

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-4-337-343>

Поступила 05.10.2022

Поступила после рецензирования 09.11.2022

Принята в печать 14.11.2022

© Донская Г. А., Креккер Л. Г., 2022

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ БИОМАССЫ СИМБИОТИЧЕСКОЙ ЗАКВАСКИ

Донская Г. А., Креккер Л. Г.*

Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

глутатион, глицин, симбиоз микроорганизмов, антиоксидантная активность, модифицированная питательная среда, окислительно-восстановительные процессы

АННОТАЦИЯ

Биологическая система антиоксидантной защиты микроорганизмов является субъектом определенного уровня физиологического окислительного процесса. Для предотвращения окисления в клетках накапливается регулятор внутриклеточного метаболизма — трипептид глутатион, имеющий большое значение для осуществления антиоксидантного ответа и поддержания внутриклеточного редокс-потенциала. Его роль в ряде метаболических адаптационных процессов симбиозов микроорганизмов дрожжей и молочнокислых бактерий остается не до конца выясненной и представляет научный и практический интерес. Компонентом полипептидной цепи и веществ, формирующих первичную структуру глутатиона, является глицин. Цель данного исследования — определение влияния окислительно-восстановительных процессов на антиоксидантную активность через регулирование уровня глутатионсодержащего компонента глицина в питательной среде для получения биомассы микроорганизмов многокомпонентной закваски. В результате проведенных исследований определена прямая зависимость между антиоксидантной активностью, рассчитанной кулонометрическим методом, и концентрацией вводимого в питательную среду глицина. Установлено, что введение глицина 0,2–0,8% приводит к понижению окислительно-восстановительного потенциала. Результаты, отраженные в данной публикации, показали, что процесс развития аэробных микроорганизмов в присутствии редуцирующих веществ идет достаточно активно. Количество дрожжей увеличивается от $1,6 \cdot 10^4$ до $3,6 \cdot 10^5$ КОЕ/г в процессе 24-часового культивирования. Увеличение от 0,5 до 0,8% глицина усиливает образование как анаэробных, так и аэробных микроорганизмов. Установлено, что увеличение концентрации глицина от 0,8% до 1,5% смещает процесс в сторону окислительного метаболизма, количество восстановленного глутатиона в культуральной жидкости возрастает практически в два раза, при этом содержание окисленного глутатиона в опытной пробе находится в интервале от 0 до 5%. Это позволяет рассматривать глутатион как потенциальный регулятор окислительно-восстановительных процессов и антиоксидантной активности биомассы молочнокислых бактерий и дрожжей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FNSS-2022-0004 Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности.

Received 05.10.2022

Accepted in revised 09.11.2022

Accepted for publication 14.11.2022

© Donskaya G. A., Krekker L. G., 2022

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

INFLUENCE OF REDOX PROCESSES ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE SYMBIOTIC STARTER BIOMASS

Galina A. Donskaya, Lyudmila G. Krekker*

All-Russian Research Institute of Dairy Industry, Moscow, Russia

KEY WORDS:

glutathione, glycine, symbiosis of microorganisms, antioxidant activity, modified nutrient medium, redox processes

ABSTRACT

The biological system of the microbial antioxidant protection is a subject of a certain level of the physiological oxidative process. To prevent oxidation, a regulator of intracellular metabolism, tripeptide glutathione, is accumulated in cells. Glutathione is very important for the antioxidant response and maintenance of intracellular redox potential. Its role in several metabolic adaptive symbiotic processes of yeasts and lactic acid bacteria is not completely elucidated and is of scientific and practical interest. Glycine is a component of the polypeptide chain and substances that form the primary structure of glutathione. The aim of this study was to determine an effect of the redox processes on the antioxidant activity through regulation of the level of the glutathione constituent, glycine, in a nutrient medium to obtain the microbial biomass of the multicomponent starter culture. As a result of the performed investigations, a direct dependence between the antioxidant activity calculated by the coulometric method and concentration of glycine introduced into the nutrient medium was determined. It has been established that addition of 0.2–0.8% of glycine leads to a decrease in the redox potential. The results reflected in this publication show that the process of the development of aerobic microorganisms in the presence of reducing substances occurs quite actively. The number of yeasts increased from $1.6 \cdot 10^4$ to $3.6 \cdot 10^5$ CFU/g during 24-hour incubation. An increase in glycine from 0.5 to 0.8% enhanced the development of both anaerobic and aerobic

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Донская, Г. А., Креккер, Л. Г. (2022). Влияние окислительно-восстановительных процессов на антиоксидантную активность биомассы симбиотической закваски. *Пищевые системы*, 5(4), 337–343. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-4-337-343>

FOR CITATION: Donskaya, G. A., Krekker, L. G. (2022). Influence of redox processes on the antioxidant activity of the symbiotic starter biomass. *Food Systems*, 5(4), 337–343. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-4-337-343>

microorganisms. It has been found that an increase in the glycine concentration from 0.8% to 1.5% shifted the process toward the oxidative metabolism; an amount of reduced glutathione in the culture liquid increased practically twofold, while the concentration of oxidized glutathione in the test sample was in a range of 0 to 5%. This allows regarding glutathione as a potential regulator of the redox processes and antioxidant activity of biomass of lactic acid bacteria and yeasts.

FUNDING: The article was published as part of the research topic No. FNSS-2022–0004 of the state assignment of the All-Russian Research Institute of Dairy Industry.

1. Введение

Антиоксидантная активность микроорганизмов зависит от определенных условий внешней среды, к которым относятся: состав, активная кислотность, окислительно-восстановительный потенциал, аэрирование, температура и т. д. [1–6]. Реакции окисления-восстановления являются центральными в обмене веществ [5]. По мнению Л. И. Работновой [3] и др. [1–2], они являются одними из важных факторов, влияющих на биохимическую активность микроорганизмов. Изменяя окислительно-восстановительный потенциал путем аэрации или введением в среду веществ с восстановительными или окислительными свойствами, можно регулировать микробиологические процессы и метаболизм бактерий [2–7].

Согласно аналитическим данным, существуют границы индекса окислительно-восстановительного потенциала rH_2 (ОВП), отражающего суммарное кислородно-водородное равновесие. ОВП характеризует также степени аэробности среды, в пределах которых развиваются бактерии: анаэробы — от 0 до 13; аэробы — от 7 до 23 [3]. Чем меньше rH_2 , тем больше восстановительная способность раствора. В насыщенной кислородом модифицированной среде с окислительными свойствами ОВП = 41. При доминировании восстановительных свойств среды и насыщении водородом rH_2 близок к нулю [3].

Следующим важным фактором, регулирующим развитие и обмен веществ микроорганизмов, считается активная кислотность, изменения rH_2 и pH среды приводят к значительным сдвигам в соотношении продуктов брожения при культивировании бактериальных концентратов [5–6].

Культивирование аэробных и анаэробных микроорганизмов происходит в условиях неизбежного соприкосновения среды с воздухом. Если при этом в питательной среде есть восстановители, то наличие кислорода не мешает культивированию анаэробов. Но при наличии окислителей, являющихся акцепторами водорода, в ней можно культивировать аэробы без доступа воздуха. Таким образом, исследование окислительно-восстановительных систем в модифицированных средах является фактором, обуславливающим возможность развития симбиоза аэробных и анаэробных микроорганизмов, а также изменения метаболизма в направлении синтеза антиоксидантов.

Во всех аэробных микроорганизмах при определенных условиях происходят окислительно-восстановительные процессы [1,7]. Образующиеся промежуточные продукты, такие как супероксид, ион кислорода, перекись водорода, могут стать причиной резкого роста перекисного окисления липидов, что приведет к повреждению клетки. Предотвращение развития окислительного процесса дрожжами обусловлено восстановленным глутатионом, уровень которого зависит от количества глицина. Глутатион при участии Se-зависимой глутатионпероксидазы восстанавливает ОН радикал. При этом образуется окисленный глутатион, который с помощью никотинамидадениндинуклеотидфосфатзависимой (NADPH) редуктазы и глицина переходит в восстановленную форму [8–11], обуславливая функционирование в клетках биологической системы антиоксидантной защиты.

Глутатион по строению является трипептидом L-γ-глутамил-L-цистеннил-глицином. Наличие сульфгидрильной группы в боковой цепи цистеина и малый размер молекулы обеспечивают его участие во множестве биохимических реакций, направленных на предотвращение действия активных форм кислорода (АФК) на нейтрализацию токсичных соединений. При регулировании свободнорадикальных процессов восстановленный глутатион блокирует и удаляет свободные радикалы. Он поддерживает тиоловый статус белков, модулирует их активность через посттрансляционную модификацию [11] и рецепторы нейротрансмиттеров [12].

Глутатион является одним из важнейших компонентов антиоксидантной системы, что делает его главенствующим для поддержания внутриклеточного редокс-потенциала [9,10]. Под его воздействием происходит S-глутатионирование белков в цитозоле, благодаря обратимой модификации сульфгидрильных групп [13]. По данным Ки Бейом Ли, стимуляция роста культур *Lactobacillus* может быть обусловлена тем, что трипептид глутатион служит эндогенным источником аминокислот [13], в которых нуждаются дрожжи при совместном культивировании с лактобактериями.

Семенихиной В. Ф. и др. установлено, что добавление дрожжевого экстракта к молоку способствовало развитию и накоплению клеток *L. reuteri* LR1, что свидетельствует о целесообразности использования экстракта для приготовления производственной закваски или продукта на основе чистой культуры [14]. Эти исследования косвенно подтверждают положительное влияние дрожжей на повышение адаптационных свойств анаэробных форм при совместном культивировании с аэробными. Дрожжевой экстракт содержит аминокислоты и комплекс витаминов, являющихся ростовыми факторами молочнокислых бактерий, эти питательные вещества оказывают стимулирующее воздействие на молочнокислые бактерии и играют решающую роль в поддержании активности кумысных и курунговых симбиотических заквасок.

Глицин влияет на внутриклеточный синтез трипептида глутатиона, он является обязательным компонентом полипептидной цепи и веществ, формирующих первичную структуру белков клетки и фосфолипидов, образующих мембраны. Он регулирует процессы окислительного фосфорилирования и биоэнергетику клетки в целом [15], значительно влияя на окислительно-восстановительные процессы в питательной среде.

Окислительно-восстановительные процессы на модифицированных средах с добавлением глицина при совместном культивировании дрожжей и молочнокислых бактерий еще недостаточно изучены. Чаще всего метаболический характер взаимоотношений между этими микроорганизмами основан на способности использовать продукты обмена друг друга. Накопление бактериями молочной кислоты до pH 5,0–5,5 полезно для дрожжей, а продукты автолиза дрожжей служат питанием для бактерий [16]. Молочнокислые бактерии обладают биосинтетической недостаточностью, по мнению Рябцевой С. А. и др., поэтому для их культивирования необходимы белковые гидролизаты [17]. Способность молочнокислых бактерий снижать pH среды имеет фундаментальное значение для активности дрожжей и защиты от стресса, но до

определенного предела. При понижении pH ниже 4,5 активность дрожжей снижается. Дрожжи создают благоприятные условия для развития факультативно анаэробных молочнокислых бактерий, потребляя растворенный в среде кислород и синтезируя витамины группы В [6,15].

Несмотря на то, что изучению роли глутатиона в жизнедеятельности заквасочных микроорганизмов посвящено множество работ, его значимость в ряде метаболических адаптационных процессов в симбиотических заквасках молочнокислых бактерий и дрожжей, в том числе окислительно-восстановительных, остается до конца невыясненной. В связи с этим целью данного исследования является определение влияния окислительно-восстановительных процессов получения биомассы молочнокислых бактерий и дрожжей на синтез восстановленной и окисленной форм глутатиона с помощью регулирования уровня глутатионсодержащего компонента глицина в модифицированной питательной среде, инокулированной симбиотической закваской.

2. Объекты и методы

Объектами исследования являлись модифицированная питательная среда на основе гидролизованного молока, картофельного отвара и глицина; симбиотическая закваска, состоящая из *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces lactis*, в соотношении культур 0,2:0,2:0,5:1 для получения кумысного продукта из коровьего молока.

Титруемую кислотность определяли по ГОСТ Р 54669–2011¹, количество молочнокислых микроорганизмов — по ГОСТ 33951–2016², количество дрожжей — по ГОСТ 33566–2015³, индекс окислительно-восстановительного потенциала рассчитывали по формуле: $rH_2 = Eh/0,03 + 2pH$; активную кислотность (pH) и окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) определяли на pH -метре — иономере «Эксперт — 001» («Эталонприбор», Россия). Антиоксидантную активность определяли кулонометрическим методом с использованием прибора «Эксперт-006» («Эталонприбор», Россия). Метод основан на способности брома вступать в радикальные и окислительно-восстановительные реакции электрофильного замещения и присоединения по кратным связям [18]. Концентрацию глутатиона определяли методом [19], в котором об уровне свободных SH-групп глутатиона (G-SH) судили по количеству пошедшего на титрование раствора йодноватистокислого калия. Окисленный глутатион переводили в восстановленную форму с помощью цинковой пыли и вновь оттитровывали SH-группы, получая количество общего глутатиона. Окисленный глутатион определяли по разнице между общим и восстановленным глутатионом. Концентрацию глутатиона (А) определяли по формуле:

$$A = I \times 100 / 3,26 \text{ мг/\%}, \quad (1)$$

Где:

I — количество 0,001N раствора йодноватистого калия в мл, израсходованного на титрование пробы;
3,26 — число, соответствующее объему йодноватистого калия (мл), идущего на титрование 1 мл глутатиона;
100 — коэффициент пересчета на 100 мл инокулированной среды.

Культуры восстанавливали на стерилизованном обезжиренном молоке, смешивали в установленном соотношении и выдерживали в термостате (ТС-80, «Медтехника», Россия)

при температуре 30 °С в течение 24 ч для получения инокулята. Гидролизованное молоко готовили по способу, предложенному В. М. Богдановым, который предусматривает разведение обезжиренного пастеризованного молока водопроводной водой (1:2), кипячение, охлаждение до 45 °С, установление активной кислотности (pH) 8,0–9,0 и проведение гидролиза панкреатином (0,05%) в течение 24 ч [4]. Картофельный отвар готовили по методике Банниковой Л. А, для этого 200 г очищенного и измельченного картофеля заливают 1000 мл дистиллированной воды, кипятят в течение 60 мин, фильтруют и доводят до первоначального объема стерильной водой. В исследованиях использовали глицин в порошке, произведенный научно-производственным комплексом «Биотики», сертификат GMP-0080–000354/19. Инокулят с содержанием клеток вносили в модифицированную питательную среду в количестве 5%.

Количество опытов составляло до 6 раз. Математическую обработку данных производили с расчетом среднего арифметического значения двух параллельных определений при условии их приемлемости, а также с расчетом среднеквадратичного отклонения.

3. Результаты и обсуждение

Исследования антиоксидантных свойств симбиозов бактерий, их способности накапливать глутатион и осуществлять своевременный антиоксидантный ответ, влияя на адаптационные механизмы конечного продукта, позволяют идентифицировать вещества, формирующие антиоксидантный потенциал бактерий и создавать продукты функциональной направленности [1, 2, 5, 10]. Механизмы саморегуляции и формирования антиоксидантного ответа заквасочных симбиозов кумыса, курунги и других гетероферментативных продуктов, в настоящее время не достаточно изучены. Известно, что многокомпонентные закваски осуществляют более выраженный антиоксидантный ответ, во многом он зависит от окислительно-восстановительных условий питательной среды. Данный эксперимент посвящен оценке влияния окислительно-восстановительных процессов на антиоксидантную активность симбиоза многокомпонентной симбиотической закваски, биомасса которой была получена ранее на модифицированной питательной среде с высоким биоантиоксидантным ответом. Для решения поставленных задач была произведена модификация питательной среды путем введения разных количеств глицина, являющегося предшественником глутатиона, а далее было проанализировано влияние изменения окислительно-восстановительного потенциала (ОВП или Eh) на антиоксидантную активность клеток и количество глутатиона. ОВП нелинейно, но связан с pH биомассы через индекс окислительно-восстановительного потенциала по уравнению: $rH_2 = Eh/0,029 + 2pH$, в связи с использованием индекса для характеристики условий культивирования микроорганизмов далее был рассчитан этот показатель в зависимости от дозы внесенного глицина.

В модифицированную питательную среду на основе гидролизованного молока и картофельного отвара вносили инокулят симбиотической закваски и различные дозы глицина с концентрацией от 0,2 до 0,8%. Для получения биомассы питательную среду с инокулятом культивировали в течение 24 ч при температуре 30 °С с двухкратным раскислением до pH 6,3–6,5 ед. и ежечасным перемешиванием. Далее определяли физико-химические показатели инокулированной среды в контроле (без глицина) и в опытных образцах с разным количеством глицина. В таблицах 1–2 представлены физико-химические показатели полученной культуральной жидкости после культивирования.

¹ ГОСТ Р 54669–2011 «Молоко и продукты переработки молока. Методы определения кислотности». Москва: Стандартинформ, 2019. — 12 с.

² ГОСТ 33951–2016 «Молоко и продукты переработки молока. Методы определения молочнокислых микроорганизмов». Москва: Стандартинформ, 2016. — 13 с.

³ ГОСТ 33566–2015 «Молоко и молочная продукция. Определение дрожжей и плесневых грибов». Москва: Стандартинформ, 2019. — 16 с.

Таблица 1. Изменения активной кислотности среды в зависимости от концентрации глицина

Table 1. Changes in the active acidity of the medium depending on the glycine concentration

Концентрация глицина в питательной среде, %	Активная кислотность, pH, ед.
0 (контроль)	5,016±0,015
0,2	5,08±0,018
0,4	5,14±0,011
0,6	5,21±0,019
0,8	5,27±0,021

Из данных, представленных в таблицах 1 и 2, следует, что введение в питательную среду глицина с концентрацией от 0,2 до 0,8% приводит к изменениям окислительно-восстановительных процессов. При содержании глицина в количестве 0,2–0,8 г на 100 мл питательной среды активная кислотность возрастает относительно контроля (без глицина) в среднем на 5%, а окислительно-восстановительный потенциал уменьшается до 6,4%.

Таблица 2. Динамика ОВП (Eh) в культуральной жидкости с биомассой

Table 2. Dynamics of redox potential (Eh) in the culture liquid with biomass

Концентрация глицина в питательной среде, %	ОВП (Eh), мВ
0 (контроль)	201,7±13,4
0,2	241,5±14,3
0,4	231,5±17,2
0,6	225,6±15,6
0,8	214,7±14,9

Глицин является промежуточным звеном в метаболизме белков и пептидов, он действует в среде как антиоксидант и один из предшественников глутатиона. Но избыток антиоксидантов может привести к восстановительному стрессу, который потенциально может негативно сказаться на развитии бактерии. В связи с этим, анализ баланса окисления и восстановления имеет важное значение для определения оптимальных физиологических диапазонов развития комплексной живой системы, характеризующей в том числе ее воспроизводимость, как показал ряд исследований [20,21].

Данные исследований показали, что ОВП снижается, а значит возрастает при внесении глицина восстановительная способность раствора, которая изначально характеризовалась большим процентом окислительных процессов. Максимальные восстановительные свойства среды при насыщении водородом и rH_2 близким к нулю [3].

Согласно аналитическим данным, возбудители молочнокислого брожения относятся к группе факультативных анаэробов [1,4]. В процессе своего развития они значительно снижают окислительно-восстановительный потенциал среды за счет выделяемых ими редуцирующих веществ неутонченной природы. Титруемая кислотность среды снижается относительно контроля на 3,4–6,7%. Данные представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Физико-химические показатели культуральной жидкости после 24 ч культивирования

Table 3. Physico-chemical indicators of the cultural liquid after 24-hour incubation

Показатели	Контроль	0,2% глицина	0,4% глицина	0,6% глицина	0,8% глицина
rH_2	16,75±2,22	16,76±2,64	16,72±3,24	16,66±2,83	16,61±2,45
Кислотность, °Т	90±4,13	87±3,51	86±6,15	85±4,61	84±5,60

Индекс окислительно-восстановительного потенциала rH_2 , определенный расчетным путем, при исследуемых дозах глицина незначительно снижается. Согласно исследованиям Л. И. Работновой, анаэробы развиваются при значениях rH_2 от 0 до 13; аэробы — от 7 до 23. Но результаты данных исследований показали, что индекс окислительно-восстановительного потенциала, независимо от дозы внесения глицина, меняется не значительно и находится в пределах 16,61–16,76. Удельная производительность определенных метаболитов микроорганизмов напрямую зависит от значений окислительно-восстановительного потенциала, одним из наиболее эффективных способов регулирования окислительно-восстановительного потенциала является аэрация [22, 23]. Можно предположить, что в данной модифицированной среде глицин, регулируя окислительно-восстановительный процесс, поддерживает оптимальное соотношение восстановленного и окисленного глутатиона в среде, что позволяет развиваться анаэробным микроорганизмам при значении rH_2 выше 13, по сравнению с ранее проведенными исследованиями.

Изменение микрофлоры после 24 ч культивирования в питательной среде показаны в Таблице 4.

Таблица 4. Микробиологические показатели инокулированной питательной среды

Table 4. Microbiological indicators of the inoculated nutrient medium

Содержание КОЕ/г	Контроль (без глицина)	Концентрация глицина, %			
		0,2	0,4	0,6	0,8
Общее количество молочнокислых бактерий	$1,2 \cdot 10^8$	$0,84 \cdot 10^8$	$0,96 \cdot 10^8$	$8,9 \cdot 10^8$	$9,2 \cdot 10^8$
Общее количество дрожжей	$1,6 \cdot 10^4$	$0,5 \cdot 10^4$	$0,6 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^5$

Среднеквадратичное отклонение по молочнокислым бактериям составляет 0,078 КОЕ/г, по дрожжам составляет 0,043 КОЕ/г

Из данных Таблицы 4 следует, что введение в питательную среду 0,2–0,4% глицина ведет к понижению значения молочнокислой колониеобразующей микрофлоры. Но с увеличением дозы глицина до 0,6–0,8% количество молочнокислых бактерий повышается. По всей видимости, это связано с окислительно-восстановительной способностью глицина. Окислительно-восстановительные свойства, как показали исследования, определяют способность любой каталитической системы, которая зависит от pH, растворителя, концентрации катализатора от вида субстрата и температуры [24].

По данным Работновой [3], введение в среду редуцирующих веществ, способных принимать на себя кислород, стимулирует развитие анаэробных бактерий и подавляет аэробные. Но результаты, полученные экспериментальным путем и представленные в Таблице 4, показали, что процесс развития аэробных дрожжевых микроорганизмов увеличивается до $3,6 \cdot 10^5$ КОЕ/г в процессе 24 ч культивирования. Таким образом, проведенные исследования показали, что введение в питательную среду 0,6–0,8% глицина усиливает образование как анаэробных молочнокислых, так и аэробных дрожжей.

Результаты определения антиоксидантной активности инокулированной питательной среды после культивирования кулонометрическим методом представлены на Рисунке 1.

Полученные данные достоверно показали, что введение глицина от 0,4% в питательную среду способствует катализируанию восстановительных процессов. В результате протекающих биохимических реакций образуется ряд веществ, обладающих антиоксидантной активностью. Интенсивность достигает 480 ± 12 мг/100 г. Выявлена закономерность измене-

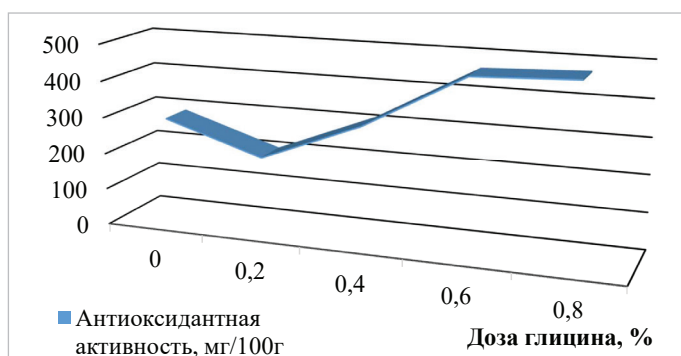


Рисунок 1. Динамика антиоксидантной активности культуральной жидкости в зависимости от концентрации внесенного глицина

Figure 1. Dynamics of the antioxidant activity of the cultural liquid depending on the concentration of introduced glycine

ния антиоксидантной активности от концентрации вводимого в питательную среду глицина. Установлено, что с повышением концентрации глицина до 0,6–0,8% увеличивается антиоксидантная активность среды.

На следующем этапе исследований концентрация глицина была увеличена до 1,5%. Экспериментальные данные показали, что количество глицина до 1,5% не оказывает значительного влияния на изменение индекса ОВП, соотношение культур в симбиозе сохраняется, но при этом значительно повышается антиоксидантная активность. В таблице 5 представлены данные по исследованию содержания глутатиона, в том числе его окисленной и восстановленной формы. Проведенные экспериментальные исследования по определению глутатиона в инокулированной питательной среде показали, что введение глицина в питательную среду в концентрации более 0,8% (1,0–1,5%) значительно изменяет количество восстановленного глутатиона, участвующего практически во всех биохимических реакциях, в том числе в реакциях блокирования избытка свободных радикалов, прерывания окислительно-восстановительную передачи сигналов от митохондрий к телу клетки [23–25].

Таблица 5. Содержание глутатиона в культуральной жидкости с биомассой

Table 5. Glutathione content in the culture liquid with biomass

Глутатион, мг%	Контроль	Концентрация глицина в питательной среде, %		
		0,8	1,0	1,5
Восстановленный	39,87±2,61	47,75±4,62	46,01±7,62	56,75±4,64
Общий	58,28±2,33	58,70±5,63	49,50±8,23	57,93±5,2
Окисленный	18,41±1,41	10,95±1,64	3,49±0,61	1,18±0,53

Экспериментальные исследования показали, что введение глицина изменяет соотношение восстановленного и окисленного глутатиона в биомассе с культуральной жидкостью. Окислительно-восстановительный потенциал является одним из наиболее сложных показателей физиологического состояния микробных культур, и его измерение может быть полезным инструментом для качественного и количественного определения микробного загрязнения [21]. Проведенные исследования показали, что, снижая концентрацию окисленного глутатиона, глицин влияет на окислительно-восстановительные процессы в клетке микроорганизмов, но в количестве 0,2–0,8% не нарушает окислительно-восстановительного равновесия, подавляющего развитие симбиоза бактерий. В контрольном образце при отсутствии глицина соотношение восстановленного и окисленного глутатиона соответствует значению 2,16, что намного меньше относительно культуральной жидкости с концентрацией глицина 0,8–1,5%.

Заключение

1. Определена прямая зависимость между антиоксидантной активностью культуральной жидкости и концентрацией вводимого в питательную среду глицина.
2. Полученные значения окислительно-восстановительного потенциала, оказывающего влияние на интенсивность протекания биохимических процессов, позволяют классифицировать инокулированную питательную среду как среду со слабо-восстановительными свойствами.
3. Увеличение концентрации вводимого глицина до 0,8% смещает процесс в сторону развития окислительных процессов. При этом незначительно увеличивается активная кислотность среды, уменьшается окислительно-восстановительный потенциал и понижается титруемая кислотность; отмечен рост молочнокислых бактерий и в значительной степени дрожжей.
4. Антиоксидантная активность инокулированной питательной среды с концентрацией глицина 0,6–0,8% превышает антиоксидантную активность контроля (без глицина), что может быть обусловлено повышением содержания восстановленного глутатиона.
5. Установлено, что введение глицина как потенциального компонента трипептида глутатиона способствует иницированию восстановительных процессов в инокулированной питательной среде.
6. Показано, что с увеличением концентрации глицина возрастает количество восстановленного глутатиона, регулирующего большинство метаболических процессов, в том числе окислительно-восстановительных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ritchie, G., Strodl, E., Parham, S., Bambling, M., Cramb, S., Vitetta, L. (2023). An exploratory study of the gut microbiota in major depression with anxious distress. *Journal of Affective Disorders*, 320, 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2022.10.001>
2. Агаркова, Е. Ю., Кручинин, А. Г. (2018). Ферментативная конверсия как способ получения биологически активных пептидов. Вестник МГТУ. Труды Мурманского государственного технического университета, 21(3), 412–419. <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2018-21-3-412-419>
3. Работнова, И. Л. (1957). Роль физико-химических условий (rH₂ и pH) в жизнедеятельности микроорганизмов. Москва: Издательство АН СССР. 1957.
4. Kivanç, M., Funda, E. G. (2017). A functional food: a traditional Tarhana fermentation. *Food Science and Technology*, 37(2), 269–274. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.08815>
5. Богданов В. М. (1957). Микробиология молока и молочных продуктов. Москва: Пищепромиздат, 1957.
6. Бегунова, Ф. В., Рожкова, И. В., Ширшова, Т. И., Глазунова, О. А., Федорова, Т. В. (2019). Биосинтез антимикробных бактериоциноподобных соединений штаммов *Lactobacillus reuteri* LR1: оптимизация условий культивирования. *Биотехнология*, 35(5), 58–69. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-58-69>
7. Kalinina, E. V., Chernov, N. N., Novochkova, N. D. (2014). Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Moscow)*, 79(13), 1562–1583. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130082>
8. Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects*, 1830(5), 3143–3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
9. Fitzpatrick, A. M., Jones, D. P., Lou Ann S. Brown, L. A. S. (2012). Glutathione redox control of asthma: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(2), 375–408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M61093420010.1089/ars.2011.4198>
10. Qanungo, S., Starke, D. W., Pai, H. V., Mיעyal, J. J., Nieminen, A.-L. (2007). Glutathione Supplementation Potentiates Hypoxic Apoptosis by S-Glutathionylation of p65-NFκB. *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), 18427–18436. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610934200>

11. Смирнова, Г. В., Музыка, Н. Г., Глуховченко, М. Н., Октябрьский, О. Н. (1997). Отклик *Escherichia coli* на действие проникающего и непроникающего оксидантов. *Биохимия*, 62(5), 563–569.
12. Boguszewska-Mańkowska, D., Nykiel, M., Zagdańska, B. (2015). Protein oxidation and redox regulation of proteolysis. Chapter in a book: Basic principles and clinical significance of oxidative stress. <https://doi.org/10.5772/61182>
13. Costa, V., Quintanilha, A., Moradas-Ferreira, P. (2007). Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life*, 59(4), 293–298. <https://doi.org/10.1080/15216540701225958>
14. Семенихина, В. Ф., Рожкова, И. В., Бегунова, А. В., Федорова, Т. В., Ширшова, Т. И. (2018). Разработка биотехнологии кисломолочного продукта с *Lactobacillus reuteri* LR1 и исследование его функциональных свойств в эксперименте *in vitro* и *in vivo*. *Вопросы питания*, 87(5), 52–62. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2018-10053>
15. Нарциссов, Я. Р., Максимов, М. Л., Максимова, Л. Н. (2016). Метаболическая терапия, как составная часть комплексного лечения хронических заболеваний. *РМЖ*, 24(14), 894–900.
16. Илларионова Е. Е., Кручинин, А. Г., Туровская, С. Н., Бигеева А. В. (2021). Ассоциация полиморфизмов в биокластере генов казеина и сывороточных белков с технологическими свойствами молочного сырья. *Молочная промышленность*, 3, 60–62. <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2021-03-60-62>
17. Рябцева, С. А., Бращикина, М. А., Ганина, В. И. (2010). Сохранение жизнеспособности заквасочной микрофлоры. *Молочная промышленность*, 1, 22–23.
18. Лалин, А. А., Горбунова, Е. В., Зеленков, В. Н., Герасимов, М. К. (2009). Определение антиоксидантной активности вин кулонометрическим методом. Научно-методическое пособие. Москва, РАЕН, 2009.
19. Дерюгина, А. В., Корягин, А. С., Копылова, С. В., Таламанова, М. Н. (2010). Методы изучения стрессовых и адаптационных реакций организма по показателям системы крови. Нижний Новгород, Издательство Нижегородского госуниверситета, 2010.
20. Selvam, M. K. P., Henkel, R., Sharma, R., Agarwal, A. (2018). Calibration of redox potential in sperm wash media and evaluation of oxidation–reduction potential values in various assisted reproductive technology culture media using MiOXSYS system. *Andrology* 6(2), 293–300. <https://doi.org/10.1111/andr.12461>
21. Reichart, O., Szakmár, K., Jozwiak, A., Felföldi, J., Baranyai, L. (2007). Redox potential measurement as a rapid method for microbiological testing and its validation for coliform determination. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.016>
22. Kim, J., Bajpai, R., Iannotti, E. L. (1988). Redox potential in acetone-butanol fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 18, 175–186. <https://doi.org/10.1007/BF02930824>
23. Berovic, M. (2000). Scale-up of citric acid fermentation by redox potential control. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(5), 552–557. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990905\)64](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990905)64)
24. Shi, C., Kang, F., Zhu, Y., Teng, M., Shi, J., Qi, H., Huang, Z. et al. (2023). Photoreforming lignocellulosic biomass for hydrogen production: Optimized design of photocatalyst and photocatalytic system, *Chemical Engineering Journal*, 425(1), Article 138980. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138980>
25. Capeloa, T., Van de Velde, J. A., d'Hose, D., Lipari, S. G., Derouane, F., Hamelin, L. et al. (2022). Inhibition of mitochondrial redox signaling with mitox prevents metastasis of human pancreatic cancer in mice. *Cancers*, 14(19), Article 4918. <https://doi.org/10.3390/cancers14194918>

REFERENCES

1. Ritchie, G., Strodl, E., Parham, S., Bambling, M., Cramb, S., Vitetta, L. (2023). An exploratory study of the gut microbiota in major depression with anxious distress. *Journal of Affective Disorders*, 320, 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2022.10.001>
2. Agarkova, E. Yu., Kruchinin, A. G. (2018). Enzymatic conversion as a method of producing biologically active peptides. *Vestnik of MSTU*, 21(3), 412–419. <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2018-21-3-412-419> (In Russian)
3. Rabotnova, I. L. (1957). The role of physico-chemical conditions (rH2 and pH) in the vital activity of microorganisms. Moscow: Publishing House of the USSR Academy of Sciences. 1957. (In Russian)
4. Kivanç, M., Funda, E. G. (2017). A functional food: a traditional Tarhana fermentation. *Food Science and Technology*, 37(2), 269–274. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.08815>
5. Bogdanov V. M. (1957). Microbiology of milk and dairy products. Moscow: Pishchepromizdat, 1957. (In Russian)
6. Begunova, A. V., Rozhkova, I. V., Shirshova, T. I., Glazunova, O. A., Fedorova, T. V. (2019). Optimization of conditions for *Lactobacillus reuteri* LR1 strain cultivation to improve the biosynthesis of bacteriocin-like substances. *Biotechnologia*, 35(5), 58–69. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-58-69> (In Russian)
7. Kalinina, E. V., Chernov, N. N., Novochkova, N. D. (2014). Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Moscow)*, 79(13), 1562–1583. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130082>
8. Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1830(5), 3143–3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
9. Fitzpatrick, A. M., Jones, D. P., Lou Ann S. Brown, L. A. S. (2012). Glutathione redox control of asthma: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(2), 375–408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M61093420010.1089/ars.2011.4198>
10. Qanungo, S., Starke, D. W., Pai, H. V., Mieyal, J. J., Nieminen, A.-L. (2007). Glutathione Supplementation Potentiates Hypoxic Apoptosis by S-Glutathionylation of p65-NFκB. *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), 18427–18436. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610934200>
11. Smirnova, G. V., Музыка, Н. Г., Глуховченко, М. Н., Октябрьский, О. Н. (1997). Effects penetrating and non-penetrating oxidants on *Escherichia coli*. *Biokhimiya*, 62(5), 563–569. (In Russian)
12. Boguszewska-Mańkowska, D., Nykiel, M., Zagdańska, B. (2015). Protein oxidation and redox regulation of proteolysis. Chapter in a book: Basic principles and clinical significance of oxidative stress. <https://doi.org/10.5772/61182>
13. Costa, V., Quintanilha, A., Moradas-Ferreira, P. (2007). Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life*, 59(4), 293–298. <https://doi.org/10.1080/15216540701225958>
14. Semikhina, V. F., Rozhkova, I. V., Begunova, A. V., Fedorova, T. V., Shirshova, T. I. (2018). Development of biotechnology of fermented milk product with *Lactobacillus reuteri* LR1 and the evaluation of its functional property in experiment *in vitro* and *in vivo* *Problems of Nutrition*, 87(5), 52–62. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2018-10053> (In Russian)
15. Nartsisov, Y. R., Maksimov, M. L., Maksimova, L. N. (2016). Metabolic therapy as the part of comprehensive treatment of chronic diseases. *RMJ*, 24(14), 894–900. (In Russian)
16. Illarionova, E. E., Kruchinin, A. G., Turovskaya, S. N., Bigaeva, A. V. (2021). Association of polymorphisms in the biocluster of casein and whey protein genes with technological properties of dairy raw materials. *Dairy Industry*, 3, 60–62. <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2021-03-60-62> (In Russian)
17. Ryabtseva S. A., Bratsihina M. A., Ganina V. I. (2010). Maintenance of viability of the starter cultures microflora. *Dairy Industry*, 1, 22–23. (In Russian)
18. Lalin, A. A., Gorbunova, E. V., Zelenkov, V. N., Gerasimov, M.K. (2009). Determination of antioxidant activity of wines by coulometric method. Scientific and methodological manual. Moscow, RAEN, 2009.
19. Deryugina, A. V., Koryagin, A. S., Kopylova, S.V., Talamanova, M. N. (2010). Methods of studying stress and adaptive reactions of the body according to the indicators of the blood system. Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod State University Publishing House, 2010.
20. Selvam, M. K. P., Henkel, R., Sharma, R., Agarwal, A. (2018). Calibration of redox potential in sperm wash media and evaluation of oxidation–reduction potential values in various assisted reproductive technology culture media using MiOXSYS system. *Andrology* 6(2), 293–300. <https://doi.org/10.1111/andr.12461>
21. Reichart, O., Szakmár, K., Jozwiak, A., Felföldi, J., Baranyai, L. (2007). Redox potential measurement as a rapid method for microbiological testing and its validation for coliform determination. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.016>
22. Kim, J., Bajpai, R., Iannotti, E. L. (1988). Redox potential in acetone-butanol fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 18, 175–186. <https://doi.org/10.1007/BF02930824>
23. Berovic, M. (2000). Scale-up of citric acid fermentation by redox potential control. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(5), 552–557. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990905\)64](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990905)64)
24. Shi, C., Kang, F., Zhu, Y., Teng, M., Shi, J., Qi, H., Huang, Z. et al. (2023). Photoreforming lignocellulosic biomass for hydrogen production: Optimized design of photocatalyst and photocatalytic system, *Chemical Engineering Journal*, 425(1), Article 138980. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138980>
25. Capeloa, T., Van de Velde, J. A., d'Hose, D., Lipari, S. G., Derouane, F., Hamelin, L. et al. (2022). Inhibition of mitochondrial redox signaling with mitox prevents metastasis of human pancreatic cancer in mice. *Cancers*, 14(19), Article 4918. <https://doi.org/10.3390/cancers14194918>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Донская Галина Андреевна — доктор биологических наук, заведующий лабораторией ресурсосберегающих процессов и функциональных продуктов, Всероссийской научно-исследовательский институт молочной промышленности 115093, Москва, Люсиновская, 35/7 Тел.: +7–499–236–35–95 E-mail: g_donskaya@vnimi.org ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6270-7579	Galina A. Donskaya, Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Resource-Saving Processes and Functional Products, All-Russian Research Institute of Dairy Industry 35/7, Lucinovskaya str., 115093, Moscow, Russia Tel.: +7–499–236–35–95 E-mail: g_donskaya@vnimi.org ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6270-7579
Креккер Людмила Геннадьевна — кандидат технических наук, младший научный сотрудник, лаборатория ресурсосберегающих процессов и функциональных продуктов, Всероссийской научно-исследовательский институт молочной промышленности 115093, Москва, Люсиновская, 35/7 Тел.: +7–908–595–42–52 E-mail: l_krekker@vnimi.org ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6905-6625 * автор для контактов	Lyudmila G. Krekker, Candidate of Technical Sciences, Junior Researcher, Laboratory of Resource-Saving Processes and Functional Products, All-Russian Research Institute of Dairy Industry 35/7, Lucinovskaya str., 115093, Moscow, Russia Tel.: +7–908–595–42–52 E-mail: l_krekker@vnimi.org ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6905-6625 * corresponding author
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.