

ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ РАСТЕНИЯ ОДУВАНЧИКА И ОЦЕНКА ЕГО ПРОБИОТИЧЕСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Бекмуродова Г.А.

Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан

**E-mail:beegull@mail.ru*

Анотация: В статье представлены результаты исследований по выделению молочнокислых бактерий из одуванчика (*Taraxicum*) для выделения культур с гипогликемическим действием. Изолят, выделенный из цветков одуванчика, классическими методами и масс-спектрометрией MALDI-TOF на биометрическом анализаторе VITEK MS был идентифицирован до вида и отнесен к виду *Apilactibacillus kunkeei*. Культура активно подавляет рост условно-патогенные штаммы *E. coli*, *St. aureus*, синегнойной палочки. Устойчив к высоким количествам NaCl (2,4 и 6 %) и медицинской желчи (0,2, 0,4, 0,6 %). анализировали показатели синтеза свободных аминокислот и водорастворимых витаминов группы В штамма. Анализ подтвержденных свойств позволяет использовать данную культуру в качестве потенциальной пробиотической культуры и на ее основе разрабатывать препараты и биодобавки для применения в медицине и ветеринарии.

Ключевые слова: пробиотические свойства, лактобациллы, антидиабетические свойства, свободный радикал, антиоксидантная активность, свободные аминокислоты, водорастворимые витамины, алиментарная гипергликемия.

ISOLATION OF A LACTIC ACID BACTERIA STRAIN FROM DANDELION PLANT AND EVALUATION OF ITS PROBIOTIC AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Bekmurodova G.A.

Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

**E-mail:beegull@mail.ru*

Abstract: The article presents the results of studies on the isolation of lactic acid bacteria from dandelion (*Taraxicum*) for the isolation of cultures with hypoglycemic action. The isolate, isolated from dandelion flowers, was identified to the species level using classical methods and MALDI-TOF mass spectrometry on a VITEK MS biometric analyzer and assigned to the species *Apilactibacillus kunkeei*. The culture actively inhibits the growth of opportunistic strains of *E. coli*, *St. aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. It is resistant to high amounts of NaCl (2.4 and 6%) and medical bile (0.2, 0.4, 0.6%). The synthesis rates of free amino acids and water-soluble B vitamins

of the strain were analyzed. The analysis of the confirmed properties allows using this culture as a potential probiotic culture and, on its basis, developing drugs and dietary supplements for use in medicine and veterinary science.

Key words: *probiotic properties, lactobacilli, antidiabetic properties, free radical, antioxidant activity, free amino acids, water-soluble vitamins, alimentary hyperglycemia.*

MOMAQAYMOQ O`SIMLIGIDAN SUT ACHITUVCHI BAKTERIYA AJRATISH VA PROBIOTIK VA BIOLOGIK FAOLLIGINI BAHOLASH

Bekmurodova G.A.

*O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Mikrobiologiya instituti, Toshkent, O'zbekiston
E-mail: beegull@mail.ru

Annotatsiya: Maqolada gipoglikemik ta'sirga ega kulturalarni tanlab olish uchun momaqaymoqdan (*Taraxicum*) sut achituvchi bakteriyalarini ajratish bo'yicha tadqiqotlar natijalari keltirilgan. Momaqaymoq gullaridan ajratilgan izolyat klassik usullar va MALDI-TOF massa spektrometriyasi yordamida VITEK MS biometrik analizatori yordamida tur mansubligi aniqlandi va *Apilactibacillus kunkei* turiga mansubligi aniqlandi. Ushbu kultura *E. coli*, *St. aureus*, *Ps. aeruginosa* ga qarshi yuqori antimikrob faollikka ega. NaCl (2,4 va 6%) va safro (0,2. 0,4, 0,6%) ning yuqori miqdoriga chidamli. O'rganilgan xususiyatlarni tahlil qilib, ushbu kultura potentsial probiyotik kultura sifatida ishlatilishi mumkin va uning asosida tibbiyot va veterinariyada foydalanish uchun preparatlar va biologik faol faol qo'shimchalarni ishlab chiqish mumkin.

Kalit so'zlar: *probiyotik xususiyatlar, laktobakteriyalar, diabetga qarshi xususiyatlar, erkin radikal, antioksidant faollik, erkin aminokislotalar, suvda eriydigan vitaminlar, alimentar giperglikemiya.*

ВВЕДЕНИЕ.

Лактобациллы – микроорганизмы, широко распространенные в окружающей среде. Высокая биологическая и функциональная активность штаммов лактобактерий определяет их практическое использование в качестве пробиотиков и в производстве продуктов питания [1].

Сахарный диабет II типа (СД2) является распространенным метаболическим заболеванием, которое привлекло внимание медицинских работников и ученых в связи с его растущей распространенностью и множеством осложнений. СД2 характеризуется повышением уровня глюкозы натощак и гликированного гемоглобина (HbA1c), что свидетельствует о нарушении метаболизма глюкозы [2]. Недавние исследования показывают, что некоторые штаммы молочнокислых бактерий *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum*.

L. gasseri обладает как способностью снижать уровень глюкозы в крови, так и антиоксидантными свойствами и имеет большой потенциал для лечения диабета 2 типа [3,4,5].

Сегодня увеличение количества свободных радикалов в организме лежит в основе различных заболеваний организма, в том числе и сахарного диабета. Поиск новых эффективных методов связывания свободных радикалов и лечения связанных с ними заболеваний является одной из актуальных задач биомедицины. Микроорганизмы обладают системами антиоксидантной защиты, которые позволяют им регулировать уровень свободных радикалов и предотвращать их вредное воздействие на клетки [6]. Система антиоксидантных ферментов микроорганизмов, состоящая из каталазы, пероксидазы, супероксиддисмутазы (СОД), а также различных субстратов, участвующих в обезвреживании свободных радикалов, позволяет рассматривать ее как экзогенную антиоксидантную защиту макроорганизма [7,8].

Изучение белков и витаминов антиоксидантной природы проводится сегодня с большим интересом. В исследованиях было подтверждено, что антиоксидантная активность также присутствует в живых системах из α -аминокислот, строительных блоков белков. Было доказано, что среди 20 различных аминокислот, присутствующих в организме, триптофан, метионин, гистидин, цистеин, аргинин и тирозин проявляют антиоксидантную активность [9].

Антиоксидантные витамины А, С и Е снижены у больных сахарным диабетом, что связано с повышенной потребностью в контроле чрезмерного окислительного стресса, вызванного нарушениями метаболизма глюкозы. Выявлено снижение уровня тиамина, пиридоксина и биотина витаминов группы В, но причины не установлены, и показано, что они опосредуют нарушения метаболического контроля у больных сахарным диабетом.

Цель данного исследования. Является выделение новых штаммов лактобацилл из растений, обладающих антидиабетическими свойствами, и изучение их пробиотических свойств, антиоксидантной и гипогликемической активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Выделение чистых культур из растительной массы проводили по общепринятому методу в селективной для молочнокислых бактерий средах МРС-бульон и МРС-агар (HiMedia, Индия). Образцы были взяты из цветков одуванчика (13, 14).

Антагонистическая активность. Определение антагонистической активности исследуемой культуры против условно-патогенных микроорганизмов проводили методом

диффузии в агар. Для чего условно-патогенные культуры (тест-культуры) засеивались газоном на поверхность твердой среды МПА. Затем дыроколом проделывали лунки в агаре диаметром 0,8 см в которые вносили суспензии испытуемых культур (0,05 мл). Инкубацию проводили при 37°C в течение 24 часов. По зонам отсутствия роста тест-культур вокруг лунок определяли чувствительность испытуемых культур к тест-культурам [10].

Чувствительность к антибиотикам. Определение чувствительности к антибиотикам проводили диско-диффузионным методом. Суточную культуру штамма *A. kunkeei* 1 засеяли газоном на поверхность МРС-агара и накладывали диски антибиотиков. Инкубацию проводили при 37°C в течение 24 часов. По зоне отсутствия роста испытуемой культуры вокруг дисков (мм) судили об их чувствительности к антибиотикам МУК 4.2.2602—10 [11].

Определение устойчивости к желчи и к повышенным концентрациям NaCl в среде. Устойчивость исследуемой культуры к действию желчи, способность к росту при повышенных концентрациях хлорида натрия определяли согласно МУК 4.2.2602—10 [11].

Изучение устойчивости к желудочному соку и соку тонкого кишечника. Выживаемость в присутствии симулированного желудочного сока и симулированного сока тонкого кишечника изучали по методу, описанному в работе [11].

Изучение физиолого-биохимических свойств штаммов. Тест на каталазную активность, на продукцию лецитиназы, гемолизина, желатиназы и амилазы проводили согласно МУК 4.2.2602-10 [11].

Антиоксидантная активность. Суточную культуру *A. kunkeei* 1 разводили свежим МРС-бульоном и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин. Супернатант культуры - культуральную жидкость (КЖ) - использовали для измерения антиоксидантной активности. Затем для получения супернатанта лизата клеток осадок культуры дважды отмывали в изотоническом растворе и ресуспендировали в 0,2 М фосфатном буфере. Полученную бактериальную суспензию подвергали ультразвуковой дезинтеграции (10 циклов обработки длительностью по 30 с, перерывы между ними 1 мин.). Для удаления обломков клеток суспензию центрифугировали 10 мин. при 10000 g. Супернатант лизата клеток (СЛК) использовали для измерения антиоксидантной активности [12].

Об антиоксидантной активности *A. kunkeei* 1 судили по активности связывания свободных оксидных радикалов 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ) по методу Главинда [12]. Тесты проводились в трех повторностях.

Определение продукции штаммами лактобактерий водорастворимых витаминов методом ВЭЖХ. Для определения синтеза водорастворимых витаминов методом ВЭЖХ музейные культуры лактобактерий выращивали в стандартном *Copmplete Defined Medium* (CDM) -бульоне при 37°C в течение 24 часов. ВЭЖХ-анализ водорастворимых витаминов проводили на хроматографе *Agilent Technologies* 1200 на колонке *ExlipseXDBC18* (обращено-фазный), 3,5 мкм, 4,6x150 мм. Детектор диод-матрицы (ДАД), 230, 265, 254, 285 нм. Раствор А: 0,5% уксусная кислота, pH 1,7; В:CH₃CN (ацетонитрил). Скорость потока 0,6 мл/мин. Градиент %В/мин: 0-5 мин/96:4%, 6-8 мин/90:30%, 9-15 мин/80:20%, 15-17 мин/96:4%. Термостат 25°C.

Выделение свободных аминокислот. Осаждение белков и пептидов водного экстракта образцов проводили в центрифужных стаканах. Для этого к 1 мл исследуемому образцу добавляли по 1 мл (точный объем) 20% ТХУК. Через 10 мин осадок отделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 15 минут. Отделив 0,1 мл надосадочной жидкости, лиофильно высушивали. Гидролизат упаривали, сухой остаток растворяли в смеси триэтиламин-ацетонитрил-вода (1:7:1) и высушивали. Эту операцию повторяли дважды для нейтрализации кислоты. Реакцией с фенилтиоизоцианатом получали фенилтиокарбамил-производные (ФТК) аминокислот по методу Steven A., Cohen Daviel. Идентификацию производных аминокислот проводили методом ВЭЖХ. Условия ВЭЖХ: хроматограф *Agilent Technologies* 1200 с DAD детектором, колонке 75x4.6 mm *Discovery HS C18*. Раствор А: 0,14М CH₃COONa + 0,05% ТЭА pH 6,4, В:CH₃CN. Скорость потока 1,2 мл/мин, поглощение 269 нм. Градиент %В/мин: 1-6%/0-2.5мин; 6-30%/2.51-40мин; 30-60%/40,1-45мин; 60-60%/45,1-50мин; 60-0%/50,1-55мин.

Не засеянные среды CDM бульон использовали в качестве контроля.

Модель алиментарной гипергликемии. Через 60 мин после введения препаратов и воды у всех групп животных вызывали острую гипергликемию путем однократного внутрижелудочного введения гипертонического раствора глюкозы в дозе 5000 мг/кг. Содержание сахара (глюкозы) в сыворотке крови определяли через 1 час после вызывания гипергликемии глюкозооксидазным методом с помощью тест набора *Cypress Diagnostic*, Германия [15].

Опытные группы до введения глюкозы получали препараты перорально с помощью желудочного катетера: «Глукейр» в дозе 100 мг/кг, «Природный инулиновый концентрат» в дозе 200 мг/кг. Пробиотики - в дозах 0,5 мл/мышы. Контрольной группе животных вводили перорально очищенную воду в объеме 3 мл.

Расчет дозы препарата «Глукейр»: принимают 1-2 капсулы 2 раза в сутки. Доза для крыс: $(500 \text{ мг} \times 2):70 \times 39$ (коэф. чел.) / $6,0$ (коэф. мыши) = 100 мг/кг .

Расчет дозы БАДа «Природный инулиновый концентрат»: принимают 2-3 капсулы 2-4 раза в день. Доза для мышь: $(800 \text{ мг} \times 4): 70 \times 39$ (коэф. чел.) / $6,0$ (коэф. мыши) = 200 мг/кг .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Культура *Apilactibacillus kunkeei* 1, выделенная с цветков одуванчика: граммположительная, палочки с закругленными концами разной длины, не образует спор. Ширина клеток $0,3\text{--}0,36 \text{ мкм}$, длина $0,7\text{--}1,3 \text{ мкм}$. Колонии круглые, выпуклые, с четким ровным краем, гладкие, блестящие, бело-серого цвета. Диаметр колоний от $0,8$ до $1,2 \text{ мм}$. Бактерии вырабатывают молочную кислоту из глюкозы. Является аэротолерантным организмом. Очень слабо растут в условиях анаэробноза и в высоком столбике среды MRS. Аналогичные сведения представлены в 2012 году Деон П. Невелип и др [14], которые также отмечали плохой рост молочнокислой культуры при анаэробной инкубации.

Идентификацию культур осуществляли методом MALDI –TOF масс-спектрометрии, применяя Анализатор биометрический VITEK MS. Культуру молочнокислых бактерий, выделенную с цветков одуванчика идентифицированы как *Apilactibacillus kunkeei* 1. Это недавно обнаруженная группа, состоящая из нескольких видов *Fructobacillus* и *Lactobacillus*. Одна группа связана с цветами, виноградом, винами и насекомыми, а вторая группа связана со спелыми фруктами и брожением фруктов [16].

Обычно данный вид лактобацилл выделяется при порче вин, из кишечника и желудка здоровых пчел, из ульев, а также из свежих цветов. Данный вид является аэротолерантным организмом, т.е. растет в аэробных условиях. Среди изолированных LAB, связанных с микробиотой кишечника пчел, обнаружено, что фруктофильный *A. kunkeei* 1 является наиболее преобладающим видом во время кормодобывания пчелами [17].

Антагонистическая активность культуры A. kunkeei 1. Антагонистическая активность пробиотических бактерий против широкого спектра патогенных микроорганизмов обуславливает перспективность их применения в профилактике и лечении заболеваний, как в медицине, так и ветеринарии [18,19]. В работах Иракских исследователей [20] показано, вид *A. kunkeei*, выделенный из кишечника пчел, может ингибировать рост *Ps. aeruginosa*. Выделенная культура нами культура *A. kunkeei* 1 проявляет антагонизм ко всем изученным тест-культурам (рис.1).

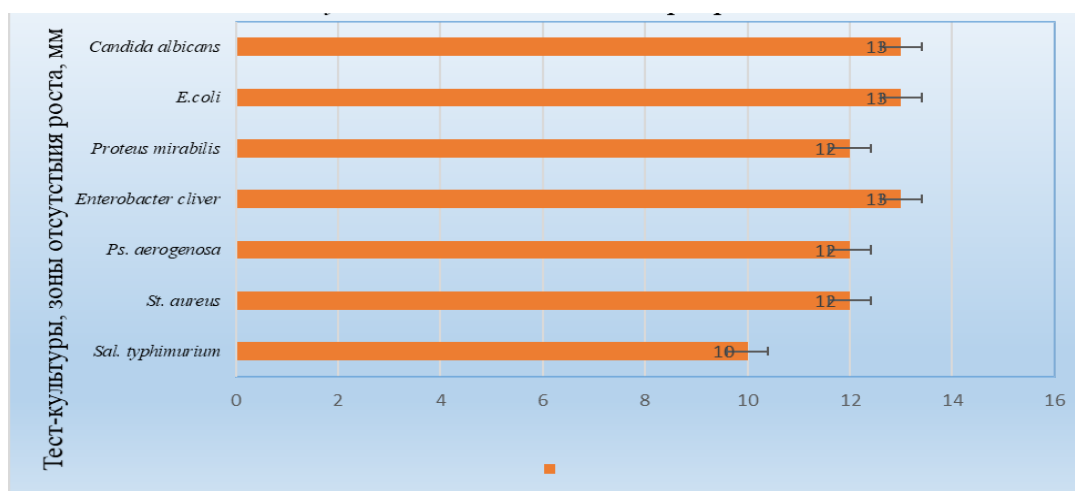


Рис. 1 Антагонистическая активность культуры *A. kunkeei 1* против условно-патогенных микроорганизмов

Чувствительность к антибиотикам. Выделенная культура *A. kunkeei 1* обладает чувствительность ко всем антибиотикам за исключением канамицина (рис. 2)



Рис.2. Антибиотикочувствительность культуры *A. kunkeei 1*

Обычно молочнокислые бактерии проявляют устойчивость к канамиину. Это может объясняться высокой степенью спонтанных хромосомных мутаций, обуславливающих устойчивость к этому антибиотику [18]. Штамм с таким типом приобретенной устойчивости имеет низкий потенциал для горизонтального распространения и может быть использован для применения.

Чувствительность к разным концентрациям NaCl. Выделенная из цветков одуванчика молочнокислая бактерия проявила устойчивость к разным концентрациям NaCl (рис 3). Так, при выдерживании культуры в среде МРС-бульон, содержащей NaCl в концентрации 6% титр клеток снижается всего на 1–2 порядка, что составляет 77% жизнеспособных клеток.

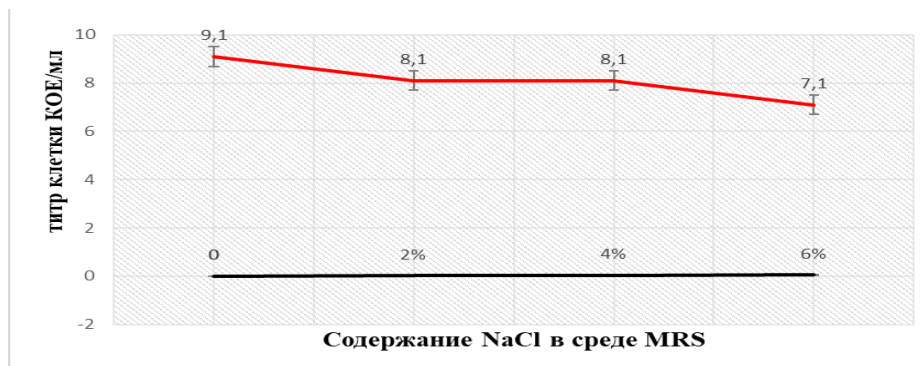


Рис. 3. Чувствительность к разным концентрациям NaCl

Чувствительность культур к различным концентрациям сухой медицинской желчи. Основным компонентом желчи являются желчные кислоты. Помимо своей физиологической функции, желчь является высокотоксичной для тех микроорганизмов, которые не адаптированы к условиям кишечника. Поэтому пробиотические бактерии должны иметь специфический механизм защиты для противостояния пагубному воздействию этих веществ. Выделенная культура устойчива к различным концентрациям медицинской желчи. Самая большая концентрация сухой желчи (0,6 %) снижает титр клеток на 3 порядка, что составляет более 60 % выживших в таких условиях клеток культур (табл. 4).

Таблица 4

Чувствительность культур к различным концентрациям сухой медицинской желчи

Культура	Выживаемость культуры, КОЕ/мл			
	Контроль	% содержание желчи в среде MRS		
		0,2 %	0,4%	0,6%
<i>A.kunkeei 1</i>	9.1	7.1	6.1	6.1

Устойчивость исследуемого штамма к симулированному желудочному соку (рН 2,0) и симулированному соку тонкого кишечника (рН 8,0). Известно, что выживаемость МКБ при рН 3,0 в течение 2 часов и при содержании желчи 1 г/л (0,1%) являются оптимальными для пробиотических культур. Время прохождения пищи через желудок составляет 90 минут [24]. С учетом таких физиологических особенностей организма мы установили длительность обработки культур симулированным желудочным соком.

При изучении устойчивости штамма *Apilactibacillus kunkeei* 1 к симулированному желудочному соку со значением pH=2,0, показано, что через 90 мин культивирования клетки оставались жизнеспособными, титр клеток составил 10^2 КОЕ/мл. При изучении выживаемости исследуемого штамма под действием симулированного сока тонкого кишечника со значением pH=8 у штамма наблюдалась высокая устойчивость (Табл. 5).

Таблица 5.

Устойчивость штамма к действию симулированного желудочного сока (pH=2,0) и сока тонкого кишечника (pH=8,0)

Культуры	Конт	Выживаемость культуры, КОЕ/мл							
		СЖС pH-2				СТК pH-8			
		0 мин	30 мин	60 мин	90 мин	0 мин	1 ч	2 ч	3 ч
<i>A.kunkeei1</i>	$7,5 \times 10^9$	9,4	0	6,2	2,2	8,6	8,7	8,6	8,1

Примечание. 0 мин - титруем сразу после контакта клеток с СЖС, без выдерживания определенного времени.

Изучение безвредности и безопасности культуры in vitro. В процессе культивирования микроорганизмы выделяют во внешнюю среду различные протеолитические ферменты, которые можно разделить условно на две группы: в первую группу следует отнести ферменты, принимающие участие в обмене веществ микроорганизмов (дыхании, питании). Они расщепляют углеводы, белки, пептиды, аминокислоты, в результате чего образуются легкоусвояемые микроорганизмами продукты питания и продукты метаболизма – кислоты, перекиси, индол, сероводород и др. Во вторую группу следует включить ферменты, относящиеся к факторам патогенности (например, гиалуронидаза, фибринолизин, плазмокоагулаза, гемолизин, лецитиназа С, лизоцим, нейрамидаза) [11].

A. kunkeei 1 является каталаза и лецитиназа отрицательным. Изученный штамм *A. kunkeei* 1 не продуцирует гемолизины.

Ферменты, участвующие в обмене веществ. Исследуемый штамм не разжижают желатиновую среду. О продукции амилазы судят по образованию прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в картофельном агаре. Результаты показали, что культура, *A. kunkeei* 1 продуцирует амилазу.

Исследуемая культура показала отсутствие факторов патогенности.

Антиоксидантная активность. Известно, что наиболее распространенные способы антиоксидантной защиты у лактобацилл связаны с работой ферментов супероксиддисмутазы и высокой внутриклеточной концентрацией ионов Mn^{2+} , а также пероксидазы. Кроме ферментов, определенную роль в снижении уровня свободных радикалов в клетках

лактобацилл могут играть различные соединения. В частности, такие свойства были показаны для низкомолекулярной фракции, полученной из супернатанта лизата клеток лактобацилл.

Результаты по определению антиоксидантной активности: наблюдалась снижение оптической плотности раствора ДФПГ при добавлении супернатанта лизата клеток *A. kunkeei* 1 %. Ингибирования оксидных радикалов в молекуле ДФПГ составляла $42,70 \pm 0,2\%$. Культуральная жидкость (КЖ) *A. kunkeei* 1 не показала снижение оптической плотности раствора ДФПГ.

Количественное определение синтеза водорастворимых витаминов культурами лактобактерий проводили методом ВЭЖХ-анализа, при котором установлено, что стандартный CDM-бульон содержит в своем составе все витамины группы В, РР и витамин С. Изученные культуры рода *A. kunkeei* 1 отличаются по спектру усвоения и продукции этих витаминов (табл.6).

Таблица 6

Количественное содержание водорастворимых витаминов в КЖ *A. kunkeei* 1

Витамины	контроль	<i>A.kunkeei</i>
	Концентрация мг/мкл	
В-1	0,187865	0,062912
В-2	0,302755	0,2079
В-6	0,026222	0,003746
В-9	0,016243	0,042034
В-12	0,03135	0
РР	0,029153	0,036324
С	0,021757	0,132957

Установлено, что количество витаминов В9, РР и С в штамме *A. kunkeei* 1 выше, чем в контроле. Витамины В9 и С действуют как антиоксидантные молекулы в организме, предотвращая патологические состояния, вызванные окислительным стрессом.

Пробиотические молочнокислые бактерии *A. kunkeei* 1 инкубировали при 37°C в течение 24 часов и проводили количественный анализ 20 свободных аминокислот с использованием метода ВЭЖХ. CDM - бульон использовали в качестве контроля (табл 7).

Таблица 7

Количественное содержание свободных аминокислот в КЖ *A. kunkeei* 1

Свободных аминокислоты	контроль	<i>A.kunkeei</i>
	Концентрация мг/мкл	
1	2	3
Аспарагин кислота	2,742692	3,612796
Глутамин кислота	1,530007	7,818388
Серин	1,971316	1,489033
Глицин	1,636846	5,831071

Аспарагин	1,820143	5,758136
Глутамин	6,949738	1,861601
Цистеин	1,473747	1,040175
Треонин	4,138648	5,329618
Аргинин	1,71508	3,163046
1	2	3
Аланин	2,226049	0,652415
Пролин	0,782363	0,588605
Тирозин	16,70839	7,342328
Валин	5,440613	7,759685
Метионин	5,283618	2,262991
Изолейцин	4,907595	15,61139
Лейцин	13,22239	15,26716
Гистидин	0,536616	0,434343
Триптофан	9,400496	10,64223
Фенилаланин	20,10651	13,8898
Лизин HCl	0,552351	0,197427
Итого	103,1452	110,5522

Содержание аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глицина, аспарагина, треонина, аргинина, валина, изолейцина, лейцина и триптофана было выше по сравнению с контролем. Общее количество свободных аминокислот было на 7 мг/мкл выше, чем в контроле.

Гипогликемическая активность на модели алиментарной гипергликемии. Как видно из приведенных в таблице 6 данных, введение глюкозы в контрольной группе животных через час вызывало увеличение содержания в крови сахара с $3,5 \pm 0,3$ ммоль/л до $8,7 \pm 0,5$ ммоль/л. Предварительное введение бактерии приводило к снижению содержания сахара в крови опытных животных (таб. 6).

Таблица 8
Гипогликемическая активность на модели алиментарной гипергликемии

Препараты	Доза препарата мг/кг мл/крысу	Исходная концентрация сахара, ммоль/л	Содержание глюкозы, ммоль/л	Гипогликемический эффект, %
Контроль		$3,5 \pm 0,3$	$8,7 \pm 0,5^*$	
<i>Apilactibacillus kunkeei</i> 1	0,5	$3,5 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,5$	39,2
Глукейр	100	$4,0 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,4^{**}$	51
БАД «Природный инулиновый концентрат»	200	$4,0 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,45^{**}$	42

Примечание. * $P \leq 0,05$ по отношению к исходным показателям; ** $P \leq 0,05$ по отношению к контрольной группе животных.

Выводы. В результате работы по выделению молочнокислых бактерий из цветков одуванчика была изолирована культура *A. kunkeei* 1. Исследование пробиотических свойств *A. kunkeei* 1 показало, что данная культура обладает широким спектром антагонистической активности, устойчива к токсичному воздействию желчи, низкому pH симулированного

желудочного сока, высоким концентрациям NaCl, не содержит генов антибиотикорезистентности и факторов патогенности. Установлено, что штамм *A. kunkeei* 1 соответствует основным критериям пробиотиков и может быть использован для разработки пробиотических препаратов.

Гипогликемическая активность *A. kunkeei* 1 делает этот штамм перспективным кандидатом для создания пробиотических препаратов, способствующих поддержанию нормального уровня глюкозы в крови, а антирадикальная активность позволяет рассматривать его как потенциальное средство для дополнительной защиты организма от свободных радикалов. Культура *A. kunkeei* 1 также способствует увеличению содержания аспарагиновой и глутаминовой кислот, глицина, аспарагина, треонина, аргинина, валина, изолейцина, лейцина и триптофана, а также водорастворимых витаминов B9, PP и C, что расширяет возможности её применения в качестве пробиотической культуры и требует дальнейших исследований.

Литература.

1. Ардатская М.Д. Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микробиологических нарушений кишечника // Медицинский совет. - 2015. - №13. - С.95-99.
1. De Frunze AR. Патогенез сахарного диабета 2 типа. Med Clin N Am. 2004; 88: 787-835
2. Kayoko Honda, Minooka Moto, Naoko Uchida, Fang He and Naotaka Hashizume. Anti-diabetic effects of lactic acid bacteria in normal and type 2 diabetic mice. Clin. Biochem. Nutr // September 2012 vol. 51 no. 2 96 – 101.
3. Li X., Wang N., Yin B., Fang D., Jiang T., Zhao J., Zhang H, Wang G, Chen W. Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM0236 on hyperglycemia and insulin resistance in high-fat and streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. // J Apple Microbial. 2016 Dec; 121 (6): 1727-1736.
4. Yun S.I., Park H.O. and Kang J.H.. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes // Journal of Applied Microbiology 107 2009 1681–1686.
5. Farr S. B., Coloma T.. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* // Microbial. Rev. 1991. 55:561-585.
6. Juliana B. R., Melina B. S., Cristiano C. P., Diego F. B., Vanessa M. S., Juliana G. P., Vladimir P. S., Carla P. Sh., Facinelli W. S. *In Vitro* Probiotic and Antioxidant Potential of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LL95 and Its Effect in Mice Behavior // Nutrients 2019. Vol. 11(4). 901. pp. 1-17.
7. Yang Wang, Yanking Wu, Yuan yuan Wang, Han Xu, Xiaoping Mei, Dongyou Yu, Yibing Wang and Weifang Li. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria // Nutrients. 2017. - Vol. 9 (5). - 521. - pp. 1-12.
8. Xu N, Chen G, Liu H. Antioxidative Categorization of Twenty Amino Acids Based on Experimental Evaluation. Molecules. 2017 Nov 27; 22. 12. 206.
9. Лысенко Ю.А., Коццаев А.Г., Муртазаев К.Н., Задченко В.В., Шантыз А.Ю., Левченко П.В. Коррекция дисбиотических нарушений у пчел путем применения пробиотических препаратов // Научный журнал Кузи ТАУ №158 (09), 2020, стр.1-12.
10. МУК 4.2.2602-10 Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов,

используемых при производстве пробиотиков.

11. Карамова Н. С., Хабибуллин Р. Э. Антирадикальные свойства *Lactobacillus acidophilus* 317 *in vitro* // J. Glavind, Acta Chem Scand., 1963., 13, 1635-1640.

12. Невелип П. Деон, Акихито Эндо, Леон М.Т.Дикс *Fructobacillus Lactobacillus kunkeei* и *Lactobacillus brevis*, выделенные из живых цветов, пчел и ульев // 15 июля 2012 г электронная версия.

13. Акихито Эндо, Синтаро Мажо, Ясухиро Тенизава, Вольфганг Кнайфель Фруктофильные молочнокислые бактерии, уникальная группа микробов, ферментирующих фрукты // Прикладная и экологическая микробиология 84 (19)., 2018 г.

14. Миронова А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств //Часть первая М.: Гриф и К, 2012. – 944.

15. Ranqberg A., M. Mathiestn G., Andom G.V. Паратрансгенный потенциал *Lactobacillus kunkeei* у медоносной пчелы *Apis mellifera* // Вenef Микробы, 2015, 6(4): 513-523.

16. Гайфуллина Л.Р., Салтыкова У.Сю, Мед как синбиотический пищевой продукт ФГБУН «Институт биохимии и генетики» // УНЦРАН т.9. №1 2017. С.12-23.

17. Мишуковская Г.С. Применение пробиотиков для повышения продуктивности темной лесной пчелы башкирской популяции // Г.С. Мишуковская, Кн: Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. Eaf Boll-do. 2015 с 193-197.

18. Shahad Mansoyr Salman, Ghada Mohamad Sakeh The role of Fructophilic Lactic Acid Bacteria in the Restoration of Infected Wounds and IL-17 Level in Rabbits // Iraqi Journal of Sciense 2019 Vol. 60, №11, 2371-2382.

19. Danielson M., Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus spp* to antimicrobial agents // Int J Food Microbiol. 2003 82 (1): 1-11.