

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: «Виділення та ідентифікація молочнокислих бактерій з
кисломолочних продуктів»

Виконав: студент 2 курсу, групи МгБТ-21
спеціальності 162 Біотехнології
та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
високомолекулярних сполук
Сабріна НЕВМИВАКА
Керівник: к.б.н., Любов ЗЕЛЕНА
Рецензент: к.б.н., Ігор ГРЕЦЬКИЙ

Київ 2022

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

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

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології, шкіри та хутра

_____ Олена МОКРОУСОВА
«__» _____ 2022 року

ЗАВДАННЯ
НА ДИПЛОМНУ МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Невмивака Сабріни Сергіївни

1. Тема роботи: **Виділення та ідентифікація молочнокислих бактерій з кисломолочних продуктів.**

Науковий керівник роботи Зелена Любов Борисівна, к.б.н.
затверджені наказом закладу вищої освіти
від «28» вересня 2022 року № 180-уч.

2. Строк подання студентом роботи _____

3. Вихідні дані до роботи: завдання на дипломну магістерську роботу; наукова література щодо властивостей молочнокислих бактерій, характеристики *Lactobacillus*, результати експериментів, які отримані у лабораторії під час роботи з *Lactobacillus*; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

4. Зміст дипломної роботи (перелік питань, які потрібно розробити): вступ, огляд літератури, експрементальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки.

5. Консультанти розділів дипломної магістерської роботи

Розділ	Ім'я, прізвище та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1	Зелена Любов Борисівна, кандидат біологічних наук		
Розділ 2	Зелена Любов Борисівна, кандидат біологічних наук		
Розділ 3	Зелена Любов Борисівна, кандидат біологічних наук		
Висновки	Зелена Любов Борисівна, кандидат біологічних наук		

6. Дата видачі завдання 12.09.2022 р.**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№ з/п	Назва етапів дипломної магістерської роботи	Терміни виконання етапів	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Огляд літератури		
3	Розділ 2 Об'єкт, мета та методи дослідження		
4	Розділ 3 Експериментальна частина		
5	Висновки		
6	Оформлення дипломної магістерської роботи (чистовий варіант)		
7	Здача дипломної магістерської роботи на кафедру для рецензування (за 14 днів до захисту)		
8	Перевірка дипломної магістерської роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		
9	Подання дипломної магістерської роботи на затвердження завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

Студент

Сабріна НЕВМИВАКА

Науковий керівник роботи

Любов ЗЕЛЕНА

Директор НМЦУПФ

Олена ГРИГОРЕВСЬКА

АНОТАЦІЯ

Сабріна НЕВМИВАКА. Виділення та ідентифікація молочнокислих бактерій з кисломолочних продуктів.

Дипломна магістерська робота за спеціальністю 162- Біотехнології та біоінженерія. Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2022 рік. – Рукопис

В дипломній магістерській роботі розглянуто існуючі та нові способи виділення та ідентифікації молочнокислих бактерій, проаналізовано їх недоліки та переваги.

Проведено аналіз умов, при яких відбувається виділення бактерій та методи і засоби, за якими їх можна ідентифікувати. Наведено результати власних досліджень із застосуванням методів кількісного та якісного аналізу продуктів харчування.

Для оцінки різноманіття мікроорганізмів, наявних у відібраних зразках молока, кефіру та сметани, а також для детекції, ідентифікації та аналізу молочнокислих бактерій у дослідженні були використанні методи мікробіологічного та цитологічного аналізу, ампліфікація з родо- та видоспецифічними праймерами, метод кількісної ПЛР.

Отримані результати виявили, що за кількісними показниками найбільше мікроорганізмів міститься у сметані, найменше – у молоці. Аналіз антагоністичної активності та резистентності до антибіотиків показав, що всі відібрані молочнокислі бактерії були чутливими до антибіотиків, а половина штамів проявила антагоністичну активність по відношенню до патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів. ПЛР-аналіз показав, що відібрані штами відносяться до родів *Lactobacillus* і *Enterococcus*, а абсолютна кількість останніх у молоці, кефірі та сметані не відрізняється.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, Lactobacillus, Enterococcus, резистентність до антибіотиків, ПЛР-аналіз.

ANNOTATION

Sabrina NEVMYVAKA. Isolation and identification of lactic acid bacteria from dairy products.

Diploma master's work in the specialty 162- Biotechnology and bioengineering. Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2022 - Manuscript

In the diploma master's work the existing and new methods of isolation and identification of lactic acid bacteria are considered, their disadvantages and advantages are analyzed.

The conditions under which bacteria are isolated and the methods and means by which they can be identified are analyzed. The results of own research with the use of methods of quantitative and qualitative analysis of food products are presented.

To evaluate the microorganisms' diversity presented in the selected samples of milk, kefir and sour cream, as well as to detect, identify and analyze lactic acid bacteria, the methods of microbiological and cytological analysis, amplification with genus- and species-specific primers, quantitative PCR were used in the research.

The results obtained revealed that the highest number of microorganisms were in sour cream, the lowest were in milk according to the quantitative values. Analysis of antagonistic activity and antibiotic resistance showed that all selected lactic acid bacteria were sensitive to the antibiotics and a half of the strains demonstrated antagonistic activity against pathogenic and relatively pathogenic microorganisms. PCR-analysis showed that the selected strains belonged to *Lactobacillus* and *Enterococcus* genera, and an absolute number of the latter in milk, kefir and sour cream was not differ.

Keywords: lactic acid bacteria, Lactobacillus, Enterococcus, antibiotic resistance, PCR-analysis.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1 Молочнокислі бактерії: характеристика та властивості.....	11
1.2. Метаболічна активність молочнокислих бактерій.....	16
1.2.1 Метаболізм вуглеводів.....	16
1.2.2 Метаболізм білків.....	17
1.2.3 Ліпідний обмін.....	19
1.2.4 Інша метаболічна активність.....	20
1.3. Біохімічне середовище молочнокислих бактерій.....	22
1.3.1 Вуглеводи.....	23
1.3.2 Амінокислоти та пептиди.....	24
1.3.3 Жирні кислоти.....	26
1.3.4 Вітаміни.....	27
1.3.5 Буферні агенти.....	28
1.4. Молочнокислі бактерії: обмеження та проблеми.....	28
1.4.1 Формування живильного середовища.....	29
1.4.2 Вивчення харчових потреб.....	31
1.4.3 Контроль та оптимізація метаболічної активності.....	33
1.4.4 Зниження життєздатності та функціональності під час зберігання.....	35
Висновки до розділу 1.....	36
РОЗДІЛ 2 ОБ’ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	38
2.1. Методи мікробіологічного аналізу.....	38
2.1.1. Поживні середовища та умови культивування мікроорганізмів.....	38
2.1.2. Визначення антагоністичних властивостей.....	45
2.1.3. Визначення чутливості до антибіотиків	46
2.1.4. Статистична обробка результатів.....	47
2.2. Молекулярно-генетичний аналіз.....	47
2.2.1. Детекція молочнокислих бактерій у молочнокислих продуктах.....	47

2.2.2. Видова ідентифікація молочнокислих бактерій.....	49
Висновки до розділу 2.....	50
РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	52
3.1 Мікробіологічний аналіз мікробіому молочних та кисломолочних продуктів.....	52
3.2 Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій.....	52
3.3 Стійкість молочнокислих бактерій до антибіотиків.....	53
3.4 Молекулярно-генетичний аналіз молочнокислих бактерій.....	55
Висновки до розділу 3.....	60
ВИСНОВКИ	62
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	63
ДОДАТКИ.....	72

ВСТУП

Актуальність теми кваліфікаційної роботи полягає в дослідженні якісного та кількісного складу молочних та кисломолочних продуктів, у необхідності методів детекції та ідентифікації мікробного різноманіття у харчових продуктах.

Наукова новизна роботи полягає в оптимізації методу якісного та кількісного аналізу молочнокислих бактерій у харчових продуктах без необхідності їх культивування.

Метою роботи є дослідити різноманіття молочнокислих бактерій у зразках молока, кефіру та сметани комерційного виробництва з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з родоспецифічними праймерами.

Об'єкт дослідження – різноманіття мікробного складу кисломолочних продуктів.

Предмет дослідження – властивості молочнокислих бактерій, виділених з молока, кефіру та сметани, кількісний склад кисломолочних продуктів.

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

1. Проаналізувати мікробіом молочних та кисломолочних продуктів (молоко, кефір, сметана) з використанням методів мікробіологічного аналізу.
2. Дослідити антагоністичні властивості та чутливість до антибіотиків молочнокислих бактерій, виділених зі зразків молока, кефіру та сметани.
3. Визначити та ідентифікувати штами молочнокислих бактерій, виділених з молочних та кисломолочних продуктів.
4. Провести кількісну оцінку бактерій роду *Enterococcus* у зразках молока, кефіру та сметани.

Методи дослідження: мікробіологічні, цитологічні, методи молекулярно-генетичного аналізу (якісна та кількісна полімеразна ланцюгова реакція).

Практичне значення отриманих результатів полягає в оптимізації застосування швидких методів детекції та ідентифікації молочнокислих бактерій у кисломолочних продуктах. Застосування цих методів дозволить здійснювати якісний та кількісний аналіз, а також проводити швидкий моніторинг молочнокислих бактерій у продуктах харчування.

Апробацію результатів проведено через їх оприлюднення на II міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології», що відбулась у м.Харків 20 травня 2022 р. (Додаток А).

Публікації. Результати досліджень опубліковано в одних тезах збірника матеріалів науково-практичної конференції та статті у журналі (Додаток Б).

Бібліографія опублікованих робіт включає:

1. Nevmyvaka S.S., Tkachuk N.V., Zelena L.B. Molecular-genetic analysis of lactic acid bacteria compositions in fermented food. Проблеми та досягнення сучасної біотехнології: матеріали II міжнародної наук.-практ. інтернет-конф., 2022. С.39,40.
2. Zelena L., Tkachuk N., Okhmat O., Nevmyvaka S. Quantitative analysis of enterococci isolated from dairy products. *Biota. Human. Technology*. 2022. Vol. 2 (прийнята до друку).

Структура і обсяг магістерської роботи. Основна частина дипломної магістерської науково-дослідницької роботи викладена на 62 сторінках, і включає три основні розділи та висновки. В роботі представлено список використаних джерел, що налічує 69 найменувань публікацій вітчизняних та зарубіжних дослідників. В роботі представлено додатки, що ілюструють виконання індивідуального плану магістра.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Молочнокислі бактерії: характеристика та властивості

Молочнокислі бактерії (МКБ) належать до важливих груп бактерій, що приносять користь для здоров'я людини, тварин і рослин . Використання LAB у ферментації харчових продуктів є одним із давніх відомих методів збереження харчових продуктів. Такі властивості, як харчова, екологічна та адгезійна адаптація, надали LAB можливість адаптуватися та бути присутніми в різних середовищах, починаючи від харчових матриць, таких як молочні продукти, м'ясо, овочі, хліб на заквасці та вино, та закінчуючи поверхнями слизових оболонок людини, такими як ротова порожнина, піхву та шлунково-кишковий тракт. МКБ відомі своїми вибагливими потребами в харчуванні, які можуть варіюватися залежно від виду і навіть штаму . Штами молочнокислих бактерій також відомі як швидкозростаючі мікроорганізми, які можуть досліджувати різні метаболічні активності. Метаболічна активність пов'язана з виробництвом багатьох корисних сполук, таких як органічні кислоти та проти-мікробні сполуки, унікальні ферменти, які можуть розщеплювати складні органічні сполуки до простих функціональних сполук.

Метаболічна активність молочнокислих бактерій, необхідна для виживання і росту, також важлива для будь-якого застосування. Основною метаболічною активністю в МКБ є розщеплення вуглеводів і споріднених сполук з отриманням здебільшого енергії та молекул вуглецю . Проте протеїназна та пептидазна активність молочнокислих бактерій привернула велику увагу через їхню важливість для прискореного дозрівання та модифікації ферментів різних харчових продуктів, особливо сиру. Інші метаболічні активності, включно з ліполізом і розкладанням складних сполук, таких як поліфеноли та лавони, відіграють важливу роль у харчовій промисловості та здоров'ї людини. Однак метаболічна активність молочнокислих бактерій природним чином не оптимізована для максимальної швидкості виробництва біотехнологічно

важливих сполук. На ріст і метаболічну активність молочнокислих бактерій можуть впливати як біохімічні, так і біофізичні умови. Біохімічне середовище стає доступним через поживні середовища, які використовуються для росту бактерій і називаються поживними речовинами або потребами в поживних речовинах. Залежно від особливих потреб у живленні конкретних видів LAB було розроблено велике розмаїття поживних середовищ для різних цілей і застосувань. Координація факторів росту та оптимізація потреб у живленні може гарантувати, що необхідні ферменти та правильна кількість кожної корисної сполуки продукуються в будь-який момент часу. Знання факторів, що впливають на метаболічну активність молочнокислих бактерій, важливе для оптимізації активності та досягнення кращого контролю процесів. Таким чином, було проведено велику кількість досліджень щодо взаємозв'язку між харчовими потребами молочнокислих молюсків і метаболічною активністю. Однак цей тип досліджень, пов'язаних із контролем метаболічної активності, стикається з багатьма обмеженнями і проблемами.

Останні кілька років зробили революцію в розробці дуже чутливих, швидких, автоматизованих методів молекулярного виявлення безлічі різних видів молочнокислих бактерій (МКБ), пов'язаних з харчовими продуктами і молочними продуктами. Нині багато таких штамів молочнокислих бактерій вважаються пробіотиками. Методи на основі геному корисні для ідентифікації бактерій як додатковий або альтернативний інструмент фенотипічним методам. За минулі роки методології ідентифікації з використанням праймерів, націлених на різні послідовності, як-от ген, що кодує рибосомну РНК (рРНК) 16S, міжгенну спейсерну ділянку 16S-23S рРНК, що кодує рРНК 23S, *recA* і *ldhD* гени; випадково ампліфікована поліморфна ДНК, поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів, денатуруючий градієнтний гель-електрофорез, температурний градієнтний гель-електрофорез, рестрикційний аналіз ампліфікації рДНК, рестрикційний аналіз ферментів, рРНК, гель-електрофорез у пульсуючому полі та поліморфізм довжини фрагменту ампліфікації відіграли значну роль у пробіотичній бактеріології. Отже, мета цього огляду полягає в

тому, щоб надати огляд деяких швидких і надійних молекулярних методів на основі полімеразної ланцюгової реакції, які використовуються для ідентифікації та диференціації близькоспоріднених видів і штамів молочнокислих бактерій, пов'язаних із харчовими продуктами та промисловістю.

У 20 столітті мікробні культури, які тисячі років використовували в харчових продуктах і спиртових ферментаціях, піддалися науковій перевірці щодо їхньої здатності запобігати і лікувати різні захворювання. Це призвело до появи терміна "пробіотики". Пробіотики - це "живі мікроорганізми, які при введенні в адекватних кількостях приносять користь здоров'ю господаря, покращуючи його мікробний баланс". 1 Молочнокислі бактерії (МКБ), тобто лактобацили та біфідобактерії, є звичайними мешканцями кишківника 2 та урогенітального тракту людини. Мікроби, які часто виділяють із кишечнику людини та тварин і вибирають як пробіотики, включають види родів Лактобактерії, Біфідобактерії та Ентерококи. Однак деякі інші молочнокислі бактерії, які зазвичай не мешкають у кишковому тракті, також іноді використовуються як пробіотики. Більшість цих бактерій використовуються в якості закваски в молочних продуктах і включають *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* і *Pediococcus*. різновид. Оскільки різні типи молочнокислих бактерій можуть по-різному впливати на мікрооточення кишківника людини, важливо визначити, які мікроорганізми присутні в мікробній екосистемі і які види з найбільшою ймовірністю мають потенційні захисні ефекти. Проте, точна ідентифікація цих бактерій на видовому рівні - непросте завдання. Ідентифікація ізолятів *Lactobacillus* за допомогою фенотипічних методів особливо складна, оскільки в деяких випадках потрібне визначення бактеріальних властивостей, окрім тих, які доступні у звичайних тестах ферментації.

За останні десятиліття низку штамів молочнокислих бактерій було включено до широкого спектру харчових продуктів для харчування людей і тварин. Оскільки здатність пробіотиків залежить від штаму, методи надійної ідентифікації молочнокислих бактерій на рівні штаму мають велике значення, особливо для контролю якості затверджених штамів, щоб уникнути ризику

для здоров'я і заяв, що вводять в оману, а також для опису нових штамів. У наші дні основна увага під час ідентифікації перемістилася з фенотипічних на генотипічні методи, оскільки останні дають більш чутливі та точні результати, як повідомляють для LAB кілька авторів.

Група LAB складається з низки родів бактерій: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* та *Microbacterium*, *Bifidobacterium* і *Propionibacterium*. 7 LAB були вперше виділені з молока 8 і відтоді були виявлені в харчових продуктах і ферментованих продуктах, таких як м'ясо, молочні продукти, овочі, напої та хлібобулочні вироби. LAB також століттями використовували як ароматизатор і текстурувальний агент, а також як консервант у харчових продуктах. LAB, такі як *Lactobacillus lactis* та *Streptococcus thermophilus*, пригнічують псування харчових продуктів і ріст патогенних бактерій, тим самим зберігаючи харчові якості сировини для тривалого зберігання. Останнім часом також обговорювалося використання метаболітів молочнокислих бактерій як біологічних консервантів у матеріалах для пакування харчових продуктів. Антимікробний ефект молочнокислих бактерій здебільшого пов'язаний з утворенням ними молочної та органічної кислоти, що призводить до зниження рН середовища зростання. Низький рН спричиняє перетворення органічних кислот на розчинні ліпіди, тим самим змушуючи їх дифундувати через клітинну мембрану в цитоплазму. LAB також продукують ацетальдегід, перекис водню, діацетил, двоокис вуглецю, полісахариди та бактеріоцини, деякі з яких можуть діяти як протимікробні препарати. LAB вважаються основною групою пробіотиків. Деякі лактобацили, лактококи та біфідобактерії вважаються корисними для здоров'я бактеріями. Однак мало що відомо про пробіотичні механізми кишкової мікробіоти. Загалом, LAB мають довгу історію безпечного використання в різних харчових продуктах. Таким чином, представники родів *Lactococcus*, *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* отримали статус "загальноновизнаних безпечних". Отже, кишкові бактерії, які найчастіше вивчаються для поте-

нційного використання як пробіотики, відносяться до родів *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* spp.

Молочнокислі бактерії (МКБ) складаються з гетерогенної групи грам-позитивних бактерій з строго бродильним метаболізмом, з якого молочна кислота є ключовим метаболітом. Природне середовище існування цих організмів є людина, тварини і рослини. Їх довга історія безпечного використання, яку зазвичай називають як статус GRAS (Generally Recognized As Safe - загально-визнаний як безпечний), у поєднанні з різноманітними цікавими метаболічними характеристиками призвели до широкого спектру промислового застосування

Через їх широке використання в харчовій ферментації і в якості харчових добавок, LAB були ретельно охарактеризовані за своїми метаболічними властивостями, ростом продуктивності, стійкості до промислових процесів, стійкості в кінцевому продукті та цільовому місці дії, термін придатності тощо. На додаток до досліджень, спрямованих на поліпшення технологічних аспектів, також безпека і якість контроль безпеки та якості мають вирішальне значення і, в ідеалі, повинні виконуватися на часто. У цьому контексті надійна ідентифікація ЛАГ залишається надзвичайно важливою. Протягом останнього десятиліття наукова спільнота приділяє особливу увагу правильній ідентифікації бактерій, що використовуються для споживання людиною, і існує широкий спектр методів ідентифікації методів ідентифікації, всі з яких демонструють відмінності в дискримінаційною здатністю, відтворюваністю та робочим навантаженням. А проблемою, що погіршує всі (промислові) ферментації, є забруднення процесу невідомими (екологічними) бактеріями, що призводить до втрати кінцевого продукту метаболітів, органолептичних властивостей, функціональності або (бактеріального) складу продукту.

1.2 Метаболічна активність молочнокислих бактерій.

Метаболічна активність LAB привернула велику увагу в дослідженнях і промисловості. Основна метаболічна активність молочнокислих бактерій полягає в розщепленні різних вуглеводів і споріднених сполук для отримання

енергії та молекул вуглецю. Інші метаболічні процеси, такі як розщеплення білків, ліпідів та інших сполук, також важливі для нормального росту. Таким чином, метаболічна активність МКБ може включати: метаболізм вуглеводів, метаболізм білків, метаболізм ліпідів та інші метаболічні активності.

1.2.1 Метаболізм вуглеводів

Вуглеводи є основним джерелом енергії для росту бактерій. LAB метаболізують вуглеводи в різні корисні сполуки (в основному молочну кислоту) за допомогою загального процесу, відомого як ферментація. Ферментація - це добре задокументований процес, тому в цей огляд було включено тільки короткий опис ферментації. Ферментація - це метаболізм цукру, під час якого енергія отримується внаслідок часткового окислення органічної сполуки з використанням органічних проміжних сполук як донорів і акцепторів електронів. Жодні зовнішні акцептори електронів не беруть участі; не потрібна мембрана або система перенесення електронів; і всі АТФ продукуються субстратним рівнем фосфорилування.

Відповідно до способу розщеплення вуглецевого скелета, що призводить до різних наборів кінцевих продуктів, у LAB було описано три основні шляхи ферментації гексоз. Ґрунтуючись на шляхах ферментації, молочнокислі бактерії можна розділити на дві фізіологічні групи: гомоферментативні (наприклад, *Lactococcus lactis*, *L. delbrueckii* і *L. casei*) і гетероферментативні (наприклад, *L. amylovorus*, *L. reuteri* і *L. manihotivorans*). Гомоферментативні МКБ метаболізують одну молекулу гексозних цукрів, таких як глюкоза, у дві молекули молочної кислоти і дві молекули АТФ, внаслідок чого виходить понад 85% молочної кислоти з однієї молекули глюкози. Гетероферментативні МКБ виробляють тільки 50% молочної кислоти, ферментуючи одну молекулу глюкози в одну молекулу молочної кислоти, одну молекулу етанолу/ацетату, одну молекулу CO₂ і тільки одну молекулу АТФ. Співвідношення ацетат/етанол залежить від окисно-відновного потенціалу системи. Різниця в продукції кислоти і зміні рН може бути використана як основа для диференціації цих двох груп МКБ. Що стосується дисахаридів та олігосахаридів, то вони

захоплюються за допомогою специфічних пермеаз, після чого всередині клітини розщеплюються на моносахариди, що підлягають фосфорилуванню. Наприклад, лактоза поглинається специфічною пермеазою і в більшості лактобацил розщеплюється β -галактозидазою з утворенням моносахариду.

1.2.2 Метаболізм білків

МКБ привернули велику увагу завдяки своїй протеолітичній активності, яка має особливе значення для прискореного дозрівання та ферментативної модифікації різних харчових продуктів, таких як сир. Протеоліз - це процес, під час якого білки розщеплюються протеїназами та пептидазами на поліпептиди, амінокислоти та пептиди. Протеїнази та пептидази можуть бути виявлені як позаклітинні та секретовані у вигляді вільних ферментів поза клітиною або внутрішньоклітинно всередині клітини. Протеолітичні системи молочно-кислих бактерій важливі як засоби отримання білків, пептидів, і амінокислоти, доступні для росту бактерій, але ці системи також можуть формувати реологічні та органолептичні властивості ферментованих харчових продуктів. Протеоліз був особливо добре задокументований щодо зростання лактобацил і лактококів у молоці, де вони значною мірою відповідальні за розвиток смаку під час виробництва сиру. Протеїназа також допомагає знизити алергічні властивості молока і молочних продуктів у дітей грудного віку, що може призвести до серйозної проблеми харчування, пов'язаної з білково-енергетичною недостатністю, але ці системи також можуть формувати реологічні та органолептичні властивості ферментованих харчових продуктів. Протеоліз був особливо добре задокументований щодо зростання лактобацил і лактококів у молоці, де вони значною мірою відповідальні за розвиток смаку під час виробництва сиру.

Протеїназа також допомагає зменшити алергічні властивості молока і молочних продуктів у дітей грудного віку, що може призвести до серйозної проблеми харчування, пов'язаної з білково-енергетичною недостатністю, але ці системи також можуть формувати реологічні та органолептичні властивості ферментованих харчових продуктів. Протеоліз був особливо добре задокуме-

нтований щодо росту лактобацил і лактококів у молоці, де вони значною мірою відповідальні за розвиток смаку під час виробництва сиру. Протеїназа також допомагає зменшити алергічні властивості молока та молочних продуктів у дітей грудного віку, що може призвести до серйозної проблеми харчування, пов'язаної з білково-енергетичною недостатністю, де вони значною мірою відповідають за розвиток смаку під час виробництва сиру. Протеїназа також допомагає зменшити алергічні властивості молока і молочних продуктів у дітей грудного віку, що може призвести до серйозної проблеми харчування, пов'язаної з білково-енергетичною недостатністю, де вони значною мірою відповідають за розвиток смаку при виробництві сиру. Протеїназа також допомагає знизити алергічні властивості молока і молочних продуктів у дітей грудного віку, що може призвести до серйозної проблеми харчування, пов'язаної з білково-енергетичною недостатністю. Зі штамів молочнокислих бактерій для виробництва сиру найдокладніше вивчені *L. helveticus* і *Lactococcus lactis*.

Багато пептидаз (наприклад, амінопептидаза С, амінопептидаза N, амінопептидаза А, X-пролілдіпептидиламідиламінопептидаза, пролідаза) було ідентифіковано та класифіковано. Ці пептидази сильно різняться між видами і навіть штамми молочнокислих бактерій. Протеолітичні системи молочнокислих бактерій складаються з трьох компонентів: 1) протеїнази, пов'язаної з клітинною стінкою, що ініціює розщеплення позаклітинного білка до олігопептидів, 2) транспортерів пептидів, що доставляють пептиди до клітини, та 3) внутрішньоклітинні пептидази, що розщеплюють пептиди на більш короткі пептиди та амінокислоти. Амінокислоти можуть бути далі перетворені на різноманітні смакові сполуки, такі як альдегіди, спирти та складні ефіри. Перевага прямого транспорту пептидів у клітину перед гідролізом полягає в зниженні кількості метаболічної енергії, використовуваної для поглинання амінокислот. Також вважається, що катаболізм амінокислот за допомогою LAB відіграє важливу роль у здатності отримувати енергію в умовах обмеженої кількості поживних речовин. Крім того, було показано, що протеїнази, транспортна система олігопептидів і пептидази розподіляються серед штамів МКБ нерів-

номірно, що, ймовірно, є результатом наявності або відсутності плазмід, які їх кодують.

У кількох оглядах описано протеолітичну систему молочнокислих бактерій щодо біохімічних і генетичних аспектів молочнокислих бактерій. Крім того, наразі анотовано понад 1000 повних геномних послідовностей бактерій, включно з 45 штамми молочнокислих бактерій. Ця робота уможливила ретельний порівняльний аналіз протеолітичних систем молочнокислих бактерій у масштабі геному. Маючи сучасні знання про протеолітичні процеси та геномні послідовності молочнокислих бактерій, ми можемо генетично сконструювати стартові молочнокислі бактерії та отримати бажану протеолітичну активність.

1.2.3 Ліпідний обмін

Метаболізм ліпідів являє собою розщеплення ліпідів ліпазами на жирні кислоти та гліцерин. Штами LAB мають внутрішньоклітинну або позаклітинну ліпазу. Крім того, штамми молочнокислих бактерій виконують унікальні реакції трансформації жирних кислот, включно з омеризацією, гідратацією, дегідратацією та насиченням. Ці функції можуть бути використані в харчовій промисловості та пробіотиках. Наприклад, ліполіз молочного жиру під дією молочнокислих бактерій являє собою основні біохімічні зміни в розвитку смаку сиру. Однак не всі штамми молочнокислих бактерій можуть метаболізувати ліпіди. Meyers та ін. (1996) провели скринінг понад 100 різних штамів молочнокислих бактерій на продукцію ліпази та ідентифікували лише 29 штамів, що продукують ліпазу.

Було показано, що ліпазна активність LAB забезпечує різну користь для здоров'я господаря. Ліпази корисні при приготуванні дієтичних складів для немовлят, літніх людей і тих, хто одужує. Дані на мишах, доклінічні та клінічні випробування показали, що лактобацили також можуть розщеплювати холестерин на ліпіди сироватки. Гіполіпемічний ефект *Lactobacillus* може бути пов'язаний із нижчою кишковою абсорбцією ліпідів або вищим катаболізмом ліпідів. Таранто та ін. припустили, що гіпохолестеринемічний ефект *L. reuteri*

може бути пов'язаний із гідролазною активністю солей жовчних кислот у клітинах. Крім того, LAB можуть виробляти кон'юговану лінолеву кислоту (CLA) з лінолевої кислоти. Кон'юговані жирні кислоти, такі як CLA, привернули велику увагу як новий тип біологічно корисних функціональних ліпідів. Було також виявлено, що рицинова олія, багата триацилгліцериновою формою рицинолеїнової кислоти, діє як субстрат для виробництва CLA за допомогою LAB за допомогою гідролізу триацилгліцерину, який каталізується ліпазою. Кон'юговані трієнові жирні кислоти можуть бути насичені LAB до транс-10, цис-15-18:2 і цис-6, транс-10-18:2 відповідно. Таким чином, деякі ізомери CLA знижують канцерогенез, атеросклероз і жирові відкладення.

1.2.4 Інша метаболічна активність

Штами LAB проявляють кілька інших метаболічних активностей, які вносять основний внесок в органолептичні зміни у ферментованих харчових продуктах, таких як смак, терпкість і колір, шляхом розщеплення різних органічних сполук у харчовій матриці. Ці ферменти також відіграють важливу роль у пробіотичних характеристиках молочнокислих бактерій, сприяючи цій низці переваг для здоров'я людей, тварин і рослин. МКБ метаболізують різні прості та складні функціональні сполуки, такі як терпеноїди, каротиноїди, стероли, поліфеноли та ізофлавоїни. Загалом ці комплексні функціональні сполуки відомі своєю користю для здоров'я, але вони недоступні для всмоктування в кишечнику. Метаболічний процес під час ферментації їжі або в кишечнику буде розкладати ці сполуки до більш дрібних метаболітів, які можуть бути поглинуті та приносити користь організму господаря.

Діацетил утворюється під час перетворення лимонної кислоти в молоці на піруват, а піруват перетворюється на α -актолактат, а потім на попередник діацетилю. Більшість штамів молочнокислих бактерій можуть декарбоксилувати α -ацетоллактат за допомогою α -ацетоллактатдекарбоксилази до кінцевого продукту метаболізму ацетоїну та ароматичних сполук, тоді як деякі штами молочнокислих бактерій не містять відповідального ферменту, що призводить до накопичення α -ацетоллактату та високого виробництва діацетилю в молоч-

них продуктах. Ацетальдегід робить основний внесок у присмак молочних продуктів і виробляється в основному компанією LAB. Крім того, МКБ можна використовувати для придушення росту шкідливих мікроорганізмів шляхом виробництва різних антимікробних сполук, включно з бактеріоцином, прокисом водню, вуглекислим газом і діактилом, на додачу до швидкого виробництва молочної кислоти. Wine LAB відіграє визначну роль у виробництві виноградних вин, де їхній ріст і метаболізм можуть позитивно або негативно впливати на якість вина. МКБ також можуть метаболізувати діацетил та ацетальдегід під час яблучно-молочного бродіння у вині та видаляти з вина охратоксин А.

LAB також можна використовувати для виробництва екзополісахаридів (EPS) під час ферментації, щоб забезпечити правильну реологію, текстуру та відчуття в роті ферментованої їжі. EPS може бути альтернативним низькокалорійним і недорогим інгредієнтом, який можна використовувати для виробництва гладенького та кремоподібного йогурту замість жиру, білка, цукру або стабілізатора. Однак на виробництво ЕПС з МКБ можуть впливати кисень, рН, температура та компоненти середовища, такі як оротова кислота та джерело вуглецю.

1.3 Біохімічне середовище молочнокислих бактерій

Бактерії, як правило, потребують відповідного біохімічного та біофізичного середовища для росту і прояву нормальної метаболічної активності. Біофізичні фактори довкілля, включно з температурою, рН, активністю води, окислювально-відновлювальним потенціалом і присутністю інгібуючих сполук, спричиняють широкий діапазон варіацій серед штамів молочнокислих бактерій. Біохімічні умови навколишнього середовища забезпечуються поживними речовинами в культуральному середовищі. МКБ відомі як вибагливі мікроорганізми, які не можуть рости на простих мінеральних середовищах, доповнених тільки джерелом вуглецю. На додаток до вуглеводів (джерела вуглецю) поживні середовища молочнокислих бактерій зазвичай доповнюють

різними вільними амінокислотами, пептидами, похідними нуклеїнових кислот, ефірами жирних кислот, мінералами, вітамінами та буферними агентами.

Харчові потреби класифікуються як основні, стимулюючі та необов'язкові. Необхідні поживні речовини чинять абсолютний вплив на ріст бактерій, і їхній ріст не може бути виявлений за відсутності цих поживних речовин. Стимулювальні поживні речовини посилюють ріст бактерій, а за відсутності цих поживних речовин спостерігається нижча швидкість росту. Незамінні поживні речовини не впливають на ріст бактерій, ні посилюючи, ні пригнічуючи. Однак поживні речовини, незалежно від того, чи є вони незамінними, стимулюючими або замінними, відіграють важливу роль в оптимізації та контролі метаболічної активності. Запропоновано використання відомих заквасок із технологічними та функціональними властивостями для оптимізації умов ферментації та поліпшення якості ферментованих харчових продуктів. За словами Лероя та інших, функціональні заквасочні культури можуть підвищити мікробну безпеку або представити органолептичні, технологічні та поживні характеристики харчових продуктів або переваг для здоров'я. Через важливу роль поживних речовин у метаболічній активності молочнокислих бактерій у цьому огляді приділяється більше уваги потребам молочнокислих бактерій у харчуванні.

1.3.1. Вуглеводи

Вуглеводи є основним джерелом вуглецю та енергії, які утворюють необхідні компоненти в середовищі МКБ для нормального росту та функціонування. Однак вуглець та енергію можна також отримати з білка, амінокислот та гліцерину. Більшість цукрів можуть бути використані молочнокислими бактеріями як джерела вуглецю та енергії, але глюкоза зазвичай надається перевага великій кількості штамів молочнокислих бактерій. Однак штами молочнокислих бактерій продемонстрували перевагу серед різних цукрів, і, таким чином, штами молочнокислих бактерій різняться за своєю здатністю ферментувати різні цукри, що може вплинути на їхній ріст і функціональність. Наприклад, *L. acidophilus* продемонстрував кращий ріст у разі заміни глюкози

мальтозою, саліцином, раффінозою або мелібіозою. *L. fermentum* показав найкращий ріст із мальтозою і значно відрізнявся від росту, отриманого з крохмалем, глюкозою та мелібіозою. *S. thermophilus* зазвичай потребує лактози, а не глюкози. *Oenococcus oeni* R1034, *O. oeni* R1054, *L. buchneri* CUC-3 і *L. hilgardii* МНР з вина показали найвищий максимальний питомий ріст і швидкість росту на середовищах із рибозою порівняно з глюкозою або фруктозою. *L. hilgardii* МНР не зростала в СДМ, що містив глюкозу або фруктозу як джерело вуглеводів, після трьох пересівань. Таким чином, на ріст і метаболічну активність молочнокислих бактерій можуть впливати доступні джерела вуглецю.

Відмінності в потребах у цукрі серед штамів молочнокислих бактерій можна використовувати для підрахунку, відбору та ідентифікації. МRS із додаванням фруктози підходив для підрахунку *L. bulgaricus*, а МRS із додаванням мальтози підходив для диференціації *L. acidophilus* і *L. paracasei*. Було виявлено, що МRS з додаванням мальтози підходить для підрахунку *L. acidophilus* і біфідобактерій. Було виявлено, що лактулоза, дисахаридне похідне лактози, підходить для підтримання високого рівня росту різних штамів *L. ruminis*. *L. casei* показав найвищу питому активність з розкладання фітатів, коли концентрація глюкози в живильному середовищі становила 2%, тоді як збільшення вдвічі концентрації глюкози різко знижувало ферментативну активність *L. casei*. Таким чином, навіть незважаючи на те, що глюкоза зазвичай використовується в середовищах для молочнокислих бактерій, види та навіть штами молочнокислих бактерій надають перевагу цукрам для оптимального росту та метаболічної активності. Концентрація цукрів також може впливати на ріст і функціональність молочнокислих бактерій.

1.3.2. Амінокислоти та пептиди

МКБ потрібно кілька амінокислот і пептидів для задоволення їхньої потреби в складному азоті. Вважається, що еволюція на складних багатих середовищах призвела до відбору специфічних ауксотрофів, які дуже сильно пов'язані з їхніми переважними умовами довкілля і розрізняються серед видів молочнокислих бактерій [4,13]. Амінокислоти і пептиди можуть бути отримані

за допомогою дії протеаз або протеолізу. У цих діях пептиди метаболізуються у вільні амінокислоти та інші сполуки подальшого використання. Відповідно до відмінностей у потребі в пептидах серед штамів молочнокислих бактерій пептиди можуть бути як незамінними факторами росту, так і стимулюючими факторами, а також деякі штами можуть рости без них. Потреба молочнокислих бактерій в амінокислотах залежить від штаму з широким спектром відмінностей між видами та плямами. Наприклад, для *L. plantarum* потрібно тільки 3 амінокислоти, в той час як для *L. acidophilus* потрібно 14 амінокислот. Letort і Juillard (2001) повідомили, що п'ять із шести різних штамів *S. thermophilus* не виявляють абсолютної потреби в амінокислотах, а пролін або гістамін необхідні тільки для одного штаму. Деякі амінокислоти (метіонон, цистеїн, лейцин і валін) виявилися стимулюючими для всіх шести штамів *S. thermophilus*, а інші амінокислоти (аспарагін, аланін, ізолейцин, гліцин, серин і треонін) виявилися несуттєвими. Дослідження потреби в амінокислотах для кількох видів лактобацил показало, що *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* і *L. delbrueckii subsp. lactis* висувають ширші вимоги, ніж *L. plantarum*, *L. pentosus* і *L. curvatus* [34,48]. Штами, що належать до *L. plantarum*, вимагають більш простого в поживному відношенні середовища. Таким чином, дефекти здатності до біосинтезу амінокислот у *L. plantarum* з більшим розміром геному менші, ніж у *L. johnsonii* з малим розміром геному.

Амінокислоти та пептиди можуть бути отримані з різних джерел органічного азоту, як-от знежирене молоко, переварене папаїном, дріжджовий екстракт, триптон (оброблений трипсином казеїн), соєві пептони, пептони тваринного походження, екстракт яловичини, кукурудзяний екстракт, екстракти печінки, сироватка, білкові гідролізати тощо. Однак; пептон, екстракт яловичини та екстракт дріжджів використовуються частіше і, мабуть, зручніші для нормального росту молочнокислих бактерій. Відомо, що ці джерела азоту містять широкий спектр амінокислот і пептидів, які можуть задовольнити потреби більшості штамів молочнокислих бактерій. Таким чином, заміна дріжджового екстракту на екстракт яловичини, казитон або глютен як інші джерела

азоту не збільшувала ріст порівняно з одним тільки дріжджовим екстрактом. Було виявлено, що заміна половини дріжджового екстракту або екстрактом яловичини, або екстрактом солоду знижує біомасу і продукцію бактеріоцину в *L. satai* CCUG 42687. Заміна триптоні бактеріологічним пептоном або соєйтоном сприяла зростанню і виробленню бактеріоцину, в той час як рибний гідролізат показав зниження росту *L. satai*. Коли пептон, екстракт яловичини та дріжджовий екстракт були замінені в харчовому середовищі на дріжджовий пептон, що виробляється з пекарських дріжджів, *L. plantarum* змогла рости, тоді як інші штами лактобацил, такі як *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* та *L. delbrueckii subsp. lactis*, не могли зрости. Таким чином, заміна екстракту яловичини, екстракту дріжджів і пептону іншими джерелами азоту або навіть один одним може негативно позначитися на зростанні.

Крім того, дріжджовий екстракт, екстракт яловичини та пептон є не тільки джерелами азоту; вони також є джерелами вуглецю, мінералів і вітамінів. Таким чином, доповнення джерел азоту розчином вітамінів або амінокислот не чинило позитивного впливу на ріст. Висока концентрація дріжджового екстракту (12 г/л) також може пригнічувати ріст молочнокислих бактерій у небуферизованому середовищі. Було виявлено, що використання бактеріологічного пептону або соїтону в середовищі для вирощування молочнокислих бактерій краще сприяє зростанню і продукції бактеріоцину порівняно з триптоном або рибним гідролізатом. Використання дріжджового екстракту та бактеріологічного пептону у високих концентраціях призводило до зниження росту штамів молочнокислих бактерій. Було виявлено, що високі концентрації триптоні (35 г/л) пригнічують ріст. Збільшення триптоні з 0,25 г/л до 5 г/л триптоні при збереженні інших чинників постійними не показало збільшення росту. Крім того, збільшення концентрації пептидів для складу цих амінокислот відрізняється від необхідного для збалансованого росту, що може обмежити поглинання незамінних пептидів і амінокислот і призвести до обмеження росту. Тому вкрай важливо включати збалансовані кількості дріжджового екстракту, екстракту яловичини та пептону до культуральних середовищ мо-

лочнокислих бактерій, щоб забезпечити відповідний рівень росту та кращу функціональність.

1.3.3. Жирні кислоти

Жирні кислоти являють собою карбонові кислоти (COOH) з коротким, середнім або довгим ланцюгом атомів вуглецю, які є насиченими або ненасиченими. Жирні кислоти зазвичай зв'язуються з іншими сполуками, такими як гліцерин, цукри або фосфати, з утворенням ліпідів. Ліпіди є компонентами клітинних структур (фосфоліпіди) і запасами енергії (тригліцериди). Жирні кислоти виконують безліч чітко визначених біологічних функцій; проте є обмежені дані про роль жирних кислот і жирів як факторів росту молочнокислих бактерій. Більшість досліджень взаємозв'язку між жирними кислотами та ростом мікроорганізмів, включаючи молочнокислі бактерії, продемонстрували протимікробну дію жирних кислот. Таким чином, жирні кислоти в цілому можуть пригнічувати ріст мікроорганізмів, але невеликі кількості, такі як 0,1% жиру, можуть стимулювати ріст бактерій.

Жирні кислоти з довшими вуглецевими ланцюгами зазвичай виявляють сильнішу інгібуючу дію, ніж жирні кислоти з коротшими ланцюгами, плюс ненасичені жирні кислоти, як правило, є більш інгібуючими, ніж насичені. Грампозитивні бактерії, такі як молочнокислі бактерії, більш чутливі до доголанцюгових жирних кислот, ніж грамнегативні бактерії. Інгібуюча дія жирних кислот більше залежить від рН. Крім того, незважаючи на те, що антимікробна дія жирних кислот добре вивчена, точний механізм, за допомогою якого жирні кислоти інгібують ріст бактерій, до кінця не визначений.

1.3.4. Вітаміни

Потребу молочнокислих бактерій у вітамінах можна розділити на три категорії: незамінні вітаміни, що спричиняють уповільнення росту на 67 %, якщо їх не приймати, стимулюючі вітаміни, що спричиняють уповільнення росту на 34-66 %, і замінні вітаміни, які спричиняють зниження менш ніж на 67 % у рості за опущення. Пантотенова, рибофлавінова і нікотинова кислоти необхідні для більшості штамів молочнокислих бактерій. При виключенні ри-

бофлавіну з мінімального середовища *L. plantarum* спостерігалось сильне інгібування росту. Тіамін необхідний для росту лактобацил на арабінозі, рибозі та глюконаті, діючи як кофактор фосфокетолази, ферменту, що бере участь у пентозофосфатному шляху. Біотин може бути стимулюючим фактором для росту деяких штамів молочнокислих бактерій або суттєвим фактором для інших штамів. Аскорбінова кислота не впливає на ріст деяких штамів МКБ, але це важливий фактор росту для інших штамів. Таким чином, очевидно, що потреби молочнокислих бактерій у вітамінах мають багато відмінностей між штамми, і деякі вітаміни можуть заміщати один одного; однак окремим штамам для нормального росту було потрібно від одного до чотирьох вітамінів.

1.3.5. Буферні агенти

МКБ виробляють кислоту (здебільшого молочну кислоту) під час росту, що знижує значення рН середовища і, таким чином, уповільнює або пригнічує ріст. Таким чином, важливо включати буферні агенти в живильне середовище. У більшості родів молочнокислих бактерій рН 4,4 може пригнічувати ріст або значно уповільнювати швидкість росту. Більшість штамів *Lactobacillus* ростуть за оптимального рН від 5 до 6, але вони також можуть рости за відносно низького рН (4,4). Таким чином, включення буферних агентів у культуральне середовище важливе для підтримання відповідного рН для росту молочнокислих бактерій. Ацетат натрію, тринатрійцитрат і динатрій-гліцерофосфат є важливими буферними агентами, що зазвичай використовуються в середовищах LAB, таких як MRS і M17. Виключення ацетату натрію з поживного середовища спричиняло зниження росту лактобацил через зниження рН середовища. Інші компоненти, що використовуються в MRS з буферною активністю, включають динатрійфосфат (Na_2HPO_4), цитрат амонію ($\text{NH}_4\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) і дикалійфосфат (K_2HPO_4).

1.4 Молочнокислі бактерії: обмеження та проблеми

LAB привернули підвищену увагу в дослідженнях і промисловості протягом останніх кількох десятиліть через більш широке застосування LAB,

особливо щодо пробіотиків. Характеристики росту і метаболічна активність LAB мають значний вплив на застосування. LAB висувають високі вимоги до харчування, яким потрібні складні поживні середовища для нормального росту і метаболічної активності. Вибагливі характеристики молочнокислих бактерій можуть вплинути на вивчення потреб у харчуванні та метаболічної здатності. Вибагливі потреби в харчуванні також можуть обмежувати здатність оптимізувати та контролювати метаболічну активність молочнокислих бактерій. Обмеження і проблеми, пов'язані з використанням і застосуванням МКБ, можуть стосуватися різних сфер, включно з формуванням середовищ для культивування, оптимізацією та контролем метаболічної активності, вивченням потреб у поживних речовинах і зниженням життєздатності й функціональності під час зберігання. LAB привернули підвищену увагу в дослідженнях і промисловості протягом останніх кількох десятиліть через ширше застосування LAB, особливо щодо пробіотиків. Характеристики росту і метаболічна активність LAB мають значний вплив на застосування. LAB висувають високі вимоги до харчування, яким потрібні складні поживні середовища для нормального росту і метаболічної активності. Вибагливі характеристики молочнокислих бактерій можуть вплинути на вивчення потреб у харчуванні та метаболічної здатності. Вибагливі потреби в харчуванні також можуть обмежувати здатність оптимізувати та контролювати метаболічну активність молочнокислих бактерій. Обмеження та проблеми, пов'язані з використанням і застосуванням МКБ, можуть стосуватися різних сфер, включно з формуванням середовищ для культивування, оптимізацією та контролем метаболічної активності, вивченням потреб у поживних речовинах і зниженням життєздатності та функціональності під час зберігання.

1.4.1 Формування живильного середовища

Було розроблено кілька поживних середовищ для забезпечення росту та метаболічної активності молочнокислих бактерій. Склад культурального середовища має низку факторів, які, як стверджується, впливають на ріст і функціональність LAB. Однак наявні середовища не задовольняли всім вимогам,

особливо тим, що стосувалися промислових і медичних застосувань. Наприклад, наявні середовища, такі як MRS і M17, дорогі, потребують певних етапів підготовки та тривалого часу інкубації. Вартість вважається найважливішим питанням щодо промислового використання середовища LAB. Вартість насамперед пов'язана з дорогими джерелами азоту, такими як екстракт яловичини, екстракт дріжджів і пептон. У результаті було проведено кілька досліджень зі зниження вартості поживних середовищ для молочнокислих бактерій із використанням недорогих матеріалів, таких як харчові побічні продукти, сільськогосподарська продукція та сільськогосподарські відходи. З цією метою сироватка і маслянка, знежирений яєчний жовток і автолізат дріжджів, сироватка, гідролізована папаїном, жом маніоки і жом цукрової тростини, ріг барана та багато інших недорогих інгредієнтів були досліджені. Багато з цих матеріалів показали значне поліпшення росту і функціональності молочнокислих бактерій порівняно з MRS при додаванні невеликої кількості поживних речовин. У нашій лабораторії солодка картопля, широко поширений сільськогосподарський продукт у штаті Північна Кароліна, була досліджена для заміни дорогих джерел азоту в середовищі для культивування молочнокислих бактерій. Наші результати показали, що солодка картопля може частково замінити дорогий інгредієнт у середовищі LAB і, таким чином, може стати альтернативним недорогим середовищем.

Крім вартості, склад носія містить низку факторів, які можуть вплинути на ріст і функціональність LAB. Ці обмеження включають доступність деяких основних молекул, які необхідні для клітинного метаболізму, вироблення органічних кислот, що спричиняють падіння рН середовища, що призводить до антимікробних ефектів, нестачу поживних речовин під час експоненціального росту, недостатню кількість основних мінералів, таких як Fe^{2+} та Ca^{2+} , які необхідні деяким штамам молочнокислих бактерій, та відсутність різних джерел вуглецю, які необхідні чи є переважними для деяких штамів молочнокислих бактерій. Ці обмеження пов'язані з тим фактом, що штами молочнокислих бактерій мають широкий діапазон варіацій у своїх вимогах до росту, що спри-

чиняє більшу складність під час формування загального середовища для вирощування молочнокислих бактерій.

Вибагливі характеристики молочнокислих бактерій, здатність штамів молочнокислих бактерій продукувати кислотні та протимікробні сполуки, а також відмінності в потребах у харчуванні серед штамів молочнокислих бактерій додали додаткові обмеження та проблеми щодо розробки загальних середовищ для вирощування. Крім того, метаболіти, що продукуються деякими штамми молочнокислих бактерій, можуть пригнічувати ріст інших штамів або навіть одного й того самого штаму, як у випадку продукції бактеріоцину. З іншого боку, низькі концентрації поживних речовин можуть призвести до швидкого виснаження основних поживних речовин, що може негативно вплинути на ріст.^{89]}, тоді як висока концентрація поживних речовин, таких як солі, також може негативно вплинути на ріст або бути нерозчинною у воді. Тому кілька досліджень були зосереджені на пошуку альтернативних способів зниження вартості доступних носіїв або на мінімізації негативних характеристик доступних носіїв, в той час як інші працювали над розширенням функціональності LAB за рахунок оптимізації складу середовища.

1.4.2 Вивчення харчових потреб

Складні середовища не можна використовувати для вивчення харчових потреб або метаболічної інженерії та метаболічної активності молочнокислих бактерій . Таким чином, було розроблено кілька CDM для різних дослідницьких цілей, включно з вивченням потреб у харчуванні, ідентифікацією специфічних характеристик і виділенням ауксотрофних мутантів . З цією метою CDM для підтримання високої щільності клітин лактококів, ентерококів і стрептококів, мінімальний CDM для експоненціального росту *S. thermophilus*, харчове середовище для культивування *L. Plantarum*, мінімальне середовище CDM для росту *L. plantarum*, CDM для росту *Leuconostoc mesenteroides* , селективне середовище для виділення лактобацил із фекалій , CDM для вин *Oenococcus*, *Lactobacillus* та *Pediococcus*, оптимізоване середовище для росту *L. sakei* та кілька інших CDM були розроблені. Проте, встановлення CDM

вимагає великих знань про харчові потреби відповідних видів або штамів при дослідженні.

Для визначення харчових потреб молочнокислих бактерій зазвичай виключають кожен компонент повного середовища. В експериментах з одноразовим пропусканням компоненти, для яких присутня біосинтетична здатність, можуть бути виключені без повного припинення росту. Крім того, вивчення харчових потреб молочнокислих бактерій може вимагати субкультивування культури кілька разів у новому середовищі або новій формулі для отримання бажаного росту. Наприклад, для отримання стабільної реакції росту під час культивування *O. oeni* R1034 і *L. hilgardii* MHP з вина в середовищі з дефіцитом фолієвої кислоти знадобилося вісім пересівань. Субкультивування може призвести до адаптації нового середовища або живильного середовища, що може призвести до помилкового висновку. Види з найменшим розміром геному мають найбільшу адаптацію до середовища, багатого поживними речовинами, а види з найбільшим розміром геному мають більш універсальне середовище існування. Феномен адаптації може призвести до того, що компонент, який відіграє стимулюючу або навіть суттєву роль у зростанні, вважатиметься несуттєвим.

Вивчення потреби у вітамінах для росту молочнокислих бактерій ускладнене, оскільки потреба молочнокислих бактерій у вітамінах є безліччю відмінностей між штамми, і деякі вітаміни можуть замінювати один одного. Зазвичай для нормального росту окремому штаму потрібно від одного до чотирьох вітамінів. Склад вітамінів був критичним моментом у рецептурі CDM для підтримки росту двох *O. oeni* і двох *Lactobacillus* spp. штамів із вина, оскільки кілька спроб росту на середовищах зі зниженим вмістом вітамінів не увінчалися успіхом. Ґрунтуючись на метаболічній мережі *L. plantarum*, було передбачено, що фолієва кислота, біотин і піридоксамін необхідні для росту. Вегкамп і його колеги показали, що видалення цих вітамінів не припиняло зростання *L. plantarum*, і, таким чином, Вегкамп і його колеги припустили, що ріст за відсутності біотину, піридоксаміну та фолієвої кислоти може бути по-

в'язаний з присутністю слідових кількостей цих вітамінів у середовищі або відбуваються альтернативні реакції, які не потребують цих вітамінів. Ці результати можуть створити ще одну проблему при визначенні необхідних вітамінів для реагуючих видів або штамів.

Для росту мікроорганізмів, включно з молочнокислими бактеріями, необхідні слідові кількості різних мінералів. Вивчення потреби МКБ у мінералах зазвичай спостерігається за ХДМ шляхом пропускання одного іона металу за раз. Однак комплексні дослідження потреби в мінералах для росту бактерій і метаболічної активності також складні й скрутні через кілька сезонів, зокрема через те, що метали можуть заміщати один одного, одні метали адсорбують інші, деякі метали по-різному взаємодіють з іншими, і багато органічних речовин можуть з'єднуватися з металами та робити їх недоступними для росту. Таким чином, всебічні дослідження і вивчення основних харчових потреб МКБ мають кілька обмежень, включно з вибагливими харчовими потребами МКБ; одні поживні речовини можуть замінювати інші; деякі поживні речовини можуть знадобитися тільки в присутності інших поживних речовин; здатність МКБ адаптуватися до різних харчових середовищ; і широкий діапазон відмінностей у харчових потребах серед штамів молочнокислих бактерій.

1.4.3. Контроль та оптимізація метаболічної активності

Для метаболічних досліджень МКБ бажано мати СДМ, що забезпечує відтворюваність хімічного складу; уникайте непотрібних поживних речовин і регулюйте рівень поживних речовин; задовольняйте експериментально встановлені потреби в живленні різних штамів; і підтримуйте зростання розумними темпами. З іншого боку, оскільки МКБ природним чином не оптимізовані для максимальної метаболічної активності, ферментативну активність МКБ необхідно оптимізувати і максимізувати для досягнення бажаного рівня продукції і бажаних кінцевих продуктів. Таким чином, багато побоювань було пов'язано з добором, поліпшенням, стабільністю або оптимізацією різних ферментів, що продукуються LАВ, для досягнення бажаного рівня активності. Ферментативна активність молочнокислих бактерій є природним процесом у

результаті нормального росту, тому склад живильного середовища може відігравати вирішальну роль у ферментативній активності молочнокислих бактерій.

Ріст і метаболічна активність молочнокислих бактерій мають вирішальне значення для виробництва та якості ферментованих харчових продуктів, а також для функціональності пробіотиків. Дослідження, пов'язані з ростом і метаболічною активністю молочнокислих бактерій, зазвичай проводять у лабораторних середовищах і лабораторних умовах, тоді як використання і застосування молочнокислих бактерій проводять у харчових продуктах, кормах або добривах. Умови вирощування в лабораторії можуть відрізнятися від доступних у промисловості. У зв'язку з цим було запропоновано вивчати ріст і метаболізм винних МКБ у природному для них середовищі вина. Однак, дослідження в галузі вина можуть бути найактуальнішими з практичного погляду, і ці дослідження можуть страждати від обмеженої застосовності до вин, виготовлених із різних сортів винограду, у різних регіонах або різних урожаїв.

Крім того, ріст у вині має тенденцію бути дуже повільним, в основному через комбіновану інгібуючу дію етанолу та органічних кислот. З іншого боку, за промислової ферментації МКБ можуть призводити до утворення сполук з негативними органолептичними властивостями, таких як β -D-глюкани. ріст у вині, як правило, є дуже повільним, здебільшого через комбіновану інгібуючу дію етанолу та органічних кислот. З іншого боку, за промислової ферментації МКБ можуть призводити до утворення сполук з негативними органолептичними властивостями, таких як β -D-глюкани. ріст у вині, як правило, дуже повільний, здебільшого через комбіновану інгібувальну дію етанолу та органічних кислот. З іншого боку, під час промислової ферментації МКБ можуть призводити до утворення сполук із негативними органолептичними властивостями, таких як β -D-глюкани та оцтової кислоти, а також продукти розпаду амінокислот, такі як асцитрулін, попередник канцерогенного етилкарбамату та біогенні аміни. Тому МКБ часто вивчають у складних лабораторних середовищах, які не містять цих інгібіторів, таких як MRS і M17, де досягається

гарний ріст, у той час як подібний ріст може бути не отриманий у промислових умовах. Також важливо відзначити, що культури в лабораторії вирощують у невеликій кількості, в той час як у промисловості культуру вирощують на об'ємних заквасочних середовищах.

Таким чином, CDM використовується для вивчення й оптимізації росту та метаболічної активності молочнокислих бактерій. При оптимізації ферментативної активності з високим коефіцієнтом контролю система моделювання може бути використана для вивчення дії ферменту у виробничих умовах. Таким чином, більше зростання важливості біоінженерії було відзначено в галузях застосування LAB. Однак між лабораторними дослідженнями та промисловим застосуванням все ще існує розрив, якому необхідно приділяти більше уваги.

1.4.4 Зниження життєздатності та функціональності під час зберігання

Життєздатність і функціональність LAB є серйозною проблемою, особливо коли йдеться про застосування пробіотиків. Хоча не всі штами молочнокислих бактерій є пробіотиками, більшість пробіотичних штамів належать до молочнокислих біфідобактерій. Було показано, що пробіотики гинуть у харчових продуктах під час розподілу та зберігання в холодильнику. Таким чином, було проведено кілька досліджень для підвищення життєздатності та функціональності пробіотиків під час зберігання. З цією метою раффіноза, фруктоолігосахариди, маніт, мальтодекстрин і пектин, інулін та інші інгредієнти були протестовані. В інших дослідженнях інкапсуляцію або мікрокапсулювання застосовували для захисту бактеріальних клітин від ушкоджень, спричинених зовнішнім середовищем, і для підтримання життєздатності. Під час ферментації харчових продуктів природа ферментованих харчових продуктів, така як склад (поживні речовини та антимікробні речовини), структура (проникність для кисню та активність води) і значення рН, можуть впливати на функціональність закваски. Взаємодії між різними штамми молочнокислих бактерій у процесі ферментації або зберігання також можуть

впливати на життєздатність і функціональність молочнокислих бактерій. Наприклад, напої з низьким значенням рН, нижчим за 4,4, у поєднанні з тривалим терміном зберігання можуть призвести до пошкодження молочнокислих бактерій. Інші обмеження та проблеми, такі як вибір штаму, рівень інокуляції, ріст і виживання під час обробки, обговорювалися більш детально в іншому місці. Однак у дослідженнях необхідно приділяти більше уваги життєздатності та функціональності LAB під час обробки, поширення та зберігання.

Висновки до розділу 1

Швидкозростаючі характеристики молочнокислих бактерій та їхня метаболічна активність використовуються в багатьох додатках у виробництві продуктів харчування, сільському господарстві та пробіотиках. Оскільки МКБ природним чином не оптимізовані для максимальної швидкості виробництва біотехнологічно важливих сполук, важливо оптимізувати, вибрати, стабілізувати та/або поліпшити метаболічні процеси щодо бажаних кінцевих продуктів. Таким чином, для максимізації ферментативної активності молочнокислих бактерій важливо оптимізувати та контролювати як біохімічні, так і біофізичні умови. Хоча біохімічні умови, найімовірніше, встановлені, контроль і оптимізація біохімічних умов мають багато обмежень і проблем. Біохімічні умови, включно зі стимулювальними, бажаними та незамінними поживними речовинами, мають значний вплив на ріст і метаболічну активність молочнокислих бактерій.

Однак одночасно можна було контролювати тільки кілька параметрів живлення, зберігаючи при цьому інші параметри постійними. Параметри харчування також можуть взаємодіяти один з одним, що призводить до помилкових результатів. Крім того, вибагливість молочнокислих бактерій, здатність штамів молочнокислих бактерій продукувати кислотні та антимікробні сполуки, а також відмінності в харчових потребах штамів молочнокислих бактерій можуть створювати додаткові обмеження та проблеми. Формування живиль-

ного середовища, яке може відповідати всім або навіть більшості параметрів і обмежень, як і раніше, залишається складним завданням. Відповідно, CDM пропонувалися в багатьох дослідженнях як альтернатива для вирішення різних проблем і обмежень. CDM, як і раніше, важливий для вивчення LAB, коли необхідно враховувати всі можливі субстрати і контролювати доступні джерела енергії, вуглецю і азоту, які можуть впливати на ріст і метаболізм. Однак промислові застосування LAB не мають місця в CDM, і тому результати CDM можуть бути неуспішними при застосуванні в промисловості. Оскільки лабораторні умови відрізняються від тих, які трапляються в промислових умовах, лабораторні результати можуть зіткнутися з різними перешкодами, коли справа доходить до промислового застосування. Таким чином, необхідно приділяти більше уваги оптимальному контролю ферментації, що призводить до поліпшеного виробництва деяких метаболітів, і метаболічній інженерії, яка може бути спрямована на управління метаболічним потоком у чітко визначеному напрямку, щоб краще відповідати промислому середовищу.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для проведення досліджень у роботі використовували зразки молочних та кисломолочних продуктів, промислового виробництва, а саме: молоко, кефір та сметану, виробництва одного й того ж підприємства. Придбані товари мали незакінчений термін придатності.

З кожного молочного та кисломолочного продукту відбирали 4 зразки об'ємом 1 мл. Два зразки відразу використовували для аналізу, а інші зберігали при температурі +4⁰С до завершення експерименту / терміну придатності.

Відібрані зразки молока, кефіру та сметани використовували для мікробіологічних та молекулярно-генетичних аналізів.

2.1 Методи мікробіологічного аналізу

2.1.1. Поживні середовища та умови культивування мікроорганізмів

Аналіз наявного мікробіому у зразках молока, кефіру та сметани, зокрема основних груп бактерій та грибів, проводили за допомогою висіву матеріалу на селективні поживні середовища. Один мл матеріалу розводили в 9 мл фізіологічного розчину та висівали на чашки Петрі з поживним середовищем по 1 мкл мікробіологічною петлею.

Поживні середовища, які використовували для аналізу: Ендо, МРС, Сабуро та кров'яний агар.

Середовище Ендо використовують для детекції та диференціювання ентеробактерій, грунтуючись на їх здатності ферментувати лактозу. Середовище містить барвник, який стимулює ріст грамнегативних мікроорганізмів та пригнічує ріст грампозитивних. В основі механізму дії середовища – здатність барвника фуксину формувати безбарвний комплекс з сульфітом. Тому розрізняють дві групи бактерій, що утворюють колонії на чашках з середовищем: бактерії з безбарвними колоніями: ті, що не ферментують лактозу, а також бактерії з червоними колоніями: ті, що ферментують лактозу та утво-

рюють альдегіди (альдегіди вступають у реакцію з сульфідом, внаслідок чого звільнений фуксин надає колоніям червоного забарвлення).

До складу середовища входить (на 1 л):

26,5 г поживного агару,

0,25 г лужного фуксину,

11 г цукру молочного,

0,5 динатрію фосфату,

0,9 г сульфід натрію безводного,

0,03 г натрію вуглекислого.

pH середовища доводили до 7,5.

Для приготування всі компоненти розчиняли в 1 л дистильованої води, кип'ятили, після чого фільтрували та знову доводили до кипіння, охолоджували до температури 45-50°C та розливали у стерильні чашки Петрі. Після застигання середовище підсушували у термостаті при температурі 37°C протягом 40 хв. Культивування матеріалу здійснювали при температурі 37°C впродовж 18-24 год.

Середовище МРС використовують для культивування молочнокислих бактерій. Середовище містило (л):

20 г декстрази,

8 г м'ясного екстракту,

4 г дріжджового екстракту,

2 г цитрату амонію,

0,2 г сульфату магнію,

10 г бактеріологічного агару,

10 г бактеріологічного пептону,

5 г ацетату натрію,

2 г K_2HPO_4 ,

1 г твіну 80,

0,05 сульфату марганцю; pH середовища доводили до 6,2.

Для приготування всі компоненти розчиняли в 1 л дистильованої води. Розчин перемішували, нагрівали та доводили до кипіння. Стерилізацію проводили при 121°C впродовж 15 хв. Потім середовище охолоджували до 45-50°C, перемішували та розливали в чашки Петрі. Культивування проводили при 37°C.

Кров'яний агар застосовують для культивування широкого спектру мікроорганізмів, що потребують складних умов для росту (стрептококи, стафілококи, пневмококи). Склад середовища (на 1 л):

10 г серцевої витяжки,

10 г пептону,

5 г хлориду натрію,

15 г бактеріологічного агару; рН 7,3. Для приготування середовища всі компоненти перемішували в 1 л дистильованої води, нагрівали та доводили до кипіння до повного розчинення компонентів. Стерилізували 15 хв. при 121°C. Охолоджували та у стерильних умовах додавали 5 – 10% стерильної дефібрированої крові, щоб не утворювались бульбашки. Обережно перемішували та розливали у чашки Петрі. Досліджуваний матеріал культивували при 37°C.

Сабуро агар використовують для виділення та селективного культивування дріжджів та пліснявих грибів. Середовище містить наступні компоненти (на 1 л):

40 г глюкози,

15 г агару,

10 г пептону,

1 г дріжджового екстракту,

0,05 г хлорамфеніколу; доводимо рН до 5,6.

Глюкоза, що входить до складу поживного середовища є оптимальним субстратом для розвитку дріжджів, пептон – джерело азоту, а дріжджовий екстракт – джерело складних органічних сполук, необхідних для росту мікроорганізмів. Для приготування середовища компоненти розчиняли в 1 л дистильованої води, обережно помішуючи під час нагрівання. Після повного розчи-

нення компонентів середовище стерилізували при 121°C протягом 15 хв. Після охолодження середовище розливали у чашки Петрі. Культивування матеріалу проводили при 37°C.

У роботі також використовували середовище МПА (м'ясопептонний агар), який готували з м'ясопептонного бульйону (м'ясна вода, 1% сухий пептона та 0,5% хлорид натрію), з додаванням 2% агар-агару.

Належність ізольованих нами культур до родів *Enterococcus* і *Lactobacillus* встановлювали шляхом дослідження морфології клітин і колоній, забарвленням за Грамом, каталазної та нітратазної активності, рухливості і утворення газу із глюкози [2, 3, 4].

Приготування препаратів для мікроскопування.

Предметне та покривне скло, що вживається для приготування препаратів, потребують спеціальної підготовки. Скло повинно бути чистим і добре знежиреним. Це може бути досягнуто різними способами. Скло кип'ятять 15 хвилин в 1% розчині соди (або в мильній воді), споліскують водою, кладуть у слабку соляну кислоту і, нарешті, добре промивають водою.

Зберігають скло в судинах (банках) з притертими пробками в суміші рівних кількостей спирту та ефіру або в 96° спирті або промитими і витертими насухо.

Препарати для мікроскопування готують із колоній бактерій. У деяких випадках приготування препаратів нескладне, в інших – вимагає спеціальної техніки.

Найпростіше готують звані нативні препарати, т. е. об'єкти у їхньому природному вигляді. У цьому випадку матеріал наносять на предметне скло та покривають тонким покривним склом. Іноді його змішують з ізотонічним розчином хлориду натрію або гліцерином для розрідження, освітлення та запобігання висиханню.

Широко поширений метод фарбування препаратів для мікроскопії. Спосіб забарвлення залежить від особливостей досліджуваного матеріалу та мети дослідження.

Різні частини препарату сприймають фарбу по-різному, що робить їх чіткішими, дозволяє відрізнити один від одного окремі структури. Наприклад, мазки крові забарвлюються азур-еозином для підрахунку лейкоцитарної формули, фуксином - для підрахунку тромбоцитів, азуром II-для підрахунку ретикулоцитів.

Для бактеріоскопії - випромінювання під мікроскопом мікроорганізмів - існує велика кількість методів фарбування, у тому числі і складних - двома і більше барвниками.

Існує негативний метод забарвлення, т. е. забарвлюється тло препарату, у якому чітко видно незабарвлені мікроорганізми, наприклад бліда трепонема.

Препарат для мікроскопії не може бути товстим або щільним, оскільки світло повинне добре проходити крізь нього, тому приготування гістологічних препаратів із тканин потребує досить складної техніки. Дослідження бактерій у фарбованому вигляді дає можливість не лише вивчити їх морфологію, але і дозволяє судити про деякі деталі їх хімічної будови. Це досягається застосуванням спеціальних фарбувань. Найчастіше серед диференційованих фарбувань використовується метод за Грамом.

Метод фарбування за Грамом

Грамм метод - метод диференційованого фарбування бактерій, при якому одні бактерії фарбуються в темно-фіолетовий колір (грампозитивні бактерії), інші – в червоний чи рожевий (грамнегативні бактерії). Суть метода в тому, що хімічний склад оболонки і цитоплазми мікроорганізмів різний, вони по-різному фарбуються тими самими фарбами, що являється класифікаційною особливістю. У мікроорганізмів, що забарвлюються за Грамом, генціанвіолет у присутності йоду (розчин Люголя) в оболонці і цитоплазмі утворює стійку сполуку, що не руйнується спиртом протягом 30 хвилин, тому вони залишаються фіолетовими. Клітини видів, що не забарвлюються за Грамом, цими властивостями не володіють, і спирт знебарвлює їх, а при наступному дофарбуванні фуксином вони набувають червоного кольору.

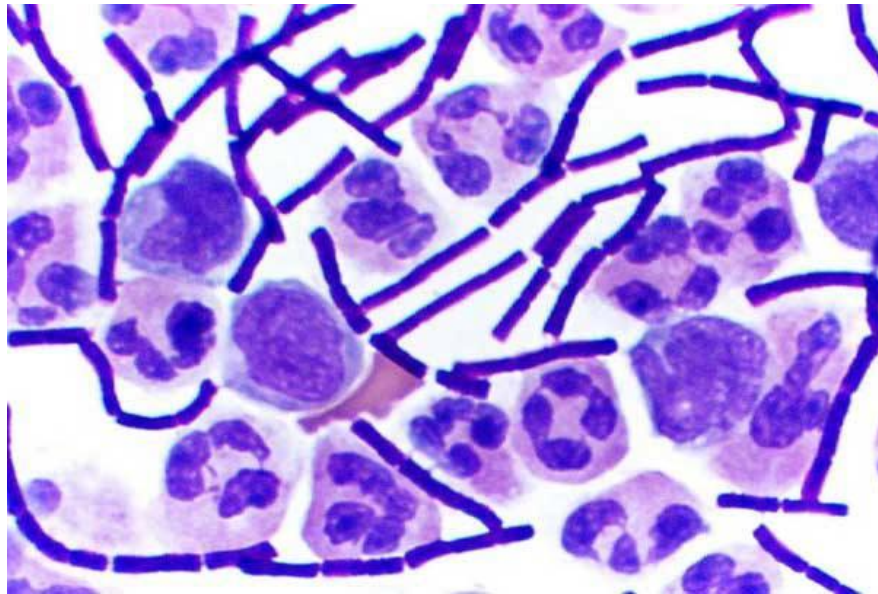


Рис.2.1 – Забарвлення за Грамом родів *Enterococcus* і *Lactobacillus*

Клітинна стінка (оболонка) бактерій – структура бактерій і грибів, що розташована між цитоплазматичною мембраною і капсулою (якщо така є), або іонізованим шаром зовнішнього середовища. Має товщину від 10 до 35 нм. Головним і специфічним компонентом для клітинної стінки є муреїн, або пептидоглікан.

У грам⁺ бактерій клітинна стінка на 80% складається з пептидогліканів, з'єднаних з тейхоевою кислотою. При електронному мікроскопуванні відносно однорідна.

Перед тим як розпочати фарбування, готують мазки досліджуваних бактерій. Для цього на предметне скло капають воду і бактеріальною петлею додають туди культуру мікроорганізмів. Потім, після повного висихання води, мазок фіксують – предметне скло проносять кілька разів над полум'ям пальника. Фарбування мазків за Грамом більш ефективно, ніж фарбування живих бактерій – з мертвими клітинами краще зв'язуються молекули барвника.

Фарбування проводиться в кілька етапів:

1. На фіксований мазок накладають невеликі шматочки фільтрувального паперу і наливають основний барвник – генціанвіолет або метиленовий синій.

2. Через 3-5 хвилин знімають пофарбовану фільтрувальний папір і заливають мазок розчином Люголя на 1 хвилину. При цьому препарат темніє.
3. Зливають розчин Люголя і обробляють мазок чистим етиловим спиртом: капають кілька крапель на препарат, через 20 секунд зливають. Процедуру повторюють 2-3 рази.
4. Промивають скло з досліджуваним препаратом дистильованою водою.
5. Проводять додаткове фарбування – дофарбовували препарат фуксином. Через 1-2 хвилини барвник змивають.
6. Після висихання води вивчають під мікроскопом мазок. Грампозитивні бактерії будуть мати синьо-фіолетовий колір, грамнегативні – рожевий або червоний.

При фарбуванні бактерій за Грамом грампозитивні бактерії забарвлюються у синьо-фіолетовий колір, а грамнегативні – в червоний або рожевий. Причина диференціального фарбування бактерій за цим методом полягає в тому, що після потрапляння в клітку розчинної форми генціанвіолета барвник переходить у нерозчинну йодну форму. Під час обробки бактерії етиловим спиртом під дією цього неполярного розчинника з мембрани екстрагуються ліпіди. Після цього мембрана стає пористою і більше не є суттєвою перешкодою для вимивання барвника. Однак пептидоглікан більш стійкий до дії неполярних розчинників, в тому числі і спирту. Саме він перешкоджає вимиванню барвника, тому бактерії з товстим муреиновим шаром забарвлюється в синьо-фіолетовий колір (грамположительно), і після обробки спиртом свій колір не змінюють.

Тонкий муреиновий шар грамнегативних бактерій не може втримати в клітці молекули барвника, тому після дії спирту вони стають безбарвними забарвлюються грамотрицательно.

Після впливу на мазок фуксином при фарбуванні за Грамом грампозитивні бактерії залишаються синьо-фіолетовими, а грамнегативні набувають рожево-червоний відтінок.

2.1.2. Визначення антагоністичних властивостей

Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій аналізували з використанням референс-штамів умовно патогенних мікроорганізмів: *Bacillus cereus* УКМ В-908 (АТСС 11778), *Escherichia coli* В-906 (АТСС 25922), *Candida albicans* Y-1918 (АТСС 885-653), *Proteus vulgaris* В-905 (АТСС 6896), *Pseudomonas aeruginosa* В-900 (АТСС 9027), *Staphylococcus aureus* В-904 (АТСС 25923), *Staphylococcus epidermidis* В-919 (АТСС 12228), *Klebsiella pneumoniae* В-920 (АТСС 10031), *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sv. abony УКМ В-921 (NCTC 6017). Дослідження проводили під керівництвом співробітників Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К. Заболотного НАН України.

Виявлення антагоністичних властивостей молочнокислих бактерій здійснювали з використанням методу відстроченого антагонізму, антагоністичну активність визначали за методикою перпендикулярних штрихів [5]. Метод полягає у тому, що на поверхню середовища МРС у чашці Петрі штрихом наносили досліджуваній штам, посів робили по всій чашці. Досліджуваній штам культивували впродовж доби при 37°C, після чого перпендикулярно до досліджуваного штаму, який виріс, підсівали референс-штами. Культивування продовжували впродовж 48 год. при 37°C.

Також використовували іншу методику. У чашці Петрі з МПА середовищем видаляли смужку середовища, яку заливали охолодженим МРС середовищем. Чашки інкубували у термостаті при 37°C впродовж 1 год. для підсушування середовища. З добової культури молочнокислих бактерій готували суспензію клітин з концентрацією 10^9 КУО / мл та наносили на смужку МРС посередині чашки Петрі. Чашки культивували протягом доби при 37°C. Згодом на МПА середовище штрихами підсівали добові культури референс-штамів, перпендикулярно до культури на МРС та продовжували культивування при температурі 37°C. Аналіз результатів проводили після інкубування протягом доби. Використовували наступну шкалу активності: штами вважали нечутливими, з відсутньою антагоністичною активністю, якщо із зоною за-

тримки росту 0–4 мм, малочутливими, з помірною антагоністичною активністю – з зоною затримки росту у 5–10 мм, високочутливими, з сильною антагоністичною активністю – зона затримки росту становила більше 10 мм.

2.1.3. Визначення чутливості до антибіотиків

Аналіз чутливості бактерій до антибіотиків проводили з використанням диско-дифузійного методу. Аналізували чутливість до 10 антибіотиків: ампіцилін, цефепім, сизоміцину, нетилміцину, офлоксацин, гентаміцин, тобраміцин, левоміцетин/хлорамфенікол, доксициклін, цефтриаксон.

Процедуру визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків починали з приготування інокуляту. Відібрані колонії ресуспендували у стерильному фізіологічному розчині до отримання суспензії клітин з густиною 0,5 за стандартом Макфарланда ($1,5 \times 10^8$ КУО / мл). Після приготування суспензію використовували впродовж 1 год. для нанесення на поверхню агаризованого середовища. Нанесення здійснювали двома методиками: або штриховими рухами в трьох напрямках, або ж 0,5 мл суспензії розтирали по поверхні за допомогою шпателью для отримання суцільного газону. Після цього стерильним пінцетом на поверхні розташовували диски з антибіотиком. На одній чашці розміщували до 7 дисків. Чашки інкубували протягом доби при 37°C.

Облік результатів визначення чутливості бактерій до антибіотиків проводили за допомогою вимірювання зон пригнічення росту навколо дисків з будь-якими антибіотиком. При цьому орієнтувались на зону повного пригнічення росту мікроорганізмів. Вимірювання здійснювали за допомогою штангенциркуля.

2.1.4. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми Excel за загальноприйнятими методиками. Відмінності вважали значимими при $p \leq 0,05$.

2.2 Молекулярно-генетичний аналіз

2.2.1. Детекція молочнокислих бактерій у молочнокислих продуктах

Для визначення наявності молочнокислих бактерій у зразках молока, кефіру та сметани використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з родоспецифічними праймерами.

Виділення метагеномної ДНК. Для виділення ДНК використовували 0,1 мл молочного або кисломолочного продукту. Загальну метагеномну ДНК виділяли за допомогою набору для виділення ДНК, *Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific)* згідно з протоколом виробника та деякими модифікаціями. Загалом, зразки об'ємом 0,1 мл інкубували з 0,4 мл буфера для лізису та 20 мкл протеїнази К при 55 °С протягом 30 – 45 хв. Потім додавали 0,5 мл хлороформу і вміст пробірки обережно перемішували, перевертаючи пробірку. Потім проводили центрифугування при 10000 об / хв протягом 10 хв. Після центрифугування спостерігали розділення фаз: верхню фазу перенесли в нову пробірку і додавали 2,5 об'єми 96 % етанолу (приблизно 800 мкл). Преципітацію ДНК здійснювали при -20 °С протягом ночі. Потім ДНК центрифугували при 10000 об / хв протягом 5 хв, рідину видаляли, а осад промивали 70% етанолом (1 мл). Пробірки центрифугували за тих же умов, після чого спирт видаляли і осад підсушували. Препарат ДНК розчиняли в 40 мкл деіонізованої води.

Концентрацію ДНК вимірювали за допомогою спектрофотометра / флуорометра DS-11 FX+ DeNovix.

ПЛР з родоспецифічними праймерами. Для виявлення молочнокислих бактерій, зокрема біфідобактерій, лактобацил та ентерококів, у молочних продуктах проводили ПЛР з родоспецифічними праймерами. Послідовності прямого та зворотнього праймерів наведені у табл. 2.1.

Компонентами реакційної суміші були: 10 мкл 2x DreamTaq PCR Master Mix (*Thermo Scientific*), 40 пмоль кожного праймера (прямого та зворотнього) та 50 нг препарату ДНК. Загальний об'єм суміші, 20 мкл, доводили деіонізованою водою.

Таблиця 2.1

Послідовності праймерів, використані у ПЛР

Рід бактерій	Послідовність праймерів	Посилання
<i>Enterococcus</i>	5'-ТАСТGАСАААССАТTCАТGАТG-3' 5'-ААСТTCGTCАССААСGCGААС-3'	1
<i>Lactobacillus</i>	5'-СТСААААСТАААСАААGТТТС-3' 5'-СТTGTACACACCGCCCGTCA-3'	2
<i>Bifidobacterium</i>	5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3' 5'-CCACCGTTACACCGGGAA-3'	3

Ампліфікацію з родоспецифічними праймерами здійснювали у приладі Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf) за наступних умов:

1 цикл: початкова денатурація – 95 °С, 2 хв;

30 циклів: денатурація – 95 °С, 20 с;

анелювання праймерів – 55 °С, 30 с;

елонгація або синтез – 72 °С, 45 с;

1 цикл: кінцева елонгація – 72 °С, 7 хв.

Горизонтальний електрофорез в агарозному гелі. Результати ПЛР візуалізували за допомогою електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі з додаванням 0,01 % розчину барвника бромистого етидію. Як електродний буфер використовували 0,5x TBE-буфер (0,089 М Tris-HCl, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА, рН 8,0). Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили протягом 30 – 45 хв. при 4 В / см. Результати візуалізували в УФ-світлі, а отримані електрофореграми обробляли за допомогою програми Gel Imager.

2.2.2. Видова ідентифікація молочнокислих бактерій

Ідентифікацію молочнокислих бактерій, що сформували колонії, проводили методом ПЛР з видоспецифічними праймерами.

Виділення ДНК. Підготовку препарату ДНК для ампліфікації проводили швидким методом, без очищення препарату ДНК. Колонію бактерій, одну або декілька морфологічно однакових, за допомогою мікробіологічної петлі переносили до пробірки з 100 мкл деіонізованої води. Вміст пробірки перемішували за допомогою вортексу та інкубували при 95 °С впродовж 10 хв. Після чого

пробірки центрифугували при 12000 об / хв. протягом 10 хв. Для проведення ампліфікації використовували надосадову рідину.

ПЛР-аналіз. Визначення видової приналежності штамів родів *Enterococcus* та *Lactobacillus* здійснювали за допомогою ПЛР з видоспецифічними праймерами. Зокрема, для ідентифікації видів *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* та *E. hirae* проводили ампліфікацію з праймерами до гена супероксид-дисмутази (*sodA*) [13]:

E. faecalis: 5'-ACTTATGTGACТААСТТААСС-3';

5'-ТААТGGTGAATCTTGGTTTGG-3',

E. durans: 5'-CCTACTGATATТАAGACAGCG-3';

5'-ТААТCCTAAGATAGGTGTTTG-3',

E. faecium: 5'-GAAAAACAATAGAGAATTAT-3';

5'-TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA-3'),

E. hirae: 5'-CTTTCTGATATGGATGCTGTC-3';

5'-ТАААТТСТТССТТАААТGTTG-3'.

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила: 5x ПЛР-буфер, 2 мМ кожного дНТФ, 10 мкМ кожного праймера, 2,5 од. Таq-полімерази, 2 мкл ДНК-матриці. ПЛР проводили в ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf). Температурний режим реакції був: початкова денатурація при 95°C – 4 хв, 30 циклів – денатурація при 95°C впродовж 30 сек; анелювання праймерів при 55°C впродовж 1 хв; синтез при 72°C протягом 1 хв; заключна елонгація при 72°C протягом 7 хв.

Типові штами *E. faecalis* ССМ 7000, *E. faecium* NCDO 942, *E. durans* NCDO 956 використовували як позитивний контроль у реакції ампліфікації.

Видову належність штамів лактобацил визначали відповідно до розміру продукту ампліфікації з видоспецифічними праймерами [15–17]:

L. plantarum: 5'-CCGTTTATGCGGAACACСТА-3';

5'-TCGGGATТАССАА АСАТCАС-3',

L. acidophilus: 5'-GAAAGAGCCCAACCAAGTGATT-3';

5'-СТТССCAGATAATTCAACСТАТCGCTTA-3',

L.fermentum: 5'-АСТААСТТГАСТГАТСТАСГА-3';

5'-ТТСАСТГСТСААГТААТСАТС-3',

L.casei: 5'-ТГСАСТГАГАТТЦГАСТТАА-3';

5'-СССАСТГСТГССТСССГТАГГАГТ-3',

L.delbrueckii: 5'-АСГГАТГГАТГГАГАГСАГ-3';

5'-ГСААГТТ ТГТТСТТТЦГААСТС-3'.

Склад реакційної суміші був таким же, як і для ідентифікації видів ентерококів. Ампліфікацію здійснювали за наступного температурного режиму: початкова денатурація при 95 °С – 4 хв., 30 циклів – денатурація при 95 °С впродовж 30 с; анелювання праймерів при 55 °С впродовж 1 хв.; синтез при 72 °С протягом 1 хв.; заключна елонгація при 72 °С протягом 7 хв.

Результати ПЛР-аналізу оцінювали методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі. Використовували 1,7% агарозний гель та 0,5 х ТВЕ буфер. Гель містив 0,01 % бромід етидію. Візуалізацію проводили в УФ-світлі.

Висновки до розділу 2

Культивували на поживних середовищах ГПС та МРС за температури 37°С упродовж 48 год з різними солями (AgNO₃, Ce(NO₃)₂) та оксидами (ZnO, TiO₂) нанометалів для отримання наночасток цих металів.

Для зеленого біосинтезу металевих наночасток за допомогою *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 використовували два різних метода. В першому вносили солі і оксиди до та після культивування, а в другому – у лізати біомаси та супернатант культуральної рідини.

Для дослідження біосинтезу наночасток металів в присутності мікроорганізму *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 використали УФ-спектрофотометрію.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Мікробіологічний аналіз мікробіому молочних та кисломолочних продуктів.

Для оцінки різноманіття мікроорганізмів, наявних у відібраних зразках молока, кефіру та сметани у дослідженні були використанні селективні середовища, які дозволяють виявляти як умовно патогенні, так і корисні (зокрема, молочнокислі бактерії) мікроорганізми.

Результати проведеного аналізу наявності колоній мікроорганізмів на селективних середовищах після 24 год культивування показав, що загальна кількість виявлених мікроорганізмів у досліджуваних зразках молока, кефіру та сметани коливалась від $1,3 \times 10^6$ КУО / мл в молоці до 3×10^9 КУО / мл сметани. У всіх досліджуваних зразках кількість молочнокислих бактерій, утворювали колонії на МРС середовищі, була майже однаковою і становила 10^5 КУО / мл. У зразках кефіру та сметани були виявлені також дріжджі у кількості $10^2 - 10^3$ КУО / мл. На середовищах на середовищі ЕНДО та Сабуро, які використовують для детекції ентеробактерій та виділення дріжджів, цвілі та інших патогенних грибів жодних колоній виявлено не було. Для подальшого дослідження були відібрані поодинокі колонії на середовищі МРС. За допомогою цитологічних методів, що дозволили проаналізувати морфологію клітин, забарвлення за Грамом було підтверджено приналежність відібраних зразків до молочнокислих бактерій. Всього було відібрано по 10 колоній з кожного зразку, молока, кефіру та сметани.

3.2 Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій

Аналіз літературних даних показав, що молочнокислі бактерії виявляють антагоністичну активність по відношенню до патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, що населяють організми людини і тварин. Такі дослідження направлені на виявлення, виділення та аналіз специфічних антагоніс-

тичних сполук – бактеріоцинів. Для аналізу штамів-антагоністів на здатність синтезувати бактеріоцини використовують тест-культури близькоспоріднених видів та родів. Однак, також проводять дослідження, пов'язані з аналізом антагоністичної активності молочнокислих бактерій по відношенню до представників умовно патогенних мікроорганізмів, зокрема лістерій і клостридій, що викликають псування харчових продуктів.

У представленій роботі проведено дослідження антагоністичних властивостей штамів молочнокислих бактерій, ізольованих з молока, кефіру та сметани. З 30 досліджених культур 50% виявили помірну антагоністичну активність принаймні до однієї з 9 використаних тест-культур. 5 штамів пригнічували ріст *P. aeruginosa*, 7 – *S. epidermidis* та 6 штамів – *P. vulgaris*.

3.3 Стійкість молочнокислих бактерій до антибіотиків

Існує декілька причин, що зумовлюють необхідність вивчення стійкості молочнокислих бактерій до антибіотиків. Зокрема, вимога Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) до пробіотичних штамів щодо наявності природної стійкості до антибіотиків, та відсутність набутої стійкості, а також стійкість до ряду антибактеріальних препаратів є неприпустимою для молочнокислих бактерій, задіяних у процесах виробництва харчових та пробіотичних препаратів [65].

У роботі проводили дослідження чутливості відібраних штамів до 10 антибіотиків, а саме . Антибіотики можуть належати до різних класів хімічних сполук. Найбільш широко в медицині використовуються антибіотики, які відносяться до групи азотовмісних гетероциклічних сполук, молекули яких містять різноманітні кільцеві структури. Серед цієї групи найбільший практичний інтерес представляють β -лактамі антибіотики (пеніциліни і цефалоспорицини), що містять β -лактаміне кільце. Антибіотики цієї групи представлені як природними, так і напівсинтетичними препаратами, що володіють високою клінічною ефективністю і низькою токсичністю. Механізм дії β -лактамічних антибіотиків спрямований на порушення синтезу клітинної стінки бактерій.

Група тетрациклінових антибіотиків включає як природні, так і напівсинтетичні препарати. Тетрацикліни є антибіотиками широкого спектру дії. У високих концентраціях діють на деяких найпростіших. У концентраціях, що зазвичай застосовуються, тетрацикліни діють бактеріостатично. Механізм дії тетрацикліну спрямований на пригнічення синтезу білка в мікробних клітинах. Антибіотики макроліди – група антибіотиків, основою хімічної структури яких є макроциклічне 14- або 16-членне лактонне кільце, до якого приєднані один або кілька вуглеводних залишків. Макроліди відносяться до малотоксичних антибіотиків широкого спектру дії. Чинять переважно бактеріостатичну дію, у високих концентраціях – бактерицидну. Механізм дії пов'язаний з пригніченням синтезу білка в клітинах чутливих мікроорганізмів. Природними макролідами є еритроміцин і олеандоміцин. Левоміцетин – антибіотик широкого спектру дії. Механізм антимікробної дії пов'язаний з порушенням синтезу білків. Досить токсичний і часто залишає важкі побічні ефекти при застосуванні внутрішньо. Аміноглікозиди за хімічною будовою являють собою сполуки, що включають аміноцукор, з'єднаний глікозидним зв'язком з аміноциклічним кільцем. Аміноглікозиди є бактерицидними антибіотиками, механізм дії яких спрямований на пригнічення синтезу білка. До аміноглікозидних антибіотиків відносяться: стрептоміцин, канаміцин, гентаміцин і ряд інших антибіотиків.

Лінкозаміди – група антибіотиків, до якої належить природний антибіотик лінкоміцин і його напівсинтетичний аналог кліндаміцин. Антибіотики активні переважно по відношенню до аеробних грампозитивних бактерій і мікоплазм. За механізмом дії відносяться до інгібіторів синтезу білка. У терапевтичних дозах діють бактеріостатично. Полієнові антибіотики містять у своїй структурі спряжені подвійні зв'язки. До цієї групи належать в основному протигрибкові препарати, серед яких в медичній практиці найбільш широко використовується ністатин. Антибіотик проявляє високу тропність до стеролових структур клітинної мембрани грибів. Вбудовування молекули ністатину в мембрану клітини викликає утворення каналів, які порушують транспорт електролітів. Загибель клітини, як правило, зумовлюється порушенням концент-

рації розчинених в ній речовин. Резистентність до антибіотика розвивається дуже повільно. Одними зі швидких якісних методів визначення природи антибіотиків є хімічні методи, які дозволяють провести аналіз приналежності препаратів до певних груп хімічних речовин.

3.4 Молекулярно-генетичний аналіз молочнокислих бактерій

Для ідентифікації молочнокислих бактерій, виділених з молока, кефіру та сметани була проведена ПЛР з родоспецифічними праймерами, що дозволяє детектувати бактерії видів *Enterococcus*, *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*.

Серед 30 відібраних штамів більшість належала до роду *Enterococcus*, 27 з 30 штамів і лише 3 штами були ідентифіковані як лактобацили. Біфідобактерій серед відібраних штамів виявлено не було. Ймовірно, це пов'язано з необхідністю анаеробних умов культивування цих бактерій. Найбільша кількість ентерококів була виявлена у зразку сметани, 16, найменше – у молоці, 4, та 7 штамів було ідентифіковано у кефірі. Штами роду *Lactobacillus* спостерігали у зразку кефіру, 1 штама, та 2 штами були виявлені у зразку сметани. Для видової ідентифікації досліджуваних штамів була проведена ампліфікація з видоспецифічними праймерами. У результаті ПЛР-аналізу показано, що серед 27 штамів ентерококів 20 належали до *E.durans*, 5 до *E.faecium* та 2 до *E.faecalis*. Найбільша кількість ентерококів була виявлена у зразку сметани: 13 штамів *E.durans* та 1 штама *E.faecium*, 2 штами *E.faecalis*; у кефірі були виділені 5 штамів *E.durans* і 2 штами *E.faecium*, а у молоці: 2 штами *E.durans*, 2 штами *E.faecium*. Результати видової ідентифікації лактобацил виявили, що 2 штами, ізольовані зі сметани, належать до *L.plantarum*, а штама з кефіру до *L.acidophilus*.

Ентерококи - всюдисуці бактерії, які колонізують різні ніші. Вони є комменсалами шлунково-кишкового тракту тварин, тому через фекальне забруднення можуть потрапляти до сирого молока та м'яса (Ben Braïek and Smaoui, 2019). Повсюдне поширення *Enterococcus* spp. у готовій до вживання їжі можна пояснити їхньою стійкістю до процесів обробки та зберігання харчових

продуктів, а також їхньою чудовою адаптивною здатністю. Ці мікроорганізми часто складають залишкову мікрофлору харчових продуктів. При виробництві сиру фактори пастеризації молока відіграють ключову роль у мікробній селекції. За оцінками, понад 50% ентерококових видів популяції витримують короткочасну високотемпературну пастеризацію (72°C/15 с), а деякі популяції не ушкоджуються за більш високих температур обробки. Бактерії роду *Enterococcus* повсюдно присутні в сирних і сичужно-коагульованих сирах як із сирого, так і з пастеризованого молока. Ентерококи характеризуються більш високим рівнем протеолітичної та ліполітичної активності, ніж інші молочно-кислі бактерії, і вони також здатні розщеплювати цитрати на ацетальдегід, ацетоїн і діацетил, що відіграють важливу роль у дозріванні деяких видів сиру. Ентерококи покращують органолептичні властивості сиру, і їх включають у закваски для виробництва різних сирів, особливо італійських, аргентинських і грецьких сирів. Велика кількість ентерококів у сирі визначають за *Enterococcus* spp. вміст у молоці, чистота закваски та гігієнічні стандарти на переробному підприємстві. Наявність ентерококів у молоці може бути результатом прямого забруднення фекаліями тварин або непрямого забруднення водою чи домішками від доїльного обладнання (Булаїч та ін., 2015). види ентерококів. кількість у свіжому кисломолочному сирі, коагульованому сичужним ферментом сиру, коливається від 10^3 до 10^6 КУО/г, і кількість коливається в процесі виробництва сиру залежно від стійкості бактерій до рН та солі. Ентерококи найпоширеніші в сирах, виготовлених із непастеризованого молока, зокрема в сирах кустарного виробництва, вироблених у Південній Європі. У продуктах такого типу ентерококи розглядаються як незаквасочні молочно-кислі бактерії (Giraffa, 2003). Сир із сирого молока промислово в Польщі не виробляється. Наявність ентерокока .види в сирах із пастеризованого молока пояснюється їхньою терmostійкістю або повторним забрудненням після пастеризації.

Ентерококи також можуть бути патогенними для людини. Стійкість бактерій роду *Enterococcus* до антибіотиків останніми роками неухильно зрос-

тає. Найбільш вірулентні та полірезистентні штами, як і раніше, виділяють із лікарень, але полірезистентні ентерококи дедалі частіше виявляють у харчових продуктах. Стійкі до антибіотиків ентерококи також були виділені з готових до вживання харчових продуктів, які не піддавалися термічній обробці перед вживанням, що дає підстави для занепокоєння. М'ясо та м'ясні продукти є найпоширенішими джерелами ентерококів із множинною лікарською стійкістю, але такі штами також було виявлено у молочних продуктах. Ентерококи, споживані з сиром, можуть влаштуватися в кишечнику, навіть якщо їхня кількість у сирі невелика. Ентерококи розробили численні адаптивні стратегії, і вони можуть тимчасово або постійно колонізувати шлунково-кишковий тракт, збільшуючи ризик перенесення бактеріального гена в мікробіоту кишечника. Повідомлялося про перенесення гена стійкості *in vivo* з ізоляту *E. faecium* тваринного походження до ізоляту *E. faecium* людського походження в кишечнику добровольців. Це свідчить про те, що велика кількість харчових ентерококів, здатних передавати гени резистентності, може слугувати резервуаром для передачі резистентності іншим популяціям ентерококів із наслідками для здоров'я людини. Харчові ентерококи можуть вижити при проходженні через шлунок і розмножуватися, що призводить до стійкого кишкового носійства. Зважаючи на все це, метою нашого дослідження була оцінка антибіотикорезистентності та генетичних детермінант у *Enterococcus* spp. штами, виділені з готових до вживання роздрібних молочних продуктів, придбаних у Польщі.

Подальші дослідження проводили з бактеріями роду *Enterococcus*.

Ентерококи - древній рід молочнокислих бактерій (МКБ), які добре пристосовані до життя у складних умовах та до виживання у несприятливих умовах. Вони повсюдно поширені, населяючи шлунково-кишковий тракт різних тварин, від комах до людини. Цей поширений зразок колонізації передбачає, що ентерококи були членами кишкового мікробіома древніх загальних предків. Штами ентерококів можна знайти в різних ферментованих харчових продуктах, що сприяють дозріванню та розвитку аромату деяких сирів або ферментованих ковбас, а також у пробіотиках для покращення здоров'я людини

або тварин. Однак рід *Enterococcus* є спірною групою молочнокислих бактерій, враховуючи, що деякі штами можуть бути пов'язані з інфекціями людини. Фактори вірулентності та патогенності, такі як адгезини, інвазини, пили та гемолізін, були описані головним чином для *E. faecalis* та *E. faecium*, але іноді інші види ентерококів можуть викликати інфекції у людини. Триведі та ін. показали наявність генів вірулентності в ізолятах інших видів ентерококів з харчових продуктів. Стійкі до антибіотиків ентерококи широко поширені у харчових продуктах, включаючи молочні та м'ясні продукти, і можуть бути потенційним резервуаром обміну генами стійкості до антибіотиків між ентерококами та іншими видами бактерій. Тому чутливість до клінічно значимих антибіотиків штамів *Enterococcus*, виділених із харчових продуктів, є дуже важливою для здоров'я споживачів.

Виявлення ентерококів у молочних продуктах. Бактерії роду *Enterococcus*, як і інші молочнокислі бактерії, надзвичайно часто зустрічаються у молочних та кисломолочних продуктах. У нашому дослідженні три продукти аналізували за допомогою ПЛР-аналізу з праймерами, специфічними до роду ентерококів.

Амплікони розміром 112 п.н., характерний для *Enterococcus*, був виявлений у всіх молочних продуктах, як показано на рис. 3.1.

Оцінка ентерококів у молочних продуктах. Мікробіом молочних продуктів складається з різноманітних мікроорганізмів, більшість з яких представлені молочнокислими бактеріями. Ентерококи були виявлені в багатьох молочних продуктах, включаючи сире молоко [16, 22], кефір [4, 13], йогурт [18], сир [1], сметану [5] та ін. Результати метагеномного аналізу, проведеного в цих дослідженнях, показали, що відсоток ентерококів серед усіх мікроорганізмів коливався в широкому діапазоні від 0 до 15% і залежав від типу молочних продуктів і способу їх виробництва (домашнє або промислове).

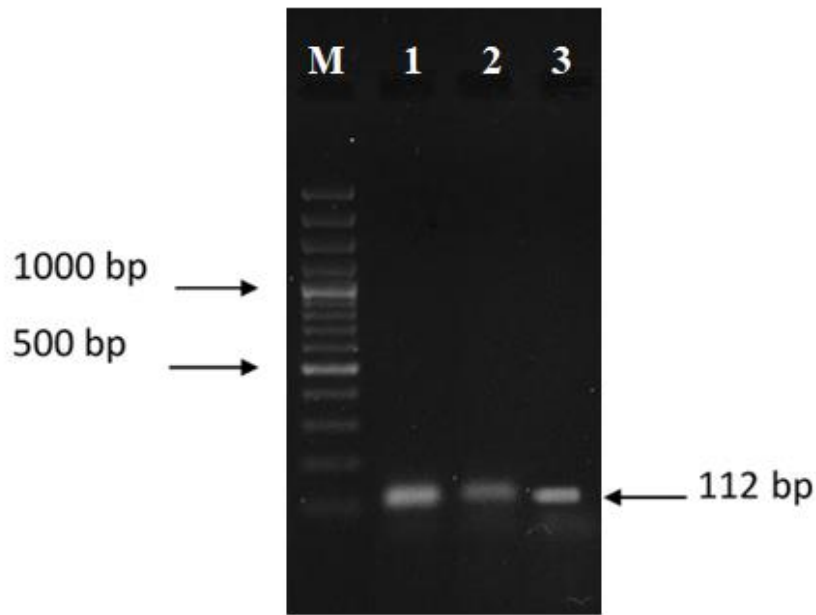


Рис. 3.1 – Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами до роду *Enterococcus*.

М – ДНК-маркер, 1 - молоко, 2 - кефір, 3 - сметана

У нашому дослідженні ми проаналізували кількість ентерококів у молоці, кефірі та сметані відносно загальної кількості бактерій у кожному продукті. У молоці та кефірі кількість ентерококів по відношенню до загальної кількості бактерій була однаковою, а в сметані ентерококів було в 1,6 раза більше. Незважаючи на відмінності в представленості ентерококів між трьома молочними продуктами, абсолютна чисельність роду *Enterococcus* не змінювалася: у всіх проаналізованих пробах кількість бактерій була майже однаковою (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Кількість геномних еквівалентів/мл (мг) бактеріальної ДНК у молочних продуктах

Бактеріальний рід	Молоко	Кефір	Сметана
<i>Enterococcus</i>	$(5,27 \pm 0,04) \times 10^5$	$(4,19 \pm 0,04) \times 10^5$	$(6,65 \pm 0,05) \times 10^5$

Дані є середнім значенням \pm СТД (стандартне відхилення)

Результати, отримані за допомогою кількісного ПЛР-аналізу, виявили невелику незначну варіабельність кількості ентерококів між трьома молочними продуктами виробництва однієї компанії. Мікроорганізмний склад молока і кисломолочних продуктів складається з різних видів мікроорганізмів і відрізняється за своїми якісними та кількісними ознаками. Ентерококи часто виявляють у бактеріальних сумішах багатьох ферментованих продуктів [2, 22]. Як зазначалося, в молочних продуктах ентерококи можуть бути представлені до 10^8 КУО/г [7]. Рівень цих бактерій різний у різних молочних продуктах. Показано, що в сирому коров'ячому молоці вони коливаються від 10^1 КУО/мл до $1,2 \times 10^4$ КУО/мл [12], а в європейському сирому молоці ентерококи коливаються від 10^3 клітин/мл до 10^5 клітин/мл [3]. Більша кількість бактерій роду *Enterococcus* спостерігалась у різних сортах сиру: 5,77 log КУО/г у цивільному сирі [9]; 5,52 – 6,48 log КУО/г в іранських сирах і 6,12 log КУО/г у турецьких сирах [10].

Висновки до розділу 3

Ентерококи є важливою частиною ферментованих харчових продуктів. Вони відіграють вагомую роль у навколишньому середовищі завдяки своїй корисній ролі як заквасок або допоміжних заквасок, володіючи пробіотичними властивостями та покращуючи органолептичні характеристики молочних продуктів [3]. Водночас ентерококи можуть володіти стійкістю до багатьох антибіотиків, бути носіями потенційних факторів вірулентності. Але слід звернути увагу на їх негативний фактор. Деякі з них є умовно-патогенними мікроорганізмами, які викликають захворювання і, таким чином, завдають шкоди здоров'ю людини.

Виявлення ентерококів у молочних продуктах. Бактерії роду *Enterococcus*, як і інші молочнокислі бактерії, надзвичайно часто зустрічаються у молочних та кисломолочних продуктах. У нашому дослідженні три про-

дукти аналізували за допомогою ПЛР-аналізу з праймерами, специфічними до роду ентерококів.

Кількість ентерококів, виявлених у дослідженні, була меншою, ніж у попередньому дослідженні домашніх молочних продуктів. Значна різниця між цими результатами може бути спричинена способом виробництва: домашнє виробництво може супроводжуватися поганою гігієною під час обробки та обробки молока, тоді як промислове виробництво може бути пов'язане з використанням деяких консервативних засобів проти псування, у тому числі спричиненого ентерококами.

Результати метагеномного аналізу, проведеного в цих дослідженнях, показали, що відсоток ентерококів серед усіх мікроорганізмів коливався в широкому діапазоні від 0 до 15% і залежав від типу молочних продуктів і способу їх виробництва (домашнє або промислове). У нашому дослідженні ми проаналізували кількість ентерококів у молоці, кефірі та сметані відносно загальної кількості бактерій у кожному продукті. У молоці та кефірі кількість ентерококів по відношенню до загальної кількості бактерій була однаковою, а в сметані ентерококів було в 1,6 раза більше. Незважаючи на відмінності в представленості ентерококів між трьома молочними продуктами, абсолютна чисельність роду *Enterococcus* не змінювалася: у всіх проаналізованих пробах кількість бактерій майже однакова.

ВИСНОВКИ

1. З використанням методів мікробіологічного аналізу охарактеризовано основні групи мікроорганізмів, наявних у зразках молочних та кисломолочних продуктів комерційного виробництва. Виявлено, що у молоці кількість мікроорганізмів була найменшою, 10^6 КУО / мл, а у сметані – найбільшою, 10^9 КУО / мл.
2. Показано, що з 30 відібраних штамів молочнокислих бактерій 50% виявляли антагоністичну активність по відношенню щонайменше до однієї з 9 використаних тест-культур. Резистентність до антибіотиків у досліджуваних штамів не виявлена.
3. За результатами ПЛР-аналізу визначено та ідентифіковано бактерії родів *Enterococcus* та *Lactobacillus*; бактерії роду *Enterococcus* були представлені видами *E.durans* (74%), *E. faecium* (19%) та *E. faecalis* (7%), а роду *Lactobacillus* – *L. acidophilus* (33%) і *L. plantarum* (67%).
4. Відмічено, що абсолютна кількість представників роду *Enterococcus*, визначена методом кількісної ПЛР, у зразках молока, кефіру та сметани комерційного виробництва не відрізняється.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Д. Сонг, С. Ібрагім і С. Хайєк, "Нещодавнє застосування пробіотиків у харчовій та сільськогосподарській науці", В: EC Rigobelo, Ed., Probiotics, InTech, Manhattan, 2012, стор. 1-34. <http://dx.doi.org/10.5772/50121>.
2. Н. Rodríguez, JA Curiel, JM Landete, B. de las Rivas, FL de Felipe, C. Gómez-Cordovés, JM Mancheño та R. Muñoz, "Харчові феноли та молочнокислі бактерії", Міжнародний журнал харчової мікробіології, Vol. 132, № 2-3, 2009, стор. 79-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025>.
3. Л. Мореллі, М.Л. Каллеаґрі, Ф.К. Вогенсен і А. фон Райт, "Генетика молочнокислих бактерій", у: С. Лахтінне, С. Салмінін, А. фон Райт і А. Оувеханд, ред., Молочнокислі бактерії: мікробіологічні та функціональні аспекти, CRC Press, Лондон, 2011 р., стор. 18-33. <http://dx.doi.org/10.1201/b11503-3>.
4. А. Фон Райт і Л. Аксельссон, "Молочнокислі бактерії: вступ", В: С. Лахтінне, С. Салмінін, А. Фон Райт і А. Оувеханд, ред., Молочнокислі бактерії: мікробіологічні та функціональні аспекти, CRC Press, Лондон, 2011 р., стор. 1-17. <http://dx.doi.org/10.1201/b11503>.
5. Э. Вера Пінгіторе, Е. М. Хеберт, Ф. Сесма і М. Е. Надер-Масіас, "Вплив вітамінів і осмолітів на ріст і продукцію бактеріоцину *Lactobacillus salivarius* CRL 1328 у середовищі з певним хімічним складом", Канадський журнал мікробіології, Vol. 55, № 3, 2009, стор. 304-310. <http://dx.doi.org/10.1139/W08-092>
6. EM Hébert, RR Raya та GS de Giori, "Оцінка мінімальних харчових потреб молочнокислих бактерій, які використовуються у функціональних харчових продуктах", в: JM Walker, JF Spencer та AL Ragout de Spencer, Eds., Methods in Biotechnology, Humana Press, Totowa, 2004. С. 139-150.
7. С. Letort і V. Juillard, "Розробка мінімального хімічно визначеного середовища для експоненціального росту *Streptococcus thermophilus*", Journal

of Applied Microbiology, Vol. 91, № 6, 2001, стор. 1023-1029.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01469>.

8. С. Тріпуранені, "Вплив поживних добавок на ферментацію огірка молочнокислими бактеріями", MS Research, Технологічний університет Університету Османії, Анн-Арбор, 2008 р..

9. Ф. Брінгель, "Карбамоілфосфат і природні ауксотрофії молочнокислих бактерій", Le Lait, Vol. 78, № 1, 1998, стор. 31-37.
<http://dx.doi.org/10.1051/lait:199815>

10. С. Санчес і А. Л. Демен, "Метаболічна регуляція і перевиробництво первинних метаболітів", мікробіологія та біотехнологія, Vol. 1, № 4, 2008, стор. 283-319. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2007.00015>.

11. М. Х. Хефнагель, М. Дж. Старренбург, Д. Е. Мартенс, Дж. Хугенгольц, М. Кліребезем, І. В. Свам, Р. Бонгерс, Х. В. Вестерхофф і Дж. Л. Сноп, "Метаболічна інженерія молочнокислих бактерій, комбінований підхід: кінетичне моделювання, метаболічний контроль і експериментальний аналіз". , Мікробіологія, Vol. 148, 2002, стор. 1003-1013.

12. Кирилов Н., Петкова Т., Атанасова Дж., Данова С., Ілієв І., Попов Ю., Хартле Т., Іванова І. Протеолітична активність молочнокислих бактерій з Іраку, Вірменії та Болгарії // Біотехнологія та біотехнологія. Обладнання, Том. 23, 2009, стор. 643-646.

13. К. Савійокі, Х. Інгмер і П. Варманен, "Протеолітичні системи молочнокислих бактерій", Прикладна мікробіологія та біотехнологія, Vol. 71, № 4, 2006, стор. 394-406. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>.

14. Х. Кеніг і Дж. Фрьоліх, "Молочнокислі бактерії", В: Х. Кеніг, Г. Унден і Дж. Фрьоліх, ред., Біологія мікроорганізмів на винограді, у суслі та у вині, Springer, Verlag, Berlin Heidelberg, 2009, стор. 3-29.
http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_1

15. Л. Аксельссон, "Молочнокислі бактерії: класифікація та фізіологія", В: С. Салмінін, А. фон Райт і А. С. Оувеханд, ред., Молочнокислі бактерії:

мікробіологія та функціональні аспекти, Марсель Деккер, Нью-Йорк, 2004, стор. 1-66. <http://dx.doi.org/10.1201/9780824752033.ch>.

16. О. Кандлер, "Метаболізм вуглеводів у молочнокислих бактерій", Антоні Ван Левенгук, Vol. 49, № 3, 1983, стор. 209-224. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00399499>

17. Р.П. Джон, К.М. Нампутірі та А. Пандей, "Ферментативне виробництво молочної кислоти з біомаси: огляд технологічних розробок і перспективи на майбутнє", Прикладна мікробіологія та біотехнологія, Vol. 74, № 3, 2007, стор. 524-534. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0779-6>

18. T. Bintsis, A. Vaforoulou-Mastrojiannaki, E. Litopoulou-Tzanetaki та RK Robinson, "Протеазна, пептидазна та естеразна активність лактобацил та дріжджових ізолятів із розсолу сиру фета", Journal of Applied Microbiology, Vol. 95, № 1, 2003, стор. 68-77. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01980.x>

19. М. Лю, Дж. Р. Байджанов, Б. Ренкенс, А. Наута і Р. Дж. Сізен, "Перегляд протеолітичної системи молочнокислих бактерій: порівняння геномів", BMC Genomics, Vol. 11, 2010, стор. 1-15.

20. Q. Yuan і GT Furuta, "Погляд на алергію на молочний білок: питання мікрооточення", Gastroenterol, Vol. 124, № 1, 2003, стор. 259-261.

21. М. Лю, А. Наута, К. Франке та Р. Дж. Зізен, "Порівняльна геноміка ферментів в ароматоутворювальних шляхах з амінокислот у молочнокислих бактерій", Прикладна та екологічна мікробіологія, Vol. 74, № 15, 2008, стор. 4590-4600. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00150-08>.

22. М. К. Доевен, Дж. Кок і Б. Пулман, "Детермінанти специфічності та селективності транспорту пептидів у *Lactococcus lactis* та інших мікроорганізмах", Молекулярна мікробіологія, Vol. 57, 2005, стор. 640-649. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04698.x>

23. С.А. Мейерс, С.Л. Куппет і Р.В. Хаткінс, "Продукція ліпази молочнокислими бактеріями та активність на вершковому маслі", Харчова мікробіологія, Vol. 13, № 5, 1996, стор. 383-389. <http://dx.doi.org/10.1006/fmic.1996.0044>

24. М. Кац, Р. Медіна, С. Гонсалес і Г. Олівер, "Естеролітична та ліполітична активність молочнокислих бактерій, виділених з овечого молока та сиру", *Journal of Food Protection*, Vol. 65, 2002, стор. 1997-2001.

25. Дж. Огава, С. Кішино, А. Андо, С. Сугімото, К. Міхара та С. Сімідзу, "Виробництво кон'югованих жирних кислот молочнокислими бактеріями", *Журнал біонауки та біоінженерії*, Vol. 100, № 4, 2005, стор. 355-364. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.100.355>.

26. MP Taranto, M. Medici, G. Perdigon, AP Ruiz Holgado та GF Valdez, "Докази гіпохолестеринемічного ефекту *Lactobacillus reuteri* у мишей з гіперхолестеринемією", *Journal of Dairy Science*, Vol. 81, № 9, 1998, стор. 2336-2340. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)70123-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)70123-7).

27. Х. Чен, С. Хайєк, Дж. Р. Гузман, Н. Д. Гілліт, С. А. Ібрагім, К. Джобін і С. Санг, "Мікробіота необхідна для утворення метаболітів, отриманих із теафлавінів чорного чаю", *PloS One*, Vol. 7, № 12, 2012 р., ідентифікатор статті: e51001. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051001>.

28. А. Лонво-Фюнель, "Молочнокислі бактерії в поліпшенні якості та знеціненні вина", *Антоні ван Левенгук*, Vol. 76, № 1-4, 1999, стор. 317-331. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1002088931106>.

29. Д. Жусьє, А. Д. Морно та Р. М. де Ордуња, "Вплив одночасної інокуляції дріжджами та бактеріями на кінетику ферментації та основні параметри вина з Шардоне в прохолодному кліматі", *Прикладна та екологічна мікробіологія*, Vol. 72, № 1, 2006, стор. 221-227. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.1.221-227.2006>.

30. А. Д. Велман та І. С. Меддокс, "Екзополісахариди з молочнокислих бактерій: перспективи та проблеми", *Тенденції в біотехнології*, Vol. 21, № 6, 2003 р., стор. 269-274. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00107-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00107-0).

31. С. Петрі, С. Фурлан, М.Дж. Крепо, Дж. Сернінг і М. Демазоуд, "Фактори, що впливають на продукцію позаклітинних полісахаридів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Vulgaricus*, вирощеного в середовищі з певним

хімічним складом", "Прикладна та екологічна мікробіологія", Vol. 66, № 8, 2000, стор. 3427-3431. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.8.3427-3431.2000>.

32. T. Lechiancole, A. Ricciardi та E. Parente, "Оптимізація середовища та умов ферментації для росту *Lactobacillus sayi*", *Annals of Microbiology*, Vol. 52, 2002, стор. 257-274.

33. EM Hébert, RR Raya і GS Giori, "Потреби в харчуванні *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* у середовищі з певним хімічним складом", *Current Microbiology*, Vol. 49, № 5, 2004, стор. 341-345. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-004-4357-9>.

34. С. Фуко, А. Франсуа і Дж. Рішар, "Розробка середовища певного хімічного складу для росту *Leuconostoc mesenteroides*", *Прикладна та екологічна мікробіологія*, Vol. 63, 1997, стор. 301-304.

35. Ф. Лерой, Дж. Верлейтен і Л. Де Вюйст, "Функціональні м'ясні закваски для поліпшення ферментації ковбас", *Міжнародний журнал харчової мікробіології*, Vol. 106, № 3, 2006, стор. 270-285.

36. Л. де Вюйст і Е. Дж. Вандамм, "Вплив джерела вуглецю на продукцію нізину в *Lactococcus lactis subsp. lactis*: Періодична ферментація", *Journal of General Microbiology*, Vol. 138, № 3, 1992, стор. 571-578. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-138-3-571>

37. LD Vuyst, G. Falony і F. Leroy, "Пробіотики у ферментованих сосисках", *М'ясознавство*, Vol. 80, № 1, 2008, стор. 75-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.038>

38. О'Доннелл М. М., Форд Б. М., Невілл Б., Росс П. Р. та О'Тул П. В., "Катаболічна гнучкість вуглеводів у комменсалах *Lactobacillus ruminis* кишкового ссавців, виявлена в результаті досліджень ферментації відповідно до анотацій генома", *Microbial Cell Factories*, Vol. 10, Доп. 1, 2011, стор. 1-11. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S12>.

39. Дж. Х. Кім, С. П. Шумейкер і Д. А. Міллс, "Розслаблений контроль використання цукру в *Lactobacillus brevis*", *Microbiology*, Vol. 155, № 4, 2009, стор. 1351-1359. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.024653-0>.

40. M. Calderon, G. Loiseau та JP Guyot, "Потреби в поживних речовинах та спрощене середовище для культивування для вивчення росту та енергетики молочнокислих бактерій *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 із закваски під час гетеролактичної ферментації крохмалю", *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 90, № 4, 2001, стор. 508-516. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01272.x>.

41. Н. Террад, Р. Ноель, Р. Куйо та Р. М. де Ордуња, "Нове середовище певного хімічного складу для винних молочнокислих бактерій", *Food Research International*, Vol. 42, № 3, 2009, стор. 363-367. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.011>.

42. В. Degeest, F. Vaningelgem і L. de Vuyst, "Мікробіологічна фізіологія, кінетика ферментації та технологія виробництва гетерополісахариду молочнокислими бактеріями", *International Dairy Journal*, Vol. 11, № 9, 2001, стор. 747-757. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00118-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00118-2).

43. Р. Табаско, Т. Пааруп, К. Джанер, К. Пельес і Т. Рекена, "Вибірковий підрахунок та ідентифікація змішаних культур *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* та *Bifidobacterium lactis* у ферментованому молоці", *International Dairy Journal*, Vol. 17, № 9, 2007, стор. 1107-1114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.010>.

44. Р. І. Дейв і Н. П. Шах, "Оцінка середовища для вибіркового підрахунку *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* і *Bifidobacteria*", *Journal of Dairy Science*, Vol. 79, № 9, 1996, стор. 1529-1536. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76513-X](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76513-X).

45. М. Нарос, М. Бielecka, J. Honke та Y. Sanz, "Активність з розкладання фітатів у молочнокислих бактерій", *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, Vol. 58, № 1, 2008, стор. 33-40.

46. Р. Баррангу, С. Дж. Лахтінен, Ф. Ібрахім і А. С. Оувеханд, "Рід *Lactobacilli*", У: С. Лахтіне, С. Салмінен, А. фон Райт і А. Оувеханд, ред., Мо-

лочнокислі бактерії: мікробіологічні та функціональні аспекти, CRC Press, Лондон, 2011, стор. 77-92. <http://dx.doi.org/10.1201/b11503-6>.

47. Мьоретро Т., Хаген Б. Ф., Аксельссон Л., "Нове, повністю визначене середовище для м'ясних лактобацил", Журнал прикладної мікробіології, Vol. 85, № 4, 1998, стор. 715-722.

48. Ю. Саватарі, Т. Хірано та А. Йокота, "Розробка харчових середовищ для приготування заквашувальної культури *Lactobacillus plantarum*", Журнал загальної та прикладної мікробіології, Vol. 52, № 6, 2006, стор. 349-356. <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.52.349>.

49. Дж. Боекхорст, Р. Дж. Зізен, М. С. Цвален, Д. Віланова, Р. Д. Прідмор, А. Мерсен'є, М. Клееребезем, В. М. де Вос, Х. Брюссов і Ф. Дезієр, "Повні геноми *Lactobacillus plantarum* та *Lactobacillus johnsonii* виявляють значні відмінності", "В організації хромосом та утриманні генів", *Microbiology*, Vol. 150, № 11, 2004, стор. 3601-3611. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27392-0>.

50. Ю. Л., Лей Т., Рен С., Пей С. і Фенг Ю., "Оптимізація поверхні відгуку виробництва L-(+)-молочної кислоти з використанням кукурудзяного екстракту як альтернативного джерела азоту за допомогою *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466", Журнал біохімічної інженерії, Vol. 39, № 3, 2008 р., стор. 496-502. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.008>.

51. Л. Агірре, М.С. Гарро і Г. Савой де Гіорі, "Ферментативний гідроліз соєвого білка з використанням молочнокислих бактерій", *Food Chemistry*, Vol. 111, № 4, 2008, стор. 976-982. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.018>

52. JA Vazquez, MP Gonzalez і MA Murado, "Пептони з автогідролізованих внутрішніх органів риби для виробництва нізину і педіоцину", *Journal of Biotechnology*, Vol. 112, № 3, 2004, стор. 299-311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.04.011>.

53. И. М. Аасен, Т. Мьоретро, Т. Катла, Л. Аксельссон та І. Сторро, "Вплив складних поживних речовин, температури та рН на виробництво бактеріоцину *Lactobacillus sakei* CCUG 42687", "Прикладна мікробіологія та біо-

технологія", Vol. 53, № 2, 2000, стор. 159-166.
<http://dx.doi.org/10.1007/s002530050003>.

54. С. О, С. Рим, Дж. Сім, С. Кім і Ю. Бек, "Оптимізація умов для росту *Lactobacillus casei* YIT 9018 у середовищі триптон-дріжджовий екстракт-глюкоза з використанням методу поверхні відгуку", "Прикладна та екологічна мікробіологія", "Прикладна та екологічна мікробіологія". , Том. 61, № 11, 1995, стор. 3809-3814.

55. А. П. Дебуа і В. Дж. Сміт, "Антибактеріальні вільні жирні кислоти: активність, механізми дії та біотехнологічний потенціал", Прикладна мікробіологія та біотехнологія, Vol. 85, № 6, 2010, стор. 1629-1642.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>

56. L. Partanen, N. Marttinen і T. Alatossava, "Жири і жирні кислоти як фактори росту для *Lactobacillus delbrueckii*", Систематична і прикладна мікробіологія, Vol. 24, № 4, 2001, стор. 500-506. <http://dx.doi.org/10.1078/0723-2020-00078>

57. П. Канкаанпаа, Б. Ян, Х. Калліо, Е. Ізолаурі та С. Салмінін, "Вплив поліненасичених жирних кислот у ростовому середовищі на ліпідний склад і фізико-хімічні властивості поверхні лактобацил", Прикладна та екологічна мікробіологія, Vol. 70, № 1, 2004, стор. 129-136.

58. Дж. К. Дженкінс і П. Д. Кортні, "Ріст лактобактерій і склад мембран у присутності лінолевої або кон'югованої лінолевої кислоти", Канадський журнал мікробіології, Vol. 49, № 1, 2003, стор. 51-57.

59. PE Kankaanra, SJ Salminen, E. Isolauri та YK Lee, "Вплив поліненасичених жирних кислот на пробіотичний ріст та адгезію", FEMS Microbiology Letters, Vol. 194, № 2, 2001, стор. 149-153.

60. A. Wegkamp, B. Teusink, WM De Vos і EJ Smid, "Розробка мінімального середовища для росту *Lactobacillus plantarum*", Letters in Applied Microbiology, Vol. 50, № 2010, стор. 57-64. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02752.x>.

61. JJ Fitzpatrick, M. Ahrens і S. Smith, "Вплив марганцю на ферментацію *Lactobacillus casei* для отримання молочної кислоти з пермеату сироватки", *Process Biochemistry*, Vol. 36, № 7, 2001, стор. 671-675. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00265-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00265-X).

62. С.А. Ібрагім, А.Я. Алаззе, С.С. Авайше, Д. Сонг, А. Шахбазі та А.А. АбуГазале, "Посилення активності α - і β -галактозидази в *Lactobacillus reuteri* за допомогою різних іонів металів", *Дослідження біологічних мікроелементів*, Vol. 136, № 1, 2010, стор. 106-116. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-009-8519-2>

63. MG Macedo, C. Lacroix, NJ Gardner та CP Champagne, "Вплив добавок середовища на виробництво екзополісахариду *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595М у пермеаті сироватки", *International Dairy Journal*, Vol. 12, № 5, 2002, стор. 419-426. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00173-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00173-X)

64. С.А. Хайєк, "Використання солодкої картоплі для розробки середовища для культивування молочнокислих бактерій", доктор філософських досліджень, енергетичних та екологічних систем, Університет штату Північна Кароліна А&Т, Грінсборо, Північна Кароліна, США, 2013.

65. Teuber M., Meile M., Schwarz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food // *Antonie Van Leeuwenhoek*.- 1999.- Vol. 76, N1-4.- P. 115-137.

66. Amaral, D. M., Silva, L. F., Casarotti, S. N., Nascimento, L. C. S., & Penna, A.L. B. (2017). *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *Journal of dairy science*, 100(2), 933–949.

67. Bayili, G. R., Johansen, P., Nielsen, D. S., Sawadogo-Lingani, H., Ouedraogo, G. A., Diawara, B., & Jespersen, L. (2019). Identification of the predominant microbiota during production of lait caillé, a spontaneously fermented milk product made in Burkina Faso. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(7), 1–13.

68. Bhardwaj, A., Malik, R. K., Chauhan, P. (2008). Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian journal of microbiology*, 48(3), 317–325.
69. Biçer, Y., Telli, A. E., Sönmez, G., Turkal, G., Telli, N., & Uçar, G. (2021). Comparison of commercial and traditional kefir microbiota using meta-genomic analysis. *International Journal of Dairy Technology*, 74(3), 528–534.