

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

Дипломна магістерська робота

на тему **Біотехнологічні аспекти отримання наночасток
за допомогою *Saccharomyces cerevisiae***

Виконав: студент 2 курсу, групи МгБТ-20
спеціальності 162 Біотехнології та
біоінженерія освітньої програми
Біотехнологія високомолекулярних сполук
Данієль ТАЛАЩЕНКО

Керівник к.б.н. Ольга ЮНГІН

Рецензент доцент кафедри біотехнології,
шкіри та хутра, к.т.н. Ірина ВОЛОШИНА

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри _____

д.т.н., проф. Олена МОКРОУСОВА
« ____ » грудня 2021 року

ЗАВДАННЯ

НА ДИПЛОМНУ МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ

Талащенку Данієлю Олександровичу

1. Тема роботи **Біотехнологічні аспекти отримання наночасток за допомогою *Saccharomyces cerevisiae***

науковий керівник роботи к.б.н. Ольга ЮНГІН

затверджені наказом вищого навчального закладу від «04» жовтня 2021 року № 286.

2. Строк подання студентом роботи _____

3. Вихідні дані до роботи: завдання на дипломну магістерську роботу; наукова література щодо властивостей наночасток срібла, характеристики культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, результати експериментів щодо отримання наночасток срібла з використанням *S. cerevisiae* та дані їх антибактеріальної активності; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

4. Зміст дипломної роботи

Розділ 1 Огляд літератури

Розділ 2 Об'єкт, мета та методи дослідження

Розділ 3 Експериментальна частина

Висновки

Список використаних джерел

Додатки

5. Консультанти розділів дипломної магістерської роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1	<i>Ольга ЮНГІН, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра</i>	25.09.2021	30.10.2021
Розділ 2	<i>Ольга ЮНГІН, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра</i>	25.09.2021	20.11.2021
Розділ 3	<i>Ольга ЮНГІН, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра</i>	25.09.2021	01.12.2021

6. Дата видачі завдання 25.09.2021 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів дипломної магістерської роботи	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ	16.10.2021	
2	Розділ 1 Огляд літератури	30.10.2021	
3	Розділ 2 Об'єкт, мета та методи дослідження	20.11.2021	
4	Розділ 3 Експериментальна частина	01.12.2021	
5	Висновки	01.12.2021	
6	Оформлення дипломної магістерської роботи	06.12.2021	
7	Подання дипломної магістерської роботи на кафедру для рецензування	06.12.2021	
8	Перевірка дипломної магістерської роботи у наявність ознак плагіату		
9	Подання дипломної магістерської роботи у відділ магістратури для перевірки виконання індивідуального навчального плану		
10	Подання дипломної магістерської роботи на затвердження завідувачу кафедри		

Студент _____

Даніель ТАЛАЩЕНКО

Науковий керівник роботи _____

Ольга ЮНГІН

Директор НМЦУПФ _____

Олена Григоревська

АНОТАЦІЯ

Талашенко Д. О. Біотехнологічні аспекти отримання наночастинок за допомогою *Saccharomyces cerevisiae*. – Рукопис.

Дипломна магістерська робота за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2021 рік.

Дипломну магістерську роботу присвячено отриманню біогенних наночастинок срібла з використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, дослідженню їх спектрофотометричних та антибактеріальних властивостей.

У дипломній роботі обґрунтовано технологію зеленого синтезу наночастинок за допомогою дріжджів *S. cerevisiae*. Експериментальним чином доведено ефективність використання саме культури *Saccharomyces cerevisiae* в порівнні з *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia anomala* та *Zygosaccharomyces rouxii*. Продемонстровано антибактеріальну активність наночастинок отриманих із дріжджових лізатів та супернатантів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995 та *Saccharomyces cerevisiae* Y-530.

Дипломна робота включає біотехнологічні аспекти отримання наночастинок срібла з вираженою антибактеріальною дією проти клінічно-важливих штамів бактерій *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 та *Staphylococcus aureus* 1560.

Ключові слова: *Saccharomyces, cerevisiae, наночастки срібла, антибактеріальна дія, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus.*

ABSTRACT

Talashchenko D. O. Biotechnological aspects of obtaining nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae*. – Manuscript.

Master's thesis work in specialty 162 – Biotechnology and bioengineering. – Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, 2021.

The master's thesis is devoted to the production of biogenic silver nanoparticles using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the study of their spectrophotometric and antibacterial properties.

The thesis of green synthesis of nanoparticles thanks to yeast *Saccharomyces cerevisiae* is substantiated in the thesis. The efficiency of using *S. cerevisiae* culture in comparison with *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia anomala* and *Zygosaccharomyces rouxii* has been experimentally proved. The antibacterial activity of nanoparticles obtained from yeast lysates and supernatants of yeast *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995 and *Saccharomyces cerevisiae* Y-530 was demonstrated.

The thesis includes biotechnological aspects of obtaining silver nanoparticles with pronounced antibacterial action against clinically important strains of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* 1560.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, silver nanoparticles, antibacterial action, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1 Загальна характеристика наночасток, отриманих біогенним способом ...	12
1.2 Властивості <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.2.1 Біологічна характеристика дріжджів <i>S. cerevisiae</i>	19
1.2.2 Застосування <i>S. cerevisiae</i> для отримання біотехнологічної продукції..	23
1.2.3 Отримання етилового спирту за допомогою <i>S. cerevisiae</i>	24
1.2.4 Використання <i>S. cerevisiae</i> в якості модельної системи для генної інженерії	25
1.3 Використання наночасток у медицині та косметиці	27
Висновки до розділу 1	30
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	31
2.1 Характеристика об'єкту дослідження <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.1.1 Таксономічний статус <i>S. cerevisiae</i>	31
2.1.2 Морфолого-культуральні властивості <i>S. cerevisiae</i>	32
2.1.3 Фізіолого-біохімічні властивості культури <i>S. cerevisiae</i>	33
2.2 Характеристика предмету дослідження.....	36
2.3 Методика синтезу наночасток з використанням культури <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
2.4 Спектрофотометричний аналіз зразків супернатантів та дріжджових лізатів на наявність наночасток срібла.....	37
2.5 Дослідження антибактеріальної активності синтезованих наночасток срібла	38
2.6 Статистичний аналіз	38
Висновки до розділу 2	40
РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	41
3.1 Синтез наночасток срібла біогенним способом.....	41

3.2	Аналіз утворення наночасток срібла за допомогою УФ-спектроскопії.	43
3.3	Антибактеріальна дія наночасток срібла, отриманих зеленим синтезом з використанням дріжджів	46
	Висновки до розділу 3	56
	ВИСНОВКИ	57
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	58
	ДОДАТКИ	65

ВСТУП

Наночастки металів володіють унікальними властивостями, що забезпечують яскраво-виражену антибактеріальну дію, антивірусну дію та антиоксидантну дію. Наприклад, мають високу адсорбційну активність, що обумовлює збільшення їхньої питомої поверхні, призводить до здатності поглинати на одиницю своєї маси у багато разів більше речовин, що адсорбується, ніж макроскопічні дисперсії. Ультрамалі розміри наночастинок металів обумовлюють підвищення біодоступності, подолання біобар'єрів, можливість зв'язування з нуклеїновими кислотами та білками, вбудовування в мембрани клітин, проникнення в органели зі зміною їхніх функцій [1].

Широко розповсюдженими методами синтезу наночастинок є фізичні та хімічні. Проте, вони є дорогими наприклад наночастки срібла. Дослідження з ними є не дешево оскільки проходить в багато етапів і зазвичай займають такі дослідження до двох тижнів. А саме методика біосинтезу наночастинок, полягає у синтезі сполук в присутності мікроорганізму *Saccharomyces cerevisiae* у водному середовищі. А також, хімічний метод біосинтезу наночастинок є енергоємним та токсичним [2].

У зв'язку з цим розвивається галузь отримання наночастинок металів за допомогою біосинтезу. Наприклад синтез нанокристалів CdS з використанням екстракту культури транс генних коренів льонку *Linaria maroccana* L [3].

Основна задача використання біотехнологій полягає у дешевому та ефективному отриманні продукту. Тому, в даній роботі ми використали дріжджі роду *Saccharomyces*, оскільки нарощування їх біомаси є дешевим, швидким та безпечним [4].

Актуальність теми кваліфікаційної роботи полягає в пошуку дешевого, ефективного та безпечного способу отримання наночастинок срібла з вираженою антибактеріальною дією.

Наукова новизна роботи полягає в отриманні та опису ефективного методу синтезу наночасток срібла біогенним способом з використанням доступного біологічного об'єкту *Saccharomyces cerevisiae*.

Метою роботи є аналіз можливості отримання наночасток срібла з вираженою антибактеріальною дією з використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

Об'єкт дослідження роботи – біосинтез наночасток срібла дріжджами *Saccharomyces cerevisiae*.

Предмет дослідження – антибактеріальні властивості наночасток срібла, отриманих за допомогою методу біосинтезу.

Для досягнення мети були поставлені такі **завдання**:

1. Провести культивування дріжджових культур *S. cerevisiae* Y-1995 та *S. cerevisiae* Y-530, а також *K. marxianus* Y-1524, *P. anomala* Y-219 та *Z. rouxii* Y-2475 на простому середовищі (20%-ва глюкоза) з робочою концентрацією солі AgNO_3 1 мМ.
2. Виділити зрізки супернатантів та дріжджових лізатів відповідно до стандартних методик.
3. Дослідити формування наночасток з використанням методу спектрофотометрії в зразках дріжджового лізату та супернатанту.
4. Визначити антибактеріальну активність наночасток, отриманих із дріжджового лізату та супернатанту, на культурах *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* 1560.

Методи дослідження, що використані в роботі: спостереження, аналіз, узагальнення, біологічні методи, спектрофотометричні, мікробіологічні, статистичні методи.

Практичне значення отриманих результатів полягає у встановленні ефективної антибактеріальної активності синтезованих наночасток срібла з використанням *S. cerevisiae* проти клінічно-важливих бактеріальних збудників інфекцій.

Апробацію наукових результатів проведено через їх оприлюднення на VI Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії», що відбулася у Харківському Національному фармацевтичному університеті 11-12 листопада 2021 року (Додаток А).

Публікації. Результати досліджень опубліковано в одних тезах збірників матеріалів науково-практичної конференції міжнародного рівня та статті, опублікованій у студентському науковому журналі (Додаток Б).

Бібліографія опублікованих робіт включає:

1. Волошина І.М., Кошелап Б.А., Талашенко Д.О. МОЗ Національний фармацевтичний університет : Біосинтез наночасток *Lactobacillus*, Харків, 2021, 262-263 с.

2. Кошелап Б.А., Талашенко Д.О., Волошина І.М. Застосування пробіотиків *Lactobacillus* в медицині та ветеринарії. *Міжнародний науковий журнал «ОСВІТА І НАУКА»*, 2021, Київ, С. 1-8. – Друк.

Структура і обсяг магістерської роботи. Основна частина дипломної магістерської науково-дослідницької роботи викладена на 57 сторінках, і включає три основні розділи та висновки. В роботі представлено список використаних джерел, що налічує 73 найменувань публікацій вітчизняних та зарубіжних дослідників. В роботі представлено два додатка, що ілюструють виконання індивідуального плану магістра, представлені на 14 сторінках.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Термін «нанотехнологія» запропонував професор Токійського наукового університету Норіо Танігучі в 1974 р. На думку Танігучі, нанотехнологія включає обробку, поділ, об'єднання і деформацію окремих атомів і молекул речовини, при цьому розмір наномеханізму не повинен перевищувати одного мікрона, або тисячі нанометрів [5].

Ще 1959 році американський фізик Річард Фейнман, лауреат Нобелівської премії, висловив припущення, що незабаром багато матеріалів і пристроїв будуть виготовляти на атомарному або молекулярному рівні, і це допоможе отримувати матеріали з небаченими досі властивостями. Однак лише чверть століття по тому, в 80-х роках, з'явилася вимірювальні і робочі прилади здатні працювати із нанорозмірними об'єктами. Першими приладами були скануючі зондові мікроскопи [5].

В даний час під терміном «нанотехнологія» мають на увазі сукупність методів і прийомів, що забезпечують можливість контрольованим чином створювати і модифікувати об'єкти, що включають компоненти з розмірами менше 100 нм, що мають принципово нові якості і дозволяють здійснювати їх інтеграцію в повноцінно функціонуючі системи макромасштабі [5].

Загалом, нанотехнології дають початок третій, небаченій за своїм розмахом науково-технічній революції — появи нової реальності, яка змінить вигляд світу вже до початку третього десятиліття XXI століття [6].

Термін «нанотехнологія» широко поширився в світі після виходу в 1986 р. знаменитої книги «Машини творення» фізика Еріка Дрекслера. Він став називати свої пропозиції по конструюванню окремих молекул, що володіють заданими властивостями, «молекулярної нанотехнологій». Нанотехнології зможуть створювати:

— наноматеріали із заданими властивостями наночастки (фулерени і дендримери);

- мікро- і нанокапсули (наприклад, з ліками всередині);
- нанотехнологічні сенсори і аналізатори, наноінструменти і наноманіпулятори;
- автоматичні нанопристрої [7].

Широкий спектр можливостей синтезу та отримання наночасток металів, полімерів, синтетичної та органічної природи, може вирішити велику кількість проблем, пов'язаних з доставкою лікарських препаратів, розробкою ефективних енергетичних носіїв, модифікації та поліпшення біодоступності та зменшення токсичності існуючих препаратів, розробки та застосування покриттів для ранових поверхонь, терапії та профілактики захворювань вірусної, бактеріальної, пухлинної та алергічної природи, створення косметичних препаратів з лікувальною на корегуючою дією.

1.1 Загальна характеристика наночасток, отриманих біогенним способом

Сьогодні по номенклатурі Міжнародного союзу теоретичної і прикладної хімії (IUPAC) наночастки — це об'єкти, розміри яких принаймні по одному вимірюванню не перевищують 100 нм. Згідно з рекомендацією VII Міжнародної конференції з нанотехнологій, виділяють наступні типи наноматеріалів: нанопористі структури, наночастки, нанотрубки і нановолокна, наноструктуровані поверхні і плівки, нанокристали і нанокластери. Таким чином, під визначення «наночастки» потрапляють практично будь-які супрамолекулярні комплекси [8]. За традицією, що склалася в біологічній і медичній літературі під наночастками зазвичай мають на увазі цілком конкретні і, перш за все, штучно створені молекулярні конструкції. Їх можна умовно розділити на кілька класів (таблиця 1) [9]. Основними характеристиками, з якими відбувається розподіл наночасток на види — це розмір, природа, форма, розмір, складність структури, кількість компонентів, хімічна природа наночастки, тип синтезу та отримання, магнітні властивості.

Таблиця 1.

Класифікація наночасток

Вид наночасток	Різновиди
Біологічні і біогенні наночастки	Ферменти, білки, рибосоми, віруси
Полімерні наночастки	Поліетиленгліколь, полігліколева і полімолочна кислоти
Дендримери	Поліамідоамін, лізин
Вуглецеві наночастки	Нанотрубки, фулерени
Неорганічні наночастки	Наночастки металів: золото, срібло, платина, титан, цинк, залізо, оксид кремнію
Квантові точки	Напівпровідникові нанокристали
Супермагнітні наночастки	Магнетит (суміш різних оксидів заліза)
Полімерні міцели	Міцели — переносники гідрофобних лікарських препаратів
Ліпосоми	Малі, великі і багатошарові ліпосоми
Перфторвуглеводні наночастки	Наночастки, що складаються з рідкого перфторвуглеводного ядра, покриті ліпідним моношаром

Біологічні і біогенні наночастки. Біологічний світ буквально наповнений наночастками — це ферменти (білки з каталітичної активністю), молекули ДНК і РНК, рибосоми, клітинні везикули, віруси та ін. [9]. Відмінною особливістю таких об'єктів є їх здатність до агрегації і самоорганізації. Це властивість активно використовується при створенні штучних конструкцій, що імітують реальні біологічні структури.

Полімерні наночастки. Полімерні матеріали мають ряд переваг, що визначають ефективність їх застосування в технологіях доставки: біосумісність, здатність до біодеградації, функціональна сумісність. Типовими сполуками, які

представляють основу для створення полімерних наночастинок, є полімолочна і полігліколева кислоти, поліетиленгліколь, полікапралактон, а також їх різні сополімери [10].

Дендримери. Це унікальний клас полімерів з сильно розгалуженою структурою. Розмір і форма дендримерів можуть бути дуже точно задані при хімічному синтезі. Дендримери отримують з мономерів. Типовими мономерами є поліамідоамін і амінокислота лізин. Контрольовані розміри і властивості поверхні, а також стабільність дендримерів роблять їх вельми перспективними для використання в доставці лікарських препаратів. Експерименти на мишах показали, що ефективність наночастинок з фолієвою кислотою і протипухлинним препаратом метотрексатом виявилася в 10 разів вище, ніж ефективність вільних препаратів. Ліки затримувалося в пухлинних клітинах на більш тривалий час, що забезпечувало нижчий токсичний ефект на організм. Ефективність їх застосування для трансдермальної доставки ряду препаратів доведена на лабораторних тваринах [12].

Вуглецеві наночастки. Нанотрубки і фулерени — одні з найвідоміших наноструктур. За відкриття цієї нової форми існування вуглецю Р. Керл, Р. Сморлі і Г. Крото в 1996 р були удостоєні Нобелівської премії з хімії [10]. Фулерен — це п'ята (крім алмазу, графіту, карбін і вугілля) форма вуглецю. Він схожий на футбольний м'яч, зшитий з п'яти шестикутників (рис. 1).

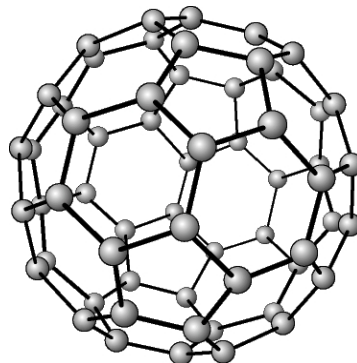


Рис. 1.1. Фулерен [13]

Нанотрубки володіють підвищеною спорідненістю до ліпідних структур, при цьому вони здатні утворювати стабільні комплекси з пептидами і ДНК олігонуклеотидами [13, 14], і навіть інкапсулювати ці молекули [14, 15], що визначає їх застосування в області створення систем доставки вакцин і генетичного матеріалу [16]. Експериментуючи з фулеренами і дендримерами, зараз у багатьох країнах шукають ефективні ліки від СНІДу, грипу, хвороби Паркінсона, раку [17].

Неорганічні наночастки. До цього класу зазвичай відносять наноструктури, отримані на основі оксиду кремнію, а також різних металів (золото, срібло, платина). Часто, така наночастка має кремнієве ядро і зовнішню оболонку, сформовану атомами металу. Використання металів дозволяє створювати переносники, які мають низку унікальних властивостей. Особливо виділяють наночастки з цинку, титану і заліза. Також, є дані про отримання наночастинок срібла в колоїдному розчині (рис. 1.2). Використання описаних вище наночастинок в медицині може не тільки ефективно доставляти біологічно активні молекули крізь різні бар'єри організму, які вони не здатні долати самотійно (шкірний, гематоенцефалічний), але і істотно змінювати характер дії препарату [17].

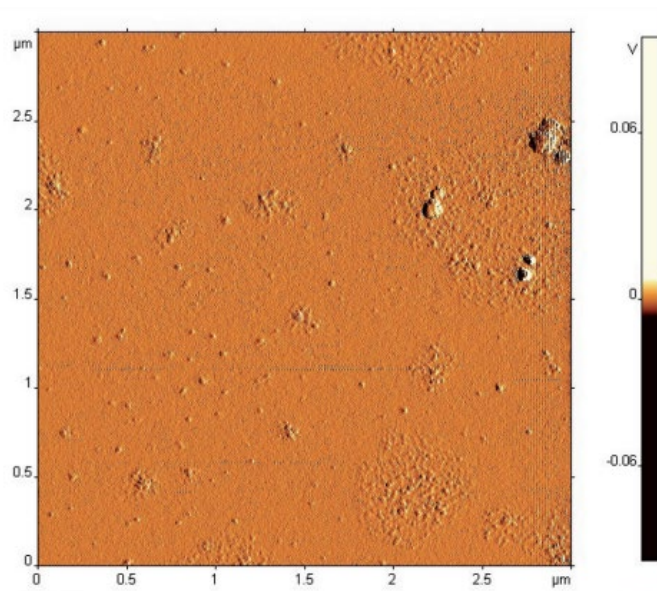


Рис. 1.2. Наночастки срібла [16]

Квантові точки. Це напівпровідникові нанокристали, що представляють собою дрібні частки, порівнянні за розміром з молекулами білків і нуклеїнових кислот. При активації зовнішнім світлом вони дають практично безперервну палітру чітких кольорів. Флюоресценція квантових точок збуджується білим світлом, причому частки нанокристалів можуть бути приєднані до біомолекул і забезпечувати довгостроково існуючий сигнал, що багаторазово перевершує по яскравості використання в різних галузях барвники [17].

В даний час квантові точки застосовуються для детекції пухлинних клітин [18], маркування внутрішньоклітинних органел [19], візуалізації мікросудин [20] і в багатьох інших біомедичних дослідженнях.

Супермагнітні частки. Найбільш добре вивчені супермагнітні властивості частинок оксиду заліза. Для біомедичних цілей найчастіше використовується магнетит, який являє собою суміш різних оксидів заліза. Подібно квантовим точкам, супермагнітні наночастки володіють досить високою токсичністю. Покриті золотом супермагнітні наночастки можуть використовуватися як контрастер при проведенні магнітно-резонансної томографії, що дозволяє істотно збільшити роздільну здатність даного методу [21].

Полімерні міцели представляють собою нанорозмірні колоїдні частинки, що мають гідрофобну внутрішню частину (ядро) і гідрофільну поверхню (оболонку). Лікарські препарати і контрастні агенти можуть або поміщатися в ліпідне ядро міцели, або ковалентно зв'язуватися з її поверхнею. Міцели мають дещо менші розміри, ніж ліпосоми (близько 50 нм). Вони представляють інтерес в першу чергу як переносники гідрофобних лікарських препаратів [22].

Ліпосоми. Це наночастки кулястої форми, обмежені біліпідною мембраною, в порожнині якої знаходиться водне середовище. Активна речовина може розташовуватися в ядрі ліпосоми (водорозчинні речовини) або в її ліпідній оболонці (жиророзчинні речовини). Більшість ліпосом мають діаметр менше 400 нм. Ліпосоми можуть бути одношаровими малими, великими і багатошаровими.

Залежно від складу і шляхів потрапляння в клітину ліпосоми можуть бути розділені на п'ять класів: стандартні ліпосоми, ліпосоми, чутливі до рН, катіонні ліпосоми, ліпосоми з імунними властивостями і довго-циркулюючі ліпосоми [23].

Перфторвуглеводні наночастки представляють собою ядро, що складається з рідкого перфторвуглецю і фосфоліпідної оболонки. Розмір цих часток лежить в межах 200-250 нм. Вони нелеткі, біологічно інертні, хімічно стабільні і не піддаються розпаду в організмі. Перфторвуглеводні наночастки використовуються для молекулярної візуалізації знову сформованих пухлинних судин за рахунок взаємодії з білками-інтегринами. Вони є недооціненим інструментом для спостереження клітин, що вводяться в організм з терапевтичною метою [24].

Отже, сьогодні існує кілька видів наночасток: біологічні та біогенні наночастки, полімерні наночастки (поліетиленгліколь, полікапралактон), ліпосоми, вуглецеві наночастки (нанотрубки і наносфери), неорганічні наночастки., що мають металічну, органічну, неорганічну природу.

1.2 Властивості *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae – один з найвідоміших видів дріжджів. Вони здавна використовуються для виробництва вина, сидру, меду, ферментованих соків та овочів, а також – йогуртів, пива та хліба. Нерідко їх так і називають: «пекарські» або «пивні» дріжджі.

Клітини *S. cerevisiae* розмножуються вегетативним шляхом за допомогою брунькування та статевими шляхом в результаті мейотичного поділу диплоїдного ядра дріжджів.

У вегетативному розмноженні — спочатку з'являється виріст на материнській клітині, потім відбувається мітотичний поділ ядра, утворення клітинної стінки і відділення клітин одна від одної. На материнській клітині залишається шрам від брунькування, що дозволяє визначити її вік. Зазвичай материнська клітина може утворювати 20-30 бруньок [25].

У статевому розмноженні утворюються гаплоїдні спори — аскоспори (ендогенні) та споридії (екзогенні). Аскоспори утворюються аскоміцетними дріжджами. Найчастіше в аску (сумці) міститься від 1 до 4-8 спор.

Клітини дріжджів можуть перебувати в одному з двох стабільних станах (фазах): гаплоїдному (сфероїди) і диплоїдному (еліпсоїди), які вважаються різними поколіннями. Протягом кожної фази пекарські дріжджі розмножуються вегетативно брунькуванням. За тривалістю у пекарських дріжджів переважає диплоїдна фаза. Вона переходить в гаплоїдну фазу шляхом утворення гаплоїдних аскоспор в результаті мейозу. Гаплоїдна фаза переходить в диплоїдну шляхом злиття аскоспор гаплоїдних клітин.

В природі дріжджі зустрічаються крім фруктів та овочів, у ґрунті, а в холодну пору року вони здатні зимувати в шлунку різних комах, наприклад, ос (в ШКТ королеви-засновниці колонії) [26].

S. cerevisiae виробляють і накопичують етанол. Він є токсичним для більшості мікробних видів, здатних конкурувати з дріжджами за цукрові сполуки, або справляє на них статичний вплив. Тобто, пригнічує діяльність мікробів, які знаходяться поряд, і таким чином усуває конкуренцію. А після того, як територія стерилізована, тобто, очищена етанолом від більшості конкурентів-сусідів, *Saccharomyces cerevisiae* продовжує споживати вироблений спирт, сприяючи, таким чином, власному зростанню [26].

При замішуванні тіста дріжджі забезпечують спиртове бродіння, в результаті чого утворюються різні речовини, які надають майбутньому хлібові відповідних смакових та ароматичних властивостей. У виробництві вина додавання дріжджів прискорює процес дозрівання напою. Позитивний вплив *Saccharomyces cerevisiae* можуть чинити і на людський організм [26].

Відмінною перевагою дріжджів є здатність виробляти вітаміни, особливо — комплекс вітамінів В. *Saccharomyces cerevisiae* виробляє вітамін В12, а також може засвоювати холестерин (33%), виробляти глутатіон, сидерофор. Дріжджі також здатні до утворення біоплівки на поверхні поживного середовища. Крім того, дослідження вказують на антибактеріальні властивості дріжджів, що належать до

видів *S. cerevisiae* та *S. boulardii*. Вони виявляли антагоністичну активність щодо патогенів людини, таких як *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* та *Enterococcus faecalis*. Також є дані, що штами дріжджів можуть бути активними проти *Staphylococcus aureus*. Деякі дослідники виділили штами з антимікробною активністю проти *Vibrio cholerae* [26].

Отже, дріжджі роду *Saccharomyces* володіють антимікробними властивостями, мають імуномодулюючі властивості, а також здатні синтезувати білки з чужорідних генів, внесених до їх геному.

1.2.1 Біологічна характеристика дріжджів *S. cerevisiae*

Клітини *S. cerevisiae* мають округлу, яйцевидну або еліпсоїдну форму; розмір їх коливається від 2,5 до 10 мкм в ширину та від 4,5 до 21 мкм в довжину. Розмір і форма клітин одного і того ж штаму визначаються генетично і можуть варіюватися в певних межах залежно від умов культивування і наступних операцій отримання комерційних дріжджів (ліофілізація) [27].

Клітини складаються з мікроскопічних (видимих в звичайному мікроскопі при збільшенні в 600-900 разів) і субмікроскопічних, видимих тільки в електронному мікроскопі (збільшення від 15 до 20 тис. раз), структур. Ці структури можна поділити на постійно присутні й такі, що періодично виявляються в клітині. До перших відносяться різні органели — клітинні структури: ядро з ядерцем, мітохондрії, рибосоми, клітинна стінка, цитоплазматична мембрана, ендоплазматичний ретикулум (сітка), апарат Гольджі, лізосоми, хітосоми, глікосоми і цілий ряд інших мембранних структур (рис. 1.3.) [28].

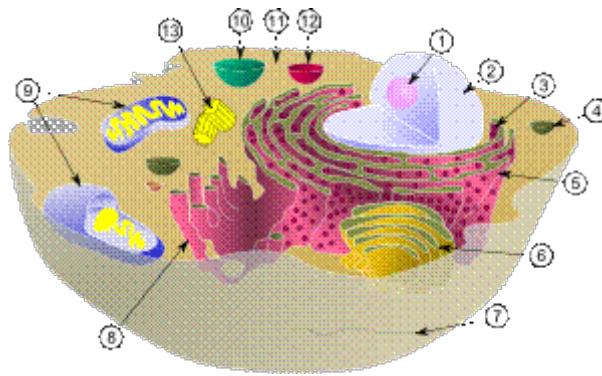


Рис. 1.3. Органели дріжджової клітини:

1 — ядерце; 2 — ядро; 3 — рибосома; 4 — везикула; 5 — шорсткий ендоплазматичний ретикулум; 6 — апарат Гольджі; 7 — цитоскелет; 8 — гладкий ендоплазматичний ретикулум; 9 — мітохондрія; 10 — вакуоль; 11 — цитоплазма; 12 — лізосома; 13 — центріоль і центросома [28]

Всі клітинні органели оточені мембранами. До складу мембран входить велика кількість фосфоліпідів, причому їх вміст як в кількісному, так і в якісному складі визначається природою органели.

Мембрани органел мають тришарову структуру. Вони складаються з ліпідів, білків і невеликої кількості вуглеводів. Ліпіди представлені в основному моно-, ди- і тригліцеридами, гліцерофосфатидами і стеролами — ергостеролу і зімостеролу. Кожна молекула фосфоліпіда складається з гідрофобної та гідрофільної (що притягує воду) частин. Гідрофільні частини молекули знаходяться на зовнішній стороні мембрани, а гідрофобні — на внутрішній. Молекули білка розміщуються на поверхні мембрани або проникають всередину неї (рис. 1.4.).

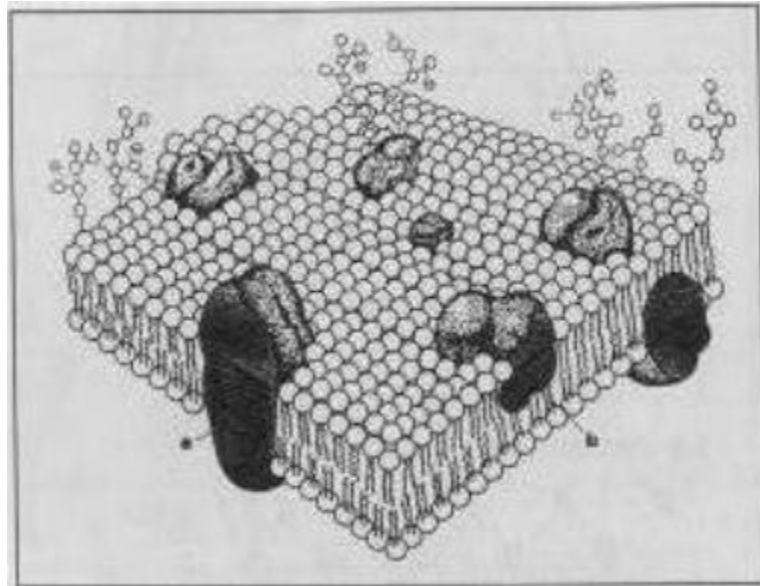


Рис. 1.4. Модель клітинної мембрани (фосфоліпиди і транспортні протеїни) [28]

Непостійні структури — включення — на відміну від органел то виникають, то зникають у процесі життєдіяльності клітин. Будучи продуктами метаболізму клітини, включення відображають різні сторони і етапи її фізіологічної активності. Цими непостійними структурами є внутрішньоклітинні запасні сполуки: жири, глікоген і поліфосфати. Описані включення мають вигляд гранул, кристалів або крапель. Їх можна дослідити за допомогою світлового мікроскопа як без попереднього контрастування барвниками, так і з ним. Так, низькомолекулярні поліфосфати виявляються у вигляді гранул в вакуолях (волютин), жири — у вигляді крапель, глікоген можна побачити при фарбуванні клітин розчином Люголя [29].

Клітинна мембрана відділяє клітинні компоненти від зовнішнього середовища, в той час як ядерна мембрана захищає спадковий матеріал. Як і в інших еукаріотичних організмах, мітохондріальна мембрана бере участь у генерації енергії, в той час як ендоплазматичний ретикулум (ЕР) і апарат Гольджі беруть участь у синтезі ліпідів і модифікації білка [29].

У вакуолі і пероксисомах містяться ферменти та різні метаболіти, пов'язані з функціями травлення. Мікротубулярна структура виконує структурну функцію клітини та забезпечує рух дріжджової клітини. Філаменти актину і міозину

цитоскелету працюють за рахунок використання енергії і дозволяють полярному упорядкуванню клітин під час поділу клітин.

S. cerevisiae має в складі клітинної стінки хітин. Ця стінка запобігає осмотичному пошкодженню, оскільки забезпечує тургор — клітини володіють пластичністю та здатністю виживати при шкідливих умовах навколишнього середовища. Клітинна стінка і мембрана з'єднані периплазматичним простором [29].

Життєвий цикл *S. cerevisiae* аналогічний життєвому циклу більшості соматичних клітин. Можливе існування гаплоїдних і диплоїдних клітин. Розмір клітин гаплоїдних і диплоїдних клітин змінюється залежно від фази росту і штаму в штамі [30].

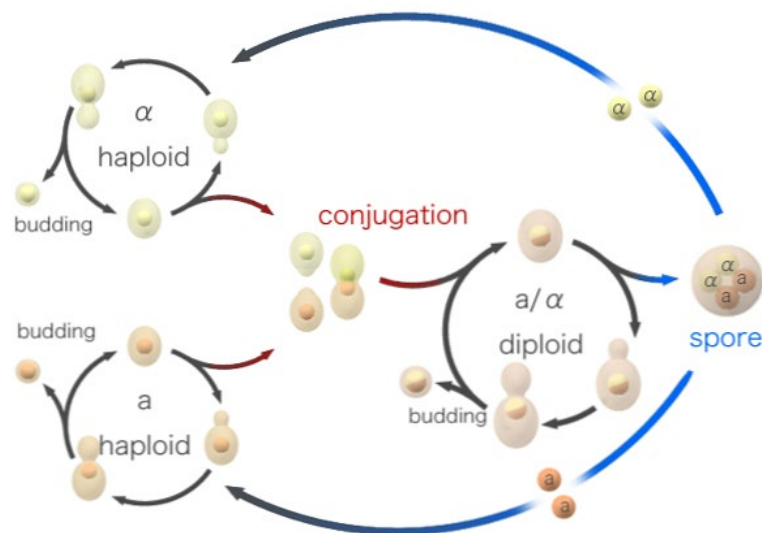


Рис. 1.5. Життєвий цикл *Saccharomyces cerevisiae* [32]

Під час експоненціального росту, культура гаплоїдних клітин відтворюється швидше, ніж у диплоїдних клітин. Гаплоїдні клітини мають бруньки, які формуються поруч з попередніми, а в диплоїдних клітинах вони формуються на протилежних полюсах [32].

Вегетативний ріст відбувається шляхом брунькування, в якому дочірня клітина починає формуватися як відросток на материнській клітині, після чого

відбувається ядерний поділ, утворення клітинної стінки і, нарешті, відділення клітини від материнської.

Кожна материнська клітина може утворювати близько 20-30 бруньок, тому її вік може бути визначений за кількістю рубців на клітинній стінці [32].

Диплоїдні клітини, які ростуть без азоту і без джерела вуглецю, проходять процес мейозу, утворюючи чотири спори (аскаси). Ці спори мають високу стійкість до умов навколишнього середовища і можуть проростати на багатому середовищі. Спори можуть бути спаровими групами a/α або обома, що є аналогом статі у вищих організмах. Обидві клітинні групи виробляють феромоноподібні речовини, які інгібують поділ клітин іншої клітини. Коли ці дві клітинні групи виявляються, кожна з них утворює своєрідний виступ, що при об'єднанні відбувається, врешті-решт, міжклітинний контакт, що виробляє в кінцевому рахунку диплоїдну клітину [32].

Отже, дріжджі одноклітинні організми, які володіються такими характеристиками: *S. cerevisiae* розмножуються брунькуванням і добре ростуть на таких же простих середовищах; здатність до перетворення цукру в етанол і вуглекислий газ здавна використовувалася для виготовлення алкогольних напоїв та хліба.

1.2.2 Застосування *S. cerevisiae* для отримання біотехнологічної продукції

Найчастіше *S. cerevisiae* застосовують у хлібопекарстві та пивоварінні. Дріжджі зумовлюють спиртове бродіння з утворенням безлічі вторинних метаболітів, що обумовлюють смакові і ароматичні якості хліба. Спирт випаровується при випіканні. Крім того, в тісті формуються бульбашки вуглекислого газу, що примушують його «підніматися», і що надають хлібу губчасту структуру і м'якість. Аналогічний ефект викликає внесення до тіста соди і кислоти (зазвичай лимонної), але в цьому випадку не формуються приємні смакові якості.

Борошно зазвичай бідне цукрами, необхідними для бродіння, тому в тісто додають цукор. Для отримання більшої кількості смакових сполук тісто проколюють або перемішують, вивільняючи вуглекислий газ, а потім знову залишають «підніматися» [32].

Пекарські дріжджі вирощують у великих ємностях при інтенсивному перемішуванні й аерації. У ємність подається поживне середовище, основою якої зазвичай служить меляса. Середовище не додається повністю на початку ферментації, а подається порціями через короткі інтервали часу протягом всього процесу ферментації. Якщо додати відразу багато цукру, то дріжджі переключать свій метаболізм на бродіння і вихід дріжджів зменшиться (ефект Кребтрі). По завершенні росту дріжджі концентрують центрифугуванням і потім фільтрують. Утворений осад пресують для отримання пресованих дріжджів, які потрібно зберігати в замороженому стані, або ліофільно висушують [19]. *S. cerevisiae* широко використовується в пивоварінні (разом з деякими іншими видами: *S. carlsbergensis* та *Brettanomyces sp.*). Вони відомі як «дріжджі верхнього бродіння» через те, що зазвичай спливають на поверхню ємності протягом бродіння. Пиво, при виготовленні якого використовувалися дріжджі верхнього бродіння, називається елем, тому ці дріжджі інколи називаються «елевими». Ці дріжджі не в змозі споживати деякі цукри, в результаті чого пиво стає більш солодким та «фруктовим» [34].

1.2.3 Отримання етилового спирту за допомогою *S. cerevisiae*

За допомогою *Saccharomyces cerevisiae* можна отримувати етиловий спирт. Дослідження показали, що одержуваний від використання нового штаму дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* 1039, полягає у підвищенні ефективності спиртового виробництва за рахунок збродження високо центрованого суслу, збільшення виходу спирту, суттєвої економії води на виробництві, значного скорочення виходу після спиртової барди.

Ректифікація — процес поділу бінарних або багатокомпонентних сумішей за рахунок проточного масо- і теплообміну між парою та рідиною. Ректифікацію

проводять в баштових колонних апаратах, забезпечених контактними пристроями — колонах ректифікації, в яких здійснюється багаторазовий контакт між потоками парової та рідкої фаз.

При однорідній ректифікації можна виробляти спирт із концентрацією близько 80%, такий спирт має середньо ринкову вартість. При повторній ректифікації можна отримати високоочищений спирт 98%, який може застосовуватися в медицині [38].

1.2.4 Використання *S. cerevisiae* в якості модельної системи для генної інженерії

Одноклітинні гриби широко використовуються в молекулярній біології та генетиці як модельний об'єкт. *S. cerevisiae* є першими з еукаріот, у яких була повністю секвенована послідовність геномної ДНК. Геном роду *Saccharomyces* складається з 17 хромосом. І в порівнянні з вищими еукаріотами містить всього 5% повторюваної ДНК, а 95% генома представлено унікальними генами. Звідси випливає, що максимальне число генів у дріжджів — не більше 5-7 тисяч.

У 1925 році Г. А. Надсоном і С. Г. Філіпповим були проведені генетичні дослідження, в яких було відкрито радіаційний мутагенез, проведений на модельному об'єкті — дріжджах. У даних дослідженнях вивчалися докази існування чергування поколінь в життєвому циклі дріжджів зі зміною плідності. Вчені виявили, що аскоспори *S. cerevisiae* мають гаплоїдний набір хромосом, а кон'югація, характерна для їх спор або їх нащадків призводить до відновлення диплоїдного набору, характерного для вегетативної стадії сахароміцетів [36].

Завдяки гомологічній рекомбінації у дріжджів можна довільно змінювати будь-яку обрану хромосомну послідовність ДНК. До того ж, можна здійснювати різні маніпуляції з частинами хромосом в складі генетичних мобільних елементів — рекомбінантних плазмід, які містяться в клітинах дріжджів, завдяки включенню в них коротких послідовностей центромер і генів, що регулюють реплікацію ДНК [37].

Арсенал доступних засобів розширився методами аналізу за допомогою мікрочіпів і білкових мереж, які охоплюють весь невеликий геном дріжджів. Дані методи дозволяють проаналізувати транскрипцію, зв'язування факторів транскрипції, модифікації гістонів і білок-білкових взаємодій. Така велика кількість методів дозволила вченим дослідити механізми регуляції формування гетерохроматину і його фізіологічну роль в клітинах дріжджів [38].

Головним відкриттям було — генетична трансформація дріжджів, яка допомогла дослідникам отримати важливий інструмент в методиці клонування генів і генетичній інженерії. Завдяки трансформації були розроблені методи, що ефективно застосовуються для аналізу генної регуляції, а також взаємозв'язку між структурою і функцією білків, структури хромосом і інших важливих питань біології клітини [37].

Дослідження щодо рекомбінантної плазмиди ДНК, забезпечуваної синтезом фібробластного інтерферона людини клітками дріжджів, спосіб її конструювання і штам дріжджів *S. cerevisiae*-«продуцент фібробластного інтерферона людини» відноситься до біотехнології і медичної промисловості і являє собою сконструйовану *in vitro* рекомбінантну плазмідну ДНК, яка забезпечує синтез фібробластного інтерферону людини в клітинах дріжджів *S. cerevisiae*, спосіб конструювання цієї плазмідної ДНК і дріжджовий штам — продуцент фібробластного інтерферона людини, який має цю плазмиду.

Фібробластний інтерферон людини, бета-інтерферон, відноситься до спільної групи еволюційних рідних білків, які отримали назву інтерферони. Утворення інтерферонів стимулюється впливом вірусів на різні групи клітин. Інтерферони здатні активувати противірусні захисні механізми клітини. Клінічні дослідження показали, можливість використання бета-інтерферона для лікування вірусних та аутоімунних захворювань людини [38].

Отже, дріжджі *S. cerevisiae* є дуже перспективними у медицині, біотехнології та генній інженерії, оскільки вони можуть виконувати ряд завдань та вирішувати головні проблеми у здоров'ї людини. Напрямок глибокого вивчення дріжджів тільки починається і має велике майбутнє у застосуванні.

1.3 Використання наночасток у медицині та косметиці

Наноматеріали використовують у багатьох косметичних продуктах, включаючи зволожуючі засоби, засоби для догляду за волоссям, макіяжу та сонцезахисні. Всі найбільші виробники косметики використовують наноматеріали у своїх продуктах [39, 40, 41].

У косметичній медицині на сьогодні відомі два головних напрямки використання нанотехнологій. Перший — застосування наночасток як фільтрів ультрафіолетового (УФ)-випромінювання. Прикладами є діоксид титану (TiO_2) та оксид цинку (ZnO) — це головні складові таких продуктів. Другий напрямок — доставка лікарських і косметичних засобів, для чого використовують ліпосоми, ніосоми, тверді ліпідні наночастки, наноструктуровані ліпідні носії. Також, запропоноване використання нанокристалів, наноемульсій, дендримерів у косметології [44].

Технології наночасток широко застосовують у медицині. Найбільш поширеним класом систем адресної доставки є ліпосоми. Ліпосоми — це штучні сферичні частинки нанорозмірів, які складаються з бішарів фосфоліпідів (фосфатидилхоліну, фосфатидилсерину, фосфатидилетаноламіну), що оточують центральну водну порожнину та самоорганізуються при фазовому переході завдяки амфіфільній структурі ліпідів. Здатність утворювати за певних умов замкнуті сферичні бішари, крім фосфоліпідів, мають дифільні природні та синтетичні сполуки — цераміди, жирні кислоти, лізоліпіди тощо [40, 20].

Кількість мембранних шарів може бути різною, що впливає на розміри і будову ліпосом. Ліпосоми бувають одношарові, розміром 25–50 нм (МОВ — малі одношарові везикули/SUV — small unilamellar vesicles) та >50 нм (ВОВ — великі одношарові везикули/LUV — large unilamellar vesicles); багатошарові (БШВ — багатошарові везикули/MLV — multilamellar vesicles), розміром 100 нм — 3 мкм [40, 41, 42].

У косметичній промисловості вперше ліпосомальні препарати застосовано у 1987–1988 рр. [39, 40, 43]. Нині засоби на основі фосфоліпідних везикул використовують у складі косметичних рецептур живильної, регенеруючої,

зволожуючої дії тощо. У складі живильних і регенеруючих косметичних кремів ліпосоми ефективні як системи доставки біологічно активних речовин (БАР) — вітамінів, мікроелементів, гормонів, рослинних компонентів тощо. Проникаючи у шкіру, везикули переносять та підвищують концентрацію активного інгредієнта в міжклітинному просторі та безпосередньо у клітинах. Ліпосоми підвищують розчинність та доставку малорозчинних у водних і жирових системах речовин, зменшують подразнювальну дію багатьох інгредієнтів препарату [44].

Найбільш поширений фосфоліпід у косметичних ліпосомах — лецитин (фосфатидилхолін). Порівняно з іншими ліпідами лецитин має високий рівень стабільності й легко утворює стійкі везикули, є природним антиоксидантом, підвищує пластичність мембранних клітин. Недостатність фосфоліпиду спричинює в'ялість і виснаження шкіри, порушення її функцій. Використання лецитину у формі ліпосом забезпечує його найвищу біодоступність [45]

Ліпосоми здатні поєднуватися з кератином, створюючи на поверхні шкіри захисний шар, який запобігає втраті води; спрямовано доставляють зволожуючі речовини (багатоатомні спирти, протеїни тощо) у відповідні ділянки шкіри, тому є ефективними інгредієнтами зволожуючих косметичних засобів [40].

Ліпосоми вводять до складу емульсійних та гідрофільних косметичних кремів. Перевага надається гідрофільній (гелевій) основі препарату, оскільки структура ліпосом нестійка і здатна руйнуватися під впливом поверхнево-активних речовин (ПАР) та ліпідів емульсійних систем [40].

Використання ліпосом, неорганічних наночасток з фосфату кальцію та полімерних наночасток для імунізації досягло вже етапу клінічних та доклінічних випробувань. Деякі з нанорозмірних структур вже пройшли випробування та активно застосовуються в медичній практиці.

Ліпосоми є одним з носіїв імунологічно-активних молекул. Наприклад, вакцинацію проти гепатиту А і грипу виконують, застосовуючи препарати, які мають в основі ліпосомальні структури [46, 47].

В імунології часто використовують ад'юванти, що входять до складу вакцин та підвищують їх імуногенність. Відносно новим класом ад'ювантів є наночастки

фосфату кальцію. На їх користь говорить висока біосумісність та можливість легкого отримання на промисловому рівні [48]. Доклінічні дослідження підтверджують, що система, яка містить нанорозмірний фосфат кальцію, викликає позитивну імунну відповідь та може підтримувати більш високий рівень антитіл триваліший час, аніж вакцини, що містять алюміній чи не мають ад'юванту взагалі [49]. Маніпуляції з антиген-презентованими клітинами (наприклад, дендритними) є також однією зі стратегій імунології [50]. В. Соколова зі співавт. синтезували кальцій-фосфатні наночастки, функціоналізовані імунологічно-активними олігонуклеотидами та гемаглютиніном вірусу грипу. Після оброблення такими наночастками дендритних клітин, вони дозрівають та набувають спроможності індукувати вроджений та набутий імунітет [51].

Принципово новою стратегією вакцинації «без шприца» є нановакцинація, яку виконують крізь шкіряний покрив [50]. Внутрішньошкірна імунізація можлива завдяки тому, що епідерміс та дерма мають багато антиген-репрезентуючих клітин та є одним з імунокомпетентних органів [48]. Для такої імунізації були розроблені наночастки з полістерену розміром 40 та 200 нм, які можуть проходити глибоко у волосяний фолікул та досягати перифолікулярних антиген-репрезентуючих клітин [52].

Загалом, нанотехнології є високотехнологічною розробкою, що дозволяє створювати унікальні препарати для лікування соціально-важливих захворювань, засоби імунізації з високими показниками ефективності, косметичні засоби з віддаленим ефектом.

Висновки до розділу 1

S. cerevisiae – один з найвідоміших видів дріжджів, що використовується для виробництва цілого ряду продуктів: вина, сидру, меду, ферментованих соків та овочів, йогуртів, пива та хліба завдяки їх здатності перетворювати цукор в етанол і вуглекислий газ в анаеробних умовах. Ці одноклітинні організми легко розмножуються брунькуванням і добре ростуть на простих середовищах, що робить їх надзвичайно зручними у використанні як в харчових технологіях, так і в інших галузях. Рекомбінатні технології дозволили використовувати дріжджі для синтезу білків фармацевтичного значення, зокрема фібробластного інтерферону людини — бета-інтерферону.

Серед існуючих біогенних наночасток можна виділити ферменти (білки з каталітичною активністю), молекули ДНК і РНК, рибосоми, клітинні везикули, віруси. Важливою особливістю біогенних наночасток є їх здатність до агрегації і самоорганізації, що робить привабливим їх використання для живих об'єктів, в тому рахунку для людини. Останні дослідження описують можливість синтезу металічних наночасток за допомогою живих об'єктів.

Сучасне застосування наночасток більше всього стосується розробок медицини та косметології. Серед популярних розробок можна виділити застосування наночасток як фільтрів УФ-випромінювання та у доставці лікарських і косметичних засобів. Також, можна виділити окремий кластер наночасток, що розглядаються як ефективна та доступна альтернатива антивірусним та антибактеріальним препаратам.

РОЗДІЛ 2

ОБ’ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика об’єкту дослідження *Saccharomyces cerevisiae*

В роботі використали штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995 та *Saccharomyces cerevisiae* Y-530 надані для наукових досліджень Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Штами належать до Української колекції мікроорганізмів.

Також, для порівняння ми використали в роботі дріжджі інших родів: *Kluyveromyces marxianus* Y-1524, *Pichia anomala* Y-219 та *Zygosaccharomyces rouxii* Y-2475. Дані культури належать до Української колекції мікроорганізмів та були надані Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

2.1.1 Таксономічний статус *S. cerevisiae*

S. cerevisiae — вид одноклітинних мікроскопічних (5-10 мкм у діаметрі) грибків (дріжджів) з класу *Saccharomycetes*, що широко використовується у виробництві алкогольної та хлібопекарської продукції, а також у наукових дослідженнях [44].

Таксономічний статус *Saccharomyces cerevisiae*:

Надцарство: Еукаріоти (*Eukaryota*)

Царство: Гриби (*Mycota*)

Відділ: Аскоміцети (*Ascomycota*)

Клас: Сахароміцети (*Saccharomycetes*)

Родина: Сахароміцетові (*Saccharomycetaceae*)

Рід: Сахароміцес (*Saccharomyces*)

Вид: *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.2 Морфолого-культуральні властивості *S. cerevisiae*

S. cerevisiae має клітини овальної форми, 5-10 мкм в діаметрі. Клітини *S. cerevisiae* утворюють аскоспори (ендогенні спори). В аску (сумці) міститься від 1 до 4-8 спор.

Характерний безстатевий (брунькування) та статевий шляхи розмноження дріжджів *S. cerevisiae*. У статевому процесі з нормальної диплоїдної клітини (клітина з двома наборами хромосом і відповідно з двома наборами генів) шляхом мейозу утворюється аск, який містить чотири гаплоїдні аскоспори (клітини з одним набором хромосом і одним набором генів). Аскоспори бувають двох типів спарювання: α і a . Брунькуванням клітини кожного типу можуть утворювати інші гаплоїдні клітини. Внаслідок спарювання гаплоїдних клітин α і a утворюється нормальна диплоїдна клітина α/a . Гаплоїдні клітини одного типу також можуть випадково спарюватись, утворюючи аномальні диплоїдні клітини (a/a або α/α), які розмножуються тільки звичайним безстатевим шляхом — брунькуванням [55].

S. cerevisiae на рідких середовищах викликають помутніння, здатні до газоутворення та піноутворення. Після закінчення бродіння середовище стає більш прозорим, дріжджі осідають на дно, утворюючи щільний осад жовтувато-білого кольору. Плівка на поверхні середовища не розвивається.

На поверхні щільного поживного середовища мікроорганізми можуть рости у вигляді окремих колоній та суцільним газоном. Штрих на косому сусло-агарі опуклий, з рівними краями, із соковитою консистенцією, жовтувато-білого кольору, маслянистий. На сусло-агарі формуються колонії круглої форми діаметром 0,5-1 см з опуклим центром і рівними краями жовтувато-білого кольору [56].

Дріжджі *S. cerevisiae* ростуть на простих цукровмісних середовищах, наприклад меляса, відходи цукрового виробництва, крохмального виробництва. Стандартизованими середовищами, на яких вирощують дріжджі є сусло-агар (солодовий екстракт 15 г/л, пептон 0,78 г/л, мальтоза 12,75 г/л, декстрин 2,75 г/л, гліцерил 2,35 г/л, фосфат калію 1 г/л, хлорид амонію 1 г/л, агар 15 г/л, рН 4.8), середовище Чапека (сахароза 30 г/л, нітрат натрію 2 г/л, калій гідро фосфат 1 г/л,

магній сульфат 1 г/л, калій хлорид 0,5 г/л, сульфат заліза 0,01 г/л, агар-агар 15 г/л) та середовище Сабуро (гідролізат казеїну 5 г/л, пептичний перевар тваринної тканини 5 г/л, глюкоза 40 г/л, хлорамфенікол 0,05 г/л, агар-агар 15 г/л, рН: 5,6.).

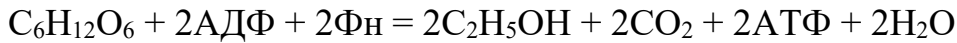
2.1.3 Фізіолого-біохімічні властивості культури *S. cerevisiae*

S. cerevisiae є факультативним анаеробом, який може однаково добре рости аеробно і анаеробно в присутності глюкози [57]. В анаеробних умовах, коли дихання не може врахувати окислення NADH, повторне окислення NADH досягається шляхом відновлення дигідроксиацетонфосфату до гліцерину. Це специфічна адаптація: експресія GPD2, яка кодує ізоформу гліцерол-3-фосфатдегідрогенази, стимулюється в анаеробних умовах, що призводить до підвищення здатності до виробництва гліцерину [58, 59].

Гліколіз – це процес перетворення глюкози в піруват і утворення невеликої кількості АТФ (енергії) і НАДН (відновлювальної сили). Це центральний шлях, який виробляє важливі метаболіти-попередники: шестивуглецеві сполуки глюкози-6Р і фруктози-6Р і тривуглецеві сполуки гліцерону-Р, гліцеральдегід-3Р, гліцерат-3Р, фосфоенолпіруват і піруват. Ацетил-КоА, інший важливий метаболіт-попередник, утворюється шляхом окисного декарбоксілювання пірувату. Коли гени ферментів цього шляху досліджуються в повністю секвенованих геномах, стадії реакції трьохвуглецевих сполук від гліцерону-Р до пірувату утворюють законсервованій основний модуль, який зустрічається майже в усіх організмах і який іноді містить оперонні структури в бактеріальних геномах. Глюконеогенез — це шлях синтезу глюкози з не вуглеводних попередників. По суті, це зворотний процес гліколізу з незначними змінами альтернативних шляхів.

Дріжджі *S. cerevisiae*, які знаходяться в середовищі для бродіння, тобто в суслі яке містить такі моносахариди як глюкоза та фруктоза, можуть використовувати готові цукри сусла, для перетворення цих цукрів на інші. Наприклад, метаболізм *S. cerevisiae* дозволяє виробляти етанол та інші сполуки під час бродіння виноградного сусла у вино. Після того, як цукор розщеплюється на

моносахариди, дріжджі можуть використовувати їх у подальших реакціях. Сумарне рівняння спиртового бродіння: [60, 61]



Основний процес бродіння можна розглянути нижче (Рис. 2.1)

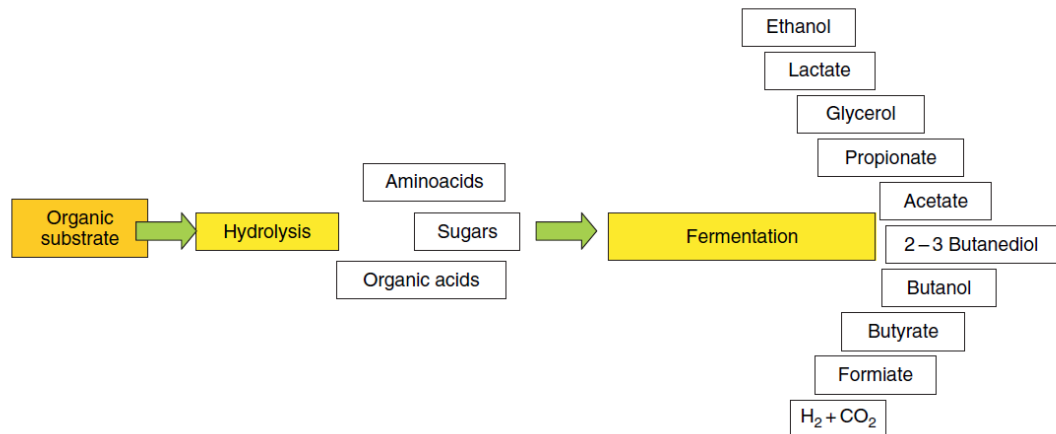


Рис. 2.1. Основні етапи процесу ферментації [62]

Спиртове бродіння здійснюють дріжджі та деякими іншими грибами та бактеріями. Перший етап спиртового бродіння включає піруват, на наступному етапі піруват декарбоксилюється до ацетальдегіду в реакції, яка каталізується ферментом піруватдекарбоксилазою.

Окисно-відновний баланс спиртового бродіння досягається регенерацією NAD^+ під час відновлення ацетальдегіду до етанолу, що каталізується спиртдейдрогеназою. Вихід АТФ від спиртового бродіння становить 1 або 2 моль АТФ на моль глюкози. За особливих умов бродіння ферментуючі дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* можуть ферментувати цукор з утворенням гліцерину наприклад, ацетальдегід, оцтову кислоту, ацетоїн, 2,3-бутандіол і бурштинову кислоту, всі сполуки, які можна отримати з пірувату [62].

Зазвичай клітини пекарських дріжджів мають розміри: 9-11 мкм — довжина; 6-8 мкм — ширина. Їхні форми бувають: округла, еліпсоїдна чи яйцеподібна. Та в загальному їх форма і розміри залежать від фізіологічного стану та умов культивування.

Дріжджі досить вимогливі до умов живлення. В анаеробних умовах дріжджі можуть використовувати як джерело енергії тільки вуглеводи, причому в основному гексози і побудовані з них олігосахариди. Наприклад *Saccharomyces cerevisiae* використовують вуглець із різних органічних сполук: глюкози, фруктози (Д-форми), манози, галактози, *Saccharomycopsis fibuliger* здатні зброджувати крохмаль, *Kluuveromyces fragilis* — інулін. В аеробних умовах круг засвоєваних субстратів ширший: окрім вуглеводів в нього входять також жири, вуглеводні, ароматичні та одновуглеводні з'єднання, спирти, органічні кислоти. В анаеробних умовах дріжджі засвоюють фосфор головним чином у початковий період збродження - 80-90% від максимальної кількості у дріжджах [63].

У присутності кисню (аеробіоз) та поживних речовин (цукрів) дріжджі споживають O₂ та глюкозу, виробляючи CO₂, воду та тепло. Енергія, вироблена дріжджами споживається їхнього відтворення. Цю реакцію використовують виробники дріжджів, виробляючи дріжджі.

За відсутності кисню (анаеробіоз) - дріжджі блукають. Дріжджі трансформують глюкозу в:

- CO₂;
- спирт;
- смако-ароматичні речовини;
- невелика кількість тепла.

Зазвичай рівень рН тримають від 4,5 до 6. Для хлібопечення тримають рівень рН біля 5,6 [64]. Цей рівень впливає на дисоціацію кислот і основ, що в свою чергу впливає на перенесення поживних речовин всередину клітини, а також на ступінь токсичності інгібіторів росту. Також може впливати на конформацію молекул ферментів і змінювати як первинний, так і вторинний метаболізм дріжджів.

По відношенню до температури дріжджі є мезофілами - оптимальна температура їх розвитку 25-30°C. Вища температура стимулює розвиток дріжджів виду *Torulopsis sphaerica* і дріжджів, що не зброджують лактозу [65]. Температура впливає на синтез вторинних метаболітів, ріст та розмноження дріжджів. Наприклад якщо температура знаходиться біля 4°C, тоді бродіння повністю

призупинено, від 10°C до 20°C градусів відбувається сповільнене бродіння, біля 30°C та 40°C відбувається прискорене бродіння, при 45°C активність бродіння призупиняється та при подальшому підвищенню температури відбувається розпад дріжджів.

2.2 Характеристика предмету дослідження.

Предмет дослідження — антибактеріальна дія наночастинок срібла, отриманих біогенним синтезом. Для оцінки антибактеріальної були використані такі штами бактерій: референтний штам колекції типових культур *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 та шпитальний ізолят *Staphylococcus aureus* 1560, вирощені на поживному агарі (СПА). В роботі досліджували бактерицидну дію на добових культурах *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* 1560.

2.3 Методика синтезу наночастинок з використанням культури *Saccharomyces cerevisiae*

Методика біосинтезу наночастинок з використанням живих об'єктів полягає у тому, що при культивуванні клітин у присутності солі металу відбуваються метаболічні процеси, що дозволяють природнім шляхом стабілізувати наночастки у водній фазі. Для синтезу наночастинок срібла в роботі використали штами *S. cerevisiae* Y-1995 та Y-530, а також дріжджі інших родів *K. marxianus* Y-1524, *P. anomala* Y-219 та *Z. rouxii* Y-2475.

Всі штами вирощували на твердому агаризованому середовищі Чапека-Докса з глюкозою (склад: глюкоза 30 г/л, мікробіологічний агар 14г/л, калій азотнокислий 2 г/л, дигідрофосфат калію 1 г/л, натрію хлорид 0,5 г/л, магнію сульфат 0,5 г/л, заліза сульфат 0,01 г/л) протягом 5 діб у термостаті при температурі 26°C в чашках Петрі. Вирощувані дріжджі формували щільний моношар клітин на поверхні середовища. Культури змивали з середовища 20%-м розчином глюкози та розводили до досягнення оптичної щільності 1,0-1,5 ОО. Контроль оптичної густини проводили з використанням УФ-спектрофотометра при довжині хвилі 620 нм.

В якості джерела формування наночастинок використали нітрат срібла. Готували матричний розчин нітрату срібла з концентрацією 10 мМ (2г/л AgNO_3). Для цього 0,03 г AgNO_3 розчиняли в дистильованій воді, після чого проводили холодну стерилізацію за допомогою фільтрування через бактеріальний фільтр з розміром пор 0,22 мкм. Робоча концентрація AgNO_3 , що використовувалася для синтезу наночастинок склала 1 мМ.

Синтез наночастинок срібла проводили у флаконах в присутності 1 мМ AgNO_3 протягом 5 діб на роторній мішалці при 26°C та 130 об/хв. Після закінчення інкубації, всі дослідні зразки центрифугували при 3000 об/хв. протягом 15 хв. Супернатанти фільтрували через фільтр з розміром пор 0,8 мкм, а потім через бактеріальний фільтр з розміром пор 0,22 мкм та використовували для подальших досліджень.

Отримані осади використали для отримання дріжджових лізатів. Для цього, в кожний флакон додавали дистильовану воду в об'ємі 4800 мкл та розчин хімотрипсину в об'ємі 200 мкл (фінальна концентрація хімотрипсину 0,4 г/л). Після цього розчини інкубували при температурі +4°C (і холодильнику) протягом 2 діб. Після закінчення інкубації, всі дослідні зразки центрифугували при 3000 об/хв. протягом 15 хв. Дріжджові лізати фільтрували через фільтр з розміром пор 0,8 мкм, а потім через бактеріальний фільтр з розміром пор 0,22 мкм та використовували для подальших досліджень.

2.4 Спектрофотометричний аналіз зразків супернатантів та дріжджових лізатів на наявність наночастинок срібла

Для аналізу отриманих зразків на наявність наночастинок срібла використали УФ-спектрофотометр DS-11 FX+. Вимірювали оптичну густина зразків в діапазоні хвиль від 400 нм до 480 нм з кроком в 10 нм. Як контроль використовували 20%-й розчин глюкози. Обраний діапазон хвиль зумовлений тим, що пік спектру плазмонного резонансу наночастинок срібла знаходиться в межах 410-430 нм. Отримані результати були використані для побудови графіків залежності оптичної густини зразків від довжини хвилі.

Перед виконанням вимірювання дотримувалися правил експлуатації приладу та провели калібрування приладу за допомогою функції автокалібрування.

2.5 Дослідження антибактеріальної активності синтезованих наночастинок срібла

Для аналізу антибактеріальної активності наночастинок срібла, отриманих біогенним синтезом використали референтний штам колекції типових культур *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 та шпитальний ізолят *Staphylococcus aureus* 1560, вирощені на поживному агарі (СПА). В роботі досліджували бактерицидну дію на добових культурах *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* 1560. Для цього, в 96-лункову плати вносили зразки супернатантів та дріжджових лізатів в об'ємі 50 мкл, після чого вносили 100 мкл добових культур в рідкому середовищі СПА. В лунки з контролем замість зразків вносили по 50 мкл фізіологічного розчину. Плати інкубували в термостаті при $+37^{\circ}\text{C}$ протягом доби.

Наступним етапом було вимірювання оптичної густини за допомогою плашкового рідеру зрізків при довжині хвилі 620 нм. Для представлення результатів було вираховано відсоток живих клітин відносно контролю. Після цього, з чашок відбирали над осад та фарбували адгезовані клітини за допомогою кристалічного фіолетового. Для цього, в кожен лунку додавали по 50 мкл спиртового розчину кристалічного фіолетового, після 20 хвилинної інкубації, відбирали непрореагований фарбник. Плати висушували при кімнатній температурі протягом доби, розчиняли фарбник, що адсорбувався на адгезованих клітинах 70%-м розчином етанолу та аналізували за допомогою плашкового рідеру при довжині хвилі 570 нм. Для представлення результатів було вираховано відсоток живих клітин відносно контролю.

2.6 Статистичний аналіз

В роботі, всі результати представлені у вигляді медіани та інтерквартильного розкиду. Для обробки результатів було використано програмне забезпечення Microsoft Office Excel Professional Plus 2021.

Для оцінки правильності нульової гіпотези застосовували непараметричні методи статистичного аналізу. Для малих вибірок значень, таких, як ми отримали в роботі, використали статистичний метод порівняння залежних пар Вілкоксона. Для проведення статистичного аналізу використали програмне забезпечення STATISTICA, version 8.0 (StatSoft, Inc. 1984-2007).

Висновки до розділу 2

В роботі використали штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Y-1995, *Saccharomyces cerevisiae* Y-530, *Kluyveromyces marxianus* Y-1524, *Pichia anomala* Y-219 та *Zygosaccharomyces rouxii* Y-2475 надані для наукових досліджень Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Штами належать до Української колекції мікроорганізмів.

Клітини *S. cerevisiae* мають овальну форму, 5-10 мкм в діаметрі. Вони утворюють аскоспори з 1 до 4-8 спор. Ростуть на рідких та твердих середовищах, наприклад сусло-агар, бульйон Сабуро, середовище Чапека. На рідких середовищах викликають помутніння, на поверхні щільного поживного середовища утворюють колонії круглої форми діаметром 0,5-1 см з опуклим центром і рівними краями жовтувато-білого кольору.

Бактерицидну дію наночасток срібла визначали на референтному штамі колекції типових культур *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 та шпитальному ізоляті *Staphylococcus aureus* 1560, вирощені на поживному агарі (СПА).

Зелений синтез проводили на описаних штаммах дріжджів в 20%-му розчині глюкози. Наночастки виділяли в складі супернатантів та дріжджових лізатів. Для дослідження відповідності синтезованих з'єднань срібла плазмонному резонансу наночасток срібла використали УФ-спектрофотометрію. Бактерицидну дію та вплив на здатність бактеріальних клітин до адгезії визначали стандартними мікробіологічними методами.

Всі дослідження проводили з використанням сучасних та робочих методів. Всі результати є достовірними, оскільки був проведений відповідний статистичний аналіз.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Синтез наночасток срібла біогенним способом

Для контролю за формуванням наночасток срібла проводили візуальний аналіз зміни кольору середовища культивування дріжджів. Після 5-денної інкубації флаконів дріжджів *S. cerevisiae* Y-1995 та *S. cerevisiae* Y-530 з 1 мМ розчином AgNO_3 спостерігали зміну кольору середовища 20%-ї глюкози з прозорого кольору на темно-коричневий (див. Рис. 3.1).

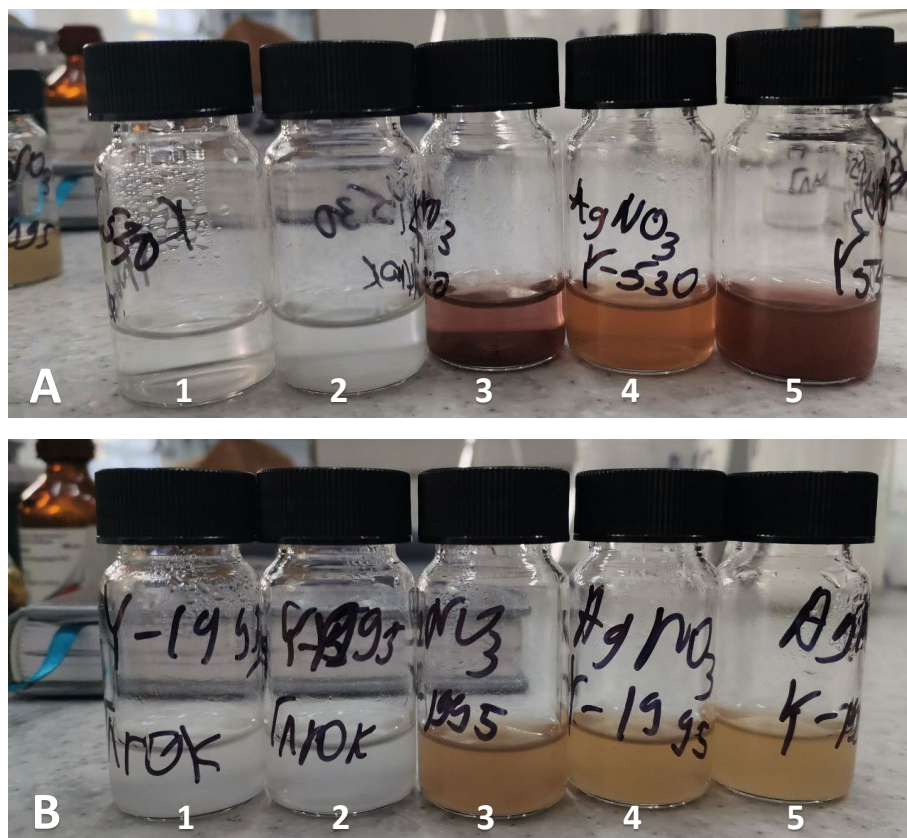


Рис. 3.1. Забарвлення флаконів після 5-денної інкубації при 26°C при 130 об/хв. А — *S. cerevisiae* Y-530; В — *S. cerevisiae* Y-1995. 1, 2 — контроль без додавання AgNO_3 . 3, 4, 5 — зразки з додаванням 1 мМ AgNO_3 .

Зміна забарвлення дослідних зразків може свідчити про формування наночасток срібла. Проте цю теорію необхідно підтвердити аналізом УФ-спектрів.

Подібні результати були отримані і для інших досліджуваних дріжджів: *K. marxianus* Y-1524, *P. anomala* Y-219 та *Z. rouxii* Y-2475 (див. Рис. 3.2).

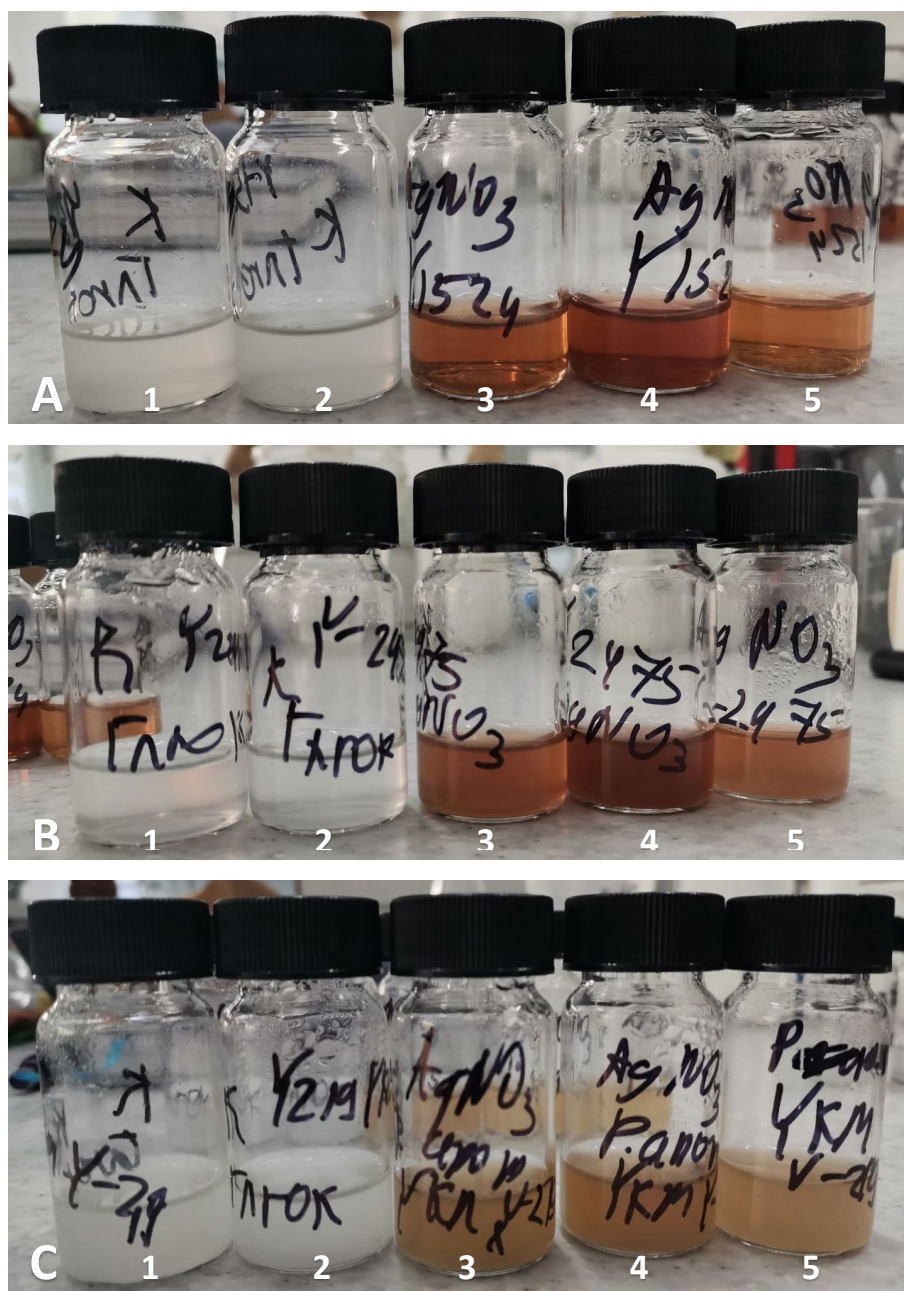


Рис. 3.2. Забарвлення флаконів після 5-денної інкубації при 26°C при 130 об/хв. А — *K. marxianus* Y-1524; В — *Z. rouxii* Y-2475; С — *P. anomala* Y-219. 1, 2 — контроль без додавання AgNO_3 . 3, 4, 5 — зразки з додаванням 1 мМ AgNO_3 .

Зміна забарвлення середовища культивування після 5-денної інкубації при 26°C та 130 об/хв. корелює з результатами схожих досліджень. Наприклад, стандартний штам *S. cerevisiae* вирощували в рідкому середовищі, що містить

мінеральну сіль; потім його піддавали впливу 2 мМ AgNO₃. Відновлення іонів Ag⁺ до металевих наночастинок було практично досліджено шляхом спостереження за зміною кольору розчину, який через 72 години перетворився на червонувато-коричневий [66]. В іншому дослідженні проводили синтез на дріжджовому екстракті *S. cerevisiae*. Синтез проводили з 10 мМ AgNO₃ при кімнатній температурі. Утворення наночастинок також було виявлено візуально за поступовою зміною кольору суміші то темно-коричневого та темно-червоного кольору [67]. Отже, за зміною забарвлення дослідних розчинів ми можемо зробити висновок, що в розчинах відбуваються метаболічні процеси, що призводять до утворення наночастинок срібла. Проте, для підтвердження даних результатів треба провести додаткове дослідження зразків за допомогою УФ-спектроскопії.

3.2 Аналіз утворення наночастинок срібла за допомогою УФ-спектроскопії.

Для того, щоб встановити, чи наявні в отриманих зразках супернатантів та дріжджових лізатів наночастинок срібла, необхідно провести спектрофотометричне дослідження зразків. Оскільки, очікуваний пік наночастинок має бути в діапазоні 410-430 нм, то для роботи з спектрофотометричним обладнанням був обраний діапазон хвиль від 400 нм до 560 нм. Вибір цього діапазону також зумовлений тим, що середовищем, на якому проходив синтез, виступав 20%-й розчин глюкози, який може вступати в реакцію з метаболітами дріжджів і давати піки в діапазоні значень 520-530 нм.

При аналізі спектрів поглинання зразків, отриманих з супернатанту та дріжджового лізату штамів *S. cerevisiae* Y-530 та *S. cerevisiae* Y-1995, було встановлено, що більші спектри поглинання мають зразки, отримані із супернатантів (див. Рис. 3.3).

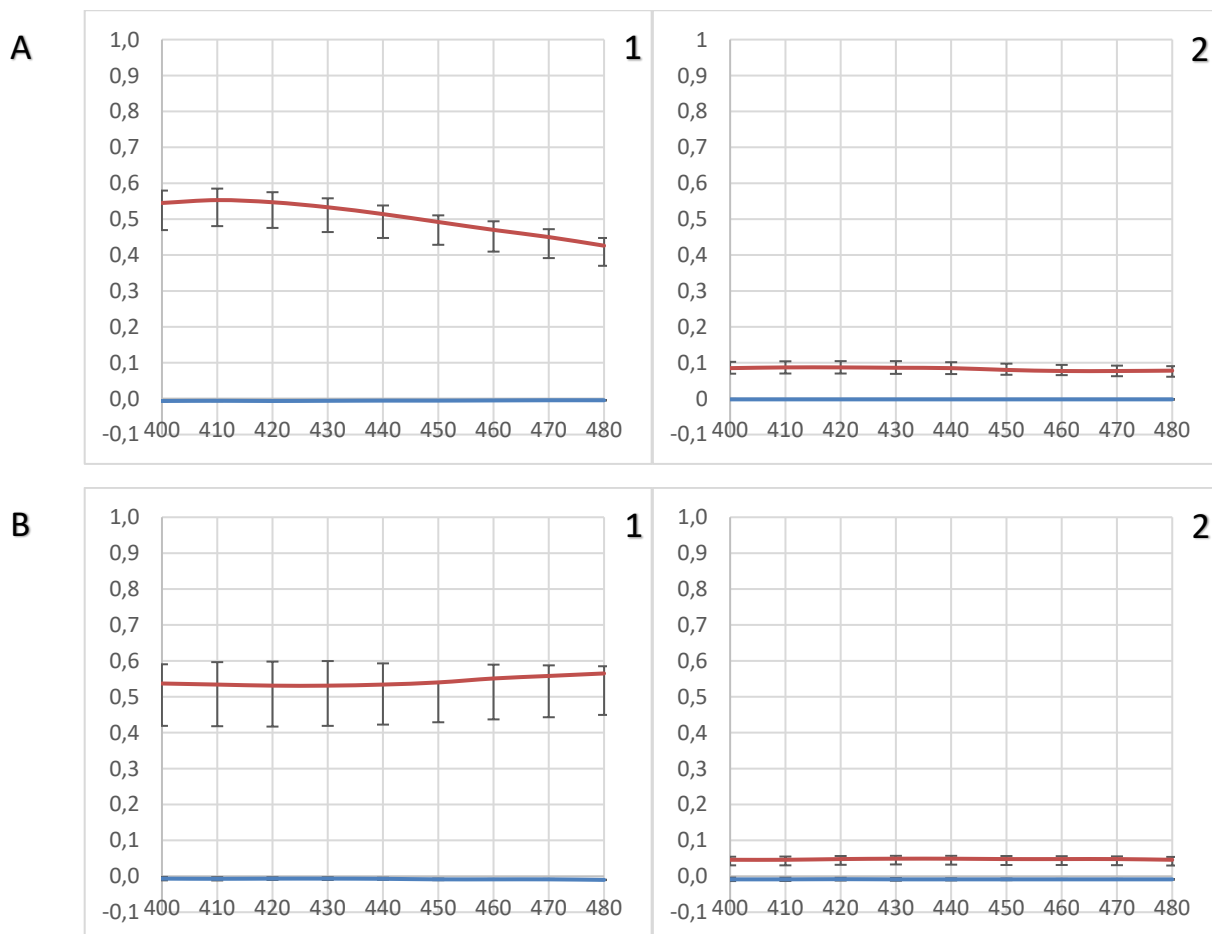


Рис. 3.3. Спектри поглинання зразків: А — *S. cerevisiae* Y-1995; В — *S. cerevisiae* Y-530. 1 — супернатант. 2 — дріжджовий лізат. Червоним кольором позначено спектри зразків з додаванням AgNO_3 , синім — контроль.

Отримані результати вказують на те, що при використанні супернатантів можна отримати більше концентрацію наночастинок, ніж при використанні дріжджового екстракту. Іншими словами, наночастки формуються саме в ході життєдіяльності дріжджів. А от всередині клітин дріжджів, наночастки срібла не формуються, що не виключає можливості формування інших агрегатів та сполучень срібла.

Пік поглинання для супернатанту *S. cerevisiae* Y-1995 складає 410 нм. Для зразку *S. cerevisiae* Y-530 пік поглинання встановити неможливо.

При дослідженні спектрів поглинання зразків, отриманих з використанням штамів дріжджів *K. marxianus* Y-1524, *P. anomala* Y-219 та *Z. rouxii* Y-2475, було

отримано результати, що співвідносяться з використанням штамів *S. cerevisiae* Y-1995 та Y-530 (див. Рис. 3.4).

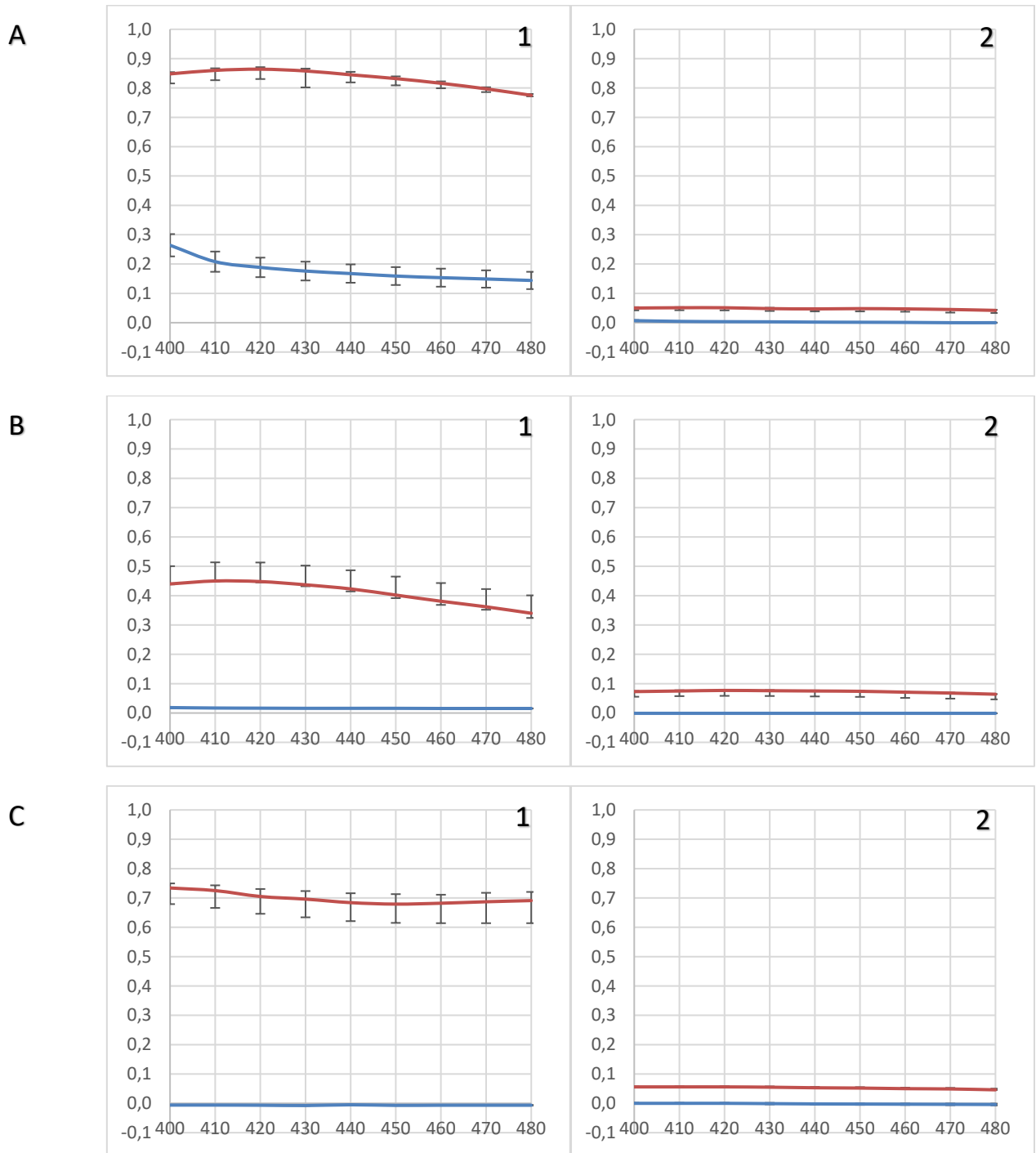


Рис. 3.4. Спектри поглинання зразків: А — *K. marxianus* Y-1524, В — *P. anomala* Y-219; С — *Z. rouxii* Y-2475. 1 — супернатант. 2 — дріжджовий лізат. Червоним кольором позначено спектри зразків з додаванням AgNO_3 , синім — контроль.

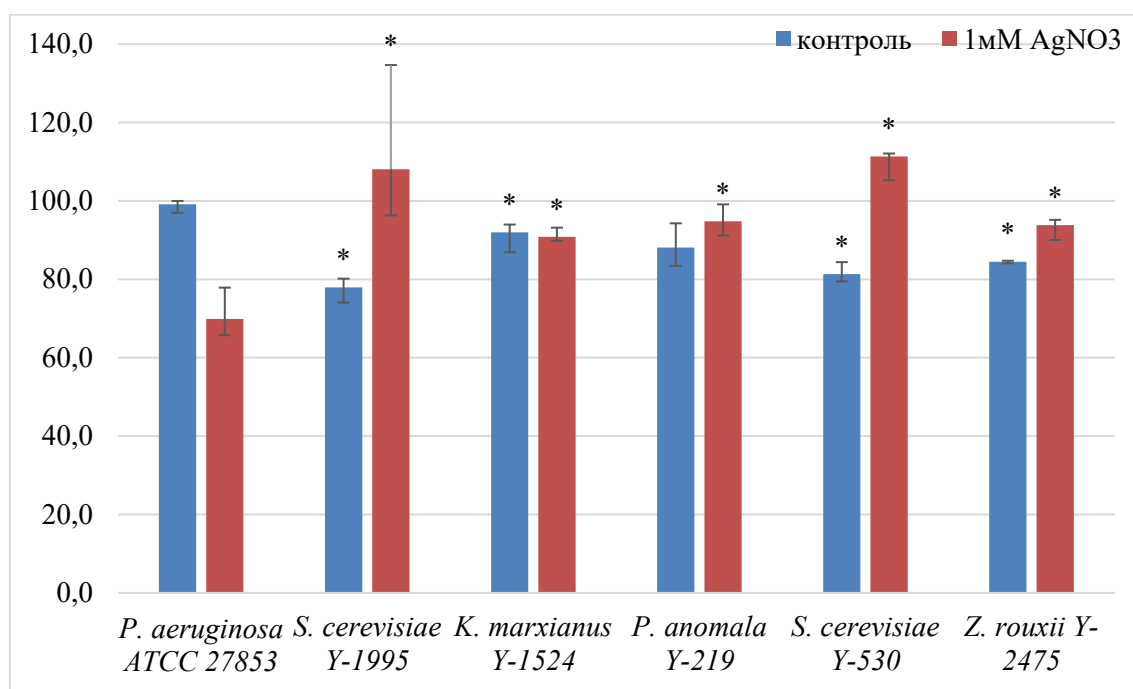
Результати досліджень спектрів зразків з використанням *K. marxianus* Y-1524, *P. anomala* Y-219 та *Z. rouxii* Y-2475 вказують на те, що в супернатанті формування наночасток йде активніше, ніж в дріжджовому лізаті. Пік поглинання зразків супернатанту для штамів *K. marxianus* Y-1524 та *P. anomala* Y-219 становить 420 нм. Для зразку супернатанту *Z. rouxii* Y-2475 пік поглинання встановити не вдалося.

Зелений синтез наночасток проводять не лише на дріжджах, а й на бактеріях, грибах та рослинах. Проте, пік поглинання синтезованих наночасток знаходить у межах 400-430 нм для всіх методів синтезу. Так, наночастки срібла, отримані шляхом біосинтезу з використанням дріжджового екстракту як відновника, мають пік поглинання на 400 нм [68]. В іншому дослідженні наночастки були отримані з екстракту *Rumex hymenosepalus*, рослини, широко поширеної у регіоні Північної Америки. Пік поглинання цих наночасток становить 425 нм, що відповідає поглинанню поверхневого плазмового резонансу для наночасток срібла [69]. Інша робота описує синтез наночасток срібла штамом дріжджів *Saccharomyces Sp.* BDU-XR1, який був виділений із йогурту, який використовується в Азербайджані. Відзначено пік спектру поглинання наночасток в діапазоні 410–420 нм за допомогою УФ-спектрофотометра [70]. В наших дослідженнях, ми отримали наночастки з піком поглинання на 410 та 420 нм, що повністю відповідає дослідженням в цій галузі. Це дає нам змогу зробити висновок, що ми отримали за допомогою штамів *S. cerevisiae* Y-1995, *K. marxianus* Y-1524 та *P. anomala* Y-219 наночастки срібла.

3.3 Антибактеріальна дія наночасток срібла, отриманих зеленим синтезом з використанням дріжджів

Антибактеріальну активність отриманих зразків дріжджових лізатів і супернатантів визначали в два етапи. Першим етапом було визначення бактерицидної дії, результати якої були враховані з використанням планшетного рідеру. Другим етапом визначення антибактеріальної дії було встановлення впливу отриманих зразків на здатність тестових бактеріальних культур до адгезії на

лабораторному пластику (96-лунковій платі). Зафіксовані та пофарбовані клітини в плашках піддавали екстракції фарби 70%-м розчином спирту. Результати також було підраховано за результати оптичної густини зразків за допомогою плашкового рідеру. При дослідженні антибактеріальної дії наночасток, отриманих з лізатів дріжджів, було встановлено, що дані зразки не проявляють антибактеріальної дії (див. Рис. 3.5). Навпаки, в середньому на 35,6 % вони викликають збільшення кількості бактеріальних клітин.



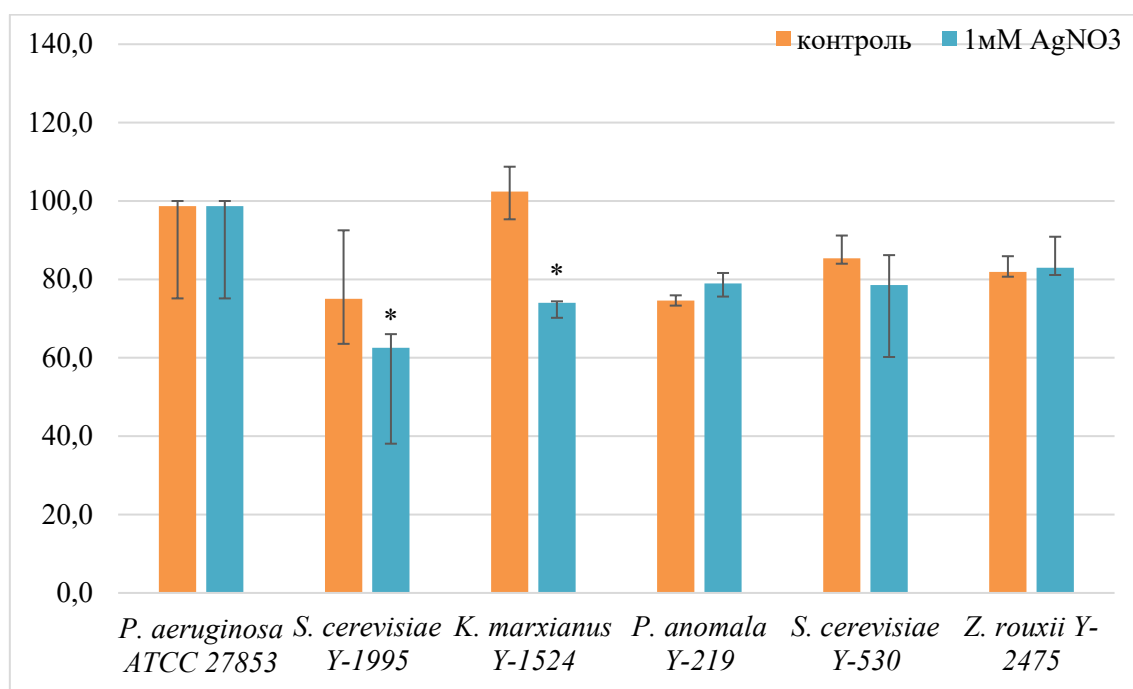
$p \leq 0,05$

Рис. 3.5. Антибактеріальна дія наночасток срібла, отриманих з дріжджових лізатів проти штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853

Враховуючи той факт, що при перевірці впливу дріжджових лізатів, в які не було додано 1 мМ AgNO₃, відбувалось в середньому зменшення кількості клітин штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 на 14,8 %, то індукуючий вплив дослідних зразків зумовлений саме присутністю з'єднань срібла в дріжджових лізатах. Важливо відмітити, що збільшення відсотку живих клітин в зразках, які були відібрані від дріжджових клітин, що субкультивувалися з 1 мМ AgNO₃ є достовірно більшими

від референтного контролю впливу вихідної для синтезу речовини — 1 мМ нітрату срібла.

Інші результати були отримані при дослідженні антибактеріальної активності супернатантів, відібраних від зразків дріжджів, що культивувалися з 1 мМ AgNO_3 (Рис. 3.6). Наночастки, отримані із супернатантів дріжджів *S. cerevisiae* Y-1995 та *K. marxianus* Y-1524 проявляли антибактеріальну активність проти *P. aeruginosa* ATCC 27853 — зменшення відсотку живих клітин на 36,6 5 та 25,0 5 відповідно в порівнянні з контролем 1 мМ AgNO_3 .



$p \leq 0.05$

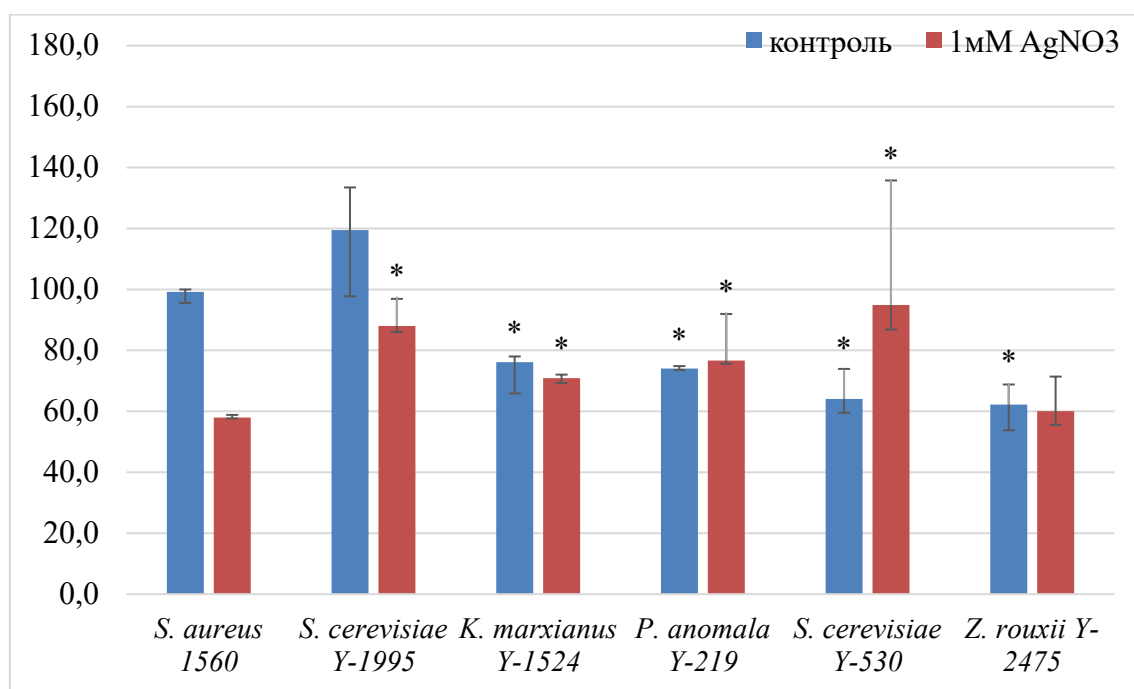
Рис. 3.6. Антибактеріальна дія наночастинок срібла, отриманих з супернатантів проти штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853

На даний момент, можна зробити висновок, що наночастки, отримані із супернатантів *S. cerevisiae* Y-1995 та *K. marxianus* Y-1524 проявляють антибактеріальну дію проти штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Наступним етапом було дослідити антибактеріальну дію дріжджових лізатів і супернатантів проти іншого штаму *S. aureus* 1560. При аналізі впливу дріжджових

лізатів на штам *S. aureus* 1560 дріжджових лізатів не було встановлено антибактеріальної дії (Рис. 3.7).

На відміну від результатів, отриманих на штамі *P. aeruginosa* ATCC 27853, і дріжджові лізати, отримані від клітин що культивувалися з 1 мМ AgNO₃, і контрольні клітини підвищували густину бактеріальних клітин в середовищі СПА. Таким чином, можна говорити про стимулюючу дію дріжджових лізатів і наночасток, що утворилися внаслідок метаболізму дріжджових клітин.

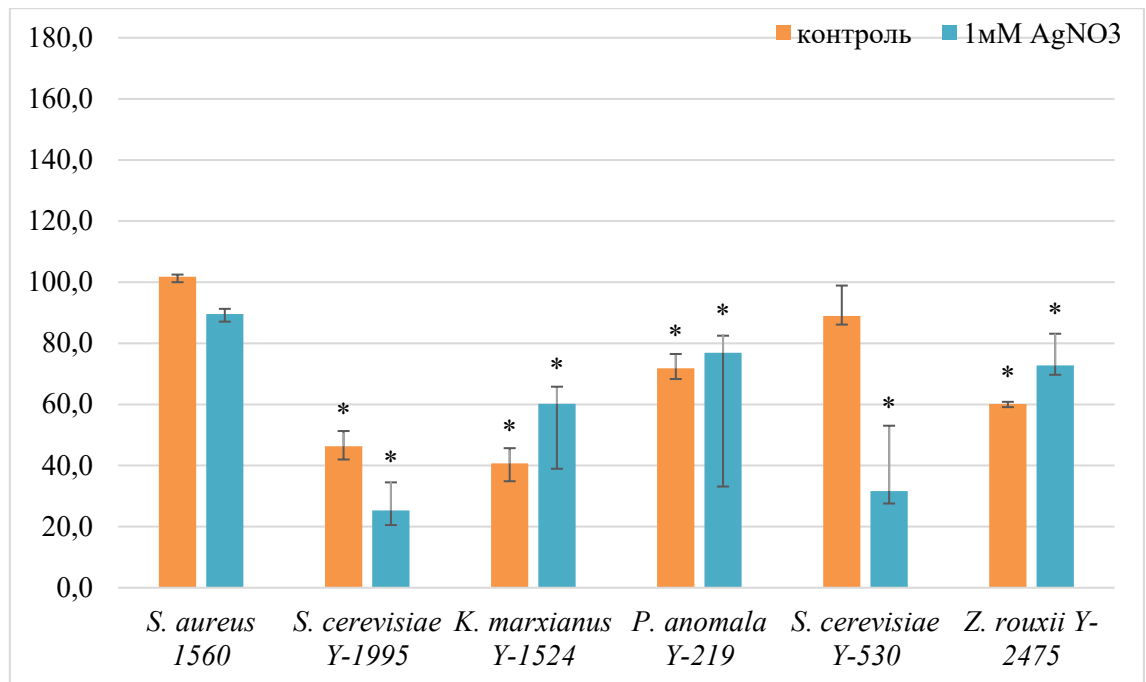


$p \leq 0.05$

Рис. 3.7. Антибактеріальна дія наночасток срібла, отриманих з дріжджових лізатів проти штаму *S. aureus* 1560

Також, ми визначили антибактеріальну дію отриманих наночасток на супернатантах проти штаму *S. aureus* 1560. Результати візуалізовані на Рис. 3.8. Наночастки, отримані на супернатантах проявляють антибактеріальну активність для всіх досліджених штамів дріжджів. Найбільшу бактерицидну дію проявляють наночастки отримані з супернатантів штамів дріжджів *S. cerevisiae* Y-1995 та *S. cerevisiae* Y-530 — зменшення кількості живих клітин на 71,8 % та 64,7 % відповідно в порівнянні з контролем 1 мМ AgNO₃. Ми відмітили саме ці штами, тому що при порівнянні зразків супернатантів, що були відібрані від клітин, що не

культивувалися з 1 мМ AgNO₃, з тими, що культивувалися для цих дріжджів більшу антагоністичну дію проти *S. aureus* 1560 мають саме супернатанти з додаванням 1 мМ AgNO₃. Було показано, що супернатанти, відібрані від дріжджів *K. marxianus* Y-1524, *P. anomala* Y-219 та *Z. rouxii* Y-2475, до яких була додана дистильована вода замість 1 мМ AgNO₃ мають антагоністичну активність проти культури *S. aureus* 1560 — 60,0 %, 29,5 5 та 40,9 % відповідно в порівнянні з контролем.



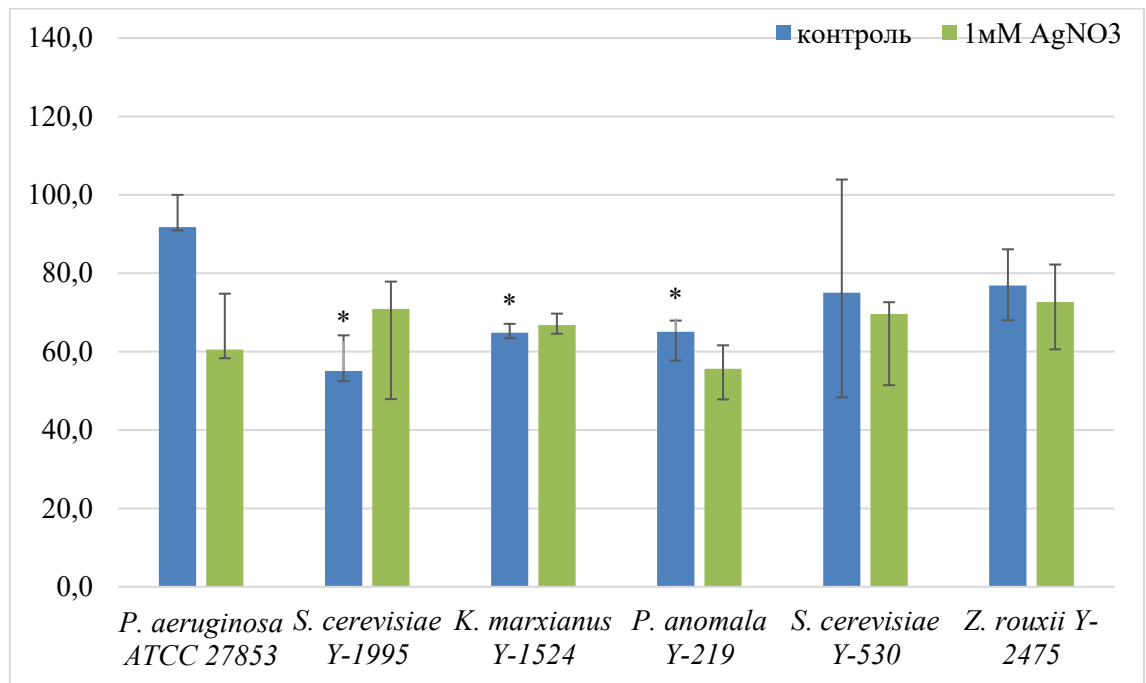
$p \leq 0.05$

Рис. 3.8. Антибактеріальна дія наночастинок срібла, отриманих з супернатантів лізатів проти штаму *S. aureus* 1560

Наступним етапом дослідження було встановити вплив отриманих зразків дріжджових лізатів та супернатантів на адгезивні властивості клітин бактеріальних культур *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* 1560.

При дослідженні впливу зразків, отриманих з дріжджових лізатів на адгезивну властивість клітин штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 було встановлено, що дріжджові лізати, отримані від штамів дріжджів *S. cerevisiae* Y-1995, *K. marxianus* Y-1524 та *P. anomala* Y-219 без субкультивування з 1 мМ AgNO₃ можуть знижувати здатність до адгезії на 44,4 %, 34,6 % та 34,4 % відповідно в порівнянні з контролем. Дріжджові лізати з наночастиками ніяким чином не впливають на

адгезію клітин *P. aeruginosa* ATCC 27853. Отримані результати також вказують на незначну антагоністичну властивість дріжджів проти бактеріальних клітин.

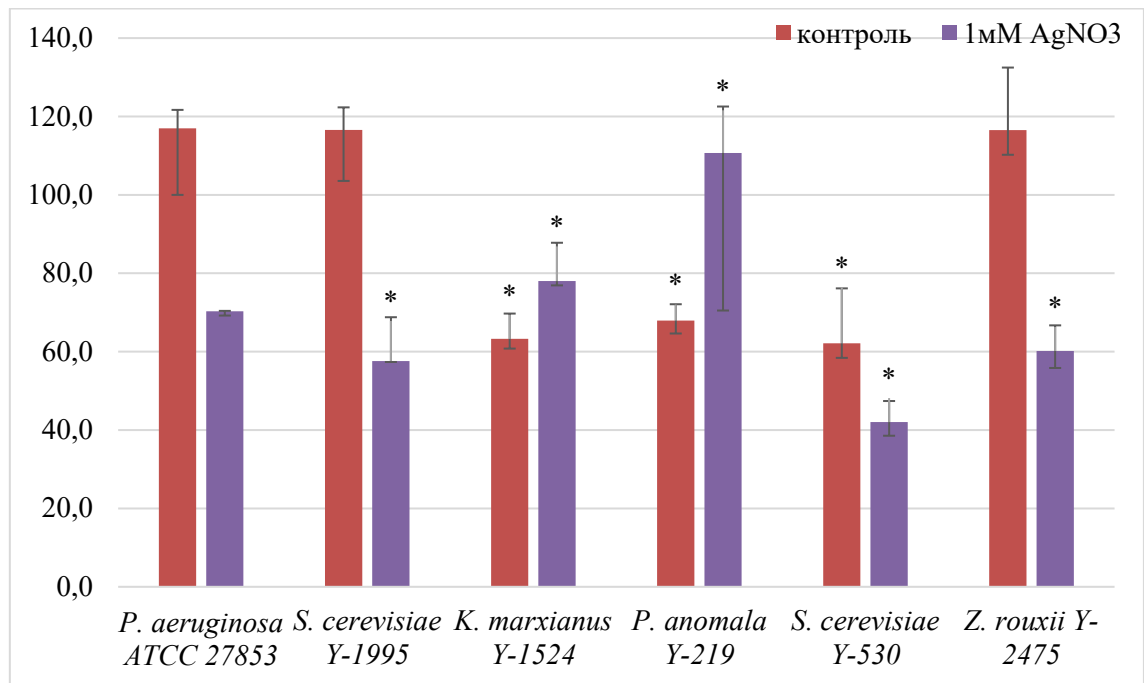


$p \leq 0,05$

Рис. 3.9. Вплив на андезивну властивість клітин штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 зразків, отриманих від дріжджових лізатів

При дослідженні впливу зразків супернатантів, отриманих від культур дріжджів *S. cerevisiae* Y-1995, *S. cerevisiae* Y-530 та *Z. rouxii* Y-2475, що культивували з 1 мМ AgNO₃, було встановлено, що вони знижують здатність клітин *P. aeruginosa* ATCC 2785 до адгезії на 18,1 %, 40,2 % та 14,4 % відповідно в порівнянні з контролем 1 мМ AgNO₃ (Рис. 3.10). Зразки супернатантів, отриманих від штамів дріжджів *K. marxianus* Y-1524 та *P. anomala* Y-219, навпаки, проявили активуючу дію — відбулося збільшення кількості адгезованих клітин на 11,0 % та 57,5 % відповідно в порівнянні з контролем 1 мМ AgNO₃. Проте справжню антибактеріальну дію проявили лише ті зразки, що отримані від штамів *S. cerevisiae* Y-1995 та *Z. rouxii* Y-2475. В контролях цих зразків не відбувалося зниження кількості адгезованих клітин в порівнянні з контролем *P. aeruginosa* ATCC, в той час як всі інші зразки (*K. marxianus* Y-1524, *P. anomala* Y-219 та *S. cerevisiae* Y-530)

в контрольних зразках знижували кількість адгезованих клітин — на 45,9 %, 41,9 % та 46,9 % відповідно в порівнянні з контролем клітин *P. aeruginosa* ATCC.

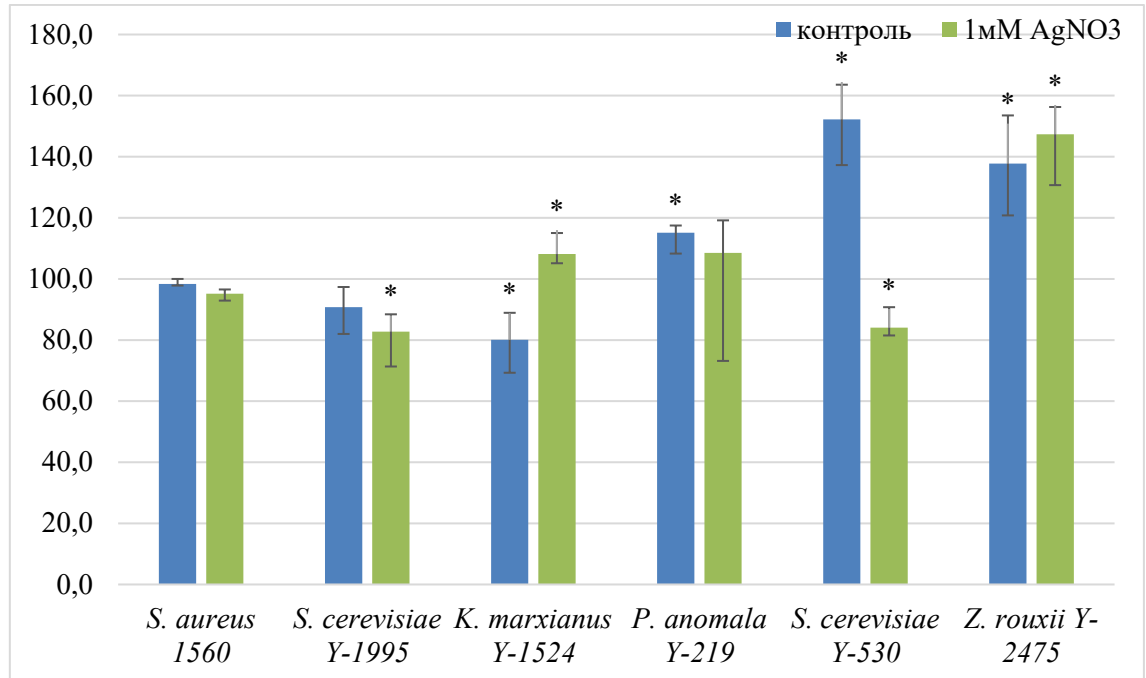


$p \leq 0.05$

Рис. 3.10. Вплив на андезивну властивість клітин штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 зразків, отриманих від супернатантів

Наступним етапом було дослідження впливу дріжджових лізатів та супернатантів на андезивну властивість клітин *S. aureus* 1560. Наночастки, отримані за допомогою дріжджових лізатів *S. cerevisiae* Y-1995 та *S. cerevisiae* Y-530, що культивували з 1 мМ AgNO₃, знижують відсоток адгезованих клітин на 13,1 % та 11,7 % відповідно в порівнянні з контролем AgNO₃. Зразки, отримані від штамів *K. marxianus* Y-1524, *P. anomala* Y-219 та *Z. rouxii* Y-2475 збільшують здатність клітин *S. aureus* 1560 до адгезії на 13,6 %, 14,0 % та 54,8 % відповідно в порівнянні з контролем 1 мМ AgNO₃. Проте, при аналізі контрольних лізатів, було встановлено, що лізат *K. marxianus* Y-1524 знижує андезивну здатність клітин *S. aureus* 1560 на 18,6 %, в то час як лізати *P. anomala* Y-219, *S. cerevisiae* Y-530 та *Z. rouxii* Y-2475 підвищують кількість адгезованих клітин на 17,0 %, 54,7 % та 40,0 % відповідно в порівнянні з контролем клітин *S. aureus* 1560. Таким чином, найкращу антибактеріальну активність проявили зразки з *S. cerevisiae* Y-1995 та *S. cerevisiae*

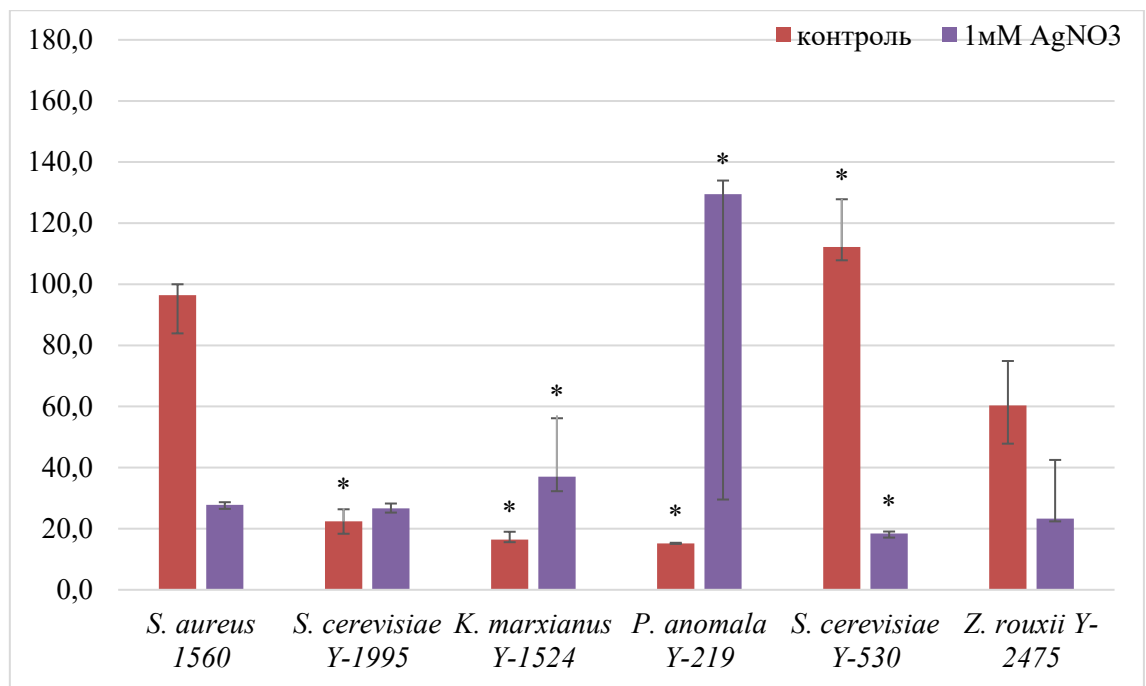
Y-530. А дріжджові лізати з *P. anomala* Y-219, *S. cerevisiae* Y-530 та *Z. rouxii* Y-2475 покращують здатність клітин *S. aureus* 1560 адгезуватися на культуральному пластику (96-лунковій платі).



$p \leq 0.05$

Рис. 3.11. Вплив на адгезивну властивість клітин штаму *S. aureus* 1560 зразків, отриманих від дріжджових лізатів

Самі неоднозначні результати були отримані при дослідженні впливу на адгезивні властивості клітин *S. aureus* 1560 зразків-супернатантів. Так, незначну і недостовірну антибактеріальну дію проявили зразки, отримані від дріжджів *S. cerevisiae* Y-1995 та *Z. rouxii* Y-2475 — на 4,1 % та 16,2 % відповідно в порівнянні контролем 1 мМ AgNO₃ (Рис. 3.12). Достовірне зниження кількості адгезованих клітин продемонстрував зразок супернатанту, отриманий від культури дріжджів *S. cerevisiae* Y-530 — на 33,6 % в порівнянні з контролем AgNO₃. Цікаво, що саме контрольний зразок лізату, отриманий від цієї культури забезпечує збільшення здатності до адгезії клітин *S. aureus* 1560 на 16,3 %, в той час як всі інші лізати зменшують адгезивну здатність в середньому на 79,9 % для всіх штамів.



$p \leq 0.05$

Рис. 3.12. Вплив на андезивну властивість клітин штаму *S. aureus* 1560 зразків, отриманих від супернатантів

Наночастки, отримані за допомогою супернатантів *S. cerevisiae* Y-1995 володіють бактерицидною дією проти *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* 1560 — вони знижують відсоток живих клітин на 36,6 5 та 71,8 5 відповідно. Також, вони знижують здатність клітин *P. aeruginosa* ATCC 27853 адгезуватися — на 18,1 % менше адгезованих клітин в порівнянні з контролем. Також, зменшувати адгезію клітин *P. aeruginosa* ATCC здатен зразок супернатанту, отриманий зі штаму *Z. rouxii* Y-2475 — на 14,4 %.

Також, високу антибактеріальну активність проявили зразки, отримані з дріжджового лізату та супернатанту штаму *S. cerevisiae* Y-530. Зразки супернатанту володіють бактерицидною дією проти *S. aureus* 1560 — знижують кількість живих клітин на 64,7 5. Також, зразок із супернатанту ефективно знижує здатність до адгезії клітин *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* 1560 — 40,2 % та 33,6 % відповідно. Дріжджовий лізат здатен зменшувати лише адгезію клітин *S. aureus* 1560 на 11,7 %.

Всі інші зразки дріжджових лізатів та супернатантів, отриманих зі штамів *K. marxianus* Y-1524 та *P. anomala* Y-219, що культивували з 1 мМ AgNO₃, виявляють

активує дію щодо бактеріальних клітин *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* 1560.

Важливо відмітити, що самі по собі, контрольні дріжджові лізати і супернатанти здатні виявляти певну антагоністичну активність проти досліджених бактеріальних штамів. Виявлена закономірність може бути обумовлена тим фактом, що на цукровмісному середовищі дріжджі здатні продукувати етанол, що володіє антибактеріальними властивостями. Більше того для дріжджів продемонстрована здатність продукувати специфічні пептиди, що є кілерними пептидами і забезпечують конкурування дріжджових клітин за субстрат [71].

Згідно літературних джерел, наночастки срібла, отримані зеленим синтезом проявляють антибактеріальну дію проти як колекційних штамів, таких як *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, так і полірезистентних клінічних штамів *K. pneumoniae* 104, *P. aeruginosa* 40, *P. aeruginosa* 215 [72]. Наночастки срібла, синтезовані зеленим синтезом здатні проявляти антибактеріальну активність проти ряду грамнегативних і грампозитивних бактерій: *Staphylococcus aureus* і *Kocuria rhizophila*, *Bacillus thuringiensis* (грампозитивні мікроорганізми); *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Salmonella typhimurium* (грамнегативні мікроорганізми) [73]. Отримані в нашій роботі результати співвідносяться з літературними джерелами, адже ми показали антибаектеріальну активність проти клінічно-важливих штамів *P. aeruginosa* та *S. aureus*.

Висновки до розділу 3

В роботі ми відзначили зміну забарвлення дослідних розчинів в процесі біогенного синтезу наночастинок срібла. Ми достовірно змогли підвередити наявність наночастинок у зразках супернатантів *S. cerevisiae* Y-1995, *K. marxianus* Y-1524 та *P. anomala* Y-219, оскільки піки оптичного поглинання цих зразків знаходились в межах 410 та 420 нм, що повністю відповідає плазмонному резонансу наночастинок срібла. В інших зразках супернатантів, *S. cerevisiae* Y-530 та *Z. rouxii* Y-2475, достовірно визначити піки не вдалося, проти високі рівні оптичного поглинання свідчать про наявність схожих на наночастки срібла з'єднань. Рівні оптичного поглинання в дріжджових лізатах вказує на відсутність формування наночастинок срібла. Проте, можливо, що в них формуються з'єднання відмінного від наночастинок типу. Для підтвердження отриманих результатів в майбутньому можна використати інші підходи.

Найефективнішими зразками, що проявили антибактеріальну активність проти досліджених штамів бактерій *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* 1560, виявилися супернатанти *S. cerevisiae* Y-1995 та *S. cerevisiae* Y-530. Бактерицидна дія зразків супернатантів проти *P. aeruginosa* ATCC 27853 складає близько 37 %, а проти *S. aureus* 1560 — близько 67 %. Також, наночастки, синтезовані за допомогою супернатантів з *S. cerevisiae* Y-1995 та *S. cerevisiae* Y-530 здатні знижувати здатність до адгезії клітин *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* 1560 на 18-40 %. Отже, отримані наночастки можуть стати перспективною для створення антибактеріальних препаратів.

ВИСНОВКИ

1. В роботі провели синтез наночасток біогенним способом за допомогою 1 мМ AgNO₃ та дріжджових культур *S. cerevisiae* Y-1995 та *S. cerevisiae* Y-530, а також *K. marxianus* Y-1524, *P. anomala* Y-219 та *Z. rouxii* Y-2475 на простому середовищі (20%-ва глюкоза).

2. За допомогою візуального спостереження встановили можливе формування наночасток срібла. За допомогою стандартних прийомів та маніпуляцій очистили та стерилізували зразки супернатантів та дріжджових лізатів для подальших досліджень.

3. Встановили, що зразки супернатантів мають вищу оптичну щільність, ніж зразки дріжджових лізатів. Достовірно підвередити наявність наночасток срібла у зразках супернатантів *S. cerevisiae* Y-1995, *K. marxianus* Y-1524 та *P. anomala* Y-219 — пік оптичного поглинання знаходиться в межах 410-430 нм, що відповідає плазмонному резонансу наночасток срібла.

4. Антибактеріальну активність встановили проти досліджених штамів бактерій *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* 1560 для зразків супернатантів *S. cerevisiae* Y-1995 та *S. cerevisiae* Y-530. Бактерицидна дія зразків супернатантів проти *P. aeruginosa* ATCC 27853 складає близько 37 %, проти *S. aureus* 1560 — близько 67 %. Наночастки, синтезовані за допомогою супернатантів з *S. cerevisiae* Y-1995 та *S. cerevisiae* Y-530 здатні знижувати кількість адгезованих клітин бактеріальних штамів на 18-40 %.

5. Найефективнішим об'єктом для синтезу наночасток срібла є штам *S. cerevisiae* Y-1995, оскільки встановлено відповідний плазмонному резонансу наночасток срібла пік в 410 нм та продемонстровано бактерицидну дію проти клінічно-важливих штамів *P. aeruginosa* та *S. aureus*. Отримані результати можуть бути використані для розробки ефективних терапевтичних засобів з антибактеріальною дією.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Трахтенберг І. М., Дмитруха Н. М. Наночастки металів, методи отримання, сфери застосування, фізико-хімічні та токсичні властивості : ДУ «Інститут медицини праці НАМН України», м. Київ, 2015.
2. Леоненко Н.С., Демецька О.В., Леоненко О.Б.. Особливості фізико-хімічних властивостей та токсичної дії наноматеріалів — до проблеми оцінки їхнього небезпечного впливу на живі організми : ДУ «Інститут медицини праці НАМН України», м. Київ, 2015.
3. «Зелений» Синтез Наночасток Благородних металів та Напівпровідникових Нанокристалів Cds за Допомогою Біологічної Сировини / Блюм Я.Б. : ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2015.
4. М. Сичевський. Вплив наночасток біогенних металів на процес культивування дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Київ : Інститут продовольчих ресурсів НААН України, 2020.
5. Нанотехнології і наноматеріали для косметики нового покоління : <https://ua.pielcosmetics.com/articles/aktivnye-komponenty/nanotekhnologii-i-nanomateriali-dlya-kosmetiki-novogo-pokolinnya/>
6. Гавкалюк М. І., Леочко Н. С. Використання ліпосом у медицині та косметичі : навч. посіб. *Діабет і серце*, 2009. С. 123–126.
7. Нанотехнології в біології : <https://biologo.ru/nanotekhnologiyi-v-biologiyi/index.html>.
8. Maunard A.D. Nanotechnology: A research strategy for addressing risk. Project on Nanotechnologies supported by the pewcharitable trusts // *Nature*. 2006. V.444. P.267-269.
9. Наночастицы и нанотехнологии в медицине сегодня и завтра. / Абаева Л.Ф. : ГУ Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва.

10. Вардуни Владимир Марэнович. Влияние загрязнения нанопорошками оксидов Co, Ni, Cu, Zn, Ti, Fe, Al, Si на состояние чернозема обыкновенного и сельскохозяйственных растений. : Москва, 2020.
11. Banciu M. Liposomal glucocorticoids as tumor-targeted anti-angiogenic nanomedicine in B16 melanoma-bearing mice. J./ M. Banciu, J. M. Metselaara, R. M. Schiffelers, G. Storm // Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2008. - №. 111(1–2). – С. 101–110.
12. Fencke D.B., Chonn A., Cullis P.R. Liposomal nanomedicines: an emerging field // Toxicol. Pathol. 2008. V.36, No.1. P.21-29.
13. Cans A.S., Wi E enberg N., Karlsson R. et al. Artificial cells: unique insights into exocytosis using liposomes and lipid nanotubes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2003. V.100. P.400- 404.
14. Choi J.H., Nquyen F.T., Barone P.W. et al. Multimodal biomedical imaging with asymmetric single-walled carbon nanotube/iron oxide nanoparticle complexes // Nano Lett. 2007. V.7. P.861-867.
15. S. Hansen and C. M. Lehr, Microbiol Biotechnol., 5: 156 (2012).
16. Пивні дріжджі : https://uk.wikipedia.org/wiki/Пивні_дріжджі
17. ГУ МОНИКИ «Наночастицы и нанотехнологии в медицинесегодня и завтра» / Абаева Л.Ф. : Москва, 2010.
18. Villalobos-Hernández J.R. Sun protection enhancement of titanium dioxide crystals by the use of carnauba wax nanoparticles: The synergistic interaction between organic and inorganic sunscreens at nanoscale./ J.R. Villalobos-Hernández, C.C. Müller-Goymann // Int. J. Pharm. – 2006. - № 322(1–2). – С. 161–170.
19. H. I. Chang and M. K. Yeh, Int. J. Nanomed., 7: 49 (2012).
20. L. Zhang, F. X. Gu, J. M. Chan, A. Z. Wang, R. S. Langer, and O. C. Farokhzad, Clin. Pharmacol. Ther., 83: 761 (2008).
21. Hughes G.A. Nanostructure-mediated drug delivery // Nanomedicine. 2005. V.1, No.1. P.22-23.

22. Wu W., Wieckowski S., Pastorin G. et al. Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 2005. V.44. P.6358-6362.
23. Cui D., Ozcan C.S., Ravindran S. et al. Encapsulation of plabelled DNA molecules inside carbon nanotubes // *Mech. Chem. Biosist.* 2004. V.1, No.2. P.113-121.
24. P. Rivera Gil, D. Huehn, L. L. del Mercato, D. Sasse, and W. J. Parak, *Pharmacol. Res.*, 62: 115 (2010)
25. Т.П. Пирог. Загальна мікробіологія : 2004.
26. *Saccharomyces cerevisiae* : <https://laktiale.ua/pro-laktiale/saccharomyces-cerevisiae/>.
27. Воробйова Олександрівна Володимирівна. Технологія виробництва етилового спирту. Дільниця виробничого біосинтезу, Київ : 2020.
28. Клітинні органиели : <https://pharmencyclopedia.com.ua/article/3575/klitinni-organeli>.
29. Матвиенко П.В. Липосомы - «скафандры» для лекарств : Провизор. 2004, С.44–48.
30. Характеристика будови клітин і життєвого циклу дріжджів : <https://studfile.net/preview/9761422/page:8/>
31. Hanaki K., Momo A., Oku T. et al. Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V.30, No.2(3). P.496-501.
32. Характеристики *Saccharomyces cerevisiae*, морфологія та життєвий цикл : <https://ua.thpanorama.com/articles/biologa/saccharomyces-cerevisiae-charactersticas-morfologa-y-ciclo-de-vida.html>
33. *Saccharomyces cerevisiae* as a model object in genetic researches / Урбах А.В. : Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, 2016.
34. Верхове бродіння : https://uk.wikipedia.org/wiki/Верхове_бродіння

35. М.К. Садыгова. Биология и генетика дрожжей: краткий курс лекций для студентов 3 курса специальности (направление подготовки). Продукты питания из растительного сырья. Саратов : ВПО «Саратовский ГАУ». , 2016. 47 с.
36. Модифікація гена *kanMX4*, що забезпечує резистентність до антибіотика генетицину: <http://5fan.ru/wievjob.php?id=38559>
37. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и патологии : 1996.
38. Буряченко С. В., "Молекулярная генетика дрожжей сахаромикетов", LAP Lambert Academic Publishing, Германия, : 2016.
39. Меледина Т.В., Давыденко С.Г. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм: Учеб. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – 88 с.
40. V. Sokolova, T. Knuschke, A. Kovtun, J. Buer, M. Epple, and A. M. Westendorf, *Biomaterials*, 31: 5627 (2010).
41. Maynard A.D. Nanotechnology: A research strategy for addressing risk. Project on Nanotechnologies supported by the pewcharitable trusts // *Nature*. 2006. V.444. P.267-269.
42. B. Mahe, A. Vogt, C. Liard, D. Duffy, V. Abadie, O. Bonduelle, A.Boissonnas, W. Sterry, B. Verrier, U. Blume-Peytavi, and B. Combadiere, *J. Invest. Dermatol.*, 129: 1156 (2009).
43. Короленко В.В. Високі технології в медицині: проблеми, сучасність і перспектива/ В.В.Короленко, А. В. Рибачук // *Укр. наук.-мед. молодіж.* – 2010. - №1. – С. 4–9.
44. Gupta U., Agashe H.B., Asthana A., Jain N.K. A review of in vitro – in vivo investigations on dendrimers: the novel nanoscopic drug carriers // *Nanomedicine*. 2006. V.2, No.2. P.66-73
45. Естетична медицина в аспекті застосування високих технологій : <https://umj.com.ua/article/5904/estetichna-medicina-v-aspekti-zastosuvannya-visokix-technologij-oglyad-literaturi-ta-vlasnix-doslidzen>
46. L. A. DeLouise, *J. Invest. Dermatol.*, 132: 964 (2012).

47. Müller R.H. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products / R. H. Müller, R. D. Petersen, A. Hommoss, J. Pardeike // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2007. - № 59(6). – С. 522–530.
48. Partlow K.S., Chen J., Brant J.A. et al. ^{19}F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons // *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB)*. 2007. V.21, No.8. P.1647-1654.
49. Ji X., Shao R., Elliot A.M. et al. Bifunctional gold nanoshells with a superparamagnetic iron oxide-silica core suitable for both MR imaging and photothermal therapy // *J. Phys. Chem.* 2007. V.111, No.17. P.6245-6251.
50. Наночастки в медицині С. Черноусова, М. Ешплє Інститут неорганічної хімії, Університет Дюйсбург-Ессен 2012 Німеччина
51. Соколов, В.А. Множественные и сочетанные травмы / В.А. Соколов. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. - 512 с.
52. R. Klippstein and D. Pozo, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, 6: 523 (2010).
53. Чекман І.С. Л.В.Савченкова, Н.О.Горчакова. Ліпосомальні форми лікарських засобів: від експерименту до клініки. : Журн. АМН України. 2006. - № 12(4). – С. 653–667.
54. Cui D., Ozcan C.S., Ravindran S. et al. Encapsulation of fluorescently labeled DNA molecules inside carbon nanotubes // *Mech. Chem. Biosist.* 2004. V.1, No.2. P.113-121.
55. Пирог Т. П. Становлення та розвиток мікробіології. Загальна мікробіологія : підручник. - 2 вид., доп. і перероб. Київ : НУХТ, 2010. - 620 с.
56. С. М. Тетеріна, Н. М. Грегірчак. Мікробіологія харчових продуктів : Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051701 "Харчові технології та інженерія" ден. та заоч. форм навчання. : НУХТ, 2013. – 97 с.
57. Gancedo, C., and R. Serrano. 1989. Energy-yielding metabolism, p. 205-257. In A. H. Rose and J. S. Harrison (ed.), *The yeasts*, 2nd ed., vol. 3. Academic Press, New York, N.Y.] [*Gancedo JM Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Jun; 62(2):334-61.
58. The two isoenzymes for yeast NAD^+ -dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and

redox regulation. Ansell R, Granath K, Hohmann S, Thevelein JM, Adler L EMBO J. 1997 May 1; 16(9):2179-87.

59. Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Björkqvist S, Ansell R, Adler L, Lidén G Appl Environ Microbiol. 1997 Jan; 63(1):128-32.

60. *Saccharomyces cerevisiae* use and function in alcohol production : https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Saccharomyces_cerevisiae_use_and_function_in_alcohol_production#Fermentation_of_alcohol

61. Дріжджі винограду і вина : <http://um.co.ua/4/4-15/4-155604.html>.

62. Encyclopedia of Ecology M. Ciani, I. Mannazzu, in Encyclopedia of Ecology, 2008

63. Дріжджі : <https://znaimo.com.ua/Дріжджі>

64. Дрожжи: состав, виды и параметры, влияющие на активность. Тонкости применения дрожжей : <https://lesaffre.ru/drozhzhi-sostav/>.

65. Анаеробіоз <https://uk.wikipedia.org/wiki/Анаеробіоз>

66. Niknejad, F., Nabili, M., Ghazvini, R. D., & Moazeni, M. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles: advantages of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Current medical mycology*, 1(3), 17-24.

67. Roy, K., Sarkar, C. K., & Ghosh, C. K. (2015). Photocatalytic activity of biogenic silver nanoparticles synthesized using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) extract. *Applied Nanoscience*, 5(8), 953-959.

68. Shu M, He F, Li Z, Zhu X, Ma Y, Zhou Z, Zeng M. Biosynthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using yeast extract as reducing and capping agents. *Nanoscale research letters*. 2020; 15(1): 1-9..

69. Rodríguez-León E, Iñiguez-Palomares R, Navarro RE, Herrera-Urbina R, Tánori J, Iñiguez-Palomares C, Maldonado A. Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). *Nanoscale research letters*. 2013; 8(1): 1-9.

70. Jafarov M.M., Ramazanov M.A., Agamaliyev Z.A, Eyvazova G.M. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces sp.* strain BDU–XR1. *Environment*. 2017; 4(6): 11-13.

71. Вальшев А.В., Чертков К.Л., Вальшева Н.А. Антибактериальная активность киллерных токсинов дрожжей. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016; (4): 1-6.

72. Удегова Е.С., Гильдеева К.А., Рукосуева, Т.В., Съед Б. Антибактериальный эффект наночастиц металлов на антибиотикорезистентные штаммы бактерий. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(4): 771-776.

73. Okafor F., Janen A., Kukhtareva T., Edwards V., Curley M. Green synthesis of silver nanoparticles, their characterization, application and antibacterial activity. *International journal of environmental research and public health*. 2013; 10(10): 5221-5238.

Міністерство охорони здоров'я України
 Ministry of Health of Ukraine
 Національний фармацевтичний університет
 National University of Pharmacy
 Кафедра заводської технології ліків
 Industrial technology of drugs
 Кафедра технології ліків
 Technology of drugs



СЕРТИФІКАТ CERTIFICATE

Цим засвідчується, що
 This is to certify that

брав(ла) участь у роботі VI Міжнародної науково-
 практичної інтернет-конференції
 participated in the VI International scientific and practical
 Internet - conference

**ТЕХНОЛОГІЧНІ ТА БІОФАРМАЦЕВТИЧНІ
 АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ
 ПРЕПАРАТІВ РІЗНОЇ НАПРАВЛЕНОСТІ ДІЇ**
**TECHNOLOGICAL AND BIOPHARMACEUTICAL ASPECTS OF THE
 CREATION OF DRUGS OF DIFFERENT DIRECTIONS OF ACTION**

11-12 листопада 2021 року, м. Харків
 November 11-12, 2021, Kharkiv

Ректор НаУФарУ,
 проф.
 Rector of
 prof.



Алла КОТВИЦЬКА

Alla KOTVITSKA



Продовження Додатку А

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ
КАФЕДРА ЗАВОДСЬКОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ**

**МАТЕРІАЛИ**

VI Міжнародної науково-практичної інтернет – конференції

**«ТЕХНОЛОГІЧНІ ТА БІОФАРМАЦЕВТИЧНІ АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ
ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ РІЗНОЇ НАПРАВЛЕНОСТІ ДІЇ»**

**«TECHNOLOGICAL AND BIOPHARMACEUTICAL ASPECTS OF DRUGS
DEVELOPING WITH DIFFERENT ORIENTATION OF ACTION»**

**11—12 листопада 2021 р.
м. Харків**

Продовження Додатку А

Методи та об'єкти дослідження. У представленій роботі були використані порівняльний та статистичний аналіз електронних і паперових джерел інформації про зареєстровані в Україні ЛЗ.

Основні результати. За результатами аналізу встановлено, що на даний момент препарати на основі липи представлені українськими виробниками (ПрАТ Фармацевтична фабрика «Віола», ПрАТ «Ліктрави», Україна, ТОВ «Тернофарм», ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика») та налічують лише чотири торгових найменувань. Досліджена група препаратів випускаються у двох лікарських формах – лікарський рослинний чай та сироп.

Липи квітки у вигляді збору рекомендовано застосовувати внутрішньо – при застудних захворюваннях, бронхітах, зовнішньо — при ангінах, стоматитах, ларингітах, гінгівітах (у складі комплексної терапії). Лікарський засіб Маліпін (виробник ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика») використовується як допоміжний засіб при ГРВІ, запаленні горла, кашлі, які супроводжуються підвищеною температурою тіла.

Висновки. Отже, обмежений асортимент лікарських засобів на основі сировини липи серцелистої обумовлює розробку нових ефективних препаратів, зокрема для лікування гострих респіраторних вірусних інфекцій.

Біосинтез наночасток *Lactobacillus*

Волошина І.М., Кошелап Б.А., Галашенко Д.О.

Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ, Україна

wim@ukr.net

Вступ. Останнім часом нанотехнології є одним із сучасних напрямів у розвитку біотехнології, оскільки наночастки набувають значної уваги завдяки їх застосуванню в різних галузях. Наночастки завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям, таким як електрична і теплопровідність, фотоелектрохімічна активність, хімічна стабільність і висока каталітична і антимікробна активність [1] привертають увагу науковців і застосовуються у різних галузях, таких як електроніка, каталіз, доставка ліків або зондування, тощо. Наночастки можна синтезувати з використанням різних хімічних і фізичних процесів, однак вони характеризуються низькою стабільністю, токсичністю хімічних речовин і складністю контролю росту кристалів [2, 3].

Мета дослідження. Провести літературний пошук у наукометричних базах даних, щодо біосинтезу наночасток *Lactobacillus*.

Методи та об'єкти дослідження. Аналіз масиву наукових літературних даних.

Продовження Додатку А

Основні результати. В літературі зустрічається багато інформації використання солей різних металів для отримання відповідних наночастинок за допомогою різних біологічних об'єктів. Більш того, різні біологічні агенти, такі як бактерії, водорості, гриби, рослини, їх ферменти і екстракти, синтезують наночастинки різного розміру і форми та мають різні механічні, електричні та структурні властивості [4].

З літератури відомо, що наночастинки срібла (AgNP), отримані за допомогою біосинтезу з використанням екзополісахариду *Lactobacillus brevis* MSR104 [5] мають різний розмір та кристалічну природу. Результати антимікробного аналізу показали, що AgNP виявляли виняткову антимікробну активність залежно від дози. Вчені довели, що новосинтезовані наночастинки срібла мають антибактеріальні, антиоксидантні та протипухлинні застосування в сільськогосподарській та харчовій промисловості [5].

Також відомо, що неорганічні наночастинки проявляють антибактеріальну дію різних доз наночастинок на *Lactobacillus plantarum* та *Lactobacillus fermentum*, змінюючи при цьому їх морфологічні властивості руйнуючи їх клітинні мембрани [6]. Позаклітинна біомаса *Lactobacillus reuteri*, використовувалася як відновник та укупорюючий агент для синтезу гібридних наночастинок хітозану-срібла (CS-AgNP). Синтезовані CS-AgNP продемонстрували потенційну антибактеріальну активність дискової дифузії щодо збудників *B. subtilis* та *E. coli* [7].

Висновки. Враховуючи літературні дані можна зробити висновок, що метод біосинтезу наночастинок за допомогою молочнокислих бактерій набуває дуже важливого значення завдяки їх економічним та екологічним перевагам. Більш того, синтезовані наноконкомпозити демонстрували антимікробні, антиоксидантні та протипухлинні властивості, що дає змогу їх використовувати у сільськогосподарській, харчовій та медичній промисловості.

Список літератури

1. Rasheed, T.; Bilal, M.; Iqbal, H.M.N.; Li, C.L. Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Artemisia vulgaris* and their potential biomedical applications. *Colloid Surf. B* 2017, *158*, 408–415. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.020.
2. Saratale, R.G.; Karuppusamy, I.; Saratale, G.D.; Pugazhendhi, A.; Kumar, G.; Park, Y.; Ghodake, G.S.; Bharagava, R.N.; Banu, J.R.; Shin, H.S. A comprehensive review on green nanomaterials using biological systems: Recent perception and their future applications. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2018, *170*, 20–35. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.045.
3. Izadiyan, Z.; Shameli, K.; Hara, H.; Taib, S.H.M. Cytotoxicity assay of biosynthesis gold nanoparticles mediated by walnut (*Juglans regia*) green husk extract. *J. Mol. Struct.* 2018, *1151*, 97–105. doi.10.1016/j.molstruc.2017.09.039.
4. Roya, S.; Das, T.K.; Maiti, G.P.; Basu, U. Microbial biosynthesis of nontoxic gold nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. B Adv.* 2016, *203*, 41–51. doi: 10.1016/j.mseb.2015.10.008.

Продовження Додатку А

5. Rajoka M. Sh. R., Mehwishc H. M., Zhanga H., et.al. Antibacterial and antioxidant activity of exopolysaccharide mediated silver nanoparticle synthesized by *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese koumiss. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2020, 186, 110734. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110734.
6. Wang M., Li Y., Yang J., Shi R., Xiong L., Sun Q. Effects of food-grade inorganic nanoparticles on the probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*. *LWT*, 2021, 139, 110540. doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110540.
7. Tharani Sh., Bharathi D., Ranjithkumar R. Extracellular green synthesis of chitosan-silver nanoparticles using *Lactobacillus reuteri* for antibacterial applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 30, 101838. doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101838.

Косметичні засоби з наночастками металів

Волошина І.М., Бойко Т., Матвієнко В.В.

Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ, Україна

wim@ukr.net

Вступ. Використання косметичних засобів зростає дуже швидкими темпами порівняно з іншими засобами особистої гігієни. В літературі зазначається [1-3], що частіше починають використовувати косметичні засоби на основі нанотехнологій для догляду за волоссям, шкірою, зубами, губами та нігтями. Ці продукти розроблені для вирішення таких проблем, як старіння, гіперпігментація, акне, лупа, грибкова інфекція, пошкодження та випадання волосся, а також карієс. Для розробки косметичної продукції використовують багато нових наноносіїв/наноматеріалів, таких як ліпосоми, наноемульсії, тверді наночастинки ліпідів, наночастинки срібла, наночастинки золота та фулерени. Виявлено, що ці продукти є більш корисними з точки зору наявності різноманітних продуктів, покращеної естетичної привабливості, підвищеної ефективності та безпеки та тривалого ефекту [1-3].

Мета дослідження. Провести літературний пошук у наукометричних базах даних, щодо засобів з наночастками металів.

Методи та об'єкти дослідження. Аналіз масиву наукових літературних даних.

Основні результати. Потенційно присутні в косметиці наночастки (НЧ) металів і оксидів металів, такі як діоксид титану та оксид цинку, є звичайними інгредієнтами, доданими для забезпечення достатнього захисту від сонця. Також дуже часто згадується додавання НЧ срібла та золота в косметичні засоби для їх підвищення антибактеріальних та фунгіцидних властивостей проти *Aspergillus niger* і *Saccharomyces cerevisiae* [2, 3]. НЧ срібла та золота додають у косметичні засоби декоративної косметики, креми проти старіння, гелі для душу, мила, маски та зубні пасти [1]. Наносрібло додають в шампуні проти лупи, для проблемної шкіри голови та зменшення вороблення шкірного сала. Виробники засобів інтимної гігієни з



СЕРТИФІКАТ

засвідчує,
що наукова стаття
**"ЗАСТОСУВАННЯ ПРОБІОТИКІВ
LACTOBACILLUS В МЕДИЦИНІ ТА
ВЕТЕРИНАРІЇ"**
автора(ів)

Кошелупи Б.А., Талащенко Д.О., Волошина І.М.

опублікована в
**Міжнародному науковому журналі
«ОСВІТА І НАУКА», випуск 2(31) 2021**

Головний редактор



Т. Д. Щербан



УДК 604+612.1/8

**ЗАСТОСУВАННЯ ПРОБІОТИКІВ *LACTOBACILLUS*
В МЕДИЦИНІ ТА ВЕТЕРИНАРІЇ
THE APPLICATION OF PROBIOTIC *LACTOBACILLUS* IN MEDICINE
AND VETERINARY MEDICINE**

Б.А. Кошелап, Д.О. Талашенко, І.М. Волошина

Киевский национальный университет технологий дизайна,

Украина, 01011, Киев, ул. Немировича-Данченка, 2

Bogdan Koshelap, Daniil Talashchenko, Iryna Voloshyna

National University of Technologies and Design,

2, Nemyrovycha-Danchenka Str., Kyiv, Ukraine 01011

Стаття присвячена актуальним напрямкам використання пробіотичних препаратів на основі бактерії роду *Lactobacillus*, оскільки вони здатні синтезувати різні речовини, а саме кислоти (молочну, оцтову), лізоцим, речовини з антибіотичною активністю, перекис водню, тощо. Ці речовини широко застосовується в медицині та ветеринарії, оскільки допомагають стимулювати шлункові соки і ферменти, необхідні для покращення процесів травлення, здатні зменшувати побічні ефекти антибіотиків, сприяти розщепленню солей жовчних кислот і нормалізації ліпідного обміну, тощо.

Ключові слова: *Lactobacillus*, пробіотики, біотехнологія, медицина, ветеринарія, мікроорганізми.

The article is devoted to the actual directions of obtaining biopreparations, the basis of which are bacteria of the genus *Lactobacillus*. Because lactobacilli have a diverse range of biological activities, for example, they help stimulate gastric juices and enzymes needed to improve digestive processes, reduce the side effects of antibiotics,

Продовження Додатку Б

promote the splitting of bile acid salts and normalize lipid metabolism, protect epithelial cells from damage, they are widely used in medicine , cosmetology, food and agriculture, and veterinary medicine.

Having analyzed the literature data, we can say that preparations based on bacteria of the genus *Lactobacillus* are effective for use in medicine and veterinary medicine. In the course of its normal metabolism, *Lactobacillus* are capable of forming lactic acid, hydrogen peroxide, producing lysozyme and substances with antibiotic activity: reuterin, plantaricin, lactocidine, lactolin. Scientists also create new probiotic drugs based on *lactobacilli*, because they are highly effective means of correction of microbiocenosis and exhibit high activity in the microorganisms of the genera *Staphylococcus* and *Candida*. Many reports have been published on the use of *Lactobacillus* in the prevention and treatment of allergic and inflammatory diseases of the intestine, mucous membrane, respiratory tract, and the like. They are also used in the feeding of cattle and poultry, since they are normal microbiota.

The creation of new effective drugs is also relevant because in the modern world viruses and bacteria undergo mutations, which complicates the treatment of various diseases. Therefore, it is necessary to search for new effective probiotic strains of the genus *Lactobacillus*, to create more effective drugs.

Key words: *Lactobacillus*, probiotics, biotechnology, medicine, veterinary, microorganisms.

Keywords: *Bifidobacterium*, probiotics, antagonistic properties, bacteriocins.

Серед ефективних пробіотиків все більшого використання набувають біопрепарати, основу яких складають бактерії роду *Lactobacillus*. Оpubліковано багато повідомлень про високу ефективність препаратів на основі лактобацил як засобів лікування захворювань, викликаних патогенними та умовно патогенними мікроорганізмами. Бактерії родини *Lactobacillus* відносять до основної мікрофлори людини і виявляють майже в усіх біотопах травного тракту [1]. Лактобактерії є грампозитивними неспороутворюючими бактеріями, які

Продовження Додатку Б

неймовірно різноманітні за формою та розмірами. Вони можуть мати форму від коротких до довгих ниткоподібних паличок, що можуть розташовуватись поодинокі, парами або короткими ланцюжками. У процесі свого нормального метаболізму лактобацили здатні утворювати молочну кислоту, перекис водню, продукувати лізоцим і речовини з антибіотичною активністю: реутерін, плантаріцин, лактоцидін, лактолін. Гетероферментативні види лактобацил в якості кінцевих продуктів, крім того, можуть продукувати молочну, оцтову та інші кислоти і вуглекислий газ [2].

Однією з головних властивостей штаму є здатність до адгезії на стінках шлунково-кишкового тракту. Вони володіють різноманітним спектром біологічних активностей, наприклад, допомагають стимулювати шлункові соки і ферменти, необхідні для покращення процесів травлення, здатні зменшувати побічні ефекти антибіотиків, сприяти розщепленню солей жовчних кислот і нормалізації ліпідного обміну. Іншою важливою характеристикою є здатність захищати клітини епітелію від пошкодження і посилювати регенерацію слизової оболонки кишківника, пом'якшувати запальні процеси за рахунок нормалізації загальної мікрофлори людини [3]. Створення медичних та ветеринарних препаратів на основі лактобацил зможе суттєво допомогти покращити якість життя людства.

Застосування в медицині. Відомо, що пробіотичні препарати проявляють високу активність до мікроорганізмів родів *Staphylococcus* і *Candida*. В даний час їх вважають високоефективними та найбільш фізіологічно активними засобами корекції мікробіоценозу [4]. Опубліковано багато повідомлень про роль бактерій, у тому числі *Lactobacillus*, у профілактиці та лікуванні алергічних та запальних захворювань. Пробіотики на основі лактобацил покращували баланс мікроорганізмів кишківника, зменшували запалення і підвищували толерантність слизової оболонки, а також пригнічували гіперчутливість дихальних шляхів до метахоліну і значно зменшували кількість інфільтруючих запальних клітин і цитокінів в рідині та сироватці взятій із бронхоальвеолярного лаважу [1]. 3

Продовження Додатку Б

літературних даних відомо, що бактерії *Lactobacillus rhamnosus* виявляють протизапальну дію на запалення дихальних шляхів, і можуть бути використанні в якості додаткової терапії при алергічних захворюваннях дихальних шляхів [5]. Пробиотики на основі *Lactobacillus gasseri* збільшують секрецію інсуліну в організмі людини [6, 7]. Також є кілька досліджень, що вказують на специфічність бактеріального роду *Lactobacillus*, які мають здатність надавати захист проти алергії та астми [8].

Деякі види *Lactobacillus* можуть використовуватися як харчові добавки для індукції вироблення антимікробних і протизапальних факторів, в якості пробіотичного лікування остеоартриту. Лікування пробіотиком на основі *Lactobacillus casei Shirota* сприяє метаболізму кісткової тканини, зменшує біль і запальні реакції вікових розладів, пов'язаних з опорно-руховим апаратом, в тому числі остеоартриту [9]. Окрім колінних суглобів артрит також впливає на деякі інші важливі органи, як печінка, нирки і яєчники. Препарат на основі *Lactobacillus acidophilus* нормалізує мікрофлору організму та запобігає пошкодженню суглобів, а також захищає печінку, нирки і яєчники від впливу на них різних цитокінів. Також полегшує інфільтрацію запальних клітин, сприяючи адгезії нейтрофілів і лімфоцитів до ендотеліальних клітин. Всі дані автори підтверджують гістопатологічним аналізом [10].

Досліджували *Lactobacillus plantarum* WLPL04, який виділений з грудного молока людини, на його пробіотичні властивості та толерантність до кислот і жовчних солей, виживаність в шлунково-кишковому тракті, інгібування патогенних мікроорганізмів, чутливість до антибіотиків, вихід екзополісахаридів, захист від шкідливого впливу додецилсульфату натрію і протизапального стресу на культуру клітин. Результати показали, що *L. plantarum* WLPL04 володіє активністю широкого спектра відносно грампозитивних і грамнегативних штамів. Тести на чутливість до антибіотиків показали, що *L. plantarum* WLPL04 є чутливим до еритроміцину і нітрофурантоїну, і стійкий до канаміцину і

Продовження Додатку Б

бацитрацину. *Lactobacillus plantarum* WLPL04 здатний існувати в шлунково-кишковому тракті та може розглядатися в якості пробіотичного препарату для нормалізації мікрофлори людини [11].

Застосування в ветеринарії. Пробіотичні препарати на основі штаму *Lactobacillus plantarum* також використовують в сільському господарстві при вигодовуванні великої рогатої худоби та птиці. Наприклад, при силосуванні люцерни для відгодівлі великої рогатої худоби штам *Lactobacillus plantarum* застосовують для більшого вмісту молочної кислоти і більш низького рівня рН при силосуванні люцерни [12]. *Lactobacillus* використовують також в якості пробіотиків для вигодовування свиней, оскільки здатні до запобігання шлунково-кишкових інфекцій, що сприятиме покращенню показників їх росту та накопиченню маси туші. Також є дослідження, які підтверджують, що лактобацили здатні регулювати імунну систему хазяїна, покращувати метаболічні можливості кишківника та підтримувати баланс в мікробіоті кишківника [12].

Також вчені досліджували вплив *Lactobacillus* на шлунково-кишковий тракт (ШКТ) курчат, оскільки вони є важливими автохтонними резидентами їх організму [13]. Було відмічено, що введення пробіотичних бактерій може привести до колонізації їх в ШКТ курчат перед першим контактом з мікроорганізмами навколишнього середовища утворюючи захисну поверхню, в якій будуть накопичуватися метаболіти (молочна кислота, бактеріоцини), що проявлятимуть антимікробні властивості відносно патогенних мікроорганізмів. Це важливо, тому що може бути профілактикою сальмонельозу курчат та бути альтернативною заміною антибіотиків. Також це сприятиме процесам що відносяться до розвитку і формуванню імунної системи птахів. Крім того *Lactobacillus* покращують процеси травлення курчат, що позитивно впливатиме на коефіцієнт конверсії корму та призведе до кращого приросту м'яса [13].

Висновки. В статті показано, що використання бактерії роду *Lactobacillus* в медицині та ветеринарії є актуальним, оскільки вони здатні утворювати молочну, оцтову кислоти, перекис водню, продукувати лізоцим і речовини з антибіотичною

Продовження Додатку Б

активністю: реутерін, плантаріцин, лактоцидін, лактолін. Також лактобацили за рахунок своїх метаболітів допомагають стимулювати шлункові соки і ферменти, необхідні для покращення процесів травлення, здатні зменшувати побічні ефекти антибіотиків, сприяти розщепленню солей жовчних кислот і нормалізації ліпідного обміну, захищають клітини епітелію від пошкоджень. Тому застосування препаратів пробіотичних мікроорганізмів роду *Lactobacillus* є одним з перспективних напрямків для нормалізації мікрофлори людини, тварин і птахів.

Література

1. Wu, C.T. Effects of immunomodulatory supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* on airway inflammation in a mouse asthma model [Text] / Wu C.T., Chen P.J., Lee Y.T., Ko J.L., Lue K.H. // J. Microbiol. Immunol. Infect – 2016. – Vol. 49, Issue 5. – P. 625–635. doi: 10.1016/j.jmii.2014.08.001.
2. Voloshyna, I.M. *Lactobacillus* bacteria: biological and therapeutic properties [Text] / I.M.Voloshyna, L.V.Shkotova, S.O.Skorokhod, I.Ye.Appolonova, N.M.Zholobak // Mikrobiol. Z., 2019, Vol 81., № 6. – P. 131-146. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.06.131>.
3. Kim, M.S. A probiotic combination attenuates experimental colitis through inhibition of innate cytokine production [Text] / Kim M.S., Byun J.S., Yoon Y.S., Yum D.Y., Chung M.J., Lee J.C. // Benefic. Microbes. – 2017. – Vol. 8, Issue 2. – P.231 – 241. doi: 10.3920/BM2016.0031.
4. Tetili, F., Anti-staphylococcal enterotoxinogenesis of *Lactococcus lactis* in algerian raw milk cheese [Text] / Tetili F., Bendali F., Perrier J., Sadoun D. // Food Technol. Biotechnol. – 2017. – Vol. 55, Issue 4. – P.511 – 518. doi: 10.17113 /ftb.55.04.17.5105.
5. Wu, Z. Peptidoglycan diversity and anti-inflammatory capacity in *Lactobacillus strains* [Text] / Wu Z., Pan D., Guo Y., Sun Y., Zeng X. // Carbohydr. Polym. – 2015. – Vol. 128. – P.130–137. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.026.
6. Dao, M.C. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology [Text] / Dao M.C., Everard A., Aron-Wisnewsky J., Sokolovska N., Prifti E., Verger E.O., et al. // Gut. – 2016. – Vol. 65, Issue 3. – P. 426–436. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308778.
7. Voloshyna, I.M. Bacteriocins *Lactobacillus* – an alternative to antimicrobial drugs [Text] / Voloshyna, I.M., Soloshenko, K.I., Krasinko, V.O., Lych, I.V., Shkotova, L.V. // Biopolymers and Cell, 2021, 37(2), P. 85–97 doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A4E>.

Продовження Додатку Б

8. Panzer, A.R. Influence and effect of the human microbiome in allergy and asthma [Text] / Panzer A.R., Lynch S.V. // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2015. – Vol. 27, Issue 4. – P. 373–380. doi: 10.1097/BOR.000000000000191.
9. Lei, M. The effect of probiotic *Lactobacillus casei* Shirota on knee osteoarthritis: a randomised double-blind, placebo-controlled clinical trial [Text] / Lei M., Guo C., Wang D., Zhang C., Hua L. // *Benef. Microbes.* – 2017. – Vol. 8, Issue 5. – P. 697-703. doi: 10.3920/BM2016.0207.
10. Amdekar, S. *Lactobacillus acidophilus* maintained oxidative stress from reproductive organs in collagen-induced arthritic rats [Text] / Amdekar S, Singh V. // *J Hum Reprod Sci.* – 2016. – Vol. 9, Issue 1. – P. 41-46. doi: 10.4103/0974-1208.178638.
11. Jiang, M. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk [Text] / Jiang M., Zhang F., Wan C., Xiong Y., Shah N.P., Wei H., Tao X. // *J. Dairy Sci.* – 2016. – Vol. 99, Issue 3. – C. 1736-1746. doi: 10.3168/jds.2015-10434.
12. Valeriano, V.D.V. Probiotic roles of *Lactobacillus* sp. in swine: insights from gut microbiota [Text] / Valeriano V.D.V., Balolong M.P., Kang D.-K. // *J. of Appl. Microbiology.* – 2017. – Vol. 122, Issue 3. – P. 554–567. doi: 10.1111/jam.13364.
13. Lebeer, S. FISH analysis of *Lactobacillus* biofilms in the gastrointestinal tract of different hosts [Text] / Lebeer S., Verhoeven T.L.A., Claes I.J.J., Hertogh G. De., Vermeire S., Buyse J., Immerseel F. Van, Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J. // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2011. – Vol. 52, Issue 3. – P. 220–226. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02994.x.

References

1. Wu, C.T., Chen, P.J., Lee, Y.T., Ko, J.L., Lue, K.H. (2016). Effects of immunomodulatory supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* on airway inflammation in a mouse asthma model. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 49 (5), 625 – 635. doi: 10.1016/j.jmii.2014.08.001.
2. Voloshyna, I.M., Shkotova, L.V. Skorokhod, S.O. Appolonova, I.Ye. Zholobak N.M. (2019) *Lactobacillus* bacteria: biological and therapeutic properties. *Mikrobiol. Z.*, 81 (6), 131-146. doi: <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj81.06.131>.
3. Kim, M.S., Byun, J.S., Yoon, Y.S., Yum, D.Y., Chung, M.J., Lee, J.C. (2017). A probiotic combination attenuates experimental colitis through inhibition of innate cytokine production. *Benefic. Microbes*, 8 (2), 231–241. doi: 10.3920/BM2016.0031.
4. Tetili, F., Bendali, F., Perrier, J., Sadoun, D. (2017). Anti-staphylococcal enterotoxinogenesis of *Lactococcus lactis* in algerian raw milk cheese. *Food Technol. Biotechnol.*, 55 (4), 511 – 518. doi: 10.17113/ftb.55.04.17.5105

Продовження Додатку Б

5. Wu, Z., Pan, D., Guo, Y., Sun, Y., Zeng, X. (2015). Peptidoglycan diversity and anti-inflammatory capacity in *Lactobacillus strains*. *Carbohydr. Polym.*, 128, 130–137. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.026.
6. Dao, M.C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E.O., et al. (2016). *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*, 65 (3), 426–436. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308778.
7. Voloshyna, I.M., Soloshenko, K.I., Krasinko, V.O., Lych, I.V., Shkotova, L.V. (2021) Bacteriocins *Lactobacillus* – an alternative to antimicrobial drugs. *Biopolymers and Cell*. 37(2), 85–97 doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A4E>
8. Panzer, A.R., Lynch, S.V. (2015). Influence and effect of the human microbiome in allergy and asthma. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 27 (4), 373–380. doi: 10.1097/BOR.000000000000191.
9. Lei, M., Guo, C., Wang, D., Zhang, C., Hua, L. (2017). The effect of probiotic *Lactobacillus casei* Shirota on knee osteoarthritis: a randomised double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Benef. Microbes.*, 8 (5), 697 – 703. doi: 10.3920/BM2016.0207.
10. Amdekar, S, Singh, V. (2016). *Lactobacillus acidophilus* maintained oxidative stress from reproductive organs in collagen-induced arthritic rats. *J Hum. Reprod Sci.*, 9 (1), 41-46. doi: 10.4103/0974-1208.178638.
11. Jiang, M., Zhang, F., Wan, C., Xiong, Y., Shah, N.P., Wei, H., Tao, X. (2016). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *J. Dairy Sci.*, 99 (3), 1736-1746. doi: 10.3168/jds.2015-10434.
12. Valeriano, V.D.V., Balolong, M.P., Kang, D.-K. (2017). Probiotic roles of *Lactobacillus* sp. in swine: insights from gut microbiota. *J. of Appl. Microbiology*, 122 (3), P. 554–567. doi: 10.1111/jam.13364.
13. Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Claes, I.J.J., Hertogh, G. De., Vermeire, S., Buyse, J., Immerseel, F. Van, Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J. (2011). FISH analysis of *Lactobacillus* biofilms in the gastrointestinal tract of different hosts. *Lett. Appl. Microbiol.*, 52 (3), 220–226. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02994.x.