

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему:
«Отримання екзополісахаридів
за допомогою *Lactobacillus acidophilus*»

Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Біотехнологія

Виконала: студентка групи ББТ-21

Анна ЮРКЕВИЧ

Науковий керівник:

к.т.н., доц. Ірина ВОЛОШИНА

Рецензент: к.б.н., доц. Ольга ЮНГІН

Київ 2025

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти	<u>перший (бакалаврський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА

«___» _____ 20__ р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Юркевич Анна Ігорівна**

1. Тема кваліфікаційної роботи: **Отримання екзополісахаридів за допомогою *Lactobacillus acidophilus***

Науковий керівник роботи Волошина Ірина Миколаївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «05» __ 03 __ 2025 року № 50-уч

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо методів синтезу екзополісахаридів; дослідні дані щодо біотехнологічного синтезу екзополісахаридів за різних біохімічних умов.

3. Зміст кваліфікаційної роботи: вступ, огляд літератури, об'єкт, мета та методи дослідження, експериментальна частина, висновки, список використаних наукових джерел, додатки.

4. Дата видачі завдання 05.03.2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ	10.03.2025	
2	Розділ 1 Огляд літератури	29.03.2025	
3	Розділ 2 Об'єкт, мета та методи дослідження	01.04.2025	
4	Розділ 3 Експериментальна частина	06.05.2025	
5	Висновки	27.05.2025	
6	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)	05.06.2025	
7	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку (за 14 днів до захисту)	07.06.2025	
8	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 12 днів до захисту)		
9	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		Коефіцієнт подібності ____% Коефіцієнт цитування ____% _____
10	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студент _____ Анна ЮРКЕВИЧ

Науковий керівник _____ Ірина ВОЛОШИНА

АНОТАЦІЯ

Юркевич А.І. Отримання екзополісахаридів за допомогою *Lactobacillus acidophilus*. – Рукопис.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 «Біотехнологія та біоінженерія». – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2025 рік.

У кваліфікаційній роботі розглянуто сучасні літературні джерела щодо отримання екзополісахаридів за допомогою хімічних та фізичних стресових факторів. Описано основні фізико-хімічні та біологічні властивості екзополісахаридів. Також наведено інформацію стосовно застосування екзополісахаридів у різних галузях промисловості.

У кваліфікаційній роботі представлено біосинтез екзополісахаридів за допомогою *L. acidophilus* УКМ В-2691 з використанням різних стресових. Застосовані стресові фактори, такі як, внесення антибіотиків (ванкоміцину, стрептоміцину, тетрацикліну), зміни температурних режимів культивування та рН середовища дали змогу збільшити кількість ЕПС у середовищі культивування в 2-4 рази.

Ключові слова: екзополісахариди, стресові фактори, антибіотики, Lactobacillus acidophilus.

ABSTRACT

Yurkevich A.I. Production of exopolysaccharides using *Lactobacillus acidophilus*. – Manuscript.

Qualification work in the specialty 162 «Biotechnology and bioengineering».
– Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2025.

The qualification work reviews modern literary sources on obtaining exopolysaccharides using chemical and physical stress factors. The main physicochemical and biological properties of exopolysaccharides are described. Information on the use of exopolysaccharides in various industries is also provided.

The qualification work presents the biosynthesis of exopolysaccharides using *L. acidophilus* UKM B-2691 using various stress factors. The applied stress factors, such as the introduction of antibiotics (vancomycin, streptomycin, tetracycline), changes in the temperature regimes of cultivation and the pH of the medium, made it possible to increase the amount of EPS in the cultivation medium by 2-4 times.

Keywords: exopolysaccharides, stress factors, antibiotics, *Lactobacillus acidophilus*.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	11
1.1 Отримання екзополісахаридів за допомогою мікроорганізмів	11
1.1.1 Отримання ЕПС за допомогою бактерій	12
1.1.2 Отримання ЕПС за допомогою грибів та дріжджів	14
1.2 Отримання екзополісахаридів за допомогою молочнокислих бактерій	16
1.3 Вплив стресових факторів на утворення ЕПС за допомогою мікроорганізмів.	21
1.4 Використання ЕПС молочнокислих бактерій в промисловості.....	25
Висновок до розділу 1.	28
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ	29
2.1 Характеристика <i>Lactobacillus acidophilus</i> УКМ В-2691	29
2.2 Поживні середовища для культивування <i>L. acidophilus</i> УКМ В-2691.....	30
2.2.1 Приготування середовища MRS агару	31
2.2.2 Приготування глюкозо-пептонного середовища (ГПС)	33
2.3. Отримання посівного матеріалу <i>L. acidophilus</i> УКМ В-2691.....	34
2.4. Біосинтез <i>L. acidophilus</i> УКМ В-2691	34
2.4.1 Вплив фізичних стресових факторів на біосинтез <i>L. acidophilus</i> УКМ В-2691.....	35
2.4.2 Вплив хімічних стресових факторів на біосинтез <i>L. acidophilus</i> УКМ В-2691.....	35
2.5 Визначення біомаси <i>L. acidophilus</i> УКМ В-2691	36
2.5.1 Метод визначення біомаси за оптичною густиною	37
2.5.2 Метод підрахунку колоній на чашках Петрі (метод Дригальського)..	38

2.6 Виділення та визначення ЕПС з <i>L. acidophilus</i> УКМ В-2691	38
Висновок до розділу 2.	40
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ	41
3.1 Визначення впливу температури на утворення екзополісахариду за допомогою <i>Lactobacillus acidophilus</i> УКМ В-2691.....	41
3.2 Визначення впливу рН на утворення екзополісахариду за допомогою <i>Lactobacillus acidophilus</i> УКМ В-2691	41
3.3 Визначення впливу антибіотиків на утворення екзополісахариду за допомогою <i>Lactobacillus acidophilus</i> УКМ В-2691.....	42
3.3.1 Визначення впливу ванкоміцину на утворення екзополісахариду	Помилка! Закладку не визначено.
3.3.2 Визначення впливу стрептоміцину на утворення екзополісахариду	Помилка! Закладку не визначено.
3.3.3 Визначення впливу тетрацикліну на утворення екзополісахариду	Помилка! Закладку не визначено.
Висновок до розділу 3.	42
ВИСНОВКИ.....	44
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	45
Додатки.....	51

ВСТУП

За останні десятиріччя спостерігається зростання зацікавленості до біотехнологічного виробництва полімерів, у тому числі екзополісахаридів. Екзополісахариди це високомолекулярні вуглеводи які утворюються мікроорганізмами як побічний продукт для захисту клітин [1]. Вони відіграють важливу роль для клітин створюючи захисні механізми, біоплівки та адгезії поверхонь. ЕПС мають потенціал застосування у харчовій промисловості, медицині та нафтовидобувній промисловості [1, 2]. Виробництво ЕПС часто пов'язане з високими витратами, тому зараз наукове суспільство робить фокус на біосинтезі екзополісахаридів за допомогою безпечних мікроорганізмів здатних синтезувати ці полімери.

Серед таких мікроорганізмів виокремлюють бактерії роду *L. acidophilus*, ЕПС синтезовані цими організмами мають пробіотичну дію, також виявляють антиоксидантні та протизапальні властивості [6]. Одним з перспективних штамів в Україні є *L. acidophilus* УКМ В-2691, що може адаптуватись до різних середовищ культивування та має високий рівень життєздатності в порівнянні з іншими видами мікроорганізмів.

Актуальність полягає у можливості інтенсифікації виходу екзополісахаридів безпечними пробіотичними мікроорганізмами *L.acidophilus* УКМ В-2691 використовуючи різні стресові фактори.

Новизна роботи. Культивування *L.acidophilus* УКМ В-2691 з метою отримання ЕПС на простому глюкозо-пептонному середовищі використовуючи стресові фактори.

Мета роботи отримання екзополісахаридів *L.acidophilus* УКМ В-2691 та оцінка факторів які впливають на ефективність його виходу.

Об'єкт дослідження – культура *L. acidophilus* УКМ В-2691

Предмет дослідження – біосинтез ЕПС *L. acidophilus* УКМ В-2691.

Для досягнення мети ми поставили ряд завдань:

1. Проаналізувати доступну літературу щодо біосинтезу ЕПС лактобацилами.
2. Дослідити вплив фізичних стресових факторів (зміна температури, рН) на накопичення екзополісахаридів при рості *L.acidophilus* УКМ В-2691 на модифікованому глюкозо-пептонному середовищі.
3. Дослідити вплив хімічних факторів на прикладі антибіотиків (ванкоміцин, стрептоміцин, тетрациклін), як стресових факторів на накопичення екзополісахаридів при рості *L.acidophilus* УКМ В-2691 на модифікованому глюкозо-пептонному середовищі.

Методи дослідження: мікробіологічні, біохімічні, технологічні, статистичні.

Практичне значення. Опотримання екзополісахаридів штамом *L.acidophilus* УКМ В-2691 на простому глюкозо-пептонному середовищі, з можливістю у подальшому застосування у фармацевтичній промисловості (у якості імуномодуляторів, пребіотиків, системи доставки лікарських засобів, тощо).

Публікації.

1. Юркевич А.І., Яценко А.А., Волошина І.М. Екзополісахариди молочнокислих бактерій. Науково-практичні розробки молодих учених в хімічній, харчовій та парфумерно-косметичній галузях промисловості: Матер. XI Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених і здобувачів освіти. – Хмельницький, ХНТУ, 2024. – С. 67-68 (додаток А) та сертифікат (додаток Б).

2. Юркевич А.І., Башмат О.М., Волошина І.М. Екзополісахариди *Lactobacillus* «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині»: матеріали III науково-практичної міжнародної дистанційної

конференції (м. Харків, 21 березня 2025 р., м. Харків) / – Х. : НФаУ, 2025. – с.153 – 154 (додаток В).

Структура і обсяг дипломної роботи. Основна частина викладена на 54 сторінках і має три основні розділи та висновки. В роботі представлено список наукових джерел що налічує 37 найменувань. В роботі представлено три додатки, представлені на 4 сторінках.

РОЗДІЛ 1.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Отримання екзополісахаридів за допомогою мікроорганізмів

Екзополісахариди (ЕПС), що синтезуються різноманітними мікроорганізмами, допомагають їм у адаптації та подальшому виживанні. Екзополісахариди мають дуже широкий спектр застосування в галузі біології та біотехнології. Екзополісахариди, як правило, поділяють на дві основні групи гомополісахариди та гетерополісахариди. Гомополісахариди за своїм складом мають лише один ланцюг повторюваних одиниць лише одного типу моносахаридів, через це їх структура вважається доволі простою та надає багато можливостей для застосування. А ось гетерополісахариди мають складнішу структуру, бо складаються з ланцюга з повторюваними одиницями різних типів моносахаридів, ці моносахариди здатні змінюватися за своєю структурою що дає можливість застосування екзополісахаридів у різних галузях [1]. ЕПС можуть синтезуватися багатьма видами різних типів бактерій, оскільки вони здатні утворюватися при різних умовах росту, доступності або браку певних типів поживних речовин та специфічних потребах мікроорганізмів. Оскільки екзополісахариди здатні синтезуватися за широкого спектру умов та адаптуватися до різних поживних середовищ – це забезпечує їм виживання та конкурентоспроможність серед інших речовин. Важливим пунктом є можливість модифікувати синтезовані екзополісахариди, через це ЕПС здатні ще більше адаптуватися до навколишніх умов, та через зміну функціональних груп, що змінює фізико-хімічні властивості - варіюватися у різних показниках біологічної активності [1, 2].

Для синтезу ЕПС використовують різні типи мікроорганізмів, а саме бактерії *Xanthomonas campestris*, *Lactobacillus* spp., тощо. Мікроціцети – *Aureobasidium pullulans* та дріжджі – *Cryptococcus laurentii* [2].

У наступних розділах ми детальніше розглянемо кожен з видів отримання ЕПС, включаючи методи культивування, виділення та очищення, а також їхнє застосування в різних галузях.

1.1.1 Отримання ЕПС за допомогою бактерій

Для отримання екзополісахаридів у наш час використовують різні варіації та штами мікроорганізмів, зокрема молочнокислих бактерій. Для біосинтезу підбирається різний час та умови культивування аби забезпечити для кожного продуцента оптимальні умови для біосинтезу.

Xanthomonas spp. Різноманітні бактерії з видів *Xanthomonas*, такі як *X. phaseoli*, *X. juglandis* та *X. campestris*, успішно культивуються для широкомасштабного виробництва ксантану, важливого полісахариду, що знаходить широке застосування в різних галузях промисловості. Серед цих видів, *X. campestris* особливо цінується та часто використовується для промислового виробництва ксантану, що зумовлено його винятковими реологічними властивостями, зокрема здатністю формувати розчини з високою в'язкістю[1]. Ця висока в'язкість розчинів ксантану робить його незамінним у багатьох застосуваннях, де потрібне стабільне загущення або модифікація реологічних характеристик рідин, що сприяє його широкому промислового використанню. Ферментація проводилася в три цикли з оновленням середовища на початку кожного: цикл 1 – 0-27 год; цикл 2 – 27-54 год; і цикл 3 – 54 – 78 год. Результати показали, що споживання глюкози та зниження рН в реакторі біоплівки PES було швидшим порівняно з реактором з біоплівки SSS. Скануюча електронна мікроскопія показала, що SSS здатний іммобілізувати більше клітин під час росту *X. campestris*. Максимальна концентрація ксантанової камеді в біоплівковому реакторі SSS отримана через 27 годин (3,47г/л), тоді як максимальна концентрація ксантану в біоплівковому реакторі PES отримана через 78,5 год (3,21г/л) [1].

***Lactobacillus* spp.** Штами *Lactobacillus*, що виявляють здатність до продукції екзополісахаридів (ЕПС), демонструють неабияку стійкість до широкого спектру екологічних стресів, що є надзвичайно важливим фактором для їхнього виживання в різноманітних умовах. Крім того, наукові дослідження все частіше підтверджують, що виробництво ЕПС не лише сприяє захисту бактеріальних клітин, але й значно підвищує їхній пробіотичний потенціал, покращуючи адгезію до епітеліальних клітин кишечника та модулюючи імунну відповідь [2,3]. Особливий інтерес до використання ЕПС, які продукуються штамми *Lactobacillus*, обумовлений тим, що ці бактерії мають давню історію безпечного використання в харчовій промисловості та вважаються загалом визнаними безпечними (GRAS), що робить їх привабливими для широкого спектру застосувань. На сьогоднішній день науковці ідентифікували близько 30 видів *Lactobacillus*, здатних до синтезу ЕПС, серед яких найбільш відомими та широко вивченими є *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* та *L. Johnsonii* [2]. Ці бактерії зазвичай культивуються на спеціально розроблених, багатих мінералами середовищах, таких як MRS (де Man, Rogosa and Sharpe), при оптимальних температурах 30 °C або 37°C, в залежності від специфічних вимог конкретного штаму, що забезпечує оптимальні умови для їхнього росту, метаболічної активності та ефективного синтезу ЕПС [2]. Штами *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* та *Lactobacillus casei* вивчалися в експериментах з ферментаторами з використанням глюкози та лактози як основних джерел вуглецю та гідролізату казеїну – як єдиного складного компонента, в діапазоні температур від 35°C до 42°C. Виробництво екзополісахаридів відстежувалося з використанням як колориметричного аналізу, так і хроматографічних методів. Експерименти з ферментаторами в пакетному режимі показали що *L. bulgaricus* синтезує ЕПС 100 мг/л а *L. casei* 350 мг/л. Крім того, використання біореактора з

мікрофільтрацією призвело до того, що концентрації ЕПС в три та шість разів перевищили концентрації в лабораторних експериментах [3].

1.1.2 Отримання ЕПС за допомогою грибів та дріжджів

Окрім бактеріальних продуцентів для біосинтезу екзополісахаридів використовують і інші джерела: гриби та дріжджі. Мікроміцети є відомими виробниками пулулану, в той час як дріжджі здатні синтезувати широкий спектр екзополісахаридів [4].

Aureobasidium pullulans синтезує пулулан, лінійний, нерозгалужений екзополісахарид, який має здатність утворювати кисневонепроникні плівки, що робить його надзвичайно цінним для консервування харчових продуктів, подовжуючи їх термін придатності шляхом запобігання окисленню [4]. Ці мікроорганізми демонструють вражаючу метаболічну гнучкість, використовуючи широкий спектр джерел вуглецю для біосинтезу пулулану, включаючи прості цукри, такі як манноза, сахароза, мальтоза, фруктоза, галактоза та ксилоза, а також складніші джерела вуглецю, що дозволяє оптимізувати виробництво в залежності від доступних ресурсів. Завдяки високій швидкості виробництва пулулану та його винятковим матеріальним властивостям, таким як еластичність, міцність і розчинність у воді, *Aureobasidium* spp. широко використовується для великомасштабного виробництва цього полісахариду в промислових умовах [4, 5]. Пулулан знаходить застосування не лише в харчовій промисловості, але й у фармацевтиці, косметичці та інших галузях, де його властивості є незамінними. Крім того, дослідження продовжують виявляти нові потенційні застосування пулулану, зокрема в біомедицині та біоупаковці, що підкреслює його важливість як біотехнологічного продукту [4].

Для приготування інокулюму *A. pullulans* вирощували при 28 °С протягом 48 годин, при початковому рН 6,5 з перемішуванням при 230 об/хв. Базове середовище для отримання ЕПС складалося з джерела вуглецю, дріжджового

екстракту, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, K_2HPO_4 і г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ на літр деіонізованої води. При початковому рН 6,5 з перемішуванням при 230 об/хв. Зразки періодично брали для визначення концентрації пуллулану, біомаси та відновлювального цукру. Вихід пуллулану подуцентом *Aureobasidium pullulans* становить 54г/л [5].

***Cryptococcus laurentii*.** Дріжджі роду *Cryptococcus* є об'єктом пильної уваги в біотехнологічних дослідженнях, оскільки вони демонструють видатну здатність до синтезу різноманітних полісахаридів, таких як маннани, глюкоманнани, глюкани, галактоманнани та фосфоманнани, що мають широкий спектр потенційного застосування [6]. Ці мікроорганізми відрізняються своєю здатністю до адаптації та росту в різноманітних умовах, що робить їх надзвичайно привабливими для промислового використання, де стабільність та масштабованість процесів є ключовими факторами. Їхня здатність до ефективної ферментації та синтезу цінних полісахаридів відкриває широкі перспективи для виробництва продуктів, які можуть знайти застосування в харчовій, фармацевтичній та косметичній промисловості, де їхні унікальні властивості можуть бути використані для створення інноваційних продуктів. Зокрема, полісахариди, які виробляються *Cryptococcus*, можуть виступати в ролі загусників та стабілізаторів у харчовій промисловості, імуномодуляторів у фармацевтиці, а також зволожувачів та плівкоутворювачів у косметичній промисловості, що підкреслює їхню багатофункціональність [6]. Крім того, наукові дослідження виявили, що деякі види *Cryptococcus* здатні до росту при низьких температурах, що робить їх особливо цінними для виробництва біологічно активних речовин у холодних кліматичних умовах або в умовах, де потрібна низькотемпературна обробка. Ця унікальна здатність відкриває нові горизонти для вивчення їхнього метаболізму та використання в біотехнологічних процесах, спрямованих на створення продуктів з покращеними властивостями. Максимальна температура росту деяких психрофільних дріжджів становить 25 °С, що

дозволяє вивчати біологічний потенціал шляхом періодичного та безперервного культивування в температурному діапазоні [7].

Базове середовище для отримання ЕПС з *Cryptococcus laurentii* AL100 складалося з джерела вуглецю (сахароза), дріжджового екстракту, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , K_2HPO_4 та $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ на літр деіонізованої води. При початковому pH 5,3. Зразки періодично брали для визначення концентрації ЕПС, біомаси та відновлювального цукру. Вихід ЕПС ізолятом *Cryptococcus laurentii* AL100 становив понад 6 г/л [6].

1.2 Отримання екзополісахаридів за допомогою молочнокислих бактерій

Молочнокислі бактерії (МКБ) є не лише важливими учасниками процесів ферментації в харчовій промисловості, але й цінними продуцентами екзополісахаридів (ЕПС), які мають широкий спектр застосування. Ці ЕПС покращують текстуру та смакові якості різноманітних продуктів, від молочних до рослинних, надаючи їм бажану консистенцію та органолептичні властивості [3]. Крім того, вони знаходять застосування в медичній галузі, де використовуються як біоматеріали, імуномодулятори та пробіотичні добавки. Враховуючи загальновизнану безпеку молочнокислих бактерій, ЕПС, що виділяються з цих бактерій, пропонують безпечну та ефективну альтернативу синтетичним полісахаридам, які часто використовуються в промисловості. Це робить їх привабливими для широкого спектру застосувань, від харчової промисловості та медицини до косметики та біотехнології. Біосинтез бактеріальних екзополісахаридів (ЕПС) є складним процесом, що включає узгоджену дію великої кількості генних продуктів. Гени, що кодують ферменти та регуляторні білки, необхідні для синтезу ЕПС, у мезофільних штамів молочнокислих бактерій, таких як *Lactococcus*, мають плазмідне походження, а у термофільних штамів *Streptococcus* та *Lactobacillus* – хромосомне. Урожайність EPS залежить від штаму МКБ і значною мірою

залежить від використовуваного субстрату. Харчові відходи вважаються чудовим вибором для синтезу ЕПС [3, 7].

Більшість молочнокислі бактерії, що продукують EPS, належать до родів *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* і *Weissella*. Повідомлялося, що приблизно 30 видів лактобацил продукують EPS, особливо *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii* тощо[2].

Молочнокислі бактерії демонструють вражаючу здатність синтезувати екзополісахариди (ЕПС) з величезним структурним різноманіттям, що відрізняються за складом моносахаридів, молекулярною масою, розміром і структурою. Це дозволяє їм адаптуватися до широкого спектру середовищ і виконувати різноманітні фізіологічні функції. Однією з ключових ролей ЕПС є захист молочнокислих бактерій від стресових умов, таких як екстремальні значення рН, осмотичний стрес, нестача поживних речовин (наприклад, азоту), а також захист від бактеріофагів, антибіотиків і лізоциму [2, 7].

Цікаво, що виробництво ЕПС у молочнокислих бактерій не обмежується лише умовами обмеженого росту. Воно також активно відбувається в умовах надлишку доступних вуглеводів, особливо сахарози, що робить ці бактерії ефективними продуцентами ЕПС у різних промислових процесах. Візуально, присутність ЕПС можна визначити за утворенням мукоїдних колоній на твердих середовищах і збільшенням в'язкості в рідких середовищах. Важливо відзначити, що ЕПС, синтезовані лактобактеріями, можуть бути нещільно прикріплені до клітинної поверхні або виділятися в навколишнє середовище, що впливає на їхні властивості та застосування. Це дозволяє використовувати ЕПС як у складі бактеріальних культур, так і у вигляді очищених сполук для різних технологічних цілей [7].

Виробництво ЕПС залежить від штаму і на нього сильно впливають умови синтезу: джерело вуглецю та поживні речовини, рН і температура, час інкубації тощо. Найбільша різноманітність структур ЕПС була виявлена у

лактобактерій. Кожен штам має свої унікальні генетичні та метаболічні характеристики, що визначають його здатність до синтезу ЕПС. Крім того, на виробництво ЕПС суттєво впливають умови культивування, такі як тип і концентрація вуглеводів, наявність необхідних мінералів і вітамінів, оптимальні значення рН і температури, а також тривалість культивування [2, 8].

З літератури відомо, що вихід EPS *W. cibaria* MG1 залежав від умов зростання. У бульйоні MRS з додаванням сахарози кількість виробленого EPS (декстрану) становила 36,4 г/л, тоді як у суслі з 10% додаванням сахарози було досягнуто лише 14,4 г/л. Ефективне виробництво EPS *W. cibaria* MG1 тісно пов'язане з додаванням сахарози. Враховуючи складний склад середовища, було підкреслено позитивну кореляцію між виробництвом EPS та збільшенням співвідношення сахарози до мальтози [8].

Виробництво ЕПС з сахарози різними *Leuconostoc lactis*, *L. mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides*, *Weissella cibaria*. Як специфічний субстрат використовувався MRS, і експерименти проводили при 25°C, 30°C і 37°C. Усі ці ізоляти були здатні виробляти EPS із сахарози при 30 °C. Деякі дослідження показали, що здатність молочнокислих бактерій виробляти EPS із сахарози зумовлена дією глюкансахарази або фруктансахарази. Нещодавно було повідомлено, що іони кальцію мають значний вплив на біосинтез EPS у *Lactobacillus plantarum* K25. Додавання CaCl₂ у кількості 20 мг/л у середовищі SDM збільшило вихід EPS на 40%, до 238,6 мг/л за 24 години інкубації, а також змінило мікроструктуру полімеру. Стабільна продукція EPS була зареєстрована при 20-80 мг/л CaCl₂, та пригнічується підвищенням концентрації CaCl₂ до 100 мг/л [9].

Для оцінки біосинтезу EPS *Lactobacillus rhamnosus* ZY середовище MRS було доповнене 10 мл CaCl₂. Прослідковувалась тенденція, що додавання CaCl₂ викликало надвиробництво EPS. Вихід EPS, *L. rhamnosus* ZY при 37 °C

у присутності CaCl_2 , знизився з 2203,5 мг/л (після 12 год культивування) до 273,2 мг/л (через 72 години) [10].

Роди *Lactobacillus* і *Weissella* демонструють досить різні механізми виробництва EPS. Для підтвердження бульйон MRS був доповнений 2%(w/w) сахарози і EPS *W. cibaria* виросла з 82 мг/л до 9838 мг/л. Вплив сахарози на EPS, що виробляється різними штамами *Lactobacillus* при 30 °C, демонструє однакові данні, приблизно від 105 мг/л до 253 мг/л. Додавання в бульйон MRS 2% сахарози збільшило вихід EPS у *L. plantarum* 23 з 72 мг/л до 105 мг/л та з 199 мг/л до 253 мг/л у *Lactobacillus acidophilus* [10,11].

Інші літературні дані описують *L. plantarum* NTMI05 і *L. plantarum* NTMI20 які теж мають здатність продукувати EPS. Вносили у поживне середовище дріжджовий екстракт покращив виробництво EPS у *L. plantarum* NTMI20 а з неорганічних джерел азоту, сульфат амонію був найефективнішим – концентрація ЕПС 0,35 г/л. Було також вивчено вплив часу інкубації на виробництво EPS, підкреслюючи, що для обох штамів найвища концентрація EPS досягалася через 72 год (*L. plantarum* NTMI05 – 0,34 г/л у і *L. plantarum* NTMI20 – 0,27 г/л) [12].

Склад середовища – це один з найважливіших факторів, що впливають на виробництво EPS. Синергетична дія в результаті одночасної присутності в середовищі різних штамів LAB має велике значення для продукції EPS. Якщо складність синтетичних механізмів може бути перешкодою, створення стресу навколишнього середовища спричинить надмірну експресію генів, пов'язаних з виробництвом EPS [7, 11].

Нещодавно вчені розглянули методи виробництва, виділення, очищення та визначення EPS. Штами, що продукують EPS, як правило, ідентифікуються на середовищах за появою слизових колоній на твердих середовищах або в'язких розчинів на рідких. На основі ультрафільтрації та гель-проникної хроматографії було розроблено швидкий метод скринінгу EPS, що виробляється штамами молочнокислих бактерій. Цей метод поєднувався зі

скринінгом за допомогою ПЛР, виконаної з парами праймерів, спрямованих на різні гени, залучені до виробництва EPS [12].

Виділення чистих екзополісахаридів, уникаючи їх забруднення є першим кроком структурного аналізу та виходу будь-якого ЕПС. Виділення ЕПС з культури включають видалення клітин, осадження полімеру, а також діаліз і висушування. Для видалення клітин використовується центрифугування або фільтрація, тоді як осадження полімеру зазвичай здійснюється додаванням холодного етанолу або ацетону. Додаткові етапи очищення, такі як мембранна фільтрація, аніонообмінна та/або гельпроникна хроматографія, можуть бути застосовані для характеристики структури EPS і для вивчення його потенційних біологічних застосувань [11, 12].

Концентрація EPS може бути визначена методом фенол-сульфатної кислоти, який оцінює вміст нейтральних вуглеводів за допомогою високоефективної ексклюзійної хроматографії. Молекулярна маса EPS вимірюється на основі часу утримування полісахариду, елюйованого HPSEC-RI. Також використовуються такі методи як гель-проникна хроматографія та асиметричне фракціонування потоком поля [13].

Для поліпшення своїх властивостей екзополісахариди, що виділяються молочнокислими бактеріями, піддаються різним обробкам, а саме:

- для більшої еластичності ЕПС додають пластифікатори, які мають здатність збільшувати рухливість біополімерних ланцюгів. Тож для підвищення гнучкості плівки кефірану пластифікують сорбітом, галактитом, гліцерином, олеїною кислотою, поліолами та цукрами, а плівки левану – гліцерином;

- для забезпечення рН і високотемпературної стабільності ЕПС комбінують з біосурфактантами - ліпопротеїдами, полісахаридно-ліпідним комплексом, фосфоліпідом;

- EPS у поєднанні з крохмалем утворюють плівки з покращеними механічними та хімічними властивостями, а нанокомпозитні плівки, що

складаються з крохмалю кефірану ZnO або левану та крохмалю, мають підвищену міцність на розрив [14].

1.3 Вплив стресових факторів на утворення ЕПС за допомогою мікроорганізмів.

Синтез екзополісахаридів може бути спричинений проявом певних стресових факторів для клітини. Серед варіації таких стресових умов можуть бути зміна рН та температура культурального середовища. Ці показники впливають не тільки на ріст а й на кількість синтезованого ЕПС.

рН культурального середовища є одним з найважливіших абіотичних стресових факторів, що впливає як на ріст лактобактерій, так і на виробництво ними ЕПС. Для вивчення цього впливу зазвичай проводять експерименти, в яких початкове значення рН середовища MRS (або іншого відповідного середовища) регулюється до різних рівнів за допомогою розчинів NaOH або HCl. Після активації лактобактерій у стандартному середовищі, їх інокулюють у середовище з встановленим рН і культивують протягом певного часу, після чого визначають концентрацію накопичених ЕПС. Результати досліджень показують, що оптимальний рН для формування ЕПС залежить від конкретного штаму LAB та експериментальних умов. Однак, існує загальна тенденція до того, що найбільш сприятливим для максимального виробництва ЕПС є рН, близький до 6,0 [15].

Наприклад, у дослідженні Khanh і Thao було встановлено, що штам *Lactobacillus plantarum* T10 продукував найбільшу кількість ЕПС (397,72 мг/л) при рН 5.5, що є досить близьким до нейтрального значення[15]. Подібні результати спостерігалися й для інших видів лактобацил. Naj-Mustafa та співавтори у своїй роботі з штамом *Lactobacillus rhamnosus* 519 повідомили, що максимальний рівень ЕПС був досягнутий при рН 5,7, а подальше підвищення рН призводило до зниження кількості продукованих полісахаридів [16].

З іншого боку, Aslim та співавтори виявили, що для штамів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 та G12 найбільша кількість ЕПС утворювалася при рН 6,2, порівняно з іншими значеннями рН (4,0 – 7,0). Це підкреслює специфічність штаму до оптимального рН для виробництва ЕПС [17]. Цікаво, що існують і протилежні дані щодо впливу нейтрального рН на біосинтез ЕПС. На відміну від результатів, які показують зниження рівня ЕПС при нейтральному рН, Imran та співавтори показали, що нейтральний рН (7,0) стимулював виробництво ЕПС у штамів *Lactobacillus plantarum* NTMI05 та NTMI20 [18].

рН впливає на активність ферментів, проникність клітинної мембрани, доступність поживних речовин та інші ключові фізіологічні процеси. Оскільки біосинтез ЕПС є метаболічно залежним процесом, зміни рН можуть безпосередньо впливати на функціонування ферментів, залучених до синтезу полісахаридних ланцюгів, а також на загальний метаболічний стан клітини [18].

Кисле середовище може призводити до денатурації деяких ферментів, необхідних для росту та синтезу ЕПС, а також може впливати на стабільність самих полісахаридів. Лужне середовище також може бути стресовим для багатьох лактобактерій, порушуючи іонний баланс клітини та функціонування мембранних білків.

Оптимальний рН для виробництва ЕПС часто є компромісом між оптимальним рН для росту клітин та оптимальним рН для активності ферментів, специфічно залучених до синтезу ЕПС. У деяких випадках, помірний стрес, викликаний незначним відхиленням рН від оптимального для росту, може фактично стимулювати виробництво захисних сполук, таких як ЕПС [17, 18].

Вплив температури на виробництво екзополісахаридів (ЕПС) лактобактеріями досліджувався шляхом інокуляції свіжовирощених культур лактобактерій у середовище MRS та інкубації при різних температурних

режимах: 20°C, 30°C та 37°C протягом 120 год [18]. Літературні результати дослідження показали взаємодію між температурою та штамми лактобактерій щодо виробництва ЕПС. Для всіх штамів лактобактерій найвищий рівень виробництва ЕПС спостерігався при температурі 30 °C, яка є оптимальною температурою росту. На підставі цих даних, температура 30°C була обрана як оптимальна температура інкубації для подальших експериментів.

Подальше підвищення температури культивування з 30°C до 37°C призводило до різкого зниження виробництва ЕПС у всіх досліджуваних штамів LAB. Хоча подібна тенденція до зниження спостерігалася і при найнижчій протестованій температурі – 20°C. Зокрема, кількість ЕПС, що продукувалася *Lactobacillus plantarum* MF460 при 20°C (418,09 мг/л), була близькою до рівня при 30°C (433,61 мг/л) [18].

Серед десяти протестованих штамів LAB, максимальну кількість ЕПС при 30 °C продукував *Lactobacillus plantarum* MF460 (433,61 мг/л) найнижча концентрація ЕПС була виявлена для *Lactobacillus plantarum* MF176 (56,15 мг/л) при температурі 37 °C. Найбільш різке зниження виробництва ЕПС спостерігалось у штаму MF176 при підвищенні температури з 30 °C до 37 °C, коли концентрація ЕПС зменшилася приблизно на 85% (з 377.50 до 56.15 мг/л)[18].

Температура є одним з найважливіших параметрів, що впливають на біосинтез ЕПС. У цьому дослідженні будь-яке відхилення температури культивування від оптимальної температури росту (30 °C), як у бік підвищення, так і в бік зниження, призводило до зменшення виробництва ЕПС. Найвища протестована температура (37 °C) зумовила найнижчий рівень виробництва ЕПС у всіх досліджуваних штамів лактобактерій [19].

Для мезофільних штамів *Lactobacillus* існує тенденція, що виробництво ЕПС стимулюється в субоптимальних умовах росту, таких як низькі температури, тоді як для термофільних штамів LAB зазвичай повідомляється

про асоційованість виробництва ЕПС з ростом. Zhang та співавтори повідомили, що *Lactobacillus fermentum* F6 продукував більшу кількість ЕПС при оптимальній температурі росту (37 °C). Polak-Berecka та співавтори [19, 20] також виявили, що виробництво ЕПС штамом *Lactobacillus rhamnosus* було більшим при 37 °C, ніж при 30 °C. Загалом, оптимальна температура для виробництва ЕПС для мезофільних та термофільних *Lactobacillus* становить у діапазоні 25 °C – 40 °C [20].

Проте, низка досліджень показує, що низькі температури помітно підвищують рівень виробництва ЕПС *Lactobacillus*. Наприклад, у дослідженні Tsuda та Miyamoto найвищий вихід ЕПС було отримано при 25 °C, що було нижче оптимальної температури росту (30°C) протестованого штаму *Lactobacillus plantarum* 301102S. З іншого боку, *Lactobacillus plantarum* T10 продукував більшу кількість ЕПС (410,44 мг/л) при 35 °C, ніж при 30, 40 та 45 °C [21,22]. Для *Lactobacillus sakei*, Degeest та співавтори також спостерігали вищі виходи ЕПС при температурах нижчих за оптимальну температуру росту досліджуваного штаму (30 °C) [22]. Bengoa та співавтори повідомили, що штами *Lactobacillus paracasei* продукували більшу кількість ЕПС при 20°C, ніж при 30°C або 37°C [23, 24].

Стимулюючий ефект низької температури на виробництво ЕПС мезофільними *Lactobacillus* пояснюється тим, що за субоптимальних температур клітини ростуть значно повільніше, що призводить до сповільнення біосинтезу полімерів клітинної стінки. Однак існує й інше можливе пояснення спостережуваного зв'язку між ростом та виробництвом ЕПС у протестованих штамів лактобактерій щодо температури. При оптимальних температурах росту мікроорганізми можуть використовувати надлишок цукру для біосинтезу клітинної стінки, що може пояснювати вплив температури на ріст та виробництво ЕПС у цьому дослідженні [24].

1.4 Використання ЕПС молочнокислих бактерій в промисловості

Харчова промисловість. Екзополісахариди, що виробляються молочнокислими бактеріями, знайшли широке застосування в харчовій промисловості завдяки їхній здатності покращувати реологічні властивості харчових продуктів, особливо ферментованих. Вони виступають в ролі природних згущувачів, надаючи продуктам бажану консистенцію та текстуру, а також використовуються як природні функціональні харчові інгредієнти, що сприяють покращенню їхніх органолептичних властивостей [25]. Специфічні характеристики екзополісахаридів зумовлюють їхні численні функціональні властивості, такі як здатність утворювати в'язкі розчини, гелі, плівки та емульсії, що дозволяє використовувати їх у широкому спектрі харчових продуктів. Вони також ефективно запобігають синерезису, зберігаючи стабільність продукту протягом тривалого часу, та можуть надавати солодкуватий присмак, покращуючи смакові якості. ЕПС беруть участь у виробництві харчових продуктів, таких як кисломолочні продукти, хлібобулочні вироби, ферментовані овочеві продукти [25]. ЕПС використовуються для загущення йогуртів, кефірів, сметани, надаючи їм кремоподібну консистенцію та запобігаючи синерезису, у виробництві сирів ЕПС можуть покращувати текстуру, сприяти формуванню бажаної консистенції та збільшувати вихід продукту, ЕПС додають до тіста для покращення його реологічних властивостей, збільшення об'єму хліба та подовження терміну його зберігання, вони можуть також покращувати м'якість та еластичність хліба, у виробництві квашеної капусти, солоних огірків та інших ферментованих овочів ЕПС сприяють формуванню бажаної текстури та консистенції, вони можуть також покращувати смакові якості продуктів та збільшувати їх термін зберігання [25].

Фармацевтична галузь. Екзополісахариди стають дедалі важливішими в розробці інноваційних стратегій доставки ліків, демонструючи виняткові властивості, що роблять їх незамінними в цій галузі. Їх біосумісність, тобто

здатність не викликати відторгнення в організмі, та біорозкладність, що забезпечує їхнє безпечне виведення, роблять їх ідеальними кандидатами для створення систем доставки лікарських засобів. Відсутність агресивних реакцій з боку організму на введення ЕПС мінімізує ризики побічних ефектів, що є критично важливим у фармакології [26].

Різнманітні ЕПС, такі як декстран, пулулан, ксантан, гелан, леван, курдлан, хітозан та мауран, показали вражаючі результати в дослідженнях, присвячених транспортуванню ліків. Вони можуть використовуватися для створення наночасток, гідрогелів та інших систем доставки, які забезпечують захист лікарських засобів від деградації в процесі транспортування та їхнє цільове вивільнення в місці призначення. Це дозволяє підвищити ефективність лікування, зменшити необхідну дозу препарату та знизити ризик побічних ефектів [26].

Зокрема, вони використовуються для створення будівельних систем у тканинній інженерії, де ЕПС слугують каркасами для регенерації пошкоджених тканин, імітуючи природний позаклітинний матрикс. Вони також застосовуються як матеріали для покриття медичних імплантатів, покращуючи їхню біосумісність та мінімізуючи ризик відторгнення, що є критично важливим для успішної імплантації. У хірургії ЕПС використовуються як ефективні хірургічні герметики, забезпечуючи надійне з'єднання тканин та сприяючи швидкому загоєнню ран. ЕПС можуть використовуватися як самотійно, так і в поєднанні з різними біоактивними матеріалами, розширюючи спектр їхнього застосування. Наприклад, у поєднанні з біополімерами вони формують композитні матеріали з покращеними механічними та біологічними властивостями, що є важливим для створення імплантатів з довготривалою функціональністю [26, 27]. У поєднанні з клітинами вони слугують основою для створення тканинних конструкцій та систем клітинної терапії, відкриваючи нові можливості для регенеративної медицини. Крім того, ЕПС демонструють здатність до

формування гідрогелів, що мають широкий спектр застосування в медицині, від створення ранозагоювальних покриттів. Їхня здатність до формування плівок робить їх придатними для створення захисних покриттів для медичних пристроїв та ранозагоювальних пов'язок. Біорозкладність ЕПС забезпечує їхнє безпечне виведення з організму після виконання своєї функції, що є важливим аспектом для медичних матеріалів [27].

Нафтовидобувна промисловість. У нафтогазовій промисловості екзополісахариди відіграють надзвичайно важливу роль, сприяючи підвищенню ефективності та безпеки процесів буріння та видобутку нафти. Їхні унікальні реологічні властивості роблять їх незамінними компонентами бурових розчинів, які використовуються для підтримки стабільності свердловин та ефективного винесення бурового шламу на поверхню. ЕПС, додані до бурових розчинів, значно збільшують їхню в'язкість, що дозволяє запобігти втратам рідини в пористі породи, які можуть призвести до серйозних ускладнень під час буріння [28]. Особливо важливою є здатність ЕПС до контролю реологічних властивостей розчинів в умовах високих температур та тиску, що характерні для глибоких свердловин. Це дозволяє підтримувати оптимальні умови для буріння, запобігаючи заклинюванню бурового інструменту та забезпечуючи ефективне видалення бурового шламу. Крім того, ЕПС використовуються для збільшення видобутку нафти з родовищ, де вони вводяться в нафтові пласти для покращення рухливості нафти та збільшення її витіснення з пор. Вони діють як поверхнево-активні речовини, зменшуючи поверхневий натяг між нафтою та водою, що сприяє ефективнішому витісненню нафти з пор. Також, ЕПС допомагають контролювати в'язкість рідини, яка вводиться в свердловину, що дозволяє оптимізувати процес видобутку нафти та збільшити коефіцієнт вилучення нафти з родовищ [28].

Екзополісахариди, що продукуються молочнокислими бактеріями, є універсальними біополімерами з широким спектром застосування в різних

галузях промисловості. Їхні унікальні властивості, такі як здатність до гелеутворення, згущення та плівкоутворення, роблять їх цінними інгредієнтами в харчовій промисловості, де вони покращують текстуру та стабільність продуктів.

Висновок до розділу 1.

Екзополісахариди є біополімерами що синтезуються різними типами організмів, для виживання та адаптації до стресових умов. Використання *Xanthomonas* spp. і *Lactobacillus* spp. для отримання екзополісахаридів перспективне завдяки різноманітності штамів і безпечному статусу. Гриби та дріжджі (*Aureobasidium pullulans* і *Cryptococcus laurentii*) мають високий потенціал для синтезу екзополісахаридів, що застосовуються в харчовій, фармацевтичній і косметичній промисловості. Продукування екзополісахаридів молочнокислими бактеріями залежить від штамів, умов культивування і складу середовища. Синтез молочнокислими бактеріями залежить від стресових факторів (рН, температура), оптимальні умови часто відрізняються від стандартних умов росту. Екзополісахариди молочнокислих бактерій використовують як загусники, стабілізатори у харчовій, фармацевтичній та нафтогазовій промисловості завдяки їхнім фізико-хімічним властивостям.

РОЗДІЛ 2.

МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ

2.1 Характеристика *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691

Під час проведення досліджень ми використовували штам *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691, який отримали з колекції мікроорганізмів України Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України

Молочнокислі мікроорганізми – група, що здатні на молочнокисле бродіння – з їх допомогою відбувається розпад вуглеводів до молочної кислоти. Окрім першочергового продукту бродіння а саме – молочної кислоти – утворюються другорядні продукти: екзополісахариди, вуглекислий газ, ароматичні речовини, оцтова кислота, етанол та ін. При біосинтезі ці другорядні продукти розцінюють, як антагоністичні активності лактобацил, за допомогою яких забезпечується антибактеріальний ефект відносно представників умовно-патогенної та патогенної флори. Загалом лактобацили дуже широко розповсюджені у навколишньому середовищі, організмах, зокрема людському, та в продуктах тваринного та рослинного походження.

Структурно молочнокислі бактерії – це палички, що розміщені короткими ланцюжками, поодинокі або попарно, вони нерухомі та мають грампозитивний статус. Лактобацили не утворюють капсул, спор та є факультативними анаеробами. Молочнокислі бактерії розмножуються за використання механізмів розділення клітин та в інших випадках перешнуровуванням. Мають бродильний тип метаболізму, це означає що майже п'ятдесят відсотків вуглецю утворених ними кінцевих продуктів бродіння випадає на лактат. Метаболічні властивості молочнокислих бактерій показують нам що вони не здатні відновлювати нітрати, не розріджують желатин, не можуть продукувати каталазу та не містять цитохромів. Вирощують лактобацили на середовищі MRS та використовують додаткові джерела азоту для більшого та активнішого накопичення біомаси. Оптимальна температура росту молочнокислих бактерій $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ [3].

Лактобактерії мають доволі багато вимог до поживних середовищ для їх вирощування. Для нормального росту молочнокислих необхідними вважаються такі амінокислоти: глютамінова кислота, аргінін, цистеїн, триптофан, лейцин, валін, фенілаланін, тирозин. Ряд зазначених вітамінів: біотин, пантотенова, нікотинова кислоти, тіамін. Також важливу роль у отриманні біоматеріалу мають сполуки міді, калію, заліза, йоду, натрію, фосфору, магнію, сірки та марганцю.

Бактерії роду *Lactobacillus* мають дуже ефективний метаболізм кислот та вуглеводів. Характеризуються тим що утворюють блискучі колонії сіро-білого кольору на щільних агаризованих середовищах. У роді *Lactobacillus* налічується близько 56 видів та 11 родів. Молочнокислі бактерії стійкі в кислотних середовищах, та здатні розмножуватися за температурних умов від 15°C до 50°C [7].

Таксономічний статус

Царство: Бактерії

Тип: Firmicutes

Клас: Bacilli

Порядок: Lactobacillales

Родина: Lactobacillaceae

Рід: Lactobacillus

Вид: acidophilus

Штам: УКМ В-2691

2.2 Поживні середовища для культивування *L. acidophilus* УКМ В-2691

Для молочнокислих бактерій характерно використовувати органічні та неорганічні субстрати, щоб забезпечити нормальний ріст та розвиток культури, оскільки саме за допомогою таких субстратів лактобацили отримують енергію та матеріал для біосинтезу та продукування клітин.

Для зростання молочнокислих бактерій потрібен ряд макроелементів (вуглець, азот, водень, кисень, фосфор та ін.) та мікроелементів (цинк, марганець, йод, мідь тощо), також як додаткові джерела вуглецю можна використовувати субстрати та екстракти відділенні з різних сировини рослинного та тваринного походження. Деякі типи мікроорганізмів мають бути додатково забезпечені такими елементами: амінокислоти, нуклеотиди, жирні кислоти і вітаміни. Середовища які створюються в природних та штучних умовах мають бути забезпечені всіма потрібними видами мікро та макроелементів, і мати збалансований склад який придатний для вирощування та розвитку культури. Вимоги до створення поживних середовищ:

- Мати у своєму складі джерела макро- та мікроелементів, та, за потреби, додатково вітаміни і фактори росту;
- Важливо аби всі елементи середовища були збалансовані для коректного біосинтезу;
- Вода має бути у складі середовища у достатньому рівні;
- Створити оптимальні умови рН;
- Тиск у середовищі має бути ізотонічними, та мати однаковий рівень осмотичного тиску з внутрішнім середовищем клітини;
- Важливо зберігати стерильність аби запобігти контамінації під час біосинтезу.

Використовуючи процес стерилізації знищуємо усю мікробіоту яка може бути або вже є контамінуючою, та здатна розвиватися в умовах продукування іншого організму тим самим перешкоджаючи його росту та розвитку. Під процес стерилізації підпадають поживні середовища та субстрати, лабораторний посуд який планується використати під час засівання культури та дослідження, розчини, інструменти і т.д.

2.2.1 Приготування середовища MRS агару

MRS (Ман, Рогоза, Шарп) – середовище для культивування лактобактерій. Середовище створене для культивування, подальшого

виділення та підрахунку бактерій роду *Lactobacillus*, *Pediococcus* та *Leuconostoc* отриманих з біоматеріалів та харчових продуктів. Натрію цитрат і низький рН інгібують зростання багатьох мікроорганізмів, але в той самий час підтримують зростання лактобактерій. Дикалію фосфат і ацетат натрію це буферні агенти які використовують для підтримки певного рівня рН. Пептон, м'ясний екстракт та дріжджовий екстракт мають у своєму складі вітаміни групи В, та забезпечують азот для культивування, Декстроза є вуглеводом який використовують для ферментації. Бактеріологічний агар є ущільнюючим матеріалом для середовища.

Ріст деяких штамів лактобактерій потребує сталого рівня рН вище 6,0, тому кислотність є однією з основних критеріїв для підтримки росту. Стандарт ISO 15214 рекомендує це середовище для росту молочнокислих бактерій та їх підрахунку колоній на чашках.

Середовище використовували стандартизоване (компанії Conda, Іспанія). Склад MRS, г/л: декстроза – 20,0, дикалію фосфат – 2,0, ферментативний перевар казеїну – 10,0, тріамонія цитрат – 2,0, м'ясний екстракт – 10,0, твін 80 – 1,08, натрій ацетат – 5,0, магнію сульфат гептагідрат – 0,20, дріжджовий екстракт – 4,0, марганцю сульфат тетрагідрат – 0,05, бактеріологічний агар – 10,0, вода дистильована до 1000,0 мл.

Зовнішній вигляд сухого середовища: гомогенний сипкий жовтий порошок.

Готове середовище має бурштиновий або темно-бурштиновий колір, та не містить мутності. Кінцеве значення рН (при 25°C) 5,9 +/- 0,1

Спосіб приготування: Сухе середовище у кількості 64 г розчиняємо в 1 л дистильованої води. Перемішуємо та нагріваємо до повного розчинення порошку. Потрібно прокип'ятити одну хвилину для повноцінного розчинення та стерилізувати за допомогою автоклаву при 121°C протягом 12 хвилин. Залишаємо для зниження температурного показника до 45-50°C, перемішуємо та розливаємо по заготовлених стерильних чашках Петрі. Готове розлите

середовище можемо зберігати за температури 8-15°C. Заморожування не допускається, приготований MRS бульйон можемо використовувати протягом 10 діб, якщо будемо його зберігати за температури 2-8°C [29].

2.2.2 Приготування глюкозо-пептонного середовища (ГПС)

Глюкозо-пептонне середовище (ГПС) – є одним з поширених середовищ у лабораторній практиці. Це поживне середовище є універсальним та може використовуватися для культивування багатьох видів мікроорганізмів таких як бактерії, дріжджі тощо. У цьому середовищі використовуються пептон - який є основним джерелом легкозасвоюваного азоту, пептидів та ряду поживних речовин. Дріжджовий екстракт – містить у своєму складі велику кількість вітамінів групи В, різноманітних мікроелементів які в свою чергу стимулюють ріст мікроорганізмів. Глюкоза - використовується у більшій кількості оскільки вона служить основним джерелом енергії для мікроорганізмів, завдяки чому впливає на метаболізм та збільшення біомаси. Завдяки своєму складу середовище ГПС має багато поживних речовин для біосинтезу мікроорганізмів. Приготування середовища ГПС. У роботі використовували модифіковане нами середовище ГПС згідно попередніх досліджень.

Модифіковане середовище ГПС мало наступний склад, г/л: пептон – 20,0, дріжджовий екстракт – 20,0, глюкоза – 30,0, сульфат магнію – 0,05, хлорид натрію – 2, дистильована вода – до 1000 мл.

Готове середовище має прозорий брунатний або темно-коричневий колір, не містить домішок та осаду.

Приготування середовища ГПС: наважки компонентів зважували та розчиняли у дистильованій воді. Перемішували розчинення та стерилізували за допомогою автоклавування за температури 121°C протягом 15 хвилин. Готове середовище після стерилізації залишаємо охолонути до температури 37°C для якісної подальшої роботи. Готове поживне середовище ГПС варто

зберігати у прохолодному темному місці дотримуючись температурних режимів 2-8°C для запобігання деградації компонентів. Використовувати приготоване середовище у лабораторній практиці можемо до 2 тижнів якщо воно не виявляє ознак контамінації.

2.3. Отримання посівного матеріалу *L. acidophilus* УКМ В-2691

Для проведення біосинтезу з метою отримання екзополісахаридів нам потрібно отримати I та II генерацію *L. acidophilus* УКМ В-2691. На 1 етапі вирощування беремо ліофільно висушену культуру *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 у розмірі 0,1 г переносимо у 1 мл фізіологічного розчину, після чого переносимо у стерильний флакон з середовищем MRS-бульйон (див розділ 2.2.1) у розмірі 9 мл та відправляємо на шутель апарат для вирощування за температурних умов 37°C, протягом 48 год та 160 об/хв. На 2 етапі відбираємо 1 мл біомаси з флакона та пересіваємо її на новий MRS-бульйон. Температурні показники залишаємо на такому ж рівні оскільки вони є оптимальними для вирощування бактерій – 37°C, протягом 48 год та 160 об/хв. Використовуємо культуру, як посівний матеріал для подальшого отримання екзополісахаридів.

2.4. Біосинтез *L. acidophilus* УКМ В-2691

У стерильні флакони загальним об'ємом 20 мл, вносимо по 9 мл поживного середовища ГПС (див розділ 2.2.2) до якого додаємо по 1 мл посівного матеріалу. Флакони з культурою поміщаємо на шутель-апарат Biosan ES-20 (Латвія) і культивуємо при 37°C, 160 об/хв.

Культивування проводимо двома варіантами з урахування стресових факторів, які впливали на культуру та синтез нею ЕПС. Контрольні зразки вирощували при 160 об/хв упродовж 96 год, тому що саме цей час дозволяє культурі досягти накопичення ЕПС. Всі дослідні зразки піддавали стресовим

факторам: фізичним (зміна рН і температури) та хімічним (внесення антибіотиків).

2.4.1 Вплив фізичних стресових факторів на біосинтез *L. acidophilus* УКМ В-2691

Вплив фізичних стресових факторів проводили за допомогою зміни рН середовища та температури.

Температура. Культуру вирощували 48 год за оптимальних параметрів, а саме температурі 37 С та перемішуванні 160 об/хв, а після чого змінювали температуру на 20С, 25С, 30С, 37С та 42С та вимикали перемішування.

рН середовища. Дослідження стресового фактору рН середовища проводили 2 варіантами. У першому випадку змінювали рН на початку культивування до значень рН 3, рН 7 та рН 9 та проводили культивування 96 год за температури 37 С, 160 об/хв. У другому випадку вирощували культуру у оптимальних умовах до 48 год, після чого змінювали рН середовища до значень рН 3, рН 7 та рН 9 та проводили подальше культивування до 96 год за тих же оптимальних умов, а саме температури 37С, 160 об/хв. рН змінювали за допомогою H_2SO_4 та NaOH відповідно.

2.4.2 Вплив хімічних стресових факторів на біосинтез *L. acidophilus* УКМ В-2691

Вплив хімічних стресових факторів проводили за допомогою внесення у ПС представників різних груп антибіотиків, а саме ванкоміцин, стрептоміцин, та тетрациклін. Антибіотики були обрані згідно літературних даних в яких зазначалось, що ці препарати не впливають на життєздатність лактобактерій. Кожен антибіотик вводився у поживне середовище з кінцевою концентрацією антибіотика від 0,1 – 10 мг/мл. Цей діапазон дозволив нам дослідити які мінімальні та максимальні концентрації антибіотику можуть призвести до стимуляції синтезу ЕПС шляхом стресу для клітин. Також цей діапазон

дозволив нам визначити поріг за якого антибіотик починає надмірно пригнічувати життєдіяльність бактерій.

Дослідження антибіотиків у якості хімічних стресових факторів проводили 2 варіантами. У першому випадку вносили антибіотик на початку культивування (0 год) у різних концентраціях 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 та 10 мг/мл та проводили культивування 96 год за температури 37 С, 160 об/хв. У другому випадку вирощували культуру у оптимальних умовах до 48 год, після чого вносили антибіотик у концентраціях 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 та 10 мг/мл та проводили подальше культивування до 96 год за тих же оптимальних умов, а саме температури 37 С, 160 об/хв.

«Ванкоміцин» від виробника ТОВ Фармекс-Груп з дозуванням 500 мг на флакон, у вигляді порошку для ін'єкцій у стерильних флаконах. Препарат виявляє ефективність проти грампозитивних мікроорганізмів. Діюча речовина пригнічує синтез бактеріальної стінки завдяки гальмуванню полімеризації глікопептидів та селективного інгібування синтезу РНК [30].

«Стрептоміцин» від виробника ПрАТ «Артеріум» з дозуванням 1000 мг на флакон, у вигляді порошку для ін'єкцій у стерильних флаконах. Препарат проявляє активність відносно грампозитивних та грамнегативних бактерій. Бактерицидна дія полягає у зв'язуванні бактеріальної рибосоми за допомогою 30S-субодиницею що призводить до пригнічення синтезу білка [31].

«Тетрациклін» від виробника ТА Вітаміни з дозуванням 100 мг, у вигляді таблеток вкритих оболонкою. Препарат активний відносно грампозитивних та грамнегативних бактерій. Препарат пригнічує рибосомальний синтез білка мікробної клітини [32].

2.5 Визначення біомаси *L. acidophilus* УКМ В-2691

Наступним етапом нашого дослідження є визначення біомаси, оскільки саме це дозволяє кількісно оцінити ріст культури та її реакцію на стресові фактори які були використані для стимуляції біосинтезу екзополісахаридів.

Існує безліч методів для визначення біомаси однак в ході нашого дослідження використовувались метод спектрофотометрії та метод підрахунку колоній на чашках Петрі за Дригальським. Спектрофотометричний метод дозволяє швидко оцінити оптичну щільність культуральної рідини. Метод підрахунку колоній на чашках Петрі є точним способом визначення кількості життєздатних мікроорганізмів оскільки він вимірює здатність окремих клітин формувати колонії на поживному середовищі.

2.5.1 Метод визначення біомаси за оптичною густиною

Першим етапом визначення біомаси досліджуваної культуральної рідини було обрано метод спектрофотометрії який дозволяє візуально відслідкувати ступінь мутності спричиненої мікроорганізмами зокрема накопичення біомаси [33].

Вимірювання оптичної густини проводилося на спектрофотометрі ULAB 102 (Україна) при стандартній довжині хвилі 600 нм. Ця хвиля є загальноприйнятою для бактеріальних суспензій оскільки при ній мінімізується поглинання світла складниками поживного середовища [5]. Для забезпечення точності був підготовлений контроль – чисте поживне середовище ГПС (див розділ 2.2.2). Зразок був внесений у кювету об'ємом 1 мл, таким чином вимірювали мутність спричинену лише бактеріальними клітинами та продуктами їх метаболізму [33].

Прилад автоматично обраховував оптичну густину, отримані показники записувалися для подальшого аналізу. Після кожного вимірювання дослідного зразку кювета піддавалась очистці та використовувалася повторно.

2.5.2 Метод підрахунку колоній на чашках Петрі (метод Дригальського)

Для оцінки впливу антибіотиків як стрес-факторів для підтвердження виживання *L.acidophilus* УКМ В-2691 та потенційного синтезу ЕПС використовували метод підрахунку колоній на чашках Петрі (метод Дригальського). Цей метод є важливим оскільки надає інформацію саме про живі клітини на відміну від методу спектрофотометрії [34].

Для цього методу відбиралися зразки культуральної рідини що перебували під впливом антибіотиків (ванкоміцин, стрептоміцин, еритроміцин та тетрациклін), оскільки саме ці антибіотики, за літературою, не знищують лактобактерії повністю, а створюють стресові умови які потенційно можуть слугувати активатором для росту та розвитку екзополісахаридів. Ми прагнули з'ясувати чи дійсно антибіотики стимулюють накопичення ЕПС. Для посіву використовувалося стерильні чаші Петрі з твердим середовищем MRS (див розділ 2.2.1) яке є оптимальним для росту лактобактерій. З кожного досліджуваного зразка стерильно відбирали по 100 мкл та наносили на середовище в чаші Петрі без розведення, за допомогою стерильного шпателя Дригальського культуральну рідину рівномірно розподіляли по всій поверхні поживного середовища. Після підготовки чаші Петрі з дослідними зразками відправляли культивуватися за оптимальних температурних умов 37°C протягом 48 год. Після завершення культивування проводився підрахунок кількості утворених колоній на кожній чаші Петрі, данні перераховувалися для обчислення концентрації життєздатних клітин у зразку КУО/мл [34].

2.6 Виділення та визначення ЕПС з *L. acidophilus* УКМ В-2691

Для визначення синтезованих екзополісахаридів штамом *L.acidophilus* УКМ В-2691 під впливом стресових факторів було використано стандартний метод осадження етанолом [35]. Через те що екзополісахариди мають низьку розчинність у спиртах, цей метод дозволяє виділити їх з водних розчинів.

Отриману культуральну рідину центрифугували у MICROmed CM-3M.01 (Китай) при 4000 об/хв упродовж 20 хв для відділення біомаси клітин. Потім з кожного дослідного варіанта відібирали по 2 мл надосадової рідини та переносилося у чистий зважений стерильний фалькон в який додавали трьократний об'єм охолодженого до -5°C 96% етанолу. Після додавання етанолу зразки перемішували на вортексі MICROmed V-3 (Китай) для рівномірного контакту культуральної рідини зі спиртом та ініціації процесу осадження ЕПС. Фалькони з дослідними зразками залишали при температурі 2°C на 24 години, такий час охолодження необхідний для повного осадження екзополісахаридів. Після охолодження візуально спостерігалось утворення характерних, для екзополісахаридів, волокнистих ланцюгів, таким чином ми якісно підтвердили наявність ЕПС у дослідних зразках. Зразки знову перемішувалися на вортексі та відправляли на центрифугування при 4000об/хв на 15 хвилин [36, 37]. Надосад обережно зливали намагаючись зберегти осаджений ЕПС, отриманий осад залишали на 12 годин для повного просихання та випаровування залишків етанолу. Після повного висихання осад екзополісахаридів зважували на вагах та отриманий результат перераховували для отримання кінцевих показників концентрації ЕПС у грамах на літр.

Висновок до розділу 2.

Lactobacillus acidophilus УКМ В-2691 — грампозитивна факультативно-анаеробна молочнокисла бактерія з антагоністичною активністю, ферментативним метаболізмом, що культивується на поживних середовищах. Для вирощування використовували стерильні середовища MRS і модифіковане ГПС, що містять поживні речовини, вітаміни, азот, вуглець та мають оптимальний рН. Посівний матеріал отримували шляхом двоетапного культивування у MRS-бульйоні при 37 °С протягом 48 год. Біосинтез проводили у флаконах з середовищем ГПС при 37 °С, 160 об/хв протягом 96 год. Стрес-фактори застосовували фізичні (температура, рН) та хімічні (антибіотики) двома способами. Для оцінки росту і реакції культури використовували спектрофотометрію (600 нм) і підрахунок колоній на чашках Петрі. Спектрофотометрія визначала загальну біомасу, а метод колоній — кількість життєздатних клітин після дії антибіотиків. екзополісахаридів визначали методом осадження етанолом, центрифугуванням, сушінням та зважуванням для обчислення концентрації.

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Визначення впливу температури на утворення екзополісахариду за допомогою *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691

Вирощували культуру молочнокислих бактерій *L. acidophilus* УКМ В-2691 на середовищі ГПС (див. розділ 2.2.2). У процесі культивування змінювали температуру, як один із стресових факторів, для збільшення накопичення ЕПС. Для того, щоб побачити вплив температури на накопичення метаболітів накопичували біомасу упродовж 48 год за оптимальної температури 37°C для розвитку та росту бактерій та перемішування 160 об/хв. Після чого змінювали температуру у діапазоні 20-42°C та вимикали повністю перемішування. На першому етапі перевіряли, як впливає зміна температури на накопичення біомаси після 48 год культивування. Результати досліджу впливу температури на біомасу представлені на рис. 3.1.

3.2 Визначення впливу рН на утворення екзополісахариду за допомогою *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691

Було вирощено культуру молочнокислих бактерій *L. acidophilus* УКМ В-2691 на середовищі ГПС (див. розділ 2.2.2). Під час культивування змінювали рН, використовуючи зміну умов як стресовий фактор, для збільшення утворення ЕПС. Щоб відслідкувати вплив на накопичення екзополісахаридів першочергово ми культивували штам за оптимальних умов, а саме температури 37°C впродовж 48 год використовуючи перемішування 160 об/хв для накопичення біомаси. Після чого змінювали кислотно-лужний баланс у діапазоні 3-9 рН та вимикали перемішування. Під час першого етапу дослідження перевіряли, як впливає зміна рН на накопичення екзополісахаридів після 48 год культивування. Результати досліджу впливу температури на біомасу представлені на рис. 3.2.

3.3 Визначення впливу антибіотиків на утворення екзополісахариду за допомогою *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691

Також використовували у якості стрес-факторів три антибіотики (ванкоміцин, стрептоміцин та тетрациклін) у кінцевих концентраціях 0,1-10 мг/мл. Після вирощення культури *L. acidophilus* УКМ В-2691 на середовищі ГПС (див. розділ 2.2.2) ми змінювали середовище в зразках додаючи туди антибіотик у різних концентраціях 0,1-10 мг/мл. Використовували цю зміну умов як стресовий фактор, для збільшення утворення ЕПС. Щоб відслідкувати вплив антибіотика на кількість накопичення екзополісахаридів використовували два варіанти внесення антибіотиків. Перший – на початку культивування, а другий – після 48 год росту культури за температури 37°C впродовж 48 год використовуючи перемішування 160 об/хв (див. розд. 2.4.2).

Висновок до розділу 3.

У межах цієї дослідницької роботи було вивчено процес біосинтезу екзополісахаридів штамом *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 за змінених фізико-хімічних умов. У лабораторних умовах штам продемонстрував високу здатність до синтезу цільового продукту на поживних середовищах MRS та ГПС. Було з'ясовано, що температура культивування впливає на продуктивність синтезу, оскільки найбільша кількість екзополісахаридів утворювалася за температури близько 37°C. За вищих або нижчих температур цей показник знижувався. Схожим чином штам реагував на зміни рН середовища. Найкращі результати досягались при кислому середовищі (рН3). Також було вивчено реакцію продуцента на хімічний стрес, додавання різних антибіотиків. Ми побачили, що усі антибіотики гарно діяли у ролі стресового фактора, концентрація ЕПС залежала від концентрації антибіотика, найкращі результати надали ванкоміцин-10мг, стрептоміцин-1мг, тетрациклін-1мг і еритроміцин-0,5мг. Для відстеження динаміки росту біомаси та кількісної оцінки ЕПС використовувалися спектрофотометричні методи й метод

Дригальського. Дослідження підтвердило актуальність використання *L.acidophilus* УКМ В-2691 як перспективного продуцента екзополісахаридів для подальшого застосування у промисловості. Отримані результати можуть стати підґрунтям для створення біотехнологічних процесів з виробництва природних полімерів.

ВИСНОВКИ

Встановлено що температура змінена після накопичення біомаси за 37°C, 160 об/хв на 30°C без перемішування сприяє збільшенню виходу ЕПС (7,73 г/л) у порівнянні з контролем (6,89 г/л).

При зниженні рН до 3 після 48 год отримано максимум ЕПС – 16,5 г/л, тоді як у контролі фіксується у 2,5 рази менше (6,89 г/л). Кисле середовище викликає стрес і посилює синтез екзополісахаридів.

Досліджено вплив антибіотиків (0,1–10 мг/мл) на синтез ЕПС *L. acidophilus* УКМ В-2691. Концентрації ванкоміцину 2,5 та 5 мг/мл стимулюють утворення ЕПС у порівнянні з контролем 12-14 г/л майже удвічі. Однак найвищий рівень ЕПС (25,4 г/л) зафіксовано при внесення у середовище 10 мг/мл ванкоміцину на 48-й годині культивування, що в 4 рази вище за контроль. Також важливо зазначити, що ванкоміцин не пригнічує накопичення біомаси за показником ОГ.

Концентрації стрептоміцину 2,5, 5 та 10 мг/мл внесені на початку культивування пригнічують рівень накопичення біомаси (0,2 – 0,25 у.о), але при цьому синтезують ЕПС на рівні контролю (5,55 – 7,25 г/л). Тобто клітини здатні адаптуватися до умов середовища за допомогою своїх захисних механізмів, один з яких є утворення екзополісахаридів. Найкращі результати ЕПС спостерігаємо при внесенні у середовище 1 мг/мл на початку культивування (11,95 г/л) та внесення 2,5 мг/мл стрептоміцину на 48 годину культивування (10,3 г/л).

Аналізуючи результати впливу тетрацикліну на накопичення ЕПС *L. acidophilus* УКМ В-2691 можемо зробити висновок, що стимулювання екзополісахаридів відбувається за внесення у середовище тетрацикліну у концентрації 1 мг/мл на 48 год культивування. За цієї концентрації спостерігаємо найвищий вихід ЕПС – 13,15 г/л, що майже вдвічі вище за показники контролю.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Nejadmansouri M, Razmjooei M, Safdarianghomsheh R, Shad E, Delvigne F, Khalesi M. Semi-continuous production of xanthan in biofilm reactor using *Xanthomonas campestris* // J Biotechnol. – 2021. – Vol. 328. – P. 1-11. – DOI: 10.1016/j.jbiotec.2021.01.004.
2. Oleksy M, Klewicka E. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2017. – Vol. 58, № 3. – P. 450–462. – DOI: 10.1080/10408398.2016.1187112.
3. Schiraldi C, Valli V, Molinaro A, Carteni M, De Rosa M. Exopolysaccharides production in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* exploiting microfiltration // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2006. – Vol. 33, № 5. – P. 384–390. – DOI: 10.1007/s10295-005-0068-x.
4. Nejadmansouri M, Razmjooei M, Safdarianghomsheh R, Shad E, Delvigne F, Khalesi M. Semi-continuous production of xanthan in biofilm reactor using *Xanthomonas campestris* // J Biotechnol. – 2021. – Vol. 328. – P. 1-11. – DOI: 10.1016/j.jbiotec.2021.01.004.
5. An C, Ma SJ, Chang F, Xue WJ. Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose // Braz J Microbiol. – 2017 Jan-Mar. – Vol. 48, № 1. – P. 180-185. – DOI: 10.1016/j.bjm.2016.11.001.
6. Pavlova K, Rusinova-Videva S, Kuncheva M et al. Synthesis and Characterization of an Exopolysaccharide by Antarctic Yeast Strain *Cryptococcus laurentii* AL100 // Appl Biochem Biotechnol. – 2011. – Vol. 163. – P. 1038–1052. – DOI: 10.1007/s12010-010-9107-9.
7. Patel S, Majumder A, Goyal A. Potentials of exopolysaccharides from lactic Acid bacteria // Indian J Microbiol. – 2012 Mar. – Vol. 52, № 1. – P. 3-12. – DOI: 10.1007/s12088-011-0148-8.
8. Wolter A, Hager AS, Zannini E, Galle S, Gänzle MG, Waters DM, Arendt EK. Evaluation of exopolysaccharide producing *Weissella cibaria* MG1 strain for

the production of sourdough from various flours // *Food Microbiol.* – 2014 Feb. – Vol. 37. – P. 44-50. – DOI: 10.1016/j.fm.2013.06.009.

9. Guérin M, Garcia C, Silva C.R.-D., Couprie J, Remize F. Characterization of Bacterial Exopolysaccharides Produced from Different Fruit-Based Solid Media // *Fermentation.* – 2023. – Vol. 9. – Article 657. – DOI: 10.3390/fermentation9070657.

10. Son Ng, Chengfeng Xue. Enhanced exopolysaccharide production and biological activity of *Lactobacillus rhamnosus* ZY with calcium and hydrogen peroxide // *Process Biochemistry.* – 2017. – Vol. 52. – P. 295-304. – DOI: 10.1016/j.procbio.2016.10.006.

11. You-Jin Yu, Zhiyang Chen, Po Ting Chen, I-Son Ng. Production, characterization and antibacterial activity of exopolysaccharide from a newly isolated *Weissella cibaria* under sucrose effect // *Journal of Bioscience and Bioengineering.* – 2018. – Vol. 126, № 6. – P. 769-777. – DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.05.028.

12. Mohammed Sedki, Amr Hefnawy, Rabeay Y.A. Hassan, Ibrahim M. El-Sherbiny. Core-shell hyperbranched chitosan nanostructure as a novel electrode modifier // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2016. – Vol. 93, Part A. – P. 543-546. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.016.

13. Yadav MK, Song JH, Vasquez R, Lee JS, Kim IH, Kang DK. Methods for Detection, Extraction, Purification, and Characterization of Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria-A Systematic Review // *Foods.* – 2024 Nov 19. – Vol. 13, № 22. – Article 3687. – DOI: 10.3390/foods13223687.

14. Montoille L., Morales Vicencio C., Fontalba D., Ortiz J. A., Moreno-Serna V., Peponi L., Matiacevich S., Zapata P. A. Study of the effect of the addition of plasticizers on the physical properties of biodegradable films based on kefiran for potential application as food packaging // *Food Chemistry.* — 2021. — Vol. 360. — Article 129966. — ISSN 0308-8146. — DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129966.

15. Mohamed Y. M. I., Reehana N., Jayaraj K. A., Ahamed A. A. P., Dhanasekaran D., Thajuddin N., Alharbi N. S., Muralitharan G. Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20 // *International Journal of Biological Macromolecules*. — 2016. — Vol. 93, Part A. — P. 731–745. — ISSN 0141-8130. — DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.007.

16. Haj-Mustafa M., Abdi R., Sheikh-Zeinoddin M., Soleimanian-Zad S. Statistical study on fermentation conditions in the optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* 519 in skimmed milk base media // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. — 2015. — Vol. 4. — P. 521–527. — DOI: 10.1016/j.bcab.2015.08.013.

17. Aslim B., Yuksekdağ Z. N., Beyatlı Y., Mercan N. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. — 2005. — Vol. 21. — P. 673–677. — DOI: 10.1007/s11274-004-3613-2.

18. Imran M. Y. M. et al. Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20 // *International Journal of Biological Macromolecules*. — 2016. — Vol. 93. — P. 731–745. — DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.007.

19. Mıdık F., Tokatlı M., Bağder Elmacı S., Özçelik F. Influence of different culture conditions on exopolysaccharide production by indigenous lactic acid bacteria isolated from pickles // *Archives of Microbiology*. — 2020. — DOI: 10.1007/s00203-019-01799-6.

20. Zhang Y. C., Li S. Y., Zhang C. H., Luo Y. K., Zhang H. P., Yang Z. A. Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* F6 in skim milk // *African Journal of Biotechnology*. — 2011. — Vol. 10. — P. 2080–2091.

21. Polak-Berecka M., Wasko A., Kubik-Komar A. Optimization of culture conditions for exopolysaccharide production by a probiotic strain of *Lactobacillus*

rhamnosus E/N // Polish Journal of Microbiology. — 2014. — Vol. 63. — P. 253–257.

22. Tsuda H., Miyamoto T. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide // Food Science and Technology Research. — 2010. — Vol. 16. — P. 87–92. — DOI: 10.3136/fstr.16.87.

23. Degeest B., Janssens B., De Vuyst L. Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0–1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields // Journal of Applied Microbiology. — 2001. — Vol. 91. — P. 470–477. — DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01404.x.

24. Bengoa A. A., Llamas M. G., Iraporda C., Duenas M. T., Abraham A. G., Garrote G. L. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains // Food Microbiology. — 2018. — Vol. 69. — P. 212–218. — DOI: 10.1016/j.fm.2017.08.012.

25. Pourjafar H., Ansari F., Sadeghi A., Samakkhah S. A., Jafari S. M. Functional and health-promoting properties of probiotics' exopolysaccharides; isolation, characterization, and applications in the food industry // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. — 2023. — Vol. 63, No. 26. — P. 8194–8225. — DOI: 10.1080/10408398.2022.2047883.

26. Paul P., Nair R., Mahajan S., Gupta U., Aalhat M., Maji I., Singh P. K. Traversing the diverse avenues of exopolysaccharides-based nanocarriers in the management of cancer // Carbohydrate Polymers. — 2023. — Vol. 312. — Article 120821. — ISSN 0144-8617. — DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.120821.

27. Mohd Nadzir M., Nurhayati R. W., Idris F. N., Nguyen M. H. Biomedical Applications of Bacterial Exopolysaccharides: A Review // Polymers (Basel). — 2021. — Vol. 13, No. 4. — Article 530. — DOI: 10.3390/polym13040530.

28. Chilingaryan G. V., Vorabutr P. Drilling and Drilling Fluids. Amsterdam: Elsevier, 1983. 352 p.

29. MRS агар середа Блікфельда, 500 г. Conda [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://shop.hlr.ua/ua/mrs-agar-sreda-blikfelda-500g-conda-147292.html>.

30. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу «Ванкоміцин» [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://likicontrol.com.ua> (дата звернення: 21.05.2025).

31. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу «Стрептоміцин» [Електронний ресурс]. – Режим доступу:.

32. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу «Тетрациклін» [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://likicontrol.com.ua>.

33. Гончаренко Т. П. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Моніторинг довкілля» для студентів спеціальності 6.040106 «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування» / Т. П. Гончаренко. — Черкаси: ЧДТУ, 2010. — 100 с. — С. 36–38.

34. Технічна мікробіологія: лабораторний практикум. Частина II / Л. В. Капрельянц, Л. М. Пилипенко, А. В. Єгорова, О. М. Кананихіна, Т. О. Велічко, О. О. Килименчук, Т. В. Шпирко. — Одеса: ОНАХТ, 2020. — 86 с. — С. 11. — (Миколаївський національний університет імені В. О. Сухомлинського).

35. Derdak R., Sakoui S., Pop O. L., Cristian Vodnar D., Addoum B., Elmakssoudi A., Errachidi F., Suharoschi R., Soukri A., El Khalfi B. Screening, optimization and characterization of exopolysaccharides produced by novel strains isolated from Moroccan raw donkey milk // Food Chemistry: X. — 2022. — Vol. 14. — Article 100305. — DOI: 10.1016/j.fochx.2022.100305.

36. Bramhachari P. V., Kishor P. B., Ramadevi R., Kumar R., Rao B. R., Dubey S. K. Isolation and characterization of mucous exopolysaccharide (EPS) produced by *Vibrio furnissii* strain VB0S3 // Journal of Microbiology and Biotechnology. — 2007. — Vol. 17, No. 1. — P. 44–51.

37. Sørensen H. M., Rochfort K. D., Maye S., MacLeod G., Brabazon D., Loscher C., Freeland B. Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Health Benefits towards Functional Food // *Nutrients*. — 2022. — Vol. 14, No. 14. — Article 2938. — DOI: 10.3390/nu14142938.

ЕКЗОПОЛІСАХАРИДИ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

Мікробні екзополісахариди (ЕПС) безпечні, біорозкладні та біосумісні полімери, які викликають інтерес через їх різноманітність у хімічній будові та великим потенціалом використання у багатьох галузях [1, 2]. Екзополісахариди молочнокислих бактерій (МКБ) є високомолекулярними біополімерами, які синтезуються бактеріями поза клітиною. ЕПС вирізняються структурною варіативністю, через що мають різні фізико-хімічні властивості, зокрема розчинність, в'язкість та здатність утворювати гелі. Вони є біосумісними тому вони вважаються безпечними для використання в харчовій та фармацевтичній промисловостях та медицині [1, 2]. Крім того, ЕПС демонструють антиоксидантні властивості, нейтралізуючи вільні радикали, і стимулюють імунну систему [1]. ЕПС використовують у харчовій промисловості як натуральні стабілізатори, згущувачі та емульгатори. У фармацевтиці ЕПС застосовуються для створення біоматеріалів, включаючи капсули для доставки ліків, плазмозамінники та ранозагоювальні покриття. У косметичній індустрії застосовуються в антивікових засобах через свої зволожувальні і антиоксидантні властивості. Екзополісахариди цінують за біологічно активні властивості, вони є ефективними агентами, тому їх використовують для лікування хвороб [1, 3]. ЕПС поділяються на гомополісахариди, гетерополісахариди, капсульні (КЕПС) та розчинні. Гомополісахариди, такі як декстрини й левани, складаються з одного типу моносахаридів, гетерополісахариди мають складну структуру з кількох типів цукрів, КЕПС формують захисну матрицю на поверхні клітин, а розчинні ЕПС легко виділяються в середовище [4]. Хоча традиційні методи отримання екзополісахаридів є ефективними, вони часто супроводжуються високими витратами і складними виробничими процесами. Зараз особливу увагу звертають нові біотехнологічні підходи, які можуть зменшити витрати, зберігаючи високу якість продукту а саме синтез ЕПС за допомогою бактерій роду *Lactobacillus* [4 – 6].

Молочнокислі бактерії синтезують екзополісахариди, зокрема декстрини, (продуценти *L. fermentum*, *L. sakei*, *L. hilgardii*, *L. parabuchneri* та *L. curvatus*), використовують у фармацевтиці як плазмозамінники, у харчовій промисловості як загусники для желе та морозива, а також у хімічній промисловості як емульгатори та матриці. Мутани (продуцент *Streptococcus spp.*) сприяють мікробній адгезії та є нерозчинними у воді. β -D-глюкани, синтезовані *L. suebicus* CUPV221 і *Lactobacillus* spp. G-77 , здатні модифікувати імунну відповідь організму. Левани, продуцентами яких є *L. reuteri* 121, *L. sanfranciscensis* LTH2590 демонструють антиканцерогенні, антихолестеринові та пребіотичні властивості. Фруктан інулінового типу який синтезує *L. reuteri* LB121 також використовуються завдяки своїм пребіотичним властивостям [5].

Екзополісахариди синтезовані молочнокислими бактеріями, вважаються безпечними завдяки тривалій історії використання *Lactobacillus* у інших галузях. ЕПС є основними біологічно активними компонентами лактобактерій, які мають пребіотичні властивості та здатні підтримувати здоров'я рослин. Численні дослідження підтвердили, що EPS LAB демонструють протипухлинні властивості, антиоксидантні, антидіабетичні дії, утворення біоплівки, а також здатність знижувати артеріальний тиск і рівень холестерину. Завдяки цим властивостям ЕПС з *Lactobacillus* досліджуються для використання в харчових, фармацевтичних і медичних промисловостях, вивчення вже створених ЕПС гарантує їх безпечність і величезний потенціал для підтримки здоров'я людини [6].

Література:

1. Nguyen H.T., Pham T.T., Nguyen P.T., Le-Buanec H., Rabetafika H.N., Razafindralambo H.L. Advances in Microbial Exopolysaccharides // Present and Future Applications. Biomolecules, 2024. №14(9). P. 1162. doi: 10.3390/biom14091162.
2. Salimi F., Farrokh P. Recent advances in the biological activities of microbial exopolysaccharides // World J Microbiol Biotechnol, 2023 № 39(8). P. 213. doi: 10.1007/s11274-023-03660-x.
3. Kavitha D., Devi P.B., Delattre C., Reddy G.B., Shetty P.H. Exopolysaccharides produced by *Enterococcus* genus - An overview // Int J Biol Macromol., 2023. № 226. P. 111-120. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.12.042.
4. Pourjafar H., Ansari F., Sadeghi A., Samakhah S.A., Jafari S.M. Functional and health-promoting properties of probiotics' exopolysaccharides; isolation, characterization, and applications in the food industry // Crit Rev Food Sci Nutr., 2023. № 63(26). P. 8194-8225. doi: 10.1080/10408398.2022.2047883.
5. Oleksy M., Klewicka E. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications // Crit Rev Food Sci Nutr., 2018. № 58(3). P. 450-462. doi: 10.1080/10408398.2016.1187112.
6. Xiu L., Sheng S., Hu Z., Liu Y., Li J., Zhang H., Liang Y., Du R., Wang X. Exopolysaccharides from *Lactobacillus kiferi* as adjuvant enhanced the immuno-protective against *Staphylococcus aureus* infection // Int J Biol Macromol., 2020. № 161. P. 10-23. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.005.



МІНІСТЕРСТВО
ОСВІТИ І НАУКИ
УКРАЇНИ



ХНТУ
ХЕРСОНСЬКИЙ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА ХІМІЧНИХ ТЕХНОЛОГІЙ, ЕКСПЕРТИЗИ ТА БЕЗПЕКИ ХАРЧОВОЇ ПРОДУКЦІЇ

СЕРТИФІКАТ

ПІДТВЕРДЖУЄ УЧАСТЬ

Юркевич Анни Ігорівни

В ХІ ВСЕУКРАЇНСЬКІЙ НАУКОВО-ПРАКТИЧНІЙ КОНФЕРЕНЦІЇ МОЛОДИХ УЧЕНИХ
І ЗДОБУВАЧІВ ОСВІТИ "НАУКОВО-ПРАКТИЧНІ РОЗРОБКИ МОЛОДИХ УЧЕНИХ В
ХІМІЧНІЙ, ХАРЧОВІЙ ТА ПАРФУМЕРНО-КОСМЕТИЧНІЙ ГАЛУЗЯХ
ПРОМИСЛОВОСТІ"

М. ХЕРСОН
М. ХМЕЛЬНИЦЬКИЙ
22 ЛИСТОПАДА 2024



ректор ХНТУ, д.т.н., професор
Олена ЧЕПЕЛЮК

