

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности «6D060700 – Биология»

Изучение влияния пищевых волокон на биологические свойства лактобактерий

Амирханова Жанерке Талгаткызы

Актуальность темы исследования. В настоящее время на рынке Казахстана представлено большое количество отечественных и зарубежных молочнокислых продуктов и пробиотиков с добавлением пищевых волокон, которые используются с заявленными свойствами о пользе для здоровья, основанными на пробиотических характеристиках выбранных штаммов молочнокислых бактерий.

Эффективность синбиотических препаратов и продуктов функционального питания в первую очередь зависит от биологических свойств, входящих в их состав видов различных штаммов молочнокислых бактерий. Одним из основных компонентов стартерных культур для подобных продуктов и препаратов чаще всего являются молочнокислые палочки с доказанными специфическими позитивными эффектами на макроорганизм и пребиотические субстанции, повышающие селективные преимущества нормофлоры пищеварительного тракта и ее биологическую активность.

Молочнокислые палочки, наравне с другими представителями нормальной микробиоты слизистой оболочки человека играют ключевую роль антиинфекционной защиты организма и в формировании колонизационной резистентности макроорганизма. В современной биомедицинской практике могут быть использованы как методы персонализированной медицины: пробиотическая культура молочнокислых палочек проявляет антимикробную активность к патогенной флоре пациента, стимулирует антагонизм и не ингибируется патогенами. Полезными свойствами молочнокислых палочек является их способность образовывать биопленки, что позволяет им противостоять условиям окружающей среды, что приводит к успешной колонизации и поддержанию их популяции. Согласно современным представлениям, биопленка – это сообщество микроорганизмов, прикрепленных поверхностью друг к другу и заключенных в матрикс, состоящий из синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ из полисахаридов, белков. Образование биопленки пробиотическими бактериями, такими как молочнокислые палочки считается полезным свойством, поскольку способствует колонизации и более длительному постоянству в слизистой оболочке хозяина, избегая колонизации патогенными бактериями. Установленный наукой феномен о защитной функции биопленки лактобацилл перспективен для применения в медицинской, фармацевтической, пищевой и сельскохозяйственной промышленности, что является приоритетными для Республики Казахстан.

В связи с этим, поиск и изучение пробиотических свойств отечественных конкурентоспособных стартерных культур выделенных из традиционно натуральных этнопродуктов, произведенных кустарным традиционным способом, является эффективным способом для получения генетически стабильных штаммов пробиотических культур, как постоянного источника штаммов культур для нужд страны с целью повышения качества микробиологических ресурсов в коллекциях.

При производстве синбиотических препаратов и кисломолочных продуктов требуется учитывать влияние пребиотических субстанций на рост, размножение и биологические свойства стартерных культур.

В настоящее время подбор стартерных культур и пребиотических субстанции преимущественно осуществляется эмпирическим путем, в основе которого лежит опыт, накопленный годами. В связи с этим, изучение биологических свойств генетически стабильных, отечественных конкурентоспособных стартовых культур, в том числе в присутствии пребиотических субстанций, является актуальной, интересной задачей и определяет приоритеты исследований при планировании и выполнении настоящей диссертационной работы.

Цель исследования – изучение влияния пищевых волокон на биологические свойства лактобактерий (*in vitro*).

Для достижения цели были сформулированы следующие задачи:

1. Выделить и идентифицировать чистые культуры изолятов молочнокислых палочек из молочнокислых этнопродуктов, произведенных кустарным способом из разных районов Карагандинской области, отобрать изоляты молочнокислых палочек наиболее способные к синтезу экзополисахаридов.

2. Оценить биопленкообразующую способность и спектр антимикробной активности изолятов молочнокислых палочек, изучить морфологию клеток лактобацилл в биопленке с помощью лазерной захватывающей микродиссекции.

3. Изучить влияние растворимых и не растворимых пищевых волокон на рост изолятов молочнокислых палочек, определить жизнеспособность клеток молочнокислых палочек при хранении их в питательной среде с добавлением растворимых и не растворимых пищевых волокон.

4. Определить адгезивные свойства изолятов молочнокислых палочек. Исследовать устойчивость молочнокислых палочек к низким значениям рН среды.

5. Исследовать биопленкообразующие свойства изолятов лактобацилл с использованием метода микрокультивирования на модифицированной питательной среде с помощью атомно-силовой микроскопии.

Научная новизна исследования. Создана коллекция молочнокислых палочек отечественных конкурентоспособных стартерных культур, выделенных из молочнокислых натуральных этнопродуктов, произведенных кустарным способом из регионов Карагандинской области, преимущественно выделенные изоляты молочнокислых палочек способны к синтезу экзополисахаридов.

Впервые используя метод лазерной микродиссекции, изучили биопленкообразующие свойства выделенных изолятов молочнокислых палочек.

Получены новые экспериментальные данные по влиянию растворимых и нерастворимых пищевых волокон на адгезивные свойства молочнокислых палочек: показатель влияние инулина – ИАМ $14,2 \pm 0,39$, влияние пектина – ИАМ $13,1 \pm 0,43$, клетчатки льна – ИАМ $19,4 \pm 0,37$, семян льна ИАМ $-17,5 \pm 0,27$.

Метод лазерной микродиссекции позволил доказать на снимках, что нерастворимые пищевые волокна, у которых самый высокий ИАМ (льняная клетчатка и семена льна) на которых культивировались лактобактерии приводит к аутоагрегации (способность формировать скопления (агрегаты)) клетки изолята *Lh13*, на семенах льна наблюдали феномен когезии (слипания клеток) изолята *Lh13*. Агрегация и когезия способствуют формированию биопленки.

Впервые установили разницу шероховатости поверхности биопленки, выращенной на модифицированной среде с добавлением пищевых волокон, с использованием атомно-силовой микроскопии.

Теоретическая и практическая значимость результатов. Проведенные исследования подтверждают теоретическую и экспериментальную значимость результатов, взяв за основу выявления лактобактерий с наибольшей продукцией экзополисахаридов была сформирована рабочая коллекция изолятов с активными биологическими свойствами (*Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом №8863 от 17 марта 2020 г., внедрения в учебный процесс*): спектр антимикробной активности, устойчивость молочнокислых палочек к низким значениям pH среды, биопленкообразующая активность, влияние пищевых волокон на адгезивные свойства. Полученные результаты важны для развития микробиологии, а также экспериментальной, пищевой и ветеринарной микробиологии, открывают перспективы широкого практического использования и дальнейшего изучения молочнокислых палочек.

Рабочая коллекция микроорганизмов биолого-географического факультета НАО КарУ им. Е.А. Букетова и кафедры биомедицины НАО «МУК» пополнена 34 изолятами молочнокислых палочек: шесть изолятов *Lactobacillus helveticus* (*Lh-13, Lh-14, Lh-15, Lh-17, Lh-20, Lh-22*), семь изолятов вида *Lacticaseibacillus rhamnosus* (*Lrh-1, Lrh-1/1, Lrh-2э, Lrh-3э, Lrh-24, Lrh-39, Lrh-40*), три изолята вида *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lpl-2/1, Lpl-5, Lpl-89*), десять изолятов *Lacticaseibacillus paracasei* (*Lpc-4, Lpc-5/1, Lpc-28, Lpc-32, Lpc-34, Lpc-35, Lpc-36, Lpc-38, Lpc-37, Lpc-48*), три изолята *Limosilactobacillus fermentum* (*Lf-18, Lf-38/1, Lf-81*), три изолята *Lactobacillus acidophilus* (*Lac-50, Lac-52, Lac-79*), два изолята *Lactobacillus delbrueckii* (*Lacd-53, Lacd-54*).

На основании полученных данных создан атлас пробиотических культур (*Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом №30964 от 9 декабря 2022 г.*) с внедрением в производство ТОО «Нэтиже» Сүт Фабрикасы»).

Предложен новый способ сохранения рабочих коллекционных культур молочнокислых палочек на ферментативной среде с добавлением пищевых волокон (*Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом №35559 от 11 мая 2023 г.*)

В процессе выполнения разработан новый способ пробоподготовки при изучении морфологии лактобактерии и их биопленкообразующих свойств на лазерной захватывающей микродиссекции (*Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом №23592 от 14 февраля 2022 г., внедрен в учебный процесс кафедры биомедицины НАО «МУК», патент на полезную модель N 8042 от 05.05.23 г.*)

Объекты исследования. В работе использованы изоляты молочнокислых палочек (Таблица 1, № 1-7) выделенных из молочнокислых продуктов (Таблица 4, рисунок 1), произведенных кустарным способом из регионов Карагандинской области, эталонные штаммы (Таблица 1, № 8-10) и типовые коллекционные штаммы АТСС (*American Type Culture Collection*) таблица 2, №1-4. Коммерческие пищевые волокна (Таблица 3).

Таблица 1- Исследуемые культуры молочнокислых палочек

№	Наименование микроорганизма	Источник выделения изолята
1	<i>Lactobacillus helveticus</i> (6 изолятов)	Натуральные молочнокислые этнопродукты, произведенные кустарным способом
2	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (7 изолятов)	
3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (3 изолята)	
4	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (10 изолятов)	
5	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> (3 изолята)	
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (3 изолята)	
7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (2 изолята)	
8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> V300	Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов – БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика
9	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
10	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> 86	

Таблица 2 - Тест-штаммы

№	Наименование микроорганизма	Типовые коллекционные штаммы
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Лаборатория микробиома, Центр наук о жизни, ЧУ "National Laboratory Astana", Назарбаев университет
2	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	
3	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	
4	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	

Таблица 3 - Пищевые волокна

Наименование	Технические условия
Инулин	ТУ 9164-030-00493534-2007
Пектин	ТУ 10.963.2.27
Льняная клетчатка	ТУ 19009841.005-2011
Семена льна	ТУ 9198-130-80324188-15

Методы исследования

Микробиологические методы исследования:

- отбор проб из исследуемых образцов, выделение чистой культуры молочнокислых палочек, изучение морфологических свойств (метод серийных разведений, метод окраски по Граму, микроскопия на световом микроскопе);
- изучение культуральных (бактериологический метод) и биохимических свойств молочнокислых бактерий (определение сахаролитических свойств, тест на каталазу, определение активности кислотообразования);
- идентификация молочнокислых палочек с помощью метода времяпролетной *MALDI-TOF* масс-спектрометрии.
- тест на образование экзополисахаридов;
- изучение биопленкообразующих свойств выделенных изолятов лактобацилл в полистироловом планшете (метод *O'Toole*, лабораторный робот *TecanEVolizer100 (Tecan)*);
- изучение морфологии клеток лактобактерии в биопленке с помощью лазерной захватывающей микродиссекции;
- определение спектра антимикробной активности (метод отсроченного антагонизма);
- влияние 1,5% инулина, 1% пектина, 15% льняной клетчатки, 10% семян льна на интенсивность размножения изолятов молочнокислых палочек, (бактериологический метод, культивирования на пищевых волокнах);
- определение жизнеспособности (метод Коха) рабочих культур молочнокислых палочек при сохранении на ферментативной среде с добавлением пищевых волокон;
- определение устойчивости лактобацилл к низким показателям pH среды с добавлением пищевых волокон;
- изучение адгезивной активности (на буккальных эпителиоцитах);
- исследование биопленкообразующих свойств с использованием метода микрокультивирования на модифицированной питательной среде с помощью атомно-силовой микроскопии.

Статистические анализы

Обработку данных проводили с помощью программы MS Office Excel 2010 и Statistica версия 8.0. Все данные представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Для анализа различных значений между контролем и образцами использовали t-критерий Стьюдента при $p < 0,05$.

Для статистической обработки данных исследований и их интерпретации применяли коэффициент корреляции Пирсона, коэффициент ранговой корреляции Спирмена, для проведения множественных сравнений использовали метод Данетта, уравнение регрессии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Выделены из натуральных молочнокислых этнопродуктов 34 (100%) изолятов молочнокислых палочек, методом масс-спектрометрического анализа белковых профилей идентифицированы виды молочнокислых палочек: *Lactobacillus helveticus*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*. Проведен скрининг лактобацилл, фенотипически подтверждающих способность к синтезу экзополисахаридов.

2. Определены биопленкообразующие способности молочнокислых палочек. Установлен антагонизм молочнокислых палочек к тест-штаммам. Впервые на лазерной захватывающей микродиссекции визуализирована морфология микро- и макроколоний лактобактерий в биопленке.

3. В процессе сохранения рабочих культур на питательной среде в течение месяца функции «самоконсервации» выполняют нерастворимые пищевые волокна, это доказано в экспериментах при культивировании: избирательное действие молочнокислых палочек с растворимыми (инулин, пектин) и нерастворимыми пищевыми волокнами (льняная клетчатка, семена льна). Именно последняя пролонгирует сроки сохранения культур молочнокислых палочек при добавлении льняной клетчатки, семян льна в питательную среду.

4. Определен СПА адгезивных свойств молочнокислых палочек на буккальных эпителиоцитах, процессы агрегации и когезии влияют на метаболизм молочнокислых палочек и повышают их устойчивость к низким значениям pH.

5. Исследования на атомно-силовом микроскопе показали, что шероховатость клеток лактобактерии в биопленке различается в модифицированной среде с добавлением 15% льняной клетчатки, от лактобактерии без добавления льняной клетчатки, это связано с различиями в исходной толщине биопленки (чем больше толщина биопленки (нм), тем больше шероховатость).

Декларация личного участия автора. Автор диссертационной работы участвовала во всех этапах исследования: в разработке дизайна исследования, в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, отбор проб, транспортировка, проведению микробиологических исследований в микробиологических лабораториях, интерпретации и оформлении полученных результатов, подготовке рукописей публикаций.

Апробация работы и публикации. Основное содержание диссертации отражено в 9 печатных работах, включая 2 статьи в цитируемых зарубежных журналах по базам Scopus, в 3 статьях рекомендованных КОКСНВО МНВО РК. 1 статья Вестник Медицинского центра управления делами президента РК

(2019г). Ряд работ были представлены и опубликованы в материалах международных конференций, проведенных в Казахстане: «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Караганда 2018 г.), «Ғылым, білім және өндіріс интеграциясы - ұлттық жоспарды жүзеге асырудың негізі» (Караганда, 2019 г); «Фараби әлемі» (Алматы, 2020 г.). По результатам исследования издано 2 методических рекомендации на казахском и русском языках, получены акты внедрения результатов в учебный процесс в университетах НАО «Медицинский университет Караганды», НАО Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова, акт внедрения в производство ТОО «Нәтиже» Сүт Фабрикасы», 4 свидетельства о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом, 1 патент на полезную модель.