

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

06.07. – МР. 216 «С». 2023.02.15. 6 ПЗ

НУБІП України

МАЄВСЬКА НАТАЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

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.
НУБІП України
ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Маєвської Наталії Олександрівни

(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 «Біотехнологічні характеристики молочнокислих бактерій *Lactobacillus* sp»

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

Термін подання завершеної роботи на кафедру 1 листопада 2023 р.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: культура *L. reuteri*, поживні середовища

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Морфологічна характеристика культури *L. reuteri*.
2. Швидкість накопичення біомаси клітинами *L. reuteri*.
3. Залежність швидкості росту культури *L. reuteri* від рН поживного середовища та об'єму первинного інокуляту.
4. Питома швидкість росту та рівень синтезу молочної кислоти клітинами *L. reuteri* залежно від часу культивування.

Перелік графічного матеріалу: 2 рисунки, 4 діаграми, 1 таблиця

Дата видачі завдання 1 вересня 2022 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Магістерська робота виконана на тему «Біотехнологічні характеристики молочнокислих бактерій *Lactobacillus* sp» в обсязі 55 сторінок комп'ютерного тексту формату А4, містить 6 рисунків, 114 використаних джерел. Робота складається з наступних розділів:

1. Огляд літератури,
2. Матеріали та методи;
3. Результати досліджень та їх обговорення.

Мета роботи: дослідити біотехнологічні особливості лактобактерій *Lactobacillus* ріст залежно від рН поживного середовища, рівень синтезу молочної кислоти.

Згідно поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1. Визначити морфологічні характеристики культури *L. reuteri*.
2. Дослідити швидкість накопичення біомаси клітинами *L. reuteri*.
3. Вивчити швидкість росту культури *L. reuteri* залежно від рН поживного середовища та об'єму первинного інокуляту.
Визначити питому швидкість росту та рівень синтезу молочної кислоти клітинами *L. reuteri* залежно від часу культивування.

НУБІП України

В
Є

Ф

НУБІП України

З
Д

4.4. Терапевтичні властивості лактобактерій: протишуклинна

Л

НУБІП України

Р

О
З

Д

НУБІП України

І

Д
Р
Я

Ф
Д
З

НУБІП України

Д

М
Ф

Визначення залежності накопичення біомаси культурою *L. reuteri* від рН

Визначення питомої швидкості росту на рівня синтезу молочної кислоти

Е

НУБІП України

В
С
О
С
Т

Н
У

Ф
О

НУБІП України

З
Д

Н
В

И
Т

Молочнокислі бактерії (МКБ) представляють собою грампозитивні та каталазонегативні мікроорганізми, які виробляють молочну кислоту як основний продукт збродження лактози. Такі мікроорганізми також мають здатність надавати специфічного смаку та аромату продуктам харчування, а також приносити користь здоров'ю людини, що підкреслює біотехнологічний та пробіотичний потенціал групи МКБ [1, 2]. Найбільш вивчені МКБ належать до різних видів родів *Lactobacillus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*,

Ця група бактерій класифікується як мікроорганізми, що містяться у продуктах харчування, які є загально визнаними як безпечні (GRAS) за класифікацією Управління з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів США (FDA). Вона має кваліфіковану презумпцію безпечності

Однак використання МКБ у харчовій промисловості обмежується деякими комерційними видами [5], такими як *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *L.*

Рід *Lactobacillus* був вперше описав Бейерінком [7] який описав його морфологічні та фізіологічні характеристики. Види цього роду мають неспороутворюючі палички [8], які природно мешкають у шлунково-кишковому тракті людей і тварин [9]. Не всі бактерії, що відносяться до лактобактерій, є

безпечними для споживання людиною і виробляють достатню кількість молочної кислоти для використання в якості закваски в процесі ферментації; однак, існує загальна згода щодо позитивного впливу цього роду в промисловому застосуванні для виробництва продуктів харчування та здоров'я людини. Більше фізико-хімічних та таксономічних [6] та метаболічна ідентифікація все ще потребує подальших досліджень [10, 11]. Наразі список назв прокариотів (LPSN,

доступний на сайті <http://www.bacterio.net>) налічує 237 видів лактобактерій (включаючи синоніми), з яких з яких лише 25 відомі як МКБ [12, 13]. Філогенетичне дерево, засноване на 1,418 пар основ 214 видів роду *Lactobacillus*

перераховує шість груп формацій. Основні МКБ розподілені на групи 1 (*L. plantarum*, *L. brevis* та *L. buchneri*), група 3 (*L. mali*, *L. oeni*, *L. nagelii* та *L. vini*) та група 6 (*L. gasseri*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. bulgaricus* та *L.*

Технологічні властивості молочнокислих лактобактерій (МКБ) класифікують ці мікроорганізми на гомоферментативні та гетероферментативні.

Гомоферментативні LAL виробляють молочну кислоту в кількості понад 85%,

ніж ніж інші продукти ферментації. Гетероферментативні БМД виробляють велику кількість ацетату, етанолу та вуглекислого газу [14]. Гомоферментативні

МКБ зазвичай використовуються як закваски, що сприяють швидкому підкисленню харчових продуктів. Гетероферментативні МКБ виконують основну

функцію, яка полягає в поліпшенні сенсорної якості продуктів харчування [15, 16] завдяки їх гліколітичній, ліполітичній та протеолітичній активності, а також

вироблення діацетилу [17]. Дослідження показали, що *L. helveticus*, *L. delbrueckii* заквасками що використовуються в молочній промисловості, поряд з *S.*

виробництва сиру, тоді як *L. helveticus* та *L. delbrueckii* ssp. *lactis* використовуються у виробництві йогуртів [19]. Іншим прикладом є *L. plantarum*,

що є ефективною закваскою для контролю ферментованих овочевих продуктів, таких як цвітна капуста та огірок [20, 21]. Вона також підвищує якість і безпеку

грецького сиру фета [22] і покращує колір вина [24].

Крім того, МКБ широко використовуються завдяки своїм пробіотичними властивостям [24]. Згідно з даними Організації з контролю за продуктами

харчування та Всесвітньої організації охорони здоров'я [25], пробіотики - це безпечні живі мікроорганізми, які сприяють покращенню здоров'я організму-

господаря. Специфічні характеристики, такі як здатність рости в кислому середовищі, стійкість до шлунково-кишкових шлунково-кишкового тракту та

клінічно значущих антибіотиків, а також висока адгезія до епітеліальних клітин шлунково-кишкового тракту, є важливими для відбору нових пробіотичних штамів [26]. Виробництво специфічних речовин, таких як органічні кислоти, вуглекислий газ, перекис водню, діацетил, жирні кислоти і, головним чином, бактеріоцини, є визначальними для антимікробної активності та розвитку нових харчових смаків [27, 28].

Тому виклик для нових досліджень полягає в тому, щоб знайти рівновагу між перевагами та недоліками, безпекою та токсичністю, а також первинними і вторинними метаболітами, що виробляються лактобактеріями, щоб забезпечити безпеку для МКБ мають широкий спектр застосування, але їх класифікація є проблемою для диференціації/ідентифікації цих мікроорганізмів, що може безпосередньо вплинути на їх застосування. У цьому сенсі, це дослідження збирає інформацію про біотехнологічний потенціал технологічних/пробіотичних МКБ, спрямованих на покращення якості харчових продуктів та здоров'я людини.

Деякі види *L. reuteri* продукують фермент інвертазу, який використовується для перетворення цукру з сахарози [33]. Крім того, *L. reuteri* також продукує велику кількість екзополісахаридів глюкану та фруктану, які вважаються пребіотиками [34]. Ці пребіотики були досліджені щодо протипухлинної активності [35], імуномодуляції [36] та зниження рівня холестерину [37]. В останні роки спостерігається значний інтерес до використання пробіотичних мікроорганізмів та органічних кислот як альтернативи антибіотикам у кормах для зменшення залишків антибіотиків у організмі, серед інших чудових переваг, таких як контроль діареї та імуностимуляція. Антимікробна дія лактобактерій зумовлена продукуванням ними багатьох сполук, головним чином органічних кислот, перекису водню, бактеріоцинів та ретиноїду [38].

Штами лактобактерій потребують поживного комплексу, який часто зустрічається в середовищах, що містять ферментовані вуглеводи, амінокислоти, вітаміни, понередики нуклеїнових кислот і мінерали, щоб виробляти значну біомасу [39], що є результатом серії високкоординованих ферментних каталізаторів. Молочнокислі бактерії зазвичай культивують на середовищі MRS

Одним з найважливіших параметрів для культивування кисломолочних бактерій є рН середовища для ферментації. Лактобактерії - це мікроорганізми з оптимальним рівнем рН близько 5,5 - 6,2, і їх ріст зазвичай відбувається при рН 5,0 або нижче; швидкість їх росту часто знижується при нейтральному рН або в середовищах, які спочатку є лужними. Обмеження росту і продукування кислоти кінцевим продуктом добре відомі. Пригнічення росту лактобактерій внаслідок підкислення цитоплазми за рахунок виробленої кислоти. Крім того, енергія, отримана при виробництві лактату, більше не доступна для росту клітин, але певною мірою використовується для підтримання гомеостазу рН [41].

Деякі з важливих аспектів промислового виробництва пробіотиків пов'язані з самим мікроорганізмом, вартістю поживних субстратів, а також процесами, що використовуються для їх виробництва та регенерації - це декілька важливих аспектів використання лактобактерій у промисловому виробництві пробіотиків. Крім того, необхідні параметри для оптимізації масштабу та ампліфікації. Необхідно оцінювати різні фази процесу, такі як кінетика росту, виробництво первинних або вторинних метаболітів, а також розділення, регенерацію та формулювання продуктів. Ферментативний процес вимагає моніторингу параметрів культурної системи як функції часу ферментації [41].

У процесі спонтанного бродіння молочнокислі бактерії розвиваються в неконтрольованих умовах, але для інших застосувань (наприклад, для виробництва молочної кислоти або біомаси) може знадобитися контроль рН.

Оптимальний рівень рН для росту різних штамів молочних бактерій був визначений раніше, як і кореляції між рН і концентрацією молочної кислоти [42].

важливим вимогам для використання в якості пробіотика: він непатогенний, нетоксигенний, стійкий до жовчі і толерантний до шлункової кислотності, а також продукує антимікробні сполуки зі здатністю знищувати патогенні мікроорганізми, нормальні мешканці кишечника, які є специфічними для господаря. Крім того, технологічні аспекти включають здатність *L. reuteri* витримувати ліофілізацію, процеси сублімаційного сушіння та кінцеву формулу продукту [43].

Враховуючи вище зазначене, метою нашого дослідження було дослідження біотехнологічних особливостей лактобактерій *Lactobacillus reuteri*, зокрема, їх морфологічних характеристик, рівень накопичення біомаси, ріст залежно від рН поживного середовища, рівень синтезу молочної кислоти.

Об'єктом дослідження є культура *Lactobacillus reuteri*.

Предметом дослідження є особливості росту та синтезу молочної кислоти лактобактеріями *Lactobacillus reuteri*.

В даній роботі було використано такі методи дослідження як методи культивування мікроорганізмів на штучних поживних середовищах, методи оцінки рівня накопичення біомаси клітин мікроорганізмів, кількісне визначення молочної кислоти.

Практична значущість роботи полягає в розробці рекомендацій щодо культивування *Lactobacillus reuteri*, що можуть бути використані при виробленні біотехнологічних препаратів на основі досліджуваної культури.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Використання лактобактерій як заквашувальної культури

Використання заквасок має на меті сприяти швидкому підкисленню харчових продуктів шляхом зброджування цукру [44], отримання молочної, оцтової, масляної та пропіонової кислот [45]. Лактобацили часто не мають здатності сприяти швидкому підкисленню продуктів (закваска), однак, здатність

метаболізувати цитрати, амінокислоти, полісахариди, поліоли, альдегіди та гідролізувати глікозиди, синтезувати та гідролізувати складні ефіри, протеоліз і пептидоліз мають велике значення для розробки нових ароматів та смаків продуктів харчування (допоміжні культури) [46]. Таким чином, підбір нових лактобактерій, які здатні сприяти швидкому підкисленню та надавати нові смаки і запахи для продуктів харчування, є важливим біотехнологічним інструментом спрямованим на розробку нових безпечних харчових продуктів. Деякі дослідження повідомляють, що деякі лактобактерії можуть ефективно підкислювати їжу. До таких продуктів відносяться переважно сир, йогурти, вино, ферментовані овочі та інші [47, 48].

1.1.1. Виробництво напоїв

Основними видами лактобактерій, які часто асоціюються з виноградом, суслом та вином, є *L. casei*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. plantarum*. Ці лактобактерії здатні до молочнокислого бродіння (при рН нижче 4,5), що є важливим у виноробстві, оскільки воно підкислює вино [48, 49]. Крім того, що винні лактобактерії містять малолактичні ферменти, вони також мають ферменти, що кодують гени для виробництва ароматичних сполук, таких як глікозидаза, протеаза, естераза, декарбоксидаза фенольної кислоти та цитратліаза

зростає. Однак вибрати ефективний штам досить складно, оскільки необхідно враховувати безпечність напою, втрати та сприйняття споживачами. Як описано вище, вибір і використання лактобацил у виробництві напоїв є економічно вигідним для виробника і безпечним для здоров'я споживачів.

1.1.2. Використання лактобацил у виробництві молочних продуктів

Використання лактобацил для покращення якості молочних продуктів є найбільш відомий біотехнологічний підхід. Більшість людей, які шукають пробіотичні продукти, завжди шукають молочні продукти. Зазвичай в якості заквасок використовують штами *Streptococcus* spp. та *Lactococcus* spp. Однак, окрім здатності підкислювати їжу, лактобацили також можуть надавати цим продуктам нових смаків. Kasimoglu et al [58] порівняли два типи турецького білого сиру. Контроль готували за допомогою комерційної закваски (Chr. Hansen містить *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* та *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*; пробіотик готували за допомогою Chr. Hansen R 707 та *L. acidophilus* 593 N. Пробиотичний сир характеризувався вищим вміст молочної кислоти, рівень протеолізу та сенсорні показники, і ці відмінності можна віднести до 593 N. *L. delbrueckii* CRL 581 та CRL 654 були ефективними заквасками для розробки аргентинських кустарних твердих сирів. Вони здатні збродувати вуглеводи фруктозу, мальтозу, трегалозу та сахарозу. Ці штами можна використовувати в одно- або багатоштамових заквасках, оскільки вони не виробляють інгібуючих речовин [59]. Бернс та ін [60] приготували м'який м'який сир, використовуючи комерційну культуру *Streptococcus thermophilus* St-M5 (Chr. Hansen Argentina, Quilmes, Аргентина) з та без (контроль) ад'юнктивних культур *L. plantarum* I91 та Однак рівень пептидолізу зростав у сирах з додаванням лактобацил підвищувався рівень пептидолізу, про що свідчить високий вміст амінокислот. Сир, приготований з *L. plantarum* I91, отримали найбільше схвальних відгуків від

дегустаторів. При цьому сири, виготовлені з *L. paracasei* I90, були менш сири, приготовані з *L. paracasei* I90, були сприйняті менш позитивно, ніж контрольний сир. Пробиотичний ефект сирів, виготовлених з I90 та I91, визначався за підвищенням рівня IgA в клітинах слизової оболонки кишечника мишей.

НУБІП УКРАЇНИ

D
i
m

i

НУБІП УКРАЇНИ

t
r
e

l

l

НУБІП УКРАЇНИ

o
u
e

l

а [61] порівняли вільну та іммобілізовану *L. casei* ATCC393 (на сироватковому білку) як стартову культуру у пробиотичному виробництві сиру типу фета, у виробництві пробиотичного сиру типу фета. Сир, засіяний вільними клітинами *L.*

клітинами, досяг рН 4,7. Іммобілізовані клітини виробляли сир з покращеним профілем аромату, що було визначено за допомогою попереднього сенсорного

тесту. Ozer et al [61] покращили життєздатність *L. acidophilus* LA-5 у білому розсільному сирі шляхом мікрокапсулювання за допомогою екструзії або емульсійного методу. Вміст середньо- та довголанцюгових вільних жирних

кислот, ацетальдегіду та діацетилу були вищими в сирі, іммобілізованому

пробиотиком, а сенсорні властивості були подібними у мікрокапсульованих лактобактеріях та контролі (немікрокапсульовані лактобактерії).

р

т

і

і

та вищу тексотропність. Вони були більш в'язкими порівняно з напоями, виготовленими з *S. thermophilus* ST7 та *L. bulgaricus* або *L. acidophilus* [62-64].

Використання лактобацил у ферментації м'ясних продуктів

та *L. casei* є найбільш використовуваними видами лактобацил як комерційних м'ясних заквасок. При ферментації м'яса, основна функція основною функцією

лактобактерій є отримання швидкого зниження рН, що інактивує патогенні

мікроорганізми і підвищує стабільність і термін зберігання продукту [65]. Rubio

та ін. [65] повідомили, що ферментовані сухі ковбаси, засіяні *L. plantarum* 299V у низькій концентрації (10^3 КУО/г), досягли рН 5,0 в кінці дозрівання і можуть

вважатися функціональним продуктом оскільки він покращує сенсорну якість,

додаючи цінності та діючи як пробіотичний носій для цього типу продуктів.

Плантарицин 423, вироблений *L. plantarum* 423, перетворює цей бактеріальний ізолят на хорошу закваску для

салями зі страусинового м'яса (знижуючи рН бульйону MRS приблизно до 3,5). Він

пригнічує ріст ерровитори і інших мікробних патогенів завдяки виробленню

антимікробних речовин і зниженню рН може зменшити використання хімічних

консервантів, таких як хімічних консервантів, таких як нітриди. Харбінська червона ковбаса яка не містить нітридів, була вироблена шляхом ферментації, що

стимулюється *L. fermentum* AS1.1880. Цей вид лактобацил ферментував ковбасу

і показав вищий вміст вільних амінокислот і дещо нижчий рН, коли порівняно з

контрольною ковбасою з нітритною обробкою (з нітридом натрію, 60 мг/кг м'яса).

Штам *L. sakei* швидко домінував у загальній мікрофлорі китайських ферментованих ковбас, знижуючи рівень рН і контролюючи ріст харчових

патогенів, таких як кишкова паличка та інші штами ентеробактерій. Вміст

нітридів у цій ковбасі швидко знизився зі 100 проміле до 9,6 проміле, а сенсорна оцінка показала високий рівень схвалення споживачів [66].

Таким чином, використання лактобактерій для ферментації ковбас стає все більш поширеним. Такі мікроорганізми адаптуються до навколишнього середовища та контролюють процес дозрівання і ріст небажаної мікробіоти. Зменшення використання полемічних хімічних консервантів (таких речовин як нітриту та нітрати), канцерогенний потенціал яких вже було продемонстровано ферментації є однією з найважливіших переваг для здоров'я. Однак є й інші переваги, які ще належить виявити, і подальші дослідження щодо рекомендацій нових штамів LAL для ферментації м'яса.

Використання лактобацил як заквасок

Закваска - це мікробний комплекс, що складається переважно з молочнокислих бактерій і дріжджів. Її ферментація надає хлібу, що випікається, особливих властивостей, які покращують смакові та сенсорні якості хліба [68]. Застосування заквасок значно зросло через високий попит на продукти без хімічних консервантів. Гетероферментативні види бактерій відіграють важливу роль у цьому процесі, оскільки вторинні метаболіти можуть надавати хлібу особливих смаків та ароматів. Існує три типи заквасок: закваски типу I виробляються з безперервним, щоденним оновленням для збереження мікроорганізмів; закваски типу II створюються з добавками, що підкислюють тісто, з тривалими періодами бродіння (2-5 днів) і високими температурами (>30C); і тип III закваски - це сухі препарати, засіяні МКБ, стійкими до процесів сушіння. Лише закваски II та III типів потребують додавання хлібопекарських дріжджів [68].

М

i
n
e

r

v

.

d
e
l
b
НУБІП УКРАЇНИ

r
u
e
c
НУБІП УКРАЇНИ

k Розщеплення глютену МКБ, окрім зменшення кількості алергенних сполук,

також збільшує концентрацію основних амінокислот, головним чином, орнітину, який є важливим для смаку пшеничного хліба [70]. Метаболізм фенілаланіну лактобактеріями, окрім утворення фенілмолочної кислоти та її молочної кислоти та її 4-гідроксипохідного (протигрибковий потенціал), також генерує ароматичні

реткі речовини. Використання тривалих періодів ферментації з обраними лактобацилами зменшує ризик забруднення глютену. Оскільки зменшення токсичності глютену недостатньо для пацієнтів з целіакією, необхідно усунути її. Щоб максимізувати використання лактобацил з цією метою, необхідно

докращити пошук нових мікробних пулів (бактерій і грибів) для оптимізації (грибів) для оптимізації якості випікання хліба.

r
c
Використання лактобактерій у процесах силосування

u
Процес силосування може відбуватися природним шляхом. Однак додавання інокулянтів лактобацил може покращити цей процес, що призведе до отримання силосу кращої якості. Штрани *L. hilgardii* UE1-A-S11 51 та UE1-A-S11 52 (штами 1842 мав високу кислотність (3,4 г молочної кислоти на 100 г хліба-1), та покращують якість силосу з цукрової тростини та зменшують втрати сухої речовини та зменшують вміст етанолу і масляної кислоти [71]. Виробництво

кращого смаку покращили ароматизатори та повідомляють, що стійкі аромати молочної кислоти шляхом інокуляції *L. buchneri* свідчить про те, що цей вид використовується в якості закваски. Інші антимікробна активність щодо *Bacillus subtilis* мікроорганізм є потужним інструментом для отримання високоякісних силосів (штами 33 та *Bacillus thuringiensis* штам 1001, який використовується в силосі Вайнберга та ін. [72]) вивчали вплив застосування *L. buchneri* під час силосування (содової кислоти), а також амплітична та протоплазматична активність медульованих

диференційованими факторами, що покращують якість та безпеку хліба.

пшеничного та кукурудзяного силосу. Через 3 місяці зберігання пшеничні силоси, інокульовані *L. buchneri* мали вищу стабільність і вміст оцтової кислоти, ніж контроль (без інокуляції лактобактеріями), і були вільні від плісняви. У кукурудзяних силосах присутня пліснява, проте аеробна стабільність є кращою.

Штам *L. buchneri* 40788 також покращує аеробну стабільність кукурудзяного силосу, а було виявлено 1,2-пропандіол, який позитивно впливає на аеробну стабільність і якість силосу.

Пробіотичні потенційні ефекти лактобацил як силосних інокулянтів для жуйних тварин повинні включати взаємодію з мікроорганізмами рубця та вплив на перетравність клітковини. Якість силосу дуже важлива для здоров'я великої рогатої худоби. Ліма та ін. [73] показали, що комбінований силос із сорго та сої, засіяний *Lactobacillus* sp., мав вищий рівень пропіонату та нижчий рівень ацетату, а також підвищену здатність до розщеплення в рубці порівняно з силосом без додавання мікроорганізмів.

Однак, деякі дослідження повідомляють, що додавання лактобацил покращує якість та аеробну стабільність силосу, а на розщеплюваність у рубці це не впливає. Дослідження підкреслюють, що основною перевагою інокуляції лактобактеріями при силосуванні для здоров'я великої рогатої худоби є пригнічення патогенних мікроорганізмів, таких як

Отже, літературні дані свідчать про те, що пробіотичні ефекти лактобацил сприяють покращенню росту та розвитку тварин, а відсутність мікробних патогенів та плісняви може бути позитивним ефектом при виробництві м'яса.

1.2. Продукування антимікробних речовин лактобацилами

Гетерогенна група антимікробних препаратів включає пептиди та білки з різними спектрами активності, способом дії, молекулярною масою, генетичним походженням та біохімічними властивостями. Бактеріоцини - це група

антимікробних пептидів з низькою молекулярною масою з високою структурною різноманітністю, механізмами дії та інгібуючим потенціалом. Виробництво цього типу сполук пов'язане з умовами навколишнього середовища, такими як рН, температура, поживні речовини та конкурентоспроможність. Антимікробні сполуки-продуценти LAL можуть виживати в шлунково-кишковому тракті завдяки потенціалу прямого пригнічення росту бактеріоцинів по відношенню до інших мікроорганізмів (особливо патогенних). Природні антимікробні сполуки (в основному бактеріоцини) також привертають увагу через їх потенціал використання в харчовій промисловості в якості природних консервантів [74].

Як зазначено в огляді Sabo et al. [75], штами *L. plantarum* є біотехнологічно універсальними і широко використовуються в підходах, пов'язаних з харчовими продуктами. У цьому огляді висвітлено 24 бактеріоцини, що продукуються різними штамами *L. plantarum*, виділеними з м'яса, риби, молочних продуктів, фруктів, овочів та зернових. Вони здатні пригнічувати ріст кількох важливих патогенів, таких як *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *S. bacteriocyini* повідомлялося в період з 1993 по 2011 рік лише в лабораторних дослідженнях. Наразі на ринку немає бактеріоцинів *L. plantarum*.

Штами *L. reuteri* (ATCC 55730, ATCC PTA 6475, ATCC PTA 4659 і ATCC таких патогенів, як *E. coli*, *S. enterica*, *Shigella sonnei* і *V. cholerae*. Автори підкреслюють, що кількість виробленого реутерину не корелює зі здатністю пригнічувати патогени, і що можуть вироблятися додаткові антимікробні фактори. *L. reuteri* LTH2584 виробляє іншу молекулу, яка називається реутероциклін. Антимікробний ефект реутероцикліну був сильним проти *B.* середовища жирними кислотами (Твін 80, олеїнова кислота, лінолева кислота та олія зародків пшениці) мало сильний вплив на продукцію реутероцикліну. Характеристика реутероцикліну показала, що ця молекула є похідною тетрамінової кислоти, негативно зарядженою, високогідрофобною, з

молекулярною масою 349 Да [76]. *L. brevis* B23, виділений з єгипетських молочних продуктів, продукував термостабільний бактеріоциноподібний препарат, який пригнічував розвиток *S. aureus* NCTC-7447, *E. coli* NCTC-10418 та *Bacillus subtilis* NCTC-10400. *L. sakei* subsp. *sakei* 2a, виділений з бразильського продукту зі свинини, продукує антимікробну сполуку, ідентифіковану як сакацин P. Ця сполука має антимікробну дію проти *E. canis* 33, *E. faecalis* ATCC 19483, *E. i* *S. epidermidis* [76].

Дослідження повідомляють про протигрибкову активність бактеріоцинів, вироблених лактобактеріями. Adebayo та Aderiye [77] показали, що бактеріоцин, вироблений *Lactobacillus* spp. має протигрибкову активність проти *Penicillium* SGI, який має найбільш перспективний потенціал. Бактеріоцин, охарактеризований як 3-феніломолочна кислота, що виробляється штамом *L.* таких як *A. niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*, *A. flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus stolonifer* і *Penicillium camemberti*. Крім того, *Candida krusei*,

бактеріоцинами, виробленими *L. fermentum* (fer) та *L. rhamnosus* (rha). Активність бактеріоцину, виробленого *L. plantarum* MBSa4 не залежала від температури (від 4С до 100С, залишаючись активним навіть після обробки при 121С протягом 15 хв). Цей бактеріоцин отримав назву MBSa4 і виявив протигрибкову активність

проти *Penicillium roqueforti*, *Penicillium expansum*, *Fusarium sp*, *Mucor plumbeus*, протигрибковий бактеріоцин, який продукується *L. brevis* і *L. paracasei*, виділеними з молочних продуктів, пригнічує ріст *Aspergillus* spp. і вироблення афлатоксину В1. Автори припустили, що інокуляція насіння кукурудзи цими бактеріальними ізолятами може діяти як харчовий протектор і є перспективним підходом для виробництва органічних продуктів без додавання хімічних речовин.

Lavermeccsa et al [79] повідомили, що бактеріоцин, який продукує *L. plantarum* 21B, ймовірно, є метиловим ефіром. Цей бактеріоцин має

протигрибкову дію проти *Eurotium repens* IBT18000, *E. rubrum* FTDC3228, *P. IDM/S5* і *F. graminearum* IDM623. Крім того, білкова протигрибкова сполука широкого спектру дії, що продукується штамом *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3, сильно пригнічує ріст пліснявих грибів *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *P. roqueforti*, температурах ускладнює процес її визначення.

Також повідомлялося про противірусну активність бактеріоцинів, що виробляються лактобактеріями. Цей противірусний захист клітин може

здійснюватися трьома шляхами: пряма взаємодія, вироблення противірусних метаболітів (антимікробних речовин) і стимуляція імунної системи. Стафілокоцин 188 і ентероцин AAR74 знижують розвиток вірусу коліфагу HSA в десять разів, а ентероцин AAR-71 і ервініоцин NA4 усувають вірусне навантаження [80]. Серкеджиева та ін [81] вивчали новий бактеріоцин, вироблений *L. delbrueckii* (B1), який має противірусну активність проти двох штамів вірусу грипу (A/Weybridge і A/Rostock), а також антибактеріальну активність проти *B. subtilis*, *E. coli*, *Listeria innocua* і *L. monocytogenes*. Автори також показали, що неочищений препарат B1 не захищав клітини від інфекції, не

впливав на адсорбцію і незначно пригнічував проникнення вірусу в інфіковані клітини. Однак очищений B1 не збільшував клітинну токсичність і приблизно у 870 разів підвищував інгібіторну активність вірусу.

Квак та ін. [82] визначили антимікробну активність 16 циклічних дипептидів, що продукуються *L. plantarum* LBP-K10, виділеним з корейського кімчі. Весь набір сполук продемонстрував високий потенціал пригнічення розвитку мультирезистентних грампозитивних (*S. aureus* 11471 та *S. pneumoniae* 14596) та грамнегативних бактерій (*S. typhimurium* 12219), патогенних грибів людини та рослин (*C. albicans* SC5314 та *G. boninense* GMR3), а також вірусу грипу А/ (H3N2). Відкриття нових антимікробних сполук, отриманих за допомогою безпечних лактобактерій, може стати біотехнологічним рішенням

проблеми мультирезистентних патогенів (бактерій, грибів і вірусів) у харчовій промисловості, аграрному секторі та для здоров'я людини.

НУВІП УКРАЇНИ

Пробіотичні характеристики лактобактерій

НУВІП УКРАЇНИ

У 2007 році Робоча група FAO/WHO ООН розробила настанову з розробки та оцінки пробіотиків у харчових продуктах. Ця настанова містила такі

НУВІП УКРАЇНИ

рекомендації: (а) висока точність ідентифікації різних генотипів або видів пробіотичного штаму, (б) проведення тестів *in vitro* та *in vivo*, які підтверджують пробіотичний потенціал штаму, (в) забезпечення безпеки та відсутності контамінації пробіотичного штаму, (г) проведення клінічних випробувань з

НУВІП УКРАЇНИ

метою виявлення конкретних переваг для здоров'я, та (д) підготовка настанови із зазначенням способів класифікації пробіотичних штамів, адекватних умов їх зберігання та мінімальної кількості клітин.²⁶ Відбір нових ізолятів пробіотиків відбувається за певними критеріями безпеки, технологічних, функціональних і фізіологічних характеристик. Дотримання вимог FAO є важливим

НУВІП УКРАЇНИ

біотехнологічним завданням.

Однак поведінка людини, така як неправильна дієта, алкоголізм, куріння, ожиріння та вік, можуть зменшити вплив пробіотиків на здоров'я. Екологічні

НУВІП УКРАЇНИ

стреси, яким піддаються лактобактерії при їх включенні в їжу (підготовка сировини та характеристики їжі), виробничі процеси (термічна та нетермічна обробка, додавання хімічних стабілізаторів та пакування), умови зберігання та прийому всередину (шлункова кислотність) також можуть призвести до негативного впливу на функціональність пробіотиків. Безпека застосування

НУВІП УКРАЇНИ

пробіотиків - це найголовніше питання. Неправильне введення або дозування для пацієнтів з ослабленою імунною системою може спричинити бактеріальний сепсис через зараження крові. Деякі дослідження повідомляють про збільшення

смертності людей через споживання багатовидових пробіотичних продуктів [83].

Однак їхні корисні ефекти все ще можуть бути майбутнім біотехнологій.

Доведено, що вживання пробіотиків позитивно впливає на мікробіоту шлунково-кишкового тракту свиней. Такий позитивний вплив проявляється п'ятьма різними способами: (а) збільшення виробництва жирних кислот з коротким і розгалуженим ланцюгом, (б) зменшення концентрації *Clostridium* spp. і збільшення *Lactobacillus* spp., (в) покращення імунної системи, (г) покращення антиоксидантної активності та (д) зменшення експресії білків, пов'язаних зі стресовою реакцією. У літературі багато повідомляється про позитивний вплив лактобактерій на здоров'я людини. Деякі з них наведені нижче.

При правильному споживанні пробіотики на основі лактобактерій можуть принести багато користі для здоров'я. Такада та ін. [84] припустили, що модулюючи реактивність гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової осі у пацієнтів зі стресовим станом, які отримували 100 мл кисломолочного молока з LcS протягом 8 тижнів. Також спостерігалось зменшення фізичних симптомів стресу, таких як лихоманка, головний біль, біль у горлі, нежить або закладеність носа. Messaoudi et al [85] провели клінічне дослідження застосування *L. helveticus* R0052 та *Bifidobacterium longum* R0175 протягом 30 днів. Автори показали, що ці пробіотичні мікроорганізми знижували глобальні бали за госпітальною шкалою тривоги та депресії (HAD), а також глобальний індекс тяжкості симптомів Голкінса (HSCL-90). Однак автори давали суб'єктам з низьким рівнем вільного кортизолу в сечі ті ж самі пробіотичні мікроорганізми, і ті ж самі показники покращилися.

Liang et al [86] показали, що у щурів, яких годували *L. helveticus* NS8, покращувалася поведінкова (тривога і депресія) та когнітивна дисфункція, викликана хронічним стресом стриманості. У щурів спостерігався низький рівень кортистерону та адренкортикотропного гормону в плазмі крові та високий рівень інтерлейкіну-10, відновлювався рівень піпокампального серотоніну та норадреналіну, а також нейротрофічного фактору головного мозку,

демонструючи ефект, подібний/кращий, ніж у щурів, які отримували циталопран. Дослідження харчових добавок з *L. rhamnosus* HN001 для вагітних або породіль, починаючи з ранньої вагітності і до 6 місяців після пологів, показало, що жінки, які годували грудьми і приймали пробіотики, мали нижчі показники депресії і тривожності, ніж жінки в групі плацебо. Автори підкреслили, що ці позитивні ефекти можуть бути пов'язані з мікробіотою-кишечником-мозком.

Концепція осі мікробіота-кишечник-мозок стверджує, що прийом людиною пробіотика на основі лактобактерій може модулювати мікробіоту кишечника, яка впливає на мозок через численні шляхи, що включають гормональні, нейронні та імунні медіатори. Такий вплив на мозок може стати ключем до розробки нових методів лікування складних розладів центральної нервової системи шляхом контролю канонічних аспектів мозку та поведінки в механізмах здоров'я та хвороби людини [87].

1.4. Терапевтичні властивості лактобактерій: протиухлинна, гіпоклікемічна, гіпотензивна активності.

Екологічна рівновага, що підтримується лактобактеріями, може також проявляти протиракову активність. Dilna et al [88] показали, що екзополісахариди, вироблені *L. plantarum* RJF4, складаються в основному з глюкози та манози. Цей екзополісахарид виявив антипроліферативну дію на клітини раку підшлункової залози MiaPaCa2 без токсичного впливу на здорові клітини (клітини фібробластів L6 і L929). Choi et al [89] вивчали активність *L. acidophilus* 606 в ракових клітинах *in vitro*. Розчинні полісахариди цього бактеріального ізоляту мають багатообіцяючу протиракову активність у клітинах HT-29, HeLa та PANC-1 і можуть бути новим протираковим агентом, який проявляє високий ступінь селективності до ракових клітин людини.

Chen et al [90] показали, що пероральна інокуляція мишей *L. acidophilus* NCFM пригнічує ріст об'єму підшкірної пухлини в аденокарциномі товстої кишки мишей CT-26 та посилює апоптоз деяких пухлин сегментарних тканин

товстої кишки. Автори припустили, що пробіотики відіграють певну роль у пригніченні нухдинного росту при канцерогенезі СТ26 товстої кишки. Крім того, безлітинні супернатанти *L. casei* та *L. rhamnosus GG* зменшують інвазію клітин раку товстої кишки згідно з дослідженнями *in vitro*. Таке зменшення пов'язане з факторами, що виділяються пробіотичними бактеріями, які націлені на асоційовані з раком білки MMP-9 і ZO-1 (зниження регуляції MMP-9 і підвищення регуляції ZO-1).

Супернатант *L. plantarum* 5BL, виділений з вагінального секрету молоді дорослої жінки, виявив протиракову активність проти різних ракових клітин, включаючи HeLa, MCF-7, AGS і HT-29. Бактеріальні клітини залишалися життєздатними після 24 годин інкубації. Штами *L. paracasei* M5 і X12 та *L. casei* X11 і K14 індукують апоптоз у клітинах раку товстої кишки людини HT-29. Високий антипроліферативний ефект є результатом значного розриву ланцюгів ДНК в окремих клітинах, а апоптозний ефект клітинних екстрактів спричинений руйнуванням мембранного потенціалу мітохондрій (ініціація апоптотичного мітохондріального шляху). Ці дослідження визнали протираковий потенціал лактобактерій. Однак вони підкреслили, що кожна бактерія має різний потенціал, і для повного розуміння цих механізмів необхідні подальші дослідження.

Здатність лактобактерій запучати цукри у власний метаболізм може допомогти зменшити прояв симптомів діабету. Порівняння мікробіоти кишечника щурів, схильних до діабету та резистентних до діабету, показало, що мікроорганізмів у щурів, стійких до діабету, та введення їх щурам, схильним до діабету, затримує або пригнічує розвиток діабету 1 типу. У неінсулінозалежних мишей з цукровим діабетом пероральне введення *L. casei* LC протягом 4 тижнів значно знижувало рівень глюкози та інсуліну в плазмі крові, а через 8 тижнів також зменшувало масу тіла. Toshimitsu et al [91] провели скринінг колекції штамів МКБ і виявили штам *L. plantarum* (OLL2712), який виявляв протизапальну дію *in vitro*. Обробка клітин цим бактеріальним ізолатом індукує

вироблення інтерлейкіну-10 та пригнічує прозапальні цитокіни, що зменшує хронічне запалення та гіперліпідемію у мишей лінії KK-Ay з діабетом 2 типу, моделі ожиріння.

Крім того, деякі лактобактерії, такі як *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. GLP-1* та *GIP*, які відіграють важливу роль у модуляції інсуліну та інгібуванні ДПП-IV. Ці мікроорганізми також модулюють гормони, що виробляються підшлунковою залозою та кишечником, які регулюють метаболізм глюкози. Вони можуть бути досліджені як терапевтичний метод проти діабету 1 типу.

Лактобактерії також відіграють важливу роль при терапії станів ожиріння. Так, при годуванні 8-тижневих мишей з ожирінням t10 і c12-кон'югованим продуцентом лінолевої кислоти *L. rhamnosus* PL60 спостерігалось зниження маси тіла і жирової тканини в епідидимічних і периренальних тканинах. Позитивні ефекти також спостерігалися у щурів на дієті з високим вмістом сахарози, а у мишей з діабетом 2-типу, які отримували корм з *L. gasseri* BNR17, спостерігалось

зниження рівня глюкози в крові. Антиожиріння пробіотика BNR17 пояснюється підвищеною експресією генів, пов'язаних з окисленням жирних кислот (ACO, CPT1, PPAR α , PPAR δ), зниженням рівня лептину та антидіабетичною активністю

через підвищену експресію основного транспортера глюкози-4 (GLUT4) та зниженням рівня інсуліну у щурів [92].

У людей, які протягом 12 тижнів вживали 200 г на день пробіотичного молока, сквашеного *L. gasseri* LG2055, спостерігалось зменшення абдомінального жиру, маси тіла, індексу маси тіла, об'єму талії та стегон [93].

Автори припустили, що LG2055 може бути корисним для лікування метаболічних порушень. Однак мета-аналіз, проведений Million et al [94], показав, що різні види лактобактерій пов'язані з різним впливом на зміну ваги, який залежить від пацієнта. *L. fermentum* та *L. ingluviei* були пов'язані зі збільшенням ваги, а *L. plantarum* та *L. gasseri* - зі зниженням ваги.

Молоко, сквашене *L. helveticus* LBK-16H, містить біологічно активні еполуки, які знижують кров'яний тиск у гіпертоніків віком близько 52 років (у

вибірці, що складалася приблизно з 35% жінок). Автори дійшли висновку, що дієтичне лікування цим пробіотичним напоєм можна використовувати для лікування гіпертонії. Молоко, сквашене цим штамом лактобактерій, містить два трипептиди, ізoleyцил-проліл-пролін і валіл-проліл-пролін, які знижують жорсткість артерій у гіпертоніків. Це зниження оцінювали за допомогою вимірювання індексу аугментації (AIx) та ендотеліальної функції у чоловіків. Молоко, ферментоване *L. paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 або *L. plantarum* NTU 102, виявило антигіпертензивну дію завдяки виробленню таких речовин, як інгібітор ангіотензинперетворюючого ферменту та γ -аміномасляна кислота при пероральному введенні шурам зі спонтанною гіпертензією. Такий же ефект спостерігався у молока, ферментованого *L. jensenii* ATCC 25258, яке також містило інгібітор ангіотензинперетворюючого ферменту [95].

1.5. Характеристика молочно-кислих бактерій *Lactobacillus reuteri*

Бактерії роду *Lactobacillus* разом з представниками бактерій роду *Bifidobacterium* відіграють важливу роль у підтримці кишкового гомеостазу і здоров'я організму. Серед них особливої уваги потребує бактерія *Lactobacillus reuteri*. Останнім часом надзвичайно гостро стоїть проблема зниження бактеріального різноманіття, разом з цим спостерігається виснаження пулу цих корисних бактерій у складі мікробіоти кишечника та зменшення поширеності популяції *L. reuteri* серед людей [96]. Це явище, ймовірно, сприяє зростанню рівня імунних дисрегуляторних порушень серед населення та інших негативних наслідків для здоров'я. У зв'язку з цим вчені запропонували гіпотезу відновлення мікробіому до природнього стану [97]. Ця гіпотеза спонукає усвідомити необхідність «реінтродукції» і приживлення *L. reuteri* в кишечнику людини.

L. reuteri – гетероферментативна лактобактерія з потужним пробіотичним потенціалом, яка належить до пробіотичних мікроорганізмів завдяки низці корисних ефектів для організму господаря, а саме: імунотропній, протимікробній та протизапальній активності. *L. reuteri* є одним із перших мікроорганізмів, що

колонізують кишечник новонароджених і визначають подальший розвиток імунної системи. Цей вид лактобактерій є важливим природним мешканцем грудного молока людини, шкіри, сечовивідних шляхів і займає особливе місце в кишковій екосистемі [98]. *L. reuteri* здатні регулювати склад мікробіот. Вони пригнічують ріст умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів за рахунок продукції протимікробних речовин, які є кінцевими продуктами ферментації вуглеводів: вуглекислого газу, оцтової, молочної кислоти та етанолу. Здатність *L. reuteri* продукувати такі протимікробні речовини і сполуки, як перекис водню, діацетил, реутерициклін, реутерицин 6 (бактеріоцин) та реутерин (3-гідроксипропіональдегід), залежить від генетичної «обдарованості» штаму та умов оточуючого середовища (рН, температури, адекватної концентрації специфічних попередників, глюкози, солей та кофакторів ензимів) [99]. Однак немає доказів того, що один штам може одночасно продукувати реутерицин, реутерициклін та реутерин або дві з цих антимікробних сполук [100]. Бактеріоцин має непитдну природу, тому він втрачає свою активність після обробки протеолітичними ферментами або після тривалої термічної обробки [101]. Реутерициклін – це молекула тетрамової кислоти, яка функціонує як протонний іонофор і порушує трансмембранний ΔpH . Він виявляє потужну протимікробну дію щодо грампозитивних мікроорганізмів у низьких концентраціях. Токсичність реутерицикліну для людей і тварин залишається невивченою [102]. Останнім часом увага вчених зосереджена на *L. reuteri* як продуценті реутерину – небілкової водорозчинної протимікробної речовини з широким спектром дії: протибактеріальною, протигрибковою та антипротозойною активністю [103]. Продукція реутерину є результатом ферментації бактеріями триатомного спирту гліцерину. Серед усіх мікроорганізмів, які можуть перетворювати гліцерин в реутерин, *L. reuteri* має найбільш виражену здатність продукувати реутерин і найменшу чутливість до його інгібіторного впливу [104]. Цей альдегід стійкий до протеолітичного та ліполітичного розщеплення. У водному розчині реутерин являє собою трикомпонентну динамічну систему, яка складається з різних (мономерних,

гідратних, мономерних та циклічних димерних) форм 3-гідроксипропіональдегіду (3-НРА). Для адекватної протимікробної активності *L. reuteri* необхідний гліцерин у кількості, що значно перевищує ті, які зазвичай є у шлунково-кишковому тракті. Тому прийом пробіотичних бактерій *L. reuteri* вимагає додаткового введення гліцерину [105]. Ціла низка робіт була присвячена підтвердженню протимікробної активності реутерину *in vitro*, але немає жодної роботи, яка демонструє його протимікробну активність *in vivo* [106].

дегідратуватися до токсичного акролеїну, *in vivo* ефекти реутерину належить докладно вивчити перед застосуванням *in vivo*. Лактобактерії виду *L. reuteri*, як і решта пробіотичних бактерій, конкурують за сайти прикріплення на слизовій оболонці кишечника з іншими мікробами, забезпечуючи колонізаційну резистентність. Тим самим *L. reuteri* зміцнює кишковий бар'єр і зменшує мікробну транслокацію через епітелій кишечника. Дослідження *in vitro* та *in vivo* (в моделях на тваринах та в клінічних випробуваннях), які довели протизапальну, протимікробну та імунотропну активність *L. reuteri*, проводилися з використанням різних штамів виду. Два штами: *L. reuteri* ATCC 55730 та *L. reuteri* DSM 17938 найчастіше використовуються при проведенні клінічних досліджень.

Пробіотичний штам *L. reuteri* DSM 17938 у вітчизняній аптечній мережі доступний у складі монопробіотичних препаратів, вироблених компанією BioGaia AB. Він є дочірнім штамом *L. reuteri* ATCC 55730 і володіє важливою перевагою – не має небажаної резистентності до антибіотиків. На сьогодні існує значний об'єм експериментальних та клінічних досліджень, що засвідчують ефективність застосування *L. reuteri* DSM 17938 для лікування захворювань у дітей раннього віку (дитячої кольки і регургітації, некротичного ентероколіту, функціонального закрепку, діареї або функціонального болю в животі) та ерадикації *Helicobacter pylori* [107]. Однак більшість досліджень показують, що сприятлива дія пробіотика тимчасова і зникає незабаром після припинення його прийому [108].

НУБІП України

РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень

2.1. Матеріали та об'єкти дослідження

Матеріалом для проведених досліджень було використано виробничий штам пробіотичної бактерії *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. Даний штам було отримано з монопробіотичного препарату «БіоГая ОРС» («BioGaia Production АВ», Швеція).

2.2. Умови культивування *Lactobacillus reuteri*

Культивування *L. reuteri* здійснювали на рідкому та агаризованому

с
е
р
е

Склад поживного середовища MRS, г/л

Дріжджовий екстракт - 5,0

М'ясний екстракт - 10,0

Глюкоза - 20,0

Твин 80 - 1,0

K_2HPO_4 - 2,0

Ацетат натрію - 5,0

Діамоній Цитрат - 2,0

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2

$MnSO_4 \cdot H_2O$ - 0,05

Вода дистильована до 1000,0 мл

р
Н

2.3. Визначення накопичення біомаси *L. reuteri*

Визначення накопичення біомаси проводили ваговим методом. Для цього бактерії культивували на рідкому поживному середовищі MRS протягом 48 годин та аналізували приріст біомаси по сирій масі. Для цього попередньо визначали масу пробірок центрифуги; потім відбирали 1,5 мл культуральної рідини з чотирьох пробірок та центрифугували протягом 15-20 хв при 10 тис. об/хв, після того відбирали супернатант та зважували пробірки разом з осадом, який містив клітини бактерій.

Вагу біомаси перераховували за формулою:

$$M = \frac{(A - B)}{V} \cdot 1000$$

де

M – вага сирої біомаси, г/л;

A – вага центрифугованої пробірки з осадом, г;

B – вага центрифугованої пробірки без осаду, г;

V – об'єм культуральної рідини, взятий для центрифугування (мл).

Питома швидкість росту μ (1/год) була визначена з використанням кутового коефіцієнта найкращої кореляції експоненціальної фази росту біомаси, натурального логарифму концентрації біомаси (X) (LnX) (г/л) від часу бродіння (год) [114].

Продуктивність біомаси була обчислена за формулою: $F_x (\text{g L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \mu \cdot X_f$, де μ – питома швидкість росту; X_f – кінцеве значення накопичення біомаси.

2.4. Визначення кількості біомаси спектрофотометричним методом.

Аналізуючи отримані зразки на приріст біомаси, використовували УФ спектрофотометр ULAB 102 UV. Оптичну щільність досліджуваних зразків вимірювали при довжині хвилі 540 нм. Контролем слугувала дистильована вода.

Перед здійсненням виміру дотримувалися вимог правил експлуатації обладнання та було проведено калібрування приладу за допомогою функції автоматичного калібрування.

2.5. Кількісне визначення молочної кислоти за методом Бюхнера

Молочна кислота під час нагрівання в сірчаною кислотою перетворюється на оцтовий альдегід, взаємодіючи з гідрохіноном, утворює сполуку червонокоричневого кольору, кількість якої піддається спектрофотометричному визначенню. Для аналізу готуються пробірки за такою схемою:

- дослідна проба: дистильована вода 6,0 мл, зразок 1,0 мл, ортофосфорна кислота 1,0 мл;

- контрольна проба: дистильована вода 6,0 мл, розчин молочної кислоти 1,0 мл, ортофосфорна кислота 1,0 мл.

Пробірки перемішували та інкубували протягом 2-3 хвилин при температурі 20°C. Проінкубовані зразки фільтрували через паперовий фільтр. До пробірок з фільтратами додали 25%-вий розчин купрум сульфату (1,0 мл) та сухий кальцій гідроксид 0,5 мг. Вміст пробірок активно перемішали та інкубували за температури 20 °C протягом 5 хв. Після інкубування проб вміст пробірок фільтрували через паперовий фільтр. Потім до 1,0 мл фільтрату додавали 0,1 мл 10%-вого розчину купрум сульфату та 4,0 мл концентрованої сульфатної кислоти.

Проби помістили на кип'ячу водяну баню на 1,5 хвилин та охолодили. Після цього, в кожную пробірку додали по 0,1 мл 20%-го спиртового розчину гідрохінону та вміст перемішали. Проби кип'ять 15 хвилин на водяній бані.

Отримані проби дослідили методом спектрофотометрії при довжині хвилі 540 нм. Розрахунок концентрації молочної кислоти в біологічному матеріалі проводили за формулою:

$$C = \frac{C_{ст.} \cdot E_{досл.}}{E_{ст.}}$$

$C_{ст.}$ – концентрація молочної кислоти у стандартному розчині, мг/мл;

$E_{ст.}$ – оптична щільність стандартного розчину молочної кислоти, одиниці оптичної густини;

$E_{досл.}$ – оптична щільність дослідної проби, одиниці оптичної густини;

C – концентрація молочної кислоти в дослідній пробі, мг/мл

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Морфологічна характеристика отриманої культури *L. reuteri*

Досліджувані клітини *L. reuteri* має паличкоподібну морфологію і позитивно реагує на забарвлення за Грамом. Після біохімічної характеристики дана культура була представлена як каталаза-негативна, отже, вона належить до роду *Lactobacillus*, який не виробляє каталазу для розкладання пероксиду водню.

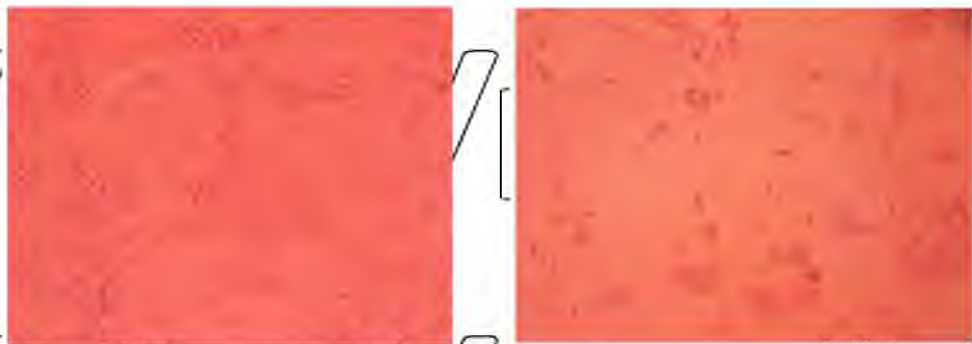


Рис. 3.1.1 Морфологія бактерій *L. reuteri* (x 1350)

Штам є молочнокислими бактеріями, оскільки він продукує молочну кислоту. Він є гетероферментативним, оскільки продукує інші продукти, крім молочної кислоти, включаючи оцтову кислоту та етанол з глюкози.

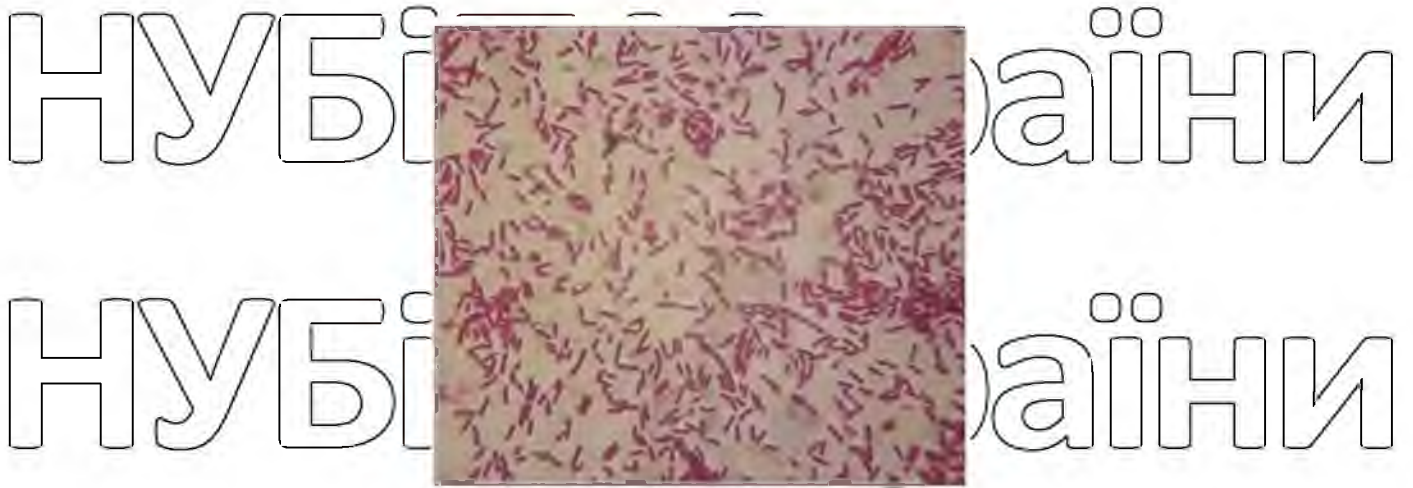


Рис. 3.1.2. Фарбування за Грамом бактерій *L. reuteri*

Таким чином, досліджуваний штам *L. reuteri* є Грам-позитивною паличкоподібною бактерією, каталазонегативною та здатною до синтезу молочної кислоти.

3.2. Визначення накопичення біомаси залежно від часу

культивування

Накопичення біомаси клітинами *L. reuteri* визначали спектрофотометричним та ваговим методами. Для цього культуру мікроорганізмів *L. reuteri* вирощували в рідкому поживному середовищі MRS в конічних колбах протягом доби при температурі 37 °С, рН 6,5 і кількість посівного матеріалу – 10% (клітин лактобактерій для посівного матеріалу була 10^9 КУО/см³). Бактерії культивували протягом 25 годин та вимірювали оптичну

густину культуральної рідини що 5 годин. Після вимірювання рівня накопичення біомаси клітинами досліджуваних мікроорганізмів спектрофотометричним методом, визначали особливості накопичення біомаси клітин *L. reuteri* ваговим методом

Результати накопичення біомаси культури *L. reuteri* на поживному середовищі MRS залежно від часу культивування наведено на рис. 3.2.1. та 3.2.2.

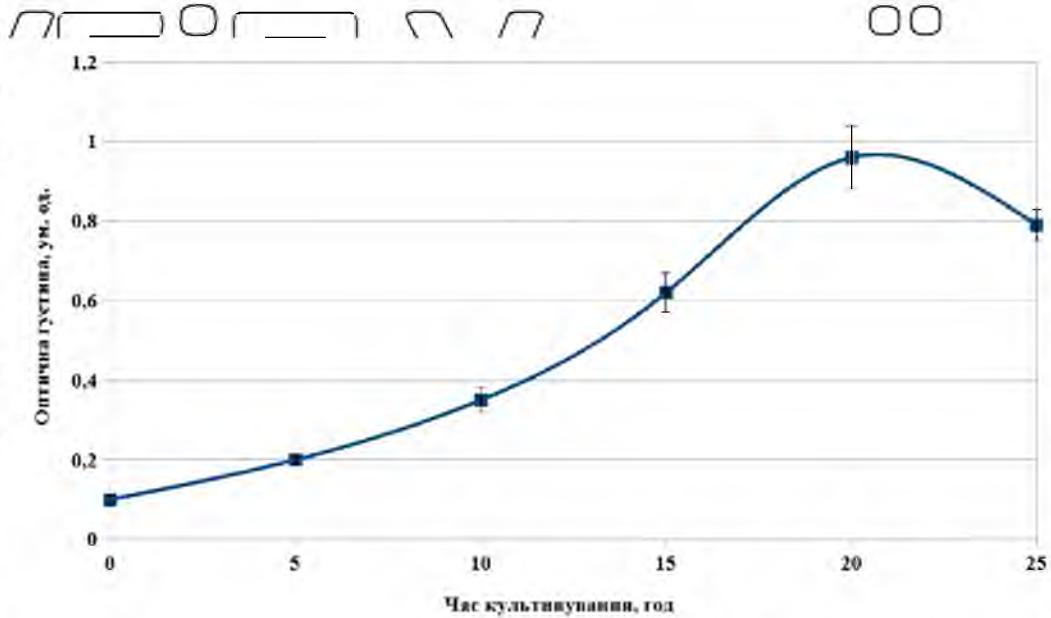


Рис. 3.2.1. Динаміка росту культури *L. reuteri* на рідкому поживному середовищі MRS [40]: визначення накопичення біомаси спектрофотометричним методом.

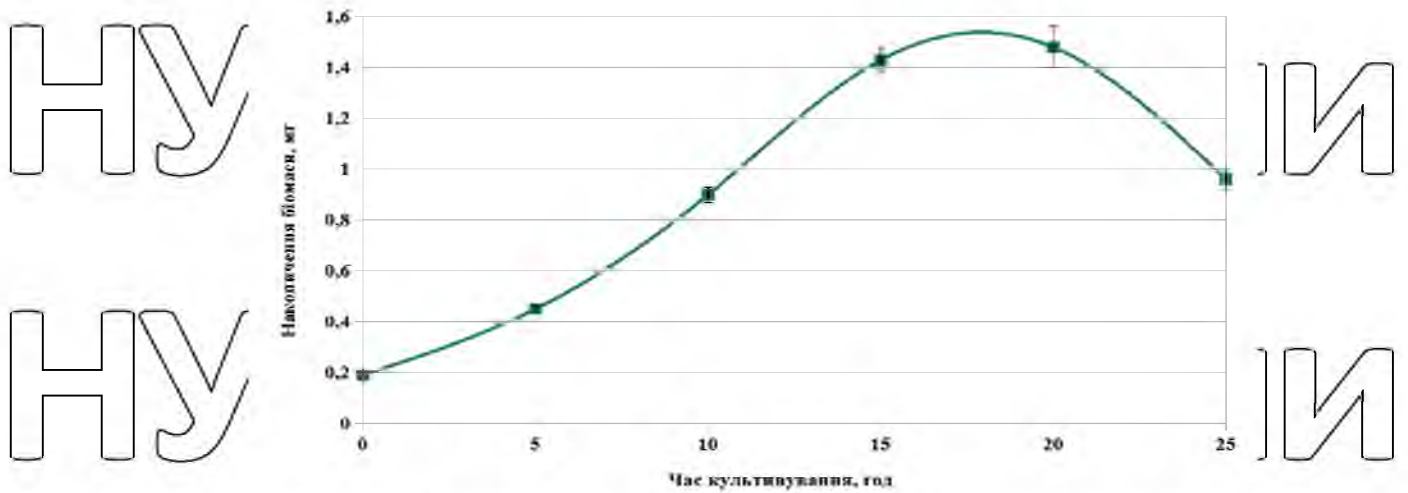


Рис. 3.2.2. Динаміка росту культури *L. reuteri* на рідкому поживному середовищі MRS [40] визначення накопичення біомаси ваговим методом.

Як показано на рис. 3.2.1. та 3.2.2. в експоненціальній фазі в перші 12-13 годинях росту кількість клітин мікроорганізмів зростає, рівень накопичення біомаси підвищується, а кількість нових клітин *L. reuteri* пропорційно відповідає загальному числу популяції досліджуваних клітин. Після 13-ї години культивування ріст культури *L. reuteri* переходить в стаціонарну фазу та поступово починає сповільнюватися, що супроводжується зменшенням кількості субстрату. Отже, показано, що максимальної величини рівень накопичення біомаси сягає в період з 13-ї до 20-ї години культивування.

Визначення залежності накопичення біомаси культурою *L. reuteri* від рН поживного середовища та об'єму первинного інокуляту

Для визначення залежності накопичення біомаси культурою *L. reuteri* від рН поживного середовища досліджувані мікроорганізми культивували на рідких поживних середовищах MRS із різними значеннями рН - від 5,5 до 8,0 із кроком 0,5. Результати досліджень представлено на рис. 3.3.1. Як видно із діаграми, оптимальним рН для росту культури *L. reuteri* є діапазон від 6,5 до 7,0. Варто зазначити, що при культивуванні мікроорганізмів на середовищі, що мало значення рН 8,0, ріст досліджуваної культури повністю зупинявся.

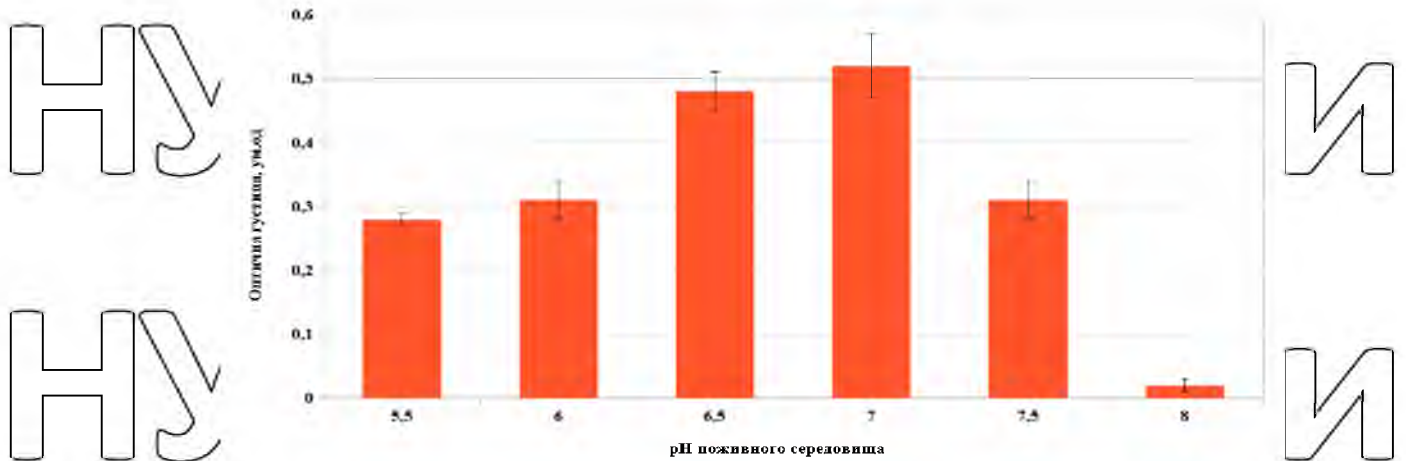
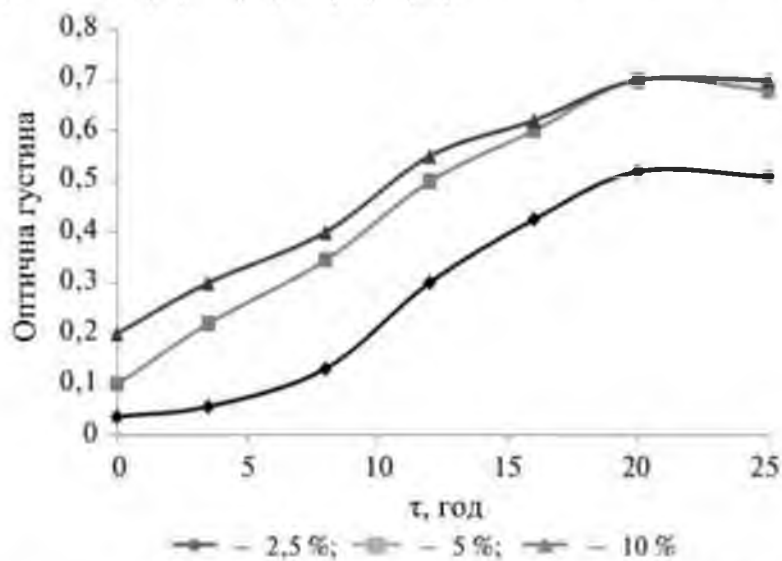


Рис. 3.3.1. Зміна кількості біомаси культури *L. reuteri* в залежності від рН поживного середовища

Наступним етапом дослідження було визначення оптимального об'єму первинного інокуляту, оскільки даний параметр може істотно вплинути на швидкість накопичення біомаси культурою мікроорганізмів. На рис. 3.3.1. показана залежність виходу біомаси від кількості початкового поживного матеріалу. Визначено, що об'єм первинного інокуляту впливає на швидкість росту культури *L. reuteri*. Так, показано, що за умов внесення інокуляту у кількості 2,5% від загального об'єму поживного середовища продукується менше клітин, ніж при 5% та 10%. Варто зазначити, що внесення первинного інокуляту у кількості 5 та 10 % від загального об'єму поживного середовища не суттєво впливає на рівень накопичення біомаси у цих двох випадках та не дають різниці під час стаціонарної фази росту досліджуваних мікроорганізмів. Отже, заради економії вихідної культури є доцільним вносити первинний інокулят у кількості 5% від загального об'єму поживного середовища.

Рис. 3.3.2. Вплив об'єму первинного інокуляту на ріст культури *L. reuteri* на



поживному середовищі MRS [40]

Таким чином, оптимальними показниками для росту культури *L. reuteri* на середовищі MRS [40] є рН середовища — 7,0, доза посівного матеріалу від об'єму поживного середовища — 5% та температура культивування — 37 °С

Визначення питомої швидкості росту на рівня синтезу молочної кислоти культурою *L. reuteri* залежно від часу культивування

Визначення питомої швидкості росту є одним з найважливіших показників росту культури мікроорганізмів та має бути врахований при плануванні біотехнологічного процесу їх культивування. Результати наших досліджень показали, що найвищих показників питомої швидкості росту культура *L. reuteri* мала на 15-20 добу культивування, отже, це є оптимальним часом для отримання найбільшої кількості біомаси досліджуваного штаму мікроорганізмів (таблиця 3.4.1.).

Таблиця 3.4.1.

Накопичення біомаси та синтез молочної кислоти культурою *L. reuteri* залежно від часу культивування

Час культивування, год	Накопичення біомаси, мг/л	Продуктивність біомаси, мг/л год	Синтез молочної кислоти, мг/г сирої маси клітин
0,01			1,04
0,03			2,09
0,05			2,96
0,08			1,98
0,04		0,04	3,02

Проведені дослідження показали, що рівень синтезу молочної кислоти досліджуваної культурою *L. reuteri* набував максимального значення на 25

годину культивування, що становило $30,530,5 \pm 3,02$ мг/г сирої маси клітин.

Варто зазначити, що найвищого рівня накопичення біомаси дана культура сягає на 15-20 годину культивування, при тому, що рівень синтезу молочної кислоти на даний час є в 1,86 рази менше, ніж на 25 годину культивування. Отже, якщо метою дослідження (або технологічного процесу) є не накопичення

максимальної кількості біомаси, а синтез молочної кислоти, варто збільшити час культивування до 25 годин.

Таким чином, питома швидкість росту *L. reuteri* є максимальної на 15-20 добу культивування, тоді як максимального рівня синтезу молочної кислоти дана культура досягає на 25 добу.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що досліджуваний штам *L. reuteri* є Грам-позитивною паличкоподібною бактерією, каталазонегативною та здатною до синтезу молочної кислоти.

2. Виявлено, що максимальної величини рівень накопичення біомаси *L.*

3. Визначено, оптимальними показниками для росту культури *L. reuteri* на середовищі MRS [40] є рН середовища — 7,0, доза посівного матеріалу від об'єму поживного середовища — 5 % та температура культивування — 37 °С.

4. Показано, що питома швидкість росту *L. reuteri* є максимальної на 15-20 добу культивування, тоді як максимального рівня синтезу молочної кислоти дана культура досягає на 25 добу.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

Acid Bacteria (pp. 7-18). 1995; Springer, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978->

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

32. Gänzle M.G. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2004. Vol. 64. - P. 226-332.

33. Gines S.C., Maldonado M.C., Valdez G.F. Purification and characterization of invertase from *Lactobacillus reuteri* CRL 1100. // *Current Microbiol.* - 2000. - Vol. 40. - P. 181-184.

34. Hijum S.A.F.T., Bonting K., Maarel M.J.E.C., Dijkhuizen L. Purification of a new fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. // *FEMS Microbiol. Lett.* - 2001. - Vol. 205. - P. 323-328.

35. Roos N. M., Katan M. B. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American Journal of Clinical Food.* 2000. - Vol. 71(2). - P. 405-411.

36. Schiffrin E.J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschlimann J.M., Donnet-Hughes A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria // *J. Dairy Sci.* - 1995. Vol. 78(3). - P. 491-497.

37. Gil N.F., Martinez R.C.R., Gomes B.C., Nomizo A., Martinis E.C.P. Vaginal lactobacilli as potencial probiotics against *Candida* spp. // *Braz. J. Microbiol.* - 2010. Vol. 41(1). - P. 6-14.

38. Carr F.J., Chill D., Maida N. The lactic acid bacteria: a literature survey // *Crit. Rev. Microbiol.* Vol. 2002. Vol. 28(4). - P. 281-370.

39. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // *J. App. Bacteriol.* 1960. Vol. 23. - P. 130-135.

40. Guyot J.P., Calderon M., Morlon-Guyot J. Effect of pH control on *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans*. *J. Applied Microbiol.* 2000. Vol. 88. - P. 176-182.

41. Narayanan N., Roychoudhury P., Srivastava A. Isolation of adh mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of L(+) lactic acid. // *Biotechnology.* 2004. Vol. 7(1). P. 72-84.

43. Pancheniak E.F.R., Soccol C.R. Biochemical characterization and identification of probiotic *Lactobacillus* for swine // Boletim do Centro de Pesq. Prod. de Alimentos. 2005. - Vol. 23(2). - P. 299-310.

4

4

НУБІП України

the next generation of malolactic fermentation starter cultures—an overview // Food

НУБІП України

НУБІП України

3840–3851. <https://doi.org/10.1021/jf052979j>

НУБІП України

НУБІП України

9

НУБІП України

НУБІП України

80. F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobbetti M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol* 2009, 66(9): 4084–4090. <https://doi.org/10.1128/AEM.01128-09>

81. Serkedjieva J, Danova S, Ivanova I. Antiinfluenza virus activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2000;88(1–3):285–298. <https://doi.org/10.1385/ABAB.88.1-3:285>

82. Kwak MK, Liu R, Kang SO. Antimicrobial activity of cyclic dipeptides produced by *Lactobacillus plantarum* LBP-K10 against multidrugresistant bacteria, pathogenic fungi, and influenza A virus. *Food Control* 2018;85:223–234. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.001>

83. Bongaerts GP, Severijnen RS. A reassessment of the PROPATRIA study and its implications for probiotic therapy. *Nat Biotechnol*. 2016;34(1):55–63. <https://doi.org/10.1038/nbt.3436>.

84. Shida K, Kataoka-Kato A, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut–brain interaction in human and

85. Messaoudi M, Violle N, Bisson JF, Desor D, Javelot H, Rougeot C. Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes*. 2011;2(4):256–261. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.4.16108>.

86. Liang S, Wang T, Hu X, et al. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic

restraint stress. // Neuroscience. 2015. Vol. 310. P. 561-577.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.033>

87. Cryan J.F., Dinan T.G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2012. Vol. 13(10). P. 701-712.

88. Dilna SV, Surya H, Aswathy RG, et al. Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT-Food // Sci Technol*. 2015. Vol. 64(2). P. 1179-1186.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.040>

89. Choi SS, Kim Y, Han KS, et al. Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. *Lett Appl Microbiol*. 2006. Vol. 42(5). P. 452-458. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01913.x>

90. Chen CC, Lin WC, Kong MS, Shi HN. Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. *Br J Nutr*. 2012;107(11):1623-1634.
<https://doi.org/10.1017/S0007114511004934>

91. Toshimitsu T, Mochizuki J, Ikegami S, Ito H. Identification of a *Lactobacillus plantarum* strain that ameliorates chronic inflammation and metabolic disorders in obese and type 2 diabetic mice. *J Dairy Sci*. 2016;99(2):933-946.
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-9916>

92. Kang JH, Yun SI, Park MH, Park JH, Jeong SY, Park HO. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. *PLoS One*. 2013;8(1):e54617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054617>.

93. Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, Akai Y, Okano M, Kagoshima M, Tsuchida T. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*. 2010; 64 (6): 636. <https://doi:10.1038/ejcn.2010.19>

9

94. Дячковский Т.М., Подгорский В.С. Оценка пробиотиков, согласно рекомендациям международных организаций. *Микробиол. Журн*. 2005. Т. 67.

№ 6. C. 104–112.

НУБІП України

Vol. 74(2): M100–7. DOI: 10.1111/j.1750–3841.2009.01067.x

©2011. Vol. 108 (Supplement 1). P. 4645–4652. DOI:10.1073/pnas.1000099107

НУБІП України

Britton et al. London: Academic Press, 2017. P. 89–97. DOI:10.1016/b978-0-12-

НУБІП України

Singapore: Springer, 2016. P. 57–81. DOI: 10.1007/978-981-10-2555-6_4

№ 8. DOI:10.3390/molecules22081255

©2015. Vol. 7, № 1. P. 39–50. DOI: 0.4172/jbb.1000212

©2017. Vol. 8, Supplement 1, P. 1281–1283. In: *Int. J. Food Microbiol.* 137: 1–7. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.003

©2012. Vol. 7, № 5. DOI:10.1371/journal.pone.0037116.

НУБІП України

№ 1. DOI:10.1080/20002297.2016.1274582.

©2017. Vol. 4, № 6. DOI:10.5935/medicalexpress.2017.06.06

НУБІП України

©2011. *Ukrainian Journal of Food Science and Technology*. DOI:10.15788/1726-4075.2011.00099107938 in

№ 1. P. 39–50. DOI: 0.4172/jbb.1000212

НУБІП України

114. Bonomi A., Schmidell W. *Biotechnologia Industrial*. Vol. 2. Edgard Blücher: São Paulo, 2001. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos; pp. 123–178

НУБІП України

©2017. P. 89–97. DOI:10.1016/b978-0-12-804024-9.00008-2