

Научная статья

УДК 579.67, 575.113

DOI: 10.17586/2310-1164-2026-19-2-26-34

Оценка технологического и пробиотического потенциала штамма *Leuconostoc mesenteroides* SM1 на основе полногеномного секвенирования

М.Ю. Тюрин^{1*}, С.В. Китаевская¹, Н.Л. Доронина²¹Казанский национальный исследовательский технологический университет
Россия, Казань, *tyuris777@mail.ru²Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, Россия, Казань

Аннотация. Оценивали технологический и пробиотический потенциал штамма *Leuconostoc mesenteroides* SM1 на основе полногеномного секвенирования и анализов *in vitro*. Полногеномное секвенирование объекта проводили на платформе Oxford Nanopore с использованием ячейки FLO-MIN114. Сборку *de novo* и полировку осуществляли алгоритмами Flye и Medaka. Профиль генетической безопасности верифицировали в сервисах PathogenFinder, ResFinder и Card. Антиоксидантные свойства оценивали двумя колориметрическими методами: DPPH-тестом и восстанавливающей силой ионов трехвалентного железа. Собран полный геном: кольцевая хромосома (1,9 Мб) и две плазмиды (37,3 и 9,5 кб). Аннотация генома выявила детерминанты технологической пригодности: гены белков холодового шока (*csp*), развитую антиоксидантную систему (*trxB*, *tpx*, *trxA*) и кластеры биосинтеза экзополисахаридов (*epsC*, *cps2T*). Доказана безопасность штамма: индекс вероятной патогенности составил 0,0775, детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам отсутствуют. Эксперименты *in vitro* подтвердили высокую функциональную активность: антирадикальная активность культуральной жидкости составила 71,6%, а восстанавливающая сила достигла показателя 1,165. Доказано, что штамм *L. mesenteroides* SM1 является перспективным натуральным стабилизатором консистенции и функциональным компонентом для производства пробиотических холодных десертов.

Ключевые слова: пищевая биотехнология; пробиотики; *Leuconostoc mesenteroides*; штамм SM1; полногеномное секвенирование; антиоксидантная активность; технологический потенциал; генетическая безопасность; функциональное питание

Original article

Technological and probiotic potential of the *Leuconostoc mesenteroides* SM1 strain. Evaluation by whole-genome sequencing

Mikhail Yu. Tiurin^{1*}, Svetlana V. Kitaevskaya¹, Nataliya L. Doronina³¹Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia, *tyuris777@mail.ru³Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, Kazan, Russia

Abstract. In the context of the growing demand for functional foods, the development of probiotic cold desserts is associated with the challenge of reduced bacterial viability under cryostress and oxidative stress. The aim of this study was a comprehensive evaluation of the technological and probiotic potential of the *Leuconostoc mesenteroides* SM1 strain based on whole-genome sequencing and *in vitro* analyses. Whole-genome sequencing of the object was performed on the Oxford Nanopore platform using a FLO-MIN114 flow cell. *De novo* assembly and polishing were carried out using the Flye and Medaka algorithms. The genetic safety profile was verified using the PathogenFinder and ResFinder and Card database services. Antioxidant properties were evaluated by two colorimetric methods: the DPPH assay and the ferric reducing power assay. As a result, a complete genome was successfully assembled, consisting of a circular chromosome (1.9 Mb) and two plasmids (37.3 and 9.5 kb). Genome annotation revealed the determinants of technological suitability: cold shock protein genes (*csp*), a developed antioxidant system (*trxB*, *tpx*, *trxA*), and exopolysaccharide biosynthesis clusters (*epsC*, *cps2T*). The safety of the strain was proven: the predicted pathogenicity index was 0.0775, and antimicrobial resistance determinants were absent. *In vitro* experiments confirmed high functional activity: the antiradical activity of the culture fluid was 71.6%, and the reducing power reached an absorbance value of 1.165. The obtained data prove that the *L. mesenteroides* SM1 strain is a promising natural consistency stabilizer and a functional component for the production of bioproducts.

Keywords: food biotechnology; probiotics; *Leuconostoc mesenteroides*; strain SM1; whole-genome sequencing; antioxidant activity; technological potential; genetic safety; functional foods

Введение

В последние годы наблюдается значительный рост спроса на функциональные продукты питания, обогащенные пробиотиками, особый интерес представляют холодные пробиотические десерты, такие как функциональное мороженое, йогурт и другие [1, 2].

Однако разработка этих продуктов сопряжена с серьезными биотехнологическими вызовами. Ключевой проблемой является резкое снижение жизнеспособности пробиотиков в условиях криостресса (при замораживании) и окислительного стресса (при аэрации смеси). Кроме этого, актуальной задачей пищевой индустрии является поиск микроорганизмов, способных выступать в роли натуральных альтернатив синтетическим стабилизаторам консистенции [3, 4].

Криорезистентность пробиотических культур остается одним из главных лимитирующих факторов в производстве функциональных продуктов, подвергаемых замораживанию. Формирование кристаллов льда внутри и вне клетки, а также сопутствующий осмотический шок приводят к нарушению целостности клеточных мембран и денатурации белков. Это критически снижает титр жизнеспособных клеток в процессе низкотемпературного хранения. В этой связи поиск штаммов, обладающих естественными механизмами адаптации к охлаждению, становится приоритетной задачей [5].

Внедрение передовых методов полногеномного секвенирования (WGS) и биоинформатического анализа фундаментально трансформировало подходы к селекции стартовых и пробиотических культур. Современный *in silico* анализ переводит разработку технологий из длительного эмпирического скрининга в область предиктивного моделирования. Изучение генома позволяет с высокой точностью прогнозировать технологическое поведение штамма в готовом продукте, выявляя молекулярные механизмы стрессоустойчивости и синтеза метаболитов. Более того, глубокий биоинформатический скрининг является сегодня золотым стандартом для подтверждения статуса безопасности (QPS/GRAS) новых штаммов перед их внедрением в пищевую промышленность [6].

Предлагаемым решением является использование молочнокислых бактерий, в частности штамма *Leuconostoc mesenteroides* SM1, который был выделен из непастеризованного фермерского молока в Республике Татарстан и демонстрирует уникальные свойства – способность синтезировать экзополисахариды (ЭПС), выступающие в роли природных криопротекторов. Кроме того, этот штамм обладает высоким антиоксидантным статусом, что делает его перспективным объектом для создания функциональных холодных десертов [7].

Цель настоящего исследования – оценка технологического и пробиотического потенциала штамма *L. mesenteroides* SM1 на основе полногеномного секвенирования. Основные задачи биоинформатического анализа включали идентификацию детерминант технологической пригодности: кластеров биосинтеза экзополисахаридов, генов ответа на холодовой шок (*Csp*) и системы антиоксидантной защиты. Критически важным этапом работы стала комплексная оценка генетической безопасности штамма, подразумевающая поиск скрытых факторов вирулентности и генов антибиотикорезистентности с использованием международных баз данных.

Для подтверждения результатов геномного скрининга антиоксидантная активность штамма была дополнительно верифицирована в условиях *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Для выделения геномной ДНК *Leuconostoc mesenteroides* SM1 проводили культивирование чистой культуры на жидкой среде MRS (Himedia, Индия), для этого вносили единичную колонию со свежей чашки Петри. Инкубировали при температуре 37°C в статичных условиях. Сбор биомассы клеток осуществляли осаждением и центрифугированием при 8000 g, 10 мин, дважды промывали PBS-буфером для удаления компонентов среды, мешающих выделению ДНК.

Выделение высокомолекулярной геномной ДНК штамма *Leuconostoc mesenteroides* SM1 проводили с использованием коммерческого набора реагентов (ExtractDNA Blood & Cells, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Для подтверждения целостности выделенной ДНК и оценки длины фрагментов, необходимых для эффективного длинного прочтения, проводили горизонтальный электрофорез в 1% агарозном геле

по стандартной методике. В качестве маркера молекулярной массы применяли 1 kb DNA Ladder (ExtractDNA Blood & Cells, Россия).

Мультиплексирование образцов и подготовку библиотек для секвенирования осуществляли с помощью набора Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114-24, Oxford Nanopore Technologies, Великобритания).

Полногеномное секвенирование выполняли на портативной платформе MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies) с использованием проточной ячейки FLO-MIN114. Управление этим процессом и первичный сбор данных проводили в программной среде MinKNOW v.23.11.2. Трансляцию сырых электрических сигналов в нуклеотидные последовательности (basecalling) выполняли «на лету» с помощью интегрированного алгоритма Dorado v.7.2.11 (модель: Fast, скорость 400 bps). Фильтрацию прочтений осуществляли с пороговым значением показателя качества (Min Q score) ≥ 8 [8, 9].

Общее медианное значение N50 для запуска составило 1.21 kb. После процедуры демультиплексирования для целевого штамма *L. mesenteroides* SM1 (индекс *barcode04*) успешно идентифицировали 462,18 тыс. прочтений, что составило 328,44 Мб качественных нуклеотидных последовательностей. Полученного объема данных было достаточно для обеспечения высокого покрытия (coverage), необходимого для точной сборки генома *de novo* [10].

Сборку генома *de novo* из полученных длинных прочтений (FASTQ) проводили с использованием алгоритма Flye (версия 2.9.6-b1802). Для исправления артефактов нанопорового секвенирования (в частности, устранения сдвигов рамок считывания в гомополимерных участках) применяли этап полировки консенсусной последовательности с помощью инструмента Medaka [11, 12].

Для поиска специфических генетических детерминант, определяющих технологическую пригодность штамма (гены криорезистентности, антиоксидантной защиты и биосинтеза экзополисахаридов), проводили направленный биоинформатический поиск в полученных аннотационных файлах формата GenBank.

Оценку патогенного потенциала штамма проводили с использованием ансамбля из четырех нейронных сетей с помощью сервиса PathogenFinder2 (v.o.6.o), Session ID: hu3e62gbar586vztcn7cwnot7qqwm5db обученных на различных выборках геномных данных. Итоговое предсказание вычисляли как среднее арифметическое выходных значений всех моделей. Пороговое значение (threshold) для отнесения штамма к категории патогенов составляло 0.5; значения ниже данного порога интерпретировались как отсутствие патогенного потенциала [13].

Поиск генов устойчивости к антимикробным препаратам проводили с использованием программного обеспечения ResFinder v.4.7.2 Session ID: m3lq2cv4lf7884ozhyevnhrruney9hje [14, 15].

Для более глубокого анализа резистоста, включая идентификацию хромосомных гомологов и оценку внутренней (intrinsic) устойчивости, применяли алгоритм Resistance Gene Identifier (RGI) на базе ресурса Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD). Анализ в базе CARD выполняли с помощью строгого алгоритма фильтрации (параметр Strict cut-off) для минимизации ложноположительных срабатываний при поиске белковых гомологов [16].

Антиоксидантный потенциал штамма оценивали двумя независимыми колориметрическими методами:

- ✓ **DPPH-тест:** способность нейтрализовать свободные радикалы определяли с использованием 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH) согласно классической методике Brand-Williams et al. [17], измерения проводили на спектрофотометре INNO (LTEK Co., Южная Корея) при длине волны 540 нм;

- ✓ **восстанавливающая сила (Fe^{3+} Reducing Power):** способность штамма выступать в роли донора электронов оценивали по реакции восстановления ионов трехвалентного железа (Fe^{3+}) до двухвалентного (Fe^{2+}) по методу, описанному I. Gülçin и S. Alwasel [18], измерения проводили на спектрофотометре INNO (LTEK Co., Южная Корея) при длине волны 700 нм.

Результаты и их обсуждение

Успешность секвенирования на платформе Oxford Nanopore критически зависит от длины исходных нуклеиновых кислот. Качество выделенной геномной ДНК штамма *L. mesenteroides* SM1 оценивали методом электрофореза в агарозном геле (рисунок 1). На электрофореграмме

визуализируется интенсивная флуоресцирующая полоса, локализованная непосредственно вблизи стартовой лунки. Минимальная электрофоретическая подвижность образца в сравнении с мигрирующими фрагментами маркера (1 kb DNA Ladder) свидетельствует о том, что молекулярная масса экстрагированной ДНК значительно превышает верхнюю границу маркера, подтверждая наличие высокомолекулярной фракции (High Molecular Weight, HMW).

Отсутствие выраженного мигрирующего шлейфа подтверждает минимальную степень фрагментации и деградации молекул в процессе лизиса и очистки. Получение интактной высокомолекулярной геномной ДНК позволило успешно провести подготовку библиотеки для последующего секвенирования длинными прочтениями.

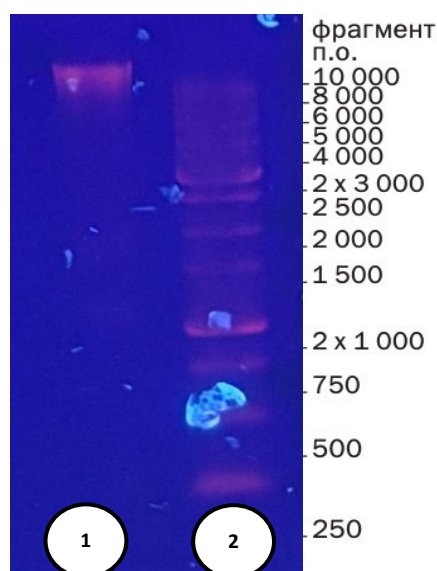


Рисунок 1 – Электрофореграмма геномной ДНК штамма *L. mesenteroides* SM1 в 1% агарозном геле: 1 – образец геномной ДНК штамма SM1 (высокомолекулярная фракция); 2 – маркер молекулярной массы (1 kb DNA Ladder)

Figure 1. Electropherogram of genomic DNA of the *Leuconostoc mesenteroides* SM1 strain in 1% agarose gel: 1 – genomic DNA sample of the SM1 strain (high-molecular fraction); 2 – molecular weight marker (1 kb DNA ladder)

Успешная интеграция пробиотических культур в холодные аэрируемые десерты требует высокой устойчивости к криострессу и окислительному повреждению. Анализ аннотированного генома *L. mesenteroides* SM1 выявил комплексную систему адаптации к данным технологическим факторам (таблица 1).

Способность штамма выдерживать замораживание обусловлена наличием двух генов белков холодового шока семейства *csp* (локусы ACZ2DY_00235 и ACZ2DY_04790). Белки *csp* выступают в роли РНК-шаперонов, предотвращая образование вторичных структур в молекулах матричной РНК при снижении температуры, что обеспечивает непрерывность трансляции критически важных ферментов.

Для защиты от окислительного стресса, возникающего на этапе фризирования и аэрации смеси, штамм обладает мощным антиоксидантным репертуаром. Выявлена полная тиоредоксиновая система, включающая гены тиоредоксин-дисульфидредуктазы (*trxB*), тиолпероксидазы (*tpx*) и трех копий самого тиоредоксина (*trxA*). Дополнительным эшелонem защиты служит фермент глутатионпероксидаза (ACZ2DY_01300), обеспечивающий нейтрализацию гидропероксидов липидов клеточных мембран.

Глутатионовый каскад также дополнен генами лактоилглутатионлиазы (ACZ2DY_00475) и глутатион-S-трансферазы (ACZ2DY_01795), расширяющими детоксикационный потенциал клетки. Примечательной особенностью аннотированного генома является отсутствие классического гена супероксиддисмутазы (*sodA*). Однако биоинформатический скрининг выявил наличие марганец-зависимого трансмембранного транспортера (локус ACZ2DY_09980), отвечающего за внутриклеточный гомеостаз ионов Mn^{2+} . Аккумуляция марганца и формирование его комплексов с органическими метаболитами выступает эффективным неферментативным механизмом дисмутации супероксидного радикала, характерным для многих молочнокислых бактерий, что полностью компенсирует отсутствие SOD и объясняет высокую радикалоперехватывающую активность штамма *in vitro*.

Таблица 1. Генетические маркеры стрессоустойчивости и технологической пригодности *L. mesenteroides* SM1
Table 1. Genetic markers of stress resistance and technological suitability of *L. mesenteroides* SM1

Локус (Locus Tag)	Ген	Аннотированный продукт	Биологическая функция
Криорезистентность (холодовой шок)			
ACZ2DY_00235, 04790	<i>csp</i>	Cold-shock protein	РНК-шапероны, адаптация к низким температурам
Антиоксидантная система			
ACZ2DY_00650	<i>tpx</i>	Thiol peroxidase	нейтрализация пероксидов и защита мембран
ACZ2DY_01300	–	Glutathione peroxidase	утилизация активных форм кислорода (АФК)
ACZ2DY_04270	<i>trxB</i>	Thioredoxin-disulfide reductase	восстановление пула внутриклеточного тиоредоксина
ACZ2DY_01835, 08620, 10075	<i>trxA</i>	Thioredoxin (3 копии)	регуляция клеточного редокс-гомеостаза
ACZ2DY_09980	–	Manganese ion transmembrane transporter	внутриклеточный гомеостаз Mn^{2+} , неферментативная дисмутация супероксидного радикала
ACZ2DY_00475	<i>adhP</i>	Lactoylglutathione lyase	расширение глутатионовой системы детоксикации (глиоксалазная система)
ACZ2DY_01795	–	Glutathione S-transferase	защита от окислительного стресса, конъюгация токсичных соединений с глутатионом
Биосинтез экзополисахаридов			
ACZ2DY_07180	<i>epsC</i>	Serine O-acetyltransferase	регуляция биосинтеза сахаридной капсулы
ACZ2DY_08240	<i>cps2T</i>	Glycosyltransferase	сборка цепей капсульного полисахарида
ACZ2DY_08010–08230	–	Glycosyltransferases (Family 2)	кластер полимеризации и секреции ЭПС

Ключевая технологическая особенность штамма SM1 – выраженный генетический потенциал к синтезу экзополисахаридов, выступающих природными криопротекторами и текстурообразователями. В геноме идентифицирован ген *epsC* (ACZ2DY_07180), а также обширный полицистронный кластер, кодирующий более десятка гликозилтрансфераз семейства 2 (включая ген синтеза капсульных полисахаридов *cps2T*, локус ACZ2DY_08240). Высокое число копий гликозилтрансфераз свидетельствует о способности штамма продуцировать структурно сложные полисахаридные матрицы, улучшающие реологические свойства готового продукта без добавления синтетических стабилизаторов.

Благодаря сервису PathogenFinder подтверждено, что штамм классифицируется как непатогенный для человека микроорганизм (Human Non Pathogenic). Высокий профиль безопасности штамма *Leuconostoc mesenteroides* SM1 подтверждают полученные данные (таблица 2).

Таблица 2. Прогнозирование патогенной способности бактерий
Table 2. Prediction of the pathogenic ability of bacteria

Модуль (Module)	Значение (Prediction)	Интерпретация
neural network 1	443	отсутствие патогенных признаков
neural network 2	447	отсутствие патогенных признаков
neural network 3	1,917	отсутствие патогенных признаков
neural network 4	295	отсутствие патогенных признаков
среднее значение (mean)	0,0775 ($\pm 0,0662$)	непатогенен для человека

Анализ генома штамма *L. mesenteroides* SM1 на наличие детерминант антибиотикорезистентности (таблица 3) показал отсутствие приобретенных генов устойчивости ко всем протестированным

классам препаратов (Software version: ResFinder-4.7.2 Sample name: assembly.fasta Session ID: m3lq2cv4lf7884ozhyevnhrrune9hje).

Таблица 3. Детерминанты антибиотикорезистентности
Table 3. Determinants of antibiotic resistance

Класс антимикробных препаратов (Class)	Предсказанный фенотип (WGS-predicted phenotype)
aminoglycosides (гентамицин, канамицин и др.)	резистентность не обнаружена
beta-lactams (пенициллины, цефалоспорины и др.)	резистентность не обнаружена
quinolones (ципрофлоксацин и др.)	резистентность не обнаружена
macrolides / lincosamides / streptogramins	резистентность не обнаружена
tetracyclines (тетрациклин, доксициклин)	резистентность не обнаружена
phenicols (хлорамфеникол)	резистентность не обнаружена
folate pathway antagonists (триметоприм)	резистентность не обнаружена
all other tested classes (другие)	резистентность не обнаружена

Оценка профиля антибиотикорезистентности – критически важный критерий безопасности (Safety Assessment) для микроорганизмов, претендующих на статус пробиотика и использование в пищевых технологиях (в соответствии с рекомендациями EFSA и FAO/WHO). Главная потенциальная угроза заключается в возможности горизонтального переноса (horizontal gene transfer) мобильных детерминант резистентности от пробиотических культур к патогенной или условно-патогенной микрофлоре желудочно-кишечного тракта человека.

Полногеномный скрининг штамма *L. mesenteroides* SM1 с использованием ресурса ResFinder 4.7.2 (база данных приобретенных генов резистентности) показал полное отсутствие генетических детерминант устойчивости ко всем протестированным классам антимикробных препаратов (таблица 3).

Для более глубокой оценки геном дополнительно проанализировали с использованием базы данных CARD и алгоритма RGI. В результате строгого поиска (strict cut-off) идентифицировали единственный генетический локус, кодирующий белок с низкой степенью гомологии (34,36%) к D,D-карбоксипептидазе *vanY* (таблица 4). Наличие данного хромосомного гомолога является ожидаемым и молекулярно подтверждает природную (intrinsic) устойчивость всех представителей рода *Leuconostoc* к ванкомицину. Данная устойчивость обусловлена конститутивным синтезом клеточной стенки с терминальным дипептидом D-Ala-D-Lac вместо D-Ala-D-Ala.

Поскольку обнаруженный ген является видоспецифичным хромосомным элементом с низкой гомологией к классическим мобильным оперонам (*vanA/vanB*), он не способен к горизонтальному переносу и не представляет эпидемиологической опасности. Таким образом, комплексный анализ (ResFinder и CARD) подтверждает статус безопасности штамма *L. mesenteroides* SM1 и обосновывает возможность его применения в технологии функциональных продуктов.

Таблица 4. Детерминанты резистентности штамма *L. mesenteroides* SM1 по данным базы CARD (RGI)
Table 4. Resistance determinants of the *L. mesenteroides* SM1 strain according to the CARD (RGI) database

Аннотированный ген (Best Hit ARO)	Идентичность белка, %	Класс антимикробного препарата	Механизм резистентности	Генетическая природа
vanY (гомолог)	34,36	гликопептиды (ванкомицин)	модификация мишени (Antibiotic target alteration)	природная хромосомная (Intrinsic)

Таким образом, геномный профиль штамма *L. mesenteroides* SM1 подтверждает отсутствие рисков распространения антибиотикорезистентности, что полностью удовлетворяет современным критериям безопасности QPS (Qualified Presumption of Safety) и обосновывает возможность его применения в технологии функциональных холодных десертов.

На рисунке 2 приведены результаты исследования антиоксидантной активности штамма *L. mesenteroides* SM1 DPPH-тестом (антирадикальная активность) и Fe³⁺ Reducing Power (восстанавливающая сила) *in vitro*.



Рисунок 2 – Антиоксидантная активность штамма *L. mesenteroides* SM1:

А – антирадикальная, Б – восстанавливающая

Figure 2. Antioxidant activity of *L. mesenteroides* SM1 strain: А – antiradical, Б – restorative

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемый штамм *L. mesenteroides* SM1 обладает выраженным антиоксидантным потенциалом. Примечательно, что наибольшую активность зафиксировали в бесклеточной культуральной жидкости.

При оценке антирадикальной активности (А) (по способности нейтрализовать свободный радикал DPPH) максимальный показатель продемонстрировала культуральная жидкость — 71,6%. Внутриклеточный экстракт и интактные клетки так же показали значимую способность к перехвату радикалов, составившую 56,2 и 51,1% соответственно.

При исследовании железовосстанавливающей способности (Б) (по конверсии Fe^{3+} в Fe^{2+}) максимальную оптическую плотность зафиксировали у культуральной жидкости (1,165), что значительно превосходит показатели внутриклеточного экстракта (0,702) и интактных клеток (0,115).

Столь высокая антиоксидантная активность бесклеточной фракции имеет ключевое технологическое значение. Она указывает на то, что в процессе жизнедеятельности штамм активно секретирует в окружающую среду метаболиты с сильными восстанавливающими свойствами. В случае молочнокислых бактерий, и *L. mesenteroides* в частности, такими соединениями могут выступать экзополисахариды, органические кислоты и специфические пептиды. Это согласуется с результатами биоинформатического анализа, направленного на поиск генов биосинтеза ЭПС (например, генов декстрансахаразы).

Наличие умеренной активности во внутриклеточном экстракте (56,2% для DPPH) подтверждает присутствие внутриклеточных антиоксидантных ферментов (тиоредоксина и др.), гены которых были локализованы в собранном геноме. Минимальная же активность интактных клеток во всех тестах ожидаема и связана с барьерной функцией клеточной стенки, которая физически ограничивает контакт внутриклеточных ферментов с реагентами *in vitro*.

Таким образом, способность *L. mesenteroides* секретировать мощные антиоксиданты наружу (в виде метаболитов и экзополисахаридов) делает его идеальным кандидатом для создания пробиотических холодных десертов. Внесение данного штамма позволит не только улучшить консистенцию продукта за счет ЭПС, но и эффективно защитить липидные и белковые компоненты пробиотических холодных десертов от окислительной порчи в процессе замораживания и хранения.

Заключение

В ходе работы проведено комплексное исследование штамма *Leuconostoc mesenteroides* SM1, направленное на оценку его пробиотического и технологического потенциала для создания функциональных продуктов питания. Полногеномное секвенирование (*Oxford Nanopore*) позволило собрать завершённый геном, состоящий из кольцевой хромосомы (1,9 Мб) и двух плазмид (37,3 и 9,5 кб).

Биоинформатическая аннотация (NCBI PGAP) выявила ключевые детерминанты технологической пригодности: гены криорезистентности (*csp*), кластеры биосинтеза ЭПС (*epsC*, *cps2T*) и развитую антиоксидантную систему. Генетическая безопасность штамма подтверждена отсутствием факторов вирулентности (PathogenFinder, Mean = 0,0775) и генов антибиотикорезистентности (ResFinder).

Отсутствие у пробиотического штамма *Leuconostoc mesenteroides* SM1 генов приобретенной антибиотикорезистентности является значимым фактом, гарантирующим его безопасность при использовании в производстве пробиотических холодных десертов, поскольку основной риск, связанный с потреблением пробиотиков, заключается в возможности горизонтального переноса генов антибиотикостойчивости (посредством конъюгации или трансформации) от пищевых пробиотических бактерий к условно-патогенным микроорганизмам кишечной микробиоты человека. В связи с этим такие международные регуляторные органы, как EFSA (Европейский союз), подчеркивают, что для стартовых культур наличие именно трансмиссивных генов резистентности недопустимо, так как включение их в «пищевую цепь» может служить основным путем передачи этих детерминант антибиотикостойчивости к кишечному микробиому человека [19].

Таким образом, штамм *Leuconostoc mesenteroides* SM1 показал отсутствие мобильных генетических элементов, кодирующих устойчивость к антибиотикам, подтвержденное методами полногеномного секвенирования, что исключает его роль как потенциального резервуара и гарантирует, что употребление функциональной продукции с этим пробиотиком не будет способствовать распространению антибиотикорезистентности в кишечном микробиоме человека.

Эксперименты *in vitro* продемонстрировали высокую антиоксидантную активность штамма (до 71,6%), что в сочетании с генетическим профилем делает *L. mesenteroides* SM1 перспективным объектом для создания биопродуктов с повышенной стрессоустойчивостью и функциональными свойствами.

Заявление о доступности данных

Необработанные данные секвенирования *Oxford Nanopore* и собранный геном штамма *Leuconostoc mesenteroides* SM1 депонированы в базе данных NCBI.

Метаданные проекта и биологического образца доступны под номером доступа BioProject PRJNA1426784 и номером доступа BioSample SAMN55892615 соответственно.

Необработанные последовательности доступны в архиве последовательностей (SRA) под номером доступа PRJNA1426784.

Полная/черновая сборка генома и соответствующая аннотация доступны в GenBank под номером доступа JBVOTN000000000.

Литература/References

1. Granato D., Barba F.J., Kovačević D.B., Lorenzo J.M., Cruz A.G., Putnik P. Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2020, V. 11, pp. 93–118. DOI: 10.1146/annurev-food-032519-051708
2. Chang W., Li K., Qi X., Meng Z. Formulation strategies, texture improvement, and sensory perception of healthy ice cream: A review. *Food Chem.* 2025, V. 30, no. 481, article 144015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2025.144015
3. Ziarno M., Cichońska P., Kowalska E., Zaręba D. Probiotic-enriched ice cream with fermented white kidney bean homogenate: Survival, antioxidant activity, and potential for future health benefits. *Molecules.* 2024, V. 29, no. 13, article 3222. DOI: 10.3390/molecules29133222
4. Feng T., Wang J. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: A systematic review. *Gut Microbes.* 2020, V. 12, no. 1, article 1801944. DOI: 10.1080/19490976.2020.1801944
5. Tyutkov N., Zhernyakova A., Birchenko A., Eminova E., Nadtochii L., Baranenko D. Probiotics viability in frozen food products. *Food Bioscience.* 2022, V. 50, Part A, article 101996. DOI: 10.1016/j.fbio.2022.101996
6. Peng X., Ed-Dra A., Yue M. Whole genome sequencing for the risk assessment of probiotic lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2023, V. 63, no. 32, pp. 11244–11262. DOI: 10.1080/10408398.2022.2087174
7. Zeid A.F., Zarour K., Mohedano M.L., Díez-Ozaeta I., López P. Biotechnological potential and genomic analysis of the *Leuconostoc mesenteroides* F17 and F18 strains isolated from camel milk. *BMC Microbiol.* 2025, V. 25, no. 1, article 763. DOI: 10.1186/s12866-025-04349-x
8. Ligation sequencing gDNA – Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24). Document version: NBE_9169_v114_revW_03Oct20252024. *Oxford Nanopore Technologies.* URL: <https://nanoporetech.com/document/ligation-sequencing-gdna-native-barcoding-v14-sqk-nbd114-24> (Accessed 01.03.2026)
9. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. CSHL Press, NY. 2001, V. 1.
10. Jung J.Y., Lee S.H., Lee S.H., Jeon C.O. Complete genome sequence of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain J18, isolated from kimchi. *J Bacteriol.* 2012, V. 194, no. 3, pp. 730–731. DOI: 10.1128/JB.06498-11

11. Kolmogorov M., Yuan J., Lin Y., Pevzner P.A. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol.* 2019, V. 37, no. 5, pp. 540–546. DOI: 10.1038/s41587-019-0072-8
12. Sequence correction provided by ONT research and applications. Oxford Nanopore Technologies. Medaka. *GitHub*. 2024. URL: <https://github.com/nanoporetech/medaka> (Accessed 01.03.2026)
13. PathogenFinder 2.0: a high-resolution tool for the prediction of bacterial pathogenicity. *Center for Genomic Epidemiology*. 2024. URL: <https://genepi.food.dtu.dk/pathogenfinder> (Accessed 01.03.2026)
14. Bortolaia V., Kaas R.S., Ruppe E., et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020, V. 75, no. 12, pp. 3491–3500. DOI: 10.1093/jac/dkaa345
15. Florensa A.F., Kaas R.S., Clausen P.T.L.C., Aytan-Aktug D., Aarestrup F.M. ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial Genomics*. 2022, V. 8, Is. 1, article 000748. DOI: 10.1099/mgen.0.000748
16. Alcock B.P., Huynh W., Chalil R., Smith K.W., Raphenya A.R., Wlodarski M.A., et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* 2023, V. 51, Part D1, pp. D690–D699. DOI: 10.1093/nar/gkac920
17. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT–Food Science and Technology*. 1995, V. 28, pp. 25–30. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
18. Gulcin I., Alwasel S.H. Fe³⁺ reducing power as the most common assay for understanding the biological functions of antioxidants. *Processes*. 2025, V. 13, no. 5, article 1296. DOI: 10.3390/pr13051296
19. Koutsoumanis K., Allende A., Alvarez-Ordóñez A., Bolton D., Bover-Cid S., Chemaly M., Davies R., et al. Statement on how to interpret the QPS qualification on ‘Acquired antimicrobial resistance genes’. *EFSA Journal*. 2023, V. 21, Is. 10, article 8323. DOI: 10.2903/j.efsa.2023.8323.

Информация об авторах

Михаил Юрьевич Тюрин – аспирант кафедры биоинжиниринга и пищевых систем

Светлана Владимировна Китаевская – д-р техн. наук, доцент, и.о. завкафедрой пищевой биотехнологии

Наталия Леонидовна Доронина – младший научный сотрудник

Information about the authors

Mikhail Yu. Tiurin, Postgraduate Student, Department of Bioengineering and Food Systems

Svetlana V. Kitaevskaya, DSc (Eng), Associate Professor, Acting Head of the Department of Food Technology

Nataliya L. Doronina, Junior Scientific Researcher

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflicts of interests

Статья поступила в редакцию 08.03.2026

Одобрена после рецензирования 09.04.2026

Принята к публикации 10.04.2026

The article was submitted 08.03.2026

Approved after reviewing 09.04.2026

Accepted for publication 10.04.2026