

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

06.07. – МР. 216 «С». 2023.02.15. 15 ПЗ

НУБІП України

ЛЯШЕНКО ВІКТОРОЛЕГОВИЧ

2023

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України



НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ  
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Завідувач кафедри

“ ” 2023 р.

**ЗАВДАННЯ  
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ**

Ляшенко Віктор Олегівич  
(прізвище, ім'я, по батькові)  
Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»  
(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»  
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна  
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Синтез екзополісахаридів молочнокислими бактеріями роду Lactobacillus»

Затверджена наказом ректора НУБіП України від 15.02.2023 р. №216 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 1 листопада 2023 р.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

- 1. Пошук штамів Бактерій роду Lactobacillus, здатних до синтезу ЕПС
- 2. Аналіз бактеріальних ЕПС
- 3. Виділення екзополісахаридів

Перелік графічного матеріалу:

Дата видачі завдання 1 вересня 2022 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи (підпис) (прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання (підпис) (прізвище та ініціали)

НУБІП України

# ЗМІСТ

## ВСТУП..... 5

## РОЗДІЛ 1. Характеристика бактерій роду *Lactobacillus*..... 6

1.1 Таксономічний статус..... 11

1.2 Морфологічні ознаки..... 11

1.3 Культуральні ознаки..... 13

1.4 Фізіолого-біохімічні властивості *Lactobacillus*..... 14

1.5 Розповсюдження бактерій роду *Lactobacillus*..... 15

РОЗДІЛ 2. Характеристика бактеріальних ЕПС..... 18

2.1 Характеристика..... 18

2.2 Актуальність використання бактеріальних ЕПС..... 21

РОЗДІЛ 3. Методи пошуку та отримання продуцентів ЕПС..... 23

3.1 Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента..... 23

3.2 Морфологія і фізіологія *Lactobacillus reuteri*..... 25

3.3 Мікробіологічний контроль..... 31

3.4 Синтез ЕПС штамом LB 121..... 32

3.5. Визначення молекулярної маси ЕПС..... 35

3.5.1 Ексклюзійна хроматографія..... 35

РОЗДІЛ 4. Виділення бактеріальних ЕПС..... 38

4.1. Способи очищення кінцевого продукту..... 38

4.2. Виділення..... 40

НУБІП України

НУБІП України

## ВСТУП

Останнім часом, серед продуктів метаболізму молочнокислих бактерій, особливу увагу було приділено дослідженню екзополісахаридів (ЕПС), завдяки їх потенційній користі та ролі у структуроутворенні продуктів, подібних до стабілізаторів рослинного походження та гелеутворюючих агентів, таких як: гелан, ксантан, пулулан тощо.

Екзополісахариди, що синтезуються бактеріями можуть володіти унікальними фізико-хімічними, біологічними та функціонально-технологічними властивостями [11]. Завдяки емульгуючим та суспендуючим властивостям, ЕПС

бактерій значно покращують реологічні показники харчових продуктів. З точки зору біотехнології, саме ЕПС бактеріального походження найбільш перспективні, якщо порівнювати їх з полісахаридами тваринного та рослинного походження.

Це зумовлюється тим, що бактеріальні ЕПС, на відміну від полісахаридів рослинного походження, отримуються у потрібній кількості незалежно від кліматичних умов або пори року, а також можливо змінювати їх властивості залежно від умов культивування бактерій.

На сьогоднішній день, для більшості підприємств залишається актуальною проблема запобігання зараження культур мікроорганізмів бактеріофагами.

Аналізуючи результати досліджень можна з впевненістю сказати, що екзополісахаридна оболонка лактобактерій є важливим фактором, який приймає участь в механізмі резистентності клітини до адгезії бактеріофагами та подальшого руйнування клітини. Тож, при використанні штамів молочнокислих бактерій з підвищеною здатністю до продукування ЕПС, можна збільшити стійкість виробничих культур до бактеріофагів.

Отже, завдяки відносно невеликій вартості виробництва, та можливості продукувати ЕПС у великому обсязі на відходах деяких виробництв, та в будь-яку пору року, використання бактеріальних ЕПС є економічно вигідним. Також, ще однією унікальністю бактеріальних екзополісахаридів є те, що в своєму складі містять моноцукри, які не входять до складу ЕПС іншого походження.

## РОЗДІЛ 1 Характеристика бактерій роду *Lactobacillus*

Характеристика бактерій роду *Lactobacillus* належить до основної мікрофлори людини: їх можна виявити практично у всіх біотопах травного тракту.

Рід *Lactobacillus* – найбільший в розділі молочнокислих бактерій, що налічує сотні видів.

Лактобацили є грампозитивними неспорутворюючими бактеріями, що відрізняються своєю різноманітністю за розмірами і формами. Вони мають форми від довгих до коротких ниткоподібних паличок, що розміщуються поодинокі, короткими ланцюжками або ж попарно. Грунтуючись на аналізі послідовності 16S рРНК, філогенетично лактобацили розподілені на 7 груп:

1. *L. buchneri* (bu);
2. *L. casei* (ca);
3. *L. delbrueckii* (de) ;
4. *L. plantarum* (pl) ;
5. *L. reuteri* (re);
6. *L. sakei* (sa) ;
7. *L. salivarius* (sl);

Бактерії роду *Lactobacillus* є факультативними або облігатними анаеробами з підвищеною ферментативною активністю. Залежно від шляхів ферментації вуглеводів, рід ділиться на три групи:

- облігатні гомоферментативні,
- факультативні гетероферментативні
- облігатні гетероферментативні [9].

У процесі метаболізму лактобацили утворюють молочну кислоту, перекис водню, синтезують лізоцим і речовини з антимікробною активністю, такі як: плантаріцин, реутерін, лактолін, лактоцидін [8, 9, 12].

Також, гетероферментативні види лактобацил продукують молочну, масляну, оцтову та інші кислоти, а також CO<sub>2</sub> [7, 12]. Важливою властивістю бактерій роду *Lactobacillus* є їх здатність до адгезії в шлунково-кишковому тракту [12].

Бактерії роду *Lactobacillus* мають широкий спектр біологічних властивостей:

- допомагають стимулювати виділення шлункового соку, а також ферментів необхідних для підвищення ефективності процесів травлення;
- зменшують негативні ефекти антибіотиків;
- сприяють нормалізації ліпідного обміну та нейтралізації солей жовчних кислот.

Ще однією важливою характеристикою є їх функція захищати клітини епітелію від пошкодження і покращувати регенерацію слизової оболонки кишечника, зменшувати запальні процеси, нормалізуючи загальний склад мікробіоти [11–13].

Одним із найбільш досліджених пробіотичних штамів є *L. rhamnosus* ATCC 53103 (*L. rhamnosus* GG або LGG). Він здатен до адгезії на епітеліальних клітинах, має стійкість до кислотного середовища шлунку, а також проявляє високу антибіотичну дію проти кишкових патогенів. Також доведено, що *L. rhamnosus* LGG продукту виділяє антимікробні речовини, які, в свою чергу, пригнічують активність ряду патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів: *Clostridium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus i Streptococcus spp.*, та інших.

Однак, беручи до уваги мікроорганізми основної мікрофлори, бактерії роду *Lactobacillus* мають виражену симбіотичну дію та позитивний вплив на адгезивні властивості *Bifidobacterium* [14]. Однією з основних переваг штамів роду *Lactobacillus* є можливість їх використання одночасно і як закваски для ферментації харчових продуктів, і як медичні або ветеринарні пробіотичні препарати [9].

### **Антиоксидантні властивості бактерій роду *Lactobacillus***

Бактерії роду *Lactobacillus* захищують організм від шкідливого впливу вільних радикалів, оскільки вони мають високу антиоксидантну дію [15]. Утворені в організмі активні форми кисню мають здатність викликати мутації в ДНК, пошкодження білків, модифікацію ліпопротеїдів низької щільності, а також окиснення мембранних фосфоліпідів. В свою чергу, це може призводити до пошкодження клітин, та виділення надмірної кількості вільних радикалів,

призводячи до розвитку діабету, артриту, атеросклерозу, а також серцево-судинних та нейродегенеративних захворювань чи раку [16].

Окисний стрес – це дисбаланс між значно підвищеним вмістом активного кисню та зменшеною активністю механізму антиоксидантного захисту [17]. При умовах, якщо вміст активного кисню певною мірою перевищує нейтралізуючу здатність ендогенних акцепторів, нуклеїнових кислот, чи наприклад білків, то під дією окисних процесів відбувається пошкодження клітин.

Отже, важливим фактором для запобігання небажаних наслідків оксидативного стресу, є додатковий захист організму за допомогою введення різноманітних антиоксидантних речовин.

Аналізуючи літературні дані можна сказати, що пробіотики, основою яких є бактерії роду *Lactobacillus*, мають антиоксидантну дію на організм людини.

Антиоксидантні властивості різноманітних штамів *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*) були досліджені з використанням як методів *in vitro* так і методів *in vivo*, та виявлено, що бактерії роду *Lactobacillus* синтезують цілий ряд ферментів з певними антиоксидантними властивостями, а саме:

- глутатіонтрансферазу;
- глутатіонпероксидазу;
- УДФ-глюкозонозилтрансферазу;
- хінонредуктазу;
- $\alpha$ - і  $\beta$ -глюкозидазу;
- супероксид дисмутазу [17, 18].

Молекулярні механізми антиоксидантної дії молочнокислих бактерій є мало дослідженими, виявлено [15], що культура *in vitro* в умовах індукованого  $H_2O_2$  оксидативного стресу штам *L. plantarum* MA2 проявляв антиоксидантну дію за рахунок активації експресії генів, продукти яких забезпечують антиоксидантний захист: *gshR*, *cat* і *prx*. За допомогою цих досліджень *L. plantarum* MA2 вважається потенційним штамом з антиоксидантними властивостями [15].

## Антагоністичні властивості бактерій роду *Lactobacillus*

Багато видів бактерій синтезують антибіотичні речовини білково-пептидної природи, що затримують або повністю знищують ріст споріднених штамів чи видів бактерій, а також мають антибактеріальну дію широкого спектру. Ці речовини вважаються високомолекулярними антибіотиками – бактеріоцинами, які мають молекулярну масу від 10 до 30 кДа, а також витримують високі температури. Їх біосинтез відбувається на рибосомах та кодується плазмідами [19, 20].

Лактобацили мають здатність до синтезу досить широкого спектру бактеріоцинів, які мають значний спектр дії, а також інгібують ріст деяких видів умовно-патогенних грампозитивних мікробіот, таких як: *Clostridium buturicum*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *C. Sporogenes*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus faecalis* тощо. Одним із вирішальних факторів, що забезпечує підвищені колонізаційні властивості та їх роль в підтриманні фізіологічного-мікробного балансу в біоценозах є синтез активних бактеріоцинів [19].

Бактеріоцини бактерій роду *Lactobacillus* мають компоненти з білковою складовою, які здатні фіксуватись на специфічних клітинних рецепторах клітин-мішеней та порушувати процеси транспорту ряду катіонів через клітинну мембрану мікроорганізмів. В деяких випадках бактеріоцини викликають часткову зміну рибосом та лізис клітинних стінок бактерій. Найбільш вивченими бактеріоцинами лактобацил є амідоворин 471 (*L. amylovorus* 471/19), ацидоцин В (*L. acidophilus*), баваріцин MN (*L. bavaricus* MN), казеїн (*L. casei*), курваїн FS47 та А, (*L. curvatus* FS47 та *L. curvatus* LTH1174), лактоцин S (*L. sake* L 45), плантарицин А и С (*L. plantarum*), плантацин 154 (*L. plantarum* LTF154), сакацин 674 (*L. sake* Lb674) та ін. [19]. В літературі також з'явилась інформація про нові бактеріоцини представників роду *Lactobacillus*, а саме: *salivaricin mmaye* 1 (*L. salivarius*) та *Bac F1* і *Bac F2* (*L. plantarum* subsp. *argentoratensis* SJ33) [28, 29].

*Salivaricin mmaye* 1 має молекулярну масу 1,221 кДа, високу хімічну і термічну стабільність, а також помірну стабільність при змін рН. Найбільш ефективна при використанні в мікромольних концентраціях [28]. Бактеріоцини *Bac F1* та *Bac F2* (*L. plantarum* subsp. *argentoratensis* SJ33), які мають широкий

спектр активності проти грамнегативних та грампозитивних бактерій, чутливі до протезаз, однак зберігають свої властивості в кислому рН в сечовивідних шляхах. Вони також здатні пригнічувати формування в медичних катетрах біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*. Молекулярна маса бактеріоцинів Bac F1 та Bac F2 була визначена як 4,039 кДа та 1,609 кДа відповідно [29].

### Імуномодулюючі властивості *Lactobacillus*

Бактеріям роду *Lactobacillus* відводять особливу роль у підтриманні імунної системи. Рецептором для *L. rhamnosus* LGG на клітинній поверхні макрофагальних, епітеліальних та інших клітин в імунній системі є TLR другого типу, які стимулюють сигнальний каскад через фактор транскрипції NF- $\kappa$ B, що призводить до експресії широкого спектру цитокінів [30]. В літературі зазначено, що штам *L. rhamnosus* LGG стимулює синтез імунокomпетентними клітинами IL-4 і IL-10 та знижує синтез прозапального цитокіну TNF- $\alpha$ . Також *L. rhamnosus* LGG пригнічує експресію генів, які кодуєть субодиниці високоафінного рецептора IgE і H4-рецептор гістаміну на мастоцитах, перешкоджаючи, таким чином, формуванню алергічного статусу. Перераховані механізми визначають протизапальний і антиалергічний ефекти лактобацил [31–33].

Найважливішими ефекторними молекулами в реалізації імуномодулюючої дії *L. rhamnosus* LGG вважаються ліпoteйхоєві кислоти їх клітинної стінки. Структура ліпoteйхоєвих кислот у *L. rhamnosus* LGG детально охарактеризована та встановлені субодиниці, що відповідають за взаємодію з рецепторами вродженого імунітету. Штам *L. rhamnosus* LGG проявляє пробіотичні властивості також завдяки структурним особливостям фімбрій, які забезпечують високі адгезивні властивості бактерій до слизової оболонки шлунково-кишкового тракту та утворення біоплівок. *L. rhamnosus* LGG здатен продукувати неметильовані CpG-олігонуклеотиди, які мають імуномодулюючі властивості [31, 33].

Імуномодулюючі властивості штаму *L. rhamnosus* LGG пов'язують з його здатністю секретувати ряд білків, що мають специфічну біологічну активність: із супернатанту культуральної рідини *L. rhamnosus* LGG були виділені білки Msp1/p75 та Msp2/p40, кожен із яких активує сигнальний пептид Akt, інгібує

індукований цитокінами апоптоз епітеліоцитів кишечника, зменшує їх TNF-індуковане пошкодження, стимулює клітинний ріст в клітинах колоноцитів та захищає епітеліальний бар'єр кишечника від дії перекису водню [34]. Таким чином, визначені імуномодулюючі властивості *L. rhamnosus* LGG пояснюють ефективність їх застосування при різних захворюваннях запального та алергічного характеру [33, 34].

### 1.1. Таксономічний статус

- Рід – *Lactobacillus*;
- Філа – *Firmicutes*;
- Клас – *Bacilli*;
- Порядок – *Lactobacillales*;
- Сімейство – *Lactobacillaceae*;
- Домен – *Bacteria*;
- Філа XIII. – *Firmicutes*;
- Клас I. – *Bacilli*;
- Порядок II. – *Lactobacillales*;
- Сімейство I. – *Lactobacillaceae*;
- Рід I. – *Lactobacillus*;
- Рід II. – *Paralactobacillus*;
- Рід III. – *Pediococcus*;

### 1.2. Морфологічні ознаки

Більшість представників роду *Lactobacillus* мають форму прямих паличок із заокругленими кінцями, зібраними у ланцюжки різної довжини, або розташовані одиночно чи попарно. Серед лактобацил зустрічаються короткі кокоподібні та звивисті форми, а також довгі, ниткоподібні палички довжиною від 0.7-1.1 до 3.0-8.0 мкм, розташовані поодиноці або зібрані в ланцюжки.

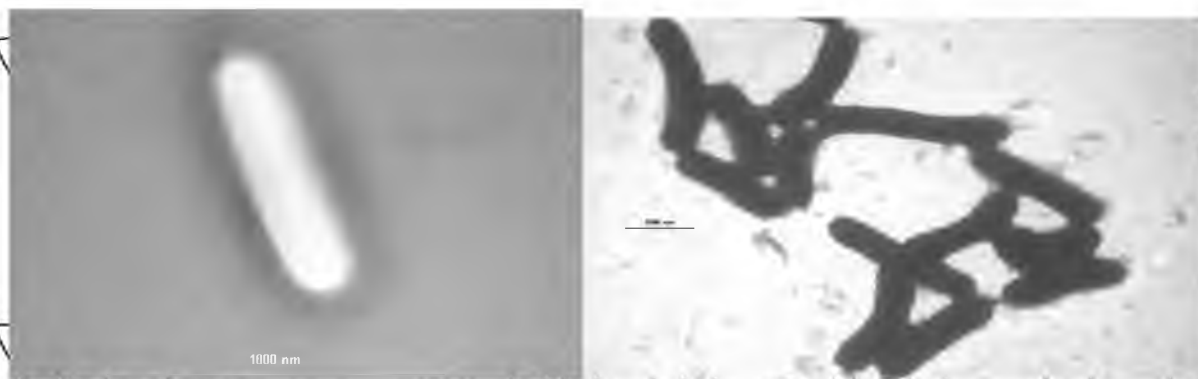


Рис. 1. Електронно-мікроскопічні знімки молочнокислих бактерій

1) *Lactobacillus plantarum* ONU 314 (x11000);

2) *Lactobacillus plantarum* ONU 315 (x3800)

У деяких видів (наприклад, *L. fermentum*, *L. brevis*) культура завжди представлена сумішню коротких та довгих паличок.

Таблиця 1. Характеристика культур

Група;	Морфологія клітин;	Розміри клітин;
I	Товсті палички різної довжини, окремі або в ланцюжках;	0,6-0,9 - 1,4-6,0
II	Товсті палички різної довжини, окремі або в ланцюжках;	0,7-0,9 - 1,3-7,0
III	Тонкі палички, іноді в ланцюжках;	0,5-0,6 - 1,0-4,4
IV	Коки, диплококи, ланцюги;	0,5-0,6 - 1,0-4,4

Лактобацили не утворюють ендоспор. За Грамом забарвлюються позитивно (Рис. 1), стають грамнегативними з віком і при підвищенні кислотності. В процесі фарбування метиленовим синім або за Грамом у деяких штамів було виявлено зернистість, біполярні тільця або лінійну смугастість цитоплазми. Більшість лактобацил нерухомі. Рухливість спостерігається лише у деяких видів. Багато лактобацили утворюють екзополісахариди (extracellular polysaccharides, EPS), які бувають двох видів (Табл. 2). Іноді EPS лактобацил представлені капсулою.

Завдяки здатності утворювати EPS *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* часто застосовують для виробництва йогуртів, вони допомагають забезпечити потрібні реологічні та органолептичні показники цього харчового продукту.

На щільних поживних середовищах бактерії *Lactobacillus* формують гладкі, сферичні, опуклі, непрозорі (іноді блискучі), з чіткими контурами колонії (рис. 1.1). Зазвичай колонії дрібні, але в деяких видів їх розмір може перевищувати 4 мм діаметрі. Колонії зазвичай не пігментовані, білі або злегка кремового кольору, іноді - жовтуваті або червонуваті, деякі види утворюють шорсткі (rough) колонії. На средах з білками або ліпідами зони просвітлення навколо колоній зазвичай не утворюються.



Рис. 1.1 Колонії *Lactobacillus bulgaricus*

Проте, більшість лактобацил мають слабку протейолітичну активність (за рахунок секретованих і пов'язаних з клітинною стінкою протеаз і пептидаз) та слабку ліполітичну активність (завдяки внутрішньоклітинним ліпазам).

Амілолітична активність на щільних середовищах з крохмалем виявляється тільки у деяких видів: *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. fermentum*.

Окремі види лактобацил (*L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. casei*) здатні утворювати позаклітинні нуклеази при вирощуванні на агарі, що містить ДНК або РНК.

### 1.3. Культуральні ознаки

Молочнокислі палички є факультативними анаеробами. За температурним режимом стрептобактерії бета-бактерії є мезофілами, термобактерії -

термофілами. На звичайних живильних середовищах вони не ростуть, тому для їх культивування додають молоко (стерильне чи гідролізоване).

На щільних живильних середовищах формують дрібні, гладкі, блискучі колонії сіро-білого кольору. Колонії лактобактерій різних видів майже не відрізняються між собою, проте є R-форми колоній (дрібні із шорсткуватою поверхнею, що врастають у субстрат) та S-форми (гладкі, великі поверхневі колонії). Молочнокислі палички зброджують молоко за 6-12 годин з утворенням щільного згустку, який має приємний кисломолочний смак і запах.

### **Стійкість до чинників зовнішнього середовища.**

Лактобактерії характеризуються стійкістю до кислого середовища, здатністю рости в температурних межах від 15 до 50°C як в аеробних, так і в анаеробних умовах. [10]

### **1.4. Фізіолого-біохімічні властивості *Lactibacillus***

Лактобацили – хемоорганогетеротрофи, дуже вимогливі до джерел харчування, потребують багатих складних середовищ. З вуглеводів вони переважно зброджують гексози (глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу) та дисахариди (лактозу, мальтозу, сахарозу), і тільки гетероферментативні види, наприклад, деякі штами *L. plantarum*, зброджують пентози (рибозу, ксилозу, арабінозу). Лактоза – дисахарид, тому перш ніж вступити на шлях катаболізму, вона має бути розщеплена ферментом галактозидазою до глюкози та галактози.

Галактоза потім фосфорилується з утворенням глюкозо-6-фосфату.

Крім вуглеводів, лактобактерії потребують свого розвитку в різних факторах зростання: амінокислот, вітамінів, нуклеотидів. Найбільш необхідними для життєдіяльності більшості видів є рибофлавін, а також ніотинова та пантотенова кислоти, для гетероферментативних лактобацил важливим є тіамін, а біотин та вітамін B<sub>12</sub> необхідний лише деяким штамам. Потреба у фолієвій кислоті, рибофлавін, піридоксальфосфат і пара-амінобензойної кислоти розрізняються у різних видів.

Майже всі лактобацили – мезофіли. Температурний оптимум розвитку лежить у межах 30-40°C. Верхнім температурним кордоном (максимумом) для них є 40°C, проте зустрічаються термофільні види, які добре ростуть і мають активний метаболізм за нормальної температури близько 45°C. Психофільні види також трапляються. Температурний діапазон зростання 2- 53°C.

Лактобактерії – факультативні анаероби, іноді – мікроаерофіли. Хоча більшість штамів аеротолерантні, оптимальними для зростання є анаеробні та мікроаерофільні умови. Лактобацили зазвичай слабо ростуть повітря, краще – при зниженому вмісті кисню. Підвищена концентрація вуглекислого газу (5%) може стимулювати зріст, у строго аеробних умовах, зазвичай, зростання уповільнюється. Деякі види є суворими анаеробами.

Фізіологічною особливістю лактобактерій є їх кислотостійкість. Для зростання лактобацил найсприятливіші злегка підкислені середовища з початковим рН 5.4-6.4, причому зростання культури зменшується при досягненні рН 3.6-4.0 залежно від виду та штаму.

### **1.5. Розповсюдження бактерій роду *Lactibacillus***

Лактобацили широко поширені у природі, найчастіше, вони зустрічаються за умови надлишку вуглеводів, наприклад, у субстратах рослинного походження, а також харчових продуктах (молочних та хлібобулочних виробів, ферментованому м'ясі). Також, вони широко розповсюджені, як в всередині, так і на поверхні тіла, а саме в респіраторному та шлунково-кишковому тракті людського тіла.

#### ***Шлунково-кишковий тракт***

Лактобацили є важливим компонентом мікрофлори організму людини: вони виділяються з урогенітального тракту жінок, їх властиво виявити у грудному молоці людини. Але основним середовищем проживання лактобацил в організмі є різні відділи шлунково-кишкового тракту, починаючи з ротової порожнини і

завершуючи пряма кишка, при цьому максимальний їх вміст спостерігається в товстому кишечнику (Табл. 5)

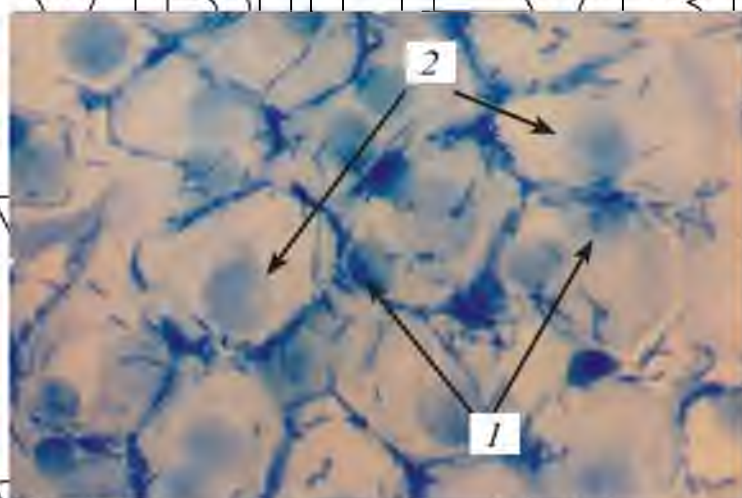


Рис. Адгезія молочнокислих бактерій до клітинної лінії аденокарциноми гортані людини HEp-2:

У ротовій порожнині вміст лактобацил становить менше  $10^3$  -  $10^4$  КУО/г, шлунку -  $10^2$  -  $10^3$  КУО/мл шлункового соку, в тонкій кишці - до  $10^3$  -  $10^4$  КУО/мл кишкового соку, в товстій (залежно від віку) - до  $10^9$  КУО/г фекалій. У дванадцятипалій і худій кишці лактобацили разом з ентерококами відносяться до домінуючої мікрофлори. У здухвинній кишці та товстому кишечнику лактобактерії у кількісному відношенні поступаються іншим мешканцям кишечника (біфілобактеріям, ентеробактеріям) та ін), але їх метаболічні функції роблять особливо значущою цю популяцію. Лактобацили володіють антагоністичною активністю щодо патогенних мікроорганізмів і виконують імуномодулюючу функцію. Загалом більшість видів лактобацил у кишечнику людини відноситься до транзиторної мікрофлори, отже, їх склад та чисельність значною мірою залежать від харчування.

#### Рослини і рослинні залишки

Молочнокислі бактерії існують на всій поверхні рослин, а також в ризосфері та в прикореневій зоні. Більш великої присутності вони набувають в рослинних рештках, наприклад на фруктах, що почали процес гниття. Бактерії *L. plantarum* найбільш часто висіваються з рослин, а їх кількість напряму

детермінована умовами їх вирощення. На рослинах були виявлені представники видів *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. buchneri*, *L. coryniformis*, *L. paracasei*, *L. curvatus*, *L. sakei* і *L. fermentum*. Відповідно до теорії Т. Хига,

лактобацили входять в число так званих «ефективних мікроорганізмів» (EM, Effective Microorganisms), які роблять позитивний вплив на рослини і сприяють

більш високим врожайам. Лактобацили забезпечують захист рослини від біотичних стресів, завдяки своїй високій антагоністичній активності щодо рослинних патогенів. Вони присутні в ферментованих харчових продуктах

рослинного походження (кислій капусти, солоних огірках і ін.) , а також в напоях

(пиві, вині, соках). *Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, грають

ключову роль

в отриманні силосу. Причому на останніх стадіях дозрівання (після зниження рН нижче 5.5) лактобацили домінують в силосній мікрофлорі.

Виявлено, що процес силосування починається гомоферментативними лактобациллами.

# НУБІП України

## РОЗДІЛ 2 Характеристика бактеріальних ЕПС

### 2.1 Характеристика

Екзополісахариди-позаклітинні поверхневі вуглеводні полімери, які секретуються і присутні у більшості бактерій, діють як захисний поверхневий шар, а також взаємодіють з навколишнім середовищем, формують бактеріальні біоплівки. ЕПС мікроорганізмів відрізняються за будовою, фізико-хімічними, біологічними властивостями, а також локалізацією їх в клітинах.

Здатність до біосинтезу позаклітинних полісахаридів поширена серед мікроорганізмів різних таксономічних груп. Можливість і ступінь його прояву залежать від умов існування продуцентів. Позаклітинні полісахариди у багатьох випадках забезпечують продуцентам суттєві переваги в порівнянні з аналогічними мікроорганізмами, які не утворюють подібних сполук [6].

Джерелом отримання екзополісахаридів (ЕПС) на сьогоднішній день є багато мікроорганізмів. До найвідоміших мікроорганізмів, які здатні продукувати ЕПС, належать бактерії різних пологів. Значне місце серед них займають молочнокислі бактерії. Вивчення ЕПС, що продукуються молочнокислими бактеріями, почалося з 80-х років минулого століття і активно розвивається в даний час, відображенням чого служать огляди, що постійно публікуються [1,2,3,4,5]. Мікробні ЕПС знаходять застосування у ветеринарії, медицині, фармацевтичній, харчовій, хімічній, нафтовидобувній та інших галузях, оскільки мають широкий спектр фізико-хімічних, функціонально-технологічних та біологічних властивостей [6,7]. Серед молочнокислих бактерій особлива увага приділяється бактеріям роду *Lactobacillus*, представники якого широко поширені у природі. Різними дослідниками показано, що лактобацили мають великий потенціал щодо синтезу екзополісахаридів, проте функції цих біополімерів є не до кінця вивченими. Для формування уявлення про вплив екзополісахаридів молочнокислих бактерій на фізіологічні реакції в організмі тварини необхідно

накопичення даних про хімічну структуру, фізичні та біологічні властивості ЕПС різних видів та штамів [8,9,10,11]. Особливий інтерес до ЕПС-активних культур пробіотичних мікроорганізмів обумовлений тим, що на міжнародному рівні молочнокислим та біфідобактеріям присвоєно високий статус безпеки, що підтверджує можливість застосування ЕПС-продукуючих штамів цих мікроорганізмів у виробництві безпеки продуктів харчування [12, 13, 14].

У зв'язку з цим дослідження, присвячені вивченню функцій екзополісахаридів молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* різних штамів, є актуальними та можуть мати значний науковий інтерес та прикладне значення.

Відзначається, що фізіологічне значення мікробних ЕПС полягає у створенні та підтриманні благодатних для мікроорганізмів умов існування. Біологічні функції, притаманні мікробним ЕПС, можна поділити на три групи:

- 1) захисні функції ЕПС;
- 2) участь ЕПС у задоволенні трофічних потреб мікроорганізмів;
- 3) ЕПС як посередник у взаємодії мікроорганізмів з іншими мікроорганізмами, макроорганізмами, об'єктами неживої природи.

Полісахаридам (ПС) властива первинна, вторинна, третинна і четвертинна структура.

- Первинна структура полісахаридів – це ланцюгова структура із мономерів.
- Вторинна структура – орієнтація ланцюгів полімерів в просторі з урахуванням ковалентних зв'язків між мономерними одиницями.
- Третинна структура – це просторова структура спіралей полісахаридів або розташування полімерних ланцюгів в просторі.
- Четвертинна структура – наступний етап просторової організації полісахаридів, який характеризується утворенням агрегатів полісахаридів при взаємодії їх третинних структур.

Першочерговою функцією ПС є захист, але, крім цього, полімери виконують

й такі важливі функції, як: енергетична, механічна, транспортна, модифікувальна тощо. Відповідно до цього була створена класифікація мікробних ПС.

- Перша група – це клітинні ПС, які по функціонально-топологічним ознакам діляться на структурні, структурно-метаболичні (присутні в клітинній стінці) і резервні. Структурні полісахариди формують у середині пластинку, первинну і вторинні стінки, що розрізняються функціональним призначенням, будовою та складом. Вони генетично детерміновані.
- До другої групи відносять позаклітинні ПС. В результаті виробництва великої кількості структурно-метаболичних полісахаридів утворюється капсула і глікани, які можуть виходити в культуральну рідину. Такі полісахариди називають позаклітинними або екзогенними [9].

Полісахариди зовнішньої мембрани, а також капсульні полісахариди зумовлюють серологічну специфічність бактерій, завдяки знаходженню на їх поверхні гліканів, вони вступають в певні реакції з імунними клітинами в організмі людини або тварини. Полісахариди, що перебувають на зовнішній мембрані, володіють достатньою резистентністю, тому вони стійкі до фагоцитозу і розщепленню ферментами. За допомогою молекулярно-біологічних досліджень встановлено, що глікани, що локалізуються на зовнішній мембрані клітин бактерій, беруть участь в таких процесах як клітинне впізнавання. Цим полісахаридам притаманні унікальні імуннохімічні та фармакологічні властивості [9].

Відповідно до якісного складу, ЕПС класифікують на дві групи: гомо-ЕПС, що складаються з моносахаридів одного типу ( $\alpha$ -D-глюкани,  $\beta$ -D-глюкани, фруктани та полігалактан) і гетеро-ЕПС, що складаються, головним чином, з різних типів моносахаридів – D-глюкози, D-галактози, L-рамнози та їх похідних [17-18].

Відмінності між окремими гомо-ЕПС виникають через особливості їх первинної структури, така як структура зв'язків головного ланцюга, молекулярна маса та структура розгалужень. Молочнокислі бактерії синтезують дві важливі групи гомо-ЕПС:

$\alpha$ -глюкани, які в основному складаються з  $\alpha$ -1,6- та  $\alpha$ -1,3- пов'язаних із залишками глюкози, а саме з декстринами.

фруктани, які в основному складаються з  $\beta$ -2,6- зв'язаних молекул фруктози, таких як леван (продукується *Streptococcus salivarius*) [17,19].

Гетеро-EPS- виробляються штамми, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (80-600 мг/л), *Lactobacillus delbrueckii* (60-150 мг/л) та *Lactobacillus casei* (50-60 мг/л).

Гомо-EПС синтезуються за допомогою позаклітинної специфічної глікозилтрансферази (ГТФ) або фермента фруктозилтрансферази (ФТФ) (зазвичай їх називають глюканцукразами або фруктан-цукразами). Молочнокислі бактерії, здатні до синтезу гомо-EПС, також використовують позаклітинні ферменти ГТФ для синтезу високомолекулярних  $\alpha$ -глюканів із сахарози. В цьому процесі сахароза використовується як специфічний субстрат і енергія, необхідна для процесу, надходить в результаті її гідролізу [17].

Гетеро-EПС не синтезуються за допомогою позаклітинних ферментів, а натомість синтезуються складною послідовністю взаємодій із залученням внутрішньоклітинних ферментів. Гетеро-EПС утворюються шляхом полімеризації структурних одиниць, які, в свою чергу, утворюються в результаті серії додавання цукрів на цитоплазматичну мембрану. Сахароза є вихідним матеріалом для синтезу цього ланцюга. Штами бактерій використовують дисахариди та моносахариди, як додаткові джерела енергії, та завдяки певним відомим нам системам поглинання цукру, до яких входять системи первинного транспорту, пряме сполучення транслокації цукру з гідролізом АТФ через транспорт-специфічну АТФазу; вторинні системи транспорту цукру, які сполучають транспорт цукру з транспортом іонів або інших розчинників, у вигляді як симпортних, так і антипортних транспортних систем; системи групової транслокації, які сполучають транспорт цукру та фосфорилування через фосфоенолпіруват-залежну систему фосфотрансферази (PEP-PTS) [15, 17].

## 2.2 Актуальність використання бактеріальних ЕПС

Попит на мікробні полісахариди на світовому ринку є високим [4], що

засвідчує збільшення з року в рік обсягів виробництва першого мікробного ЕПС ксантану (продуцент *Xanthomonas campestris*, виділений у кінці 60-х років ХХ ст. [5]). Починаючи з відкриття ксантану і дотепер, мікробні екзополісахариди є об'єктом теоретичних і практичних досліджень.

Але, одним з недоліків технології мікробних екзополісахаридів є використання досить дорогої вуглеводної сировини, наприклад сахарози або глюкози. На жаль наразі немає необхідної кількості дослідів про використання альтернативної заміни вуглеводів, для одержання ЕПС на промислових відходах біотехнологічних виробництв, що є доступною та дешевою сировиною, яку можна знайти у досить великій кількості. Для подальшого розгляду було взято статтю, в якій проаналізовано літератури щодо синтезу мікробних ЕПС на відходах харчової промисловості, сільськогосподарського сектору, виробництва біодизелю.

Використання промислових відходів для отримання екзополісахаридів дасть змогу вирішити не лише проблему накопичення вторинної сировини, а й зменшити витрати на біосинтез практично цінних метаболітів. Крім того, застосування деяких відходів порівняно з традиційними вуглеводними субстратами, окрім екологічних переваг, має ряд технологічних: наявність ростових факторів, відсутність потреби у піногаснику та стерилізації субстрату.

Екзополісахариди також рекомендовані як пребіотичні препарати та добавки у функціональних продуктах для профілактики гастритів, колітів, ерозій та інших захворювань шлунково-кишкового тракту: ЕПС *L. helveticus* Lh59, *S. thermophilus* SFi39, SFi12 і SFi20, *L. sake* O-1, за рахунок і повного, і часткового руйнування в шлунково-кишковому тракті та утворення в результаті цього олігоцукорів, які є поживним субстратом для корисної мікробіоти кишечника.

# НУБІП України

## РОЗДІЛ 3 Методи пошуку та отримання продуцентів ЕПС

### 3.1 Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента

Молочнокислі бактерії - це харчові організми, які мають статус GRAS (загально визнаний як безпечні) і, як відомо, виробляють велику кількість молекул екзополісахаридів (EPS) (4, 9, 37), які сприяють текстурі кисломолочних продуктів. ЕПС цих бактерій може дозволити розробити нове покоління харчових полісахаридів. Молочнокислі бактерії часто також позитивно впливають на смак, запах та збереження кінцевого продукту.

Екзополісахариди таких молочнокислих бактерій, як *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *B. adolescentes*, *L. rhamnosus*, *L. kefirifaciens* мають імуностимулюючий ефект [24, 25, 78, 80, 120, 126, 133, 154, 163, 164, 171, 217].

Біополімери цих бактерій здатні підвищувати продукцію імунокomпетентними клітинами прозапальних цитокінів, таких як ІЛ-1 $\alpha$  та ФНП- $\alpha$ , які відіграють важливу роль в активації макрофагів та лімфоцитів. Так, деякі ЕПС молочнокислих бактерій здатні впливати на швидкість процесу фагоцитозу [25,

155, 183], проте ці роботи, переважно відносяться до ЕПС бактерій роду *Lactobacillus* - *L. Reuteri*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. kefirifaciens*.

Багато лактобацили утворюють екзополісахариди (extracellular polysaccharides, EPS), які бувають двох видів (Табл. 2). Іноді EPS лактобацил представлені капсулою. Так, капсула діаметром 1,5-3 мкм виявлена у бактерій *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, виділені з йогурту та *L. kefirifaciens*, виділені з кефірних грибків. Оскільки *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* має здатність утворювати EPS, їх часто застосовують для виробництва йогуртів, адже вони забезпечують необхідні реологічні характеристики харчового продукту. EPS *L. kefirifaciens* утворюють матрикс, званий «кефірним верном», який служить екологічною нішею для мікробної спільноти дріжджів та лактобацил.

Характеристика	Позаклітинні гомополісахариди	Позаклітинні гетерополісахариди
Будова	Найчастіше декстран, глюкан, леван	Молекулярна маса: $4 \times 10^4$ - $6 \times 10^6$ . Можуть утримувати регулярно повторювані одиниці
Особливості біосинтеза	Синтез індукується додаванням сахарози в середа	Синтезуються у невеликих кількостях (0.1-1.5 г/л) з нуклеотид-активованих попередників
Представники	Гетероферментативні: <i>L. pontis</i> , <i>L. frumenti</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. reuteri</i>	Гомоферментативні та факультативно гетеро-ферментативні: <i>L. kefiranoformans</i> , <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. sakei</i>
Місце проживання	Злакові	Молочні продукти, м'ясо

Таблиця 2 – Екзополісахариди лактобацил

ЕПС бактерій належать до другорядних метаболітів, вони є продуктами метаболізму, які утворюються внаслідок дії первинних метаболітів-ферментів.

Підбір умов (температура і склад поживного середовища), за яких культивують штами молочнокислих бактерій, прямо впливає на здатність до синтезу ЕПС штами *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* не виявляли здатності до синтезу ЕПС при оптимальній температурі розвитку ( $t=42\pm 1^\circ\text{C}$ ), але проявляли її при зниженні температури на  $5^\circ\text{C}$ , як на знежиреному молоці, так і на гідролізованому молоці. Відзначено, що зниження температури на  $10^\circ\text{C}$  призводило до втрати даної властивості.

Проведення аналізу експериментальних даних ферментації молока 10 штамами *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, здатних до синтезу

ЕПС показало, що найбільший рівень синтезу екзополісахаридів – від 62,6 до 68,4 мг/дм<sup>3</sup> – був властивий 30% штамів, середній рівень – 43,3 до 58,6 мг/дм<sup>3</sup> – 30% штамів, а найменший рівень – від 33,2 до 40,1 мг/дм<sup>3</sup> – у останніх 40%.

### 3.2. Морфологія і фізіологія *Lactobacillus reuteri*

Вид *L. reuteri* був виділений німецьким дослідником Герхардом Ройтером наприкінці 1960-х років [19]. Цей видатний мікробіолог вивчав деякі види мікроорганізмів з ШКТ людини, наприклад *L. gasseri*. Спочатку вид *L. reuteri* класифікували, як *L. fermentum*, але з роками перейменували на честь науковця, який першим його описав. Данні мікробіотичні представники наявні не тільки у шлунково-кишковому тракті людини, а й у гризунів (мишей, щурів), свійських тварин (свиней, курей та індичок). Зазвичай їх можна виділити з тканин тонкого кишечника, шлунку та калу цих організмів [18].

Згідно літературних даних в останні роки у пацієнтів спостерігалось зменшення кількості клітин *L. reuteri* в організмі людини, що спричинено порушенням нормальної мікробіоти людського організму, підвищенням рівня життя, рівня гігієни та вживанням великої кількості антибіотиків, проте відбулося значне зростання кількості випадків запальних хворіб протягом останнього часу [15]. *Lactobacillus reuteri* - це грампозитивні паличкоподібні бактерії, в старих культурах зустрічаються зігнуті форми. Ці бактерії є корінними представниками мікробіоти як людей так і тварин, що представляє всі типові властивості роду *Lactobacillus*, а саме здатність до муцину епітеліоцитів та адгезії. Основний механізм даного процесу пов'язують зі здатністю *L. reuteri* виробляти поверхневі різноманітні речовини серед яких виявлені муцин-зв'язуючі протеїни, D-аланін-LTA, екзополісахариди, глюкозилтрансферазу А, інулінсахарозу, що сприяють адгезії і формуванню активної біоплівки [4]; - бактеріям цього роду притаманна антагоністична дія проти різних родів патогенних мікроорганізмів, зокрема *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* і *Staphylococcus* та у меншій мірі на роди *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* і *Lactobacillus*. Бактерії цього роду проявляють фунгіцидну дію на роди *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium* та протизойну на паразитичний

вид *Trypanosoma cruzi* [4, 8, 10]; - виділяють у порожнину кишечника антибактеріальні речовини, такі як перакис водню, реутерин, реутицелін [14].



Рис. 1. Колонії виду *L. Reuteri*, на середовищі сусло-агару з додаванням 1%  $\text{CaCO}_3$ , після 48 годин культивування

Як вже було зазначено, *L. reuteri* продукує біоплівку на поверхні кишечника, ця біоплівка відіграє важливу роль для імунітету господаря, її основною задачею є виробництво реутерину, модуляція цитокінінів, імуностимулюючих факторів та супресування виробництва фактора некрозу пухлин (ФНП) за допомогою лінополісахаридів, активованих та первинних моноцитів [4]. *L. reuteri* є важливим агентом імунної системи, оскільки індукує апоптоз у клітинах мієлоїдної лейкоїї за допомогою супресування позаклітинних сигнальних кіназ ФНП-активованих мієлоїдних клітин.

Також, *L. reuteri* провокує апоптоз підсиленням діяльності мітоген-активованої протеїн кінази (МАПК) за допомогою с-Jun N-кінцевої кінази і p38 МАПК [6]. Крім впливу на мієлоїдну лейкоїю супресування, виробництво ФНП відіграє важливу роль у лікуванні хвороби Крона. Штам ATCC PTA 6475 зменшив кількість хемокинів MIP-1/CCCL-2 у макрофагів дітей [9]. Цікаво те, що цей ж штам, *L. reuteri* ATCC PTA 6475, відіграє важливу роль у виробництві імунних факторів, що попереджують розвиток остеопорозу, викликаного нестачею

естрогену в період менопаузи [20].

Важливим продуктом життєдіяльності виду *L. reuteri* є антибіотик реутерин. Завдяки детальним аналізам, а саме сепаративній хроматографії, ядерно-магнітному резонансу, та рідинній мас спектрометрії було доведено, що ця речовина являє собою еквімолярну суміш мономерних, 8 гідратованих мономерних і циклічних димерних форм бет гідроксипропіональдегіду, що було підтверджено методами хімічного [7]. Даний антибіотик синтезується з гліцерину методом бактеріологічного синтезу для фармації в промисловості та лабораторіях в умовах, які мають відповідати умовам тих частин ШКТ, де був виявлений *L. reuteri* (T=37°C, pH=5-7, анаеробні умови) [7, 8].

### ***Застосування Lactobacillus reuteri у медицині, ветеринарії, харчовій промисловості***

У зв'язку із особливостями фізіології та поширення *L. reuteri* виник практичний інтерес щодо його використання у різних галузях промисловості. На сьогоднішній день існує велика необхідність у пошуку альтернативних засобів лікування, які були б максимально природні для людини, чим у свою чергу зменшували вплив хімічних речовин на організм, тому зараз серед населення України набувають актуальності біологічно-активні добавки, пробіотичні засоби бактеріального походження тощо. В останні роки спостерігається тенденція активного впровадження аутентичних штамів *L. reuteri* у різні галузі медицини:

- виробництво вітамінів B12, B9 та  $\alpha$ -лізину [17];
- лікування мієлоїдної лейкемії, хвороби Крона, остеопорозу;
- виробництво пробіотичних лікарських препаратів (штами ATCC 55730, *L. reuteri*, DSM 17938 (торгова назва *L. reuteri* Protectis)).

Лідером із виробництва лікарських препаратів на основі *L. reuteri* є шведська компанія BioGaia [21];

- покращення стану ротової порожнини (зменшення кількості нальоту на зубах, лікування надмірної чутливості та кровотечі з ясен), для цього частіше всього використовують штами *L. reuteri* DSM 17938 і *L. reuteri* ATCC PTA 5289

(торгівельна назва L. reuteri ProDentis ) [22];

- попередження виникнення гастриту шляхом попередження зв'язування *Helicobacter pylori* до сульфідних та asialo-GM1 рецепторів епітелію шлунку шляхом синтезу сульфід-зв'язуючого білка [3];

- лікування коліків у немовлят. Для цього грудним дітям давали харчову добавку на основі штаму *L. reuteri* 17938, проте результати експериментів виявились неоднозначними, оскільки в одному випадку пробіотичний препарат продемонстрував досить непогану ефективність (зменшення часу дитячого плачу, покращення загального самопочуття), а у іншому випадку результати виявились гіршими (час плачу дітей виріс), тому цей спосіб використання *L. reuteri* вимагає доопрацювання та проведення подальших досліджень [12, 13].

Оскільки *Lactobacillus reuteri* є одним з дійсно автохтонних представників мікробіоти свиней, його використовують в якості пробіотичної добавки до кормів цим тваринам. Як показали дослідження, додавання *L. Reuteri* 15007 (торгівельна назва *L. reuteri fermentum*) у кількості  $6 \times 10^9$  КУО/день у корм поросят покращує набір маси та піднімає імунітет, чим сприяє зменшенню необхідності використання антибіотиків та ймовірності виникнення діареї у приплоду [14].

Кисломолочні харчові продукти мають доволі значну популярність серед населення. Серед них можна виділити дитяче харчування. Аналіз ринку цього сектору продукції показав, що протягом останніх п'яти років багато виробників (NAN, Nestogen, Milupa) додають до складу сумішей для дитячого харчування різні штами *L. reuteri*, зокрема *L. reuteri* 19738. Для дорослих споживачів у промисловості планують використовувати додавання штаму *L. reuteri* NCIMB 30242 в йогурти, що в експериментах оказало досить непогані результати, в наслідок чого люди з високим рівнем холестерину в крові мають можливість не тільки споживати якісні кисломолочні продукти, а й зменшувати його рівень [23].

### Порівняння штамів *Lactobacillus reuteri*

Для аналізу було обрано три штами *Lactobacillus reuteri* LB 121 (LMG

18388) штамм *Lactobacillus* 35-5 (LMG 18390) *Lactobacillus* K-24 (LMG 18391).

Всі штами були вирошені в анаеробних умовах, при температурі 37°C, на модифікованих середовищах MRS [17], що містять 100 г рафінозу (1MRS-r) або сахарози (2MRS-s) літр<sup>-1</sup> замість 20 г глюкози літр<sup>-1</sup> зазвичай присутні в середовищі MRS, використовували для продукції EPS.

Середовище	Склад:	Концентрація, г
1MRS-r	пептон	10
	Екстракт яловичини	10
	Екстракт дріжджів	5
	глюкоза	20
	Вторинний кислий фосфат калію	2
	Натрію ацетат	5
	Цитрат діамоній	2
	Сульфат магнію	0,2
	Сульфат марганцю	0,05
	агар	15
Tween® 80	1	
2MRS-s	пептон	10
	Екстракт яловичини	10
	Екстракт дріжджів	5
	глюкоза	20
	Вторинний кислий фосфат калію	2
	Натрію ацетат	5
	Цитрат діамоній	2
	Сульфат магнію	0,2
	Сульфат марганцю	0,05
	агар	15
Tween® 80	1	

*L. reuteri* LB 121 вирощували в анаеробних умовах при 37°C серед MRS (7). Модифіковане середовище MRS, що містить 100 г рафінозу (MRS-r) або сахарози (MRS-s) літр<sup>-1</sup> замість 20 г глюкози літр<sup>-1</sup> зазвичай присутні в середовищі MRS, використовували для продукції EPS в умовах культивування з або без контролю рН (46). Усі середовища автоклаували протягом 15 хв при 121°C. Цукор автоклаували окремо.

Культивування в хемостаті (ФЕРМЕНТЕР BIOFLO 610 [17]; робочий об'єм 1,5 л) проводили в середовищі 0,5×MRS-s, продутого азотом. рН автоматично підтримували на рівні 5,5 за допомогою 400М NaOH.

#### Відбір дослідницьких зразків

Зразки культур розбавляли відповідним чином і розподіляли по чашках з агаром MRS. Декілька колоній з кожної чашки відбирали випадковим чином і вирощували в анаеробних умовах культуральних пробірок, що містять 10 мл MRS-ів. Після 3 днів зростання з зразків виділяли EPS.

#### Ферментні аналізи

Активність глюкоансахарази (ЕС 2.4.1.5) та левансахарази (ЕС 2.4.1.10) вимірювали при 37°C шляхом моніторингу вивільнення фруктози та глюкози відповідно з сахарози. Реакційні суміші (1 мл) містили CaCl<sub>2</sub> (50 мМ · літр<sup>-1</sup>), ацетатний буфер (200 мМ, рН 5,5), сахарозу (50 мМ) та відповідним чином розведений фермент. Проби (100:1) відбирали через рівні проміжки часу і додавали 5:1 2 М NaOH для зупинки реакцій.

Глюкозу і фруктозу, що утворилися, кількісно визначали ферментативно, відстежуючи зниження НАДФ, як описано раніше (29). Глюкозу вимірювали спочатку в реакційній суміші, що містить Трис-НСІ (50 мМ, рН 7,6), АТФ (2,5 мМ), НАДФ (1 мМ), MgSO<sub>4</sub> (10 мМ), гексокіназу (3000 од · літр<sup>-1</sup>) і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу (1500 од · літр<sup>-1</sup>).

Концентрацію фруктози вимірювали в тій же реакційній суміші, але з

додаванням фосфоглюкоїзомерази (7000 од. · Літр<sup>-1</sup>). Одна одиниця активності глюкансахарази або левансахарази визначається як кількість ферменту, що продукує 1 мкмоль моносахариду за хвилину. Усі ферментні аналізи проводилися у трьох примірниках; Наведені дані є середніми значеннями зі стандартним відхиленням менше 10%.

### Фарбування активності ферментів, що синтезують ЕПС

Середовище MRS, MRS-2 та MRS-4 (10 мл) інокулювали розведеннями 200:1 нічних культур штамів LB 121, 35-5 та K-24 і інкубували при 37°C протягом 8 годин. Клітини видаляли центрифугуванням, а білки в супернатантах електрофорезу піддавали в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) (див. нижче). Після електрофорезу гелі тричі промивали демінералізованою водою і інкубували протягом ночі при 37°C в ацетатному буфері (pH 5,5; 50 mM ацетату водню, 1% [об/об] Твін 80, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) з 1% (мас / Про) сахароза. Активність глюкансахарази визначали шляхом фарбування гелів на полісахариди за допомогою процедури періодичної кислоти-Шиффа (PAS) (50). Як контроль використовували гелі, завантажені тими ж супернатантами та інкубовані без сахарози.

### 3.3. Мікробіологічний контроль

При біосинтезі бактерій *Lactococcus lactis subspecies Lactis LLN-E2* необхідно проводити мікробіологічний контроль на всіх етапах культивування, для запобігання контамінації. Кожні 2 год відбирають зразок культуральної рідини для проведення аналізу.

Мікробіологічний контроль проводимо висівом на агаризоване поживне середовище MPA для бактерій, та Сусло-агар для дріжджів та грибів а також мікроскопіюванням за допомогою світлового мікроскопа. Приготування препарату здійснюється в асептичних умовах, для проведення експерименту на чисте (попередньо знежирене) предметне скло наноситься невелика краплина культуральної рідини використовуючи стерильні петлі. Далі, за допомогою бакт. петлі розподіляють по предметному склу краплю в мікроорганізми, діаметром близько 1 см, після чого висушують при кімнатній температурі, до повного

випаровування вологи. На сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1–2 краплини імерсійного масла, після чого вагою, попередньо змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з об'єктиву.

Для фарбування за Грамом на попередньо приготований мазок наносять розчин карболового генціанвіолету, витримують 1–2 хв. Після чого барвник зливають, а мазок обробляють розчином Люголя 1–2 хв. Залишок розчину прибрати, мазок занурити в розчин 96%-го спирту на 30 сек. Промити мазок водою. Нанести на препарат водний розчин фуксину і залишити на 1 хв. Промити препарат водою, промокнути фільтрувальним папером. Мікроскопіювання препарату здійснюють імерсійною системою. Бактерії мають сферичну або овальну форму. Розташовуються по одинці або попарно, чи у вигляді коротких ланцюжків.

#### **Методика визначення кількості живих лактобацил.**

Дослідження проводимо методом послідовних десятикратних розведень. Беремо 1 мл дослідного зразка розчиняємо в 9 мл стерильного фізіологічного розчину і ретельно перемішуємо до повного розчинення. З першого розведення у фізіологічного розчину готуємо ряд 10-кратних серійних розведень. З кожного отриманого розведення по 1 мл вносимо у дві пробірки рідкого середовища MRS, для отримання достатньої кількості колоній для проведення підрахунку. Пробірки інкубуємо в термостаті при  $(32 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Облік результатів здійснюється через 48 годин шляхом підрахунку кількості колоній у пробірках з найбільшим розведенням, у яких спостерігається ріст у пробірках, що передують найбільшому розведенню.

#### **3.4 Синтез ЕПС штамом LB 121**

Штам LB 121, вирощений у періодичних культурах з контролем рН або без нього, продукував великі кількості нетропних EPS як на MRS-s, так і на MRS-g середовищах. Аналіз моносахаридів, включаючи визначення абсолютних конфігурацій, виявив наявність як d-глюкози, так і d-фруктози (у співвідношенні 1:2) у матеріалі ЕПС, синтезованому штамом LB 121, вирощеним MRS-s, на

MRS-g був отриманий полімер, що містить тільки d-фруктозу. Повторне субкультування (близько 350 поколінь) штаму LB 121 на MRS-s у періодичній культурі не впливало на рівні EPS.

Штам	Тип цукру	Концентрація EPS (г · літр <sup>-1</sup> )	% d-глюкози в EPS (мас./мас.)	% d-фруктози в EPS (мас./мас.)
LB 121	Сахароза	9,8	32	68
	Рафіноза	7,3	0	100
35-5	Сахароза	9,7	100	0
	Рафіноза	0	0	0

K-24	Сахароза	0		
	Рафіноза	0		

При вирощуванні штаму LB 121 в культурах хемостату кількість ЕПС, що синтезується, сильно варіювало

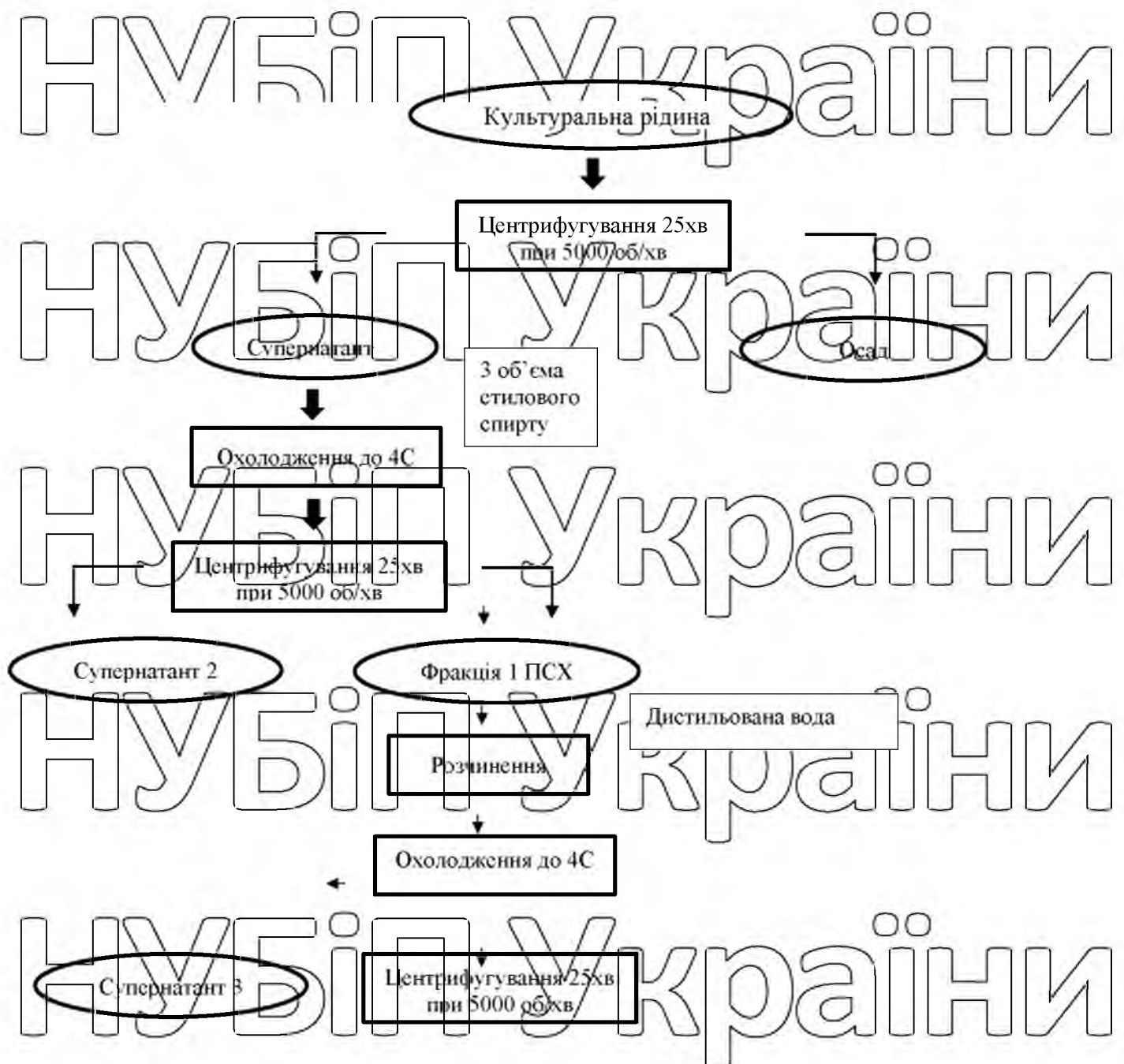
Це сталося за рахунок накопичення спонтанних мутантів у хемостатних культурах. Безперервне культивування штаму LB 121 при рН 5,5 призвело до швидкого зниження продукції ЕПС з часом: концентрації ЕПС впали з 10 г · літр<sup>-1</sup> у періодичних культурах на MRS-s до 1,5 та 2,5 г · літр<sup>-1</sup> після 20 поколінь зростання на 0,5 × MRS-s при швидкості розведення 0,05 та 0,2 год<sup>-1</sup> відповідно.

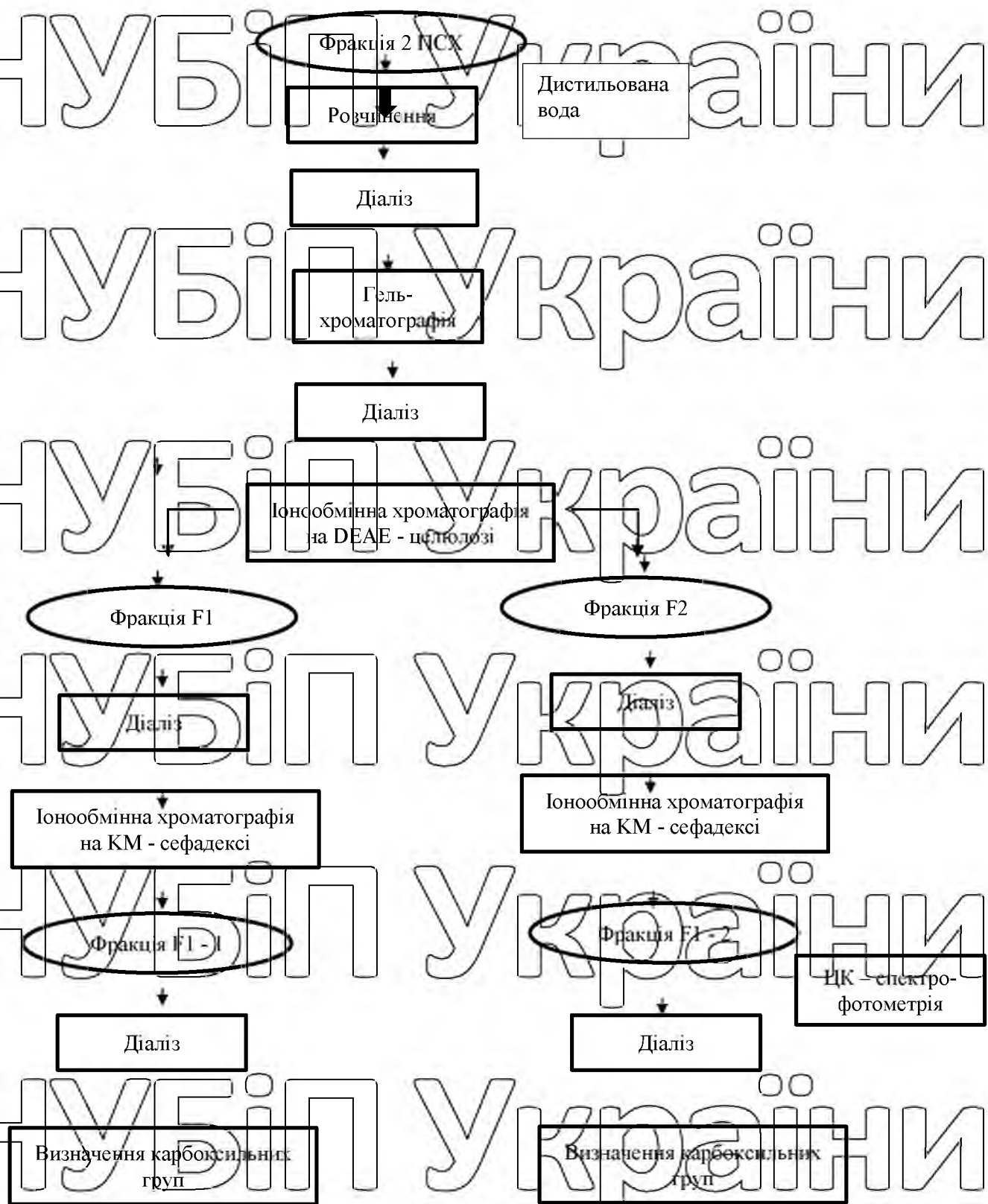
Зважаючи на нетропний характер ЕПС штаму LB 121 зразки з цих культур спочатку розподіляли на агар MRS (без продукції ЕПС), а окремі колонії перевіряли на здатність синтезувати ЕПС при зростанні в періодичній культурі на рідкому середовищі MRS-s. Після 20 поколінь зростання 25 окремих колоній досліджували щодо продукції ЕПС. З цих колоній 21 не продукувала ЕПС взагалі (наприклад, мутантний штам K-24) або виробляла менше 1 г літр<sup>-1</sup>; тільки 4 колонії продукували таку ж кількість ЕПС, як і штам LB 121 (близько 10 г · літр<sup>-1</sup>). Штам K-24 не продукував ЕПС ні на MRS-s, ні на MRS-g (таблиця 1); в ході подальших досліджень не спостерігалося ревертантів, які синтезують ЕПС.

Клітини штаму LB 121, що ростуть у культурах хемостату при рН 5,5 і швидкості розведення 0,05 або 0,2 год<sup>-1</sup> також піддавали зсуву до рН 4,5. Було

ідентифіковано, що протягом 10 поколінь росту за будь-якого ступеня розведення численні мутанти (наприклад, штамп 35-5) продукували матеріал EPS, який при висушуванні мав зовнішній вигляд, відмінний від зовнішнього вигляду EPS штаму LB 121, і складався з d-глюкози, що штамп 35-5, вирощений у періодичній культурі на MRS-s, продукував таку ж кількість EPS, як і штамп LB 121 (близько 10 г літр<sup>-1</sup>), але тепер він складався тільки з глюкози.

Мутантний штамп 35-5 виявився дуже стабільним у ході подальших досліджень. Мутантів, які продукують ЕПС, що складається тільки з фруктози, не виявлено.





Мал. 1. Схема виділення, очищення, фракціонування та аналізу екзополісахаридів

### 3.5. Визначення молекулярної маси ЕПС

#### 3.5.1 Ексклюзійна хроматографія

Ексклюзійна хроматографія – це різновид рідинної хроматографії, у якій розділення компонентів базується на розподілі молекул відповідно до їхніх розмірів між розчинником, який знаходиться у порах сорбента, і розчинником, що протікає між його частинками. У процесі розділення невеликі молекули попадають у сітку полімера, в порах якого розчинник служить нерухомою фазою, і утримуються там, великі молекули не можуть проникнути в полімерну сітку і вимиваються із колонки рухомою фазою.

Спочатку елюються найбільші, потім середні і далі невеликі молекули.

Тому ексклюзійну хроматографію називають також молекулярно-ситовою.

Ексклюзійна хроматографія підрозділяється на гель-проникаючу і гель-фільтраційну. У гель-проникаючій хроматографії розділення здійснюється на полімерах, що набухли у органічних розчинниках; якщо ж полімери набухають у воді, то звичайно кажуть про гель-фільтраційний варіант.

Утримування молекул у цьому варіанті хроматографії визначається їхньою дифузійною у пори сорбента і залежить як від розміру молекул, так і від розміру пор нерухомої фази. Якщо на механізм такого розподілу молекул не накладаються інші побічні ефекти, наприклад адсорбція або іонний обмін, то ізотерма розподілу є лінійною (тобто, концентрація у нерухомій фазі завжди є пропорційною до концентрації у рухомій фазі).

Середню молекулярну масу полісахаридів визначали методом виняткової хроматографії. Для визначення розподілу полісахаридів за розмірами ЕПС, отриманого після 2 днів зростання MRS-s або MRS-g, виділяли, як описано вище.

Замість сушіння ЕПС піддавали діалізу (пробірка для діалізу целюлози [Sigma D-9777]; відсікання 12 кДа) при 4°C проти води протягом 3 днів. Ліофілізований ЕПС розчиняли в 0,1 М NaNO<sub>3</sub> фільтрували через фільтр 0,45 мкм (Millipore) та аналізували за допомогою HP-GPC.

При аналізі багатокомпонентних сумішей часто використовують дві, інколи чотири послідовно з'єднані колонки. Нерухомі фази у ексклюзійній хроматографії вибирають для вирішення конкретних аналітичних завдань. Спочатку встановлюють, яка система розчинників може бути використана для

аналізу (водна або водно-органічна), що визначає тип сорбента. Так, наприклад, розділення водних сумішей проводять на зшитих декстранах (сефадекс) або поліакриламіді (біогель Р). З органічними розчинниками розділення проводять на гідрофобних полістиролах з різним ступенем зшивки (стирогель, поргель, биобид С). Подібні гідрофобні гелі мають добру розділяючу здатність тільки в тих випадках, якщо полімер набухає в органічному розчиннику. Такі набухлі гелі нестійкі при дії тиску, швидкість потоку дуже мала.

Для ексклюзивної хроматографії при високому тиску колонки заповнюють стійкими до тиску нерпухомими фазами з жорсткими матрицями – силікагелями. Недолік таких сорбентів – висока адсорбційна активність, яку можна знизити силанізацією поверхні або вибором відповідного елюента, який підходить за полярністю. Наприклад, використовуючи як рухому фазу метиленхлорид або тетрагідрофуран, на силікагелі можна розділити за молекулярними масами полістироли.

Рухомі фази у ексклюзивній хроматографії повинні відповідати певним вимогам, головна з яких – повне розчинення зразка, добре змочування сорбента, попередження адсорбції, низька в'язкість і токсичність.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## РОЗДІЛ 4 Виділення бактеріальних ЕПС

### 4.1 Способи очищення кінцевого продукту

Розрізняють такі способи концентрування та виділення продуктів:

- 1) Седиментація;
- 2) Фільтрування;
- 3) Центрифугування;
- 4) Сепарація;
- 5) Мембранні методи розподілу.

Седиментація- це процес розділення дисперсних систем під дією сили тяжіння і відділення згущеної дисперсної фази у вигляді осаду.

Цей метод використовують, коли: діаметр частинок більше 3 мкм (броунівський рух не здійснює значного впливу на процес відстоювання), - необхідно розділити частинки на фракції по розміру та густині на основі різних швидкостей осадження; - Необхідно виділити стабільні продукти (фактор часу не має вирішального значення); - необхідно поперечно розділити суспензію на дві фракції: осад і надосадова рідина, які в подальшому можна обробляти на різноманітному обладнанні; - великі об'єми.

Переваги методу:

Це найбільш простий та дешевий процес.

Недоліки полягають у тому, що швидкість осадження біомаси та інших твердих частинок в КР мала і складає приблизно  $10^{-6}$  -  $10^{-7}$  м/с. Для пришвидшення процесу в КР додають коагулянти та флокулянти. Також відстоюванню підлягають не всі речовини, лише стабільні та частинки з діаметром більше 3мкм [37]

Мембранні методи розділення, до них відносять діаліз, електродіаліз, оборотний осмос, ультрафільтрація та мікрофільтрація. Основним елементом апаратурного оформлення є напівпроникна мембрана.

Переваги методу:

1. Концентрування і очищення відбуваються без зміни агрегатного стану і фазових перетворень; - продукт не піддається тепловим і хімічним впливам; - механічна та гідродинамічна дія на біологічний матеріал незначна;

- легко забезпечуються герметичність і асептичні умови на умови;

- процес не володіє високою енергоємністю;

2. Основні обмеження у використанні пов'язані з тим, що деякі матеріали, з яких виготовляються мембрани, що не витримують дуже високих і дуже низьких значень рН або високих температур. Крім того, виникають труднощі при обробці розчинів, що містять тверду фазу. Однак ці труднощі успішно

3. долаються підбором нових видів матеріалів для виготовлення мембран і введенням стадії попередньої обробки [38].

Фільтрування - його основними перевагами є швидкість, кількість фільтрату. Фільтрування — це гідродинамічний процес, швидкість якого прямо пропорційна різниці тисків, що створюються по обидва боки фільтрувальної перегородки, і обернено пропорційна опору руху рідини при її русі через пори перегородки і шар утвореного осаду. На процес фільтрування впливає ряд факторів:

Макрофактори — поверхня фільтрації, різниця тисків, товщина шару осаду, в'язкість рідини. Ці фактори контролюються [39]. Центрифугування широко застосовується в мікробіологічних виробництвах насамперед для відділення біомаси з культуральної рідини (дріжджів, бактерій, грибів), відділення різних цільових продуктів мікробіологічного синтезу (антибіотиків, вітамінів ферментів і т. п.).

Центрифугування має і ряд суттєвих недоліків, які необхідно враховувати.

- складність конструкції;

- висока вартість і енергоємність;

- складність експлуатації (ненадійність, вібрація, шум, необхідність періодичної розбирання і миття і т. п.)

Крім того, присутні недоліки, що мають значення саме для технології мікробіологічного синтезу: вплив на клітину відцентрової сили, нагрів, складність герметизації асептичних умов ведення процесу. Однак головна перевага центрифугування - висока продуктивність та ефективність - дозволяє цьому методу успішно конкурувати з іншими способами виділення. Тому,

враховуючи все вище сказане як метод концентрування продукту, обираємо центрифугування [40].

#### 4.2 Виділення

Клітини збирали центрифугуванням (10 хв при 11 000 g). До культуральних супернатантів додавали два обсяги холодного етанолу і суміші зберігали протягом ночі при 4°C. Випалий матеріал збирали центрифугуванням (20 хв при 2500×g), ресуспендували в демінералізовану воду і змішували з 2 обсягами холодного етанолу. Проби центрифугували (20 хв при 2500 g), опади сушили при 100°C. Кількість EPS визначали шляхом вимірювання кінцевої сухої ваги.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Г.Т.ДЖАКИБАЕВА, Д.А.ГЛЕУБЕКОВА, А.БЕРДАЛИЕВА., Г.Б. БАЙМАХАНОВА, А.И. БАЙДАЛИНОВ, «ЭКЗОПОЛИСАХАРИДТЕРДІ СИНТЕЗДЕУ ҮШІН КОНСОРЦИУМГА ЕНГІЗІЛГЕН СҮТ ҚЫШҚЫЛЫ БАКТЕРИЯЛАРЫНЫҢ ҚАБІЛЕТТІЛІГІ»
2. Wakefield J., Hassan H. M., Jaspars M., Ebel R., Rateb M. E. Dual Induction of New Microbial Secondary Metabolites by Fungal Bacterial Co-cultivation. *Frontiers in Microbiology*. 2017: 8.
3. Михайлова О. Б., Ломберг М. Л., Краснюк В. О. Біотехнологічні основи інтенсивного культивування шкарського базидієвого гриба *Fomitopsis betulina* (Fomitopsidaceae, Polyporales)
4. Пирог Т. П., Ярош М. Б., Вороненко А. А. Синтез мікробних екзополісахаридів на нетрадиційних субстратах
5. БАКТЕРІЇ РОДУ LACTOBACILLUS: БІОЛОГІЧНІ ТА ЛІКУВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ, І.М. Волошина, Л.В. Шкотова, С.О. Скороход, І.Є., Аполонова, В.М. Жолобак
6. ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА СИНТЕЗ МІКРОБНИХ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ, М.О. Івахнюк, Н.А. Гриценко, Національний університет харчових технологій
7. Valerie Sung, Frank D'Amico, Michael D. Gabana, Kim Chay, Gideon Koren, Francesco Savino, Hania Szajewska, Girish Deshpande, Christophe Dupont, Flavia Indrio, Silja Mentula, Anna Partty, Daniel Tancredi Lactobacillus reuteri to Treat Infant Colic: A Meta-analysis. – J.: NCBI, 2018.
8. Chengli Hou, Xiangfang Zeng, Fengjuan Yang, Hong Liu and Shiyan Study and use of the probiotic Lactobacillus reuteri in pigs: a review. – J.: Journal of Animal science and biotechnology, 2015 – pg. 6-14.
9. Qinghui Mu, Vincent J. Tavella, Xin M. Luo Role of Lactobacillus reuteri in Human Health and Diseases. – J.: Frontiers in Microbiology, 2018 – Article 757
10. Robert A. Britto, Regina Irwin, Darin Quach, Laura Schaefer, Jing Zhang, Taehyung Lee, Narayanan Parameswaran, Laura R. McCabe Probiotic L. reuteri Treatment Prevents Bone Loss in a Menopausal Ovariectomized Mouse Model. – J.: Journal of Cellular Physiology, 2014. – vol. 229, pg. 1822-1830
11. Monica Vicario, Antotio Santos, Deborah Violanti, Jose Nart, Lluís Giner Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic Lactobacillus reuteri Prodentis: A preliminary randomized clinical trial. J.: Acta Odontologica Scandinavica, 2013. – pg. 813-819
12. M. L. Jones, C. J. Martoni, S. Prakash Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by Lactobacillus reuteri NCIMB 30242: a randomized controlled trial. – J.: European Journal of Clinical Nutrition, 2012. – pg. 1234- 1241
13. ПОШУК І ВЛАСТИВОСТІ ЛАКТОБАКТЕРІЙ, ПЕРСПЕКТИВНИХ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ О. В. Науменко Інститут продовольчих ресурсів НААН України, Київ
14. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ МІКРОБНИХ ПОЛІСАХАРИДІВ, М. Б. Ярош, Т. П. Пирог, О. І. Скроцька, Національний університет харчових технологій

15. СТРАТЕГІЯ ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНИХ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ ЗІ СТАБІЛЬНИМИ ЗАДАНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ НА ОСНОВІ РОЗРОБКИ ПІДХОДІВ КОНТРОЛЬОВАНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ СИНТЕЗУ ЕТАПОЛАНУ, Т.П. Пирог, Т.О. Грінберг, Ю.Р. Малащенко, Інститут мікробіології і вірусології Національної академії наук України, Київ

16. БІОЛОГІЧНІ ФУНКЦІЇ МІКРОБНИХ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ, Пирог Т.П., Інститут мікробіології і вірусології Національної академії наук України, Київ

17. АНАЛІЗ ВИКОРИСТАННЯ ЗАКВАШУВАЛЬНИХ КУЛЬТУР, ЗДАТНИХ ДО СИНТЕЗУ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ, ПРИ ФЕРМЕНТАЦІЇ МОЛОКА, Боднарчук О. В., Якубенко О. Б., Петров П. І., Насирова Г. Ф.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України