 к единице можно сделать вывод о тесноте взаимосвязи случайных величин.

Степень расхождения экспериментальных и рассчитанных с помощью K_i или МС моделей значений численности тест-штамма при ингибировании роста метаболитами пробиотика – молочной и уксусной кислотами, при периодическом культивировании оценивали путем расчета коэффициента детерминации [280]:

$$R^2 = 1 - \frac{RSS}{TSS} = 1 - \frac{\sum_{t=1}^n (y_t - \hat{y}_t)^2}{\sum_{t=1}^n (y_t - \bar{y}_t)^2} \quad (17),$$

где RSS – сумма квадратов регрессионных остатков; TSS – общая дисперсия; y_t, \hat{y}_t – экспериментальное и расчетное значения величины, соответственно; \bar{y}_t – среднее арифметическое значений величины, полученных экспериментально.

Для оценки точности прогноза моделей, полученных для описания изменения численности культур при непрерывном культивировании, использовали метод расчета относительной ошибки. Относительная погрешность представляет собой отношение абсолютной погрешности измерения к действительному или измеренному значению измеряемой величины. В данной работе относительные ошибки определяли как разность полученного с помощью модели и экспериментального значений величины, отнесенную к экспериментальному значению, в %.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Исследование антагонизма в со-культуре пробиотиков и тест-штаммов при периодической ферментации

Основной особенностью микробных сообществ является сложная система разнообразных типов экологических связей между образующими ее популяциями. Метаболические взаимодействия, такие как последовательное расщепление и окисление субстрата или перекрестное питание (рисунок 1), как правило, оказываются в центре внимания большинства исследований. Однако, аменсализм, проявляющийся, в подавлении одних популяций посредством метаболитов других, также важен, особенно в контексте борьбы с контаминацией толстого кишечника патогенами [55].

Исследования межмикробных взаимодействий на людях осложнены труднодоступностью материала, этическими и экономическими аспектами. Поэтому широко применяются функциональные модели кишечника, позволяющие обеспечить простоту отбора проб и полный контроль условий эксперимента (описаны в п. 1.3.1). Такие модели незаменимы на финальных этапах *in vitro* исследований влияния пробиотиков, пребиотиков и синбиотиков на микробиоту кишечника. Однако разнообразие членов микробиоты и продуцируемых ими метаболитов значительно затрудняет выявление конкретных путей взаимодействия. Предположительно, для подробного изучения одного типа связи можно пройти по пути упрощения системы. В случае аменсализма, например, логично выделение микроорганизмов двух типов: продуцентов ингибирующих метаболитов и объектов ингибирования (кишечных патогенов и/или контаминантов пищи). Ярким примером ингибирующих метаболитов в кишечнике являются органические кислоты, продуцируемые, в основном, бифидо- и лактобактериями. Так, например, в исследовании [247] было выявлено подавление роста *Clostridium difficile* при совместном культивировании с бифидобактериями за счет продуцирования последними КЦЖК и молочной кислоты.

Причем, относительная доля бифидобактерий в толстом кишечнике выше, а за счет гетероферментативного брожения основными продуктами их метаболизма являются молочная и уксусная кислоты, в отличие от лактобактерий, продуцирующих преимущественно молочную кислоту.

Метаболизм бифидобактерий хорошо изучен, в том числе, при потреблении пребиотических субстратов, таких как ОФ, инулин и др. Было доказано, что некоторые пребиотические субстраты метаболизируются бифидобактериями с более высоким продуцированием органических кислот, нежели глюкоза [286]. Можно предположить, что синбиотическая композиция на основе пробиотического микроорганизма (выделенного из здоровой микробиоты) и пребиотика будет более эффективно подавлять рост тест-штамма (объекта ингибирования), чем индивидуальный пробиотик, за счет более активного синтеза ингибирующих метаболитов.

Для проверки данной гипотезы были подобраны две бинарные культуры, включающие пробиотик и тест-штамм: *Bif. adolescentic* ATCC 15703 и *Bac. cereus* ATCC 9634; *Bif. bifidum* ВКПМ АС-1666 и *S. aureus* ATCC 43300. Сравнивали рост микроорганизмов как в чистых, так и в смешанных культурах, в среде с пребиотиком или глюкозой. Выбор *Bif. adolescentic* обоснован данными о том, что представители данного вида преобладают в микробиоте толстого кишечника взрослого человека [163], а штамм *Bif. bifidum* ВКПМ АС-1666 широко применяется в коммерческих пробиотических и синбиотических продуктах. Начальная концентрация пребиотических субстратов или глюкозы в питательной среде была равна 10 г/л. Отсутствие лимитирования роста в периодической культуре при данной концентрации углевода было подтверждено экспериментально для каждого исследуемого микробного объекта.

Изменение численности *Bif. adolescentic* и *Bac. cereus* и pH при совместном культивировании в среде с пребиотиком (ОФ) или глюкозой, а также кривые роста тест-штамма в моно-культуре представлены на рисунке 18. Для моделирования различных доз контаминанта инокулят *Bac. cereus* засеивали в объеме 0,33 %, либо 0,033 % от объема инокулята бифидобактерий, начальная

численность которых во всех вариантах лежала в пределах 6,9 – 7,2 lg (КОЕ/мл).

Расчетные характеристики моно- и смешанных культур представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Результаты моно- и со-культивирования *Bac. cereus* (Npr) и *Bif. adolescentis* (Pr). Со-культура 1 (инокулят бацилл 0,33%), со-культура 2 (инокулят бацилл 0,033%). Начальный титр бифидобактерий 6,9-7,2 lg КОЕ/мл

Культура	Углевод	Начальная численность бацилл, lg (КОЕ/мл)	μ_{opt}^{Pr} (ч ⁻¹)	μ_{opt}^{Npr} (ч ⁻¹)	Экономические коэффициенты образования кислот, мг/КОЕ	
					молочной $Y_{L/X}$	уксусной $Y_{A/X}$
<i>Bif. adolescentis</i> моно-культура	ОФ	-	0,27 ± 0,02	-	13,2 ± 1,1	13,9 ± 0,8
	глюкоза	-	0,26 ± 0,03	-	10,2 ± 0,7	10,6 ± 0,9
<i>Bac. cereus</i> моно-культура	ОФ (рис.18 А)	5,55 ± 0,05	-	1,10 ± 0,02	-	-
	ОФ (рис.18 В)	4,20 ± 0,06	-	1,12 ± 0,01	-	-
	Глюкоза (рис.18 С)	5,27 ± 0,05	-	1,06 ± 0,04	-	-
	Глюкоза (рис.18 D)	4,22 ± 0,07	-	1,04 ± 0,02	-	-
Со-культура 1 (рис.18 А)	ОФ	5,34 ± 0,26	0,45 ± 0,03	1,08 ± 0,02	2,09 ± 0,06	3,09 ± 0,10
Со-культура 2 (рис.18 В)		4,40 ± 0,18	0,45 ± 0,02	1,08 ± 0,01		
Со-культура 1 (рис.18 С)	глюкоза	5,29 ± 0,12	0,54 ± 0,01	0,89 ± 0,04	0,77 ± 0,08	2,44 ± 0,11
Со-культура 2 (рис.18 D)		4,41 ± 0,20	0,52 ± 0,02	0,96 ± 0,03		

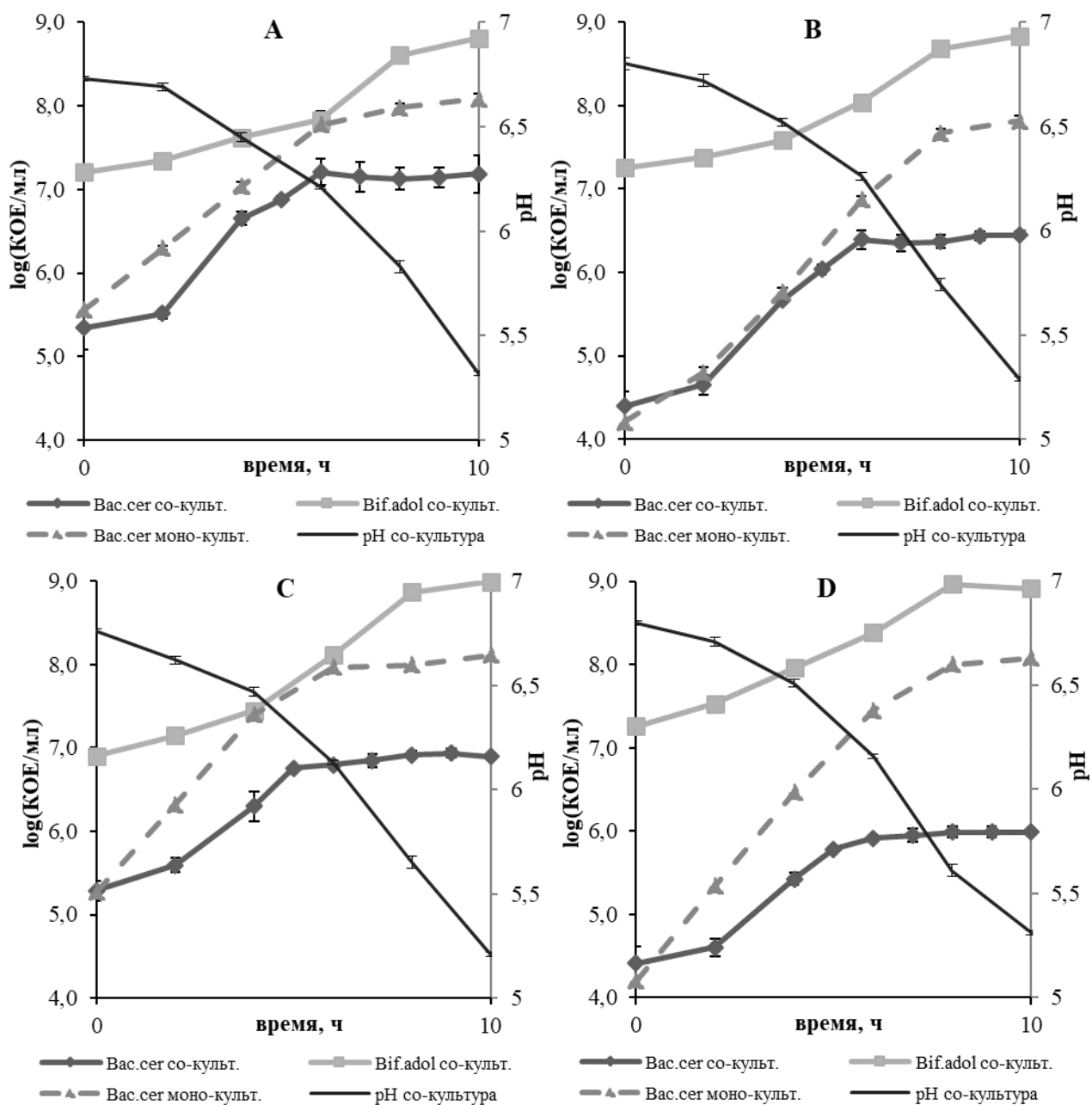


Рисунок 18 - Кривые роста *Bif. adolescentis*, *Bac. cereus* и pH в со-культуре и кривые роста бацилл в моно-культуре в среде с ОФ (А, В) или глюкозой (С, D). Начальное количество бацилл 5,5 (А, С) или 4,5 (В, D) lg (КОЕ/мл)

В присутствии бацилл повышалась удельная скорость роста бифидобактерий и выход метаболитов по сравнению с чистой культурой (таблица 3). Так скорость роста *Bif. adolescentis* в среде с ОФ повышается в 1,7, а с глюкозой – в 2,1 раза, независимо от количества тест-штамма. Стимулирование роста пробиотика, по-видимому, связано с протеолитической активностью бацилл [287], повышающей питательную ценность среды для бифидобактерий. Массовое соотношение молочной и уксусной кислот при

ферментации в смешанной культуре сдвигалось в сторону уксусной кислоты. Экономический коэффициент образования уксусной кислоты в среде с ОФ был в 1,5 раза выше, а с глюкозой - примерно в 3 раза выше, чем молочной кислоты. Экономические коэффициенты образования молочной и уксусной кислот бифидобактериями в смешанных культурах были ниже, чем в моно-культуре с аналогичными субстратами. Это может быть связано с расходом кислот в процессе ингибирования роста бацилл или их частичным метаболизированием тест-штаммом. Отсутствие пропионовой кислоты и бактериоцинов подтверждено для всех вариантов смешанных культур в конечный момент культивирования (10 ч), что предполагает единственный подавляющий рост тест-штамма фактор - ингибирование молочной и уксусной кислотами. При этом рассматривать систему при большей продолжительности ферментации не представляется целесообразным, поскольку основные события взаимодействия уже произошли и рост бацилл полностью прекратился.

Достоверное различие (при уровне значимости $p = 0,05$) конечного содержания бацилл между чистой и смешанной культурой установлено для всех вариантов (рисунок 18), хотя присутствие пробиотика и пребиотика практически не влияло на удельную скорость роста бацилл в первые часы совместного культивирования. В среде с ОФ, при большей начальной численности тест-штамма, μ_{opt} (удельная скорость роста, определенная на момент минимального содержания ингибиторов в среде) была даже выше, чем в монокультуре. В среде с глюкозой, μ_{opt} бацилл была значительно ниже, чем в моно-культуре (таблица 3). Однако, во всех вариантах в смешанной культуре рост тест-штамма прекращался после 6 часов, а конечная численность бацилл была на 1,5 – 2 порядка ниже, чем в моно-культуре, что иллюстрирует ингибирующее действие продуцируемых бифидобактериями кислот. Снижение начального количества тест-штамма приводило к уменьшению его конечной численности в смешанной культуре, чего не наблюдали в моно-культуре бацилл.

На следующем этапе исследовали рост *St. aureus* в моно- и со-культуре с *Bif. bifidum* в среде с пребиотиком (ОФ или лактулозой) или глюкозой (Рисунок 19).

В данной серии экспериментов также варьировали начальную численность тест-штамма, при неизменной начальной численности пробиотика ($7,6 - 7,8 \lg$ (КОЕ/мл)). Расчетные характеристики моно- и смешанных культур представлены в таблице 4.

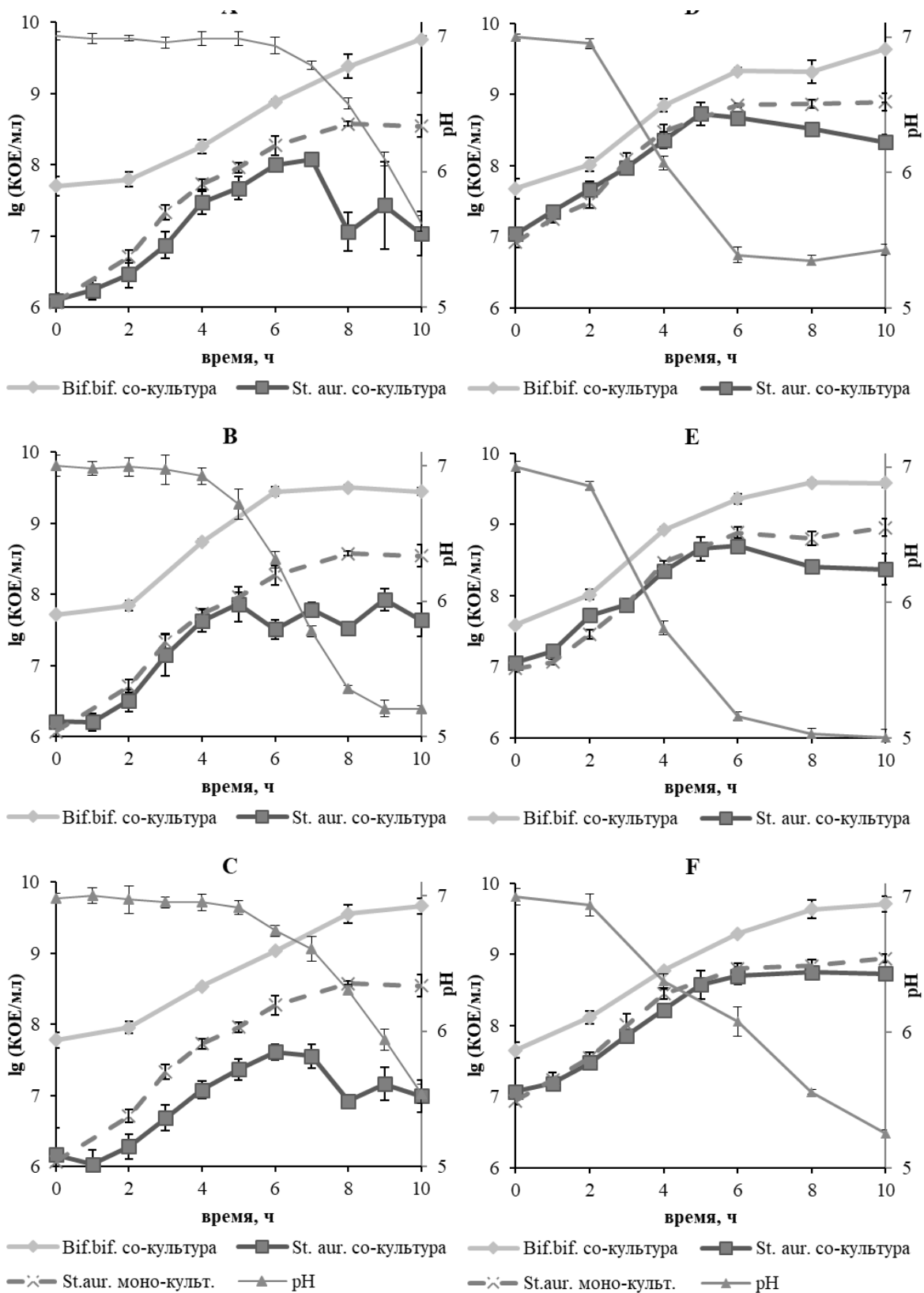


Рисунок 19 - Кривые роста *Bif. bifidum*, *St.aureus* и pH в со-культуре и кривые роста *St.aureus* в моно-культуре при различной начальной численности тест-штамма (А, В, С – $X_0^{S.aur} = 10^6$ КОЕ/мл; D, E, F - $X_0^{S.aur} = 10^7$ КОЕ/мл) в среде с глюкозой (А, D), ОФ (В, Е) или лактулозой (С, F)

Таблица 4 - Результаты моно- и со-культивирования *St. aureus* (Npr) и *Bif. bifidum* (Pr).
 Со-культура 1 ($X_0^{S.aur} = 10^7$ КОЕ/мл), со-культура 2 ($X_0^{S.aur} = 10^6$ КОЕ/мл). Начальная численность бифидобактерий 7,6-7,8 lg КОЕ/мл.

Культура	Углеводный субстрат	$X_0^{S.aur}$, lg(КОЕ/мл)	μ_{opt}^{Pr} (ч ⁻¹)	μ_{opt}^{Npr} (ч ⁻¹)	Экономические коэффициенты образования кислот, пг/КОЕ	
					молочной $Y_{L/X}$	уксусной $Y_{A/X}$
<i>Bif. bifidum</i> моно- культура	глюкоза	0	0,75 ± 0,02	-	0,97 ± 0,11	1,60 ± 0,15
	ОФ	0	0,78 ± 0,03	-	0,52 ± 0,04	0,61 ± 0,03
	лактозула	0	0,72 ± 0,03	-	0,37 ± 0,02	0,71 ± 0,06
<i>St. aureus</i> моно- культура	глюкоза (рис.1 А)	6,08 ± 0,07	-	0,93± 0,05	-	-
	глюкоза (рис.1 D)	6,92 ± 0,07	-	0,91± 0,03	-	-
	ОФ (рис.1 В)	6,07 ± 0,09	-	0,92± 0,03	-	-
	ОФ (рис.1 Е)	6,97 ± 0,05	-	0,88± 0,06	-	-
	лактозула (рис.1 С)	6,07 ± 0,10	-	0,92 ± 0,02	-	-
	лактозула (рис.1 F)	6,94 ± 0,06	-	0,87± 0,05	-	-
Со-культура 1 (рис.1 А)	глюкоза	6,09 ± 0,10	0,47 ± 0,02	0,89 ± 0,01	0,37 ± 0,05	0,39 ± 0,02
Со-культура 2 (рис.1 D)		7,04 ± 0,04	0,48 ± 0,03	0,76 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,39 ± 0,03
Со-культура 1 (рис.1 В)	ОФ	6,21 ± 0,07	0,48 ± 0,03	1,09 ± 0,02	0,57 ± 0,06	0,53 ± 0,03
Со-культура 2 (рис.1 Е)		7,06 ± 0,05	0,50 ± 0,02	0,81 ± 0,03	0,60 ± 0,09	0,56 ± 0,05
Со-культура 1 (рис.1 С)	лактозула	6,16 ± 0,38	0,48± 0,01	0,81± 0,02	0,17 ± 0,01	0,28 ± 0,01
Со-культура 2 (рис.1 F)		7,07 ± 0,05	0,50± 0,01	0,66± 0,02	0,15 ± 0,03	0,27 ± 0,01

В данных экспериментах не наблюдали стимулирование роста бифидобактерий в присутствии тест-штамма. Оптимальные удельные скорости роста *Bif. bifidum* в смешанных культурах различались между собой незначительно (0,47 до 0,50 ч⁻¹), но были примерно в 1,5 раза ниже, чем в монокультурах. Повышение начальной численности стафилококков не влияло на экономические коэффициенты образования кислот. Наибольшие экономические

коэффициенты продуцирования кислот в смешанных культурах наблюдали при росте с ОФ (0,60 пг/КОЕ по молочной и 0,56 пг/КОЕ по уксусной кислотам), хотя в моно-культурах наибольшее продуцирование было в среде с глюкозой (0,97 пг/КОЕ по молочной и 1,60 пг/КОЕ по уксусной кислотам). При совместном росте в среде с глюкозой и лактулозой продуцирование кислот было ниже, чем в моно-культурах, что соотносится с результатами предыдущих исследований. Однако, в среде с ОФ в смешанных культурах значения экономических коэффициентов были близкими к полученным в моно-культуре. Продуцирование молочной и уксусной кислот в со-культуре между собой различалось не существенно при росте с глюкозой и ОФ, однако на лактулозе экономический коэффициент образования молочной кислоты был почти вдвое меньше значения для уксусной.

Оптимальная удельная скорость роста *St. aureus* на всех субстратах в моно- и со-культурах была выше при меньшей начальной численности тест-штамма. В вариантах с меньшим начальным количеством стафилококков их конечная численность в смешанной культуре была примерно на два порядка ниже, чем в моно-культуре, однако при большем начальном количестве тест-штамма различия составляли 0,5 lg (КОЕ/мл) и ниже (в среде с лактулозой). Практически во всех вариантах проведения эксперимента в смешанной культуре наблюдали падение численности стафилококков после 6 часов роста, чего не наблюдали при исследовании *Vac. cereus*. Видимо, это связано с переходом действия кислот от бактериостатического к бактериолитическому [288]. При большей начальной численности тест-штамм достигает максимального количества, обнаруживаемого в моно-культуре, к 5-6 часам со-культивирования, а при меньшей - отмирание клеток начинается до достижения максимального значения. Это означает, что эффективность антагонизма синбиотической композиции в отношении данного тест-штамма сильно зависит от начальной численности последнего.

Описанные исследования показали, что наличие пребиотика в среде незначительно влияет на удельные скорости роста пробиотика: в моно-культурах

обоих штаммов бифидобактерий, удельные скорости роста на пребиотических субстратах или глюкозе различаются слабо. В случае *Bif. adolescentis* наблюдали стимулирующее продуцирование органических кислот пребиотиком. В присутствии ОФ, как в моно-, так и в со-культурах данный штамм продуцировал больше кислот, чем при росте с глюкозой. В случае *Bif. bifidum* подобный эффект не наблюдали в моно-культурах (наибольшие экономические коэффициенты были в среде с глюкозой), однако, в смешанных культурах с ОФ пробиотик продуцировал больше кислот, чем в среде с глюкозой. Причем, эффект ОФ и лактулозы на рост тест-штамма и продуцирование ингибирующих метаболитов бифидобактериями различался значительно, что говорит о специфичности каждой синбиотической композиции.

3.2. Математическая модель со-культуры пробиотика и тест-штамма и количественный критерий эффективности синбиотиков на ее основе

Математическое моделирование биологических процессов позволяет повысить объективность их понимания. Предсказательная микробиология основывается на трех основных принципах: 1) рост, выживание и инактивация микроорганизмов считаются воспроизводимыми явлениями, 2) поведение микроорганизмов зависит от ограниченного числа факторов внешней среды; 3) путем количественной оценки совместного влияния этих факторов можно прогнозировать поведение микроорганизмов [289]. Математическое моделирование микробного роста широко используют, например, для описания роста микроорганизмов, вызывающих микробную порчу пищевых продуктов.

Механизм стимуляции роста пробиотиков пребиотиками изучен не полностью и обусловлен рядом факторов. Кроме того, различные субстраты могут стимулировать рост нескольких видов бактерий различными способами, что было подтверждено экспериментально. Изначально предполагали, что селективное стимулирование «полезных» микроорганизмов (в частности,

бифидобактерий) может быть связано с большей скоростью роста в среде с пребиотиком. Однако, результаты исследования обеих бинарных культур и литературные данные [290] не подтверждают данную гипотезу (удельные скорости роста тест-штаммов во всех вариантах превышали значения, полученные для пробиотиков). Можно предположить, что эффект от внесения в среду пребиотика будет проявляться не в повышении скорости роста пробиотиков, а в снижении скорости роста тест-штаммов, что, в частности, может быть результатом действия метаболитов.

С учетом полученных в со-культуре данных, для математического описания совместного роста пробиотика и тест-штамма были приняты следующие допущения: а) метаболиты тест-штамма не влияют на рост пробиотика; б) подавляющее действие в отношении тест-штамма обеспечивается только продуцированием метаболитов пробиотиком; в) ингибирование роста пробиотика собственными метаболитами не учитывается, поскольку их рост начинает угнетаться при значительно больших концентрациях таковых; г) накопление данных метаболитов ограничено и пропорционально увеличению численности пробиотика; д) константы ингибирования и минимальные ингибирующие концентрации, определенные для чистых культур тест-штаммов, не изменяются в со-культурах.

Как показали исследования, основное взаимодействие культур проходит в фазе экспоненциального роста, поэтому первое уравнение описывает зависимость численности пробиотика в экспоненциальной фазе от времени [291]:

$$x_{Pr} = x_{Pr_0} \cdot \exp(\mu_{Pr_{opt}} \cdot t) \quad (18),$$

где x_{Pr} – содержание пробиотика (КОЕ/мл) в момент времени t , x_{Pr_0} – начальное содержание (КОЕ/мл) пробиотика сразу после засева, $\mu_{Pr_{opt}}$ – удельная скорость роста пробиотика в оптимальных условиях в периодической культуре.

Накопление продукта P (молочной или уксусной кислоты), который, в сущности, является ингибитором (I) роста тест-штамма, можно описать, используя экономический коэффициент ($Y_{P/X}$):

$$I = P = Y_{P/X} \cdot (x_{Pr} - x_{Pr0}) \quad (19)$$

Объединив уравнения (18) и (19) получим:

$$I = P = x_{Pr0} \cdot Y_{P/X} \cdot \left\{ \exp(\mu_{Pr\,opt} \cdot t) - 1 \right\} \quad (20)$$

При этом начальную концентрацию продуктов считали равной 0, пренебрегая веществами, вносимыми с инокулятом, из-за малой концентрации.

В общем случае ингибирование роста тест-штамма при отсутствии лимитирования субстратом можно представить следующим образом:

$$\mu_{NPr} = \mu_{NPr\,opt} \cdot f(I) \quad (21)$$

Для математического описания роста тест-штамма в условиях антагонизма пробиотика были предложены модели, учитывающие влияние кислот, продуцируемых пробиотиком, через K_i (константу ингибирования) (уравнение 22) [292-295] или MIC (минимальную концентрацию ингибитора) (уравнение 23) [296, 297].

$$\frac{dX_{NPr}}{dt} = \mu_{NPr\,opt} \cdot \frac{K_{iL}}{L + K_{iL}} \cdot \frac{K_{iA}}{A + K_{iA}} \quad (22)$$

$$\frac{dX_{NPr}}{dt} = \mu_{NPr\,opt} \cdot \frac{pH - pH_{min}}{pH_{opt} - pH_{min}} \cdot \left[1 - \left(\frac{[L]}{MIC_L} \right)^\alpha \right] \cdot \left[1 - \left(\frac{[A]}{MIC_A} \right)^\beta \right] \quad (23),$$

где L, A – концентрации молочной и уксусной кислот, соответственно, г/л; K_{iL}, K_{iA} – их константы ингибирования, г/л; [L], [A], концентрации недиссоциированных молочной и уксусной кислот, соответственно, г/л; MIC – их минимальные ингибирующие концентрации, г/л; pH_{min} – уровень pH, ниже которого удельная скорость роста более не изменяется; pH_{opt} – значение pH, при котором удельная скорость роста будет максимальной; α, β – константы.

Необходимо упомянуть, что K_i – это концентрация ингибитора, при которой удельная скорость роста снижается в два раза. MIC – это минимальная концентрация ингибитора, выше которой снижение удельной скорости роста тест-штамма не происходит.

В случае нехватки субстрата в среде и/или в результате его потребления тест-штаммом и пробиотиком, рост культур может быть лимитирован. Фактор лимитирования субстратом можно учесть с помощью уравнения Моно [298]:

$$\mu_{NPr} = \mu_{NPr\,opt} \frac{K_{S\,NPr}}{S + K_{S\,NPr}} \cdot f(I) \quad (24)$$

$$\mu_{Pr} = \mu_{Pr\,opt} \frac{K_{S\,Pr}}{S + K_{S\,Pr}} \quad (25),$$

где $K_{S\,NPr}, K_{S\,Pr}$ – константы уравнения Моно тест-штамма и пробиотика, соответственно, г/л; S – концентрация субстрата, г/л.

Поскольку накопление продукта может быть описано кинетической зависимостью, связанной с удельной скоростью роста пробиотика, удельная скорость роста тест-штамма также будет функцией времени. В данном случае уравнение экспоненциального роста должно быть использовано в дифференциальной форме:

$$\frac{dX_{NPr}}{dt} = \mu_{NPr} X_{NPr} \quad (26)$$

Таким образом, получаем два варианта систем для описания совместного роста и взаимодействия культур в бинарной системе пробиотик - тест-штамм:

$$\left\{ \begin{array}{l} x_{Pr} = x_{Pr0} \cdot \exp(\mu_{Pr\,opt} \cdot t) \\ I = P = Y_{P/X} \cdot (x_{Pr} - x_{Pr0}) = x_{Pr0} \cdot Y_{P/X} \cdot \{ \exp(\mu_{Pr\,opt} \cdot t) - 1 \} \\ \mu_{NPr} = \mu_{NPr\,opt} \cdot f(I) \\ \frac{dX_{NPr}}{dt} = \mu_{NPr} X_{NPr} \end{array} \right. \quad (27)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu^{Pr} = \mu_{max}^{Pr} \frac{K_S^{Pr}}{S + K_S^{Pr}} \\ \frac{dx^{Pr}}{dt} = \mu^{Pr} x^{Pr} \\ I = P = Y_{P/X} \cdot (x^{Pr} - x_0^{Pr}) = Y_{P/X} \cdot x_0^{Pr} \cdot \{\exp(\mu^{Pr} \cdot t) - 1\} \\ \mu^{Npr} = \mu_{max}^{Npr} \frac{K_S^{Npr}}{S + K_S^{Npr}} \cdot f(I) \\ \frac{dx^{Npr}}{dt} = \mu^{Npr} x^{Npr} \end{array} \right. \quad (28)$$

Следует отметить, что проверка модели, учитывающей лимитирование субстратом (28), является значительно более трудоёмкой, поэтому культивирование в периодических условиях проводили при концентрациях субстрата, исключающих лимитирование. Соответственно расчеты вели по модели (27).

В заданный момент времени множители при $\mu_{Npr\,opt}$ в уравнениях (22) и (23) 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.

$$SF_{K_i} = \frac{K_{iL}}{L + K_{iL}} \cdot \frac{K_{iA}}{A + K_{iA}} \quad (29)$$

$$SF_{MIC} = \frac{pH - pH_{min}}{pH_{opt} - pH_{min}} \cdot \left[1 - \left(\frac{[L]}{MIC_L} \right)^\alpha \right] \cdot \left[1 - \left(\frac{[A]}{MIC_A} \right)^\beta \right] \quad (30)$$

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 прямая.

3.3. Определение параметров модели для тест-штаммов

Определение констант ингибирования (уравнения 22) и параметров MIC-модели (уравнения 23) для математического описания роста *Bac. cereus*, *St. aureus* и *Sal. enterica* в условиях ингибирования метаболитами пробиотика, проводили в моно-культурах. Культивирование и расчет констант проводили согласно пп.2.6.2. и 2.10. Перед засевом в среду добавляли рассчитанные значения одной из кислот, после чего рН в среде не изменяли. Начальные концентрации кислот определяли методом ВЭЖХ. Для каждой концентрации и каждой кислоты были получены кривые роста тест-штамма в трёх повторностях, по которым были определены удельные скорости роста. Результаты представлены на рисунке 20 и в таблице 5.

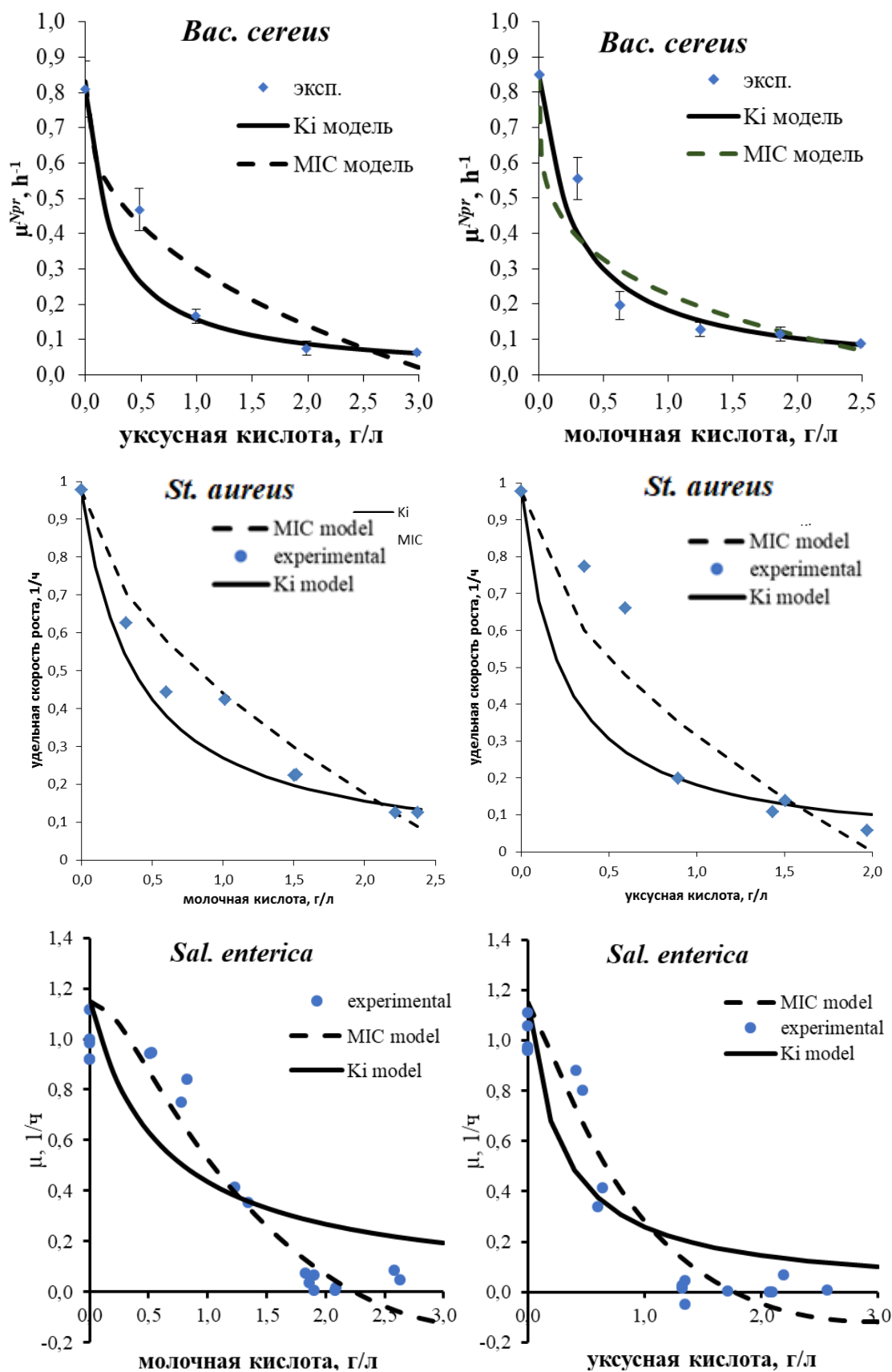


Рисунок 20 - Полученные экспериментально и рассчитанные с помощью моделей скорости роста тест-штаммов (*Bac. cereus*, *St. aureus* и *Sal. enterica*) в зависимости от концентрации молочной (слева) или уксусной (справа) кислот. Погрешность в измерении скоростей роста не превышала 2 % (при $p = 0,05$)

Таблица 5 - Значения K_i , МІС, констант степени, pH_{opt} и pH_{min} при ингибировании *B. cereus*, *S. aureus* и *S. enterica* молочной и уксусной кислотами

Тест-штамм	μ_{max} , ч ⁻¹	кислота	K _i - модель		MIC - модель				
			K _i , мг/мл	R ²	pH _{opt}	pH _{min}	MIC, мг/мл	α , β	R ²
<i>Bac. cereus</i> ATCC 9634	0,83	Молочная	0,273	0,95	7,0	4,9	3,48	0,25	0,91
		Уксусная	0,240	0,98			3,20	0,4	0,94
<i>St. aureus</i> ATCC 43300	0,98	Молочная	0,371	0,93	7,15	5,05	2,8	0,66	0,94
		Уксусная	0,136	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	1,7	0,86
		Уксусная	0,29	0,83			1,77	0,9	0,91

Все тест-штаммы продемонстрировали заметную чувствительность к комплексному действию рН и лактат- или ацетат-ионов даже при минимальных концентрациях (рисунок 20). В то же время характер зависимости удельной скорости роста от концентрации ингибитора различался как между видами, так и кислотами. Более резкое снижение удельной скорости роста было показано для сальмонелл, а более плавное – для бацилл, в присутствии как молочной, так и уксусной кислоты. Действие уксусной кислоты было сильнее во всех случаях. Снижение удельной скорости роста до нулевых значений наблюдали только в случае сальмонелл.

Хотя для бацилл и стафилококка коэффициенты детерминации (R^2) K_i -модели оказались выше, модель МІС более универсальна, поскольку значения R^2 данной модели для всех случаев были не менее 0,86 (таблица 5), что подразумевает высокую точность прогноза. Рассчитанные значения МІС хорошо отражали полученные эмпирические закономерности. Несмотря на то, что в литературе [299] коэффициенты степени (α или β) обычно принимают равным 0,5 (квадратный корень) или 1 (линейная функция), значения, рассчитанные в нашей работе, практически во всех случаях заметно отличались от указанных значений. Так, использование коэффициента больше 1 позволило отразить в

модели для сальмонелл плавное изменение удельной скорости роста при низких концентрациях молочной кислоты.

Значения MIC *B. cereus* были определены в ряде других исследований. MIC уксусной кислоты, полученная Nakai and Siebert [299] для *B. cereus* ATCC 11778 была близка значению, полученному в нашей работе (3,37 и 3,48 мг/мл, соответственно). MIC молочной кислоты, рассчитанная Hsiao and Siebert [300] была близка к полученному нами значению и составляла 3,48 и 3,20 мг/мл, соответственно.

Влияние уксусной кислоты на рост *St. aureus* носит штамм-специфичный характер [301]. Тем не менее, MIC трёх из четырех исследованных штаммов уксусной кислоты составляла 3,1 мг/мл и, только для одного, –1,6 мг. Таким образом, можно утверждать, что полученные результаты соотносятся с литературными данными. MIC *Staphylococcus aureus* ATCC 1163 молочной кислотой была определена как 2,50 мг/мл диско-диффузионным методом [301]. В нашем исследовании MIC молочной кислоты был ниже (2,00 мг/мл), что можно объяснить как различием параметров культивирования, так и штамм-специфичным эффектом.

Исследование [302] было посвящено определению MIC различных органических кислот в отношении 145 штаммов *Sal. enterica* относящихся к различным серотипам. Исследователи отмечали, что основной вклад в ингибирование патогена вносили именно диссоциированные кислоты, тогда как pH и концентрации недиссоциированных кислот не коррелировали с ингибирующим воздействием. Рекомендуемые концентрации диссоциированных органических кислот для полного подавления роста патогена были следующими: пропионовая - 15 мМ (1,11 г/л), уксусная - 16 мМ (0,96 г/л), молочная - 17 мМ (1,53 г/л) и лимонная 20 - мМ (3,84 г/л). В нашей работе определенные значения MIC уксусной и молочной кислот оказались значительно выше (2,25 и 1,77 г/л, соответственно), что можно объяснить более благоприятными для сальмонелл условиями культивирования и штамм-специфичным эффектом. Молочная кислота обладает большим ингибирующим

эффектом на сальмонелл, чем уксусная, что соответствует данным литературы [302].

3.4. Применение математической модели для описания роста смешанных культур *Bif. adolescentis* и *Bac. cereus*, *Bif. bifidum* и *St. aureus* в средах с пребиотиком или глюкозой

Ранее описанные экспериментальные данные по росту *Bac. cereus* и *St. aureus* в со-культуре с пробиотиком в среде с пребиотиками или глюкозой (п. 3.1.) были использованы для проверки предсказательной способности Ки- и МПС-моделей (рисунки 21, 22). Коэффициенты детерминации моделей представлены в таблице 6. Для моделирования роста моно-культур тест-штаммов использовали уравнение Ферхюльста.

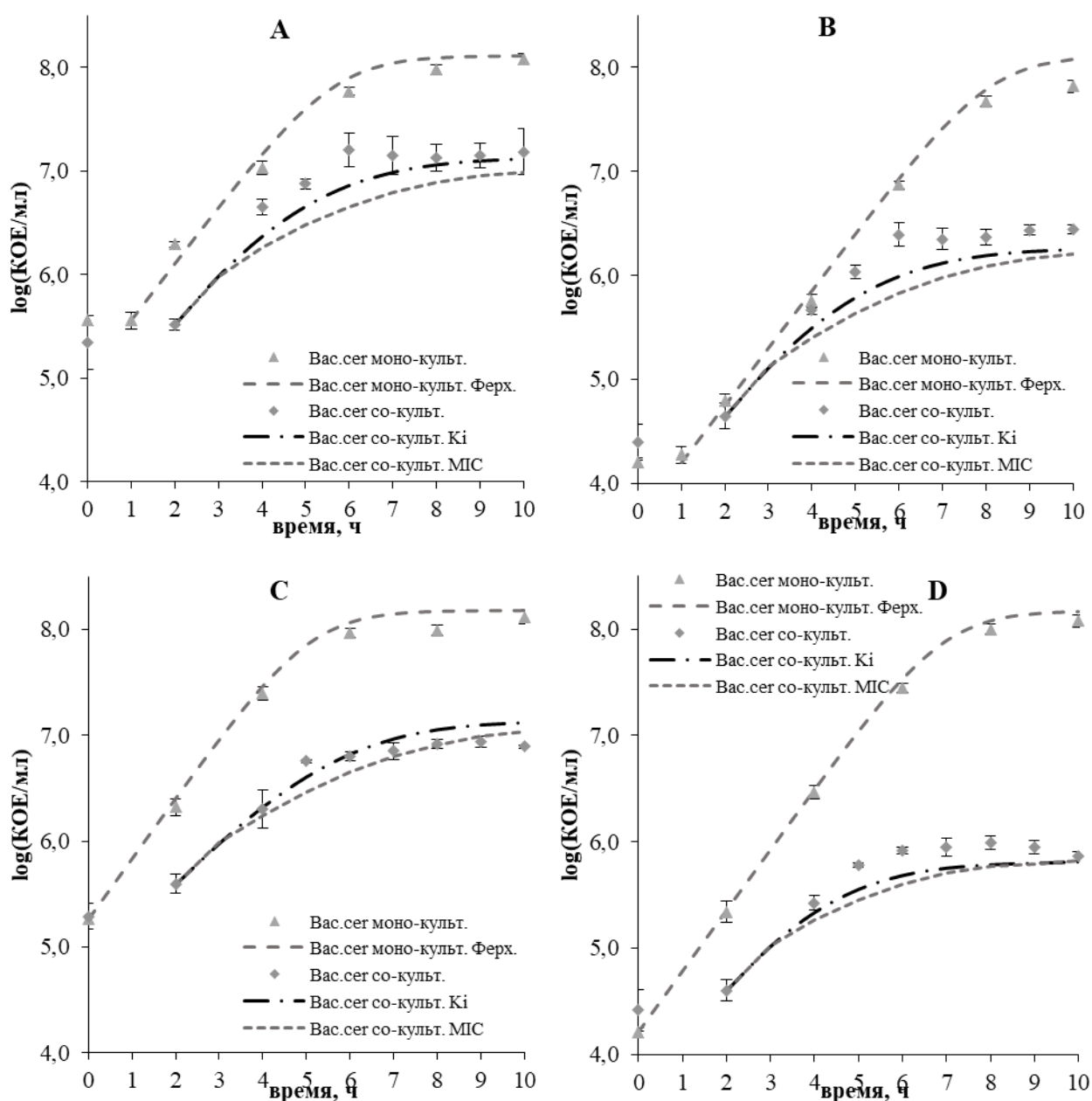


Рисунок 21 - Кривые роста *Bacillus cereus* (экспериментальные данные и полученные с использованием моделей) в чистой и в смешанной культуре с *Vif. adolescentis* в среде с ОФ (А, В) или глюкозой (С, D). Начальное количество бацилл 5,5 (А, С) или 4,5 (В, D) lg (КОЕ/мл). Все измерения проводили в трех повторностях ($p = 0,05$)

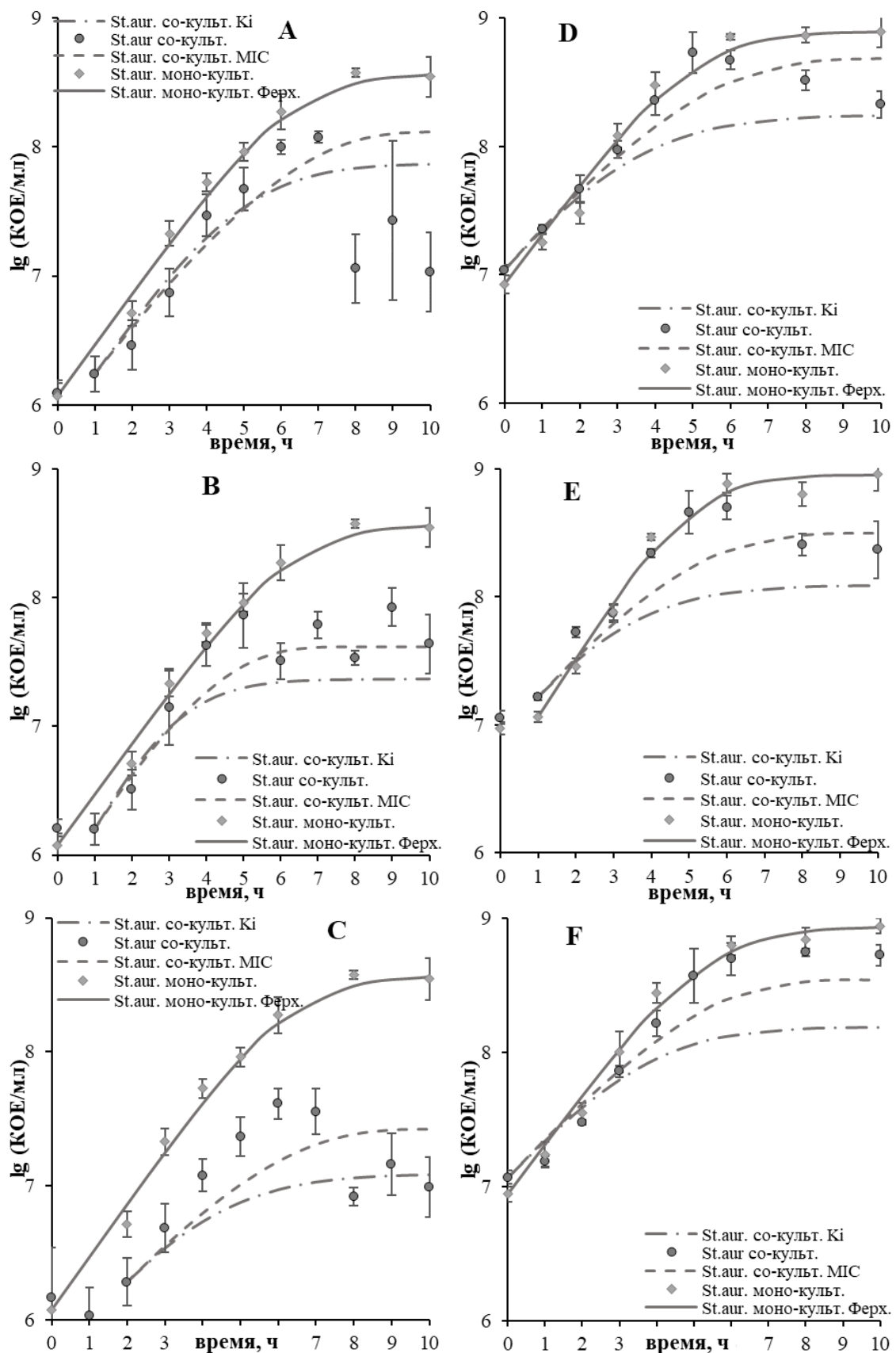


Рисунок 22 - Кривые роста *St. aureus* (экспериментальные данные и полученные с использованием моделей) в чистой и в смешанной культуре с *Bif. bifidum* (A, B, C – $X_0^{S.aur} = 10^6$ КОЕ/мл; D, E, F – $X_0^{S.aur} = 10^7$ КОЕ/мл) в среде с глюкозой (A, D), ОФ (B, E) или лактулозой (C, F)

Таблица 6 - Коэффициенты детерминации, рассчитанные для Ki- и MIC-моделей, при описании роста *Bac. cereus* и *St. aureus* в со-культуре с бифидобактериями в среде с пребиотиками или глюкозой и синбиотические факторы SF (по п. 3.1.)

Со-культура	Углевод	Графическое представление	SF _{Ki}	SF _{MIC}	Коэффициенты детерминации моделей, R ²	
					Ki	MIC
<i>Bif. adolescentis</i> + <i>Bac. cereus</i>	ОФ	рис.21 А	0,0183	0,0181	0,93	0,79
		рис. 21 В	0,0183	0,0369	0,91	0,81
	Глюкоза	рис. 21 С	0,0228	0,0299	0,93	0,93
		рис. 21 D	0,0327	0,0617	0,91	0,87
<i>St. aureus</i> + <i>Bif. bifidum</i>	Глюкоза	рис.22 А	0,0119	-0,0015	0,73	0,65
		рис. 22 D	0,0077	-0,0016	0,69	0,87
	ОФ	рис. 22 В	0,0048	0,0003	0,70	0,86
		рис. 22 Е	0,0043	0,0013	0,24	0,74
	Лактулоза	рис. 22 С	0,0128	-0,0026	0,23	0,86
		рис. 22 F	0,0038	0,0062	0,65	0,91

При описании роста бацилл в со-культуре с пробиотиком, коэффициенты детерминации (R²) Ki-модели во всех вариантах были выше соответствующих значений для MIC-модели. Однако, MIC-модель тоже прогнозирует рост бацилл с высокой точностью (R² ≥ 0,79). Таким образом, для математического описания роста *Bac. cereus* в условиях ингибирования метаболитами *Bif. adolescentis* применимы обе модели.

Как в случае Ki-, так и MIC-модели, наибольшие расхождения с экспериментальными данными наблюдали на отрезке 4 - 6 часов от начала культивирования, тогда как в конце ферментации различия были незначительными (рисунок 21). По-видимому, это связано с тем, что экспериментально были определены только начальные и конечные концентрации кислот, тогда как промежуточные были рассчитаны через экономический коэффициент. В результате расчетное количество бактерий

оказалось ниже, чем экспериментальное, что приводит к уменьшению значений R^2 .

В большинстве вариантов проведения совместного культивирования бифидобактерий со стафилококками модель МІС точнее описывала изменения численности тест-штамма. Практически во всех вариантах проведения эксперимента в смешанной культуре наблюдали падение численности стафилококка на финальном этапе роста. Предположительно, падение численности тест-штамма связано с качественным переходом действия молочной и уксусной кислот от бактериостатического к бактериолитическому. Переход происходит, когда концентрации кислот превышают определенные значения МІС и/или рН опускается ниже рН минимального, который для *St. aureus* был определен как 5,05. Следует отметить, что модель МІС подразумевает возможность описания данного участка математически (при наличии одного или трех множителей ниже нуля), однако на практике наблюдали расхождение экспериментальных и расчетных данных на участке падения численности. Также следует отметить, что ни в одном из случаев рассчитанные данные не достигали максимального количества стафилококков, полученного экспериментально (максимальное значение количества клеток стафилококка, после которого начинается снижение). Однако, в целом, МІС-модель достаточно точно описывает снижение удельной скорости роста стафилококка в результате продуцирования пробиотиком ингибирующих кислот во всех случаях ($R^2 \geq 0,65$), тогда как расхождения Кі-модели с экспериментальными данными, в среднем, были выше.

Отрицательное значение удельной скорости роста можно интерпретировать как бактериолитическое действие бифидобактерий на *St. aureus*. Ранее было установлено [288], что при низких значениях рН и высоких концентрациях молочной кислоты некоторые штаммы молочнокислых бактерий (МКБ) могут оказывать бактерицидное действие на *St. aureus*. При этом скорость гибели стафилококков под влиянием заквасок в пищевых матрицах (сырах) была прямопропорциональна скорости закисления среды. В настоящем

исследовании было установлено, что увеличение начального количества стафилококков в со-культуре с бифидобактериями приводило как к более высокой конечной численности, так и к снижению бактериолитического действия на заключительном этапе ферментации. Иными словами, при равной скорости кислотообразования бифидобактериями, при большем начальном количестве стафилококков популяция может достигать большего конечного количества до того, как удельная скорость роста примет нулевое или отрицательное значение, чего не происходит при меньшем посеве тест-штамма. Кроме того, существует вероятность того, что комбинированный ингибирующий эффект молочной и уксусной кислот может быть выше, чем суммарный эффект каждой из кислот по отдельности.

3.5. Определение синбиотического фактора для нескольких комбинаций пробиотиков и коммерческих пребиотических субстратов для подавления роста различных тест-штаммов

Предложенная модель была проверена с применением коммерческих пребиотиков, таких как олигофруктоза (ОФ), инулин (ИН), раффиноза (РФ), палатиноза (ПЛ) и лактулоза (ЛК), в сравнении с глюкозой, как непробиотиком. Совместное культивирование пробиотика (*Bifidobacterium adolescentis* или *Bifidobacterium bifidum*) и тест-штамма (*Bac. cereus*, *St. aureus* или *Sal. enterica*) проводили в течение 10 ч в анаэробных условиях при перемешивании, как описано в п. 2.6.1. Пребиотический субстрат или глюкозу добавлялся в среду в концентрации 10 г/л. Численность бактерий, рН, концентрации молочной и уксусной кислот определяли в начальный (0 ч) и конечный (10 ч) моменты совместного культивирования. По рассчитанным ранее константам K_i -модели и полученным концентрациям кислот были определены SF для каждой комбинации пробиотик/пребиотик/тест-штамм (рисунок 23).

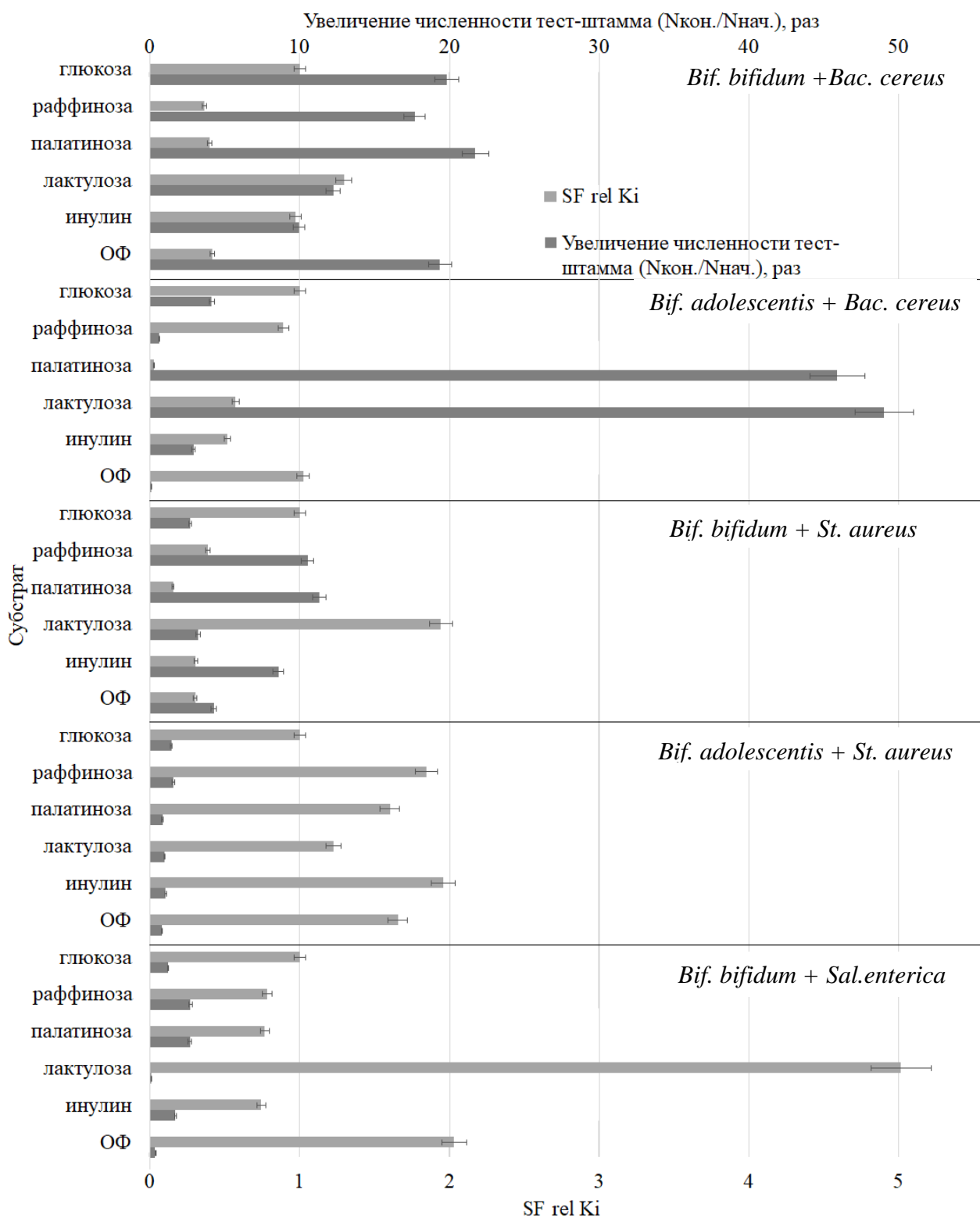


Рисунок 23 - Увеличение численности тест-штаммов (*Bac. cereus*, *St. aureus* или *Sal. enterica*) при совместном культивировании с пробиотиком *Bif. adolescentis* или *Bif. bifidum* в среде с одним из коммерческих пребиотических субстратов или глюкозой и относительные синбиотические факторы, рассчитанные для каждой комбинации пробиотик/пребиотик/тест-штамм с помощью Ki - модели

При сопоставлении данных по изменению численности со значениями относительного SF для большинства комбинаций наблюдали умеренную обратную корреляцию (среднее значение корреляции по всем комбинациям - 0,42), например, при культивировании бацилл и *Bifidobacterium bifidum* в среде с лактулозой, изменение численности тест-штамма минимально, а относительный SF максимальный. Это показывает, что данная композиция наиболее эффективна для подавления роста данного тест-штамма. Действие *Bif. adolescentis* на рост бацилл различается слабо в зависимости от пребиотика, однако все комбинации, за исключением раффинозы, были эффективнее, чем комбинация с глюкозой. Для подавления роста стафилококка наиболее эффективными композициями оказались *Bif. bifidum* с лактулозой и *Bif. adolescentis* с олигофруктозой. Наиболее эффективными комбинациями для подавления сальмонеллы оказались *Bif. adolescentis* с инулином и лактулозой.

Таким образом предложенный подход является перспективным для выявления синбиотических композиций, наиболее эффективно подавляющих конкретный бактериальный патоген или контаминант пищи. Кроме того, было выявлено, что некоторые комбинации могут быть эффективны в отношении нескольких тест-штаммов. В дальнейшем указанный подход может быть применен в исследованиях свойств новых пробиотиков и пребиотиков, а также с использованием большего числа тест-штаммов, в том числе, клинических изолятов.

Следует уточнить, что в соответствии с приведенными выше исследованиями кинетики совместного роста, эффективность композиции зависит не только от её состава, но и от количества пробиотика и дозы контаминанта.

3.6. Исследование синбиотической эффективности композиций бифидобактерий и фруктанов, выделенных из растительного сырья

В рамках поиска новых веществ, проявляющих пребиотические свойства, огромное внимание направлено на полисахариды, выделенные из натуральных источников: топинамбур, цикорий, рожь, молоко, мед, лук, ячмень и козлобородник [303]. Например, было показано, что *Lactobacillus paracasei* в сочетании с экстрактом рисовых отрубей снижает скорость роста *Salmonella typhimurium* более эффективно, чем без него [304]. Эффект стимуляции пробиотиков различными видами меда был продемонстрирован исследователями на ряде штаммов бифидобактерий и лактобацилл *in vitro*. Стоит особо отметить селективность ферментации олигосахаридов меда пробиотиками, что является одним из важнейших аспектов определения их пребиотической природы [305]. Повышение антимикробной активности наблюдали при росте *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. reuteri*, и *P. acidilactici* в среде с β -ГОС, выделенными из ячменя, как единственного углеводного субстрата по сравнению с ростом с глюкозой. β -ГОС в среде позволяли поддерживать культуру *L. lactis* subsp. *lactis* в экспоненциальной фазе роста дольше, чем в среде с глюкозой, что привело к увеличению продуцирования низина на 25% [306]. Также активно исследуют возможность использования пребиотиков не углеводной природы, например, полифенолов. Совместная инкапсуляция бифидобактерий с фенолами зеленого чая повысила стабильность культуры при росте в среде, моделирующей желудочно-кишечный тракт, и в условиях хранения при пониженных температурах [307].

3.6.1. Исследование фракций фруктанов корня лопуха и клубней топинамбура с помощью ^{13}C -ЯМР

Методика выделения и очистки фруктанов из корней лопуха и клубней топинамбура описана в п. 2.4. Полученные осаждением различными концентрациями этанола, высушенные фруктаны представляли собой кристаллы (измельченные до состояния порошка) от белого, до светло-кремового оттенка (бесцветные в растворе). Все полученные осадки содержали не менее 98 % СВ и не менее 90 % углеводов от СВ.

Спектры ^{13}C -ЯМР стандартных образцов инулина (Orafti ® HSI, BENEORAFI, Belgium) и олигофруктозы (ОФ, Orafti ® P95, BENEORAFI, Belgium), а также очищенных от примесей фракций фруктанов корня лопуха, осажденных этанолом концентрацией 20% (Л - 20), 32,2% (Л - 32), 50% (Л - 50), 67,8% (Л - 68) и 80% (Л - 80) и фруктанов клубней топинамбура, осажденных этанолом концентрацией 20% (ТП - 20), 32,2% (ТП - 32), 50% (ТП - 50), 67,8% (ТП - 68) и 80% (ТП - 80) представлены на рисунке 24. Химические сдвиги атомов углерода стандартных и исследуемых образцов типичны для фруктанов инулинового типа (таблица 7). При анализе спектров учитывали, что химические сдвиги атомов углерода олиго- и полисахаридов (внутрицепочных звеньев полисахаридов и атомов концевых звеньев) различаются [270].

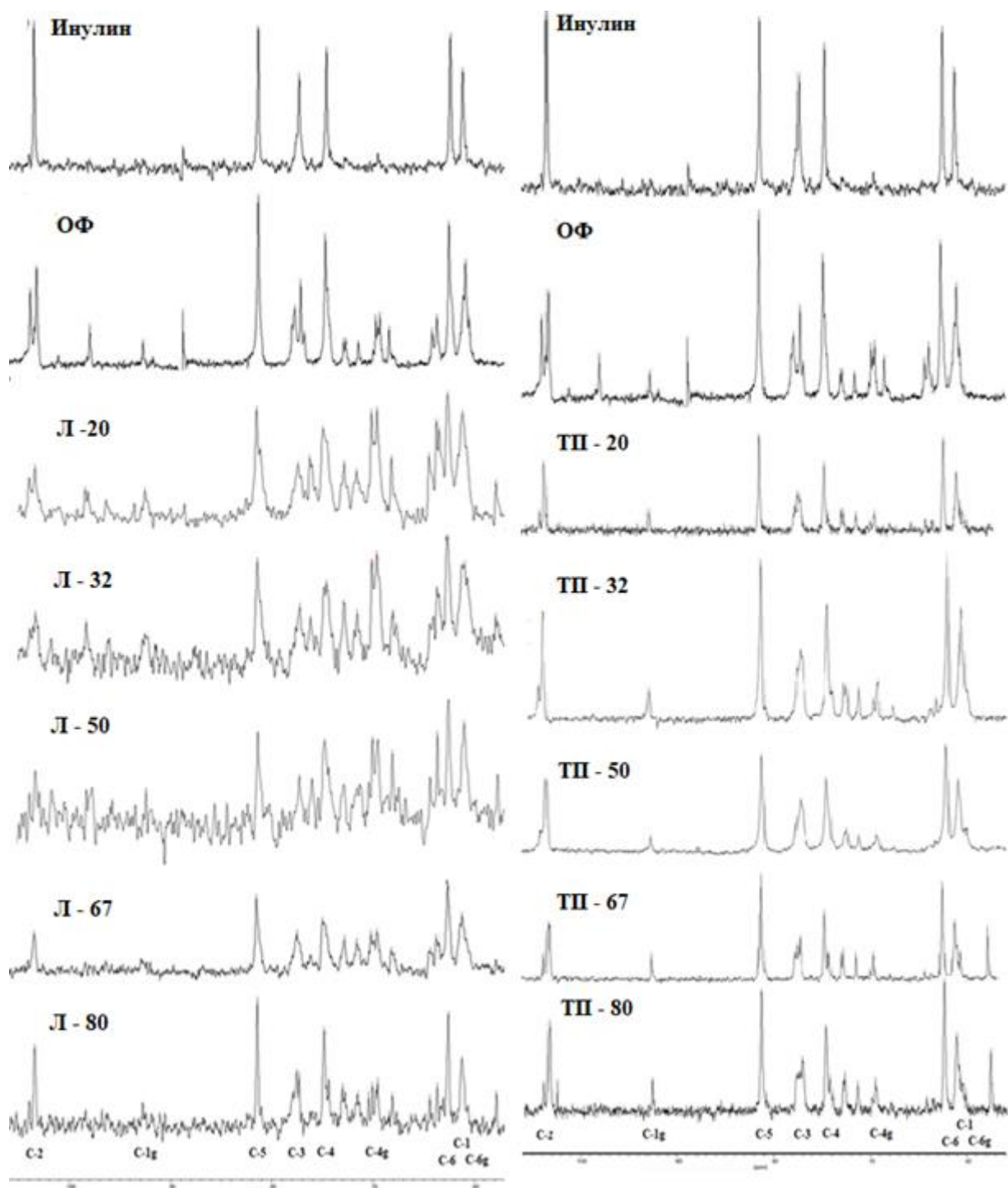


Рисунок 24 - Спектры ^{13}C -ЯМР в дистиллированной воде с добавлением D_2O инулина HSI, олигофруктозы (ОФ) (приведены дважды для сравнения различного сырья), фракций фруктанов корня лопуха (**слева**), осажденных этанолом концентрацией 20% (Л-20), 32,2% (Л-32), 50% (Л-50), 67,8% (Л-67) и 80% (Л-80) и фракций фруктанов клубней топинамбура (**справа**), осажденных этанолом концентрацией 20% (ТП-20), 32,2% (ТП-32), 50% (ТП-50), 67,8% (ТП-67) и 80% (ТП-80)

Таблица 7 - Химические сдвиги ЯМР ^{13}C β -D-фруктафуранозы (f) и α -D- глюкопиранозы (g) стандартных образцов фракции инулина и олигофруктозы (ОФ), и фруктанов, выделенных из корней лопуха и клубней топинамбура

Углевод*	Химические сдвиги, ppm											
	Инулин	ОФ	Л-20	Л-32	Л-50	Л-67	Л-80	ТП-20	ТП-32	ТП-50	ТП-67	ТП-80
C-2 f (terminal)	-	103,88	-	-	-	-	-	103,9	103,86	103,55	103,98	103,92
C-2 f (2 → 1 link)	103,43	103,26	104,26	104,29	103,4	103,43	103,43	103,45	103,38	103,38	103,41	103,35
	-	97,98	99,31	99,25	-	-	-	-	-	-	-	102,52
C-1 g (terminal)	-	92,73	93,41	-	-	-	-	92,73	92,72	92,72	92,81	92,72
	-	88,76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-5 f (2 → 1 link)	81,33	81,33	82,4	82,3	81,44	81,5	81,44	81,4	81,35	81,32	81,45	81,39
	-	77,71	-	-	-	-	-	-	-	-	77,52	77,45
C-3 f (2 → 1 link)	77,28	77,15	78,31	78,06	77,32	77,48	77,54	77,41	77,4	77,36	77,31	77,21
C-3 f (terminal)	-	76,77	77,16	77	76,07	-	77,32	-	-	-	-	-
C-4 f (2 → 1 link)	74,59	74,7	75,85	75,76	74,83	74,96	74,86	74,72	74,68	74,65	74,81	74,72
C-4 f (terminal)	-	-	-	75,44	-	-	-	74,31	-	-	74,36	74,27
C-3 g (terminal)	-	72,89	73,75	73,75	-	72,79	73,04	72,97	72,96	72,7	73,02	-
C-5 g (terminal)	-	72,67	-	-	-	-	-	72,71	72,67	-	72,8	72,77
C-2 g (terminal)	-	71,43	72,53	72,41	-	71,58	71,54	71,47	71,46	71,43	71,52	71,43
C-4 g (terminal)	69,4	69,3	71,06	70,94	70,11	70,17	70,46	69,55	69,51	69,58	70,06	69,61
	-	68,39	69,09	68,83	68,13	68,19	68,13	65,79	67,98	-	69,7	-
C-6 f (2 → 1 link)	-	64,16	65,38	64,49	64,3	64,3	64,43	64,29	64,18	-	64,37	64,35
C-6 f (terminal)	-	63,67	64,65	63,47	63,69	63,79	63,69	63,67	63,61	63,64	-	-
	-	-	64,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-1 f (2 → 1 link)	62,38	62,49	63,53	62,06	62,61	62,61	62,57	62,5	62,46	62,43	62,52	62,46
C-1 f (terminal)	61,16	60,84	62,06	61,78	61,04	61,2	61,27	61,19	61,18	61,18	61,31	61,18
C-6 g (terminal)	-	60,49	58,78	58,71	57,88	-	57,85	60,58	60,48	60,48	60,64	60,55

*Анализ соответствия пиков в зависимости от хим. сдвигов проведен по [270].

Полученные спектры фруктановых фракций корней лопуха по количеству и расположению пиков ближе к коммерческой ОФ, а по интенсивности сигнала занимают промежуточное положение между спектрами стандартных образцов ОФ и инулина. Следует отметить, что сигналы С-2 терминальной D-фруктофуранозы идентифицированы не для всех экспериментальных образцов. В экспериментальных выборках спектров выявлен рост относительных площадей пиков для всех атомов углерода внутрицепочечных остатков D-фруктофуранозы (образующих 2→1 связь) с ростом концентрации осаждающего вещества. В то же время все площади пиков для соответствующих атомов углерода были меньше, чем в спектре инулина, а значения, полученные для Л-50 и Л-68, были ближе всего к ОФ. Различия относительных площадей пиков в спектрах Л-20 и Л-32 незначительны и заключаются в наличии неидентифицированных пиков в спектре Л-20. Связи между относительными площадями пиков концевых атомов глюкопиранозы и фруктофуранозы обнаружить не удалось, что не позволяет рассчитать среднюю степень полимеризации (сСП) полученных фракций, однако, согласно литературным данным [270] с повышением концентрации этанола сСП осаждаемых полисахаридов снижается.

Полученные спектры фракций фруктанов клубней топинамбура, осажденных 20% этанолом (ТП-20), по количеству и расположению пиков, а также по интенсивности сигналов ближе к спектру инулина. Фруктаны полученные осаждением этанола при больших концентрациях по количеству и расположению пиков ближе к спектру коммерческой ОФ, а по интенсивности сигналов занимают промежуточное положение между спектрами стандартных образцов ОФ и инулина. Рассчитанное значение отношения суммы площадей пиков атомов глюкозы к сумме площадей пиков атомов фруктозы экспериментальных образцов снижалось с повышением концентрации этанола при осаждении фруктанов, что иллюстрирует снижение сСП фруктанов с повышением концентрации осадителя.

3.6.2. Исследование синбиотической эффективности композиций *Bif. bifidum* и фруктанов, выделенных из корней лопуха и клубней топинамбура, для подавления *St. aureus*

Для проверки способности исследуемого штамма пробиотика и тест-штамма потреблять выделенные фруктаны провели восьмичасовое культивирование чистых культур в среде с тестовыми субстратами (фруктаны, осажденные минимальной – 20 % и максимальной – 80 % концентрациями этанола) и контрольными: пребиотиком (ОФ) и непребиотиком (глюкозе) (10 г/л). Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Характеристики роста чистых культур *St. aureus* и *Bif. bifidum* на углеводных фракциях водных экстрактов корней лопуха (Л) и клубней топинамбура (ТП), осажденных 20% или 80% этанолом, и контрольных субстратах – ОФ и глюкозе (ГЛ)

Микро-организм	Субстрат	Численность бактерий Lg (КОЕ/мл)		Накопление кислот, г/л		конечный pH
		0 ч	8 ч	молочная	уксусная	
<i>Bif. bifidum</i>	ТП-20	8,15±0,06	9,03±0,05	0,30 ± 0,02	0,96 ± 0,05	5,28
	ТП-80	7,96±0,01	9,21±0,05	0,06 ± 0,00	0,25 ± 0,01	6,80
	Л-20	8,16±0,08	9,11±0,05	0,05 ± 0,00	1,03 ± 0,03	5,12
	Л-80	8,07±0,04	9,47±0,18	0,04 ± 0,00	0,33 ± 0,01	6,76
	ОФ	8,17±0,04	9,19±0,05	0,56 ± 0,02	1,53 ± 0,03	4,57
	ГЛ	8,18±0,04	8,75±0,06	0,05 ± 0,00	1,06 ± 0,02	5,12
<i>St. aureus</i>	ТП-20	5,89±0,03	8,62±0,04	0,74 ± 0,03	0,27 ± 0,01	6,18
	ТП-80	6,10±0,01	8,71±0,07	0,34 ± 0,01	0,00 ± 0,00	6,78
	Л-20	5,82±0,08	8,67±0,07	1,12 ± 0,03	0,41 ± 0,01	6,05
	Л-80	6,19±0,10	8,79±0,05	0,41 ± 0,01	0,00 ± 0,00	6,74
	ОФ	5,97±0,03	8,58±0,05	1,49 ± 0,03	0,32 ± 0,01	5,90
	ГЛ	6,14±0,03	8,57±0,11	2,11 ± 0,06	0,44 ± 0,02	5,62

Среди двух фракций фруктанов большее накопление клеток бифидобактерий наблюдали при культивировании с углеводами, осажденными 80% этанолом (9,47 lg(КОЕ/мл) в случае Л-80, и 9,21 lg(КОЕ/мл) в случае ТП-80). Эти значения близки к полученным со стандартным пребиотиком – ОФ (9,19 lg(КОЕ/мл)) и выше, чем в среде с глюкозой (8,75

lg(КОЕ/мл)). Накопление молочной и уксусной кислот с различными субстратами сильно различались. В данных экспериментах наблюдали значительное смещение метаболизма бифидобактерий в сторону образования уксусной кислоты. Причем, на обеих фракциях фруктанов лопуха (Л-20 и Л-80), фруктанах топинамбура, осажденных 80% этанолом, и на глюкозе накопление молочной кислоты было крайне низким (менее 0,06 г/л). Наибольшее накопление обеих кислот зафиксировали при культивировании с ОФ (0,56 г/л молочной и 1,53 г/л уксусной кислоты). Среди двух фракций углеводов как лопуха, так и топинамбура продуцирование кислот было выше на осажденных меньшими концентрациями этанола (с большей сСП). Исходя из полученных данных в вариантах с наилучшим продуцированием кислот (ОФ, Л-20 или ТП-20) был проведен капиллярный электрофорез. По электрофореграммам, представленным на рисунке 25 (А1, В1 и С1), видно, что ОФ содержит большое количество низкомолекулярных олигосахаридов, тогда как фруктаны лопуха и топинамбура характеризуются гораздо меньшей площадью пиков, соответствующих низкомолекулярным углеводам. Следует отметить, что данная методика не позволяет проанализировать фруктаны со сСП более 7. Кроме того, капиллярный электрофорез в данном случае является методом полу-количественного анализа углеводного состава. Можно предположить, что образцы Л-20 и ТП-20 содержат, преимущественно фруктаны с более высокой сСП, а небольшие количества глюкозы, фруктозы и сахарозы, образуются в результате частичной деполимеризации после осаждения (например, при сушке, растворении, стерилизации среды и т.п.). Видно уменьшение площадей пиков углеводов различной молекулярной массы, свидетельствующее о потреблении данных углеводов бифидобактериями (рисунок 25-А2, 25-В2 и 25-С2).

При культивировании *St. aureus* в средах с различными углеводами значительных различий в конечной численности бактерий не наблюдали. Во всех случаях они достигали ранее установленного значения конечной численности клеток (8,5 – 8,8 lg(КОЕ/мл)). Следует отметить, что в конечных

пробах при ферментации моно-культуры стафилококков были обнаружены высокие концентрации молочной кислоты. Причем, во всех вариантах, стафилококки продуцировали больше молочной кислоты, чем бифидобактерии в среде с соответствующим субстратом, а наибольшее значение наблюдали с глюкозой (2,11 г/л). Продуцирование уксусной кислоты было небольшим, по сравнению с молочной кислотой и не превышало значений, полученных при культивировании пробиотика.

Потребление тест-штаммом отдельных фракций углеводов лопуха и топинамбура подтверждается электрофореграммами, представленными на рисунке 25 (A3, B3 и C3). Уменьшение площадей соответствующих пиков относительно исходных питательных сред заметно для всех субстратов. Однако, следует отметить, что стафилококки полностью потребляют ограниченный спектр из смеси гомологов, тогда как бифидобактерии потребляют практически все детектируемые вещества, что наилучшим образом иллюстрируют электрофореграммы с ОФ.

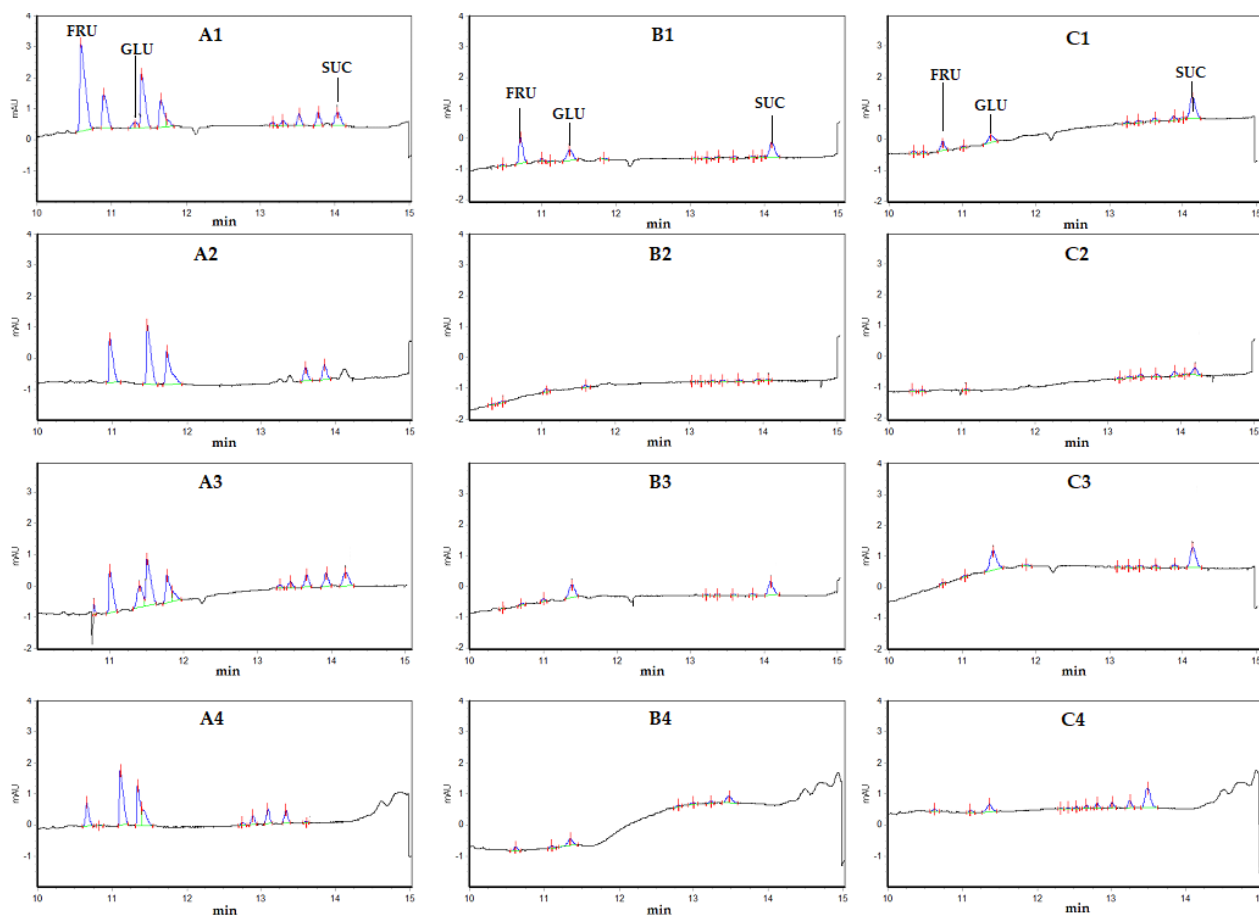


Рисунок 25 - Электрофорэграммы проб с ОФ (столбец А), Л-20 (столбец В) или ТП-20 (столбец С) до засева (строка 1) и после 8 часов культивирования моно-культур *St. aureus* (строка 2) и *Bif. bifidum* (строка 3) или в со-культуре (строка 4). FRU – фруктоза, GLU – глюкоза, SUC – сахараза

При исследовании синбиотической активности углеводных фракций экстрактов лопуха и топинамбура с культурой *Bif. bifidum* против *St. aureus* проводили совместные ферментации пробиотика и тест-штамма. При этом варьировали начальную численность бифидобактерий и стафилококков и время проведения эксперимента. Результаты представлены в таблице 9. Варьирование продолжительности культивирования проводили с целью определить оптимальное время совместного культивирования пробиотика и тест-штамма в пределах от 7 до 9 часов, опираясь на ранее полученные кривые роста моно- и со-культур (п. 3.1). В заданном промежутке ожидали получить концентрации молочной и уксусной кислот, достаточные для качественного перехода их воздействия на рост тест-штамма с бактериостатического на бактериолитическое. SF каждой комбинации был рассчитан с применением МИС-модели.

Таблица 9 - Характеристики роста со-культур и синбиотические факторы для углеводной фракции водных экстрактов топинамбура и лопуха, осажденных 20 % или 80 % этанолом, и в контрольных опытах с ОФ при варьировании начальной численности бифидобактерий и стафилококка и продолжительности ферментации.

Субстрат	Продолжительность культивирования, ч	<i>B. bifidum</i> lg(KOE/мл)		<i>S. aureus</i> lg(KOE/мл)		Кон. pH	Накопление кислот, г/л*		SF	SF _{rel}
		0 ч	конеч.	0 ч	конеч.		МК	УК		
ТП-20	9	8,01 ± 0,08	9,12 ± 0,12	6,97 ± 0,12	7,62 ± 0,24	6,17	1,55 ± 0,03	0,46 ± 0,01	0,058	- 0,053
ТП-80		7,96 ± 0,10	9,08 ± 0,19	6,89 ± 0,13	8,60 ± 0,23	6,33	1,22 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,112	0,001
Л-20		7,99 ± 0,13	9,34 ± 0,16	6,91 ± 0,13	7,19 ± 0,15	6,26	1,21 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,089	- 0,022
Л-80		7,96 ± 0,11	9,05 ± 0,14	6,88 ± 0,16	8,29 ± 0,19	6,42	1,06 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,146	0,035
ОФ		7,96 ± 0,11	9,06 ± 0,11	6,91 ± 0,17	8,63 ± 0,14	6,31	0,96 ± 0,04	0,65 ± 0,03	0,111	0,000
ТП-20	8	5,46 ± 0,10	7,51 ± 0,11	6,91 ± 0,15	8,72 ± 0,25	6,06	0,90 ± 0,03	0,14 ± 0,00	0,156	0,041
ТП-80		5,47 ± 0,11	7,39 ± 0,11	6,90 ± 0,13	8,70 ± 0,20	5,96	0,90 ± 0,04	0,12 ± 0,00	0,143	0,029
Л-20		5,46 ± 0,10	7,53 ± 0,12	6,93 ± 0,18	8,70 ± 0,16	6,22	1,07 ± 0,03	0,21 ± 0,01	0,141	0,027
Л-80		5,49 ± 0,17	7,43 ± 0,11	6,91 ± 0,21	8,76 ± 0,13	6,00	0,89 ± 0,04	0,16 ± 0,01	0,144	0,030
ОФ		5,44 ± 0,10	7,53 ± 0,11	6,92 ± 0,11	8,67 ± 0,17	6,07	1,04 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,115	0,000
ТП-20	7	7,95 ± 0,15	9,45 ± 0,12	3,82 ± 0,33	6,66 ± 0,07	5,47	0,06 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,112	0,118
ТП-80		7,96 ± 0,12	9,21 ± 0,15	3,70 ± 0,10	7,11 ± 0,03	5,67	0,06 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,176	0,181
Л-20		8,02 ± 0,13	9,49 ± 0,16	3,86 ± 0,16	6,73 ± 0,05	5,29	0,16 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,052	0,057
Л-80		8,07 ± 0,10	9,49 ± 0,18	3,88 ± 0,18	6,48 ± 0,08	5,43	0,04 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,103	0,108
ОФ		7,95 ± 0,13	9,70 ± 0,15	3,70 ± 0,26	6,03 ± 0,10	5,02	0,23 ± 0,01	0,54 ± 0,02	- 0,005	0,000

* МК – молочная кислота, УК – уксусная кислота. Накопление кислот рассчитывали, как разность конечной и начальной концентрации по данным ВЭЖХ.

При близкой начальной численности бифидобактерий (продолжительность культивирования 7 и 9 часов), их конечная численность при меньшем начальном количестве стафилококков превышает значения, полученные с аналогичными субстратами при большем начальном количестве тест-штамма. Вероятно, происходит конкуренция за низкомолекулярные гомологи фруктанов. Наиболее близких значений конечной численности пробиотик достигает между 7 и 9 часами культивирования при росте с фруктанами лопуха, осажденными 20% этанолом. Предположительно, в случае данного субстрата конкуренция со стафилококками минимальна.

Несмотря на высокую конечную численность бифидобактерий после 7 часов роста, накопление молочной кислоты при меньшем начальном количестве стафилококков сильно уступает значениям, полученным при больших продолжительности культивирования и начальной численности патогена. Однако, эти значения близки к полученным при 8 часовом росте моно-культуры бифидобактерий. Можно предположить, что накопление молочной кислоты после 9 часов совместного культивирования получено в результате совместного продуцирования кислот бифидобактериями и тест-штаммом. Однако, следует отметить, что итоговое содержание кислот выше, чем суммарное накопление в моно-культурах, что свидетельствует о различных эконом-коэффициентах для моно- и со-культур бактерий.

Накопление уксусной кислоты в семичасовых со-культурах сравнимо с девятичасовым, но в обоих случаях уступает данным по росту моно-культуры бифидобактерий (наиболее близки к значениям моно-культуры накопление уксусной кислоты при росте на ТП-80 и Л-80). По полученным данным видно, что при меньшей начальной численности тест-штамма профиль кислот сдвигается в сторону уксусной кислоты, которая обладает большим ингибирующим воздействием на *St. aureus* (таблица 5), что положительно влияет на эффективность синбиотической композиции.

В экспериментах с меньшей начальной численностью бифидобактерий (восьмичасовое культивирование) их рост в среде с ТП-80 был наиболее

слабым (7,09 lg(КОЕ/мл)), а в остальных вариантах примерно одинаковым (7,43 – 7,53 lg(КОЕ/мл)). Следует отметить, что во всех вариантах проведения со-культивирования на фруктанах топинамбура, осажденных 80% этанолом, конечная численность бифидобактерий была меньше, чем на других субстратах в тех же условиях.

При соотношении начальных численностей пробиотика и тест-штамма примерно 1 к 28,3 (количество бифидобактерий 5,44 - 5,49 lg(КОЕ/мл)), количество образуемых кислот оказалось не достаточным для ингибирования роста тест-штамма, конечные численности которого достигали значений, близких к монокультуре. В этом случае значения SF различаются между собой слабо и лежат в пределах от 0,115 (ОФ) до 0,156 (ТП-20). Напротив, при минимальной начальной численности стафилококков (около 3,8 lg(КОЕ/мл)) и наибольшем начальном соотношении бифидобактерий и клеток тест-штамма (примерно $1,5 \cdot 10^4:1$), даже при сравнительно небольших концентрациях ингибиторов, конечная численность тест-штамма была значительно ниже, чем в монокультуре. При наибольшем подавлении роста стафилококков было в среде с ОФ, а наименьшее - в среде с ТП-80. Это соотносится с рассчитанными значениями SF: рассчитанный для со-культуры с ОФ наименьший (-0,005), что говорит о наибольшей степени подавления, а для со-культуры с ТП-80 значение фактора оказалось наибольшим (0,176). При умеренном начальном соотношении бифидобактерий и стафилококка (примерно 11,6:1), среди полученных фруктанов, наибольшее подавление патогена наблюдали с ТП-20 (SF 0,058) и Л-20 (SF 0,089), что также соотносилось с конечной численностью патогена.

Поскольку синбиотический фактор показывает степень снижения удельной скорости роста тест-штамма по сравнению с чистой культурой, определили корреляционную зависимость между синбиотическими факторами и отношением удельных скоростей роста стафилококков в смешанной и в чистой культуре на соответствующем субстрате (данные не показаны). Указанные массивы характеризуются сильной положительной

связью ($r = 0,855$). Полученные результаты дополнительно подтверждают предсказательную ценность статической модели при простоте практической реализации экспериментов.

Результаты данной серии экспериментов с фруктанами, как и ранее описанные исследования, показали, что соотношение начальных численностей пробиотика и тест-штамма влияет на конечную численность последнего. Кроме того, было выявлено, что фруктаны с различной сСП демонстрируют различное действие на со-культуру пробиотика и тест-штамма. Поэтому дальнейшие исследования, направленные на установление количественных взаимосвязей между указанными факторами и оценки их влияния на эффективность синбиотических композиций, проводили по схеме РЦКП.

3.6.3. Антагонизм синбиотических композиций *Bif. bifidum* и фруктанов корней лопуха в отношении *Bac. cereus* и анализ поверхностей отклика

Для оценки влияния различных факторов на антагонистическую активность синбиотической композиции *Bif. bifidum* и фруктанов корней лопуха в отношении тест-штамма *Bac. cereus* эксперимент проводили согласно РЦКП. Области варьирования переменных выбирали, основываясь на предыдущих исследованиях. Предельными значениями концентрации этанола были выбраны 20 и 80%. При концентрации этанола 20% сСП осаждаемой фракции углеводов наибольшая. Следует отметить, что в близком исследовании [308], после осаждения 33%-ным этанолом была получена фракция фруктанов инулинового типа из артишока со сСП 32-42. Матрица планирования, экспериментальные и расчетные значения функций отклика (синбиотического фактора и конечной численности клеток тест-штамма) представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Область варьирования и кодирования переменных, экспериментальные и расчетные значения функций отклика для тест-штамма *Bac. cereus* в среде с фруктанами корней лопуха

№ опыта	Факторы						Синбиотический фактор		Конечная численность бацилл, lg(КОЕ/мл)*	
	Концентрация осадителя (EtOH), %		Начальная численность пробиотика, lg(КОЕ/мл)		Начальная численность бацилл, lg(КОЕ/мл)		SF_{obs}	SF_{pred}	$X_{Bac\ obs}$	$X_{Bac\ pred}$
	z_1	x_1	z_2	x_2	z_3	x_3				
1	67.8	+1	7.6	+1	6.4	+1	0.0267	0.0249	5.72	6.77
2	67.8	+1	7.6	+1	4.6	-1	0.0310	0.0249	7.48	7.65
3	67.8	+1	6.4	-1	6.4	+1	0.0420	0.0397	7.80	7.72
4	67.8	+1	6.4	-1	4.6	-1	0.0433	0.0397	7.77	7.80
5	32.2	-1	7.6	+1	6.4	+1	0.0136	0.0089	5.43	6.77
6	32.2	-1	7.6	+1	4.6	-1	0.0092	0.0089	7.58	7.65
7	32.2	-1	6.4	-1	6.4	+1	0.0224	0.0236	7.66	7.72
8	32.2	-1	6.4	-1	4.6	-1	0.0244	0.0236	7.79	7.80
9	20.0	-1.682	7.0	0	5.5	0	0.0188	0.0076	7.77	7.69
10	80.0	+1.682	7.0	0	5.5	0	0.0404	0.0346	7.63	7.69
11	50.0	0	6.0	-1.682	5.5	0	0.0471	0.0425	7.82	7.88
12	50.0	0	8.0	+1.682	5.5	0	0.0179	0.0177	7.51	7.34
13	50.0	0	7.0	0	4.0	-1.682	0.0268	0.0211	7.77	7.69
14	50.0	0	7.0	0	7.0	+1.682	0.0301	0.0211	6.63	6.84
15	50.0	0	7.0	0	5.5	0	0.0213	0.0211	7.74	7.69
16	50.0	0	7.0	0	5.5	0	0.0122	0.0211	7.68	7.69
17	50.0	0	7.0	0	5.5	0	0.0239	0.0211	7.76	7.69
18	50.0	0	7.0	0	5.5	0	0.0241	0.0211	7.70	7.69
19	50.0	0	7.0	0	5.5	0	0.0205	0.0211	7.56	7.69
20	50.0	0	7.0	0	5.5	0	0.0237	0.0211	7.66	7.69

* расчет функции отклика проводили в размерности КОЕ/мл, результаты представлены в логарифмической шкале.

По рассчитанным SF и полученным значениям конечной численности бацилл определили коэффициенты уравнения функции отклика. Для синбиотического фактора (Y_1) была рассчитана функции отклика (уравнение 17) и построена поверхность функции (рисунок 26). Расчетный критерий Фишера ($F = 1,681 < 4,704$) меньше табличного при $p = 0,05$, уравнение адекватно.

$$Y_1 = 0.0211 + 0.008x_1 - 0.0074x_2 + 0.0032x_2^2 \quad (17)$$

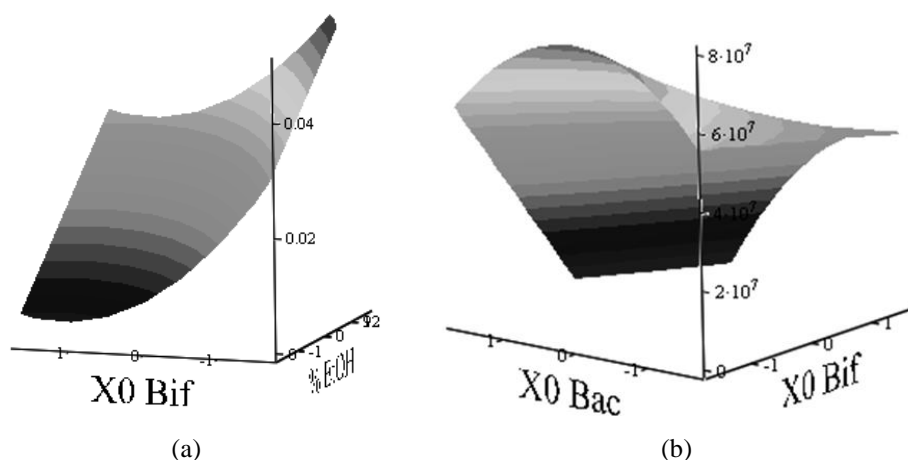


Рисунок 26 - Поверхность отклика для синбиотического фактора (a) и конечной численности бацилл (КОЕ/мл, b) при их со-культивировании с *Bif. bifidum* в среде с фруктанами корней лопуха, осажденных этанолом в различных концентрациях

Поскольку, максимальное ингибирующее воздействие будет соответствовать наименьшему значению SF, можно утверждать, что SF композиции *Bif. bifidum* и фруктанов корня лопуха имеет положительную линейную зависимость от концентрации осадителя (x_1). Таким образом, наибольшим подавляющим воздействием в отношении *Bac. cereus* характеризуется композиция с фруктанами, осажденными спиртом меньшей концентрации, т.е. с наибольшей средней СП. Это соотносится с результатами предыдущих исследований со стафилококком (п. 3.6.2). Линейный характер зависимости подразумевает невозможность нахождения экстремального значения. Зависимость SF от начальной численности пробиотика (x_2) параболическая и имеет минимум при $x_2 = +1,156$ (что соответствует 7,69

lg(КОЕ/мл)). Следует отметить, что при увеличении $x_2 > +1.156$, SF практически не изменяется, поэтому наблюдаемым снижением антагонистической активности, видимо, можно пренебречь. Все коэффициенты уравнения при x_3 оказались незначимы, то есть начальная численность тест-штамма не влияет на SF. Таким образом, в пределах области варьирования переменных минимальное значение SF (максимальное подавление тест-штамма) составляет 0,0033 и лежит в точке с координатами (-1.682; 1.156), что соответствует начальной численности пробиотика 7.69 lg(КОЕ/мл) и фракции фруктанов корня лопуха, осажденных 20% этанолом.

Уравнение (18), полученное для конечной численности тест-штамма адекватно, критерий Фишера ($F = 1,66 < 4,74$) меньше табличного значения.

$$Y_2 = 4.9 \cdot 10^7 - 1.6 \cdot 10^7 x_2 - 1.2 \cdot 10^7 x_3 - 7.1 \cdot 10^6 x_2 x_3 - 7.4 \cdot 10^6 x_3^2 \quad (18)$$

При повышении начальной численности бифидобактерий (x_2) конечная численность бацилл закономерно снижается (рисунок 26 б). Зависимость конечной численности тест-штамма (Y_2) от начальной (x_3) имеет параболический характер. Максимальное значение функции отклика находится при минимальном начальном количестве бифидобактерий (6,0 lg(КОЕ/мл)) и среднем значении начальной численности тест-штамма (5,5 lg(КОЕ/мл)). При данных значениях факторов эффективность подавления тест-штамма минимальна. Минимальное значение конечной численности тест-штамма лежит в области наибольших начальных количеств как пробиотика, так и тест-штамма. Интересно, что с повышением начальных численностей обоих микроорганизмов снижение конечной численности бацилл становится более резким. Полученные результаты можно объяснить образованием бациллами дополнительного количества молочной кислоты в анаэробных условиях (приложение 3), и, как следствие, ингибирования роста собственными метаболитами.

3.6.4. Антагонизм синбиотических композиций *Bif. bifidum* и фруктанов корней лопуха в отношении *Sal. enterica* и анализ поверхностей отклика

Матрица планирования, экспериментальные и расчетные значения функций отклика для экспериментов с *Sal. enterica* представлены в таблице 11. Область варьирования переменных (в логарифмических координатах) отличалась от исследований с бациллами, смещением начальной численности тест-штамма на +1 lg (КОЕ/мл), что обусловлено особенностями роста тест-штамма.

Таблица 11 - Область варьирования и кодирования переменных, экспериментальные и расчетные значения функций отклика для тест-штамма *Sal. enterica* в среде с фруктанами корней лопуха

№ опыта	Факторы						Синбиотический фактор		Конечная численность сальмонелл, lg(КОЕ/мл)*	
	Концентрация осадителя (EtOH), %		Начальная численность пробиотика, lg(КОЕ/мл)		Начальная численность сальмонелл, lg(КОЕ/мл)		SF_{obs}	SF_{pred}	$X_{Sal\ obs}$	$X_{Sal\ pred}$
	z_1	x_1	z_2	x_2	z_3	x_3				
1	67.8	+1	7.6	+1	7.4	+1	0.0544	0.0477	8.55	8.58
2	67.8	+1	7.6	+1	5.6	-1	0.0636	0.0596	8.53	8.47
3	67.8	+1	6.4	-1	7.4	+1	0.0233	0.0214	8.71	8.67
4	67.8	+1	6.4	-1	5.6	-1	0.0689	0.0616	8.64	8.59
5	32.2	-1	7.6	+1	7.4	+1	0.0114	0.0088	8.58	8.58
6	32.2	-1	7.6	+1	5.6	-1	0.0265	0.0267	8.41	8.47
7	32.2	-1	6.4	-1	7.4	+1	0.0328	0.0351	8.60	8.67
8	32.2	-1	6.4	-1	5.6	-1	0.0278	0.0247	8.60	8.59
9	20.0	-1.682	7.0	0	6.5	0	0.0225	0.0202	8.51	8.49
10	80.0	+1.682	7.0	0	6.5	0	0.0525	0.0602	8.47	8.49
11	50.0	0	6.0	-1.682	6.5	0	0.0468	0.0371	8.61	8.64
12	50.0	0	8.0	+1.682	6.5	0	0.0221	0.0371	8.46	8.44
13	50.0	0	7.0	0	5.0	-1.682	0.0399	0.0413	8.59	8.63
14	50.0	0	7.0	0	8.0	+1.682	0.0179	0.0162	8.77	8.74
15	50.0	0	7.0	0	6.5	0	0.0328	0.0287	8.61	8.62
16	50.0	0	7.0	0	6.5	0	0.0289	0.0287	8.61	8.62
17	50.0	0	7.0	0	6.5	0	0.0334	0.0287	8.65	8.62
18	50.0	0	7.0	0	6.5	0	0.0244	0.0287	8.63	8.62
19	50.0	0	7.0	0	6.5	0	0.0230	0.0287	8.63	8.62
20	50.0	0	7.0	0	6.5	0	0.0308	0.0287	8.57	8.62

* – расчет функции отклика проводили в размерности КОЕ/мл, результаты представлены в логарифмической шкале.

При расчете функции отклика для SF (Y_1) было получено уравнение (19), оказавшееся адекватным ($F = 3,99 < 4,87$) при $p = 0.05$:

$$Y_1 = 0.029 + 0.012x_1 - 0.007x_3 + 0.006x_1x_2 - 0.006x_1x_3 + 0.007x_1x_2x_3 + 0.004x_1^2 + 0.003x_2^2 \quad (16)$$

Поскольку значимыми оказались коэффициенты при всех факторах (либо их парных взаимодействиях) поверхности отклика построены при фиксированных значениях x_3 (рисунок 27). Наименьшее значение функции отклика в границах области варьирования было рассчитано при минимальной концентрации осадителя. При значениях x_3 ниже 0,46 (соответствует начальной численности сальмонелл 6,91 lg(КОЕ/мл)), поверхность отклика принимает вид параболоида с аналитическим минимумом, лежащим за пределами области варьирования. Для данной группы поверхностей характерно, что с увеличением начальной численности сальмонелл от минимального (при $x_3 = -1.682$) до максимального (при $x_3 = +1.682$) минимум функции отклика SF (наибольшее подавление) мигрирует в направлении увеличения начальной численности бифидобактерий от нижней к верхней границе. Таким образом, поверхность отклика позволяет установить критическое значение численности сальмонелл ($x_3 = 0$, т.е. 6.5 lg(КОЕ/мл)) выше которого для подавления патогена требуется максимальное количество жизнеспособных клеток бифидобактерий. При начальной численности патогена более 6,91 lg (КОЕ/мл) поверхности отклика имеют седловидную форму.

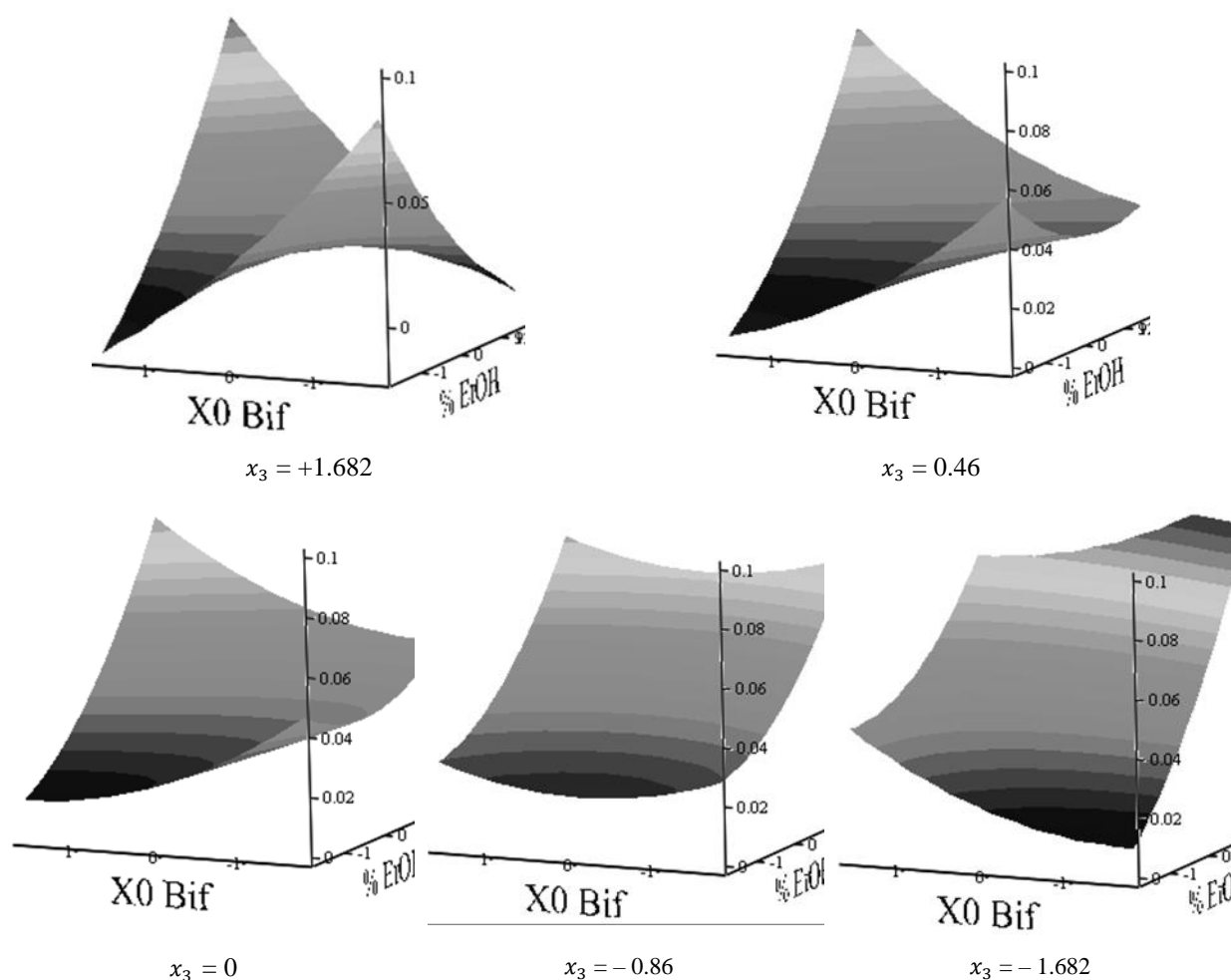


Рисунок 27 - Поверхность отклика SF как функция от концентрации этанола (x_1) и начальной численности пробиотика (x_2) при фиксированных значениях начальной численности сальмонеллы (x_3)

Глобальный минимум функции отклика в пределах области варьирования определен методом сканирования с переменным шагом. Первоначально для всех переменных был выбран интервал по каждой координате, который был разбит на два равных подинтервала. В узлах образующейся сетки были рассчитаны значения функции, и затем выбрана лучшая точка с минимальным значением синбиотического фактора. Последующие расчеты проводились с уменьшением интервала вдвое. Циклы расчета продолжали до момента, когда интервал по одной из координат не стал меньше заданной точности (0,001). Поскольку минимум был определен на границе области, в координатах (-1.682, +1.682, +1.682), то наибольший антагонистический эффект ожидается при условии минимальной концентрации спирта 20% и максимальных начальных

численностях бифидобактерий ($8,0 \lg(\text{КОЕ/мл})$) и тест-штамма ($8,0 \lg(\text{КОЕ/мл})$). В данном случае, в отличие от бацилл, метаболизм сальмонелл влиял на синбиотический фактор, снижая его значение, предположительно, в результате дополнительного продуцирования кислот.

Уравнение (20), полученное для конечной численности сальмонелл, адекватно, критерий Фишера ($F = 2,20 < 4,74$) меньше табличного значения при $p = 0.05$.

$$Y_2 = 4.14 \cdot 10^8 - 4.58 \cdot 10^7 x_2 + 3.95 \cdot 10^7 x_3 - 3.61 \cdot 10^7 x_1^2 - 2.08 \cdot 10^7 x_2^2 + 2.63 \cdot 10^7 x_3^2 \quad (20)$$

Как и в случае SF, коэффициенты при всех факторах оказались значимыми, а поверхности отклика построены при фиксированных значениях x_3 (рисунок 28). Поверхность имела форму параболоида в координатах ($x_1; x_2$) при всех x_3 в пределах области варьирования. Максимальное значение конечной численности тест-штамма лежит в координатах (0; -1.101; +1.685), и составляет $8,68 \lg(\text{КОЕ/мл})$. Таким образом, синбиотическая композиция фруктанов, осажденных 50 %-ным этанолом, и бифидобактерий с начальной численностью $6,34 \lg(\text{КОЕ/мл})$ обладает наименьшим антагонизмом в отношении сальмонелл и по мере увеличения начальной численности тест-штамма эффективность также будет ослабевать. При этом влияние начальной численности тест-штамма на функцию отклика не симметрично относительно центра плана, т.к. экстремум (минимум) функции по этой переменной находится в точке -0.749 ($5,83 \lg(\text{КОЕ/мл})$). В следствие квадратичного характера зависимости, конечная численность сальмонелл практически не изменяется при их начальной численности ниже $6,5 \lg(\text{КОЕ/мл})$, при больших же значениях наблюдали резкое увеличение значения функции отклика. Таким образом, начальная численность сальмонелл $6,5 \lg(\text{КОЕ/мл})$ является критической как фактор возможного микробного поражения.

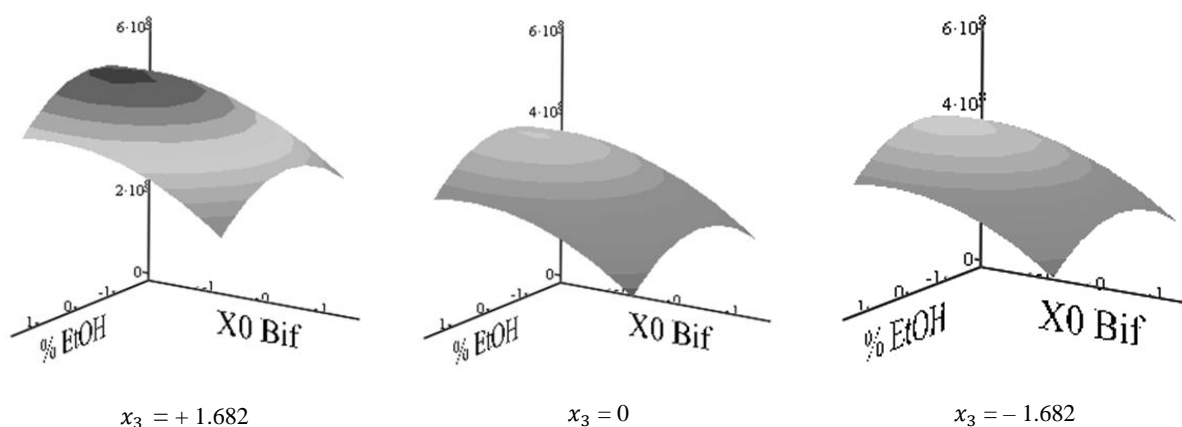


Рисунок 28 - Поверхность отклика конечной численности сальмонелл как функция от концентрации этанола (x_1) и начальной численности пробиотика (x_2) при фиксированных значениях начальной численности сальмонеллы (x_3)

Параболоид функции отклика (в координатах $(x_1; x_2)$) симметричен относительно центра плана переменной x_1 , что говорит о равных эффектах подавления фракций фруктанов, осаждённых наибольшей и наименьшей концентрациями спирта. При этом увеличение начальной численности пробиотика выше 6,34 lg(КОЕ/мл) усиливает подавление патогена. Наименьшие значения конечной численности *Sal. enterica* (наибольший антагонизм) в пределах области варьирования достигается при максимальной начальной численности бифидобактерий (8,0 lg (КОЕ/мл)) в среде, содержащей фруктаны корня лопуха, осажденные 20% или 80% этанолом. Видимо, при наибольшей сСП антагонизм обусловлен, преимущественно, меньшей доступностью углеводного субстрата, а при наименьшей - в результате более интенсивного его потребления бифидобактериями и большей скорости продуцирования метаболитов. Данный вопрос, однако, требует дальнейших детальных исследований.

3.6.5. Антагонизм синбиотических композиций *Bif. bifidum* и фруктанов клубней топинамбура в отношении *Vac. cereus* и анализ поверхностей отклика

Матрица планирования, экспериментальные и расчетные значения функции отклика (SF) при совместном культивировании *Vac. cereus* и *Bif. bifidum* в среде с фруктанами клубней топинамбура представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Область варьирования и кодирования переменных, экспериментальные и расчетные значения функции отклика для тест-штамма *Vac. cereus* в среде с фруктанами клубней топинамбура

№ опыта	Факторы						Синбиотический фактор	
	Концентрация осадителя (EtOH), %		Начальная численность пробиотика, lg(КОЕ/мл)		Начальная численность бацилл, lg(КОЕ/мл)			
	z_1	x_1	z_2	x_2	z_3	x_3	SF_{obs}	SF_{pred}
1	67.8	+1	7.6	+1	6.4	+1	0,0307	0,0314
2	67.8	+1	7.6	+1	4.6	-1	0,0310	0,0314
3	67.8	+1	6.4	-1	6.4	+1	0,0418	0,0417
4	67.8	+1	6.4	-1	4.6	-1	0,0417	0,0417
5	32.2	-1	7.6	+1	6.4	+1	0,0126	0,0133
6	32.2	-1	7.6	+1	4.6	-1	0,0118	0,0133
7	32.2	-1	6.4	-1	6.4	+1	0,0124	0,0236
8	32.2	-1	6.4	-1	4.6	-1	0,0144	0,0236
9	20.0	-1.682	7.0	0	5.5	0	0,0248	0,0150
10	80.0	+1.682	7.0	0	5.5	0	0,0424	0,0454
11	50.0	0	6.0	-1.682	5.5	0	0,0471	0,0387
12	50.0	0	8.0	+1.682	5.5	0	0,0199	0,0214
13	50.0	0	7.0	0	4.0	-1.682	0,0240	0,0211
14	50.0	0	7.0	0	7.0	+1.682	0,0223	0,0211
15	50.0	0	7.0	0	5.5	0	0,0213	0,0211
16	50.0	0	7.0	0	5.5	0	0,0122	0,0211
17	50.0	0	7.0	0	5.5	0	0,0239	0,0211
18	50.0	0	7.0	0	5.5	0	0,0241	0,0211
19	50.0	0	7.0	0	5.5	0	0,0205	0,0211
20	50.0	0	7.0	0	5.5	0	0,0237	0,0211

Функция отклика, рассчитанная по синбиотическому фактору при совместном культивировании *Bif. bifidum* с *Bac. cereus* (уравнение 21) в среде с различными фракциями фруктанов клубней топинамбура, была адекватна (расчетный критерий Фишера ($F = 1,96 < 4,74$) меньше табличного значения при $p = 0,05$).

$$Y_1 = 0.0211 + 0.0091x_1 - 0.0051x_2 + 0.0032x_1^2 + 0.0031x_2^2 \quad (21)$$

В случае бацилл, SF не зависел от их начальной численности (x_3), благодаря чему получена одна поверхность отклика (рисунок 29). Все коэффициенты при парных и тройных взаимодействиях факторов оказались незначимы, что говорит о независимом влиянии концентрации осадителя (x_1) и начальной численности пробиотика (x_2) на ингибирующее действие синбиотической композиции, включающей бифидобактерии и фруктаны клубней топинамбура в отношении тест-штамма.

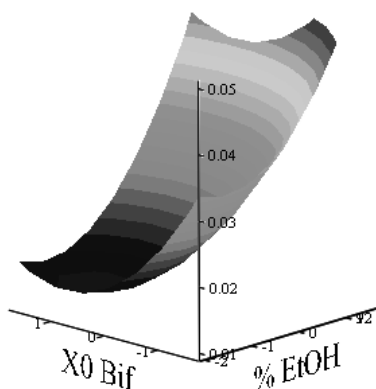


Рисунок 29 - Поверхность отклика SF, как функция концентрации этанола (x_1) и начальной численности пробиотика (x_2). Данные получены при совместном культивировании бифидобактерий и бацилл в среде с различными фракциями фруктанов клубней топинамбура

Поверхность отклика имела вид параболоида с минимумом в пределах области варьирования при $x_1 = -1,410$ и $x_2 = 0,814$. Таким образом композиция бифидобактерий в количестве $7,49 \log(\text{КОЕ/мл})$ и фруктанов топинамбура, осажденных 24,9 %-ным этанолом является наиболее эффективной.

Модель, полученная для конечной численности бацилл, оказалось неадекватной (данные не приводятся).

3.6.6. Антагонизм синбиотических композиций *Bif. bifidum* и фруктанов клубней топинамбура в отношении *Sal. enterica* и анализ поверхностей отклика

Матрица планирования, экспериментальные и расчетные значения функции отклика (SF) при совместном культивировании *Bif. bifidum* и *Sal. enterica* в среде с фруктанами клубней топинамбура представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Область варьирования и кодирования переменных, экспериментальные и расчетные значения функции отклика для тест-штамма *Sal. enterica* в среде с фруктанами клубней топинамбура

№ опыта	Факторы						Синбиотический фактор	
	Концентрация осадителя (EtOH), %		Начальная численность пробиотика, lg(KOE/мл)		Начальная численность сальмонелл, lg(KOE/мл)			
	z_1	x_1	z_2	x_2	z_3	x_3	SF_{obs}	SF_{pred}
1	67.8	+1	7.6	+1	7.4	+1	0,015	0,016
2	67.8	+1	7.6	+1	5.6	-1	0,026	0,035
3	67.8	+1	6.4	-1	7.4	+1	0,057	0,046
4	67.8	+1	6.4	-1	5.6	-1	0,073	0,065
5	32.2	-1	7.6	+1	7.4	+1	0,008	0,016
6	32.2	-1	7.6	+1	5.6	-1	0,043	0,035
7	32.2	-1	6.4	-1	7.4	+1	0,041	0,046
8	32.2	-1	6.4	-1	5.6	-1	0,061	0,065
9	20.0	-1.682	7.0	0	6.5	0	0,060	0,043
10	80.0	+1.682	7.0	0	6.5	0	0,021	0,043
11	50.0	0	6.0	-1.682	6.5	0	0,065	0,073
12	50.0	0	8.0	+1.682	6.5	0	0,026	0,022
13	50.0	0	7.0	0	5.0	-1.682	0,036	0,044
14	50.0	0	7.0	0	8.0	+1.682	0,006	0,011
15	50.0	0	7.0	0	6.5	0	0,025	0,027
16	50.0	0	7.0	0	6.5	0	0,023	0,027
17	50.0	0	7.0	0	6.5	0	0,038	0,027
18	50.0	0	7.0	0	6.5	0	0,023	0,027
19	50.0	0	7.0	0	6.5	0	0,020	0,027
20	50.0	0	7.0	0	6.5	0	0,037	0,027

Функция отклика, рассчитанная по синбиотическому фактору при совместном культивировании *Bif. bifidum* с *Sal. enterica* (уравнение 22) в среде с различными фракциями фруктанов клубней топинамбура, была адекватна (расчетный критерий Фишера ($F = 2,22 < 4,74$) меньше табличного при $p = 0.05$).

$$Y_1 = 0,0274 - 0,0151x_2 - 0,0096x_3 + 0,0056x_1^2 + 0,0072x_2^2 \quad (22)$$

Как и в экспериментах с бациллами, в случае сальмонеллы, функция отклика SF от концентрации осадителя и начальной численности пробиотика

является параболоидом с минимумом (рисунок 30). Зависимость синбиотического фактора от начальной численности тест-штамма – линейная обратная. При увеличении начальной численности сальмонелл SF снижается, при этом характер поверхности не изменяется. Коэффициенты при парных и тройных взаимодействиях оказались незначимы, что указывает на независимое влияние факторов на SF.

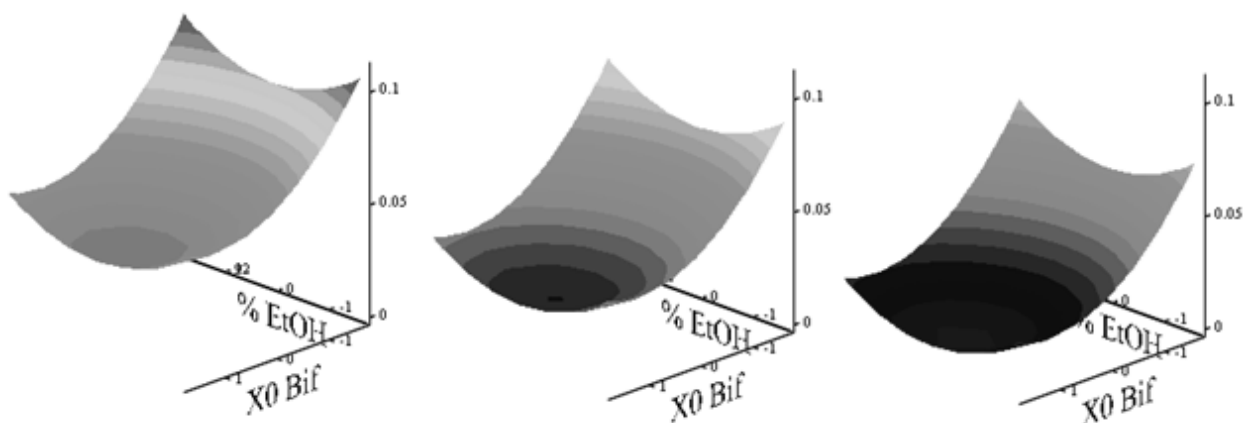


Рисунок 30 - Поверхность отклика SF, как функция концентрации этанола (x_1) и начальной численности пробиотика (x_2) при фиксированных значениях x_3 . Данные получены при совместном культивировании бифидобактерий и бацилл в среде с различными фракциями фруктанов клубней топинамбура

Минимум функции SF соответствует наиболее эффективной синбиотической композиции и располагается (в пределах варьирования) в точке (0; 1,05; 1,68), что соответствует синбиотической композиции бифидобактерий с начальной численностью 7,62 log(KOE/мл) с фруктанами клубней топинамбура, осажденными 50%-ным этанолом при максимальном начальном количестве тест-штамма 8,0 lg(KOE/мл). Повышение SF наблюдали как при уменьшении (повешение сСП), так и при увеличении концентрации этанола (понижение сСП) относительно среднего значения. Возможно, фруктаны с меньшей длиной цепи могут потреблять сальмонеллы, конкурируя с бифидобактериями за углеводный субстрат, а длинноцепочные фруктаны топинамбура оказались менее доступны для бифидобактерий, чем в экспериментах с корнем лопуха. Учитывая характер зависимости SF от x_3 ,

можно сказать, что антагонизм синбиотической композиции растет с увеличением начального количества сальмонелл. Данное явление можно объяснить продуцированием сальмонеллами органических кислот, т.е. ингибирование собственными метаболитами.

Как и в случае бацилл, уравнение для расчета конечной численности сальмонелл оказалось неадекватным (данные не показаны).

Таким образом, в отношении обоих исследованных тест-штаммов и типов растительного сырья наибольшая эффективность синбиотика установлена для фракции фруктанов с большей степенью полимеризации (осажденных минимальной концентрацией этанола) и наибольшей численностью бифидобактерий. Полученные результаты позволили установить количественную связь между параметрами процесса получения фруктанов и антагонизмом их синбиотической композиции с бифидобактериями в отношении исследованных тест-штаммов, а также определить влияние соотношения численности пробиотика и тест-штамма на антагонизм. Предложенный подход, несмотря на трудоемкость экспериментов, является достаточно информативным и позволяет обосновать состав новых синбиотиков, что обуславливает интерес в проведении подобных исследований с другими пробиотиками, тестовыми штаммами, и пребиотическими веществами различного состава.

В качестве ингибиторов в нашем исследовании рассмотрены молочная и уксусная кислоты. Известно [308], что многие бифидобактерии, в том числе представители вида *Bifidobacterium bifidum*, могут продуцировать антимикробные пептиды. Однако их синтез, как правило, активируется на стационарной фазе, к моменту наступления которой у бифидобактерий, в со-культуре рост бацилл и сальмонелл также прекращается. Поэтому действие бактериоцинов при расчете SF не учитывали. Вопрос действия данных ингибиторов в условиях, приближенных к реальным, например, в системах,

моделирующей кишечник, при непрерывной подаче среды с малыми скоростями протока является предметом дальнейшего изучения.

Предложенный в данной работе подход также может быть применен для пребиотиков животного происхождения. Лактулоза известна как один из наиболее эффективных пребиотиков [309], который используется во многих функциональных продуктах, часто в сочетании с другими пребиотиками, например, ФОС. С недавнего времени внимание исследователей направлено на олигосахариды молока (в частности, козьего), представляющие смесь, преимущественно, три- и тетрасахаридов, состоящих из глюкозы, фруктозы, галактозы и их ацилированных производных [310]. Очевидно, что качественный и количественный состав в данном случае будет оказывать влияние на действие пребиотика как отдельно, так и в составе синбиотической композиции, что может быть исследовано *in vitro* с применением предложенного метода.

3.7. Исследование моно- и со-культур *Bif. adolescentis* и *Bac. cereus* при непрерывном культивировании в одностадийной модели толстого кишечника

Модель, разработанная для периодической культуры, хотя и характеризовалась высокой точностью прогноза, но, как функциональная, является существенно упрощенной. Большой научный и практический интерес представляет её модификация для описания динамической системы, приближенной к реальным условиям толстого кишечника. При выборе условий проведения экспериментов были скомбинированны:

- бинарная система, в которой рассматривается действие пробиотика на тест-штамм через образование метаболитов (молочной и уксусной кислоты) при периодическом культивировании, и ее математическое

описание, на основании которой был предложен критерий для оценки эффективности синбиотических композиций (п.3.2.);

- функциональная модель TSC имитирующая условия кишечника *in vitro* в динамических условиях [268];

Для облегчения задачи математического описания и приближения описанной выше математической модели, TSC модель была упрощена до одностадийной. Функциональная модель имитировала нисходящий отдел толстого кишечника, поскольку именно в нём сконцентрирована основная часть микробиоты. Культивирование проводили в одном биореакторе, в условиях, соответствующих нисходящему отделу толстого кишечника: скорость разбавления $0,04 \text{ ч}^{-1}$, pH 6,8, температура $37 \text{ }^\circ\text{C}$ [268]. План эксперимента, как и для периодической ферментации, предполагал исследование монокультур пробиотика и тест-штамма и со-культуры.

3.7.1. Исследование роста монокультуры *Bifidobacterium adolescentis* при непрерывном культивировании с варьированием концентрации пребиотика

Для изучения параметров роста микроорганизмов с целью дальнейшего математического моделирования исследовали поведение монокультуры *Bif. adolescentis* в среде с пребиотиком (ОФ) при непрерывном культивировании. Была проведена серия экспериментов при варьировании концентрации ОФ (2, 5, 7, 10, 12 и 15 г/л). Необходимо отметить, что при низких скоростях разбавления скорость потребления субстрата будет выше скорости удаления метаболитов, поэтому в состоянии динамического равновесия в системе может происходить как лимитирование субстратом, так и ингибирование продуктами метаболизма [291].

Для оценки устойчивости состояния динамического равновесия, были проведены выборочные эксперименты с концентрациями ОФ в среде 7 и 12 г/л в течение периода динамического равновесия до 19 суток, определены

концентрации метаболитов и численность бифидобактерий (рисунки 31 и 32, соответственно). Общая продолжительность культивирования при концентрации ОФ 7 г/л составила 120 часов, а при концентрации субстрата 12 г/л – 461 час. Установлено, что численность бифидобактерий и концентрации кислот в системе оставались стабильны в течении указанного времени. Следовательно, для исследования поведения бифидобактерий в состоянии динамического равновесия в данной системе, допустима продолжительность эксперимента около 48 часов, что позволит снизить трудоемкость исследований.

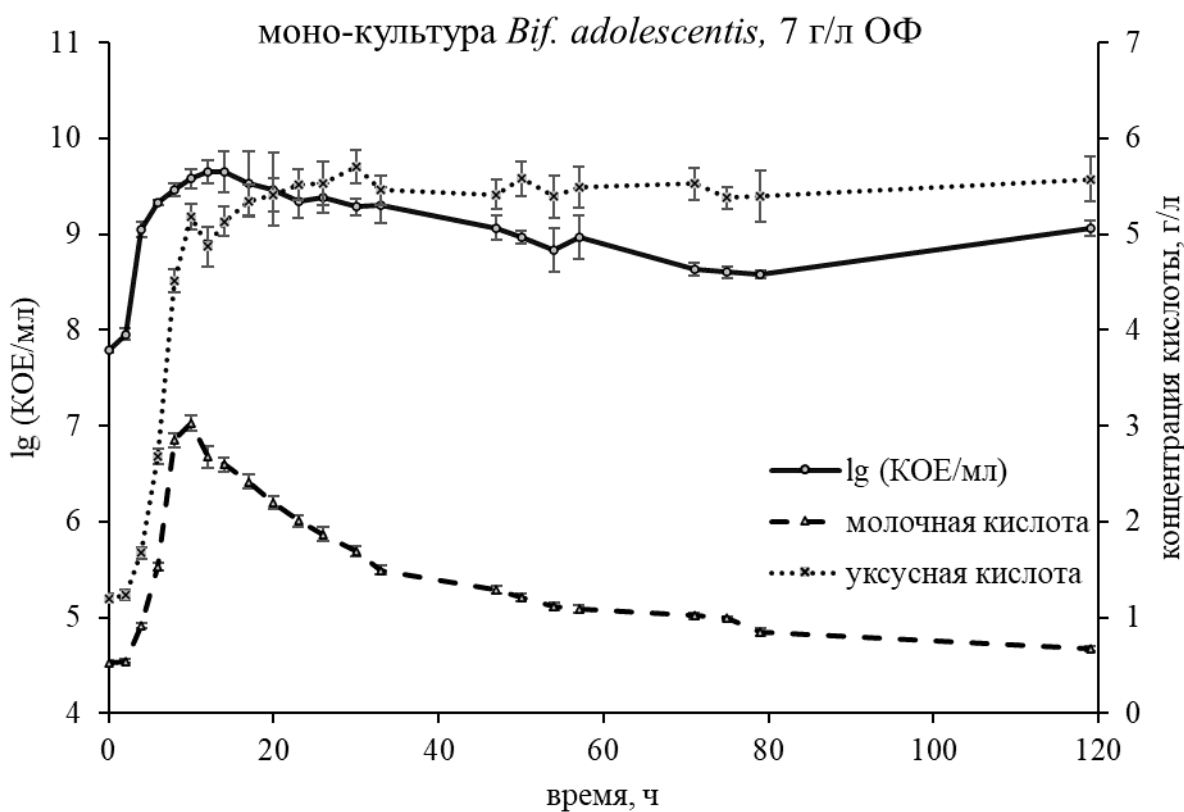


Рисунок 31 - Динамика численности *Bifidobacterium adolescentis* при одностадийном непрерывном культивировании в среде с ОФ 7 г/л ($p < 0,05$), концентрация кислот

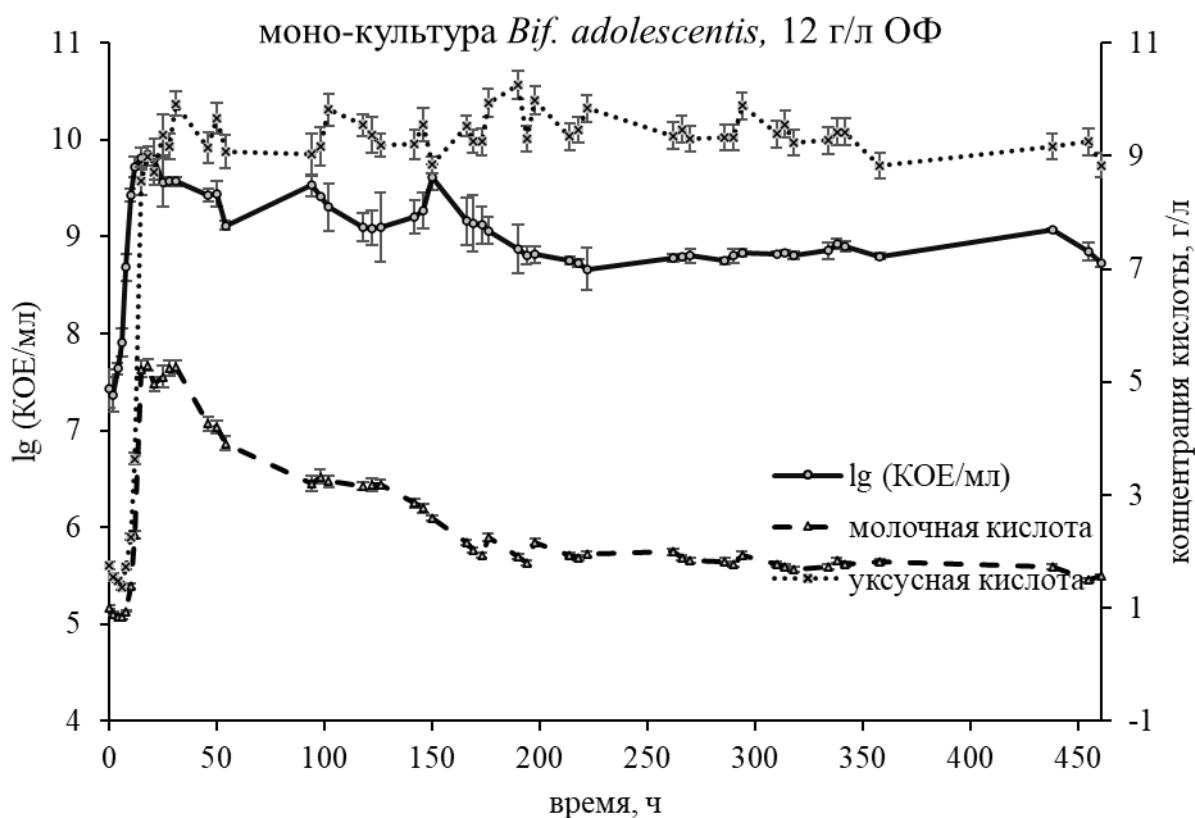


Рисунок 32 - Динамика численности *Bifidobacterium adolescentis* при одностадийном непрерывном культивировании в среде с ОФ 12 г/л ($p < 0.05$), концентрация кислот

Кривые роста бифидобактерий при варьировании концентраций ОФ (2, 5, 10 и 15 г/л) представлены на рисунке 33. При повышении концентрации пребиотика численность бифидобактерий в состоянии динамического равновесия не зависит от концентрации ОФ, за исключением концентрации 2 г/л. Лимитирующее действие субстрата, видимо, является преобладающим, вызывая энергетический «голод». Предположительно, в состоянии динамического равновесия происходит снижение скорости роста бифидобактерий до величины равной скорости разбавления. Достижение динамического равновесия происходит в течение 6 – 10 часов. Культивирование при 12 и 15 г/л ОФ отличается небольшим увеличением продолжительности перехода к равновесному состоянию, по сравнению с 10 г/л. Можно предположить, что для создания синбиотических композиций количество пребиотика из расчета его средней концентрации в среде (химусе) 10 г/л является оптимальным.

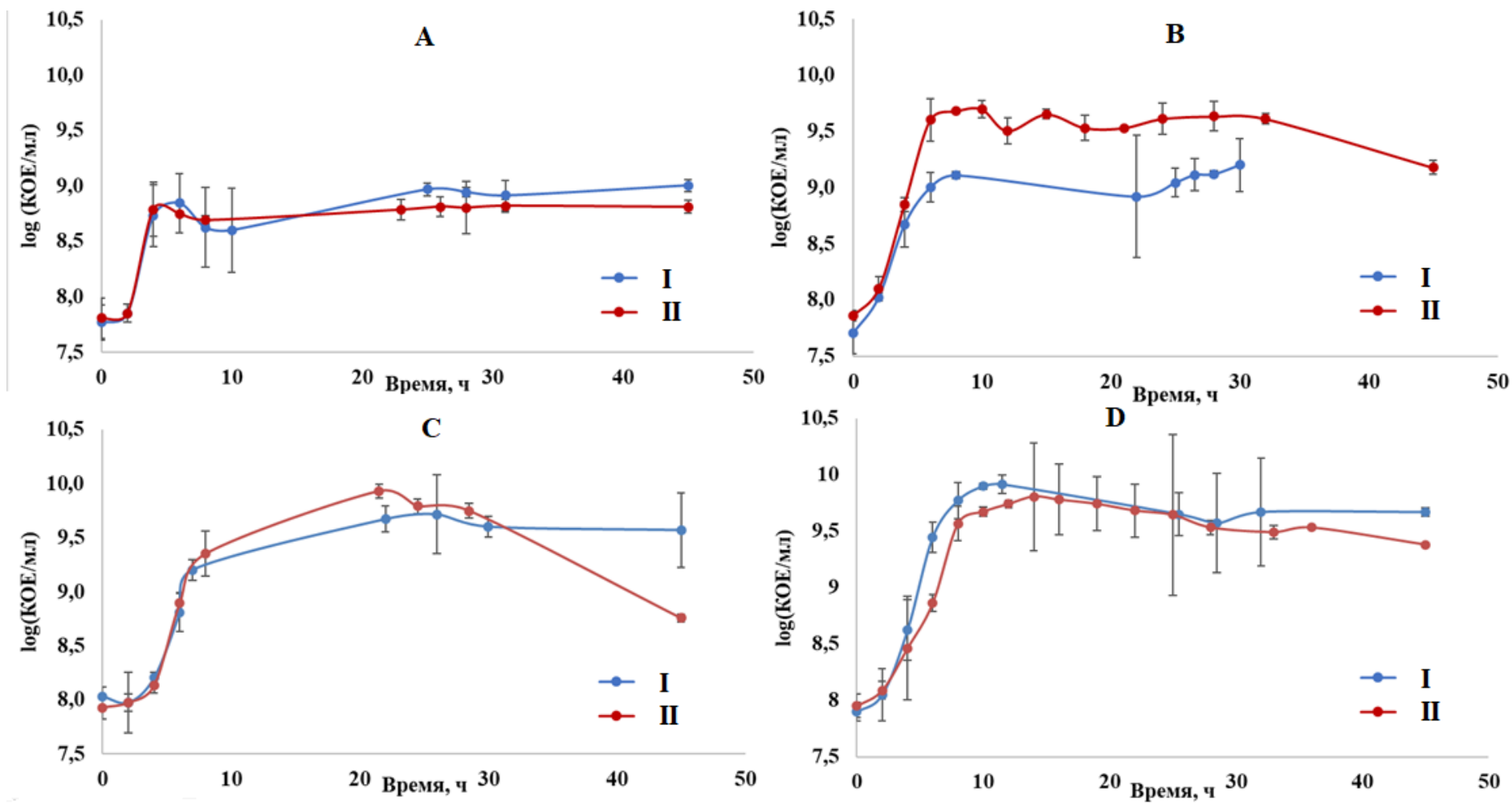


Рисунок 33 - Динамика численности *Bifidobacterium adolescentis* при одностадийном непрерывном культивировании в среде с ОФ: А – 2 г/л, В – 5 г/л, С – 10 г/л, D – 15 г/л (каждый эксперимент был проведен в двух повторностях, обозначенных I и II). Доверительные интервалы при $p = 0,05$

При микроскопическом исследовании препаратов с фазовым контрастом (ФК) наблюдали образование агломератов в культуре бифидобактерий (Приложение 4). Культуральный метод определения численности бактерий может давать заниженные результаты, по причине того, что один образующийся агломерат будет давать 1 КОЕ вне зависимости от количества в нем клеток. Поэтому для расширения классической математической модели исследовали дополнительно культуры с помощью микроскопии с фазовым контрастом и окраской витальными красителями. Исследование агломерации проводили при культивировании в среде с концентрациями ОФ 2, 5, 10, 15 г/л. Была определена доля свободных клеток и клеток в агломератах, рассчитано соотношение «видимой» численности (полученной культуральным методом) к фактической (определенной микроскопированием), а также определена доля мертвых клеток (рисунки 34, 35).

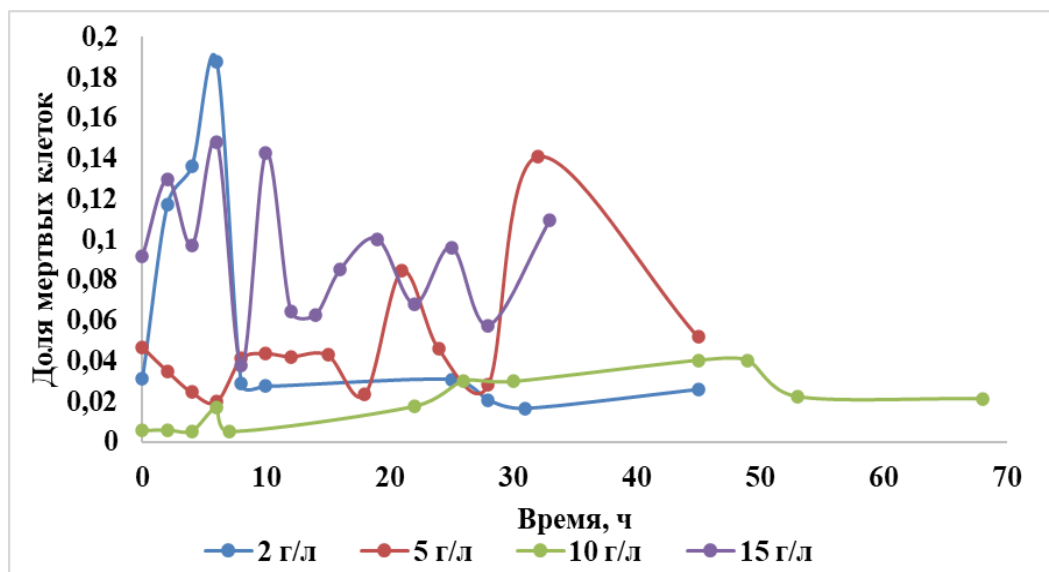


Рисунок 34 - Доля мертвых клеток при одностадийном непрерывном культивировании *Bifidobacterium adolescentis* в среде с концентрацией ОФ 2, 5, 10 и 15 г/л

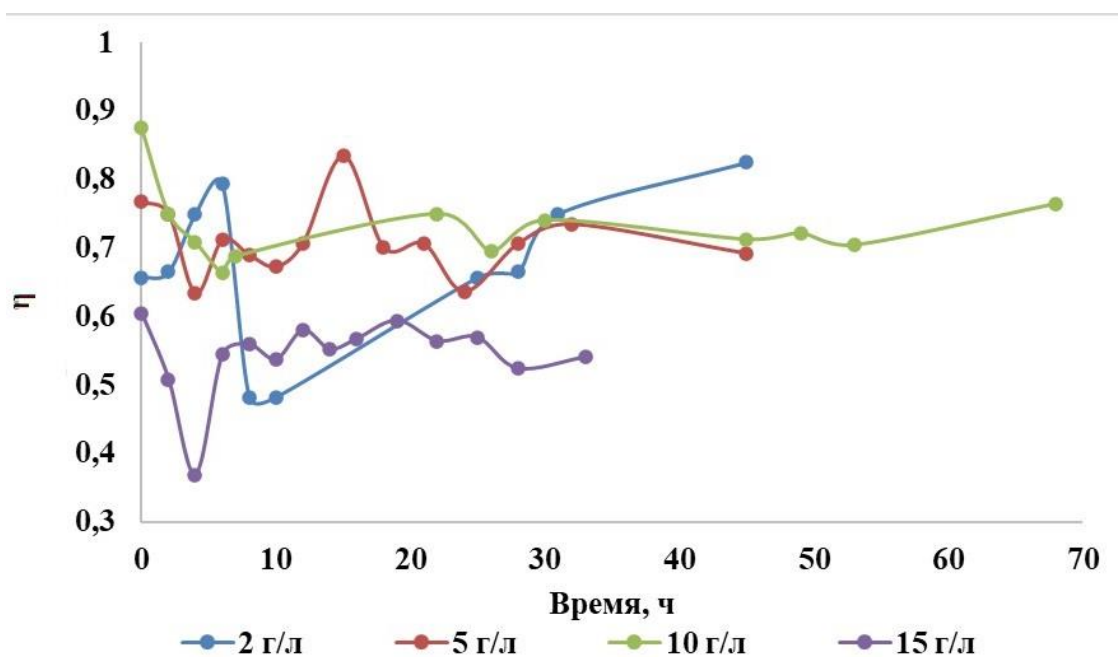


Рисунок 35 - Соотношение «видимой» и фактической численности клеток *Bifidobacterium adolescentis* (агломерация) при одностадийном непрерывном культивировании в среде с концентрацией ОФ 2, 5, 10 и 15 г/л

Доля мертвых клеток при концентрации 10 г/л ОФ ниже, чем при 2, 5, 15 г/л. Вероятно оптимальная концентрация пребиотика поддерживает баланс между лимитированием субстратом, скоростью разбавления и ингибированием продуктами, образующимися пропорционально потребленному субстрату. В случае предельных концентраций 2 и 15 г/л ОФ наблюдали высокую долю мертвых клеток, однако при 2 г/л ОФ это значение снижается и достигает квазистационарного состояния, в то время как в среде с 15 г/л ОФ наблюдали колебания. В целом количество мертвых клеток невелико и не превышает 14 %.

Причины интенсификации образования агломератов бифидобактериями не до конца понятны, но, можно предположить, что оно связано с отклонением условий роста от оптимальных. Поскольку концентрации субстрата в инокуляте были такими же, как и при дальнейшем культивировании, можно предположить, что при концентрации 2 г/л ОФ после внесения инокулята в ферментер культура адаптируется к относительно более богатой питательной среде, что сопровождается увеличением агломерации. Достижение

динамического равновесия характеризовалось низким соотношением «видимой» численности клеток к фактической, после чего количество агломератов быстро возрастало. При 5, 10 и 15 г/л до достижения динамического равновесия происходит спад числа агломировавшихся клеток. В дальнейшем, при 5 г/л наблюдали колебания, а при 10 г/л и 15 г/л ОФ доля клеток в агломератах оставалась постоянной. Полученные результаты представляются полезными для более глубокого понимания происходящих в исследуемой системе биологических процессов. Однако существенным практическим ограничением является необходимость проведения большого количества экспериментов и усложнение анализа проб для определения констант модели, учитывающей агломерацию. Поэтому данный фактор в математической модели не учитывали.

Основными продуктами энергетического метаболизма бифидобактерий являются молочная и уксусная кислоты [311]. Изменение концентрации этих кислот представляется важным для математического описания роста сокультуры бацилл и бифидобактерий, поскольку они являются ингибиторами роста тест-штамма. С помощью ВЭЖХ были определены концентрации молочной и уксусной кислот в культуральной жидкости для всех вариантов (Рисунки 36 и 37). Зависимость концентраций кислот в культуральной жидкости на момент достижения культурой состояния динамического равновесия от концентрации ОФ, поступающей с подпиткой, представлена на рисунке 38.

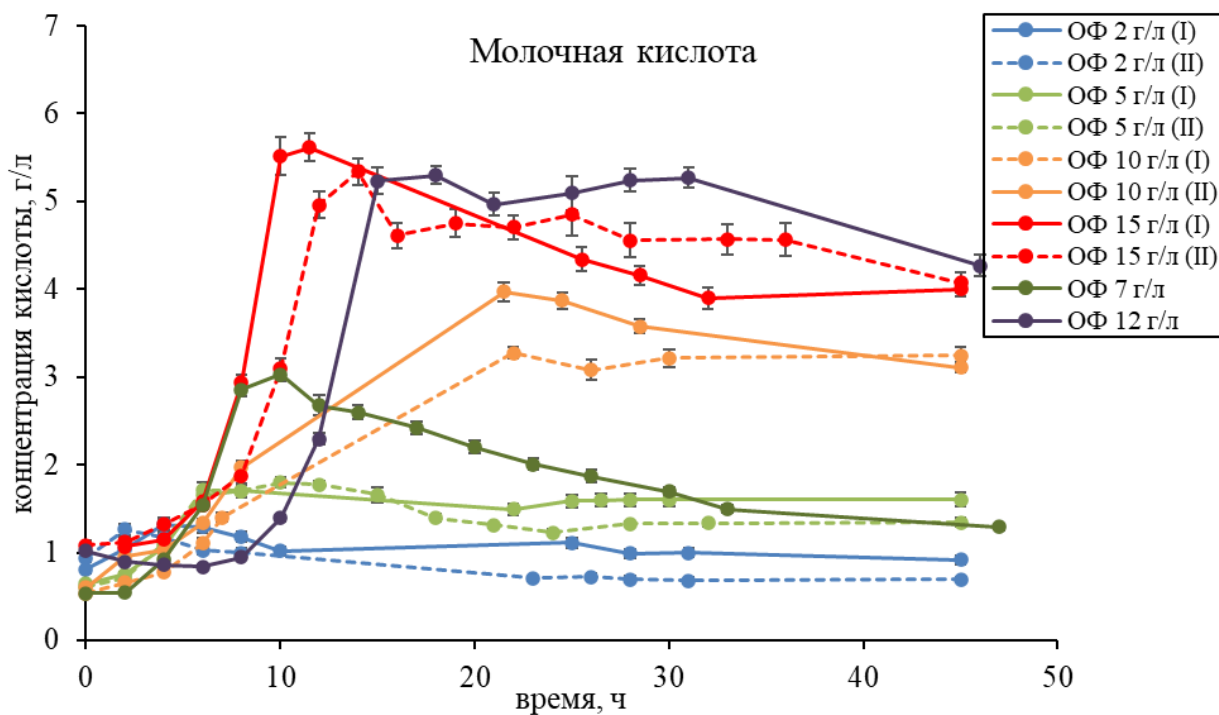


Рисунок 36 - Концентрации молочной кислоты при одностадийном непрерывном культивировании *Bifidobacterium adolescentis* при концентрации ОФ 2, 5, 7, 10, 12, 15 г/л. Все результаты, кроме 7 и 12 г/л ОФ, представлены в двух повторностях ((I) и (II)). Представлены кривые до 46 ч роста

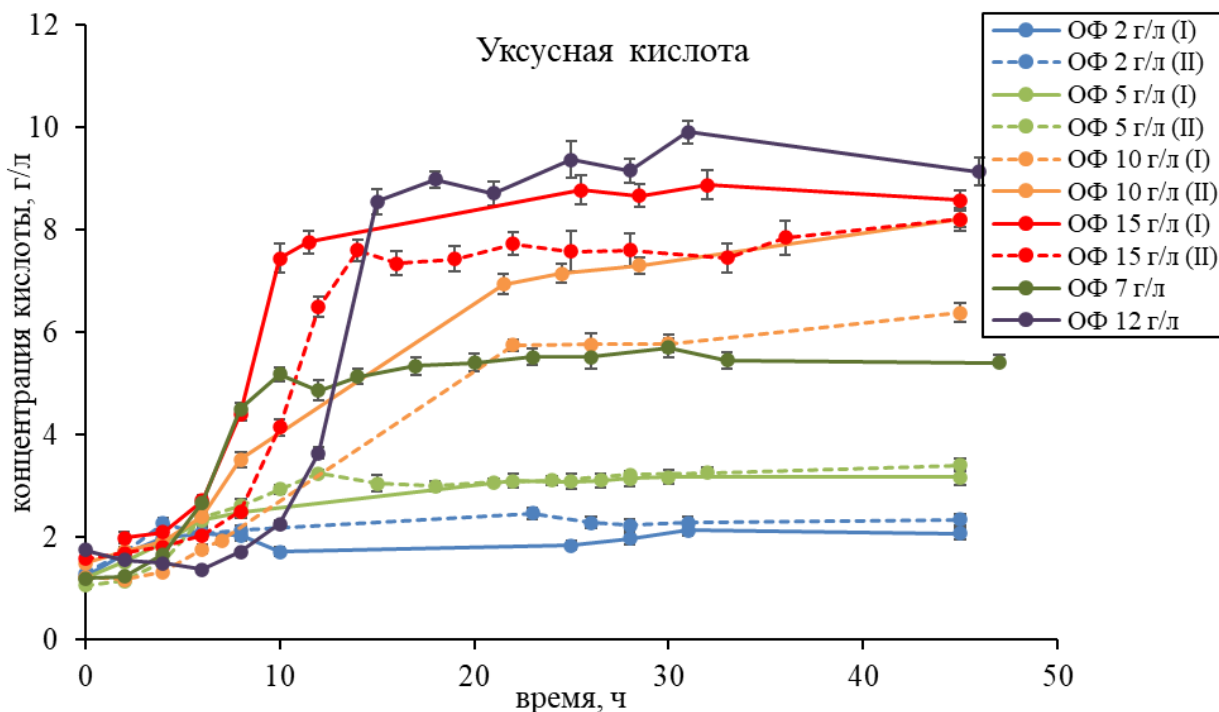


Рисунок 37 - Концентрации уксусной кислоты при одностадийном непрерывном культивировании *Bifidobacterium adolescentis* при концентрации ОФ 2, 5, 7, 10, 12, 15 г/л. Все результаты, кроме 7 и 12 г/л ОФ, представлены в двух повторностях ((I) и (II)). Представлены кривые до 46 ч роста

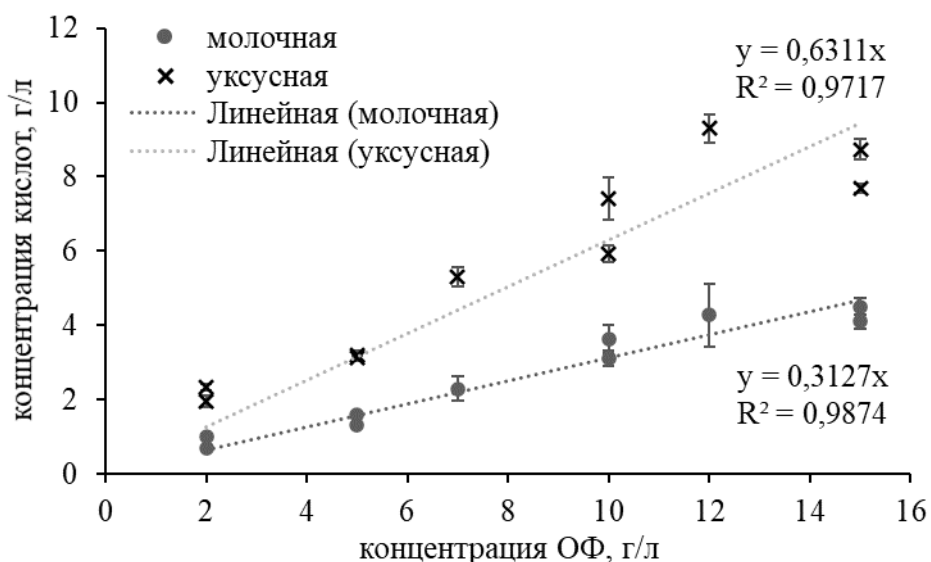


Рисунок 38 - Корреляции между потреблением ОФ и продукцией молочной и уксусной кислот в стационарной фазе монокультуры бифидобактерий. Считалось, что количество потребленного субстрата было равно концентрации, поступившей в ферментер с подпиткой

При достижении динамического равновесия наблюдали повышение концентрации уксусной кислоты и снижение концентрации молочной кислоты. Возможно, при избытке лактата в бифидном шунте (Приложение 5), фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, участвующий в синтезе молочной кислоты, ингибируется образованным продуктом. В результате равновесие смещается в сторону образования уксусной кислоты, и изменяется мольное соотношение молочной и уксусной кислот. При 2 и 5 г/л ОФ мольное соотношение молочной и уксусной кислот сохраняется на протяжении всей ферментации.

Чем выше концентрация пребиотика, тем больше кислот продуцируется бифидобактериями. При концентрации 15 г/л ОФ суммарный выход кислот был ниже, чем при 12 г/л. Вероятно меньшее накопление связано с большей агломерацией при 15 г/л, при которой продукция метаболитов замедляется. Данная гипотеза, однако, требует дальнейших исследований. В целом, наблюдали сильную корреляцию между количеством кислот и концентрацией ОФ в подпитке (рисунок 38). Экономический коэффициент для молочной кислоты составлял 0,313 г/г поступающей ОФ, а для уксусной – 0,631 г/г.

Таким образом, углеводный субстрат на стадии динамического равновесия практически полностью расходуется культурой на энергетические нужды.

Инокулирование бифидобактерий в стерильную питательную среду было условно принято как терапевтическое внесение пробиотиков. Если принять во внимание высокую β -фруктофуранозидазную активность штамма, то предположение о преимущественном потреблении ОФ можно считать вполне обоснованным. При концентрации ОФ 2 г/л, количество жизнеспособных клеток бифидобактерий было значительно ($p < 0,01$) ниже, чем при концентрации 7 г/л и выше (рисунки 31, 33). В то же время заметной разницы между стационарными количествами бифидобактерий при концентрациях ОФ ≥ 7 г/л не наблюдалось. Таким образом, данная концентрация ОФ, как можно предположить, не является лимитирующим субстратом для накопления биомассы. Во всех случаях можно отметить, что популяция бифидобактерий достигала своего максимального количества, после чего происходило постепенное снижение и стабилизация состояния.

Для исследования возможности лимитирования роста бифидобактерий пребиотическим субстратом были определены концентрации потребляемых углеводов с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза. Исследования были проведены выборочно, в нескольких пробах культуральной жидкости при концентрации ОФ 7 и 12 г/л (таблицы 14 и 15, соответственно).

Таблица 14 - Концентрация углеводов при непрерывном культивировании *Vif. adolescentis* при концентрации ОФ 7 г/л

Время, час	Фруктоза, мг/л	Глюкоза, мг/л	Сахароза, мг/л	Сумма углеводов, мг/л	Кол-во гомологов (пиков)
0	1302	71,42	373,9	1747,32	8
2	1275	-	121,1	1396,1	6
14	55,12	-	-	55,12	3
23	-	-	46,29	46,29	1
54	34,96	-	-	34,96	3
75	8,975	-	-	8,975	4

Примечание: Количество гомологов не учитывалось в сумме углеводов.

С помощью данного метода количественно были определены концентрации фруктозы, глюкозы и сахарозы, а остальные гомологи

детектировали в виде пиков на полученных электрофореграммах (Приложения 6, 7). При меньшей концентрации субстрата (7 г/л) наблюдали уменьшение количества фруктозы до близкого к нулю значения на 23 часу ферментации (Приложение 8).

Таблица 15 - Концентрация углеводов при непрерывном культивировании *Bifidobacterium adolescentis* при концентрации субстрата 12 г/л

Время, час	Фруктоза, мг/л	Глюкоза, мг/л	Сахароза, мг/л	Сумма углеводов, мг/л	Кол-во гомологов (пиков)
0	1944	101	498	2543	9
6	2058	63,67	476,4	2598,0	9
10	2230	-	455,3	2685,37	9
25	33,44	-	-	33,44	3
50	37,66	-	-	37,66	3
98	39,24	-	-	39,24	3
122	62,78	-	-	62,78	3
146	33,01	-	-	33,01	3

Примечание: Количество гомологов не учитывали в сумме углеводов.

При культивировании в среде с 12 г/л ОФ увеличивались концентрации фруктозы и глюкозы, а концентрация сахарозы уменьшалась (Приложение 6). Известно, что ОФ содержит продукты неполной полимеризации и частичной деполимеризации инулина, в том числе, мономеры, т.е. глюкозу и фруктозу. Содержание мономеров даже после термической стерилизации не велико, что видно, в частности, по хроматограмме питательной среды в начальный момент культивирования (Приложение 7). В условиях поддержания рН при непрерывном культивировании, по всей вероятности, активируется синтез β -фруктафуранозидазы, в результате чего в течение первых 10 часов при избытке субстрата (12 г/л) наблюдается увеличение концентрации фруктозы. То есть скорость гидролиза ОФ ферментом превышает скорость потребления продуктов гидролиза бифидобактериями. После 25 часов при достижении динамического равновесия сохраняется постоянная концентрация фруктозы

(Приложение 6). Из-за ограничений метода гомологи ОФ не были проанализированы количественно.

Таким образом, динамика численности *Bif. adolescentis* значительно различалась при варьировании концентраций ОФ в условиях, моделирующих условия толстого кишечника. На наступление равновесного состояния в системе равновероятно может влиять истощение среды по углеводному субстрату, накопление метаболитов, агломерация, что требует дополнительных исследований. При избытке субстрата, предположительно, активируется синтез β -фруктофуранозидазы, из-за чего возрастает концентрация фруктозы в среде. Равновесные значения численности бифидобактерий при культивировании в среде с концентрацией пребиотика 5 г/л и выше отличаются незначительно. Однако максимальное накопление кислот увеличивается пропорционально повышению концентрации пребиотика.

3.7.2. Исследование роста со-культуры *Bifidobacterium adolescentis* и *Vacillus cereus* при непрерывном культивировании с варьированием концентрации олигофруктозы

Для изучения влияния синбиотической композиции *Bif. adolescentis* и ОФ на рост *Vac. cereus* в условиях, приближенных к условиям толстого кишечника, были проведены эксперименты в указанных выше условиях. Серия экспериментов, как предполагали, приближенно отражает события, соответствующие заселению кишечника бифидобактериями при профилактическом применении пробиотиков, и последующее инфицирование бациллами (микробными контаминантами пищи). Поступление пребиотика с питательной средой, должно стимулировать антагонизм бифидобактерий, как было установлено для статической модели. Выше показано, что концентрация пребиотика влияет на синтез бифидобактериями кислот, что должно отразиться на силе подавления ими бацилл. Чтобы подтвердить данное

предположение, варьировали концентрацию ОФ (5, 7, 10, 12, 15 г/л). После достижения культурой *Bif. adolescentis* динамического равновесия (не раньше 48 часов, см. п. 3.7.1) вносили инокулят *Vac. cereus*, предварительно инкубированный в течение трех суток, что соответствует стадии образования спор. Считали, что споры являются наиболее вероятным состоянием, в котором данные микроорганизмы могут проникать в ЖКТ. Контрольные эксперименты проводили с монокультурой *Vac. cereus*. Оценивали численность обоих микроорганизмов, концентрации кислот, остаточное содержание субстрата. Для исследования стабильности системы выборочно проводили длительные эксперименты: в среде с 7 г/л ОФ – 97 часов, в среде с 12 г/л ОФ – 123 часа. Результаты представлены на рисунках 39 и 40.

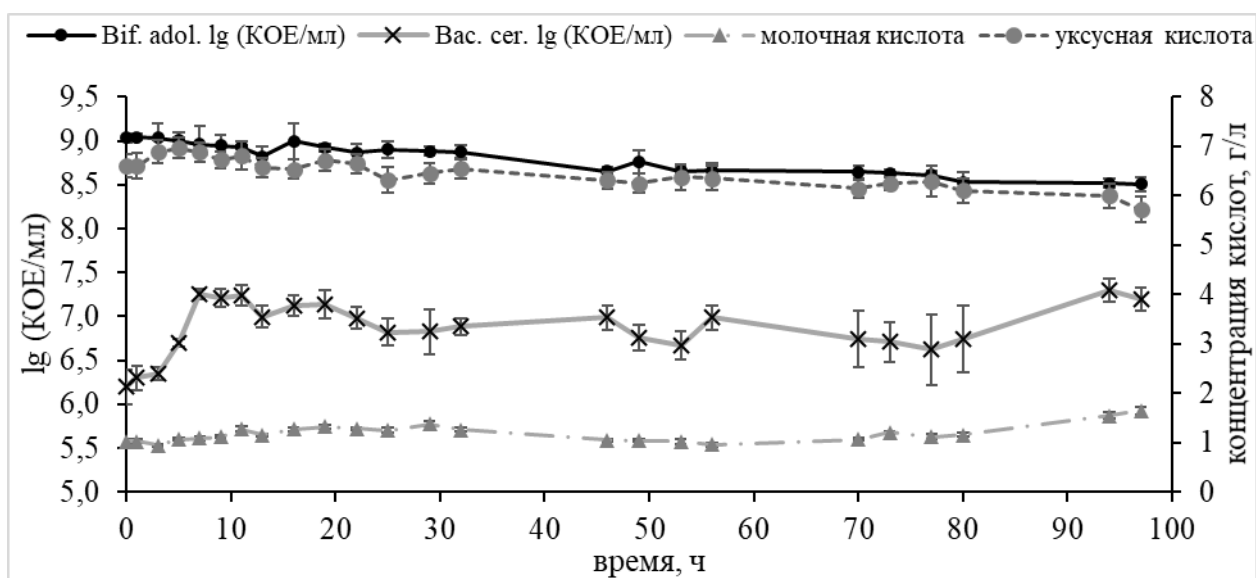


Рисунок 39 - Динамика численности микроорганизмов и концентрации кислот при совместном культивировании *Bacillus cereus* и *Bifidobacterium adolescentis* на ОФ 7 г/л. Доверительные интервалы рассчитаны при $p = 0,05$

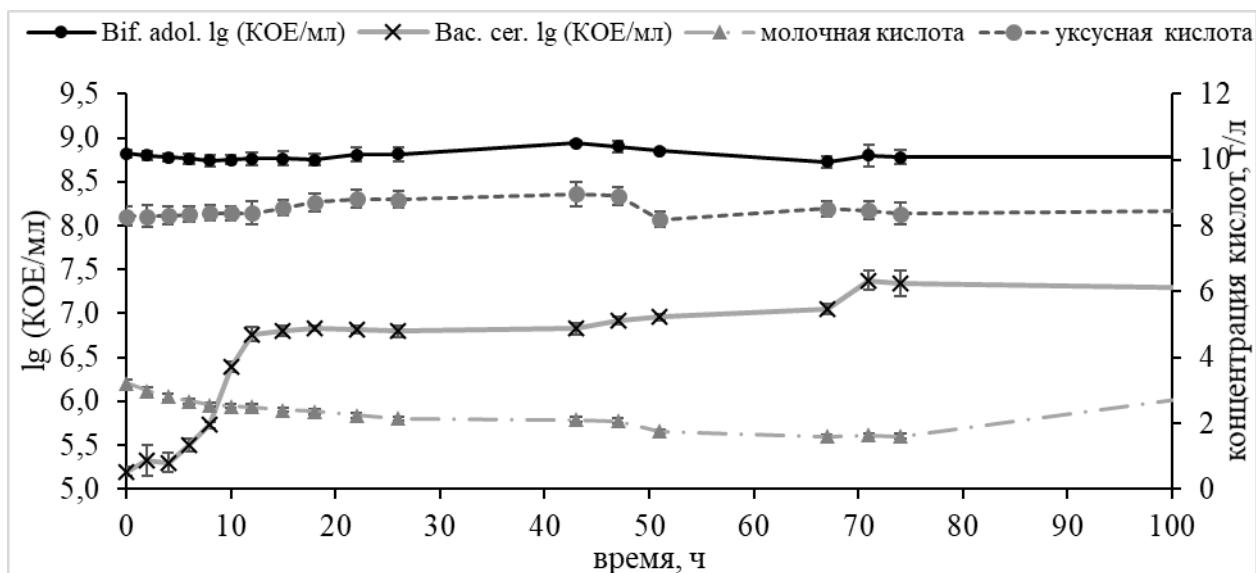


Рисунок 40 - Динамика численности при смешанном культивировании *Bacillus cereus* и *Bifidobacterium adolescentis* на ОФ 12 г/л, концентрации кислот. Доверительные интервалы рассчитаны при $p = 0,05$

При концентрации ОФ в среде 7 г/л после заражения спорами бацилл наблюдали задержку роста тест-штамма в течение примерно 4 часов, после чего следовала стадия активного роста. Далее численность бацилл достигала равновесного состояния. Концентрация уксусной кислоты уменьшалась, а молочной кислоты – возрастала, что может быть объяснено как смещением равновесия в метаболизме бифидобактерий в сторону молочной кислоты, так и потреблением ацетата, и продуцированием лактата бациллами в анаэробных условиях [312].

При концентрации ОФ в среде 12 г/л также наблюдали задержку роста *Bac. cereus*. Численность бифидобактерий не изменяется под влиянием роста бацилл, концентрации кислот были выше, чем в эксперименте с концентрацией ОФ в среде 7 г/л. Наблюдаемая продолжительность увеличения концентрации молочной кислоты одинакова, концентрация ацетата снижается медленнее. Таким образом, обосновано устойчивое состояние системы в течение более 120 часов. Для дальнейших исследований приняли допустимой продолжительность эксперимента с со-культурой 48

часов, поскольку в течение данного времени система переходит к стационарному состоянию.

Динамика численности бацилл в моно- и со-культуре и бифидобактерий в со-культуре при рассмотренных концентрациях ОФ представлены на рисунках 41 и 42, соответственно.

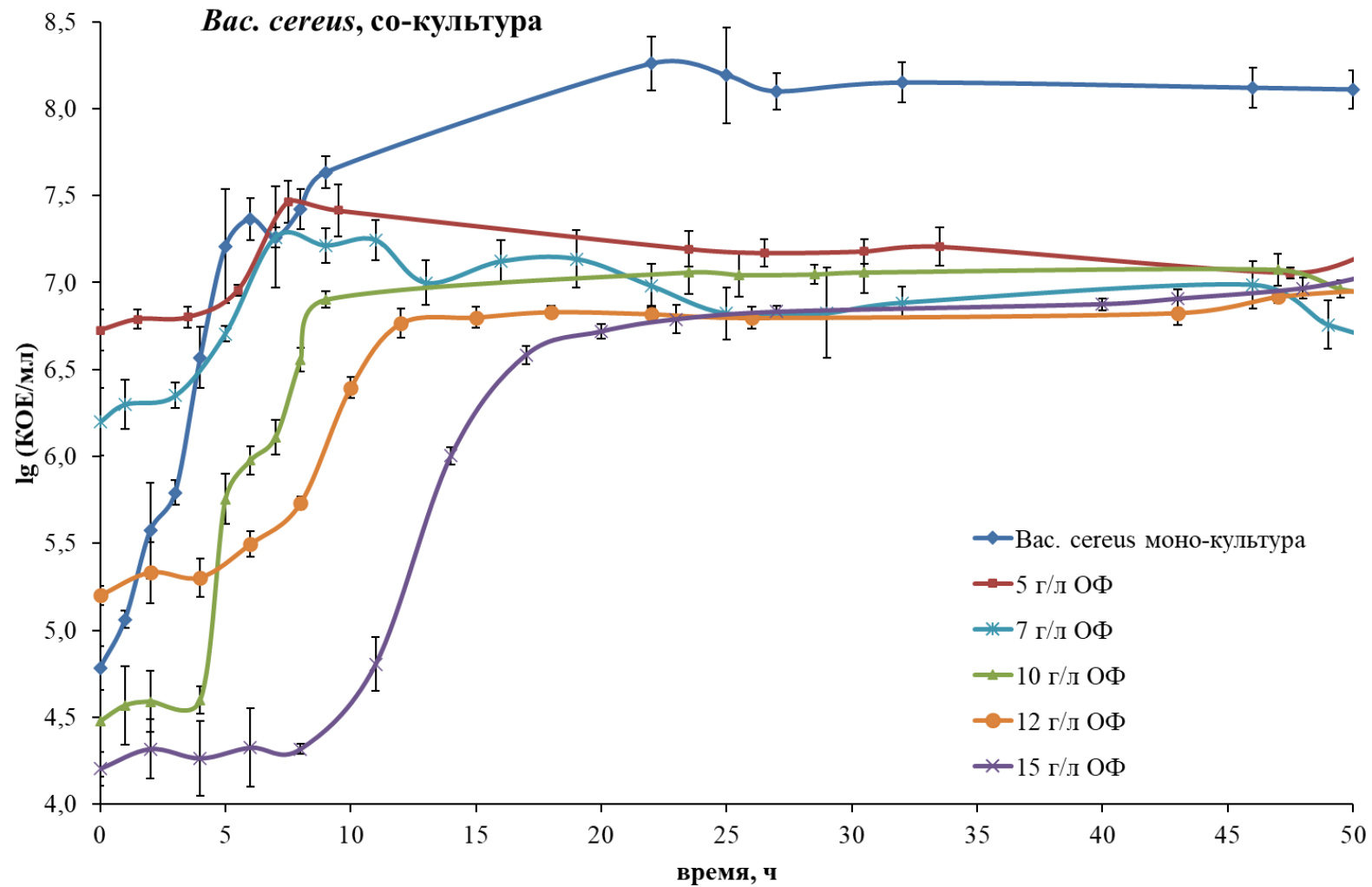


Рисунок 41 - Динамика численности *Bacillus cereus* при совместном культивировании с *Bifidobacterium adolescentis* на ОФ 5, 7, 10, 12, 15 г/л, при ферментации монокультуры *Bacillus cereus* на ОФ 10 г/л. Доверительные интервалы рассчитаны при $p = 0,05$

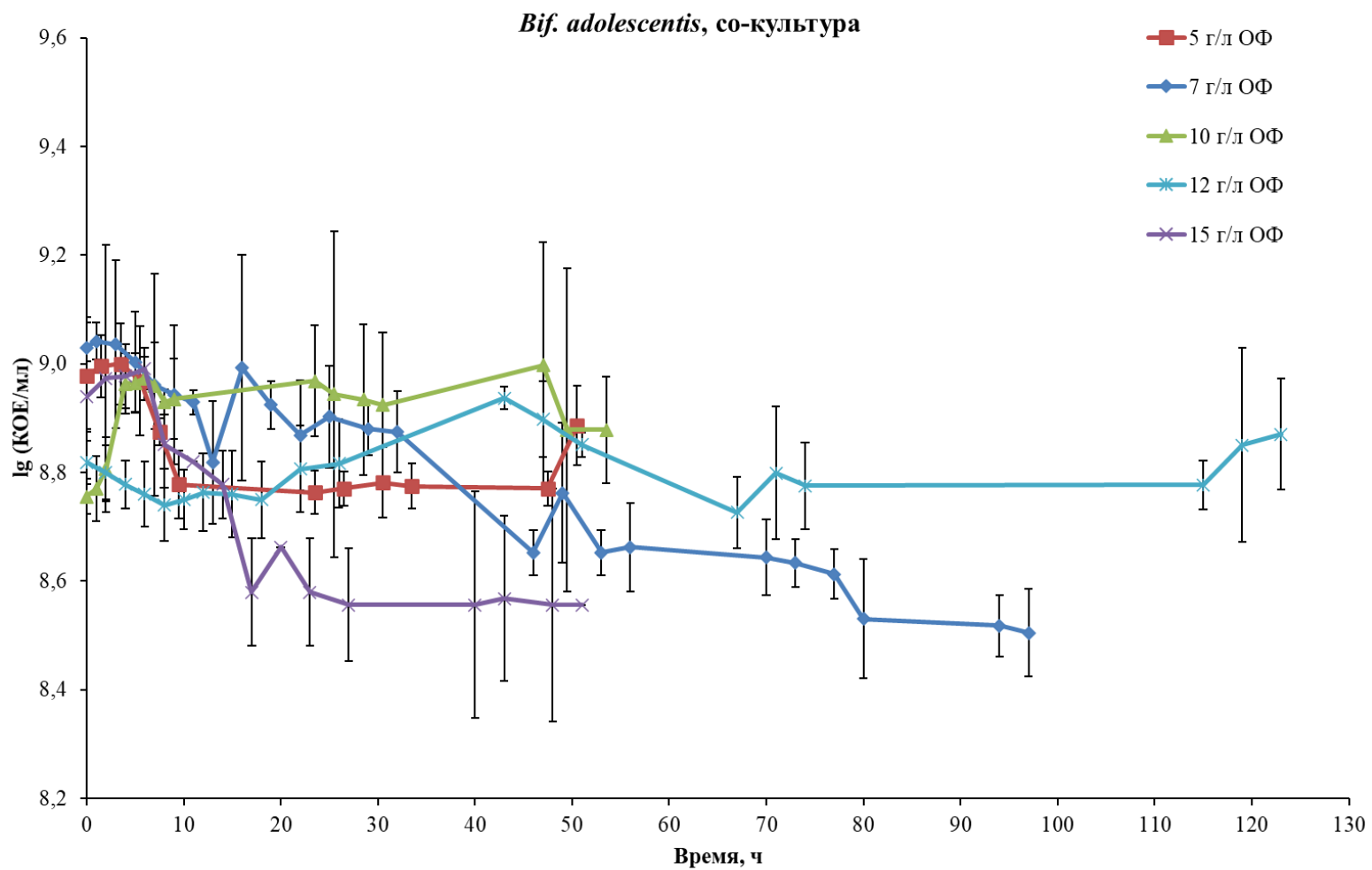


Рисунок 42 - Динамика численности *Bifidobacterium adolescentis* при совместном культивировании с *Bacillus cereus* на ОФ 5, 7, 10, 12, 15 г/л. Доверительные интервалы рассчитаны при $p = 0,05$.

При выращивании моно-культуры бацилл в среде с ОФ лаг-фазу не наблюдали. Начальная удельная скорость роста была определена как $1,07 \text{ ч}^{-1}$. Как показано выше, бациллы не метаболизируют фруктаны, поэтому энергетический метаболизм клетками *Bac. cereus*, предположительно, осуществляли за счет альтернативных субстратов, например, аминокислот [313]. Снижение скорости роста и наступление равновесного состояния в ходе культивирования связано, вероятно, с исчерпанием данных субстратов.

При совместном культивировании бацилл и бифидобактерий с варьированием концентраций ОФ равновесная численность *Bac. cereus* была ниже, чем в контрольных экспериментах с чистой культурой тест-штамма. Повышение концентрации пребиотика в среде вызывало задержку наступления динамического равновесия у бацилл, что, вероятно, связано с увеличением времени прорастания спор (например, при 15 г/л ОФ задержка составила 8 часов). Однако равновесная численность бацилл в со-культуре при различных концентрациях пребиотика не изменялась в пределах ошибки ($p < 0,05$). При сравнении удельных скоростей роста бацилл (таблица 16) в стадии активного роста установлено, что в результате увеличения концентрации ОФ до 10 г/л данная величина возрастает, а при больших концентрациях изменения незначительны. Таким образом, можно выделить три параметра роста бацилл, на которые влияло изменение концентрации пребиотика в среде: продолжительность лаг-фазы, удельная скорость роста и время достижения динамического равновесия.

Таблица 16 - Удельные скорости роста *Bacillus cereus* в стадии активного роста (μ_{BC}) и длительность лаг-фазы (t_λ) при совместном культивировании с *Bifidobacterium adolescentis* при варьировании концентрации ОФ

Концентрация ОФ, г/л	Равновесные концентрации кислот, г/л			$\mu_{BC}, \text{ч}^{-1}$	$t_\lambda, \text{ч}$
	молочная	уксусная	суммарная		
Моно-культура	-	-	-	0,78	0
5	1,23	3,44	4,67	0,382	3,5
7	1,03	6,60	7,63	0,525	3,0
10	3,20	8,02	11,22	0,661	4,0
12	3,22	8,28	11,50	0,594	4,0
15	3,54	7,49	11,03	0,615	8,0

Динамика численности *Bif. adolescentis* в со-культуре с *Bac. cereus* представлена на рисунке 42. Результаты приведены от момента заражения, т.е. от засева бацилл (культура бифидобактерий в состоянии динамического равновесия). После засева бацилл отмечали небольшое снижение численности бифидобактерий. При концентрации ОФ 10 г/л наблюдали аномальное увеличение численности бифидобактерий. При остальных концентрациях пребиотика количество бактерий практически не менялась, т.е. контаминант не выводит культуру пребиотика из равновесного состояния.

Сумма продуцируемых кислот в зависимости от концентрации ОФ не меняется (рисунки 43 и 44). Однако соотношение лактата и ацетата при варьировании концентрации ОФ отличалось. При меньших концентрациях субстрата (5, 7 г/л ОФ) наблюдается увеличение концентрации молочной кислоты в результате роста бацилл, а концентрация уксусной кислоты изменяется незначительно. Увеличение концентрации молочной кислоты может быть связано с переключением энергетического метаболизма бацилл в анаэробных условиях на белковые компоненты среды, когда они могут продуцировать лактат [314]. При концентрации ОФ 10, 12, 15 г/л уменьшается концентрация молочной кислоты и увеличивается продуцирование уксусной,

что, вероятно, связано с метаболизмом бифидобактерий (бифидный шунт). Увеличение концентрации молочной кислоты при культивировании на 12 г/л ОФ (после 26 часов) и на 15 г/л (после 20 часов), предположительно, объясняется потреблением бациллами ацетата, в ходе которого они способны продуцировать лактат (Приложение 3). Можно заключить, что концентрация ОФ влияет на ключевые параметры роста контаминанта через концентрацию образуемых бифидобактериями кислот.

При выращивании со-культуры в среде с 7 г/л ОФ определяли фракционный состав олигосахаридов с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза (таблица 17). Концентрация углеводов после контаминации системы бациллами указывает на попадание небольшого количества с инокулятом углеводного субстрата. Концентрация фруктозы после инокуляции бацилл увеличивалась с 8,98 до 10,32 мг/л, однако концентрация глюкозы, не детектируемой до засева, возросла до 7,65 мг/л. На девятом часу ферментации повышается концентрация фруктозы, что подтверждается соответствующим пиком на электрофореграмме. После 25 часов концентрация уменьшается до 11,08 мг/л, далее меняется в пределах ошибки метода.

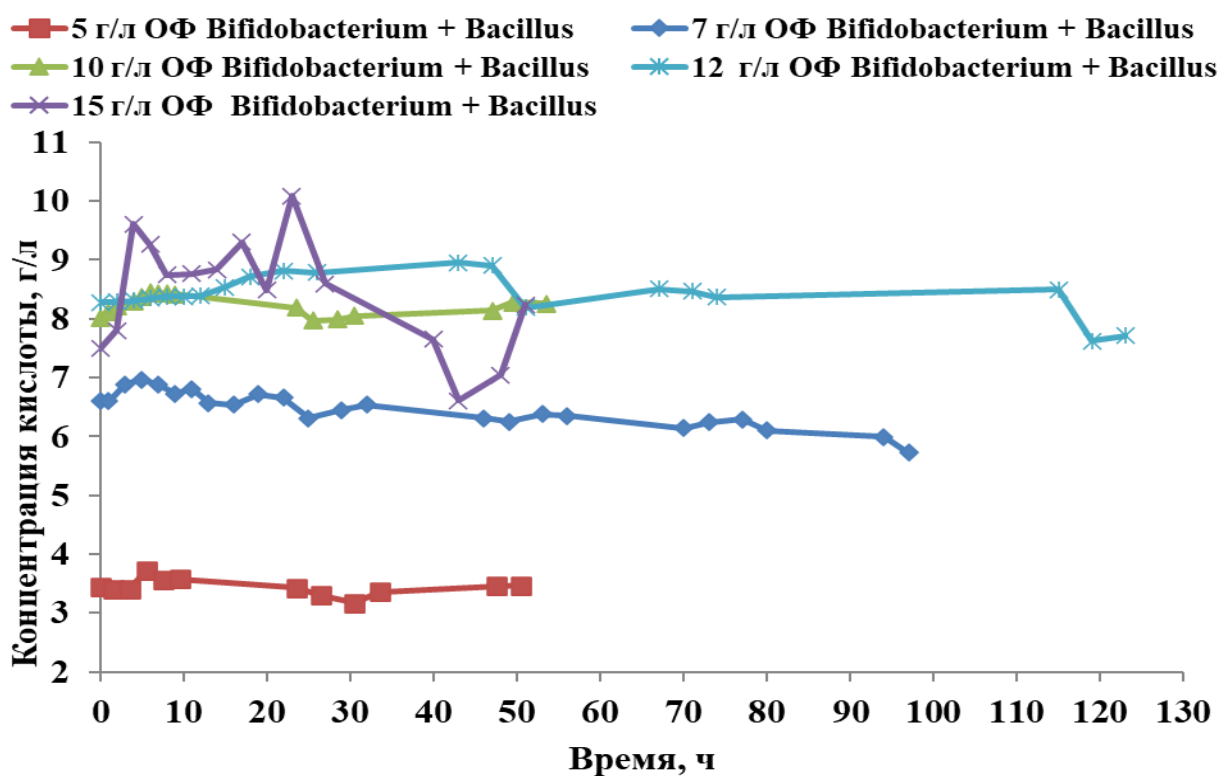


Рисунок 43 - Концентрация уксусной кислоты при непрерывном одностадийном со-
культивировании *Bifidobacterium adolescentis* и *Bacillus cereus* при концентрации ОФ 5, 7,
10, 12, 15 г/л

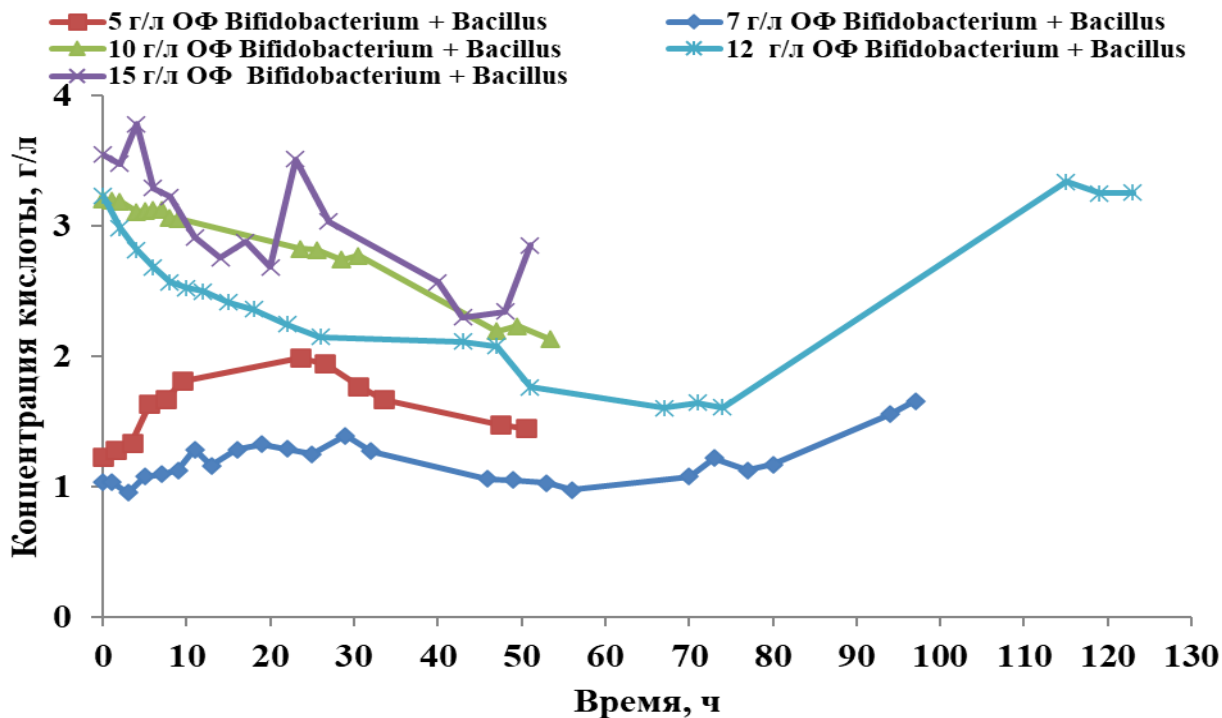


Рисунок 44 - Концентрация молочной кислоты при непрерывном одностадийном со-
культивировании *Bifidobacterium adolescentis* и *Bacillus cereus* при концентрации ОФ 5, 7,
10, 12, 15 г/л

Таблица 17 - Концентрация углеводов при смешанном культивировании *Bif. adolescentis* и *Bacillus cereus* при концентрации пребиотика 7 г/л

Время, час	Фруктоза, мг/л	Глюкоза, мг/л	Суммарное количество, мг/л	Наличие гомологов, (кол-во)
0	10,32	7,65	17,97	+ (3)
9	53,38	-	53,38	+ (2)
25	11,08	-	11,08	+ (3)
49	21	-	21	+ (3)
70	24,77	-	24,77	+ (3)
94	17,23	-	17,23	+ (3)

Примечание: Количество гомологов не учитывали в сумме углеводов.

При периодическом культивировании бифидобактерий и бацилл события, обуславливающие взаимодействие микроорганизмов, в частности, переход к стационарной фазе, зачастую происходят вследствие ингибирования кислотами. При этом лимитирование субстратом не наблюдали, о чем свидетельствует достаточно высокая концентрация углеводов в конце ферментации. При непрерывном культивировании с поддержанием рН и, как следствие, оптимальных для роста условий, наступления стационарного состояния обуславливается как лимитированием субстратом, так и накоплением метаболитов.

3.7.3. Исследование роста моно- и со-культур *Bif. adolescentis* и *Bacillus cereus* при непрерывном культивировании на глюкозе

По полученным данным было выявлено, что концентрация ОФ 10 г/л является предпочтительной для роста *Bif. adolescentis*. Для сравнения влияния пребиотического и непребиотического субстратов на рост пробиотика и тест-штамма были проведены одностадийные непрерывные ферментации монокультур и со-культуры *Bif. adolescentis* и *Bac. cereus* в среде с глюкозой (10 г/л). Результаты ферментации моно-культуры бифидобактерий в среде с

глюкозой на рисунке 45. Для сравнения представлена кривая изменения численности при росте моно-культуры бифидобактерий в среде с 10 г/л ОФ.

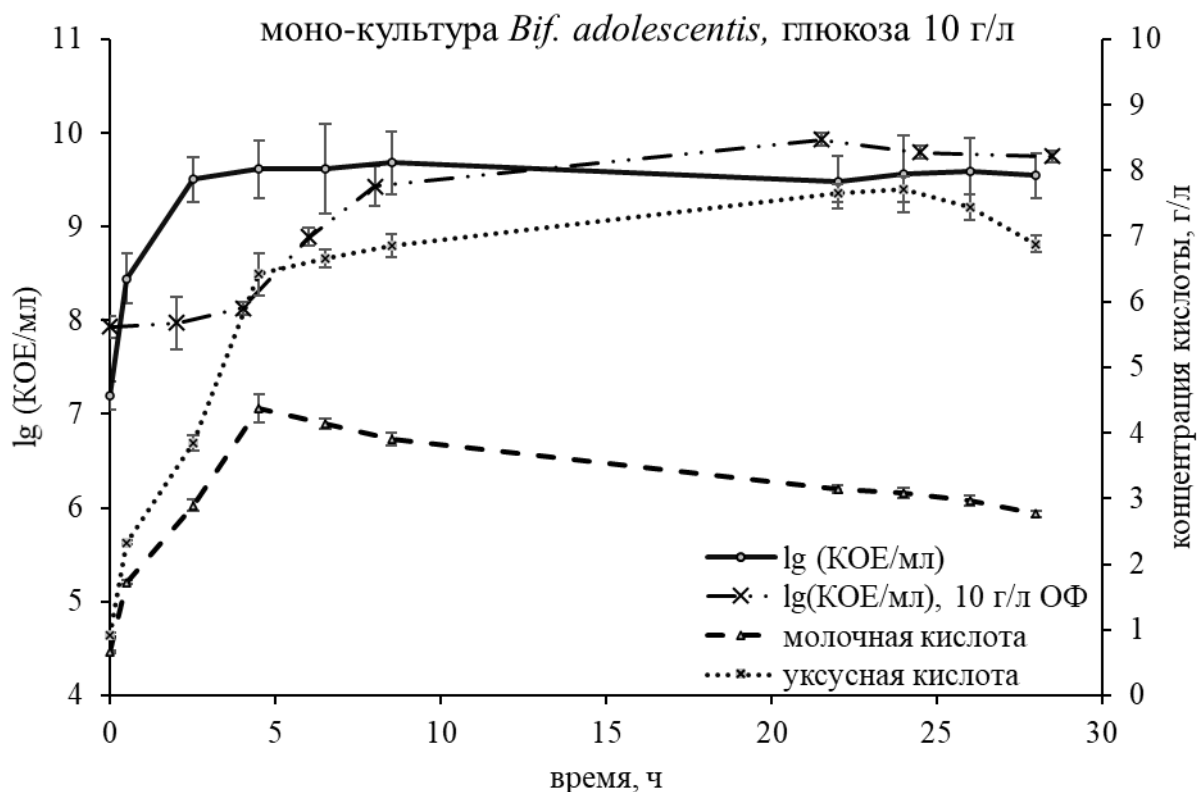


Рисунок 45 - Динамика численности *Bifidobacterium adolescentis* в среде с глюкозой и ОФ при концентрациях 10 г/л, концентрации продуктов метаболизма (молочной и уксусной кислот) при непрерывном одностадийном культивировании с глюкозой. Доверительные интервалы рассчитаны при $p = 0,05$

При анализе кривой роста *Bif. adolescentis* в среде с глюкозой наблюдали отсутствие лаг-фазы, а наступление динамического равновесия было установлено уже после 4,5 часов. Несмотря на то, что количество бифидобактерий после 5 часов практически не изменялось, наблюдали повышение концентрации уксусной кислоты и снижение концентрации молочной кислоты. Максимальное накопление молочной кислоты составляло 3,91 г/л, далее снижалось до 2,76 г/л. Концентрация уксусной кислоты увеличивалась с 6,42 г/л до 7,71 г/л. Таким образом, равновесие смещалось в сторону образования уксусной кислоты, и изменялось мольное соотношение молочной и уксусной кислот.

При сравнении кривых роста с пребиотическим и непребиотическим субстратами установлено различие в фазе задержки роста, связанное, видимо, с меньшей скоростью потребления ОФ. Для достижения состояния динамического равновесия в среде с ОФ культуре *Bif. adolescentis* требуется больше времени, хотя существенной разницы в равновесных значениях численности бифидобактерий и максимальных концентрациях метаболитов на различных углеводах не было.

Также были проведены ферментации со-культуры бифидобактерий и бацилл в аналогичных условиях в среде с глюкозой. После достижения динамического равновесия бифидобактериями засеивали трехсуточный инокулят бацилл. Динамика численности бифидобактерий, бацилл и концентрации метаболитов при со-культивировании в среде с глюкозой представлены на рисунке 46. Также представлена динамика численности моно-культуры тест-штамма при одностадийном непрерывном культивировании в среде с глюкозой (рисунок 46).

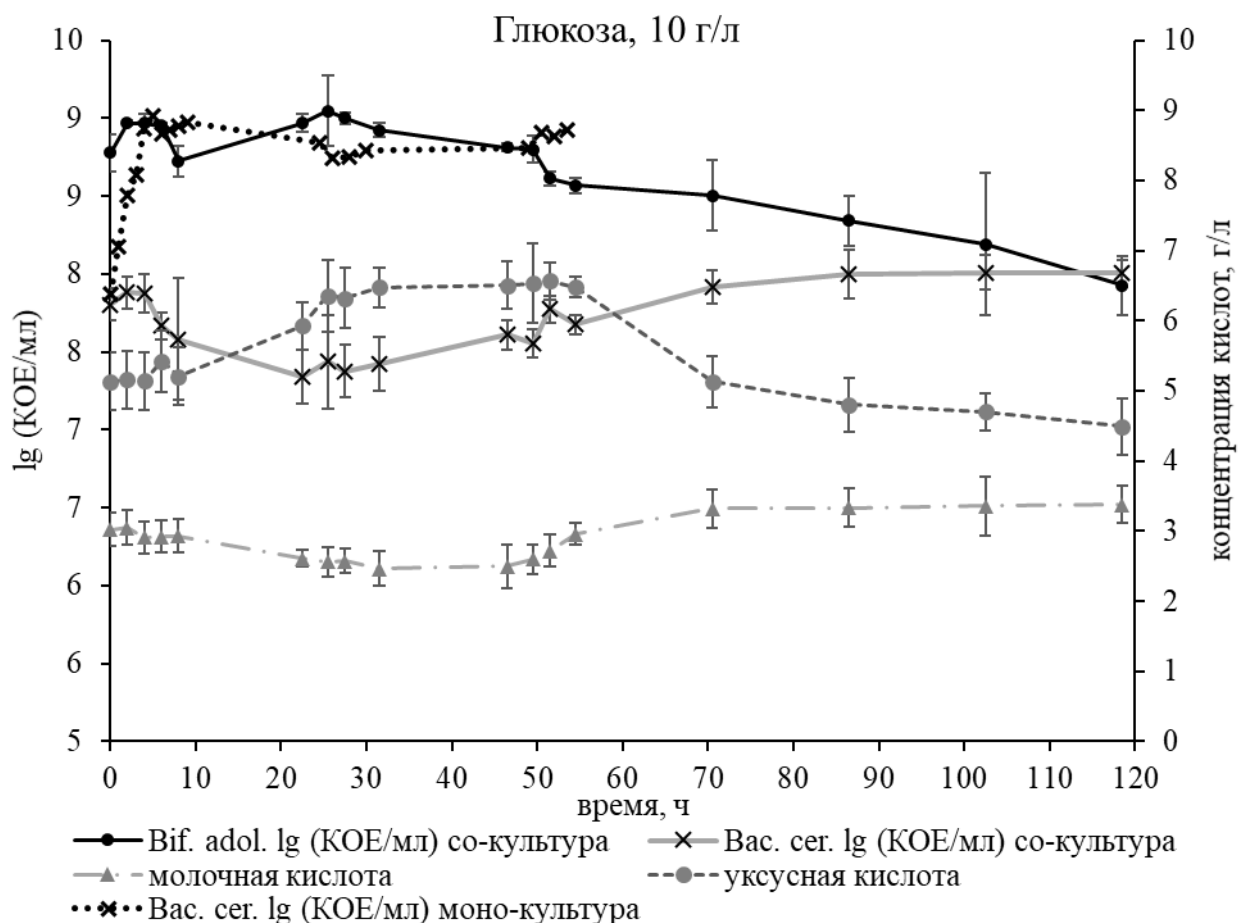


Рисунок 46 - Динамика численности *Bifidobacterium adolescentis* и *Bacillus cereus* и концентрация кислот при со-культивировании на глюкозе, а также динамика численности тест-штамма при одностадийной непрерывной ферментации моно-культуры в среде с глюкозой. Доверительные интервалы рассчитаны при $p = 0,05$

В среде с глюкозой после засева бацилл количество бифидобактерий плавно снижается, вероятно, по причине конкуренции за углеводный субстрат, в которой бациллы, обладая большей скоростью роста и, следовательно, потребления субстрата, получали преимущество. После 50 часов культивирования, происходит также снижение концентрации уксусной кислоты, в то время как до контаминации тест-штаммом наблюдали ее увеличение, что можно связать с анаэробным метаболизмом бацилл. Также с этого момента происходило увеличение концентрация молочной кислоты. Это может быть объяснено переключением метаболизма бацилл с потребления глюкозы на белковые компоненты среды в условиях истощения субстрата, при котором они могут продуцировать лактат [12].

При ферментации со-культуры на непробиотическом субстрате наблюдали небольшую задержку роста бацилл, также как и в среде с пребиотиком (рис. 41, 46). Начальная удельная скорость роста *Bac. cereus* в смешанной культуре с бифидобактериями на глюкозе составляла $0,74 \text{ ч}^{-1}$, на ОФ – $0,66 \text{ ч}^{-1}$. После 50 часов культивирования численность бацилл на глюкозе возрастает, а на ОФ уменьшается. Результаты эксперимента показывают, что в среде с глюкозой бациллы способны ослаблять рост бифидобактерий за счёт более интенсивного потребления углеводного субстрата и, вероятно, повышения продуцирования уксусной кислоты. Тем не менее, следует отметить, что максимальная численность тест-штамма в среде с непробиотическим субстратом была значительно ниже, чем с ОФ.

3.7.4. Математическое моделирование роста бифидобактерий в монокультуре и бацилл в со-культуре в условиях, моделирующих нисходящий отдел толстого кишечника человека

Математическая модель представляется полезным инструментом для прогнозирования ключевых событий бактериальной инфекции кишечника, которые в совокупности определяют продолжительность достижения патогеном максимальной численности и, как следствие, развития инфекции. Полученные экспериментальные данные были проанализированы с целью решения задач математического моделирования.

Для описания кинетики роста бифидобактерий при непрерывном культивировании использовали модель Моно-Иерусалимского, учитывая параметры исследуемой системы [293]. По результатам культивирования было определено, что образование агломератов бифидобактерий не связано явно с концентрацией субстрата и слабо влияет на образование обуславливающих антагонизм кислот. Однако, при малой скорости часть клеток погибает из-за давящих условий, что обуславливает зависимость численности бифидобактерий не только от удельной скорости роста, но и от скорости

гибели [291]. Также необходимо учесть, что часть клеток будет вымываться пропорционально скорости разбавления (D) ($D = Q/V_p$, Q – объемный расход среды, л/ч; V_p – рабочий объем биореактора). При длительном непрерывном культивировании и малой скорости поступления ПС, рост бифидобактерий будет лимитироваться, как минимум, углеводным субстратом, что можно описать с помощью уравнения Моно [298]. Также, при накоплении большого количества кислот в среде в ходе длительной ферментации, необходимо учесть ингибирование роста бифидобактерий собственными метаболитами, которые предложено включить в уравнение константы гибели. Таким образом, для описания динамики численности бифидобактерий в системе, моделирующей дистальный отдел толстого кишечника, была предложена следующая система уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX_{Bif}}{dt} = \mu_{Bif} \cdot L - D \cdot X_{Bif} \\ \frac{dL}{dt} = \mu_{Bif} \cdot L - D \cdot L - k_{d\ Bif} \cdot L \\ \frac{dM}{dt} = k_{d\ Bif} \cdot L - D \cdot M \\ -\frac{dS}{dt} = \mu \cdot Y_{S/X} \cdot L - D(S_{in} - S) \\ \frac{dLA}{dt} = Y_{L/S} \cdot \frac{dS}{dt} - D \cdot LA \\ \frac{dAA}{dt} = Y_{A/S} \cdot \frac{dS}{dt} - D \cdot AA \\ \mu_{Bif} = \mu_{Bif\ max} \cdot \frac{S}{S + K_{S\ Bif}} \cdot \frac{K_{i\ Bif\ L}}{K_{i\ Bif\ L} + LA} \cdot \frac{K_{i\ Bif\ A}}{K_{i\ Bif\ A} + AA} \\ k_{d\ Bif} = k_{d\ Bif\ max} \cdot \frac{LA}{K_{aLA} + LA} \cdot \frac{AA}{K_{aAA} + AA} \end{array} \right. \quad (23)$$

где L – численность живых клеток (КОЕ/мл); M – численность мертвых клеток (кл./мл); $X_{Bif} = L + M$ – суммарная численность клеток (кл./мл); μ_{Bif} – удельная скорость роста (ч^{-1}); D – коэффициент разбавления (ч^{-1}); $k_{d\ Bif}$ –

константа гибели бифидобактерий (ч^{-1}); $Y_{S/X}$ – экономический коэффициент потребления субстрата бифидобактериями (мг/КОЕ); $Y_{L/S}$ и $Y_{A/S}$ – экономические коэффициенты образования молочной и уксусной кислот к потребляемому субстрату (мг/мг); S , LA и AA – концентрации субстрата, молочной и уксусной кислоты в биореакторе, соответственно (мг/мл); $K_{S\text{Bif}}$ – константа насыщения (г/л); $K_{i\text{Bif}L}$ и $K_{i\text{Bif}A}$ – константы ингибирования роста бифидобактерий лактатом и ацетатом, соответственно (мг/мл); $k_{d\text{Bifmax}}$ – максимальное значение константы гибели (ч^{-1}); K_{aLA} и K_{aAA} – константы активации гибели (мг/мл).

Скорость разбавления является постоянной, экономические коэффициенты образования молочной и уксусной кислот могут быть вычислены по экспериментальным данным. Однако аналитическое решение системы уравнений (23) затруднительно, поэтому для поиска численного решения система была преобразована в интегральную форму итерационных уравнений:

$$\begin{aligned} \mu_{\text{Bif}_{t+1}} &= \mu_{\text{Bifmax}} \cdot \frac{S_t}{S_t + K_S} \cdot \frac{K_{i\text{Bif}L}}{K_{i\text{Bif}L} + LA_t} \cdot \frac{K_{i\text{Bif}A}}{K_{i\text{Bif}A} + AA_t} \\ k_{d\text{Bif}_{t+1}} &= k_{d\text{Bifmax}} \cdot \frac{LA_t}{K_{aLA} + LA_t} \cdot \frac{AA_t}{K_{aAA} + AA_t} \\ X_{\text{Bif}_{t+1}} &= L_t \cdot \exp(\mu_{\text{Bif}_{t+1}} \cdot \Delta t) - D \cdot X_{\text{Bif}_t} \\ L_{t+1} &= L_t \cdot \exp(\mu_{\text{Bif}_{t+1}} \cdot \Delta t) - D \cdot L_t - k_{d\text{Bif}_{t+1}} \cdot L_t, \quad (24) \\ M_{t+1} &= k_{d\text{Bif}_{t+1}} \cdot L_t - D \cdot M_t \\ S_{t+1} &= S_t + \left[D \cdot (S_{in} - S_t) - \mu_{\text{Bif}_{t+1}} \cdot Y_{S/X} \cdot L_{t+1} \right] \cdot \Delta t \\ LA_{t+1} &= Y_{L/S} \cdot (S_{in} - S_{t+1}) - D \cdot LA_t \cdot \Delta t + LA_0 \\ AA_{t+1} &= Y_{A/S} \cdot (S_{in} - S_{t+1}) - D \cdot AA_t \cdot \Delta t + AA_0 \end{aligned}$$

где Δt – шаг по времени (был принят 0,1 ч), а индексы переменных соответствуют моменту времени на заданном шаге итерации t , либо следующем шаге $t + 1$, отличном на Δt , либо в начальный момент времени (0 ч).

Для нахождения констант уравнения использовали метод пчелиного роя [284, 285] (п. 2.11).

Рассчитанные параметры модели для моно-культуры бифидобактерий при одностадийном непрерывном культивировании представлены в таблице 18. Прогноз равновесного количества бифидобактерий в микробном сообществе оказался приемлемо точным (ошибка не превышала 2,58 % для всех концентраций ОФ) (таблица 19), поскольку это значение было выбрано в качестве критерия для нахождения оптимальных значений коэффициентов системы уравнений (24). С другой стороны, оценка стационарных концентраций кислот была менее точна (от 9,8 до 68,9 %). Причем, точность прогноза при средних концентрациях была выше, чем при максимальной и, в особенности, при минимальной.

Таблица 18 - Определенные параметры модели (24) для описания роста моно-культуры *Bif. adolescentis* при одностадийной непрерывной ферментации

Обозначение параметра	Единицы измерения	Значение
Моно-культура бифидобактерий		
$\mu_{Bif\ max}$	ч ⁻¹	1.003
$K_{S\ Bif}$	г/л	0.727
$K_{i\ Bif\ L}$	г/л	5.46
$K_{i\ Bif\ A}$	г/л	5.33
$k_{d\ Bif\ max}$	ч ⁻¹	0.117
K_{aLA}	г/л	2.12
K_{aAA}	г/л	2.05
$Y_{S/X}$	г/л	$1.40 \cdot 10^{-6}$
$Y_{L/S}$	г/л	0.313
$Y_{A/S}$	г/л	0.631

Таблица 19 - Значения относительных ошибок (%) для модели моно-культуры бифидобактерий (24) при одностадийной непрерывной ферментации

Концентрация поступающей ОФ	Моно-культура бифидобактерий		
	Количество живых клеток	Концентрация молочной кислоты	Концентрация уксусной кислоты
2	1.93	27.2	19.3
2	2.17	68.9	10.3
5	2.03	24.4	24.8
5	2.11	33.1	25.3
7	2.10	27.5	10.5
10	1.14	9.8	18.3
10	2.58	7.39	5.66
12	2.12	13.7	11.9
15	2.39	29.9	18.9
15	1.00	14.2	27.5

С учетом подавляющих условий, возникающих при малых скоростях протока, события в моно-культуре бифидобактерий можно рассматривать как установление динамического равновесия между ростом и гибелью клеток, с постепенным снижением удельной скорости роста и повышением константы гибели. Эти параметры были включены в ранее описанные модели [315], однако нами было предложено рассматривать их не как независимые переменные, а как функции замедляющих рост факторов (концентрации лимитирующего субстрата и метаболитов). Значение k_d , полученное Pinto et al., составляет 0,0139 для бифидобактерий в синтетическом кишечном сообществе и соответствует концентрации молочной кислоты около 0,8 г/л и уксусной кислоты около 1,5 г/л. В то же время кривая роста имеет экстремум до достижения динамического равновесия, что можно отразить формулой:

$$\mu_{Bif} - k_{d\ Bif} - D = 0, \quad (25)$$

С другой стороны, осциллятор, предсказанный рядом моделей [316], не получил экспериментального подтверждения ни для моно-культуры, ни для со-культуры в условиях, имитирующих дистальный отдел кишечника.

Предполагалось, что модель позволит точно прогнозировать стационарные концентрации молочной и уксусной кислот, так как они оказывают решающее влияние на исход микробной инфекции. Однако

точность прогноза для этих функций была ниже, чем при определении количества бифидобактерий. В дальнейшем возможно расширение модели роста моно-культуры бифидобактерий и определение оптимальных значений параметров по концентрациям кислот в качестве критериев.

Экспериментальные (X_{obs}) и предсказанные с помощью модели (X_{pred}) значения численности бифидобактерий, рассчитанные константы удельных скоростей роста (μ) и гибели (k_d) в моно-культуре при одностадийной непрерывной ферментации в условиях, имитирующих нисходящий отдел толстого кишечника человека, представлены на рисунках 47, 48.

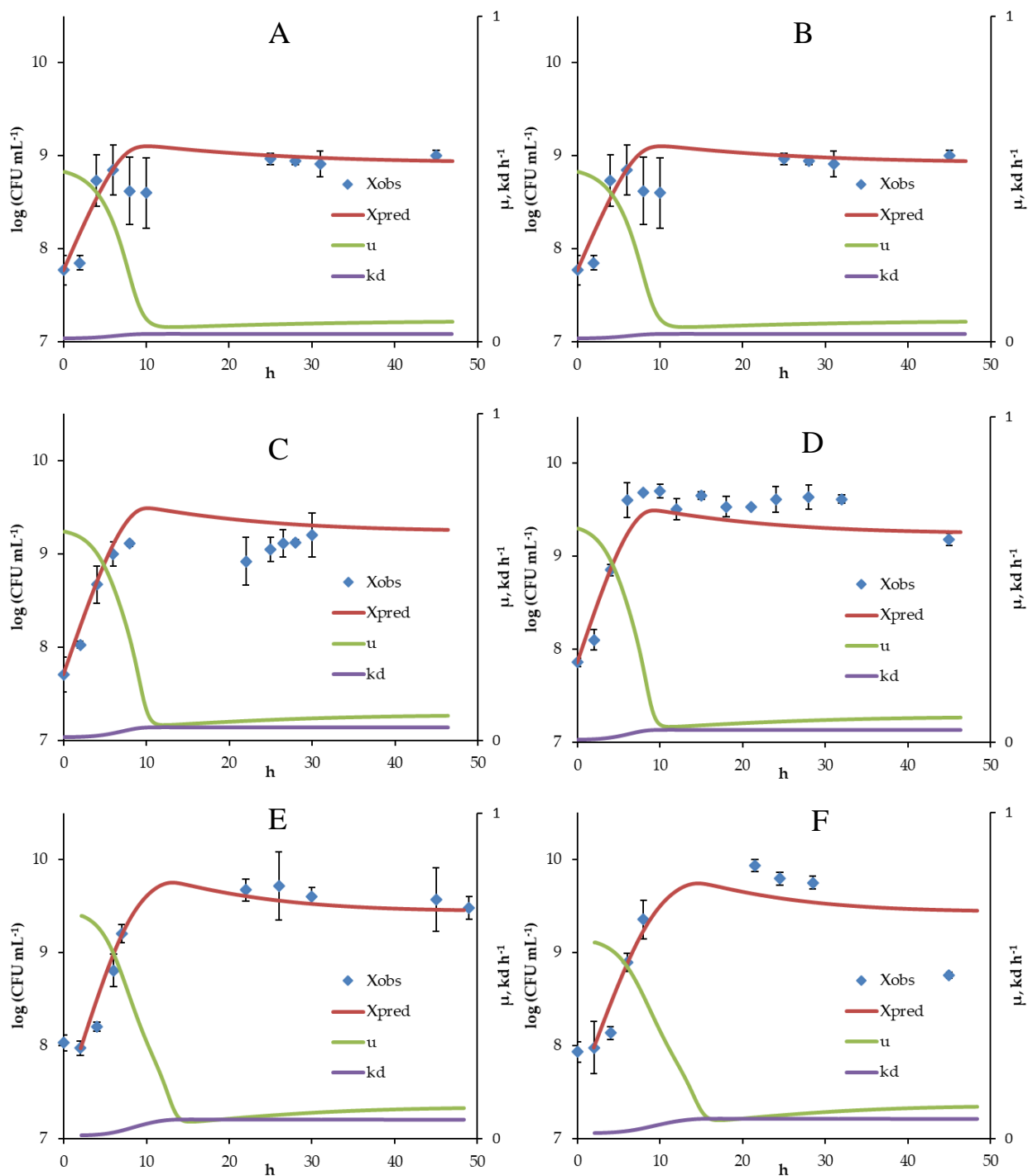


Рисунок 47 - Экспериментальные (X_{obs}) и предсказанные с помощью модели (X_{pred}) значения численности бифидобактерий, рассчитанные константы удельных скоростей роста (μ) и гибели (kd) в моно-культуре в условиях, имитирующих дистальный толстый кишечник, при концентрациях ОФ 2 г/л (А, В); 5 г/л (С, D); 10 г/л (Е, F)

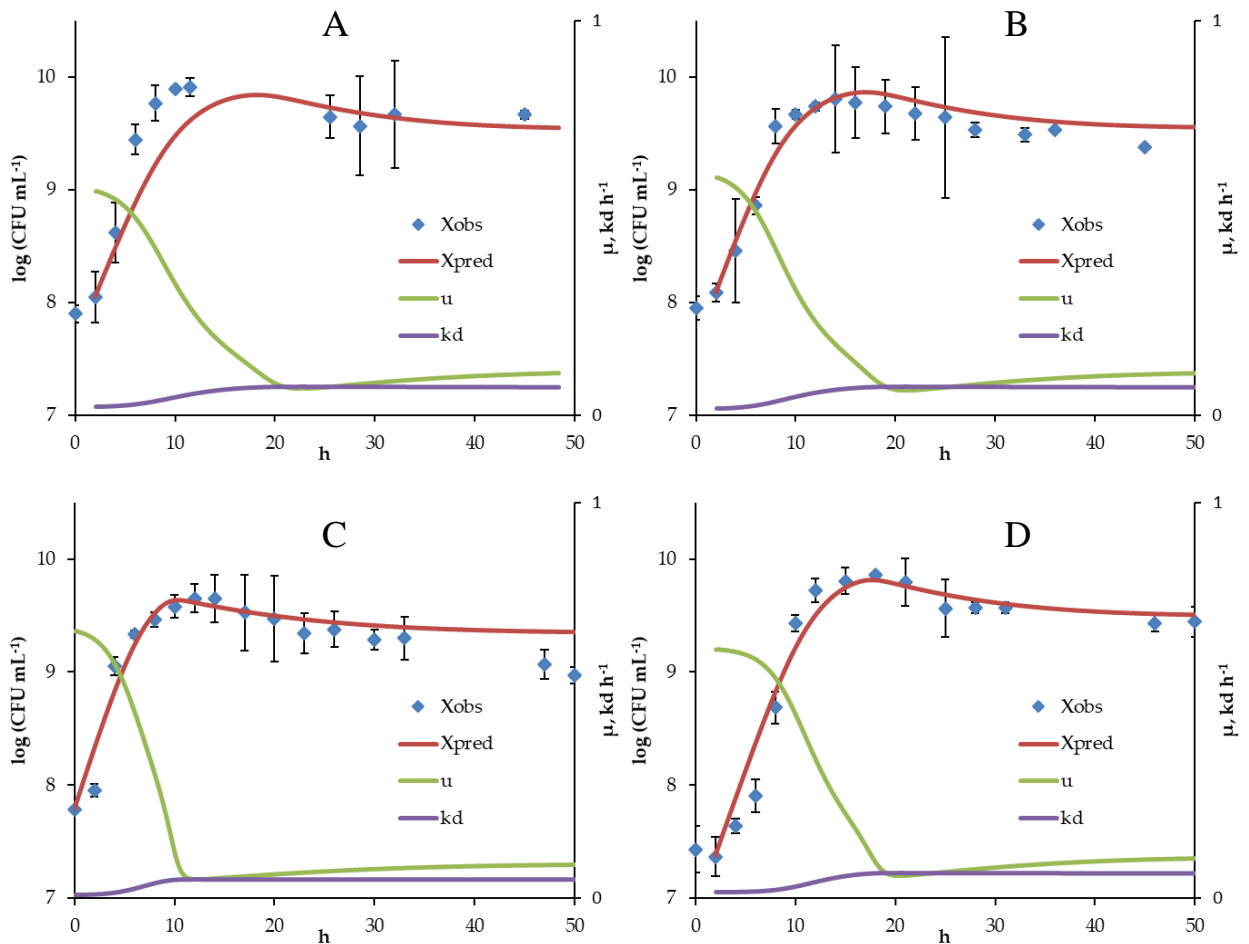


Рисунок 48 - Экспериментальные (X_{obs}) и предсказанные с помощью модели (X_{pred}) значения численности бифидобактерий, рассчитанные константы удельных скоростей роста (μ) и гибели (k_d) в моно-культуре в условиях, имитирующих дистальный толстый кишечник, при концентрациях ОФ 15 г/л (А, В); 7 г/л (С); и 12 г/л (D)

С учетом характера кривых роста бацилл предложена кинетическая модель, описывающая только динамику числа живых клеток (X_{BC}):

$$\frac{dX_{BC}}{dt} = \mu_{BC} X_{BC} - D X_{BC}, \quad (26)$$

где μ_{BC} – удельная скорость роста бацилл ($ч^{-1}$).

Как и в статической модели, предполагали, что ингибирующее действие на рост бацилл вызвано образованием бифидобактериями метаболитов, снижающих удельную скорость роста. В отличие от периодического, при непрерывном культивировании с низкими скоростями разбавления нельзя исключить лимитирование субстратом, как и в случае бифидобактерий. Отсутствие продуцирования β -фруктофуранозидазы штаммом *Bacillus cereus* ATCC 9634 было доказано экспериментально ($12,8 \pm 1,0$ ед./мл), что

исключает возможность конкуренции за углеводный субстрат при совместном культивировании с бифидобактериями. Известно, что представители вида *Bacillus cereus* способны дезаминировать ряда аминокислот (гистидин, аспарагин, глутамин, пролин и др.) [317], которые, как можно предположить, использовались в качестве энергетических субстратов. Действие метаболитов на продолжительность фазы задержки роста можно описать с помощью фактора (коэффициента), понижающего удельную скорость роста до значения, близкого к нулевому в начальный период [294, 318]. Поэтому в формулу для расчета удельной скорости роста введен коэффициент, учитывающий продолжительность фазы задержки роста – $\alpha(t)$:

$$\mu_{Bc} = \mu_{Bc \max} \cdot \alpha(t) \cdot \frac{K_{iBcL}}{K_{iBcL} + LA} \cdot \frac{K_{iBcA}}{K_{iBcA} + AA} \cdot \frac{AmA}{K_{S Bc Am} + AmA}, \quad (27)$$

где $\mu_{Bc \max}$ – максимальная скорость роста бацилл, $\alpha(t)$ – коэффициент, учитывающий продолжительность лаг-фазы, K_{iBcL} , K_{iBcA} – константа ингибирования бацилл молочной и уксусной кислотами, соответственно (г/л), $K_{S Bc Am}$ – константа ингибирования уксусной кислотой (г/л), $K_{S Bc Am}$ – константа уравнения Моно для аминокислоты, лимитирующей рост бацилл (г/л), AmA концентрация аминокислоты, ограничивающей рост бацилл (г/л).

Для расчета коэффициента, учитывающего продолжительность фазы задержки роста, предлагаем использовать сигмоидальную эмпирическую функцию, аналогичную используемым для описания задержки сигнала в автоматических системах управления:

$$\alpha(t) = \frac{A \cdot e^{B \cdot (t - t_\lambda)}}{1 + A [e^{B \cdot (t - t_\lambda)} - 1]}, \quad (28)$$

где A и B — эмпирические константы, определяющие крутизну сигмоиды.; t_λ продолжительность лаг-фазы.

Принимая во внимание представленные выше особенности роста бацилл в смешанной культуре, можно предположить, что продолжительность лаг-фазы зависит от концентрации молочной и уксусной кислот в момент контаминации (таблица 16). Однако определить явный характер этой

зависимости сложно, а литературные данные по этому вопросу крайне скудны. Поэтому было предложено следующее полиномиальное квадратное уравнение:

$$t_{\lambda} = C_L \cdot LA + C_A \cdot AA + C_{LL} \cdot LA^2 + C_{AA} \cdot AA^2 + C_{AL} \cdot LA \cdot AA, \quad (29)$$

где C_k – коэффициенты уравнения регрессии, для расчета которого использовали метод наименьших квадратов и экспериментальные данные. Коэффициенты были определены с помощью МНК (п. 2.10) на основе экспериментальных данных.

Для математического описания роста бацилл в смешанной культуре в первую очередь были определены коэффициенты уравнения квадратной полиномиальной регрессии (29) для расчета времени задержки роста по ранее определенным экспериментально параметрам (п. 3.7.2. таблица 16):

$$t_{\lambda} = -3,46 \cdot LA + 2,77 \cdot AA + 2,20 \cdot LA^2 - 0,23 \cdot AA^2 - 0,56 \cdot LA \cdot AA, \quad (30)$$

Расчетное значение критерия Фишера ($F = 0,1 < 6,61$) меньше табличного при $p = 0,05$.

Другие параметры модели (26)–(28) были определены методом роя пчел (таблица 20), что позволило получить прогностическую модель для описания роста бацилл в со-культуре с приемлемой точностью (таблица 21). Относительная ошибка не превышала 2,78 %. На рисунке 49 представлены расчетные данные по модели для всех экспериментов с со-культурой.

Таблица 20 - Определенные параметры модели (27) для описания роста *Bac. cereus* при одностадийном непрерывном со-культивировании с бифидобактериями

Моно-культура бацилл		
$\mu_{Bc\ max}$	ч ⁻¹	1.214
$K_{i\ Bc\ L}$	г/л	8.85
$K_{i\ Bc\ A}$	г/л	10.15
$K_{S\ Bc\ Am}$	г/л	0.18
AmA	г/л	0.71
A	безразмерный	0.55
B	безразмерный	2.23

Таблица 21 - Значения относительных ошибок (%) для модели моно-культуры бифидобактерий и модели бацилл в со-культуре с бифидобактериями

Концентрация поступающей ОФ	Относительная ошибка подсчета количества бацилл в со-культуре, %
5	0,75
7	0,93
10	2,78
12	0,75
15	0,74

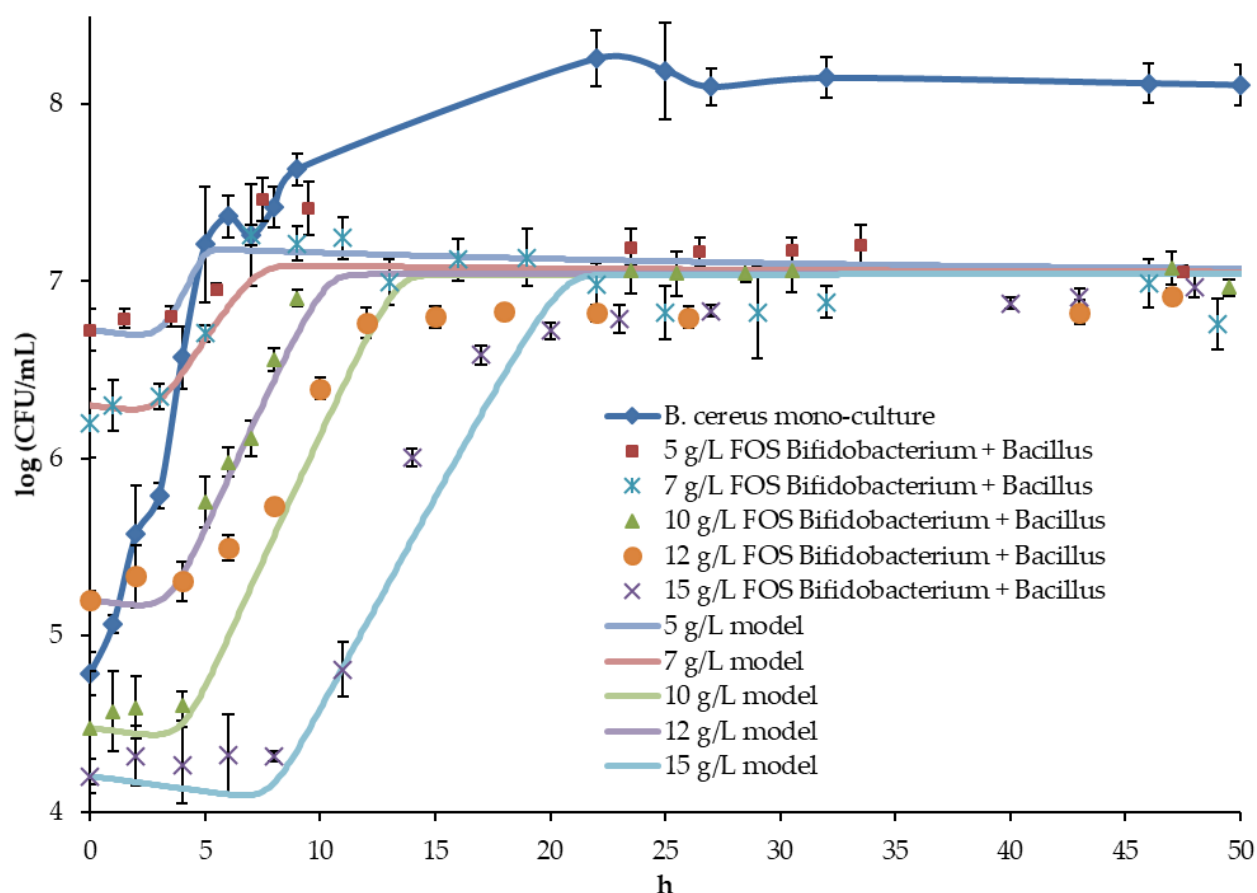


Рисунок 49 - Количество клеток *Bacillus cereus* в моно- и со-культуре, полученное экспериментально, а также кривые роста бацилл в со-культуре, в условиях, имитирующих дистальный отдел толстого кишечника, рассчитанные с помощью модели

Поправочный коэффициент для моделирования лаг-фазы был ранее введен Varanyi and Roberts [294]. Они предложили рассчитывать его как функцию лимитирующего субстрата, что не соотносится с целями нашего исследования. Поэтому в данной работе использовали сигмовидную функцию

с точкой перегиба, определяемой продолжительностью лаг-фазы в зависимости от концентрации молочной и уксусной кислот.

Таким образом, предложенная модель помогает спрогнозировать два ключевых события бактериальной кишечной инфекции, которые в совокупности будут определять продолжительность достижения возбудителем максимального количества в толстом кишечнике и, как следствие, его вирулентность. Можно предположить, что чем длиннее этот временной интервал, тем выше шансы микробиоты и организма хозяина подавить возбудителя и предотвратить развитие инфекции.

В результате исследования установлены основные закономерности развития бифидобактерий и исход бактериальной инфекции в условиях, моделирующих дистальный отдел кишечника при различных дозах дополнительно вводимого пребиотического вещества. Концентрация углеводов определяет продукцию кислот-метаболитов, но лимитирование роста бифидобактерий наблюдали только при минимальных ее значениях. Разработаны математические модели, основанные на кинетических закономерностях, позволяющие прогнозировать поведение отдельных представителей кишечного микробного сообщества. Хотя рассматриваемые модели не могут дать исчерпывающих ответов относительно исхода кишечной инфекции *in vivo*, ряд описанных закономерностей важен для понимания ее ключевых событий.

3.8. Исследование воздействия *Bac. cereus* на фекальную микробиоту в непрерывной трехстадийной функциональной модели кишечника в присутствии синбиотика или пребиотика

Для исследования особенностей взаимодействия микробного пищевого контаминанта, пробиотических бактерий и пребиотических веществ в условиях, максимально приближенных к условиям толстого кишечника человека, эксперименты проводили в трёхстадийной функциональной модели TSC (рисунок 17, Приложение 2), описанной в пункте 2.6.4.

Воздействие пробиотика, пребиотика и тест-штамма на микробиоту кишечника представляет огромный интерес. Необходимо отметить, что взаимодействие микроорганизмов в данном случае довольно сложно и может быть оценено по таким признакам как изменение профиля метаболитов (в особенности, органических кислот), изменение численности различных групп кишечных микроорганизмов, изменение численности пробиотика и тест-штамма, потребление питательных веществ. Эксперименты проводили с целью установления закономерностей, выявленных ранее (в условиях моно- и смешанных периодических и непрерывных культур *Bac. cereus* и *Bif. adolescentis*) в условиях, максимально приближенных к реальному толстому кишечнику человека.

Были проведены тестовый (I) и контрольный (II) эксперименты. В первом случае оценивали воздействие на систему тест-штамма после введения пробиотика на фоне постоянного поступления пребиотика с питательной средой. Предполагали, что данная схема отражает контаминацию кишечника человека, после профилактического приема синбиотика. Во втором случае предварительное заселение бифидобактерий в фекальную культуру не проводили, а вводили только споры бацилл. При этом в обоих вариантах пребиотик (ОФ) подавали в систему непрерывно с подпиткой в концентрации 8 г/л, что соответствовало суточной дозе потребления.

3.8.1 Исследование влияния на микробиоту *Bac. cereus* на фоне предварительного внесением в систему *Bif. adolescentis*

Изучение влияния бацилл-контаминантов, бифидобактерий и ОФ на микробное сообщество кишечника проводили с помощью функциональной трехстадийной *in vitro* модели кишечника TSC.

Подготовка, инокулирование и запуск системы TSC подробно описан в п. 2.6.4. Эксперимент I проводили в течение 28 суток. О наступлении стационарного состояния судили по концентрациям кислот, которые должны были оставаться условно постоянными в течении более трех дней. После достижения равновесного состояния (на 14 сутки) в течение 5 дней в первый ферментер вносили культуру бифидобактерий штамма *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 в дозе 10^9 КОЕ, что соответствует суточной норме потребления. Затем на 22 сутки контаминировали R1 трехсуточной культурой *Bacillus cereus* ATCC 9634 (преимущественно в споровой форме).

Для изучения воздействия периодически (1 раз в 1-2 дня) для каждого из реакторов проводили отбор проб. Определяли содержание молочной, уксусной, пропионовой и масляной кислот (методом ВЭЖХ), общей численности бактерий, численности бифидобактерий и *Bacillus cereus*, а также *Bacteroidetes*, *Clostridial* кластер IV, *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacilli*, типичных представителей кишечной микробиоты (методом qПЦР). Результаты ВЭЖХ и qПЦР представлены в виде диаграмм отдельно для каждого ферментера (рисунки 50-52). Профиль гомологов ОФ и их потребление микроорганизмами определяли методом капиллярного электрофореза выборочно в реперных точках эксперимента.

По полученным данным можно увидеть, что в каждом ферментере общая численность бактерий колебалась в пределах 10^{10} - 10^{11} lg (клеток/мл) в течение всего времени ферментации. При этом концентрация ацетата всегда была выше, чем концентрация остальных кислот.

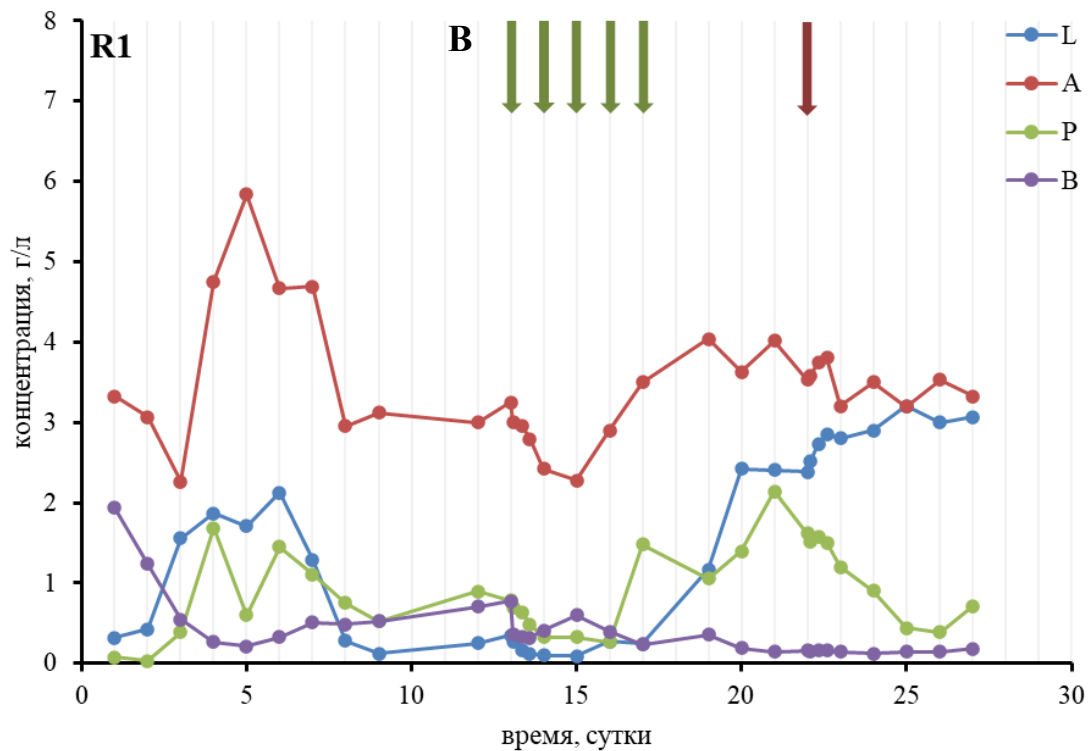
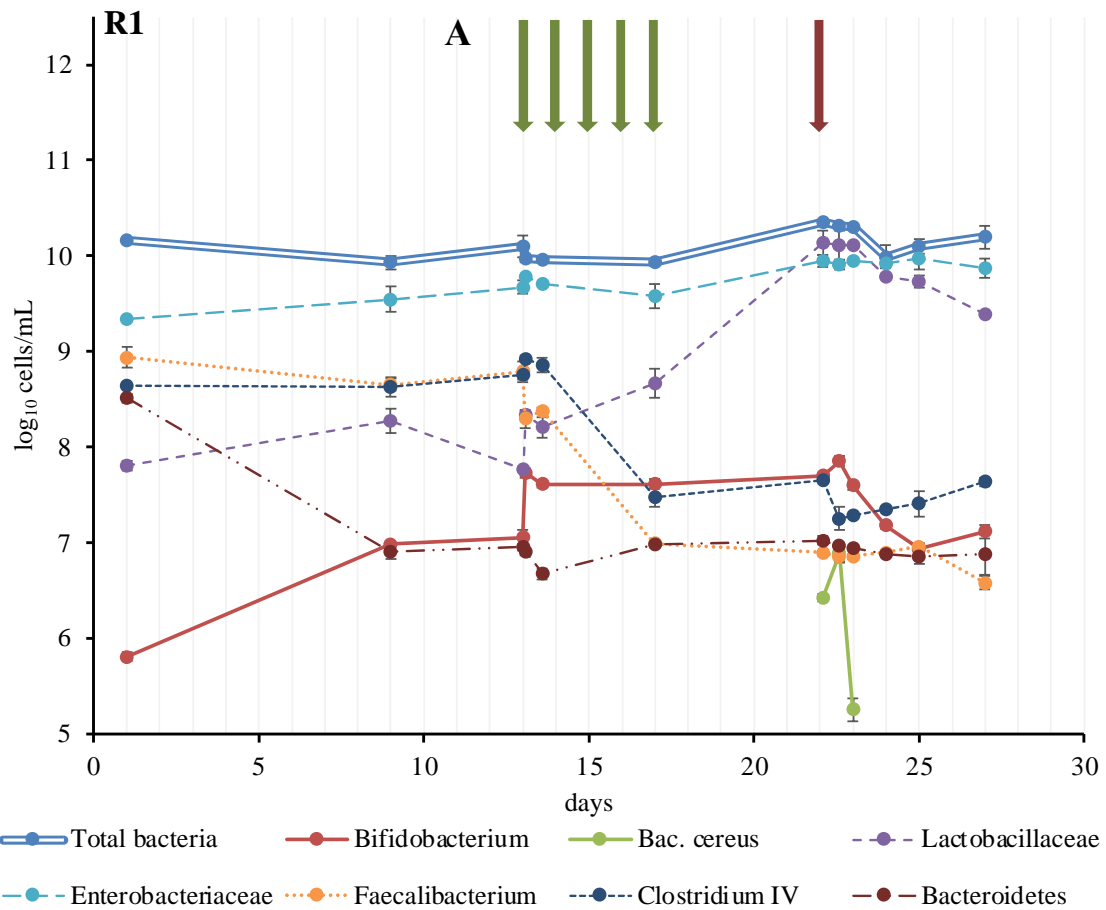


Рисунок 50 - Эксперимент I. Диаграммы численности бактерий (А) и продуцирования кислот в биореакторе R1 (В): L - молочной, А - уксусной, Р - пропионовой, В – масляной кислот, соответственно. Зеленые стрелки – внесение пробиотика, красная – внесение бацилл

В первом реакторе (рис. 50) до момента внесения пробиотика численности отдельных групп бактерий практически не изменялись, кроме плавного увеличения количества бифидобактерий, пришедших из фекальной культуры, и снижения численности бактериоидов. При снижении численности бактериоидов одновременно происходило снижение концентрации масляной кислоты. Известно, что *Bacteroidetes* являются одними из основных продуцентов бутирата [319].

При внесении *Bifidobacterium adolescentis* в R1 происходило снижение численности *Clostridium* кластера IV и *Faecalibacterium prausnitzii*, поскольку они также являются первичными анаэробами, разлагающими крупные молекулы, и могут конкурировать с бифидобактериями за субстраты. Соответственно, развитие бифидобактерий повышает долю потребляемых поли- и олигосахаридов, а другие первичные деструкторы проигрывают в конкуренции за субстрат. При этом следует отметить, что с ростом численности бифидобактерий также наблюдали увеличение количества лактобацилл. По профилю кислот (рис. 50 В) можно отметить, что после внесения пробиотика концентрация молочной, уксусной и пропионовой кислот повышается, поскольку *Bifidobacterium adolescentis*, обладают высокой β -фруктафуранозидазной активностью (β -фруктофуранозидазная активность штамма составила $128,3 \pm 2,3$ ед./мл), и быстро расщепляют ОФ, поступающую с питательной средой.

В результате контаминации R1 спорами *Bacillus cereus* происходило незначительное снижение численности всех групп бактерий. В первом ферментере бациллы элиминировались из системы на следующие сутки, что можно связать с низким значением рН в ферментере, равным 5,5.

В отличие от R1, в R2 (рис. 51) и R3 (рис. 52) продуцирование лактата не наблюдали, что говорит о его метаболизме микробиоценозом. Также происходило практически синхронное изменение концентраций пропионата и бутирата в этих ферментерах.

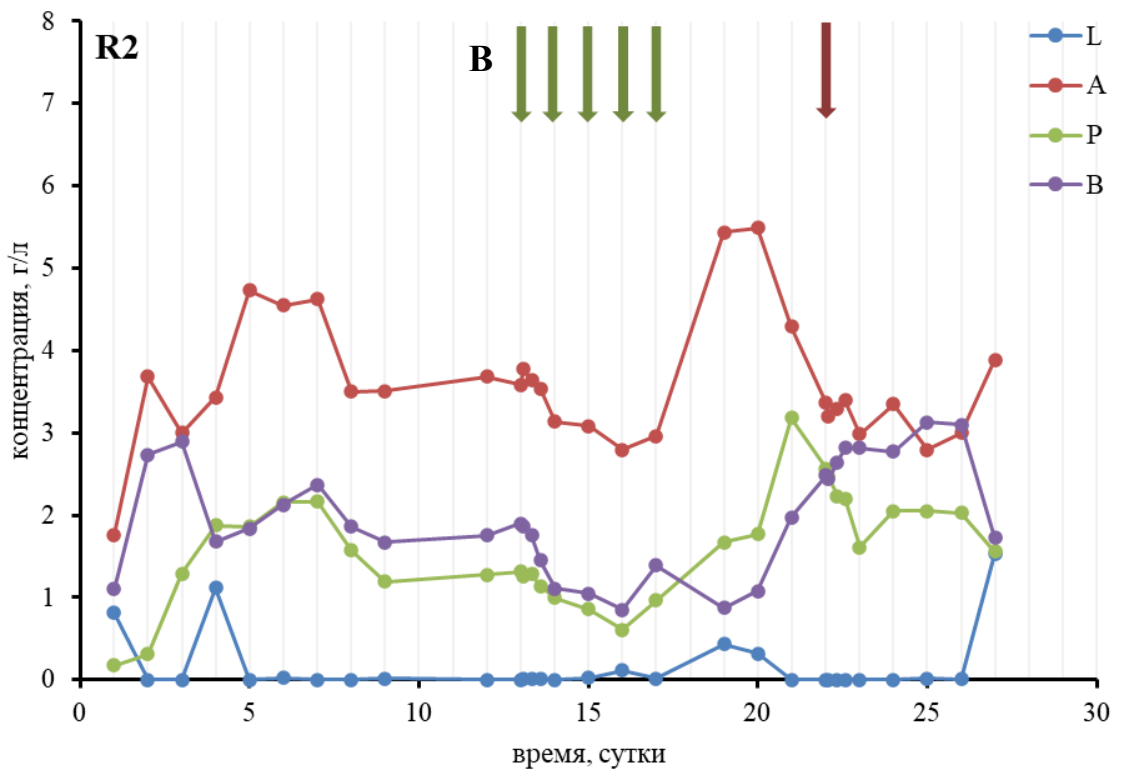
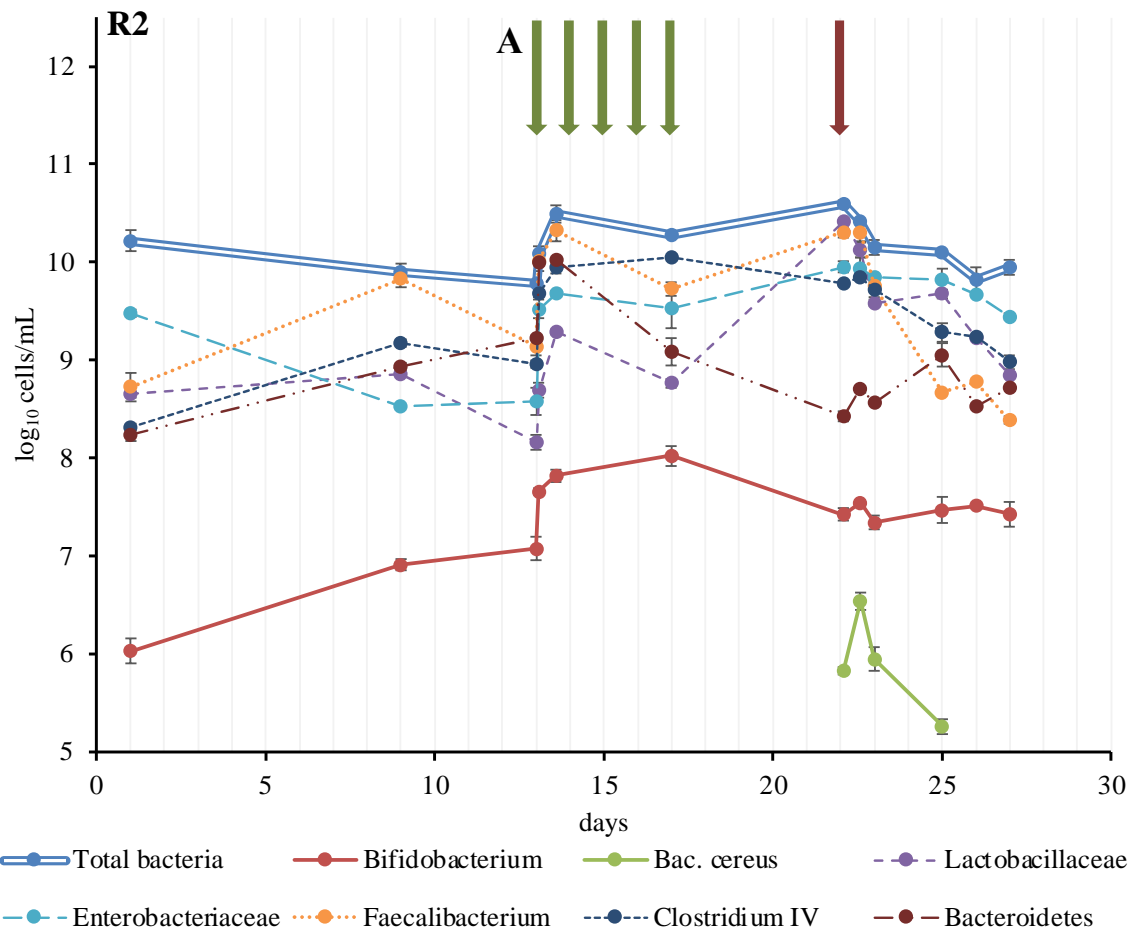


Рисунок 51 - Эксперимент I. Диаграммы численности бактерий (А) и продуцирования кислот в биореакторе R2 (В): L - молочной, А - уксусной, Р - пропионовой, В – масляной кислот, соответственно. Зеленые стрелки – внесение пробиотика, красная – внесение бацилл

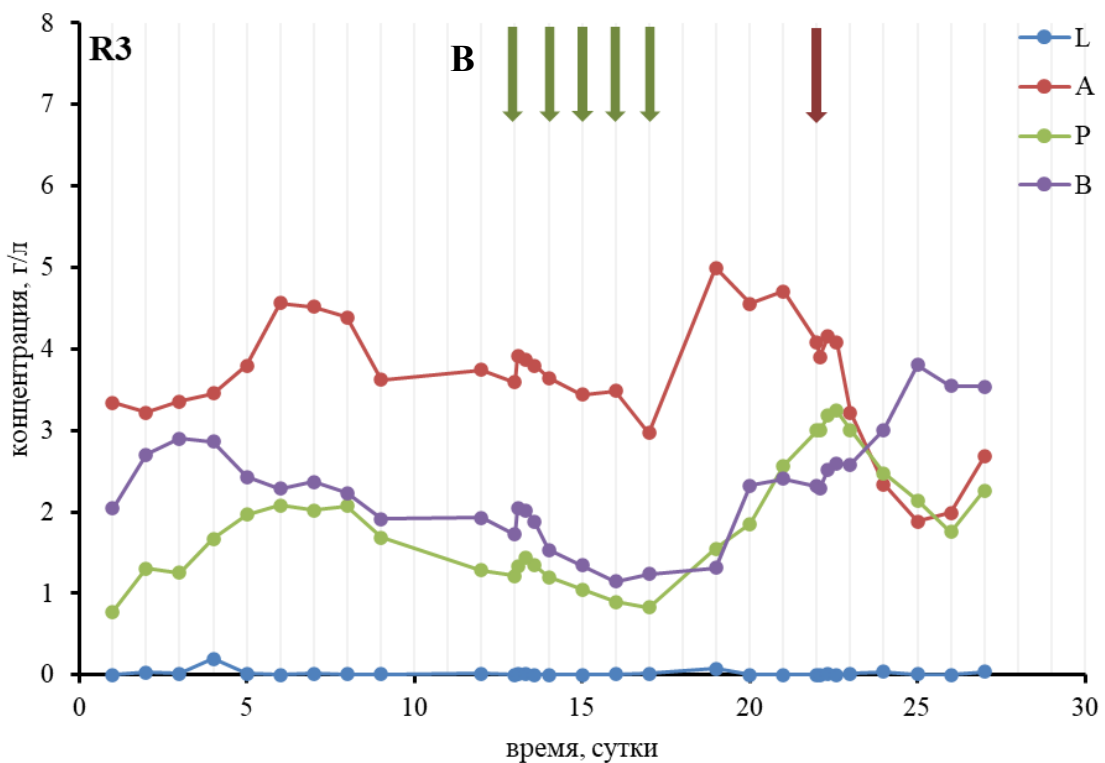
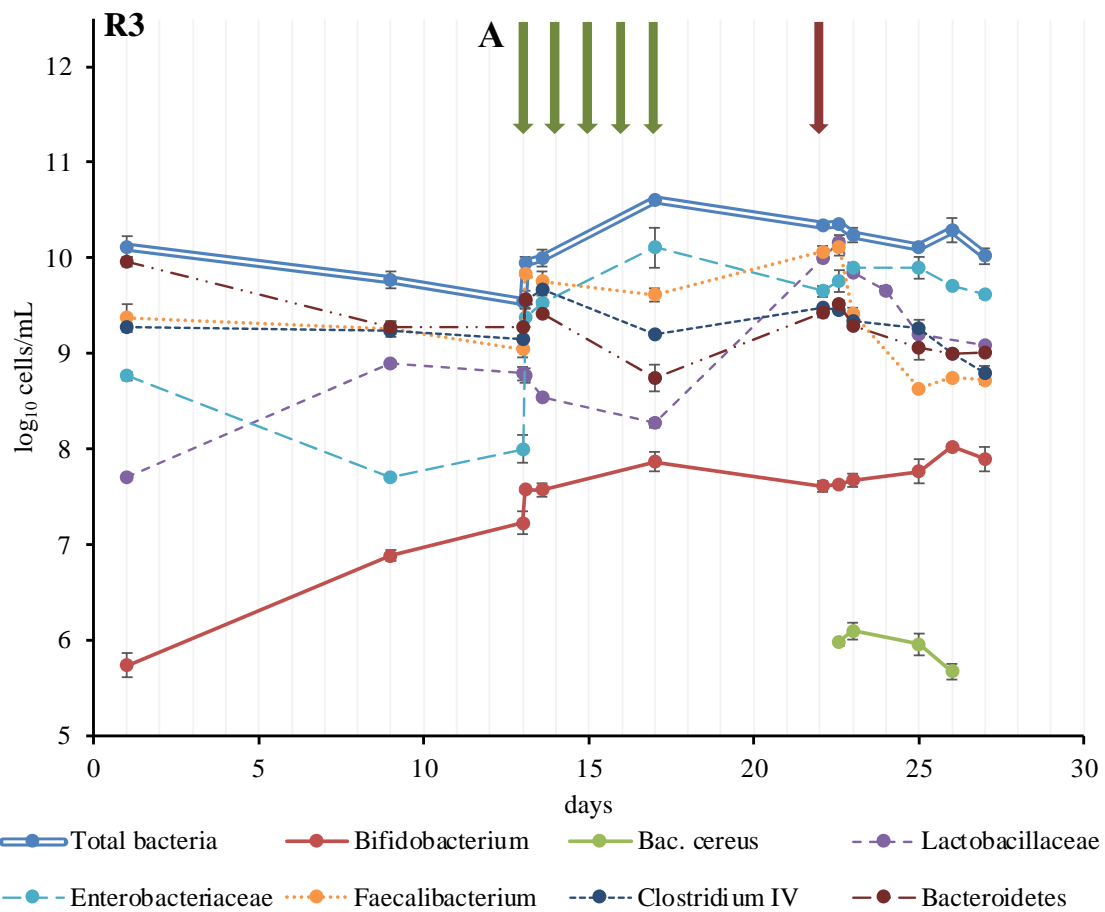


Рисунок 52 - Эксперимент I. Диаграммы численности бактерий (A) и продуцирования кислот в биореакторе R3 (B): L - молочной, А - уксусной, Р - пропионовой, В – масляной кислот, соответственно. Зеленые стрелки – внесение пробиотика, красная – внесение бацилл

Так же как и в R1 после внесения *Bif. adolescentis* происходило закономерное скачкообразное увеличение численности, однако в R3 несколько меньше, чем в R1 и R2. В R2 численность рода *Bifidobacterium* увеличилась примерно на 1,0 lg (клеток/мл), а в R3 – примерно на 0,5 lg (клеток/мл). Одновременно происходило снижение концентраций уксусной, пропионовой и масляной кислот в R2 и R3, что может быть связано с ускорением их метаболизма в результате перекрестного питания. После прекращения добавления бифидобактерий концентрация уксусной, пропионовой и масляной кислот повышалась.

Во втором реакторе резких изменений численности отдельных групп бактерий не наблюдали, однако при увеличении численности бифидобактерий снижалась численность *Bacteroidetes*. Кроме того, после прекращения внесения *Bif. adolescentis* возрастает численность лактобацилл.

При внесении *Bacillus cereus* в R2 снижались общая численность микроорганизмов и концентрации кислот. В отличие от R1, бациллы в R2 обнаруживали в течение более трех суток. В R3 бациллы сохранялись еще дольше, до 88 часов от момента попадания (обнаружения), при этом их численность оставалась в пределах 5,5-6,0 lg (клеток/мл). Следовательно, условия в поперечном и нисходящем отделах толстой кишки, в частности pH, являются более благоприятными для роста бацилл.

3.8.2 Исследование влияния на микробное сообщество контаминанта *Bac. cereus* без предварительного внесения пробиотика

В контрольном эксперименте (II) R1 контаминировали трехсуточной культурой *Bacillus cereus* без предварительного внесения пробиотика, после достижения динамического равновесия в системе (на двенадцатые сутки от начала культивирования). Данное состояние подтверждали с учетом динамики

концентраций кислот. Далее эксперимент продолжали до 20 суток. Результаты qПЦР и ВЭЖХ приведены отдельно для каждого ферментера (рисунки 53-55).

Общая численность бактерий во всех реакторах оставалась в пределах 10^{11} Ig (клеток/мл) в течение всего культивирования, как и ранее.

В первом ферментере (рисунок 53) в течение первых пяти суток наблюдали активный рост численности *Lactobacillaceae*. Также, в адаптивный период на 4 сутки произошло резкое снижение концентрации ацетата, что, скорее всего, стало следствием снижения численности его продуцентов, в частности, *Bifidobacterium*, *Clostridium* и *Faecalobacterium* в этот период. На пятые сутки началось активное продуцирование ацетата, а на шестые сутки – лактата, на фоне роста численности *Bifidobacterium*, *Clostridium* и *Faecalobacterium*. В дальнейшем система стабилизировалась, что свидетельствовало о преодолении адаптационного периода.

На протяжении всей ферментации в R1 наблюдали снижение численности *Bacteroidetes* и, соответственно, уменьшение концентрации масляной кислоты.

При добавлении *Bacillus cereus* наблюдали кратковременное повышение численности всех членов кишечного микробного сообщества. После внесения бацилл резко снизилась концентрация ацетата и пропионата, а концентрация лактата возросла, что, видимо, было связано с повышением количества лактобцилл, а также продукции лактата собственно бациллами. Следует отметить, что при внесении спор бацилл к бифидобактериям, находящимся в состоянии динамического равновесия, при одностадийном непрерывном со-культивировании (п. 3.7.2), в частности при 5 и 7 г/л ОФ, наблюдали повышение концентрации молочной кислоты (на 0,58 г/л при 5 г/л ОФ и на 0,33 г/л при 7 г/л ОФ) в период активного роста тест-штамма. Как и в предыдущем эксперименте, в первом ферментере бациллы элиминировались быстрее всего - в течение первых суток.

После элиминирования из системы бацилл наблюдали снижение концентрации лактата в системе и плавное возвращение численностей всех групп бактерий к состоянию, наблюдавшемуся до контаминации.

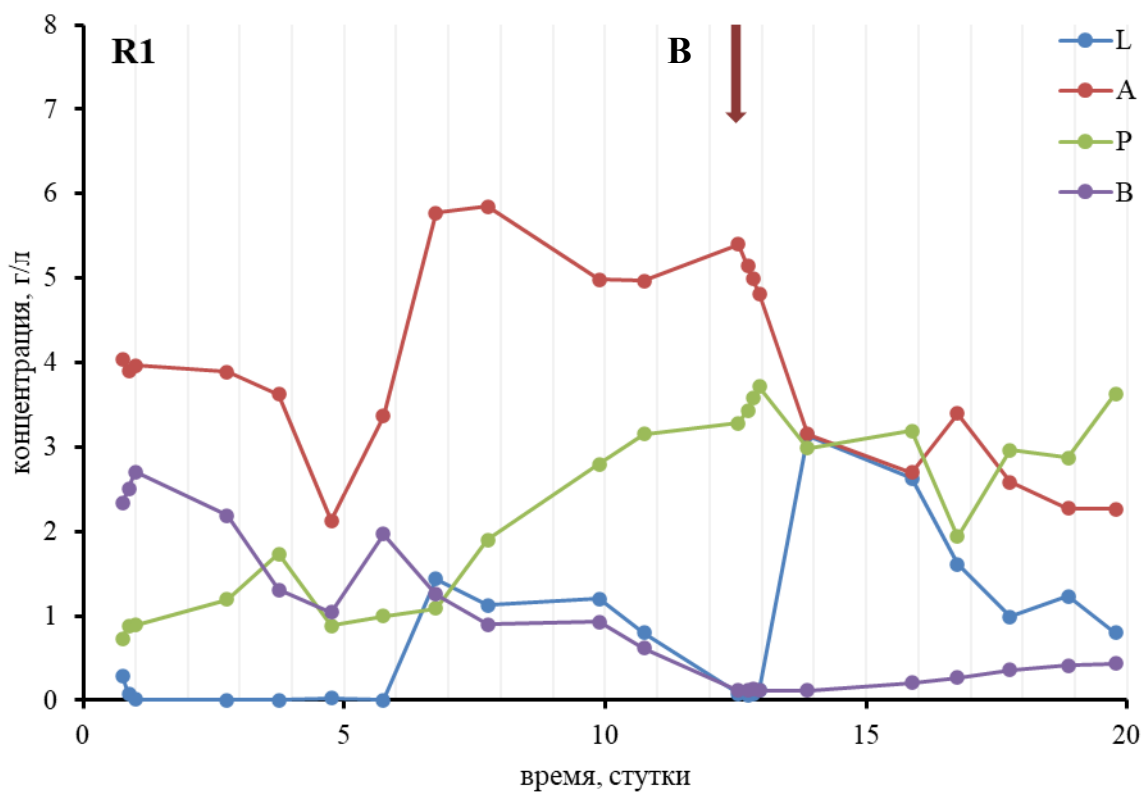
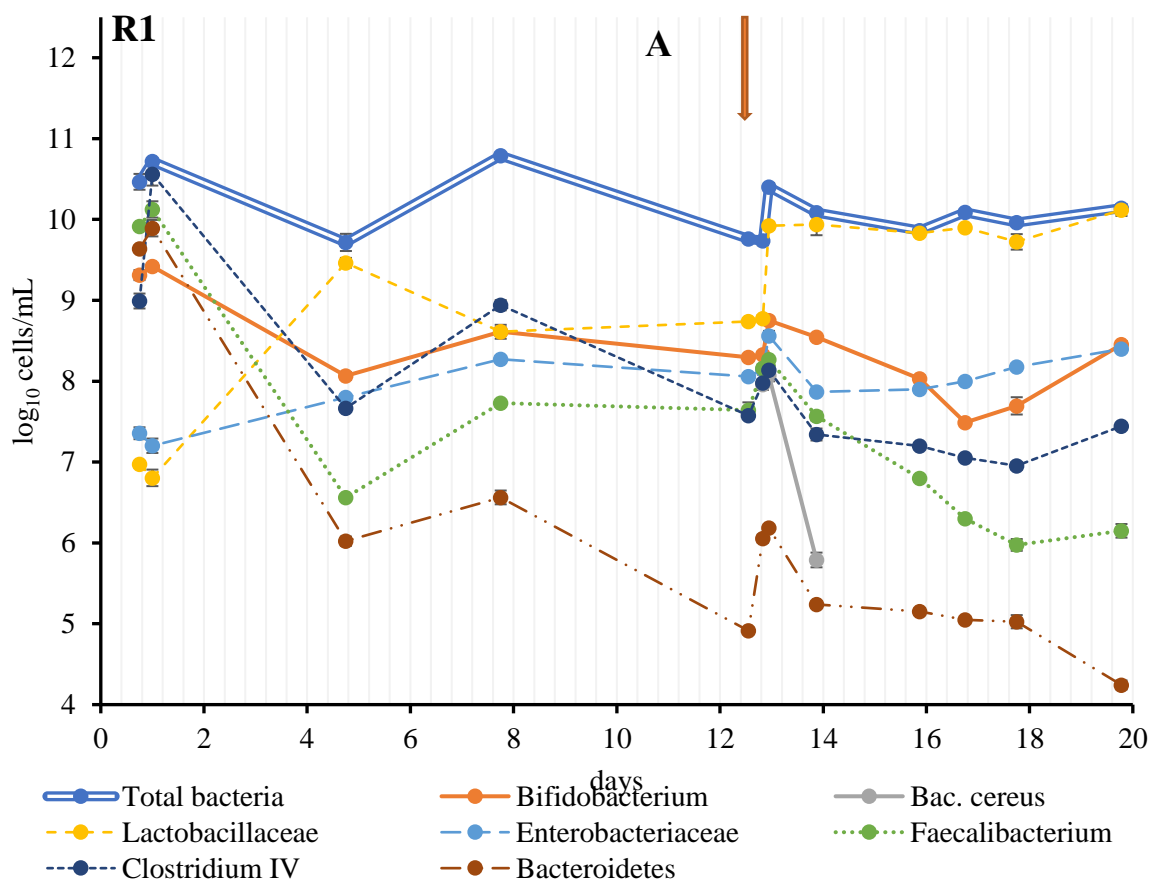


Рисунок 53 - Эксперимент II. Диаграммы численности бактерий (А) и продуцирования кислот в биореакторе R1 (В): L - молочной, А - уксусной, Р - пропионовой, В – масляной кислот, соответственно. Красная стрелка – внесение бацилл

В отличие от первого ферментера, профили численностей различных групп бактерий и профили концентраций кислот в R2 и R3 практически идентичны. Как и в первом эксперименте, в них практически не обнаруживали молочную кислоту, что связано с потреблением лактата микробным сообществом. При попадании бацилл в R2 и R3 также происходило увеличение численности всех групп и общего количества бактерий примерно на $0,5 \lg$ (клеток/мл). В дальнейшем заметных изменений в количественном составе микробного сообщества не наблюдали за исключением плавного снижения бактероидов и бифидобактерий в R2, которые достигли к концу эксперимента численности до контаминации. Таким образом, бациллы, по-видимому, выступают в роли положительного для микробного сообщества фактора. Это может быть связано с повышением биодоступности для членов сообщества некоторых субстратов за счет ферментной системы бацилл. Данный вопрос требует дополнительных исследований с применением современных методов протеомики и метаболомики.

В R2 и в R3 бациллы сохранялись в течение 73 и 94 часов, соответственно, при этом численность бацилл в первом ферментере изменилась с $7,5$ до $5,5 \lg$ (клеток/мл), а в третьем – сохранялась в интервале $6,0-6,5 \lg$ (клеток/мл). Как и в предыдущем эксперименте установлено постепенное снижение концентрации ацетата в среде, причем в R2 сразу, а в R3 – с небольшой задержкой. Известно, что бациллы могут трансформировать ацетат в ацетил-КоА в анаэробных условиях (приложение 3), расходуя одну молекулу АТФ. Вероятно, бациллы метаболизируют ацетат с потерей энергии для предотвращения ингибирующего действия.

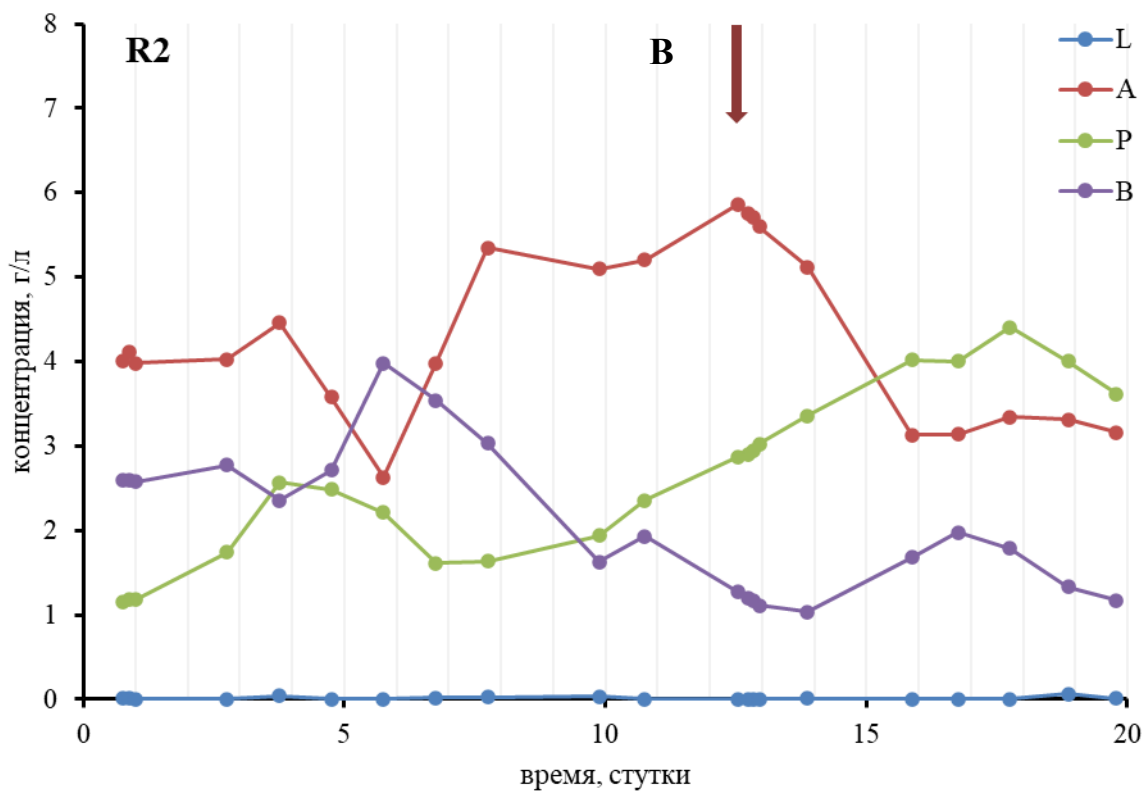
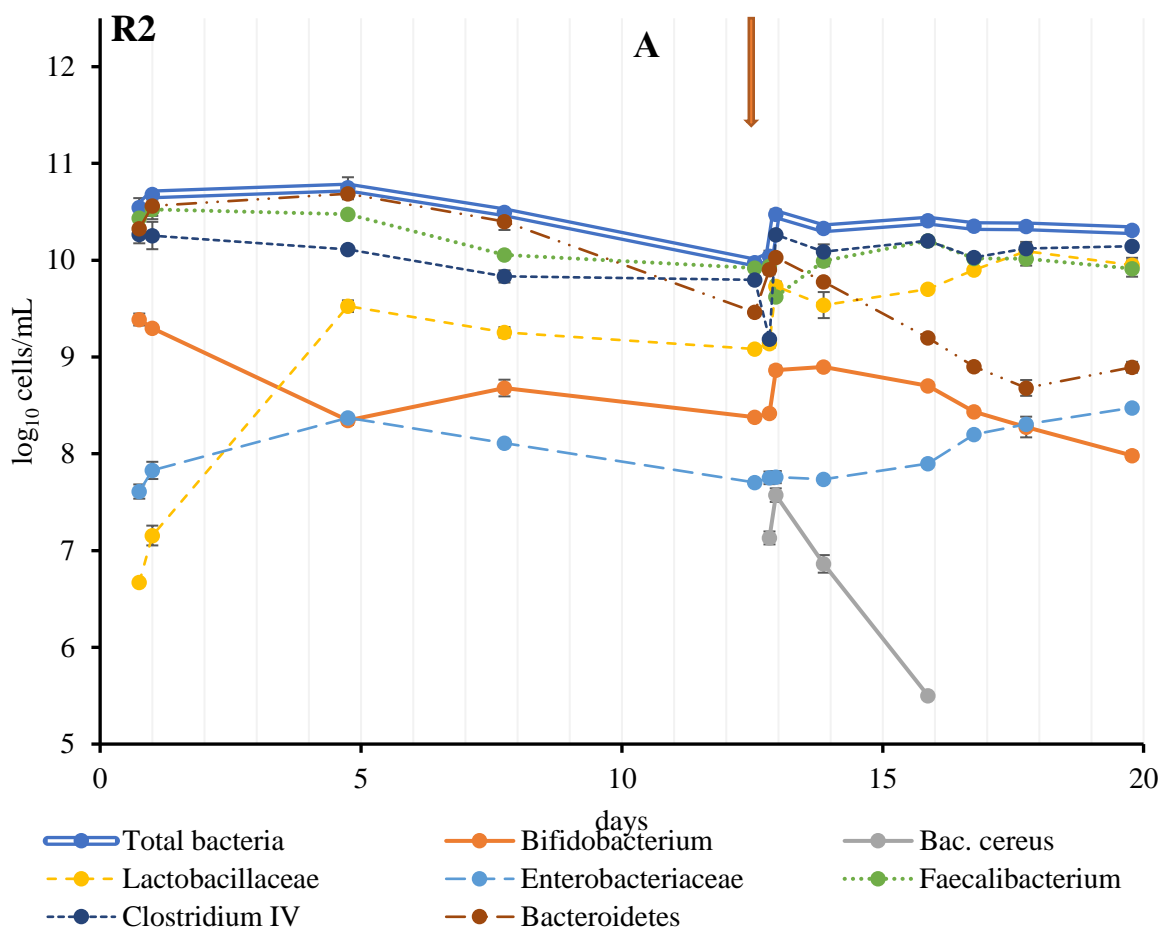


Рисунок 54 - Эксперимент II. Диаграммы численности бактерий (А) и продуцирования кислот в биореакторе R2 (В): L - молочной, А - уксусной, Р - пропионовой, В – масляной кислот, соответственно. Красная стрелка – внесение бацилл

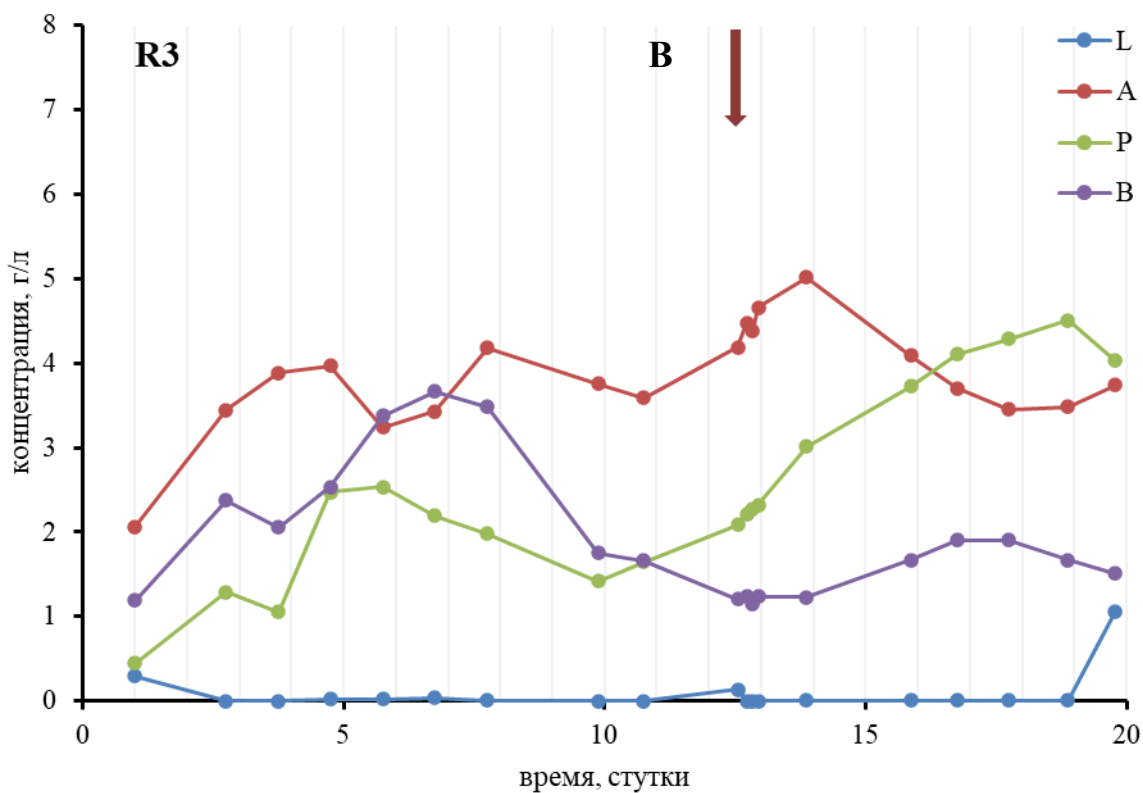
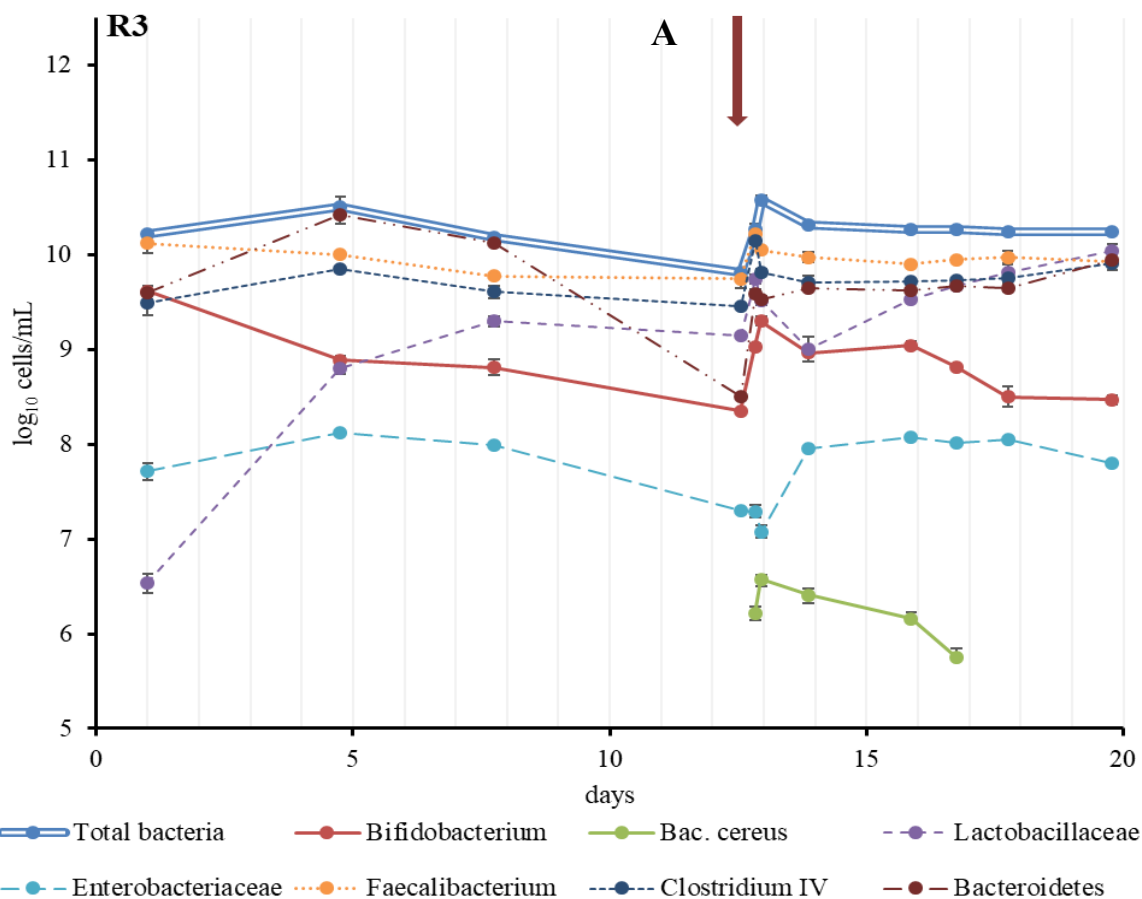


Рисунок 55 - Эксперимент II. Диаграммы численности бактерий (А) и продуцирования кислот в биореакторе R3 (В): L - молочной, А - уксусной, Р - пропионовой, В – масляной кислот, соответственно. Красная стрелка – внесение бактерий

В микробиоте кишечника человека представлены все возможные типы экологического взаимодействия микроорганизмов (Приложение 9), однако, основным объектом большинства исследований остается явление перекрестного питания [28, 53]. В то время как аменсализм (микроорганизм ингибитор подавляет рост и развитие другого – аменсала), являющийся частным случаем антагонизма, также представляет огромный научный интерес, хоть и не встречается в микробиоте столь часто [55, 56]. Именно данный тип взаимодействия обуславливает подавление микробиотой развития кишечных патогенов и контаминантов пищи в кишечнике. Понимание процесса, предположительно позволит эффективнее бороться с кишечными инфекциями и поддерживать здоровый тип микробиоты. Ранее на примере монокультуры бифидобактерий было показано, что даже для такого типичного представителя кишечного сообщества млекопитающих, условия, приближенные к условиям толстого кишечника, являются давящими в связи с ограничением поступающих веществ и избытком образующихся продуктов (п. 3.7.). При этом глубинная ферментация не позволяет учесть влияние диффузии в биопленки, выстилающие эпителий кишечника и, предположительно, обстановка для микроорганизмов там будет еще тяжелее.

Хотя антагонистическая активность является одним из стандартных тестов для исследования пробиотических культур [320], применяемые методы (например, метод отложенного антагонизма, метод диффузии в агар) сложно соотнести с изменениями, происходящими в микробном сообществе *in vivo*. В данной работе антагонизм как микроэкологическое явление в фекальном сообществе, наиболее близком по составу к кишечному, был рассмотрен наряду с другими типами микроэкологических взаимодействий. Полученные результаты полезны для понимания механизмов взаимодействия популяций и установления количественных критериев этих взаимодействий.

3.8.3. Математическое моделирование роста *Bacillus cereus* при непрерывном культивировании в системе TSC на фоне и без него предварительного внесения пробиотика

Предложенные ранее для периодического и одностадийного непрерывного культивирования математические модели ингибирования роста бацилл кислотами были проверены на полученных данных. Экспериментальные и рассчитанные с помощью моделей кривые роста тест-штамма представлены на рисунке 56, а относительные ошибки между экспериментальной и рассчитанной численностью тест-штамма – в таблице 22.

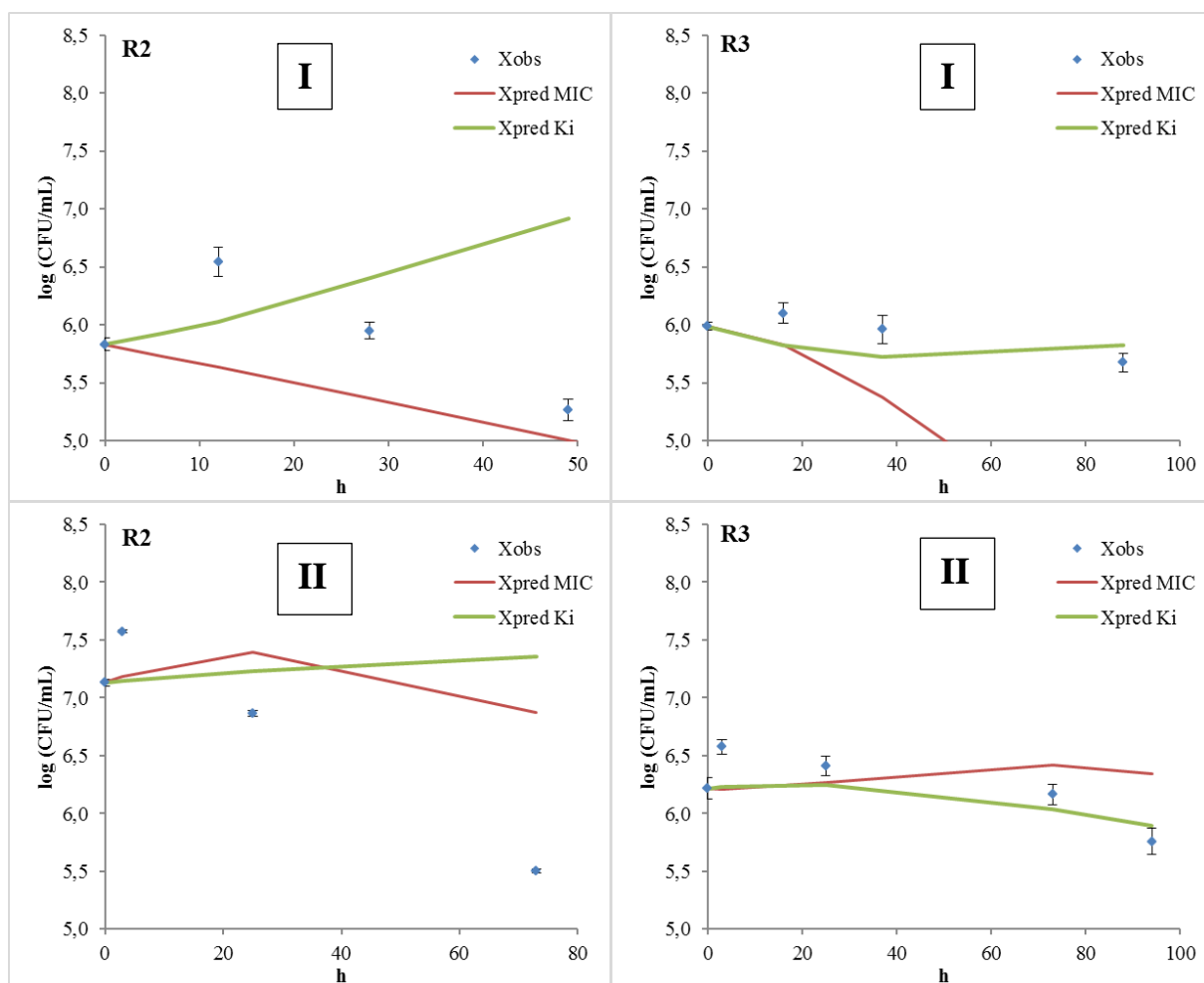


Рисунок 56 - Экспериментальные и рассчитанные значения динамики численности бацилл в системе трехстадийного непрерывного культивирования с предварительным внесением бифидобактерий (I) или без внесения (II). Для расчетов использованы Ki-модель и MIC-модель

Таблица 22 - Относительная ошибка (%) между экспериментальными и расчетными данными численности бактерий при культивировании в TSC

Относительная ошибка (%) между экспериментальными и расчетными данными численности бактерий				
Реактор	R2		R3	
Эксперимент	Ki-модель	MIC-модель	Ki-модель	MIC-модель
I	44,6	37,9	10,0	22,1
II	46,9	28,5	11,0	45,1

Как для Ki -, так и для MIC-модели ошибки при описании событий в R2 были выше, чем в R3. Для R3 MIC-модель давала относительную ошибку 22,1 % в эксперименте I, но сильно занижала результаты в контрольном эксперименте. В то же время относительные ошибки между экспериментальными и расчетными значениями численности бактерий, полученных с применением Ki - модели, составляли 10 и 11 %, соответственно. Можно предположить, что определение констант ингибирования для непрерывной одностадийной ферментации с чистой культурой бактерий при соответствующих рН позволит повысить точность прогноза для R².

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 Ки-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 *Vac. 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 рН влияет на рост и продолжительность пребывания *Vac. cereus* в каждом из реакторов. При рН 5,5 рост отсутствовал, при рН 6,2 вымывание происходило в течение 48-74 ч, а при рН 6,8 – в течение 95-98 ч. Для реактора с рН 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.
12. Нейросетевое моделирование изменения концентрации молочной кислоты в ходе непрерывной ферментации бифидобактерий/ Макляев И.В., Нохаева В.С., **Евдокимова С.А.**, Кареткин Б.А. и др./ Бутлеровские сообщения. - 2020. - Т.64. - №11. - с. 61-69.

Публикации в других изданиях (тезисы докладов):

13. Исследование закономерностей роста и взаимодействия *Bifidobacterium adolescentis* и *Bacillus cereus* в условиях непрерывного культивирования на пребиотическом и непребиотическом 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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
20. 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.
21. 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:

22. 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.**

23. 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sako T., Tanaka R. Prebiotics. Functions. – 2011. – с. 365-371.
2. Shilovsky G.A., Sorokina E.V., Putyatina T.S. Assessment of the Human Metabolome as a Method for Molecular Diagnostics of Colorectal Cancer: Prevention and Therapy //Biology Bulletin Reviews. – 2022. – Т. 12. – №. 4. – С. 422-427.
3. Cheng L. et al. gutMGene: a comprehensive database for target genes of gut microbes and microbial metabolites //Nucleic Acids Research. – 2022. – Т. 50. – №. D1. – С. D795-D800.
4. Rohlion N., Chassaing B. When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota //Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2016. – Т. 371. – №. 1707. – С. 20150504.
5. Черневская Е. А., Белобородова Н. В. Микробиота кишечника при критических состояниях (обзор) //Общая реаниматология. – 2018. – Т. 14. – №. 5. – С. 96-119.
6. Walsh C.J. et al. In silico identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project's reference genome database //BMC microbiology. – 2015. – Т. 15. – №. 1. – С. 1-11.
7. van der Hee B., Wells J. M. Microbial regulation of host physiology by short-chain fatty acids //Trends in Microbiology. – 2021. – Т. 29. – №. 8. – С. 700-712.
8. Kamada N. et al. Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota //Science. – 2012. – Т. 336. – №. 6086. – С. 1325-1329.
9. von Martels J. Z. H. et al. The role of gut microbiota in health and disease: In vitro modeling of host-microbe interactions at the aerobe-anaerobe interphase of the human gut //Anaerobe. – 2017. – Т. 44. – С. 3-12.
10. Makki K. et al. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease //Cell host & microbe. – 2018. – Т. 23. – №. 6. – С. 705-715.
11. Lankelma J. M. et al. Antibiotic-induced gut microbiota disruption during human endotoxemia: a randomised controlled study //Gut. – 2017. – Т. 66. – №. 9. – С. 1623-1630.
12. Xu W. et al. Systematic review of the effect of enteral feeding on gut microbiota in preterm infants //Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing. – 2018. – Т. 47. – №. 3. – С. 451-463.
13. Hill C. et al. 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. – Т. 11. – №. 8. – С. 506.
14. Gibson G.R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics //Nature reviews Gastroenterology & hepatology. – 2017. – Т. 14. – №. 8. – С. 491-502.
 15. Swanson K. S. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics //Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2020. – Т. 17. – №. 11. – С. 687-701.
 16. Мескина Е.Р., Целипанова Е.Е., Хадисова М.К., Галкина Л.А., Сташко Т.В. Эффективность применения сорбированных пробиотиков в комплексной терапии пневмонии, вызванной sars-cov-2. Часть 1. Период разгара клинических проявлений // Терапевтический архив. – 2021.-Т.93.-№.4.- С.456-464.
 17. «COVID-19 существенно изменил состав лидеров на рынке пробиотиков и пребиотиков»// Фармацевтический вестник [Электронный ресурс]. Дата обновления: 23.04.2021. URL: <https://pharmvestnik.ru/content/articles/COVID-19-sushestvenno-izmenil-sostav-liderov-na-rynke-probiotikov-i-prebiotikov.html> (дата обращения: 27.08.2022)
 18. Probiotics Market by Ingredient (Bacteria and Yeast), Function (Regular, Preventative Healthcare, and Therapeutic), Application (Food & Beverage, Dietary Supplements, and Animal Feed), and End User (Human and Animal): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast 2021-2030 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.alliedmarketresearch.com/probiotics-market#:~:text=The%20global%20probiotics%20market%20size,by%20maintaining%20intestinal%20microbial%20balance.html> (дата обращения: 27.08.2022)
 19. Гурылёва М.Э., Глушаков А.И. Организационные и этические аспекты проведения клинических исследований: Учебное пособие для слушателей послевузовского и дополнительного профессионального образования //Казань: Первый печатный двор, 2012. 57 с. – 2012.
 20. Macfarlane S. et al. Polysaccharide degradation by human intestinal bacteria

- during growth under multi-substrate limiting conditions in a three-stage continuous culture system //FEMS Microbiology Ecology. – 1998. – Т. 26. – №. 3. – С. 231-243.
21. Feria-Gervasio D. et al. Three-stage continuous culture system with a self-generated anaerobiosis to study the regionalized metabolism of the human gut microbiota //Journal of microbiological methods. – 2014. – Т. 96. – С. 111-118.
 22. Wang X. et al. Prebiotics inhibit proteolysis by gut bacteria in a host diet-dependent manner: a three-stage continuous in vitro gut model experiment //Applied and environmental microbiology. – 2020. – Т. 86. – №. 10. – С. e02730-19.
 23. Sannasiddappa T.H. et al. The influence of Staphylococcus aureus on gut microbial ecology in an in vitro continuous culture human colonic model system //PloS one. – 2011. – Т. 6. – №. 8. – С. e23227.
 24. Probert H.M. et al. Polydextrose, lactitol, and fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system //Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Т. 70. – №. 8. – С. 4505-4511.
 25. Costabile A. et al. Effects of orange juice formulation on prebiotic functionality using an in vitro colonic model system //PLoS One. – 2015. – Т. 10. – №. 3. – С. e0121955.
 26. Healey G. et al. Variability in gut microbiota response to an inulin-type fructan prebiotic within an in vitro three-stage continuous colonic model system //Bioactive carbohydrates and dietary fibre. – 2017. – Т.11. – С. 26-37.
 27. Xiang Y. et al. Gut-on-chip: recreating human intestine in vitro //Journal of tissue engineering. – 2020. – Т. 11. – С. 2041731420965318.
 28. S. Macfarlane, M.J. Hopkins, G.T. Macfarlane. Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine //Microbial Ecology in Health and Disease. – 2000. – Т. 12. – №. 2. – С. 64-72.
 29. Probert H.M., Gibson G.R. Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract // Curr. Issues Intest. Microbiol. – 2002. – Vol. 3. – P. 23–27.
 30. Сорбированные пробиотики. Механизм действия / Кареткин Б.А., Дорошенко Е.О., Ланских А.Г., Терешкова Е.А. – М.: ТД ДеЛи, 2020. – 36 с.
 31. Engevik A. C., Engevik M. A. Exploring the impact of intestinal ion transport on the gut microbiota //Computational and Structural Biotechnology Journal. – 2021. – Т. 19. – С. 134.

32. Yanni D. et al. Drivers of spatial structure in social microbial communities //Current biology. – 2019. – Т. 29. – №. 11. – С. R545-R550.
33. Ahmed S. et al. Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples //Applied and environmental microbiology. – 2007. – Т. 73. – №. 22. – С. 7435-7442.
34. Macfarlane S., Furrie E., Cummings J.H., Macfarlane G.T. Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis // Clin. Infect. Dis. – 2004. – Т. 38, №. 12. – С. 1690–1699.
35. Korpela K., de Vos W.M. Early life colonization of the human gut: microbes matter everywhere //Current opinion in microbiology. – 2018. – Т. 44. – С. 70-78.
36. Ferretti P. et al. Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome //Cell host & microbe. – 2018. – Т. 24. – №. 1. – С. 133-145.
37. Bezirtzoglou E., Tsiotsias A., Welling G. W. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH) //Anaerobe. – 2011. – Т. 17. – №. 6. – С. 478-482.
38. Korpela K. et al. Association of early-life antibiotic use and protective effects of breastfeeding: role of the intestinal microbiota //JAMA pediatrics. – 2016. – Т. 170. – №. 8. – С. 750-757.
39. Korpela K. et al. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children //Nature communications. – 2016. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-8.
40. Thomson P., Medina D.A., Garrido D. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization //Food Microbiology. – 2018. – Т. 75. – С. 37-46.
41. Tochitani S. Vertical transmission of gut microbiota: Points of action of environmental factors influencing brain development //Neuroscience Research. – 2021. – Т. 168. – С. 83-94.
42. Жиленкова О.Г., Воронина О.Л., Амерханова А.М. и др. Видовой состав бифидофлоры желудочно-кишечного тракта у детей // Астраханский медицинский журнал.-2014.-С.49-55.
43. Abenavoli L. et al. Gut microbiota and obesity: a role for probiotics //Nutrients. – 2019. – Т. 11. – №. 11. – С. 2690.

44. Ramos S., Martín M. Á. Impact of diet on gut microbiota //Current Opinion in Food Science. – 2020. – Т. 37. – С. 83-90.
45. Madison A., Kiecolt-Glaser J.K. Stress, depression, diet, and the gut microbiota: human–bacteria interactions at the core of psychoneuroimmunology and nutrition //Current opinion in behavioral sciences. – 2019. – Т. 28. – С. 105-110.
46. Kostovcikova K., Coufal S., Galanova N. et al. Diet rich in animal protein promotes pro-inflammatory macrophage response and exacerbates colitis in mice // Frontiers in immunology.-2019.-Т.10.-С.919.
47. Yang Q., Liang Q., Balakrishnan B. et. al. Role of dietary nutrients in the modulation of gut microbiota: A narrative review // Nutrients.-2020.-Т.12.-С. 381.
48. Charoenngam N., Shirvani A., Kalajian T.A. et. al. The effect of various doses of oral vitamin D3 supplementation on gut microbiota in healthy adults: A randomized, double-blinded, dose-response study // Anticancer Res.-2020.-Т.40.-С.551-556.
49. Ma G., Chen Y. Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: A systematic review via meta-analysis // J Funct Foods.- 2020.-Т.66.-С.103829.
50. Попова А.Ю. и др. Сравнительная характеристика особенностей микробиоты кишечника жителей Гвинейской Республики и России //Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 7. – №. 4. – С. 375-382.
51. Pérez J.C. Fungi of the human gut microbiota: Roles and significance //International Journal of Medical Microbiology. – 2021. – Т. 311. – №. 3. – С. 151490.
52. Berg G. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges //Microbiome. – 2020. – Т. 8. – №. 1. – С. 1-22.
53. Coyte K. Z., Rakoff-Nahoum S. Understanding competition and cooperation within the mammalian gut microbiome //Current Biology. – 2019. – Т. 29. – №. 11. – С. R538-R544.
54. Muñoz-Tamayo R., Laroche B., Walter E, Doré J., Duncan S.H., Flint H.J., Leclerc M. Kinetic modelling of lactate utilization and butyrate production by key human colonic bacterial species // FEMS Microbiol Ecol. – 2011. – Т. 76. – С. 615–624.
55. Magnúsdóttir S. et al. Generation of genome-scale metabolic reconstructions for

- 773 members of the human gut microbiota //Nature biotechnology. – 2017. – T. 35. – №. 1. – C. 81-89.
56. Venturelli O.S. et al. Deciphering microbial interactions in synthetic human gut microbiome communities //Molecular systems biology. – 2018. – T. 14. – №. 6. – C. e8157.
57. Markowiak-Kopeć P., Śliżewska K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome //Nutrients. – 2020. – T. 12. – №. 4. – C. 1107.
58. Martin-Gallausiaux C. et al. SCFA: mechanisms and functional importance in the gut //Proceedings of the Nutrition Society. – 2021. – T. 80. – №. 1. – C. 37-49.
59. Duncan S.H. et al. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota //Environmental microbiology. – 2009. – T. 11. – №. 8. – C. 2112-2122.
60. Kelly C.J. et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function //Cell host & microbe. – 2015. – T. 17. – №. 5. – C. 662-671.
61. Bronner D.N. et al. Genetic ablation of butyrate utilization attenuates gastrointestinal Salmonella disease //Cell host & microbe. – 2018. – T. 23. – №. 2. – C. 266-273. e4.
62. Rogowski A. et al. Glycan complexity dictates microbial resource allocation in the large intestine //Nature communications. – 2015. – T. 6. – №. 1. – C. 1-16.
63. Abisado R.G. et al. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions //MBio. – 2018. – T. 9. – №. 3. – C. e02331-17.
64. Claussen J. C. et al. Boolean analysis reveals systematic interactions among low-abundance species in the human gut microbiome //PLoS computational biology. – 2017. – T. 13. – №. 6. – C. e1005361.
65. Hsiao A. et al. Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection //Nature. – 2014. – T. 515. – №. 7527. – C. 423-426.
66. Faust K. et al. Signatures of ecological processes in microbial community time series //Microbiome. – 2018. – T. 6. – №. 1. – C. 1-13.
67. Venturelli O.S. et al. Deciphering microbial interactions in synthetic human gut microbiome communities //Molecular systems biology. – 2018. – T. 14. – №. 6. – C. e8157.
68. Cao H.T. et al. Inferring human microbial dynamics from temporal metagenomics

- data: Pitfalls and lessons //BioEssays. – 2017. – Т. 39. – №. 2. – С. 1600188.
69. Heinken A., Thiele I. Systematic prediction of health-relevant human-microbial co-metabolism through a computational framework //Gut microbes. – 2015. – Т. 6. – №. 2. – С. 120-130.
70. Анохина Е.П., Исува М.М., Старцева С.В., Мотина Е.А., Михайлова Н.А., Корнеева О.С. Исследование пребиотических, иммуностимулирующих свойств фукозы и ее влияния на репродуктивную функцию // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.-2018.-№.6.-С.110-114.
71. Харитонов Д.В., Харитонова И.В., Просеков А.Ю. Разработка концепции создания синбиотиков и синбиотических молочных продуктов // Техника и технология пищевых производств.-2013.-Т.31.-№.4.-С.91-94.
72. Marino S. et al. Mathematical modeling of primary succession of murine intestinal microbiota //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Т. 111. – №. 1. – С. 439-444.
73. Ng K.M. et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens //Nature. – 2013. – Т. 502. – №. 7469. – С. 96-99.
74. Ferreyra J.A. et al. Gut microbiota-produced succinate promotes *C. difficile* infection after antibiotic treatment or motility disturbance //Cell host & microbe. – 2014. – Т. 16. – №. 6. – С. 770-777.
75. Rey F.E. et al. Metabolic niche of a prominent sulfate-reducing human gut bacterium //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – Т. 110. – №. 33. – С. 13582-13587.
76. Wrzosek L. et al. Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent //BMC biology. – 2013. – Т. 11. – №. 1. – С. 1-13.
77. García-Bayona L., Comstock L. E. Bacterial antagonism in host-associated microbial communities //Science. – 2018. – Т. 361. – №. 6408.
78. Kolmeder C.A., de Vos W.M. Roadmap to functional characterization of the human intestinal microbiota in its interaction with the host //Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2020. – С. 113751.
79. Spencer S.P., Fragiadakis G.K., Sonnenburg J.L. Pursuing human-relevant gut microbiota-immune interactions //Immunity. – 2019. – Т. 51. – №. 2. – С. 225-239.

80. Li J. et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome //Nature biotechnology. – 2014. – T. 32. – №. 8. – C. 834-841.
81. Gotoh A. et al. Sharing of human milk oligosaccharides degradants within bifidobacterial communities in faecal cultures supplemented with *Bifidobacterium bifidum* //Scientific reports. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 1-14.
82. Jung J.Y. et al. In-vitro characterization of growth inhibition against the gut pathogen of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from fermented products //Microorganisms. – 2021. – T. 9. – №. 10. – C. 2141.
83. Palframan R., Gibson G.R., Rastall R.A. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides //Letters in Applied Microbiology. – 2003. – T. 37. – №. 4. – C. 281-284.
84. Vulevic J., Rastall R.A., Gibson G.R. Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides //FEMS microbiology letters. – 2004. – T. 236. – №. 1. – C. 153-159.
85. Zafar H., Saier Jr M.H. Gut Bacteroides species in health and disease //Gut Microbes. – 2021. – T. 13. – №. 1. – C. 1848158.
86. Heintz-Buschart A., Wilmes P. Human gut microbiome: function matters //Trends in microbiology. – 2018. – T. 26. – №. 7. – C. 563-574.
87. Ruan W. et al. Healthy human gastrointestinal microbiome: composition and function after a decade of exploration //Digestive diseases and sciences. – 2020. – T. 65. – №. 3. – C. 695-705.
88. Rowland I., Gibson G., Heinken A., Scott K., Swann J., Thiele I., Tuohy K. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components // Eur J Nutr.-2018.-T.57.-C.1-24.
89. Yoshii K., Hosomi K., Sawane K., Kunisawa J. Metabolism of dietary and microbial vitamin B family in the regulation of host immunity // Front Nutr.-2019.-T.6.-C.48.
90. Soderholm A.T., Pedicord V.A. Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity // Immunology .-2019.-T.58.-C.267-280.
91. Sánchez-Tapia M., Tovar A.R., Torres N. Diet as regulator of gut microbiota and its role in health and disease // Arch Med Res.-2019.-T.50.-C.259-268.
92. Schirmer M. et al. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity //Cell. – 2016. – T. 167. – №. 4. – C. 1125-1136.
93. Peluzio M.C.G., Martinez J.A., Milagro F. I. Postbiotics: Metabolites and

- mechanisms involved in microbiota-host interactions //Trends in Food Science & Technology. – 2021. – Т. 108. – С. 11-26.
94. Gantois I. et al. Butyrate specifically down-regulates Salmonella pathogenicity island 1 gene expression //Applied and environmental microbiology. – 2006. – Т. 72. – №. 1. – С. 946-949.
95. Shin R., Suzuki M., Morishita Y. Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7 //Journal of medical microbiology. – 2002. – Т. 51. – №. 3. – С. 201-206.
96. Zhuang X. et al. Fecal microbiota alterations associated with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome //Frontiers in microbiology. – 2018. – Т. 9. – С. 1600.
97. Koh A., Bäckhed F. From association to causality: the role of the gut microbiota and its functional products on host metabolism // Mol Cell.-2020.-С.78.
98. Саликова С.П., Власов А.А., Гриневич В.Б. Адаптация человека к условиям Крайнего Севера: фокус на коррекцию микробно-тканевого комплекса желудочно-кишечного тракта//Экология человека.-2021.-Т.28.-№.2.-С.4-12.
99. Keaney J., Campbell M. The dynamic blood–brain barrier //The FEBS journal. – 2015. – Т. 282. – №. 21. – С. 4067-4079.
100. Kimura I. et al. Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype in mice //Science. – 2020. – Т. 367. – С. 6481.
101. Ковтун А. С. и др. In silico определение метагеномной сигнатуры, отражающей нейрометаболический потенциал микробиоты кишечника человека в норме //Генетика. – 2018. – Т. 54. – №. 9. – С. 1081-1091.
102. Малкоч А.В., Бельмер С.В., Ардатская М.Д. Функциональные нарушения моторики желудочно-кишечного тракта и кишечная микрофлора //Педиатрическая фармакология. – 2009. – Т. 6. – №. 5. – С. 70-75.
103. Fukumoto S. et al. Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats //American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. – 2003. – Т. 284. – №. 5. – С. R1269-R1276.
104. Koller V.J. et al. Impact of lactic acid bacteria on oxidative DNA damage in human derived colon cells //Food and Chemical Toxicology. – 2008. – Т. 46. – №. 4. – С. 1221-1229.
105. Kolmeder C.A. et al. Comparative metaproteomics and diversity analysis of

- human intestinal microbiota testifies for its temporal stability and expression of core functions //PloS one. – 2012. – Т. 7. – №. 1. – С. e29913.
106. Lallès J. P. Recent advances in intestinal alkaline phosphatase, inflammation, and nutrition //Nutrition reviews. – 2019. – Т. 77. – №. 10. – С. 710-724.
107. Liu H. N. et al. Altered molecular signature of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: a systematic review and meta-analysis //Digestive and Liver Disease. – 2017. – Т. 49. – №. 4. – С. 331-337.
108. Duranti S. et al. Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: bifidobacteria as novel microbial biomarkers //FEMS microbiology ecology. – 2016. – Т. 92. – №. 12. – С. 191.
109. Ojima M. et al. Metagenomic analysis reveals dynamic changes of whole gut microbiota in the acute phase of intensive care unit patients //Digestive diseases and sciences. – 2016. – Т. 61. – С. 1628-1634.
110. Oerlemans M.M.P. et al. Benefits of bacteria-derived exopolysaccharides on gastrointestinal microbiota, immunity and health //Journal of Functional Foods. – 2020. – С. 104289.
111. Duan H. et al. Gut microbiota: A target for heavy metal toxicity and a probiotic protective strategy //Science of The Total Environment. – 2020. – С. 140429.
112. Ahmed E., Holmström S.J.M. Siderophores in environmental research: roles and applications //Microbial biotechnology. – 2014. – Т. 7. – №. 3. – С. 196-208.
113. Beloborodova N.V. Integration of metabolism in man and his microbiome in critical conditions //General Reanimatology. – 2012. – Т. 8. – №. 4. – С. 42.
114. Wischmeyer P.E., McDonald D., Knight R. Role of the microbiome, probiotics, and ‘dysbiosis therapy’ in critical illness //Current opinion in critical care. – 2016. – Т. 22. – №. 4. – С. 347.
115. Mardinoglu A. et al. An integrated understanding of the rapid metabolic benefits of a carbohydrate-restricted diet on hepatic steatosis in humans //Cell metabolism. – 2018. – Т. 27. – №. 3. – С. 559-571. e5.
116. Каштанова Д.А. и др. Состав микробиоты кишечника у относительно здоровых жителей Москвы и московской области с ожирением //Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – №. 6.- С. 154.
117. Cani P.D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance

- //Diabetes. – 2007. – Т. 56. – №. 7. – С. 1761-1772.
118. Allin K.H., Nielsen T., Pedersen O. Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus //European journal of endocrinology. – 2015. – Т. 172. – №. 4. – С. R167-R177.
119. Medina-Vera I. et al. A dietary intervention with functional foods reduces metabolic endotoxaemia and attenuates biochemical abnormalities by modifying faecal microbiota in people with type 2 diabetes //Diabetes & metabolism. – 2019. – Т. 45. – №. 2. – С. 122-131.
120. Chumphukam O. et al. The innovation of functional foods in Asia: IFFA 2018 //Asia Pacific journal of clinical nutrition. – 2019. – Т. 28. – №. 2. – С. 419-426.
121. Tufarelli V. et al. An overview on the functional food concept: perspectives and applied researches in probiotics, prebiotics and synbiotics //Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. – 2016. – Т. 4. – №. 3, Suppl. – С. 273-278.
122. Green M., Arora K., Prakash S. Microbial medicine: prebiotic and probiotic functional foods to target obesity and metabolic syndrome //International journal of molecular sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 8. – С. 2890.
123. Baumgartner S. et al. The position of functional foods and supplements with a serum LDL-C lowering effect in the spectrum ranging from universal to care-related CVD risk management //Atherosclerosis. – 2020.
124. Ashaolu T.J. Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics //Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2020. – Т. 130. – С. 110625.
125. Alkhatib A. Antiviral functional foods and exercise lifestyle prevention of coronavirus //Nutrients. – 2020. – Т. 12. – №. 9. – С. 2633.
126. Сорокина Е.В. и др. Многофункциональные свойства пробиотических штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* //Успехи современной биологии. – 2022. – Т. 142. – №. 1. – С. 25-36.
127. Peluso I. et al. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Microbial-Modulating Activities of Nutraceuticals and Functional Foods 2019. – 2020.
128. Wieërs G. et al. How probiotics affect the microbiota //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2020. – Т. 9. – С. 454.
129. Lilly D. M., Stillwell R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms //Science. – 1965. – vol. 147. – №. 3659. – pp. 747-748.

130. Fuller R. Probiotics in man and animals //Journal of Applied Microbiology. – 1989. – Т. 66. – №. 5. – С. 365-378.
131. Carré G. Ueber Antagonisten unter den bacterien //Correspondenz-Blatt Schweiz Aerzte. – 1887. – Т. 17. – С. 385-392.
132. Tissier H. Traitement des infections intestinales par la méthode de transformation de la flore bactérienne de l'intestin. – 1907.
133. Metchnikoff E. The prolongation of life. Optimistic studies. London: Butterworth-Heinemann. – 1907
134. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Córdoba, Argentina, 1-4 October 2001. – Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2001.
135. Волкова Г.С., Серба Е.М. Создание многоштаммового бактериального консорциума для технологии пробиотических препаратов кормового назначения //Техника и технология пищевых производств.-2021.-Т.51.-№.2.- С.260-269.
136. Просеков А.Ю., Вобликова Т.В. Иммобилизация бифидобактерий для повышения их жизнеспособности при пероральной доставке в матрице пищевых продуктов // Современная наука и инновации.-2018.-Т.23.-№.3.- С.141-146.
137. Феклисова Л. В., Мацулевич Т. В. Отечественные бифидосодержащие пробиотики в педиатрической практике //Альманах клинической медицины. – 2002. – №. 5. – С. 296-300.
138. Leo E.E.M. et al. Probiotics beverages: An alternative treatment for metabolic syndrome //Functional and Medicinal Beverages. – Academic Press, 2019. – С. 459-482.
139. Health Canada. Accepted claims about the nature of probiotic microorganisms in food //CFIA Guide to Food Labelling and Advertising (Guide). – 2009.
140. Rao K.R. et al. Biological detoxification of Aflatoxin B1 by Bacillus licheniformis CFR1 //Food Control. – 2017. – Т. 71. – С. 234-241.
141. Taheur F.B. et al. Adsorption of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains //International journal of food microbiology. – 2017. – Т. 251. – С. 1-7.
142. Harkai P. et al. Biodegradation of aflatoxin-B1 and zearalenone by

- Streptomyces* sp. collection //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2016. – T. 108. – C. 48-56.
143. Wan M.L.Y., Forsythe S.J., El-Nezami H. Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges //Critical reviews in food science and nutrition. – 2019. – T. 59. – №. 20. – C. 3320-3333.
144. Kumar M. et al. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer //Nutrition reviews. – 2013. – T. 71. – №. 1. – C. 23-34.
145. Reid G. et al. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities //Nature Reviews Microbiology. – 2011. – T. 9. – №. 1. – C. 27-38.
146. Cerdó T. et al. The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity //Nutrients. – 2019. – T. 11. – №. 3. – C. 635.
147. Gomes A. C. et al. The additional effects of a probiotic mix on abdominal adiposity and antioxidant Status: a double-blind, randomized trial //Obesity. – 2017. – T. 25. – №. 1. – C. 30-38.
148. Kim J. et al. Lactobacillus gasseri BNR17 supplementation reduces the visceral fat accumulation and waist circumference in obese adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial //Journal of medicinal food. – 2018. – T. 21. – №. 5. – C. 454-461.
149. Pedret A. et al. Effects of daily consumption of the probiotic Bifidobacterium animalis subsp. lactis CECT 8145 on anthropometric adiposity biomarkers in abdominally obese subjects: a randomized controlled trial //International Journal of Obesity. – 2019. – T. 43. – №. 9. – C. 1863-1868.
150. Romo-Araiza A., Ibarra A. Prebiotics and probiotics as potential therapy for cognitive impairment //Medical hypotheses. – 2020. – T. 134. – C. 109410.
151. Distrutti E. et al. Modulation of intestinal microbiota by the probiotic VSL# 3 resets brain gene expression and ameliorates the age-related deficit in LTP //PloS one. – 2014. – T. 9. – №. 9. – C. e106503.
152. Sarkar A. et al. The microbiome in psychology and cognitive neuroscience //Trends in cognitive sciences. – 2018. – T. 22. – №. 7. – C. 611-636.
153. Allen S. J. et al. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2010. – №. 11.
154. Sukhikh S., Kalashnikova O., Ivanova S., Prosekov A. et al. Evaluating the

- influence of microbial fermentation on the nutritional value of soybean meal //Fermentation. – 2022. – Т. 8. – №. 9. – С. 458.
155. Guo Q. et al. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2019. – №. 4.
156. Trallero O. G. et al. Effect of the administration of a probiotic with a combination of Lactobacillus and Bifidobacterium strains on antibiotic-associated diarrhea //Revista Española de Quimioterapia. – 2019. – Т. 32. – №. 3. – С. 268.
157. Caballero S. et al. Distinct but spatially overlapping intestinal niches for vancomycin-resistant Enterococcus faecium and carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae //PLoS pathogens. – 2015. – Т. 11. – №. 9. – С. e1005132.
158. Kaushik M. et al. Integrons and antibiotic resistance genes in water-borne pathogens: threat detection and risk assessment //Journal of medical microbiology. – 2019. – Т. 68. – №. 5. – С. 679-692.
159. Hidalgo-Cantabrana C. et al. Bifidobacteria and their health-promoting effects //Bugs as Drugs: Therapeutic Microbes for the Prevention and Treatment of Disease. – 2018. – С. 73-98.
160. Mathipa M.G., Thantsha M.S. Cocktails of probiotics pre-adapted to multiple stress factors are more robust under simulated gastrointestinal conditions than their parental counterparts and exhibit enhanced antagonistic capabilities against Escherichia coli and Staphylococcus aureus //Gut pathogens. – 2015. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-14.
161. Рахматзода Н.Р., Юсупов Х.А. Пробиотики-альтернатива антибиотикам (обзор) //Известия Академии наук Республики Таджикистан. Отделение биологических и медицинских наук. – 2017. – №. 1. – С. 57-62.
162. Стоянова Л.Г., Сорокина Е.В., Дбар С.Д. Скрининг перспективных штаммов Lactococcus lactis subsp. lactis для создания нетоксичных антимикотиков // Проблемы медицинской микологии.-2020.-Т.22.-№.4.-С. 46-53.
163. Kato K. et al. Age-related changes in the composition of gut Bifidobacterium species //Current microbiology. – 2017. – Т. 74. – №. 8. – С. 987-995.
164. Pokusaeva K., Fitzgerald G.F., van Sinderen D. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria //Genes & nutrition. – 2011. – Т. 6. – №. 3. – С. 285-306.
165. Duranti S. et al. Evaluation of genetic diversity among strains of the human gut commensal Bifidobacterium adolescentis //Scientific reports. – 2016. – Т. 6. – №.

1. – С. 1-10.
166. Lugli G.A. et al. Tracking the taxonomy of the genus *Bifidobacterium* based on a phylogenomic approach // *Applied and environmental microbiology*. – 2018. – Т. 84. – №. 4. – С. e02249-17.
167. Fushinobu S., Abou Hachem M. Structure and evolution of the bifidobacterial carbohydrate metabolism proteins and enzymes // *Biochemical Society Transactions*. – 2021. – Т. 49. – №. 2. – С. 563-578.
168. Feng Y. et al. An examination of data from the American Gut Project reveals that the dominance of the genus *Bifidobacterium* is associated with the diversity and robustness of the gut microbiota // *Microbiologyopen*. – 2019. – Т. 8. – №. 12. – С. e939.
169. Turrone F. et al. Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Т. 107. – №. 45. – С. 19514-19519.
170. Egan M. et al. Metabolism of sialic acid by *Bifidobacterium breve* UCC2003 // *Applied and environmental microbiology*. – 2014. – Т. 80. – №. 14. – С. 4414-4426.
171. Turrone F. et al. Glycan cross-feeding activities between bifidobacteria under in vitro conditions // *Frontiers in microbiology*. – 2015. – Т. 6. – С. 1030.
172. Kelly S.M. et al. Bifidobacterial biofilm formation is a multifactorial adaptive phenomenon in response to bile exposure // *Scientific reports*. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 1-14.
173. Azad M. et al. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview // *BioMed research international*. – 2018. – Т. 2018.
174. Lim H.J., Shin H.S. Antimicrobial and immunomodulatory effects of bifidobacterium strains: a review // *Journal of microbiology and biotechnology*. – 2020. – Т. 30. – №. 12. – С. 1793–1800.
175. Жакслыкова С.А., Хабибуллин Р.Э., Яковлева Г.Ю., Решетник О.А. Биохимическая активность бифидобактерий в отношении говяжьих субпродуктов 2 категории // *Вестник Казанского технологического университета*. – 2013. – Т. 16. – №. 11. – С. 202-206.
176. Deguchi Y., Morishita T., Mutai M. Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria // *Agricultural and biological chemistry*. – 1985. – Т. 49. – №. 1. – С. 13-19.

177. Solopova A. et al. Riboflavin Biosynthesis and Overproduction by a Derivative of the Human Gut Commensal *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 //Frontiers in microbiology. – 2020. – Т. 11. – С. 2167.
178. Rossi M., Amaretti A., Raimondi S. Folate production by probiotic bacteria //Nutrients. – 2011. – Т. 3. – №. 1. – С. 118-134.
179. Sun S. et al. *Bifidobacterium* alters the gut microbiota and modulates the functional metabolism of T regulatory cells in the context of immune checkpoint blockade //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – Т. 117. – №. 44. – С. 27509-27515.
180. Duranti S. et al. *Bifidobacterium adolescentis* as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA //Scientific reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 1-13.
181. Behera S.S., Ray R.C., Zdolec N. *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods //BioMed Research International. – 2018. – Т. 2018. – с. 9361614.
182. Heeney D.D., Gareau M.G., Marco M.L. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? //Current opinion in biotechnology. – 2018. – Т. 49. – С. 140-147.
183. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes. Editors: Paul Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W.B. Whitman. Springer-Verlag New York.– 2009.-С.1450.
184. Potočnjak M. et al. Three new *Lactobacillus plantarum* strains in the probiotic toolbox against gut pathogen *Salmonella enterica* serotype Typhimurium //Food technology and biotechnology. – 2017. – Т. 55. – №. 1. – С. 48-54.
185. Mulaw G. et al. Protective effect of potential probiotic strains from fermented Ethiopian food against *Salmonella typhimurium* DT104 in mice //International journal of microbiology. – 2020. – Т. 2020.
186. Лойко Н.Г., Краснова М.А., Пичугина Т.В., Гриневич А.И., Ганина В.И., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Изменение диссоциативного спектра популяций молочнокислых бактерий при воздействии антибиотиков //Микробиология. – 2014. – Т. 83. – №. 3. – С. 284-294.
187. Wasfi R. et al. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans* //Journal of cellular and

- molecular medicine. – 2018. – Т. 22. – №. 3. – С. 1972-1983.
188. Li S. et al. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315 // *Journal of Dairy Science*. – 2014. – Т. 97. – №. 12. – С. 7334-7343.
189. Gibson G. R., Roberfroid M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics // *The Journal of nutrition*. – 1995. – Т. 125. – №. 6. – С. 1401-1412.
190. Gibson G.R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics // *Nutrition research reviews*. – 2004. – Т. 17. – №. 2. – С. 259-275.
191. Храпцов А.Г. и др. Пребиотики как функциональные пищевые ингредиенты: терминология, критерии выбора и сравнительной оценки, классификация // *Вопросы питания*.-2018.-Т.87.-№.1.-С. 5-17.
192. Xavier-Santos D. et al. Impact of probiotics and prebiotics targeting metabolic syndrome // *Journal of Functional Foods*. – 2020. – Т. 64. – С. 103666.
193. Shramko M.I., Lodygin A.D., Evdokimov I.A., Sushinskaya N.V. and Kurchenko V.P. Influence of oligochitosans and highly molecular chitosan on *Lactobacillus Bulgaricus* cultivation // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. –2020. – Т.548. – С.082066.
194. Радиф З.Х., Анохина Е.П., Синюкова Ю.П., Корнеева О.С. Ферментативная деструкция маннанов растительного сырья: выбор ферментного препарата и исследование бифидогенной активности гидролизатов // *Вестник Воронежского государственного университета*. Серия: Химия. Биология. Фармация.–2018.– №.3. – С. 199-204.
195. Храпцов А.Г., Лодыгин А.Д., Родная А.Б. Современные технологии синтеза галактоолигосахаридов из лактозы молочного сырья для продуктов функционального питания нового поколения // *Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета*.-2008.-№.3.-С.63-67.
196. Костина В.В., Евдокимов И.А., Шрамко М.И. Функциональные олигосахариды на основе лактозы, сахарозы и растительных полисахаридов: характеристика, способы получения и перспективы // *Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета*. – 2011. – №. 3. – С. 99-103.
197. Евдокимов И.А., Лодыгин А.Д., Анисимов Г.С. Создание российских

- высокотехнологичных производств лактозы и лактулозы для импортозамещения в медицине, ветеринарии, детском и лечебно-профилактическом питании //В сборнике: Новейшие достижения в области медицины, здравоохранения и здоровье сберегающих технологий. Сборник материалов I Международного конгресса.-2022.-С.133-136.
198. Wan X. et al. The physiological functions and pharmaceutical applications of inulin: A review //Carbohydrate Polymers. – 2020. – Т. 246. – С. 116589.
199. Коденцова В.М., Леоненко С.Н., Бекетова Н.А., Кошелева О.В., Вржесинская О.А., Сокольников А.А., Шевякова Л.В., Рисник Д.В. Инулин как компонент обогащенных пищевых продуктов: влияние на микронутриентный статус организма // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.-2022.-Т.25.-№.3.-С.34-42.
200. Oswari H. et al. Dosage-related prebiotic effects of inulin in formula-fed infants //Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition. – 2019. – Т. 22. – №. 1. – С. 63-71.
201. Asadpoor M. et al. Anti-pathogenic functions of non-digestible oligosaccharides in vitro //Nutrients. – 2020. – Т. 12. – №. 6. – С. 1789.
202. J. Ekvall et al. Optimization of extraction methods for determination of the raffinose family oligosaccharides in leguminous vine peas (*Pisum sativum* L.) and effects of blanching // Journal of Food Composition and Analysis. – 2007. – Т. 20. – С. 13–18.
203. Amorim C. et al. In vitro fermentation of raffinose to unravel its potential as prebiotic ingredient //Lwt. – 2020. – Т. 126. – С. 109322.
204. Пономарев В.А., Лодыгин А.Д. бифидогенные концентраты с заданными функциональными свойствами //Молочная промышленность. –2010. –№.1. – С.64.
205. Rycroft C.E. et al. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides //Journal of applied microbiology. – 2001. – Т. 91. – №. 5. – С. 878-887.
206. Collins S.L. et al. Promising prebiotic candidate established by evaluation of lactitol, lactulose, raffinose, and oligofructose for maintenance of a lactobacillus-dominated vaginal microbiota //Applied and environmental microbiology. – 2018. – Т. 84. – №. 5. – С. e02200-17.
207. Yang Z.D. et al. Isomaltulose Exhibits Prebiotic Activity, and Modulates Gut

- Microbiota, the Production of Short Chain Fatty Acids, and Secondary Bile Acids in Rats //Molecules. – 2021. – Т. 26. – №. 9. – С. 2464.
208. van Zanten G.C. et al. The effect of selected synbiotics on microbial composition and short-chain fatty acid production in a model system of the human colon.// PLoS One. – 2012.- Т.7. - №10.- С. e47212.
209. Machado I. et al. Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition //Food Research International. – 2020. – Т. 127. – С. 108754.
210. Rashmi H.B., Negi P.S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits //Food Research International. – 2020. – Т. 136. – С. 109298.
211. Lopes S.M.S. et al. Chemical characterization and prebiotic activity of fructooligosaccharides from Stevia rebaudiana (Bertoni) roots and in vitro adventitious root cultures //Carbohydrate polymers. – 2016. – Т. 152. – С. 718-725.
212. Van den Abbeele P. et al. In Vitro Evaluation of Prebiotic Properties of a Commercial Artichoke Inflorescence Extract Revealed Bifidogenic Effects //Nutrients. – 2020. – Т. 12. – №. 6. – С. 1552.
213. Mariano T.B. et al. Prebiotic fructooligosaccharides obtained from escarole (Cichorium endivia L.) roots //Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. – 2020. – Т. 24. – С. 100233.
214. Tadayoni M., Sheikh-Zeinoddin M., Soleimanian-Zad S. Isolation of bioactive polysaccharide from acorn and evaluation of its functional properties //International journal of biological macromolecules. – 2015. – Т. 72. – С. 179-184.
215. Кареткин Б.А. Комплексная переработка клубней топинамбура с получением фруктанов и пробиотического продукта для животных : дис. – Воронежский государственный университет инженерных технологий, 2013.
216. Старовойтов В.И. и др. Топинамбур – культура многоцелевого использования // Пищевая промышленность. – 2013. – №. 4. – С. 22-25.
217. Sasaki H. et al. Combinatorial Effects of Soluble, Insoluble, and Organic Extracts from Jerusalem Artichokes on Gut Microbiota in Mice //Microorganisms. – 2020. – Т. 8. – №. 6. – С. 954.
218. Glatter M. et al. Modification of the equine gastrointestinal microbiota by Jerusalem artichoke meal supplementation //Plos one. – 2019. – Т. 14. – №. 8. – С. e0220553.

219. Horochowska M. et al. Topinambour–nutritional and medical properties of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) // *Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism*. – 2017. – Т. 23. – №. 1.
220. Sawicka B. et al. Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as a medicinal plant and its natural products // *Cellular and Molecular Biology*. – 2020. – Т. 66. – №. 4. – С. 160-177.
221. Chan Y.S. et al. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock) // *Inflammopharmacology*. – 2011. – Т. 19. – №. 5. – С. 245-254.
222. Электронный ресурс: <https://pharmacopoeia.ru/fs-2-5-0025-15-lopuha-korni/>
дата обращения 16.08.2021
223. LI Y. et al. The Experimental Study of the Effect of Anti-decrepitude of *Arctium lappa* L // *LiShiZhen Medicine and Materia Medica Research*. – 2004. – Т. 9.
224. Qiu T. et al. Effects of Saccharides from *Arctium lappa* L. Root on FeCl₃-Induced Arterial Thrombosis via the ERK/NF- κ B Signaling Pathway // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2020. – Т. 2020. – С. 7691352
225. Watanabe A. et al. Effect of dose and timing of burdock (*Arctium lappa*) root intake on intestinal microbiota of mice // *Microorganisms*. – 2020. – Т. 8. – №. 2. – С. 220.
226. Yen C.H. et al. Beneficial effect of Burdock complex on asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects: A randomized, double-blind placebo-controlled clinical trial // *Helicobacter*. – 2018. – Т. 23. – №. 3. – С. e12469.
227. Wang Y. et al. Structural characterization of water-soluble polysaccharide from *Arctium lappa* and its effects on colitis mice // *Carbohydrate polymers*. – 2019. – Т. 213. – С. 89-99.
228. Shi Y. et al. In vitro digestibility and prebiotic potential of curdlan (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan oligosaccharides in *Lactobacillus* species // *Carbohydrate polymers*. – 2018. – Т. 188. – С. 17-26.
229. Rodriguez-Colinas B. et al. Analysis of fermentation selectivity of purified galacto-oligosaccharides by in vitro human faecal fermentation // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2013. – Т. 97. – №. 13. – С. 5743-5752.
230. Вальшев А.В., Головченко В.В. Пребиотическая активность пектинов и их производных // *Бюллетень Оренбургского научного центра УРО РАН*. – 2012. – №. 3. – С. 5.

231. Ragab T.I. M. et al. Antitumor and prebiotic activities of novel sulfated acidic polysaccharide from ginseng //Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2018. – Т. 14. – С. 402-409.
232. Cardarelli H.R. et al. Functional petit-suisse cheese: measure of the prebiotic effect //Anaerobe. – 2007. – Т. 13. – №. 5-6. – С. 200-207.
233. Бучахчян Ж.В., Алиева Л.Р., Куликова И.К., Евдокимов И.А., Каледина М.В., Жигулина О.В. Сравнение пребиотической активности производных хитозана и лактозы //Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2011. – №. 73.-С.125-136.
234. Huebner J., Wehling R.L., Hutkins R.W. Functional activity of commercial prebiotics //International Dairy Journal. – 2007. – Т. 17. – №. 7. – С. 770-775.
235. Praveen M.A. et al. Dietary fiber from Indian edible seaweeds and its in-vitro prebiotic effect on the gut microbiota //Food Hydrocolloids. – 2019. – Т. 96. – С. 343-353.
236. Zhang S. et al. Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin //Food chemistry. – 2018. – Т. 244. – С. 232-237.
237. Banerjee D., Chowdhury R., Bhattacharya P. Optimization of extraction process of inulin from Indian millets (jowar, bajra and ragi)—characterization and cost analysis //Journal of food science and technology. – 2017. – Т. 54. – №. 13. – С. 4302-4314.
238. ГОСТ Р 56201-2014. ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ. Методы определения бифидогенных свойств. В кн.: Электронный фонд нормативно-технической документации [Электронный ресурс]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200114185>. Введен 2016.01.01.
239. Анохина Е.П., Корнеева О.С., Черемушкина И.В., Шуваев П.В. Исследование пребиотической активности гидролизатов маннана в условиях in vitro // Вестник ВГУИТ. – 2013.- №. 4. – с. 219-222.
240. Корнеева О. С. и др. Исследование бифидогенной активности тагатозы и фукозы //Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2012. – №. 1. – С. 107-110.
241. Конева Е. Л., Аминина Н. М., Валентинович Я. Е. Бифидогенные свойства продуктов переработки бурых водорослей //Известия ТИПРО

- (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра).
– 2010. – Т. 161. – С. 303-308.
242. Журлова Е.Д., Капрельянц Л.В. Исследование пребиотической активности ксилоолигосахаридов из пшеничных и ржаных отрубей *in vitro* //ScienceRise. – 2015. – Т. 4. – №. 1 (9). – с. 79-84.
243. Son S.J. et al. Effect of the *Lactobacillus rhamnosus* strain GG and tagatose as a synbiotic combination in a dextran sulfate sodium-induced colitis murine model //Journal of dairy science. – 2019. – Т. 102. – №. 4. – С. 2844-2853.
244. Krumbeck J.A. et al. Probiotic *Bifidobacterium* strains and galactooligosaccharides improve intestinal barrier function in obese adults but show no synergism when used together as synbiotics //Microbiome. – 2018. – Т. 6. – №. 1. – С. 1-16.
245. Henrique-Bana F.C. et al. In vitro effects of *Bifidobacterium lactis*-based synbiotics on human faecal bacteria //Food Research International. – 2020. – Т. 128. – С. 108776.
246. Ruiz L. et al. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT7210 (*B. infantis* IM-1®) Displays In Vitro Activity against Some Intestinal Pathogens //Nutrients. – 2020. – Т. 12. – №. 11. – С. 3259.
247. Valdés-Varela L. et al. Effect of *Bifidobacterium* upon *Clostridium difficile* growth and toxicity when co-cultured in different prebiotic substrates //Frontiers in microbiology. – 2016. – Т. 7. – С. 738.
248. Śliżewska K., Chlebicz-Wójcik A. The in vitro analysis of prebiotics to be used as a component of a synbiotic preparation //Nutrients. – 2020. – Т. 12. – №. 5. – С. 1272.
249. Kok C.R. et al. An in vitro enrichment strategy for formulating synergistic synbiotics //Applied and environmental microbiology. – 2019. – Т. 85. – №. 16. – С. e01073-19.
250. Williams C.F. et al. Comparative analysis of intestinal tract models //Annual review of food science and technology. – 2015. – Т. 6. – С. 329-350.
251. van Rijn J.M. et al. Novel approaches: Tissue engineering and stem cells–In vitro modelling of the gut //Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. – 2016. – Т. 30. – №. 2. – С. 281-293.
252. Wang X. et al. Prebiotic supplementation of in vitro fecal fermentations inhibits proteolysis by gut bacteria, and host diet shapes gut bacterial metabolism and

- response to intervention //Applied and environmental microbiology. – 2019. – Т. 85. – №. 9. – С. e02749-18.
253. Ryan J.J. et al. Impact of 2'-Fucosyllactose on Gut Microbiota Composition in Adults with Chronic Gastrointestinal Conditions: Batch Culture Fermentation Model and Pilot Clinical Trial Findings //Nutrients. – 2021. – Т. 13. – №. 3. – С. 938.
254. Feria-Gervasio D. et al. In vitro maintenance of a human proximal colon microbiota using the continuous fermentation system P-ECSIM //Applied microbiology and biotechnology. – 2011. – Т. 91. – №. 5. – С. 1425-1433.
255. Cinquin C. et al. New three-stage in vitro model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota //FEMS microbiology ecology. – 2006. – Т. 57. – №. 2. – С. 324-336.
256. Cha K.H. et al. Effects of fermented milk treatment on microbial population and metabolomic outcomes in a three-stage semi-continuous culture system //Food chemistry. – 2018. – Т. 263. – С. 216-224.
257. Liu Y., Gibson G. R., Walton G. E. A three-stage continuous culture approach to study the impact of probiotics, prebiotics and fat intake on faecal microbiota relevant to an over 60 s population //Journal of Functional Foods. – 2017. – Т. 32. – С. 238-247.
258. Paul S.I. et al. Identification of marine sponge-associated bacteria of the Saint Martin's island of the Bay of Bengal emphasizing on the prevention of motile *Aeromonas septicemia* in *Labeo rohita* //Aquaculture. – 2021. – Т. 545. – С. 737156.
259. Diacovich L. et al. The infectious intracellular lifestyle of *Salmonella enterica* relies on the adaptation to nutritional conditions within the *Salmonella*-containing vacuole //Virulence. – 2017. – Т. 8. – №. 6. – С. 975-992.
260. Castro V.S. et al. Inactivation of Multi-Drug Resistant Non-Typhoidal *Salmonella* and Wild-Type *Escherichia coli* STEC Using Organic Acids: A Potential Alternative to the Food Industry //Pathogens. – 2020. – Т. 9. – №. 10. – С. 849.
261. Lo T.S., Borchardt S. M. Antibiotic-associated diarrhea due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* //Diagnostic microbiology and infectious disease. – 2009. – Т. 63. – №. 4. – С. 388-389.
262. Конон А.Д. и др. Особенности биотехнологий клостридиальных

- коллагеназ-перспективных ферментов медицинского назначения //Медицина экстремальных ситуаций. – 2016. – №. 2 (56). – С. 45-57.
263. Домотенко Л.В., Шепелин А.П. Бифидум-среда для выделения и культивирования бифидобактерий // Инфекция и иммунитет. 2014. №.3. [электронный ресурс] URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/bifidum-sreda-dlya-vydeleniya-i-kultivirovaniya-bifidobakteriy> (дата обращения: 21.05.2022).
264. Nebra Y., Blanch A.R. A new selective medium for Bifidobacterium spp //Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – Т. 65. – №. 11. – С. 5173-5176.
265. Kateete D.P. et al. Identification of Staphylococcus aureus: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test //Annals of clinical microbiology and antimicrobials. – 2010. – Т. 9. – №. 1. – С. 1-7.
266. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli //Journal of applied Bacteriology. – 1960. – Т. 23. – №. 1. – С. 130-135.
267. Rossi M. et al. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures //Applied and environmental microbiology. – 2005. – Т. 71. – №. 10. – С. 6150-6158.
268. Macfarlane G.T., Macfarlane S., Gibson G.R. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon //Microbial ecology. – 1998. – Т. 35. – №. 2. – С. 180-187.
269. Karetkin B.A. et al. Ultrasonic Extraction of Fructans from the Tubers of Jerusalem Artichoke: Optimization of Conditions, Purification Methods, C-13nmr Spectroscopy of the Product //Proceedings of the 15th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM2015, Ecology, Economics, Education and Legislation, Albena, Bulgaria. – 2015. – С. 18-24.
270. Wack M., Blaschek W. Determination of the structure and degree of polymerisation of fructans from Echinacea purpurea roots //Carbohydrate research. – 2006. – Т. 341. – №. 9. – С. 1147-1153.
271. Шакир И.В., Красноштанова А.А., Парфенова Е.В., Суясов Н.А., Бабусенко Е.С., Смирнова В.Д. Общая биотехнология. Лабораторный практикум: учебное пособие / М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева,.-2008. – 120 С.

272. Scherer R. et al. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices //Food Chemistry. – 2012. – Т. 135. – №. 1. – С. 150-154.
273. Andersen K.E. et al. High-performance capillary electrophoresis with indirect UV detection for determination of α -galactosides in leguminosae and brassicaceae //Journal of agricultural and food chemistry. – 2003. – Т. 51. – №. 22. – С. 6391-6397.
274. Arentoft A.M., Michaelsen S., Sørensen H. Determination of oligosaccharides by capillary zone electrophoresis //Journal of Chromatography A. – 1993. – Т. 652. – №. 2. – С. 517-524.
275. Seong H. et al. Comparative analysis of prebiotic effects of seaweed polysaccharides laminaran, porphyran, and ulvan using in vitro human fecal fermentation //Journal of Functional Foods. – 2019. – Т. 57. – С. 408-416.
276. Yin Y. et al. Comparative analysis of the distribution of segmented filamentous bacteria in humans, mice and chickens //The ISME journal. – 2013. – Т. 7. – №. 3. – С. 615-621.
277. Bartosch S. et al. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota //Applied and environmental microbiology. – 2004. – Т. 70. – №. 6. – С. 3575-3581.
278. Burgos-Edwards A. et al. Effects of gastrointestinal digested polyphenolic enriched extracts of Chilean currants (*Ribes magellanicum* and *Ribes punctatum*) on in vitro fecal microbiota //Food Research International. – 2020. – Т. 129. – С. 108848.
279. Ramirez-Farias C. et al. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii* //British Journal of Nutrition. – 2008. – Т. 101. – №. 4. – С. 541-550.
280. Гордиенко М.Г., Баурин Д.В., Кареткин Б.А., Шакир И.В., Панфилов В.И. Измерения. Статистическая обработка результатов пассивного и активного экспериментов в биотехнологии : учебное пособие. - М. : РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2015. - 105 с.
281. Макаров Р.И. Основы планирования и обработки экспериментальных данных: курс лекций для студентов ВлГУ, обучающихся по направлению 231000.62 "Программная инженерия". Профиль подготовки «Разработка

- программно-информационных систем»: учебное электронное издание. – г. Владимир: ВлГУ, 2014. – 180 с.
282. Ахназарова С.Л., Кафаров В.В. Методы оптимизации эксперимента в химической технологии. - М.: Высшая школа, 1985. - 327 с.
283. Vox G.E.P., Wilson K.B. On the experimental attainment of optimum conditions (with discussion) // Journal of the Royal Statistical Society. – 1951. – Т.13. – С.1–45.
284. Shan H., Yasuda T., Ohkura K. A self adaptive hybrid enhanced artificial bee colony algorithm for continuous optimization problems //BioSystems. – 2015. – Т. 132. – С. 43-53.
285. Roeva O., Zoteva D., Lyubenova V. Escherichia coli Cultivation Process Modelling Using ABC-GA Hybrid Algorithm //Processes. – 2021. – Т. 9. – №. 8. – С. 1418.
286. Roberfroid M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits // The British journal of nutrition. – 2010. – Т. 104. - №. 2. – С. 1–63.
287. Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications // Applied microbiology and biotechnology. – 2002. – Т. 59. - №. 1. – С. 15–32.
288. Charlier C. et al. Interactions between Staphylococcus aureus and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives //International journal of food microbiology. – 2009. – Т. 131. – №. 1. – С. 30-39.
289. Koutsoumanis K.P., Lianou A., Gougouli M. Latest developments in foodborne pathogens modeling // Current Opinion in Food Science. – 2016. – Т. 8. – с. 89 - 98.
290. Hopkins M.J., Cummings J.H., Macfarlane G.T. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources // Journal of Applied Microbiology. – 1998. - Т. 85. - №. 2. – с. 381-386.
291. Перт С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – 1978.
292. Bouguettoucha A., Balannec B., Amrane A. Unstructured models for lactic acid fermentation – a review // Food Technology and Biotechnology. – 2011. – Т. 49. – №. 1. – с. 3-12.
293. Ierusalimskii N.D., Neronova N.M. Quantitative relationship between the concentration of metabolic products and the rate of growth of microorganisms//

- Dokl Akad Nauk SSSR. – 1965. – T.161.-№.6.-c.1437-1440.
294. Baranyi J., Roberts T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food //International journal of food microbiology. – 1994. – T. 23. – №. 3-4. – C. 277-294.
295. Andrews J.F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates //Biotechnology and bioengineering. – 1968. – T. 10. – №. 6. – C. 707-723.
296. Zwietering M.H. et al. A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods //Journal of Industrial Microbiology. – 1993. – T. 12. – №. 3-5. – C. 324-329.
297. Pujol L. et al. Establishing Equivalence for Microbial-Growth-Inhibitory Effects (“Iso-Hurdle Rules”) by Analyzing Disparate *Listeria monocytogenes* Data with a Gamma-Type Predictive Model //Applied and environmental microbiology. – 2012. – T. 78. – №. 4. – C. 1069-1080.
298. Monod J. The growth of bacterial cultures //Annual Reviews in Microbiology. – 1949. – T. 3. – №. 1. – C. 371-394.
299. Nakai S.A., Siebert K.J., Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids// Int. J. of Food Microbiol.-2003.-T.86.-C. 249–255.
300. Hsiao C.P., Siebert K.J., Modelling the inhibitory effects of organic acids on bacteria // Int J Food Microbiol.-1999.-T.47.-C. 189– 201.
301. Halstead F. D. et al. The antibacterial activity of acetic acid against biofilm-producing pathogens of relevance to burns patients //PloS one. – 2015. – T. 10. – №. 9. – C. e0136190.
302. Beier R.C. et al. Interactions of organic acids with *Salmonella* strains from feedlot water-sprinkled cattle //J Food Chem Nanotechnol. – 2017. – T. 3. – №. 2. – C. 60-66.
303. Khangwal I., Shukla P. Potential prebiotics and their transmission mechanisms: Recent approaches // Journal of food and drug analysis.-2019.-T.27.-№.3.-C. 649-656.
304. Nealon N.J., Worcester C.R., Ryan E.P. *Lactobacillus paracasei* metabolism of rice bran reveals metabolome associated with *Salmonella Typhimurium* growth reduction. Journal of applied microbiology 2017, Volum 122, no. 6, C. 1639-1656.

305. Almasaudi S.B. et al., Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*. Saudi journal of biological sciences 2017, Volum 24, issue 6, C. 1255-1261.
306. Lee J.M. et al. β -glucoooligosaccharides derived from barley β -glucan promote growth of lactic acid bacteria and enhance nisin Z secretion by *Lactococcus lactis*. LWT 2020, Volum 122, C. 109014.
307. Sharma R.; Padwad Y. Plant Polyphenols Based Second Generation Synbiotics: Emerging Concepts, Challenges and Opportunities. Nutrition 2020, C. 110785.
308. Zeaiter Z, Regonesi ME, Cavini S, Labra M, Sello G, Di Gennaro P. Extraction and characterization of inulin-type fructans from artichoke wastes and their effect on the growth of intestinal bacteria associated with health. BioMed research international. 2019;2019:1083952.
309. Khramtsov AG. New technological paradigm of the Russian dairy industry: formation principles under globalisation. Foods and raw materials. 2019;7(2):291-300.
310. van Leeuwen S. S. et al. Goat milk oligosaccharides: Their diversity, quantity, and functional properties in comparison to human milk oligosaccharides //Journal of agricultural and food chemistry. – 2020. – T. 68. – №. 47. – C. 13469-13485.
311. Amaretti A. et al. Kinetics and metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 growing on glucose, galactose, lactose, and galactooligosaccharides //Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – T. 73. – №. 11. – C. 3637-3644.
312. Ouhib-Jacobs O. et al. Fructose and glucose mediates enterotoxin production and anaerobic metabolism of *Bacillus cereus* ATCC14579T //Journal of applied microbiology. – 2009. – T. 107. – №. 3. – C. 821-829.
313. Chang J. D. et al. Metabolic profiling reveals nutrient preferences during carbon utilization in *Bacillus* species //Scientific reports. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 1-11.
314. Ohara H., Yahata M. L-Lactic acid production by *Bacillus* sp. in anaerobic and aerobic culture //Journal of fermentation and Bioengineering. – 1996. – T. 81. – №. 3. – C. 272-274.
315. Pinto F. et al. Modeling metabolic interactions in a consortium of the infant gut microbiome //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 2507.
316. Muñoz-Tamayo R. et al. Mathematical modelling of carbohydrate degradation

- by human colonic microbiota //Journal of theoretical biology. – 2010. – Т. 266. – №. 1. – С. 189-201.
317. Lu J. et al. Characterization of *Bacillus cereus* AFA01 Capable of Degrading Gluten and Celiac-Immunotoxic Peptides //Foods. – 2021. – Т. 10. – №. 8. – С. 1725.
318. Swinnen I.A. M. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review //International journal of food microbiology. – 2004. – Т. 94. – №. 2. – С. 137-159.
319. Thomas F. et al. Environmental and gut bacteroidetes: the food connection //Frontiers in microbiology. – 2011. – Т. 2. – С. 93.
320. Общая фармакопейная статья "Определение специфической активности пробиотиков". ОФС.1.7.2.0009.15 "Государственная фармакопея Российской Федерации». XIII издание.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Фотография установки для непрерывного одностадийного культивирования с имитацией условий нисходящего отдела кишечника.

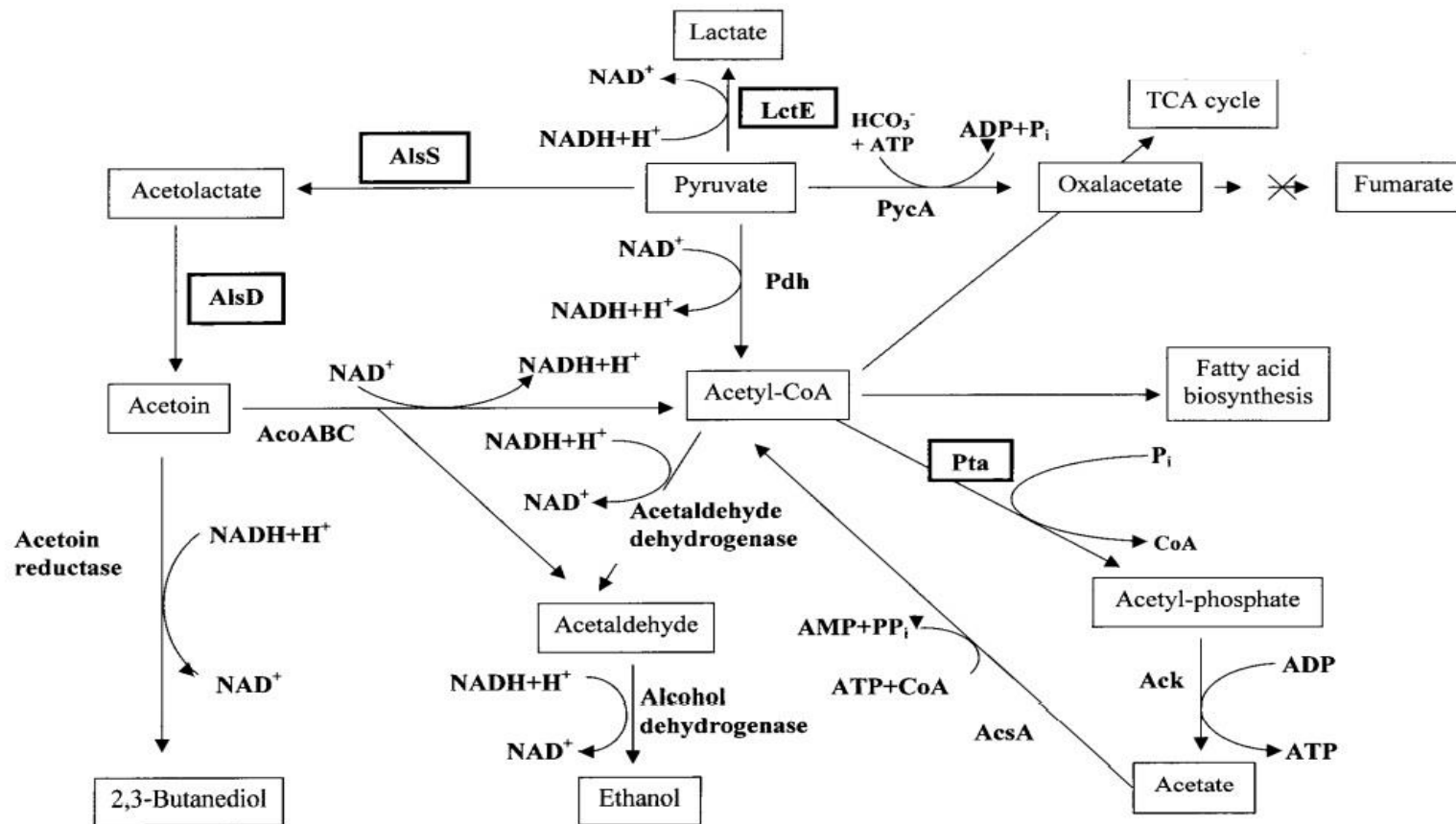


Приложение 2

Фотография установки для трехстадийного непрерывного культивирования с имитацией условий трех отделов толстого кишечника человека: восходящего, поперечного и нисходящего (TSC)



Путь метаболизма бацилл в анаэробных условиях [12]

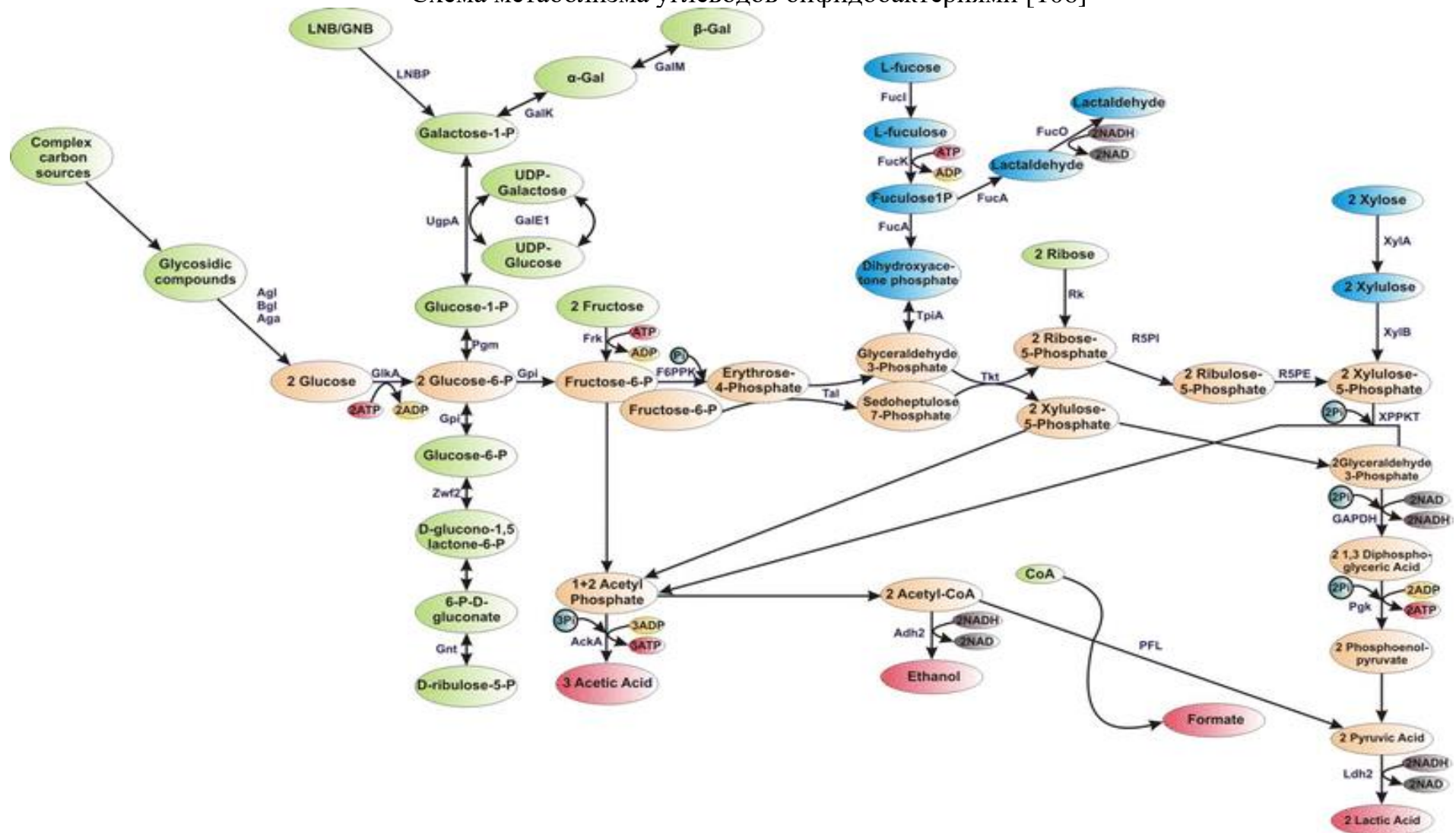


Приложение 4

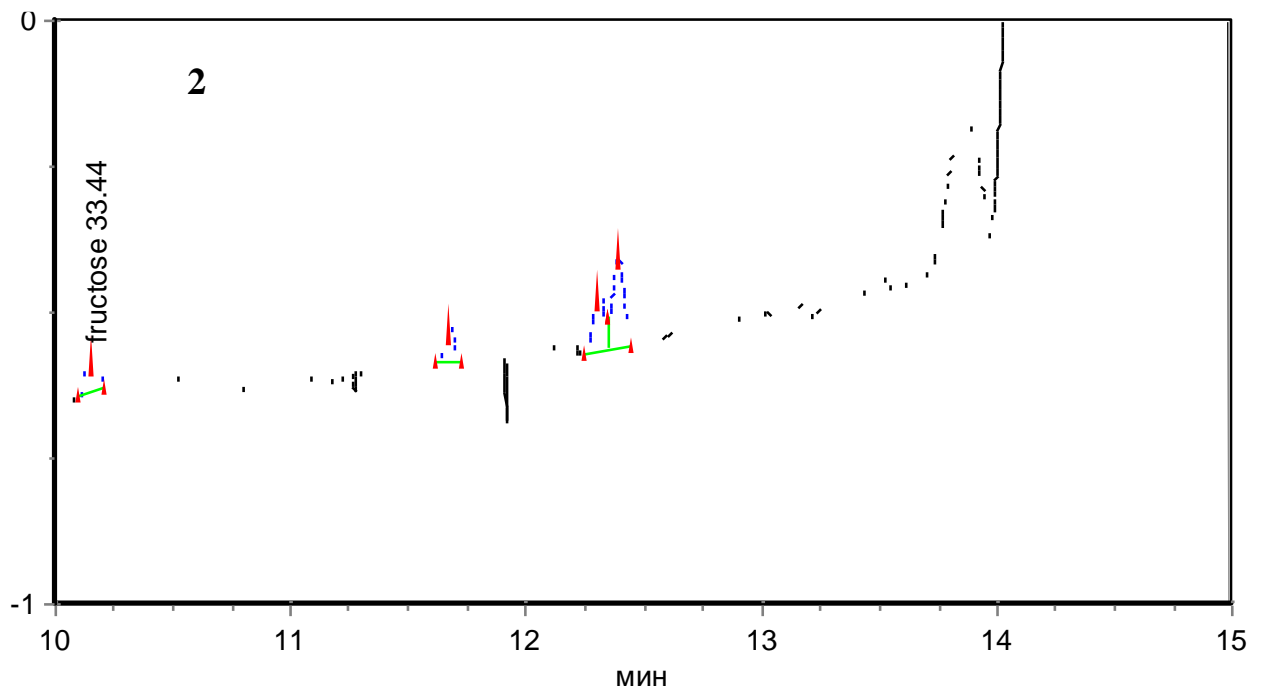
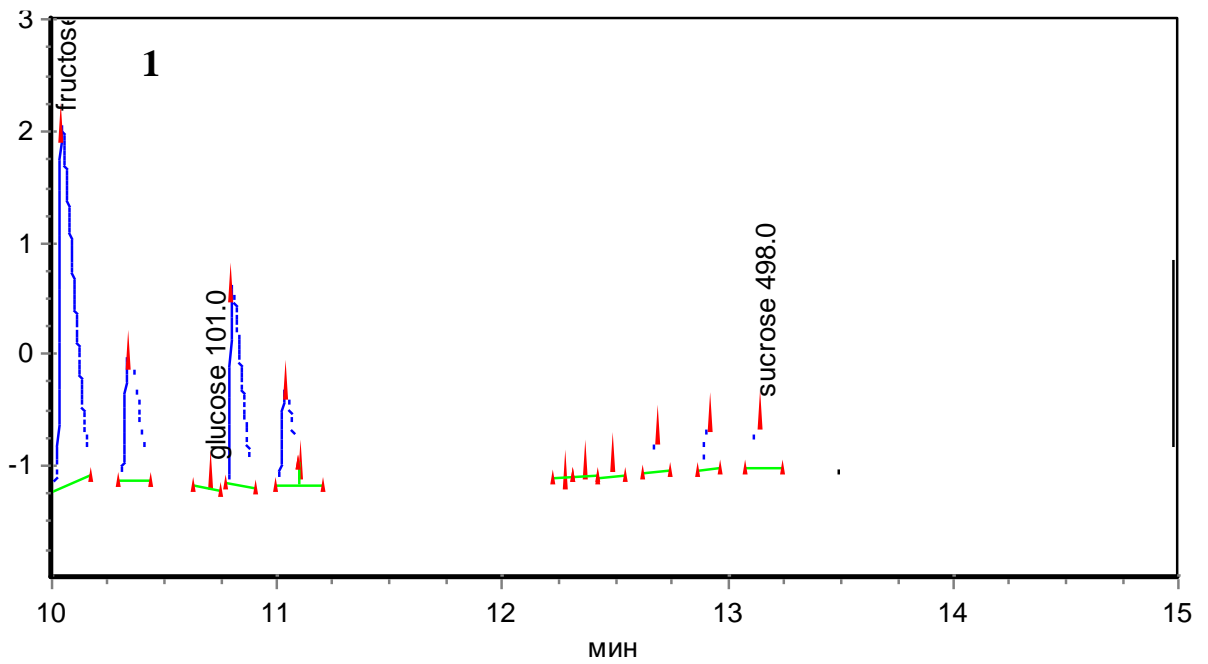
Примеры агломератов бифидобактерий при одностадийном непрерывном культивировании моно-культуры *Bif. adolescentis* (увеличение 100х, масло иммерсионное, ФК)



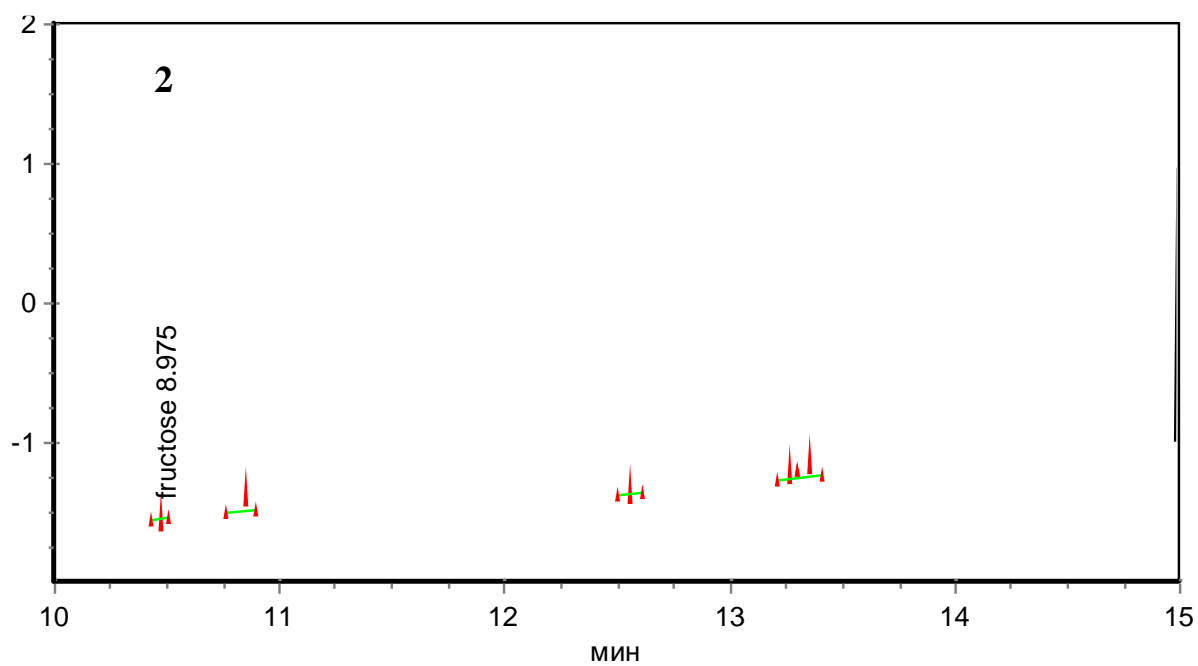
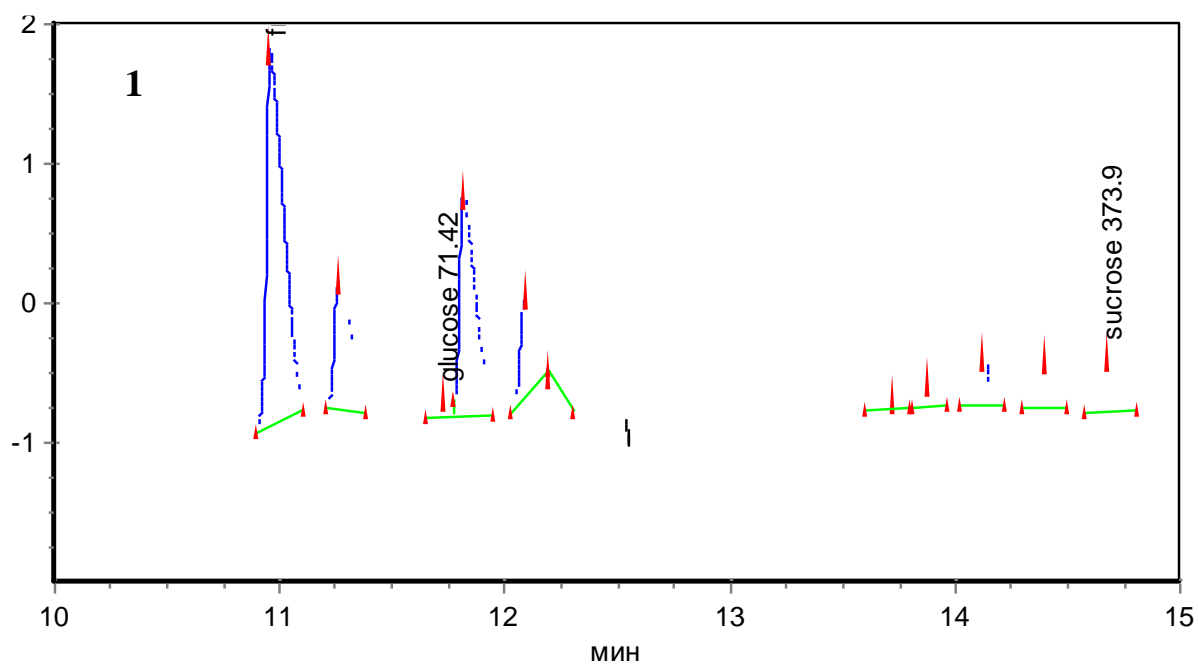
Схема метаболизма углеводов бифидобактериями [106]



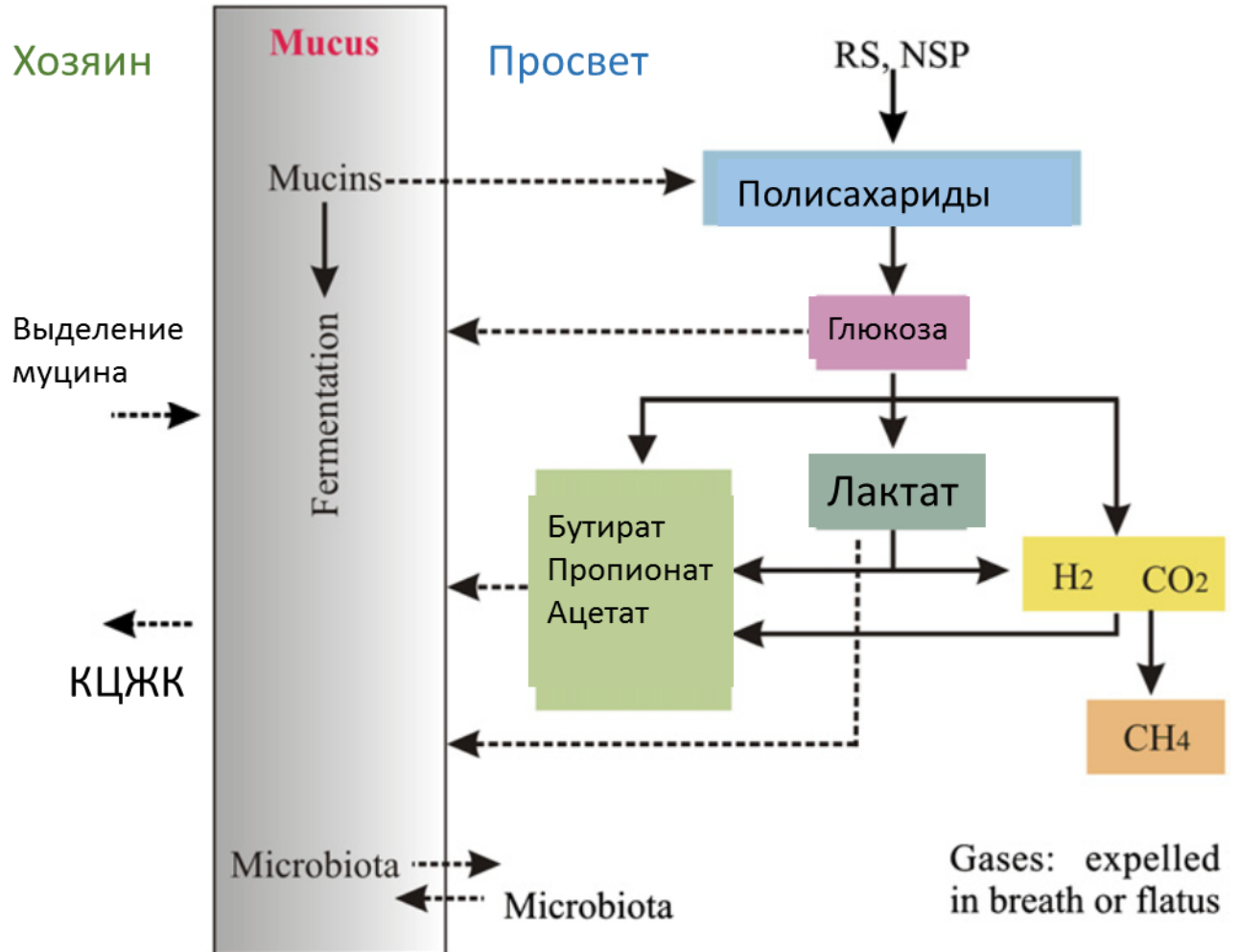
Электрофореграммы определения олигосахаридов при культивировании *Bif. adolescentis* на 12 г/л пребиотика: 1) 0 часов, 2) 25 часов.



Электрофореграммы определения олигосахаридов при культивировании *Bif. adolescentis* на 7 г/л пребиотика: 1) 0 часов, 2) 75 часов.



Основные метаболические связи в микробном сообществе кишечника (приведено по [316])



Акт апробации результатов исследований

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

А.А. Варначев



«24» апреля 2023 г.

АКТ

апробации результатов исследований

Мы, представители предприятия ООО «Пробиофарм» в лице заместителя генерального директора – директора Биотехнологического производства Гелеверя Натальи Владимировны и заместителя генерального директора по качеству Полянской Ольги Викторовны с одной стороны и представитель Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева (РХТУ им. Д.И. Менделеева) в лице заведующего кафедрой биотехнологии Панфилова Виктора Ивановича с другой стороны, настоящим актом подтверждаем, что результаты исследований, отраженные в публикациях Евдокимовой Светланы Александровны (S. A. Evdokimova, V. S. Nokhaeva, B. A. Karetkin et al. A study on the synbiotic composition of bifidobacterium bifidum and fructans from arctium lappa roots and helianthus tuberosus tubers against staphylococcus aureus // Microorganisms. — 2021. — Vol. 9. — P. 930; S. Evdokimova, B. Karetkin, M. Zhurikov et al. Antagonistic activity of synbiotics: Response surface modeling of various factors // Foods and Raw Materials. — 2022. — Vol. 2. — P. 365–376), а также в диссертационной работе Евдокимовой С.А. обладают коммерческим потенциалом и приняты к апробации на предприятии.

От ООО «Пробиофарм»

От РХТУ им. Д.И. Менделеева

Зам. генерального директора –
директор БТП

Зав. кафедрой биотехнологии

Гелеверь / Н.В. Гелеверя

Панфилов / В.И. Панфилов

Зам. генерального директора по качеству

Полянская / О.В. Полянская