

ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Навчально-науковий інститут агротехнологій, селекції та екології
Кафедра біотехнології та хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття ступеня вищої освіти

Бакалавр на тему:

**«Дослідження біотехнологічного потенціалу молочнокислих
бактерій при синтезі молочної кислоти»**

Виконав: здобувач вищої освіти

за освітньою програмою

Біотехнології та біоінженерія спеціальності

162 Біотехнології та біоінженерія

ступеня вищої освіти бакалавр

Боса Жанна Олександрівна

Керівник: к.х.н., доцент, професор кафедри

біотехнології та хімії Крикунова В.Ю.

Рецензент: Левченко Г.М.

директор ТОВ Копилянський Млин

Полтава – 2024 року

ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Навчально-науковий інститут агротехнологій, селекції та екології
Кафедра біотехнології та хімії

Освітньо-професійна програма Біотехнології та біоінженерія
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Рівень вищої освіти бакалаврський

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри _____
Таміла РОМАШКО _____

«__» «_____» 20__ року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ

Боса Жанна Олександрівна

1. Тема роботи: **«Дослідження біотехнологічного потенціалу молочнокислих бактерій при синтезі молочної кислоти»**,

керівник роботи: к.х.н., доцент, професор кафедри біотехнології та хімії
Крикунова В.Ю

Затверджено засіданням кафедри протокол № 3 від «11» вересня 2023 р.

2. Строк подання здобувачем вищої освіти роботи «10» червня 2024 р.

3. Вихідні дані до роботи

Літературні джерела, організація культивування молочнокислих бактерій та молочної кислоти у лабораторних умовах промислової мікробіологічної лабораторії на ТОВ Копилянського комбікормового заводу, приготування живильних середовищ, вплив стресових факторів: рН середовище, температура, сублетальна концентрація хлориду натрію та пероксиду водню

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Розділ 1. Огляд літератури за темою кваліфікаційної роботи.

1.1. Загальна характеристика пробіотичних мікроорганізмів

- 1.2 Морфолого-культуральні властивості
- 1.3 Регуляції метаболізму у молочнокислих бактерій
- 1.4. Вимоги до умов культивування. Вуглецеві та азотовмісні субстрати, ростові фактори
- 1.5 Оптимізація складу поживних середовищ
- 1.6 Стресовий вплив на мікроорганізми
- 1.7 Основні методи одержання молочної кислоти

Розділ 2. Матеріали і методи дослідження.

- 2.1 Мікробіологічні та морфологічні методи дослідження
 - 2.1.1 Оптимізація складу поживного середовища та вибір оптимального варіанту
- 2.2 Фізико-хімічні методи дослідження
 - 2.2.1 Дія стресорів на життєздатність молочнокислих бактерій. Механізм синтезу молочної кислоти.

Розділ 3. Результати дослідження

- 3.1 Оптимізація складу поживного середовища та вибір оптимального варіанту культивування молочнокислих бактерій
- 3.2 Вивчення стресового впливу на фізіолого-біохімічні характеристики культур молочнокислих бактерій
 - 3.2.1. Визначення сублетальної концентрації пероксиду водню для культури *Lactobacillus lactis*
- 3.3 Механізм культивування молочнокислих бактерій з вуглеводними субстратами у лабораторному ферментері
- 3.1 Перелік графічного матеріалу: схеми, рисунки, таблиці за темою та об'єктом дослідження.
- 5. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи
- 6. Дата видачі завдання «___» _____ 2024__ р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

| Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи | Термін виконання етапів роботи | Примітка |
|--|--------------------------------|----------|
| 1. Вибір і затвердження теми роботи. | 04.09.-11.09.23 | виконано |
| 2. Складання та погодження розгорнутого плану та завдання на кваліфікаційну роботу | 11.09-18.09.23 | виконано |
| 3. Опрацювання літературних джерел | 18.09-20.10.23 | виконано |
| 4. Збір, вивчення і обробка інформації, необхідної для виконання роботи | 23.10-20.11.23 | виконано |
| 5. Виконання теоретичного розділу роботи | 20.11.23-12.01.24 | виконано |
| 6. Виконання аналітичних розділів роботи | 15.01.-29.03.24 | виконано |
| 7. Виконання спеціальних розділів | 01.04.-30.04.24 | виконано |
| 8. Оформлення тексту роботи | 01.05.-31.05.24 | виконано |
| 9. Попередній захист роботи на кафедрі | 10.06.24 | виконано |
| 10. Доопрацювання роботи з урахуванням зауважень і пропозицій | 10.06.-20.06.24 | виконано |
| 11. Нормоконтроль | 20.06.24 | виконано |
| 12. Захист кваліфікаційної роботи | 21.06.24 | виконано |

Здобувач вищої освіти

(підпис)

Жанна БОСА

Керівник роботи

(підпис)

Валентина КРИКУНОВА

АНОТАЦІЯ

Боса Ж. О. «Дослідження біотехнологічного потенціалу молочнокислих бактерій при синтезі молочної кислоти» - Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня бакалавра за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія, Полтавський державний аграрний університет, м. Полтава, 2024 р.

У кваліфікаційній роботі викладені результати досліджень аналізу біотехнологічного потенціалу молочнокислих бактерій р. при дії стресових впливів.

За результатами експериментальних досліджень було з'ясовано, що раціональним способом вдосконалення мікробіологічного синтезу може бути управління стресовими впливами, прикладом яких є контрольований тепловий, кислотний, осмотичний, оксидативний на інокулянт *Lactobacillus lactis* на основі р. *Lactobacillus*. В ході експерименту було встановлено, що для подальшого вдосконалення процесу мікробіологічного синтезу молочної кислоти можуть бути: традиційні підходи, зокрема оптимізація умов культивування молочнокислих бактерій *Lactobacillus lactis*; вибір оптимального варіанту поживних середовищ, розробка методів підвищення стійкості популяції продуцента до стресового впливу та раціонального управління ним.

Кваліфікаційна робота: 61ст., 12 рис., 6 табл., 1 фото, 30 літер. джерел.

Ключові слова: біотехнологічний потенціал, молочнокислі бактерії, культивування, поживні середовища, стресорні впливи: рН середовище, температура, осмотичний тиск, молочна кислота, ферментер.

З М І С Т

| | |
|--|----|
| ВСТУП | 7 |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ | 10 |
| 1.1. Загальна характеристика пробіотичних мікроорганізмів | 10 |
| 1.2 Морфолого-культуральні властивості | 11 |
| 1.3 Регуляції метаболізму у молочнокислих бактерій | 13 |
| 1.4. Вимоги до умов культивування. Вуглецеві та азотовмісні субстрати, ростові фактори | 14 |
| 1.5 Оптимізація складу поживних середовищ | 16 |
| 1.6 Стресовий вплив на мікроорганізми | 18 |
| 1.7 Основні методи одержання молочної кислоти | 23 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ | 26 |
| 2.1 Мікробіологічні та морфологічні методи дослідження | 27 |
| 2.1.1 Оптимізація складу поживного середовища та вибір оптимального варіанту | 27 |
| 2.2 Фізико-хімічні методи дослідження | 32 |
| 2.2.1 Дія стресорів на життєздатність молочнокислих бактерій. Механізм синтезу молочної кислоти | 32 |
| РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ | 37 |
| 3.1 Оптимізація складу поживного середовища для культивування молочнокислих бактерій | 37 |
| 3.2 Вивчення стресового впливу на фізіолого-біохімічні характеристики культур молочнокислих бактерій р. <i>Lactobacillus</i> | 39 |
| 3.2.1.Визначення сублетальної концентрації пероксиду водню для <i>L. lactis</i> | 45 |
| 3.3 Механізм культивування молочнокислих бактерій з вуглеводними субстратами у виробничих умовах | 47 |
| ВИСНОВОК. ПРОПОЗИЦІЇ | 52 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ | 54 |
| ДОДАТКИ | 58 |

ВСТУП

Актуальність теми. Біотехнологія відноситься до галузі, яка постійно та динамічно розвивається і ґрунтується на використанні мікроорганізмів для різних виробництв [1]. Молочнокислі бактерії (МКБ) прийнято називати мікроорганізми, які здатні зброджувати вуглецевмісні субстрати з утворенням молочної кислоти. Їх об'єднують у р. *Lactobacillus*.

Молочна кислота використовується у багатьох галузях промисловості: харчовій, хімічній, фармацевтичній, косметичній, текстильній, при синтезі полімерів, що біодеградуються, у деяких органічних розчинниках і ряду цінних хімічних сполуках. Проте широке використання молочної кислоти та отримання з неї продуктів стримується відносно високою собівартістю.

На сьогоднішній день найбільш традиційним та раціональним способом одержання молочної кислоти вважається мікробіологічний синтез з використанням періодичного культивування молочнокислих бактерій р. *Lactobacillus*, використовуючи комплексні живильні середовища, що містять амінокислоти, вітаміни та інші фактори росту, джерелом яких є різноманітні рослинні, тваринні, дріжджові гідролізати та екстракти [1-5,11].

Крім того, недоліками традиційного способу біосинтезу молочної кислоти є низька продуктивність процесу бродіння, а також утворення у процесі нейтралізації значної кількості відходу у вигляді сульфату кальцію.

За результатами експериментальних досліджень було з'ясовано, що раціональним способом вдосконалення мікробіологічного синтезу може бути управління стресовими впливами, прикладом яких є контрольований тепловий, кислотний, осмотичний, оксидативний та інші стресорні впливи на популяцію продуцентів. Таким чином, в основі подальшого вдосконалення процесу мікробіологічного синтезу молочної кислоти можуть бути: традиційні підходи, зокрема оптимізація умов культивування; розробка методів підвищення стійкості популяції продуцента до стресового впливу та раціонального управління ним.

Отже, вивчення біологічного потенціалу лактобактерій, оптимізація

умов їх культивування; дослідження методів підвищення стійкості продуценту до стресових впливів є беззаперечною підтримкою колекцій молочнокислих бактерій у високоактивному стані для виготовлення і зберігання пробіотичних препаратів та у подальшому вдосконаленню процесу мікробіологічного синтезу молочної кислоти.

Мета дослідження: визначення порогових стресових дій на кероване культивування молочнокислих бактерій р. *Lactobacillus*, що дозволяє забезпечити біосинтетичну стабільність продуценту та інгібуючу дію молочної кислоти.

Завданнями дослідження є:

1. Визначення основних характеристик та показників процесу культивування молочнокислих бактерій *Lactobacillus lactis*.
2. Оптимізація та вибір складу живильного середовища при дослідженні ростових факторів молочнокислих бактерій.
3. Дослідження впливу рН середовища на ріст молочнокислих бактерій р. *Lactobacillus*.
4. Вивчення впливу стресового контрольованого теплового шоку та осмотичного шоку при дії пероксиду водню на ріст *Lactobacillus lactis*.
5. З'ясування механізму культивування молочнокислих бактерій культури *Lactobacillus lactis* з вуглеводними субстратами у лабораторному ферментері та технологічного процесу синтезу молочної кислоти.

Об'єкт дослідження – порогові стресові дії на мікроорганізми при синтезі молочної кислоти

Предмет дослідження – молочнокислі бактерії р. *Lactobacillus lactis* - *Lactobacillus lactis*, живильне середовище, вуглеводні субстрати, молочна кислота, лабораторний ферментер.

Методи дослідження: мікробіологічні, морфологічні та фізико-хімічні

Наукова новизна результатів роботи. В умовах промислової мікробіологічної лабораторії Копилянського комбікормового заводу досліджено оптимальне середовище для культивування молочнокислих

бактерій р. *Lactobacillus lactis* - *Lactobacillus lactis* з значною кількістю життєздатних клітин – $6,2 - 8,2 \times 10^6$ КОУ/см³.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що отримані результати та висновки кваліфікаційної бакалаврської роботи можуть бути виробничим досвідом при практичній підготовці фахівців-біотехнологів.

Особистий внесок здобувача. Здобувач вищої освіти самостійно опанувала методику досліджень, особисто провела огляд та аналіз джерел наукової літератури за темою кваліфікаційної роботи; самостійно був проведений експеримент та лабораторний аналіз, зроблені висновки і пропозиції.

Студентка взяла активну участь у роботі VIII Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції, де були опубліковані матеріали тезів: 1. Виробництво однорідних кормосумішей – запорука здорових харчових продуктів для людей Крикунова В.Ю., Боса Ж.О «ХІМІЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ, ЕКОЛОГІЯ ТА ОСВІТА»: Збірник матеріалів VIII Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (м. Полтава, 15-16 травня 2024 року). – Полтава, 2024. С. 100

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика пробіотичних мікроорганізмів

Термін «пробіотик» вперше використали для визначення метаболітів, що продукують певні мікроорганізми для стимуляції ростових процесів інших [1,4]. Переважна більшість пробіотиків-бактерій відноситься до двох родів: лактобактерії (лат. *Lactobacillus*) і біфідобактерії (лат. *Bifidobacterium*), до кожної з яких включені безліч видів та штамів, а також багато інших видів бактерій-пробіотиків (непатогенні різновиди *Escherichia coli*, непатогенні різновиди *Bacillus* (*Bacillus subtilis*), непатогенні різновиди *Enterococcus* (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus salivarius*), молочнокислий стрептокок *Streptococcus thermophilus*, дріжджеві гриби *Saccharomyces boulardii*). За визначником Берджі мікроорганізм-продуцент має наступне систематичне положення: домен: Bacteria; царство: Prokaryotes тип XIII: Firmicutes клас I: Bacilli порядок II: Lactobacillales родина I: Lactobacillaceae рід I: Lactobacillus вид: Lactobacillus delbrueckii [2,3,12,20].

Молочнокислими бактеріями (МКБ) прийнято називати мікроорганізми, які здатні зброджувати вуглецевмісні субстрати з утворенням молочної кислоти. Їх об'єднують у цьому р. *Lactobacillus*). Всі бактерії, що відносяться до цієї родини, є грампозитивними.

Крім того, майже всі молочнокислі бактерії не є абсолютними анаеробами, а характеризуються аеротолерантністю. Відповідно, [8] родина *Lactobacillaceae* включає наступних представників: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* та *Weisella*. З усіх цих родів мікроорганізмів *Lactobacillus* є найбільш значущим, включає близько 80 видів, які виробляють молочну кислоту [7]. Найбільш відомі види лактобацил: *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus maltoromicus* та *Lactobacillus salivarius*. Такі

види як *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus jenseni*, і *Lactobacillus acidophilus* виробляють одночасно D-молочну кислоту та суміш двох стереоізомерів [10]. Комерційну цінність представляють ті штами, які витримують високі концентрації молочної кислоти при збереженні продуктивності та можливо проводити з ними різні генно-інженерні модифікації для селективного отримання D-або L-молочної кислоти [2].

Однак деякі МКБ, наприклад, представники родини *Lactobacillus plantarum* і *Lactobacillus casei* містять гени, що кодують синтез ферментів аеробного дихання, і здатні переходити до аеробного дихання при додаванні компонентів, що містять гем, в живильне середовище [9, 10, 11]. За відсутності каталаз захист від активних форм кисню, що утворюються в аеробних умовах, забезпечують пероксидази, NADH:H₂O₂ оксидаза [12].

Більша частина є мезофілами (рН 5,5 – 6,5, температура 30–40°C). Недоліками проведення промислових ферментаційних процесів з використанням МКБ є: а) вимогливість до наявності в поживному середовищі факторів росту; б) нездатність проростати на простих синтетичних середовищах; в) максимальна активність досягається лише у дуже вузькому діапазоні значень рН (від 5,5 до 6,5); г) в ході ферментації необхідно нейтралізувати молочну кислоту, що утворюється, так як вона інгібує ріст та біосинтетичну активність МКБ. Зазвичай для цього використовуються CaCO₃, Ca(OH)₂, NH₄OH, NaOH, і це призводить до одержання відповідної солі молочної кислоти. Всі перераховані вище обставини підвищують витрати на ферментацію і виділення МК.

1.2 Морфолого-культуральні властивості

В середині роду *Lactobacillus* зустрічаються бактерії з різною морфологією. Більшість представників мають форму прямих паличок із закругленими кінцями, зібраних в ланцюжки різної довжини, або розташовані поодинокі чи попарно. Серед лактобацил зустрічаються короткі коковидні і покручені форми, а також довгі, ниткоподібні палички довжиною

від 0,7-1,1мкм до 3,0-8,0 мкм, розташовані поодинокі або зібрані в ланцюжки.

Лактобацили не утворюють ендоспори. За Грамом забарвлюються позитивно стають грамнегативними з віком та при підвищенні кислотності. Більшість лактобацил нерухомі. Рухливість спостерігається лише у представників деяких видів (а саме: *L. agilis*, *L. aquaticus*, *L. capillatus*, *L. ghanensis*, *L. mali*, *L. nagelii*, *L. oeni*, *L. ruminis*, *L. satsumensis*, *L. sucicola*, *L. ivarum*, *L. Vini* [5], при цьому вони пересуваються за допомогою перитрихіальних джгутиків. Багато лактобацил утворюють екзополісахариди (ЕПС), які бувають двох видів: позаклітинні гомополісахариди позаклітинні гетерополісахариди.

На щільних поживних середовищах лактобацили утворюють сферичні, гладкі, іноді блискучі, опуклі, з чіткими контурами колонії. Зазвичай колонії дрібні, але у деяких видів їх розмір може перевищувати 4 мм в діаметрі. Колонії як правило, білі або злегка кремового кольору. На середовищах з білками або ліпідами зони просвітління навколо колоній зазвичай не утворюються. Проте, більшість лактобацил мають слабку протеолітичну активність (за рахунок секретуючих і пов'язаних з клітинною стінкою протеаз і пептидаз) і слабкою ліполітичною активністю (завдяки внутрішньоклітинним ліпазам). Амілолітична активність на щільних середовищах з крохмалем виявляється тільки у деяких видів: *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. fermentum*. Окремі види лактобацил (*L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. casei*) здатні утворювати позаклітинні нуклеази при вирощуванні на агарі, що містить ДНК або РНК [4, 13,17,24].

Хороший ріст спостерігається в напіврідкому поживному середовищі, що містить 0,15-0,75% агару. Невеликі концентрації агару забезпечують низький окислювально-відновний потенціал середовища і створюють сприятливі мікроаерофільні умови. За характером росту в напіврідкому середовищі виділяють п'ять варіантів: ріст кульками; з поздовжньою смугастістю; придонний; поверхневий; рівномірне помутніння середовища.

При розвитку на рідких поживних середовищах лактобацили найчастіше викликають рівномірне помутніння, після припинення росту осідаючи у вигляді рівного гомогенного, рідше пластівчасті осаду, ніколи не утворюючи плівок на поверхні середовища.

1. 3 Регуляції метаболізму у молочнокислих бактерій

Молочнокислі бактерії поділяються на дві великі групи: гомоферментативні та гетероферментативні. Гомоферментативні молочнокислі бактерії утворюють практично одну молочну кислоту, що становить щонайменше 90% всіх продуктів бродіння. Від стереоспецифічності лактатдегідрогенази та від наявності лактатрацемази залежить, який продукт утворюватиметься - D(-), L(+) - форми або рацемат. Гомоферментативні молочнокислі бактерії становлять найбільший інтерес виробництва молочної кислоти у промислових масштабах[2,16].

Гетероферментативні молочнокислі бактерії, на відміну від гомоферментативних, що зброджують цукру по гліколітичному шляху, здійснюють зброджування цукрів по пентозофосфатному шляху, в ході якого шестивуглецеві цукри (гексози) переходять у п'ятивуглецеві (пентози) за допомогою фосфози. Кінцевими продуктами цього процесу є гліцеральдегід 3-фосфат та ацетилфосфат. У ході подальших перетворень гліцеральдегід 3-фосфат перетворюється на лактат, а ацетилфосфат – на етанол та оцтову кислоту. Більшість гетероферментативних молочнокислих бактерій перетворюють пентози на молочну кислоту та супутні продукти через фосфокетотлазний шлях із максимальним виходом 0,6 г молочної кислоти на 1 г пентоз.

Слід зазначити, що підрозділ МКБ на гомоферментативні та гетероферментативні не має абсолютного характеру. Багато гомоферментативних МКБ здатні перемикатися на гетероферментативний спосіб зброджування субстрату за певних умов: зброджування різних цукрів,

відмінних від глюкози, пентоз, за стресових умов (високі рН, неоптимальні температури).

1.4. Вимоги до умов культивування. Вуглецеві та азотовмісні субстрати, ростові фактори

Більшість видів молочнокислих бактерій р. *Lactobacillus* вимагають складних поживних середовищ для їх культивування, що включають такі речовини, як амінокислоти, пептиди, нуклеотиди, вітаміни, що значно збільшує витрати виробництва. Зазвичай культивування молочнокислих бактерій р. *Lactobacillus* як джерело вуглецю використовують вуглеводи, що містять редуруючі речовини, тому що, як правило, молочнокислі бактерії не мають амілолітичної активності і не здатні споживати полісахариди. Однак є окремі штами, які здатні утилізувати дисахариди і навіть деякі олігосахариди. При використанні глюкози як джерело вуглецю ступінь конверсії субстрату досить великий і становить зазвичай 95-98%, проте можливість заміни глюкози на економічно ефективніші джерела вуглецю викликає дедалі більший інтерес. Існують дослідження, що показують можливість заміни глюкози при культивуванні молочнокислих бактерій на різні гідролізати та екстракти, як рослинного, так і тваринного походження [8,23,24].

Приблизно 17% сухої ваги клітини за оцінками елементного складу становить азот, включений до складу білкових молекул, нуклеїнових кислот та інших сполук. При культивуванні для зростання мікроорганізмів використовують різні джерела азоту та факторів росту, які можуть бути як органічного, так і неорганічного походження.

Серед джерел азоту неорганічного походження вплив солей амонію на бактеріальні та грибні культури є найбільш вивченим питанням. Однак використання солей амонію при культивуванні молочнокислих бактерій не забезпечує необхідної динаміки зростання. Для досягнення необхідного ефекту потрібно використовувати складні органічні джерела азоту, такі як дріжджові гідролізати, м'ясний бульйон та гідролізати борошна.

Бактерії роду *Lactobacillus* досягають кращих показників при культивуванні з використанням середовищ, де джерелом азоту містяться дріжджовий екстракт і пептон. Але промислове одержання молочної кислоти на основі такого живильного середовища економічно не вигідне, тому пошук альтернативних джерел азоту є актуальною проблемою досі.

Також показано, що додавання в середу вітамінів групи В призводить до збільшення кількості життєздатних клітин на 20 - 24 год культивування від $6,5 \times 10^6$ до $1,9 \times 10^9$ КУО/мл, сприяє гідролізу клітинами соєвих олігосахаридів і більшій асиміляції цукрів, що редукують молочно *L. acidophilus* ATCC 314 та *L. gasseri* FTDC 8131.

Крім вітамінів, значний вплив на кінетику росту молочних бактерій надають іони Mn^{2+} . Однак разом з тим підвищена концентрація іонів Mn^{2+} негативно впливає на процес оцукрювання. Ряд статей, присвячених метаболізму бактерій роду *Lactobacillus*, підтверджує тенденцію до збільшення концентрацій молочної кислоти при підвищенні концентрацій солей марганцю.

Заміна дріжджового екстракту на альтернативні джерела азоту та факторів росту є складним завданням, оскільки він є практично універсальним джерелом факторів росту для молочнокислих бактерій та містить вітаміни (рибофлавін, тіамін, пантотенова, нікотинова та фолієва кислота, біотин) та мікроелементи.

В окремих випадках дріжджовий екстракт замінюють менш дорогими джерелами азоту. Як альтернативу дріжджовому екстракту можна використовувати різні гідролізати. Вони застосовуються або у складі комплексних середовищ, або додаються до синтетичних. Крім того, порівняно з дріжджовим екстрактом, використання гідролізатів більш економічно вигідно, так як вони найчастіше є відходом великотонажних виробництв. При використанні гідролізатів як один з основних компонентів живильного середовища можна значно знизити вартість кінцевого продукту - молочної кислоти. Другим позитивним моментом є покращення екологічної

ситуації. Сировина, що використовується для отримання гідролізатів, що застосовуються при культивуванні мікроорганізмів, може бути рослинного, тваринного та мікробного походження.

З рослинних часто використовують гідролізати бурякової та соєвої меляси, гороху, кукурудзи, рослинної маси деревних та зернових порід. При цьому такі високомолекулярні сполуки як целюлоза, крохмаль, лігнін розпадаються з утворенням оліго-, ді- та моноцукорів, представлених як пентозами, так і гексозами. Тваринні і мікробні гідролізати можуть бути джерелами низькомолекулярного органічного азоту при культивуванні, оскільки білки, що містяться в них, гідролізуються по пептидних зв'язках з утворенням суміші, що складається з пептидів та окремих амінокислот [9,18,27,29,].

Використання гідролізатів ускладнює процес накопичення біомаси, оскільки гідролізати є сумішшю пентоз і гексоз, тому мікроорганізми повинні адаптуватися до зміни джерела вуглецю. Це основна проблема культивування з використанням гідролізатів. Однак ряд досліджень підтверджує можливість отримання позитивних результатів при культивуванні з використанням гідролізатів.

1.5 Оптимізація складу поживних середовищ

Методи оптимізації, як і раніше, залишаються актуальними для вдосконалення процесів культивування молочнокислих бактерій. З цією метою використовуються методи статистичного планування експерименту, методи математичного моделювання з описом динаміки процесу, пошуком кінетичних констант, визначення впливу різних факторів.

Стандартні методи, що застосовуються для планування як активних, так і пасивних експериментів, включають повний факторний експеримент. Найчастіше проводять або оптимізацію складу поживних середовищ, або умов культивування, зокрема з метою підвищення виходу молочної кислоти. Так у статті в умовах змішаної ферментації та контрольованого рН був

досягнутий вищий вихід 96,3% порівняно з бродінням *Lactobacillus rhamnosus* на немодифікованому поживному середовищі (68,8%). Титр молочної кислоти, вихід і продуктивність досягали 121 г/л, 94,6% та 2,18 г/(л×год) відповідно.

Досліджено процеси одержання молочної кислоти за допомогою термофільних *Lactobacillus plantarum* з використанням п'яти альтернативних джерел азоту – екстракту солодових паростків, рідкого кукурудзяного екстракту, NH_4Cl , NH_4NO_3 , діамінцитрату. За допомогою статистичного аналізу результатів шляхом побудови поверхонь відгуку було виявлено, що екстракт солодових паростків і рідкий кукурудзяний екстракт істотно впливають на продукування молочної кислоти, і їх оптимальні концентрації в середовищі повинні становити 16,0 г/л і 12,0 г/л відповідно. Культивування з використанням оптимізованого середовища показало, що максимальна питома швидкість росту (μ_m) становила 1,09 год⁻¹, вихід біомаси ($Y_{X/S}$) та вихід L(+)-молочної кислоти ($Y_{P/S}$) – 0,233 OD 620/ г і 0,98 г/г відповідно, а максимальна продуктивність та середня продуктивність - 13,0 г/(л*год) та 3,20 г/(л*ч) відповідно. Результати показали, що отримання молочної кислоти можливе під час використання недорогих альтернативних джерел азоту. [9,18,27,29].

Виходячи з вищевикладеного можна зробити висновок, що використання у складі живильного середовища гідролізатів тваринної та рослинної сировини, що є відходами різних виробництв, замість традиційних глюкози та дріжджового екстракту має сприяти зниженню вартості живильного середовища та собівартості одержуваної молочної кислоти. Тому підбір альтернативних джерел вуглецю, азоту та факторів росту, а також оптимізація складу живильного середовища для культивування молочнокислих бактерій є актуальними практичними завданнями при отриманні молочної кислоти.

1.6 Стресовий вплив на мікроорганізми

Інший раціональний підхід до вдосконалення біосинтезу молочної кислоти може бути заснований на розумінні змін у біосинтезі при різних стресових впливах на продуцент, які неминуче супроводжують ферментаційний процес у різні фази культивування та при відхиленні тих чи інших параметрів, та цілеспрямоване керування цими стресовими впливами та параметрами.

Як уже було зазначено вище, варіантом такого підходу може бути раціональне поєднання стресорних та антистресорних факторів, при якому можуть бути покращені цільові показники біосинтезу, що було показано раніше для продуцентів білка, етанолу, біологічної очистки стічних вод. Його прикладом є контрольований оксидативний стрес, що використовує вибіркоче посилення або пригнічення дії сублетальних доз активних форм кисню (АФК), зокрема H_2O_2 , на мікробні культури при одночасному дії антистресорних факторів, як може виступати видиме світло низької інтенсивності.

Культивування молочнокислих бактерій не завжди протікає в оптимальних умовах. Причинами цього можуть бути незбалансованість живильного середовища, зміна фізико-хімічних параметрів оточення, накопичення продуктів біосинтезу, які інгібують фізіологічну активність мікробних клітин, популяційні зміни. Клітини мікроорганізмів, що зазнали несприятливих впливів, перебувають у стані стресу. Ці дії визначають як стресорні.

Стресорні фактори – це фактори абіогенного та біогенного походження, здатні впливати на мікробіологічні структури та процеси. У літературі стосовно стресорним чинникам, які впливають на живі об'єкти, використовують термін «стресори». В принципі будь-яке відхилення від оптимальних умов можна охарактеризувати як стрес. Стосовно культивування мікроорганізмів стрес можна визначити, як фізіологічні зміни, зумовлені модифікацією оточення (фізичні, хімічні, умови харчування), які

можуть мати безліч наслідків для мікроорганізмів, таких як затримка росту та загибель клітин.

Важливі аспекти вивчення стресу у молочнокислих бактерій – технологічні, особливо коли важливо отримати життєздатні клітини МКБ як пробіотики або стартерні культури. У процесі виділення вони піддаються дії голодування, механічного (при сепарації, центрифугуванні), термічного та осмотичного (при сушінні), холодого та оксидативного (при зберіганні) стресів. Тому робляться численні спроби підвищити стійкість МКБ до різного виду стресів.

До стресових відносять такі умови: голодування при нестачі або відсутності необхідного субстрату, температурний, осмотичний та рН-шок, УФ-випромінювання, зміна умов освітлення (для світлочутливих культур), механічні пошкодження, дія різних окисних агентів (оксидативний стрес).

Тепловий шок виникає при дії на живі клітини сублетальних температур, при яких фізіологічна активність клітини знижується, що проте не супроводжується автолізом, тобто культура при цьому залишається життєздатною. Денатурація білків є головною небезпекою для мікроорганізмів.

Зниження температури нижче за рівень фізіологічної активності викликає холодний шок, при цьому вторинна структура нуклеїнових кислот стабілізується, що призводить до інгібування процесів реплікації, транскрипції та трансляції. З іншого боку, відбувається зниження активності багатьох ферментів, і навіть загального метаболізму. Змінюється і плинність мембран, що ускладнює транспорт речовин у клітину [9,11,24,27].

При дії на мікроорганізми агентів оксидативного стресу можуть відбуватися розриви в молекулах нуклеїнових кислот, зміна просторової конфігурації білкових молекул через розриви/зшивання, що може призводити до блокування реакційних центрів ферментів. Завдяки наявності у клітині антиоксидантних систем швидкість реакції утворення агресивних частинок не перевищує межі фізіологічної норми. Однак при посиленні окисних

процесів та при недостатній роботі антиоксидантного механізму захисту розвивається оксидативний стрес, причому розмноження мікроорганізмів спочатку сповільнюється, а потім і зовсім припиняється. Відбувається перебудова метаболізму синтез білків, необхідні виживання. Крім іншого, активні форми кисню також опосередковано беруть участь у клітинній відповіді на температурний, механічний, осмотичний та рН-шок, а також задіяні і при голодуванні[30].

Довгий час вважалося, що стрес несприятливо впливає на мікроорганізми, знижуючи їхню біохімічну активність і, як наслідок, ефективність біосинтетичних процесів. Однак, як уже було зазначено вище, стресовий вплив може призводити і до позитивних змін, поліпшення окремих показників біосинтезу. Також було показано, що мікроорганізми, які є стійкими до дії одних стресових факторів, іноді легко переносять вплив інших (перехресна адаптація), не знижуючи фізіологічної активності. Така позитивна і перехресна дія обумовлюють доречність поняття контрольованого стресу як сукупності дії стресорних та антистресорних факторів.

Таким чином, ефективним засобом удосконалення процесів культивування та інтенсифікації біосинтезу цільового продукту може бути контроль кількості та якості стрес-факторів, вибіркоче посилення або придушення їх дії на мікроорганізми.

Загалом метаболічні відповіді на стрес полягають у використанні інших джерел вуглецю, активації протеолітичної системи та/або катаболізму вільних амінокислот клітинами. Метаболічна адаптація має вирішальне значення для виживання клітин, оскільки вона стимулює вироблення додаткової енергії та знижує негативний вплив стресорів. У цих умовах здатність МКБ ефективно транспортувати та метаболізувати вуглеводи та інші джерела вуглецю, такі як малат та цитрат, має вирішальне значення для зростання мікроорганізмів та їх продуктивності[29,30]

Ступінь метаболічних змін та адаптації, а також основні способи перепрограмування метаболічних шляхів, що відповідають за катаболізм субстрату або адаптацію до стресорів, залежить від видів МКЛ та умов адаптації.

Наприклад, кислотний стрес викликає внутрішньоклітинне закислення, яке знижує активність цитоплазматичних ферментів. В умовах кислотного стресу у *L. casei* та *S. mutans* помітно знижується синтез системи фосфоенолпіруват-фосфотрансферази (PEP-PTS) для глюкози, яка є основною системою транспорту вуглеводів. Проведені транскриптомні та протеомні дослідження показали, що деякі МКБ, наприклад, *L. sakei* та *L. helveticus*, підвищують рівень гліколітичних ферментів під дією кислотного, теплового та осмотичного стресу, але при цьому не відбувається збільшення синтезу молочної кислоти [15,16,23].

Однією з найбільш вивчених антистресорних систем є система відповіді на тепловий шок. Для живих організмів характерний синтез білків теплового шоку (БТШ чи HSP) зі збільшенням температури. Даний тип стресорних білків має консервативний характер, на що вказує, наприклад, 90% гомологія окремих ділянок білків теплового шоку бактерій і людини. Основною функцією білків теплового шоку є правильне укладання синтезованих поліпептидних ланцюгів і перебудова їх у тому випадку, якщо вони були неправильно укладені та пошкоджені.

Стрес, який викликається високою температурою, також порушує трансмембранний протонний градієнт, що призводить до зниження внутрішньоклітинного рН. Пробіотичні культури та інокуляти зазвичай зберігаються у формі ліофільно висушених препаратів (з додаванням кріопротекторів для підтримки життєдіяльності), тобто можуть стикатися не лише з тепловим шоком, а й з холодним, хоч і не так поширений.

У технологічних процесах тепловий стрес у МКБ зазвичай вивчають шляхом аналізу його впливу на ріст, термостійкість і синтез цільових

продуктів біосинтезу у зв'язку з завданнями підвищення або зниження резистентності лактобацил до теплового стресу[15,28].

Виникнення толерантності до теплового шоку після помірної теплової дії виявлялося у таких штамів: *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus casei* LC301, *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticum*. Дослідження з термостійкості *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* вказують, що існують варіанти з більш високою термостійкістю. При холодному шоці зростання бактерій спочатку припиняється, поновлюючись через якийсь час, але з меншою швидкістю. При різкому зниженні температури зменшується плинність мембрани, уповільнюється фолдинг білків, утруднюється функціонування рибосом, як і трансляція і транскрипція з допомогою зміни вторинної структури ДНК і РНК. За низьких температур синтезуються низькомолекулярні білки холодного шоку (CSPs). Вони здатні зв'язуватися з нуклеїновими кислотами та відновлювати їх вторинну структуру.

МКБ можуть зазнавати осмотичного стресу, наприклад, при виробництві кисломолочної продукції та сирів – концентрація солі в деяких сирах досягає 2,8%, в інших продуктах вона може бути ще більшою (*Tetragenococcus halophila*, яка використовується при виробництві японських соусів, може стикатися з концентрацією солі до 18%). Також пробіотичні культури бактерій відчувають осмотичний стрес при проходженні травним трактом людини.

Різде підвищення осмотичного тиску веде до переміщення води з клітин назовні, результатом чого є зменшення тургору в клітинах, зміна їх обсягу та внутрішньоклітинної концентрації іонів. У гіпотонічних розчинах клітина набухає та розривається, у гіпертонічних відбувається дегідратація клітини відбувається плазмоліз – відділення протопласту від клітинної стінки бактерій. Всі ці явища можуть серйозно вплинути на життєздатність клітини, оскільки вважається, що саме підтримання постійного тургору є рушійною силою для розвитку та зростання клітини.

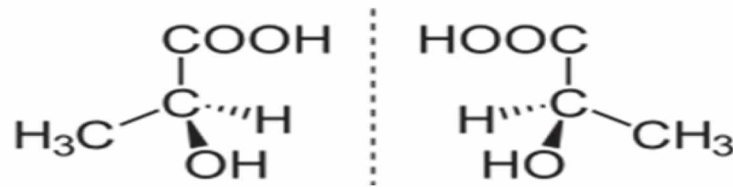
Важливу роль у регуляції осмотичних явищ грає клітинна оболонка, яка здатна підтримувати форму клітини та витримувати осмотичний тиск, що досягає 2 МПа у грампозитивних бактеріях. У відповідь на осмотичний стрес молочнокислі бактерії починають накопичувати осмопротектори – переважно це бетаїн, холін, карнітин. Накопичення цих речовин підвищує межу толерантності бактерій. Оскільки молочнокислі бактерії не здатні синтезувати багато речовин, вони використовують вищезгадані сполуки з ферментаційного середовища.

У *L. plantarum* підвищення осмотостійкості досягається за наявності в середовищі L-карнітину, бетаїну та проліну. Бетаїн має найбільшу ефективність. Однак *O. oeni* є винятком - на наявність у середовищі подібних осмолітів клітина ніяк не реагує.

Деякі амінокислоти (пролін, глутамінова кислота, іноді аланін) теж відіграють важливу роль у разі осмотичного стресу. Молочнокислі бактерії можуть накопичувати деякі амінокислоти (пролін, глутамінову кислоту, іноді аланін), що зменшують вплив на них осмотичного стресу, що виникає. Цей ефект спостерігався при додаванні в середовище проліну для росту *L. Lactis*. При додаванні в середовище ді- та трипептидів спостерігається схожий ефект. Дипептиди, що містять пролін (Pro-Leu і Leu-Pro), мають високу ефективність, навіть вище, ніж вільні амінокислоти. Вони допомагають відновити надспіралізацію ДНК, яка змінюється при знаходженні клітини у гіперосмотичному середовищі. При осмотичному стресі відбувається синтез стресорних білків, загальних для різних стресорних впливів – при критичних значеннях температури, рН і т. д. До них відносяться шаперони та протеази: шаперони DnaK, GroEL та GroES та ін.

1.7 Основні методи одержання молочної кислоти

Молочна (2-гідрокси-пропанова) кислота (МК) є - гідроксильованою карбоновою кислотою. Існує у двох діастереоізомеричних формах: L(+) та D(-) молочна кислота.



Енантіомери молочної кислоти

Синтетичний спосіб одержання МК являє собою органічний синтез на основі різних попередників (ацетальдегід, оцтова кислота, ацетонітрил та ін), проте, через утворення рацемічних сумішей ізомерів, синтетичний шлях не знайшов широкого застосування в промисловості. В даний час МК одержують за допомогою мікробіологічного синтезу. Ефективність процесу біосинтезу МК головним чином залежить від мікроорганізму-продуцента МК, вартості субстрату та режимів культивування. Мікроорганізми можуть синтезувати одночасно як обидва стереоізомери, так і кожен з них окремо. Синтез залежить від наявності відповідних лактатдегідрогеназ.

Традиційно отримання МК використовується періодичний спосіб культивування, що є найпростішим і легко організованим процесом, оскільки джерело вуглецю та інші компоненти живильного середовища не додаються в ході процесу, а завантажуються в ферментер перед його безпосереднім початком. Виняток становить лише нейтралізуючий агент, використовуваний підтримки постійного значення рН. Такий спосіб має певні переваги, такі як низька можливість контамінації та досить високі концентрації кінцевого продукту (МК) у порівнянні з іншими методами культивування [1].

З іншого боку, періодичне культивування характеризується низькими концентраціями біомаси, а також низькою продуктивністю через можливе інгібування процесу субстратом та/або кінцевим продуктом. Для вирішення цих проблем зазвичай використовують інші способи культивування, такі як: культивування з підживленням, культивування з рециклом з біомаси та безперервне культивування. Тим не менш, кожен з цих методів має деякі обмеження, і на подальший їхній розвиток для досягнення ефективного виробництва МК спрямовуються великі зусилля. Способи культивування з використанням високих щільностей клітин (HCDs) за допомогою

імобілізації клітин або організації процесу з рециклом біомаси дозволяють досягти високої продуктивності по молочній кислоті. Крім того, останні досягнення у галузі інтегрованих мембранних систем створюють основу для подальшого вдосконалення біотехнологічного виробництва МК [2].

ВИСНОВОК до розділу I. Щодо використання спрямованих стресових впливів необхідно враховувати такі моменти:

1. На популяційному рівні тривалий вплив стресорів у сублетальних дозах викликає адаптивні та мікроеволюційні зміни. У молочнокислих бактерій преадаптація до сублетальних доз стресорів підвищує стійкість клітин бактерій до стресів.

2. Є тісний біохімічний та генетичний зв'язок між різними системами відповіді на стрес, а також між системами репарації при внутрішньоклітинних ушкодженнях у стресових ситуаціях.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Кваліфікаційну бакалаврську роботу виконано на базі виробничої мікробіологічної лабораторії Копилянського комбікормового заводу, Полтавського району та в Полтавському державному аграрному університеті на кафедрі біотехнології та хімії. Для культивування молочнокислих бактерій (МКБ) використали продуцент - аптечний пробіотик «PROBIOTIC», (30 капсул по 230мг, (містить до 10 млрд КУО).

Об'єктом дослідження відібраний штам молочнокислих бактерій *Lactococcus lactis*

Предмет дослідження: процес культивування молочнокислих бактерій, порогові стресові дії на МКБ, технологічний процес синтезу молочної кислоти

Методи дослідження: мікробіологічні, морфологічні та фізико-хімічні методи

Експериментальні дослідження за темою бакалаврської роботи було проведено у кілька етапів. На першому етапі вивчали пробіотичні властивості молочнокислої бактерії *Lactococcus lactis*. Наступними етапами було приготування для культивування лактобактерій живильного середовища та удосконалення його на базі стандартного MRS, дослідження впливу стресорних факторів на життєздатність культури *Lactococcus lactis*, а саме: здатність виживати в умовах зміни рН середовища, за різних температурних режимів, осмотичного тиску; встановлення сублетальної концентрації стресора пероксиду водню на ріст культури. Експерименти здійснювали в трьох повторах. Результати дослідження опрацьовували статистично з використанням програми "Microsoft Office Excel 2003".

Найпоширенішим способом збереження молочнокислих бактерій є їхні періодичні пересівання на свіжі поживні середовища. Однак використання такого методу часто спричиняє значні зміни культурально-морфологічних

властивостей культур. Залежно від біологічних особливостей штамів, їхньої життєстійкості пересівання здійснюють один раз на 2-4 місяці [3, 4]. Такий спосіб трудомісткий, крім того, після чотирьох-п'яти пасажів штами знижують свою біологічну активність [5, 6].

2.1 Мікробіологічні та морфологічні методи дослідження.

2.1.1 Оптимізація складу поживного середовища та вибір оптимального варіанту.

Для культивування молочнокислої бактерії *Lactobacillus lactis* контролем служило стандартне живильне середовище Man-Rogosa-Sharpe (MRS) у наступному складі (грам/літр): гідролізат казеїну - 10, пептон - 10, глюкоза - 20, дріжджовий екстракт - 5, K_2HPO_4 - 2, CH_3COO - 5, цитрат триамонію - 2, $MgSO_4$ - 0,2, $MnSO_4$ - 0,05. Були підготовлені всі зазначені наважки компонентів, що входять до середовища, довели до потрібного об'єму (дистилятом) з відповідним рН середовищем (рН = 7,0) до 1 л. Розливали тепле живильне середовище у біологічні пробірки до 1/2-2/3 об'єму, закривають фольгою або ватними пробками, потім стерилізували його автоклавуванням протягом 20-25 хв. при тиску 1 атм [Додаток В].

Підбір та оптимізацію середовищ проводили за наступними критеріями: вибір оптимального значення рН середовища, температурного режиму, кількістю мікробних клітин після інкубації. Кількість живих мікробних клітин визначали методом серійних розведень одержаної суспензії у дистильованій воді з наступним висівом культур бактерій по 0,1 см³ із розведень 10^6 на середовища з наступним підрахунком кількості колонієутворюючих одиниць[11].

Культивування *Lactobacillus lactis* проводили наступним чином: стерильне стандартне живильне середовище розливали у чашки Петрі по 5 мм за висотою рідкого шару, постійно дотримуючись правил асептики. [12,14,20]. На поверхню середовища, що затверділо проводили посів культури з допомогою шпателя Дригальського (С.Г.Лебідь Основи загальної мікробіології,

навчальний посібник. 2013р.)

Мікроскопічні препарати готували за загально визнаною методикою та фарбували метиленовим синім відповідно до ДСТУ 7357:2013 Методи культивування.

З метою прискорення росту накопичення бактеріальної маси, а також більш тривалого терміну збереження культур, ми здійснили роботу з розробки поживного середовища для культивування лактобактерій.

Для проведення експериментів було виготовлено 6 варіантів дослідних поживних середовищ для культивування лактобактерій. Були підібрані компоненти до основного складу середовища: лактоза, натрій фосфорнокислий двоамінений, натрій лимоннокислий при наступному співвідношенні компонентів, мас. %: натрій фосфорнокислий двоамінений – 0,2-0,4, натрій лимоннокислий 0,5-0,8.

Для культивування у ферментері використовували модифіковане живильне середовище MRS у наступному складу (г/л): глюкоза – 100–110, дріжджовий екстракт – 5–10, K_2HPO_4 – 2, $MgSO_4$ – 0,1, $MnSO_4$ – 0,05; містить додатково різні джерела азоту та ростових факторів кількості 5-15 г/л [3,6, 11, ДодатокВ].

Приготування: розчинили 64 г середовища в 1 л дистильованої води. Добре перемішали та нагріли до розчинення. Прокип'ятили одну хвилину до розчинення. Стерилізували автоклавування при 121°C протягом 12 хвилин. Дали охолонути до 45-50 ° C, перемішали і розлили по чашках. Приготовлене середовище зберігалось при 8-15°C. Колір янтарний, злегка ополесцентний.

2.1.2 Методи обліку мікроорганізмів .

Підрахунок вирослих колоній. Колонії мікроорганізмів в залежності від швидкості росту підраховують через 2 - 15 діб інкубації. Підрахунок, як правило, проводять, не відкриваючи чашок Петрі. Для зручності кожен прораховану колонію позначають точкою на зовнішній стороні дна чашки. При великій кількості колоній дно чашки Петрі ділять на сектори, прораховують колонії в кожному секторі і підсумовують результати.

Кількісний облік мікроорганізмів.

Чисельність життєздатних молочнокислих бактерій визначали методом підрахунку колоній, що проросли на поживному середовищі MRS після відповідного часу інкубування (ДСТУ 7999:2015). Використовували такі методи кількісного обліку мікроорганізмів: метод Коха (найуживаніший у лабораторній практиці), прямий підрахунок клітин за допомогою лічильних камер, облік на фіксованих препаратах.

Облік мікроорганізмів методом Коха.

Суть методу полягає у послідовному десятикратному розведенні досліджуемого зразка: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , а потім у висіві певного об'єму досліджуваної суспензії на агаризоване середовище (у чашки Петрі) з наступним підрахунком кількості колоній, що вирости.

Цей метод дав змогу здійснювати облік тільки життєздатних клітин.

Ступінь розведення визначали передбачуваною кількістю клітин у зразку. Кількість розведень тим більша, чим більше мікроорганізмів міститься у вихідному зразку. Чашки Петрі поміщали у термостаті за нормальної температури 28–30 °С. Через 3-5 діб підраховували кількість колоній у чашці. Враховуючи ступінь розведення суспензії та кількість внесеної рідини, обчислювали кількість клітин в 1 г вихідної суспензії.

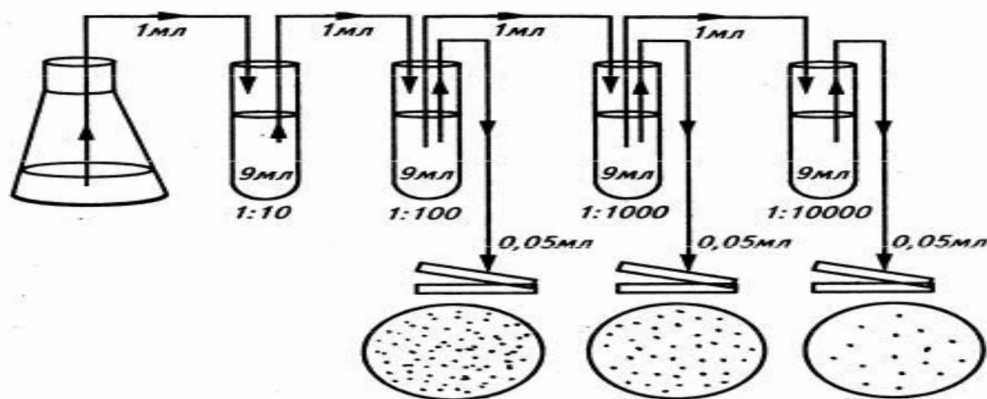


Рис. 2.1 Схема приготування розбавленої суспензії мікроорганізмів і посіву (метод Коха)

Знаючи кількість колоній і ступінь розведення, визначали кількість мікроорганізмів. Кількість мікроорганізмів в 1 г вихідного матеріалу (С) розраховували за формулою:

$$C = (N : V) \cdot K,$$

де: N – середня кількість колоній в одній чашці; V – об'єм суспензії, що вноситься при посіві; K – кратність розведення.

Камера Горяєва має площу 9 мм², об'єм камери становить 9 мм³. Камера розбита на 225 великих квадратів (15 рядів по 15 великих квадратів у кожному ряду) (рис. 2,2 в). Лічильна камера Горєва являє собою товсте предметне скло з нанесеними на ньому поперечними прорізами, що утворюють три поперечно розміщені плоскі площадки (рис. 2.2, а).

Облік мікроорганізмів за допомогою лічильних камер.

Лічильна камера Горєва являє собою товсте предметне скло з нанесеними на ньому поперечними прорізами, що утворюють три поперечно розміщені плоскі площадки (рис. 2.2, а). Середня площадка поздовжньою прорізом розділена навпіл, причому на кожній половині нанесена квадратна сітка. Дві бокові площадки розміщені на 0,1 мм вище середньої (рис. 2.2, б). Сітка розділена на певну кількість великих і малих квадратів, згрупованих по-різному (рис. 2.2, в).

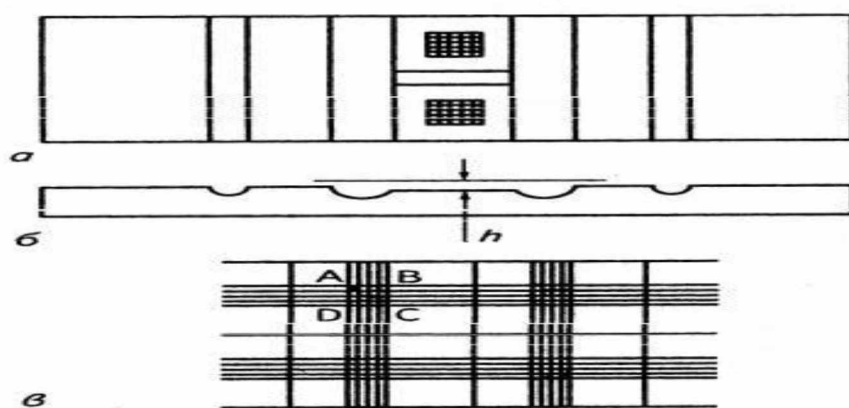


Рис. 2.2 Лічильна камера Горєва:

а – вигляд зверху; б – вигляд збоку; в – вигляд за малого збільшення мікроскопу

Постійною величиною у всіх сітках є малий квадрат(ABCD, рис. 2.2, в), сторона якого дорівнює 1/20 мм, площа – 1/400 мм², а об'єм за висоти камери 1/10 мм – 1/4000 мм³ або 1/4000000 мл. Так званий великий квадрат ABCD складається з 16 малих квадратів.

Краплю суспензії наносять на сітку камери і зверху накривають чистим накривним скельцем. Рідина під накривним скельцем повинна рівномірно без бульбашок розподілитися по всій сітці, не виступаючи у жолобок між стінками. Визначали середню кількість клітин в одному квадраті. Припустимо, у п'яти великих квадратах (80 малих) міститься 240 клітин, тоді в одному малому квадраті середня кількість клітин становить 240:80 = 3.

Кількість клітин в 1 мл досліджуваної суспензії розраховують за формулою:

$$M = \frac{A \cdot 10^3}{hS} n,$$

де M - число клітин в 1 мл суспензії;

A – середнє число клітин в 1 квадраті сітки;

h - висота камери;

S – площа 1 квадрата сітки, мм²;

10^3 – коефіцієнт переводу кубічних сантиметрів в кубічні міліметри;

N – розведення досліджуваної суспензії.

Облік мікроорганізмів на фіксованих препаратах. Фарбування за Грамом.

Для розгляду штаму бактерії *Lactobacillus lactis* як грампозитивну для розгляду під мікроскопом використали техніку фарбування за Грамом.

1. На фіксований мазок бактерії клали просочений фарбою генціанвіолету фільтрований папір і наносять 2-3 краплі дистильованої води й через 2 хвилини його знімали, а залишки фарби змивали водою. 2. На мазок наносили розчин Люголя й через 2 хвилини його змивали. 3. Мазок знебарвлювали 96-% етиловим спиртом, наносячи його на 20-30 секунд.

4. Мазок ретельно промивали водою.

5. На 1-2 хв наносили фуксин Пфейфера

Фарбу змивали водою, просушували препарат і мікроскопують.

Грампозитивні мікроби фарбуються у фіолетовий колір, і грамнегативні – у червоний.

Характерною особливістю молочнокислих бактерій *Lactobacillus lactis*, є їх здатність зброджувати вуглеводи, з утворенням молочної кислоти. Істинні (гомоферментні) молочнокислі бактерії утворюють в основному молочну кислоту. Лактобактерії зазвичай мають правильну форму довгої «палички», іноді

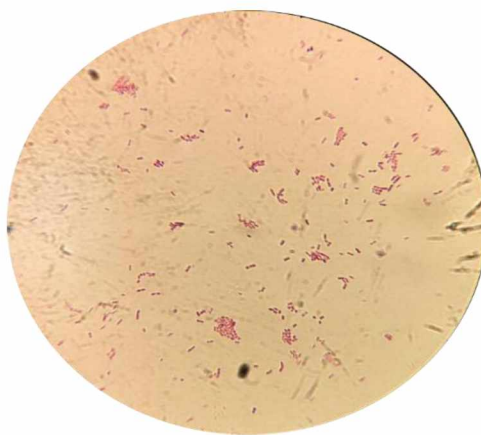


Рис. 2.3 Візуальний вигляд колоній лактобактерій *Lactobacillus lactis* під мікроскопом з об'єктивом 90x (фарбування за Грамом)

2.2 Фізико-хімічні методи дослідження.

2.2.1 Дія стресорів на життєздатність молочнокислих бактерій.

Механізм синтезу молочної кислоти.

В результаті проведених досліджень встановлено, що *Lactobacillus lactis* має досить високою біохімічною активністю та стійкістю до несприятливих для зростання умов. Отримані результати демонструють гнучке реагування *Lactobacillus sakei lactis* на зміну рН середовища, температури, на підвищення концентрації хлориду натрію у живильному середовищі.

При дії стресових факторів кількість життєздатних клітин *Lactobacillus lactis* (КОУ/см³) підраховували за вище вказаними методами обліку МКБ за допомогою висіву послідовних десятикратних розведень досліджуваної суспензії мікроорганізмів на агаризоване стандартне живильне середовище

MRS та на технологічно удосконалене дослідне середовище. Спостерігали та робили облік мікроорганізмів під дією стресорних факторів: за зміною рН середовища (від 5,5 до 8,5), за різних температурних режимів (від 30 °С до 52 °С), за різною концентрацією з вмістом хлориду натрі (вд 0,6 до 2 М та при сублетальній концентрації пероксиду водню у темновій та освітленій фазі росту бактерій).

Сублетальну концентрацію пероксиду водню вносили в культуру, що знаходилась у фазі зниженого росту, концентрація субстрату (глюкози) при цьому складала 10-12% від початкової концентрації. За результатами визначення сублетальної концентрації здійснювався відбір стійких до H_2O_2 культур молочнокислих бактерій шляхом послідовних пасивацій в колбах на середі з глюкозою, в яку на кінець експоненціальної фази вносили H_2O_2 в установленій сублетальній концентрації. Для кожного експерименту був свій контроль - культура молочнокислих бактерій, куди H_2O_2 не вносилося. Значення рН досліджуваних розчинів вимірювали на рН-метрі «рН-150 М» в інтервалі температур 20–25 °С. Перед вимірюваннями рН-метр калібрували за допомогою буферних розчинів зі значеннями рН 4.01, 6.87 і 9.18 [14].

Зараз у промисловості в основному реалізується періодичний процес ферментації, при якому на першому етапі методом глибинного культивування за допомогою гомоферментативних термофільних бактерій вирощується біомаса мікробного продукту, а на наступному здійснюється синтез молочної кислоти з додаванням у ферментаційне середовище необхідної кількості глюкози (цукрози). У цих процесах повний цикл ферментації становить від 2 до 10 діб.

У виробничих умовах мікробіологічної лабораторії Копилянського комбікормового заводу проводили дослідження зброжувальної здатності молочнокислих бактерій *L. Lactis* з використанням вуглеводних субстратів: бурякову мелю, сахарозу, глюкозу. Культивування проводили у лабораторному ферментері марки Minifors (INFORS, Швейцарія) з робочим

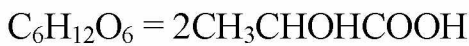
об'ємом 5л.

Кінцевим продуктом при молочнокислому бродінні є синтез молочної кислоти, також відома як 2-гідроксипропанова або α -оксипропіонова кислота. Молочна кислота є продуктом метаболізму молочнокислих бактерій за анаеробних умов. Вона належить до класу ациклічних оксикислот, що одночасно мають карбоксильну групу та спиртовий гідроксил.

Основність оксикислоти визначається числом карбоксильних груп в її молекулі, а атомність – числом гідроксильних груп. Тож молочна кислота – це одноосновна двохатомна оксикислота [10].

Емпірична формула: $C_3H_6O_3$ ($CH_3-CH(OH)-COOH$).

При гомоферментативному молочнокислому бродінні в присутності МКБ в і дбувається розпад глюкози до молочної кислоти.



В основі гомоферментативного молочнокислого бродіння лежать реакції гліколізу (шлях Ембдена-Мейергофа-Парнаса). Утворений в результаті піруват відновлюється до лактату воднем, що відщепився при дегідруванні гліцеральдегід-3-фосфату (рис. 2.4).

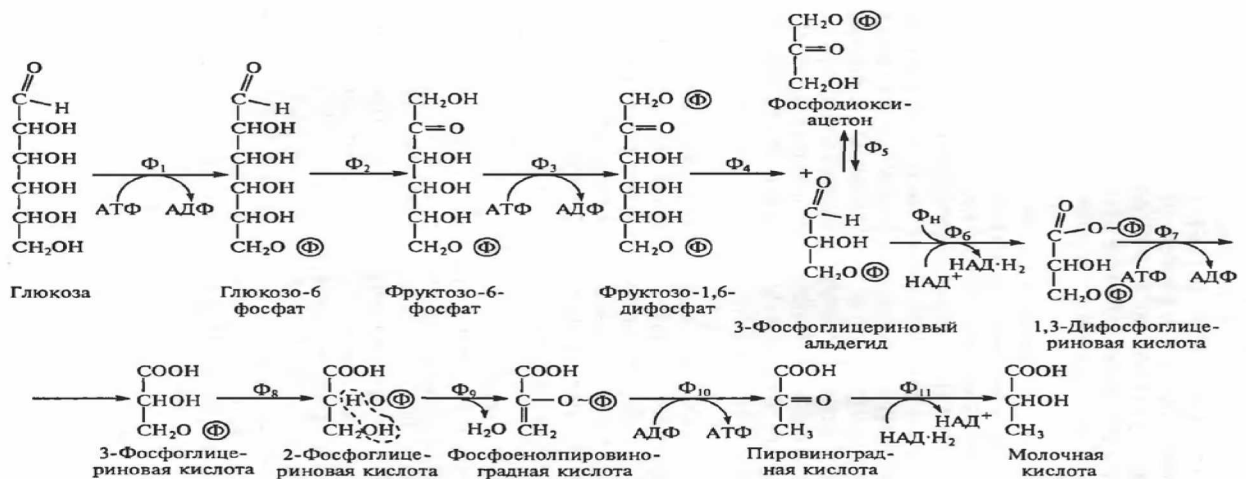


Рис. 2.4. Гомоферментативне молочнокисле бродіння:

Φ_1 – гексокіназа, Φ_2 – глюкозофосфатізомераза, Φ_3 – фосфотруктокіназа, Φ_4 – фруктозо-1,6-дифосфат-альдолаза, Φ_5 – триозофосфатізомераза, Φ_6 – 3-ФГА-дегідрогеназа, Φ_7 – фосфогліцераткіназа, Φ_8 – фосфогліцеромутаза, Φ_9 – енолаза, Φ_{10} – піруваткіназа, Φ_{11} – лактатдегідрогеназа

Утворення D(-) - , L(+) - або DL - форм молочної кислоти визначається наявністю у молочнокислих бактерій стереоспецифічних D- , L- або DL-лактатдегідрогеназ. Незначна частина пірувату піддається декарбокسيلюванню, що призводить до утворення ацетату, етанолу і CO₂, а також ацетону

Наступна реакція каталізується під впливом ферменту глюкозофосфатізомеразі і призводить до ізомеризації глюкозо-6-фосфату до фруктозо-6-фосфату з наступним фосфорилуванням. Донором фосфату служить АТФ. Утворений фруктозо- 1,6-дифосфат розривається на фосфодіоксиацетон та 3-ФГА під впливом фруктозо-1,6-дифосфатальдолази – ключового ферменту гліколітичного шляху. Отриманий фосфодіоксиацетон ізомеризується з отриманням 3-ФГА. До подальшого перетворення включається лише 3-ФГА.

На даному етапі процес бродіння є енергозатратним, адже на фосфорилування витрачається 2 молекули АТФ. Окислення 3-ФГА до 1,3-дифосфогліцеринової кислоти – одна з найважливіших реакцій шляху Ембдена-Меєргофа-Парнаса, адже на цьому етапі запасається енергія в молекулі 1,3-ФГК та виділяється електрон, що переходить на НАД⁺ та в подальшому передається піровиноградній кислоті [12,21].

На наступному етапі 1,3-ФГК віддає високоенергетичну фосфатну групу АДФ, що призводить до утворення 3-ФГК і АТФ, в якій запасається енергія. Оскільки в реакції брало участь 2 молекули 1,3-ФГК, то на даному етапі клітина відновила свій енергетичний баланс: 2 молекули АТФ було витрачено та 2 молекули АТФ синтезувалось на 1 молекулу глюкози.

Під впливом фосфогліцеромутази фосфатна група 3-ФГК з третього положення переноситься в друге з утворенням 2-ФГК. Наступна реакція представляє собою внутрішньо молекулярний окисно-відновний процес. Від другого та третього атомів вуглеводу 2-ФГК відщеплюється молекула води, в наслідок чого ступінь окислення другого атому підвищується, а третього – зменшується. Дегідратація молекули каталізується енолазою і

супроводжується перерозподіленням енергії в молекулі, в результаті чого 2-ФГК перетворюється у ФЕП, що вже має високоенергетичний зв'язок.

Молекула ФЕП стає донором фосфатної групи, що з допомогою піруваткінази переноситься на АДФ. В результаті загальний енергетичний баланс процесу становить 2 молекули АТФ на 1 молекулу глюкози.

Залишилось відновити відновлений переносний НАД-Н₂, що утворився в реакції окислення 3-ФГА. Молекула піривиноградної кислоти, утворена на попередньому етапі, за своїм хімічним складом – достатньо окислена речовина, що може слугувати акцептором електронів.

Таким чином донорно- акцепторна проблема вирішується найпростішим чином: 2 електрони переносяться з НАД-Н₂ на молекулу піривиноградної кислоти з утворенням молочної кислоти [14,22-25].

Сумарно процес гомоферментативного молочнокислого бродіння можна виразити наступним рівнянням:



При гетероферментативному бродінні, а також при наявності кисню в процесі бродіння виділяються побічні продукти, такі як етанол та оцтова кислота. Однак в гомоферментативне молочнокисле бродіння в анаеробних умовах виключає синтез побічних продуктів.

ВИСНОВОК до розділу 2.

1. Визначені основні мікробіологічні методи дослідження. Розглянуті методики приготування стандартного живильного середовища та технологічно удосконалене живильне середовище (як дослідне) для культивування молочнокислих бактерій.
2. Виділені основні методи обліку мікроорганізмів, проведено порівняльну характеристику їх, що надає можливість враховувати при експериментальних дослідженнях.
3. Визначено межу дії стресорів на життєздатність молочнокислих бактерій.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

На підставі проведених досліджень було встановлено, що найкращими сукупними характеристиками має штам роду *Lactobacillus* - *Lactobacillus lactis*. У зв'язку з цим подальше відпрацювання різних процесів культивування проводилося з цим штамом.

3.1. Оптимізація складу поживного середовища та вибір оптимального варіанту

Варіант удосконалення культивування молочнокислих бактерій у технології одержання молочної кислоти, що розглянутий у нашій експериментальній роботі був пов'язаний, перш всього, з оптимізацією живильного середовища за показниками рівня накопичення та виходу молочної кислоти. Проводили оптимізацію модифікованого живильного середовища MRS, спланованого за схемою повного факторного експерименту (ПФЕ) [9].

Для проведення експерименту було підготовлено 6 варіантів дослідних поживних середовищ для культивування лактобактерій. Були підібрані компоненти до основного складу середовища: лактоза, натрій фосфорнокислий двозамінений, натрій лимоннокислий при наступному співвідношенні компонентів, мас. %: лактоза 1,0 – 1,5, натрій фосфорнокислий двозаміщений – 0,2-0,4, натрій лимоннокислий 0,5-0,8.

На цих середовищах молочнокислі бактерії росли і активно накопичували значну кількість життєздатних клітин: $6,2-8,17 \times 10^6$ КУО/ см³ (контроль $6,1 \pm 0,07 \times 10^6$ КУО/см³). Встановлено, що при культивуванні лактобактерій на середовищі № 3 збільшується вихід біомаси у 1,3 рази у порівнянні з контрольним середовищем або на $2,1 \times 10^6$ КУО/ см³ більше ніж у контролі. Загальну кількість молочнокислих бактерій визначали стандартним методом висіву згідно з ДСТУ 7999:2015 та використовуючи

Компонентний склад поживного середовища для культивування молочнокислих бактерій ($M=t, n=3$)

| Варіант середовища | Співвідношення компонентів в середовищі, мас % | | | Кількість мікробних клітин, $\times 10^6$ КУО/см ³ |
|-----------------------|--|------------------------------------|----------------------|---|
| | Лактоза | Натрій фосфорнокислий двозаміщений | Натрій лимоннокислий | |
| 1 | 1,0 | 0,20 | 0,50 | 7,35±0,23 |
| 2 | 1,1 | 0,25 | 0,55 | 6,4±0,07 |
| 3 | 1,2 | 0,30 | 0,60 | 8,17±0,11 |
| 4 | 1,3 | 0,35 | 0,65 | 7,2±0,09 |
| 5 | 1,4 | 0,40 | 0,70 | 7,67±0,21 |
| 6 | 1,5 | 0,47 | 0,85 | 6,89±0,21 |
| Контрольне середовище | | | | 6,18±0,07 |

В табл.3.1 приведені 6 варіантів живильних середовищ з удосконаленою технології для культивування МКБ та стандартне живильне середовище Man-Rogosa-Sharpe (MRS) як контрольне.

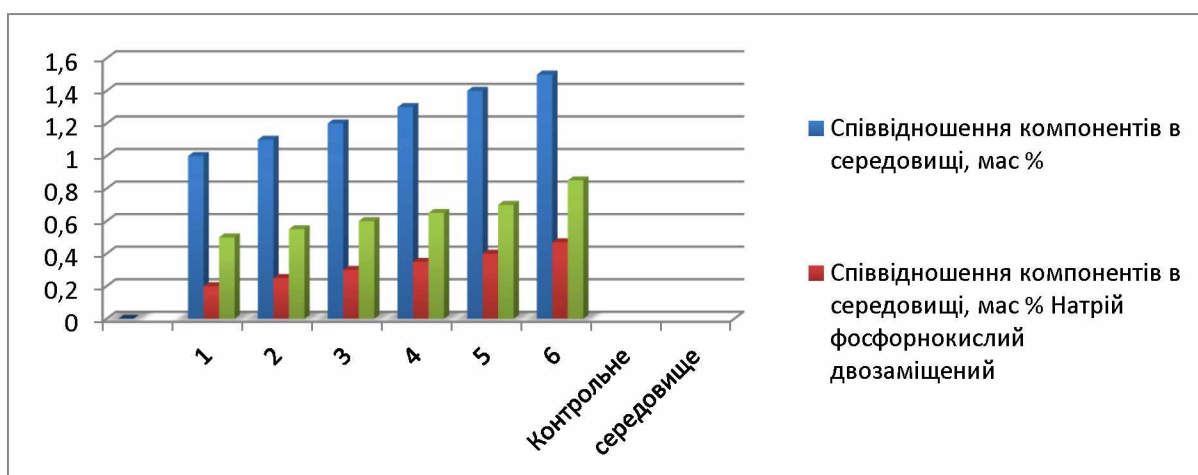


Рис 3.1. Співвідношення компонентів в середовищі, мас %

В подальшому, для продовження експерименту у нашій роботі для

з'ясування стресових впливів на ростовий фактор МКБ був вибраний варіант живильного середовища № 3, а контрольним – стандартне середовище MRS.

3.2 Вивчення стресового впливу на фізіолого-біохімічні характеристики культур молочнокислих бактерій.

Клітини мікроорганізмів, що зазнали несприятливих впливів, перебувають у стані стресу. Ці дії визначають як стресорні.

Стресорні фактори, що зумовлюють будь-яке відхилення від оптимальних умов можна охарактеризувати як стрес. Стосовно культивування мікроорганізмів стрес можна визначити, як фізіологічні зміни, що викликані модифікацією оточення (фізичні, хімічні, умови харчування). У процесі вивчення поживного середовища та культивування лактобактерій встановлено, що ріст мікроорганізмів залежить від рН середовища. Одним із важливих стресових факторів є кислотний стрес, що впливає на внутрішньоклітинне закислення і знижує активність цитоплазматичних ферментів.

Таблиця 3.2

Вплив рН живильного середовища на ріст молочнокислих бактерій (M±m, n=3)

| Початкове значення рН | Кількість мікробних клітин, × 10 ⁶ кл/см ³ | |
|-----------------------|--|------------|
| | M±m | |
| | контроль | дослід |
| 5,5 | 13,75±0,15 | 14,15±0,14 |
| 6,0 | 14,38±1,16 | 14,55±1,10 |
| 6,5 | 23,25±1,70 | 24,4±1,16 |
| 7,0 | 24,34±1,30 | 25,30±1,14 |
| 7,5 | 22,56±1,10 | 23,25±1,01 |
| 8,5 | 10,17±0,50 | 12,3±4,10 |

У процесі вивчення поживного середовища встановлено, що ріст

мікроорганізмів залежить від рН середовища. Чим вище рН середовищ тим менша кількість молочнокислих клітин розвивається в поживному середовищі, результати наведені в таблиці 3. 2.

Результати досліджень рН були в межах від 5,5 до 8,5, В результаті статистичної обробки отриманих результатів виявилось, що найінтенсивніший ріст бактерій відзначався при рН 6,5-7,5.

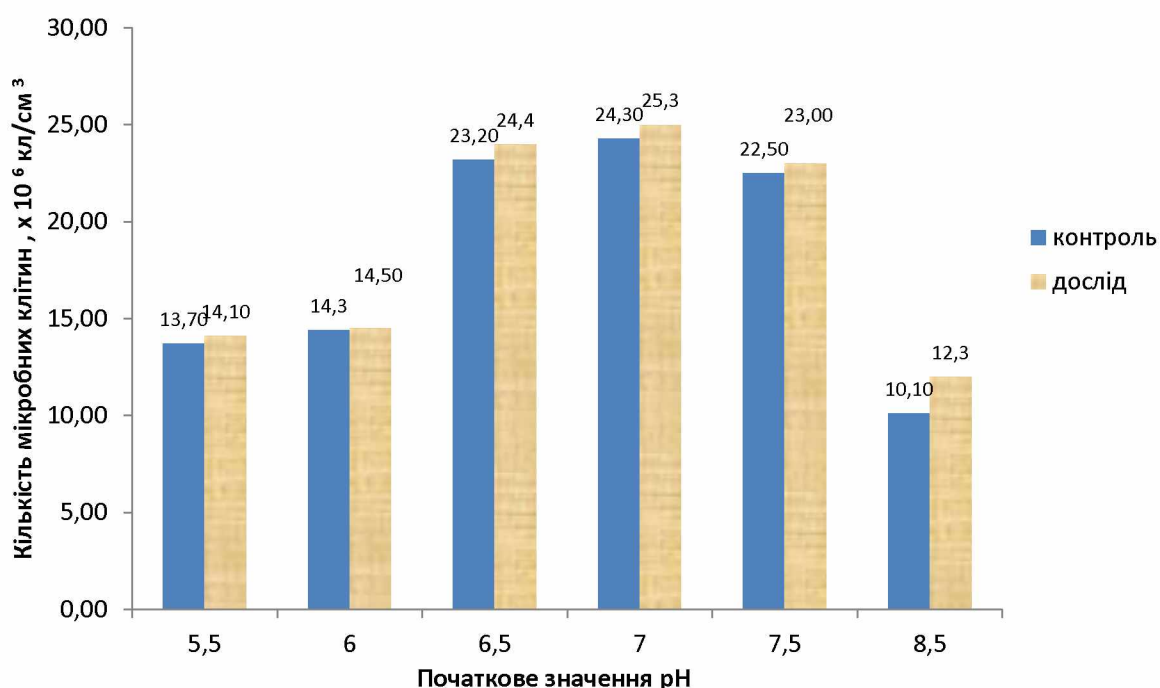


Рис. 3.2 Стресовий кислотний вплив (зміна рН) на культивування МКБ в поживному середовищі

Максимальне накопичення культур спостерігалось при рН – 7,0 (контроль $24,4 \pm 1,30$; дослід $25,3 \pm 1,14$ клітин). Найменша концентрація молочнокислих бактерій у поживному середовищі спостерігалась при рН – 8,5, що було як стресове рН середовище для МКБ, що ілюстровано показано і на діаграмі

Найменша концентрація мікроорганізмів в поживному середовищі спостерігалась при рН – 8,5. Отримавши позитивні результати по визначенню оптимальних умов рН було визначено оптимальні температурні режими вирощування молочнокислих бактерій на запропонованому середовищі. В

дослідах інкубацію посіяних культур проводили за температури від 30° С – мінімальна та до 52° С – максимальна (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Вплив температури вирощування на ріст молочнокислих бактерій,
($M \pm m$, $n=3$)

| Температура, ° С | Кількість мікробних клітин, $\times 10^6$ кл/см ³ | |
|------------------|--|-----------|
| | $M \pm m$ | |
| | контроль | дослід |
| 30 | 14,6±1,77 | 12,7±0,15 |
| 37 | 24,8±0,36 | 25,3±0,34 |
| 40 | 23,6±0,92 | 24,2±0,87 |
| 45 | 8,05±0,92 | 9,3±0,87 |
| 52 | 9,15±0,06 | 12,1±0,05 |

При статистичній обробці було встановлено, що найкращий ріст та розвиток лактобактерій проходить за температури 37 – 40 °С.

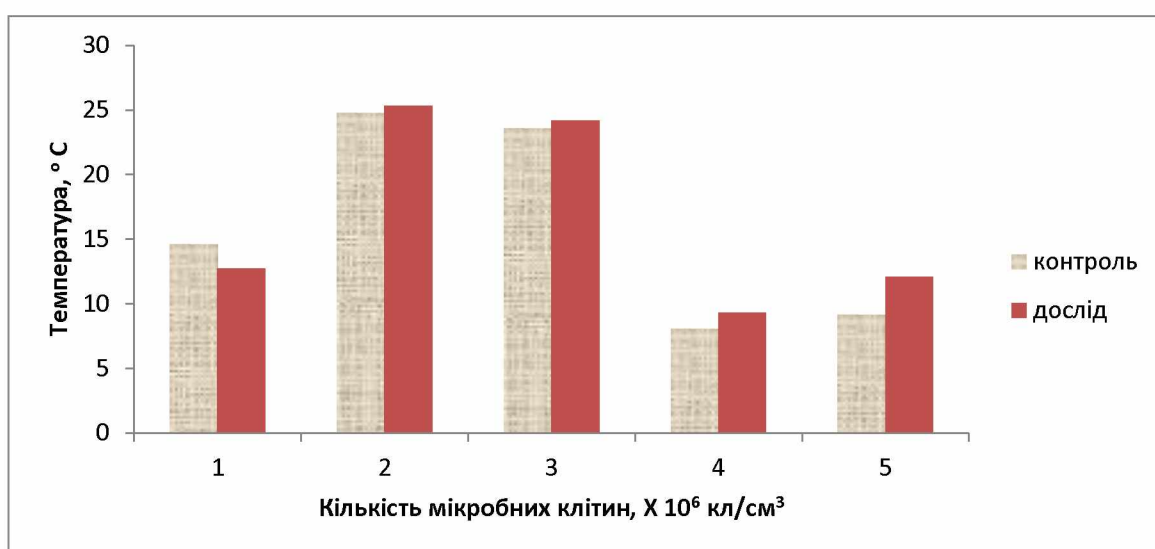


Рис. 3.3 Стресовий температурний вплив на культивування МКБ в
поживному середовищі

При температурі 37 °С в контролі нараховувалось $24,8 \pm 0,36$ мікробних клітин, $\times 10^6$ кл/см³ а в досліді -максимально $25,3 \pm 0,34$ мікробних клітин, $\times 10^6$ кл/см³.

Отже, стресовою температурою для МКБ, (їх було найменше) – це температура 30 °С та 45 °С – 52°С. Таким чином, дослідження показали, що при різних температурних режимах і рН середовища найкращим з них є те, що має рН – 7,0, а інкубація посівного матеріалу проходить за температури 37 °С (рис. 3.2). Запропоновано середовище для культивування лактобактерій, на якому бактерії росли і активно накопичували значну кількість життєздатних клітин $6,2-8,2 \times 10^6$ КУО/см³ . Встановлено, що при різних температурних режимах і рН середовища найкращим з них є те, що має рН– 7,0, а інкубація посівного матеріалу проходить за температури 37° С.

У наступній серії експериментів вивчали вплив осмотичного стресу на культуру молочнокислих бактерій *Lactobacillus lactis*. Як живильне середовище використовувалася MRS модифікована з вмістом 20 г/л глюкози та 7,5 г/л дріжджового екстракту. Як інокулянт використовували добуву культуру *Lactobacillus lactis*.

Культивування проводилося в колбах Ерленмейера (об'єм 100 мл, робочий об'єм – 50 мл) у термостаті при температурі 37°С у *темряві* та *на світлі*. При культивуванні в колбах Ерленмейера осмотичний вплив створювалося додаванням в живильне середовище NaCl концентрації від 0,6 М до 2М. Критична концентрація NaCl визначалася експериментально (див. нижче на фотографії мікроскопіювання), концентрація сахарози обрана виходячи з літературних даних [8,16,17,19].

Для визначення концентрації NaCl, при якій культура молочнокислих бактерій *Lactobacillus lactis* неперевадаптована до стресових умов за допомогою пероксиду водню, може витримувати експозицію до години.


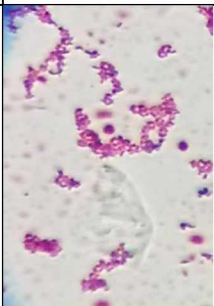
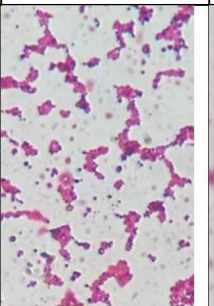
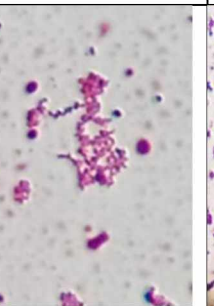
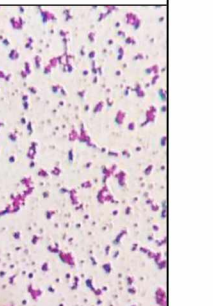
За результатами експерименту було визначено, що 1 М концентрація NaCl є пороговою, при якій культура молочнокислих бактерій *Lactobacillus lactis*, неперевадаптована до стресової дії пероксиду водню, може

витримувати експозицію в 1 М концентрації NaCl до години, не втрачаючи при цьому свого життя.

При концентрації NaCl в 2М при висіві проб на агаризоване середовище після годинної експозиції культура МКБ не зростала на чашках Петрі, була сублетальною.

Таблиця 3.4.

Фотографії клітин адаптовані до стресової дії культури молочнокислих бактерій *Lactobacillus lactis* під мікроскопом при різних концентраціях NaCl

| Концентрація NaCl, М | 0 (контроль) | 0,6 | 1 | 1,4 | 2 |
|----------------------|---|---|--|---|---|
| |  |  |  |  |  |

З представлених фотографій під час мікроскопіювання молочнокислих бактерій видно, що при збільшенні концентрації NaCl спостерігається агрегація клітин з утворенням паличковидних клітинних конгломератів бактерій. Зі збільшенням концентрації хлориду натрію інтенсифікуються міжклітинні контакти з утворенням багатоклітинних систем, що гарантує адаптаційну фізіологічну стійкість клітин до несприятливих факторів середовища. Одна з форм адаптації бактерій до несприятливих факторів середовища – колективна взаємодія, різновидом якого є когезія, тобто злипання клітин одного клону або однієї тканини. Отримані у цьому дослідженні результати підтверджують відомості, що присутність серед

хлориду натрію може призводити до більшої агрегації клітин бактерій [19, 25-26],(*Li et al., 2020; Chowdhury et al., 2007*).

Найбільша кількість життєздатних клітин виявилася у варіанті з адаптованою до пероксиду водню лінією лактобацил, що вирощуються на світлі.

Таблиця 3.5

Кількість мікробних клітин КОУ/см³ наприкінці культивування адаптованою до пероксиду водню при освітленні та затемненні.

| Адаптована культура, освітлення. | Адаптована культура, затемнення. | Не адаптована культура, освітлення. | Не адаптована культура, затемнення. |
|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| $3,8 \times 10^{10}$ | $3,5 \times 10^8$ | $7,3 \times 10^9$ | 3×10^8 |

На рис. 3.3 представлені криві росту адаптованих до стресу молочнокислих бактерій з внесенням різних концентрацій NaCl в кількості, що відповідає розрахованим концентраціям у живильному середовищі .

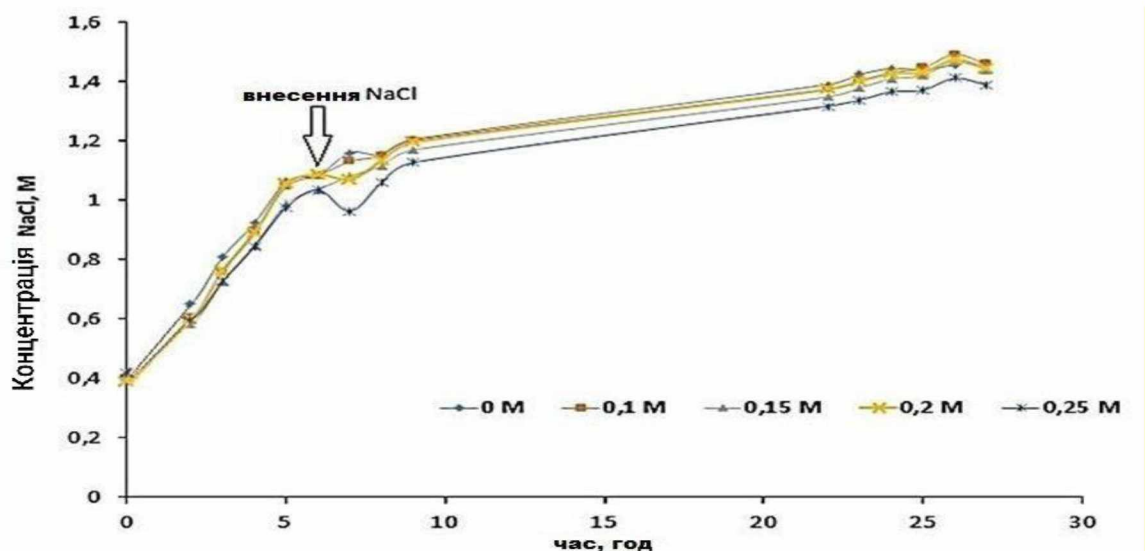


Рис. 3.4 Криві росту адаптованої до стресу лінії *L. lactis* у варіантах з внесенням NaCl.

З рис.3.4 видно , що криві росту адаптованої до стресу лінії *L. lactis* пояснюють стійкість застосовуваного штаму лактобактерій до хлориду

натрію

Таким чином, можна вважати, що культура молочнокислих бактерій *L. lactis*, преадаптована до стресового впливу пероксиду водню, на світлі стає більш стійкою і до сублетального осмотичного впливу, що свідчить про перехресну адаптацію у відповіді на оксидативний і осмотичний світлочутливості та позитивний вплив видимого світла на показники біосинтезу найбільше виявляється для бактерій, преадаптованих до оксидативного стресу.

3.2.1. Визначення сублетальної концентрації пероксиду водню для *L. lactis*

Завданням наступного етапу досліджень було вивчення перехресних впливів стрес-факторів. В наступній частині наших досліджень було вивчення впливу оксидативного стресу на фізіолого-біохімічні характеристики культури молочнокислих бактерій *Lactobacillus lactis*. Для проведення основних досліджень попередньо було необхідно визначити сублетальну концентрацію пероксиду водню. При визначенні сублетальних доз H₂O₂ використовували добову культуру *Lactobacillus lactis*, вирощену на модифікованому живильному середовищі MRS (№ 3). Досліджено, що прийнятною сублетальною дозою є така, що призводить до зменшення логарифму числа життєздатних клітин МКБ.

Наявність перехресної адаптації до різних видів стресу розширює можливості керованого культивування мікроорганізмів, підтримки цільової фізіологічної та біохімічної активності продуцента за відхилення режимів культивування від стандартних. Вивчалася перехресна дія між оксидативним стресом та осмотичним шоком, та виникнення чутливості популяції штаму *L. lactis* до видимого світла після стресу, не пов'язаного з оксидативним. У літературному огляді (розділ 1.6 Стресовий вплив на мікроорганізми зазначалося, що системи відповіді різні стреси взаємно перетинаються і доповнюють одне одного. Зокрема, у лактобацил гени, що відповідають за

регуляцію стійкості до оксидативного стресу, належать до -32 та інших регулонів, пов'язаних, у свою чергу з регулюванням відповіді клітини на тепловий шок [11].



Рис.3.5 КОУ на агаризованому середовищі MRS після внесення пероксиду водню: концентрація H_2O_2 , г/л: А – 0,05; Б – 0,1; В – 0,3.

Таким чином, у даному випадку можна припустити виникнення перехресної адаптації між оксидативним стресом та осмотичним шоком. З метою вивчення перехресної відповіді на стрес культуру, передадаптовану шляхом впливу на неї агентів окисного стресу, піддавали тепловому шоку. Сублетальна температура становила $52^{\circ}C$.

З метою визначення сублетальної концентрації пероксид водню вносили в дозах від 0,05 г/л до 3 г/л з кроком 0,05 одиниць у культуру, що знаходиться у фазі уповільненого зростання в момент, коли концентрація субстрату (глюкози) становила 10-12 % від початкової.

Інокулятом служила добова культура, вирощена серед MRS. Кількість інокуляту, що вносився, становило 10,0 %.

За результатів, поданих на рис. 3.2 видно, що за прийнятих сублетальних() умов для даної культури молочнокислих бактерій є концентрація пероксиду водню, що дорівнює 0,3 г/л, яка в подальшому була використана для отримання ліній молочнокислих бактерій, адаптованих до H_2O_2 .

3.3 Механізм культивування молочнокислих бактерій з вуглеводними субстратами у лабораторному ферментері

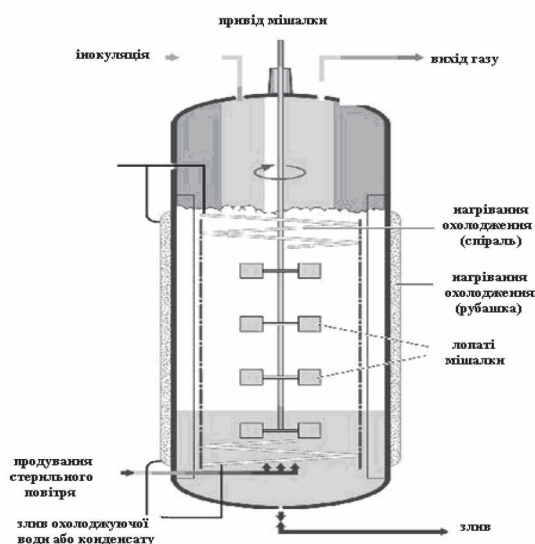
Кінцевим етапом експериментальних досліджень було вивчення культивування молочнокислих бактерій *Lactobacillus lactis* на живильних середовищах з вуглеводними субстратами та вихід молочної кислоти (ДСТУ 4621:2006 Кислота молочна харчова) в лабораторному ферментері. Дані, що приведені в табл. 3.5 були використані з результатів дослідження у промисловій мікробіологічній лабораторії.

Як зазначалось раніше синтез молочної кислоти у промисловості відбувається шляхом гомоферментативного молочнокислого бродіння. Послідовність хімічних перетворень, що лежить в основі синтезу, отримала назву гліколітичного шляху або шляху Ембдена-Меєргофа-Парнаса, адже 10 з 11 реакцій, починаючи з вуглеводу та закінчуючи піруватом, у гомоферментативному молочнокислому бродінні та в гліколізі ідентичні[10,13,14, додаток Б,Д].

Основним енергетичним ресурсом для бактерій, що здійснюють гомоферментативне молочнокисле бродіння служать моносахариди та дисахариди.



А



Б

Рис. 3.6 А -Лабораторний ферментер Minifors, Б) Схема ферментера (біореактор) для культивування мікроорганізмів.

Як інокулянт використовували добову культуру *Lactobacillus lactis*, вирощену з використанням стандартного середовища MRS. [2,6,11].

Технологія отримання молочної кислоти при використанні джерела вуглецю чистої глюкози істотно дорожчає. У виробничих умовах на ферментері проводили дослідження здатності *L. lactis* зброджувати вуглеводні субстрати такі як бурякову мелясу, сахарозу, глюкозу

Культивування проводили у лабораторному ферментері Minifors (INFORS, Швейцарія) з робочим об'ємом 5 л. Швидкість обертання мішалки – 150,0 об/хв. В ході процесу здійснювалося автоматичне підтитрування 25% розчином аміаку до значень кислотності середовища 6,0-6,5. Кількість інокулянту, що вноситься, становило 10,0 %.

На першому етапі проводили дослідження щодо впливу джерела вуглецю на біологічну активність обраного штаму МКБ *Lactobacillus lactis*. Склад середовища має бути найбільш економічно вигідним і не спричиняти погіршення раніше отриманих показників для обраного штаму: ступінь споживання вуглеводів – 97,5 %, вихід продукту – 92 – 95 %, продуктивність – не менше 1,5 г/л*год. Перша фаза росту бактерій називається лаг-фазою, це період повільного зростання, коли клітини адаптуються до середовища, багатого на поживні речовини, і готуються до швидкого зростання.

За лаг-фазою слідує логарифмічна фаза, або експоненційна фаза, під час якої відбувається швидке експоненційне зростання. Швидкість, з якою клітини ростуть під час цієї фази, називають швидкістю зростання, а час, який необхідний для подвоєння клітинної популяції, називається часом генерації. У першому етапі культивування немає значного збільшення швидкості споживання субстрату – середня швидкість споживання вуглеводів становила 0,54 г/л*ч. Глюкоза, як більш простий субстрат, споживається насамперед протягом 6,5 год. Результати культивування молочнокислих бактерій *p.L. lactis* на живильних середовищах з вуглеводними субстратами та вихід молочної кислоти представлені у табл.3.5

Таблиця 3.6

Результати культивування молочнокислих бактерій р. *L. lactis* на живильних середовищах з вуглеводними субстратами (дані таблиці використані з результатів дослідження у промисловій мікробіологічній лабораторії).

| Показники періодичного процесу культивування | <i>Бурякова меляса</i> | <i>Сахароза</i> | <i>Глюкоза</i> |
|--|------------------------|-----------------|----------------|
| Тривалість, год. | 117,5 | 74,5 | 21,0 |
| Тривалість лаг-фази, год | 2,43 | 2,06 | 5,05 |
| Середня швидкість використання вуглеводів, г/л*год | 1,25 | 2,34 | 4,62 |
| Максимальна швидкість використання вуглеводів, в експоненціальній фазі росту, г/л*год. | 1,68 | 3,86 | 8,92 |
| Максимальне накопичення біомаси, г/л | 6,54 | 4,46 | 5,8 |
| Ступінь використання вуглеводів, % | 93,0 | 91,6 | 96,7 |
| Вихід молочної кислоти, % | 94,6 | 71,0 | 97,8 |

Таким чином, отримані на виробництві результати показали, що при культивуванні МКБ р. *Lactobacillus lactis* на сахарозі і *буряковій мелясі* остання зброджується з суттєво меншою швидкістю порівняно з глюкозою, що обмежує використання сахарозомістких субстратів для одержання молочної кислоти та обумовлює необхідність пошуку інших рішень для вдосконалення процесу культивування.

Вихід молочної кислоти при використанні для культивування МКБ вуглеводних субстратів: *бурякової меляси* - вихід молочної кислоти становив 94,6%, сахарози -71,0 та при використанні глюкози вихід молочної кислоти найвищий - 97,8 %.

На рис. 3.7 представлена загальна технологічна схема синтезу молочної кислоти у виробничих умовах.

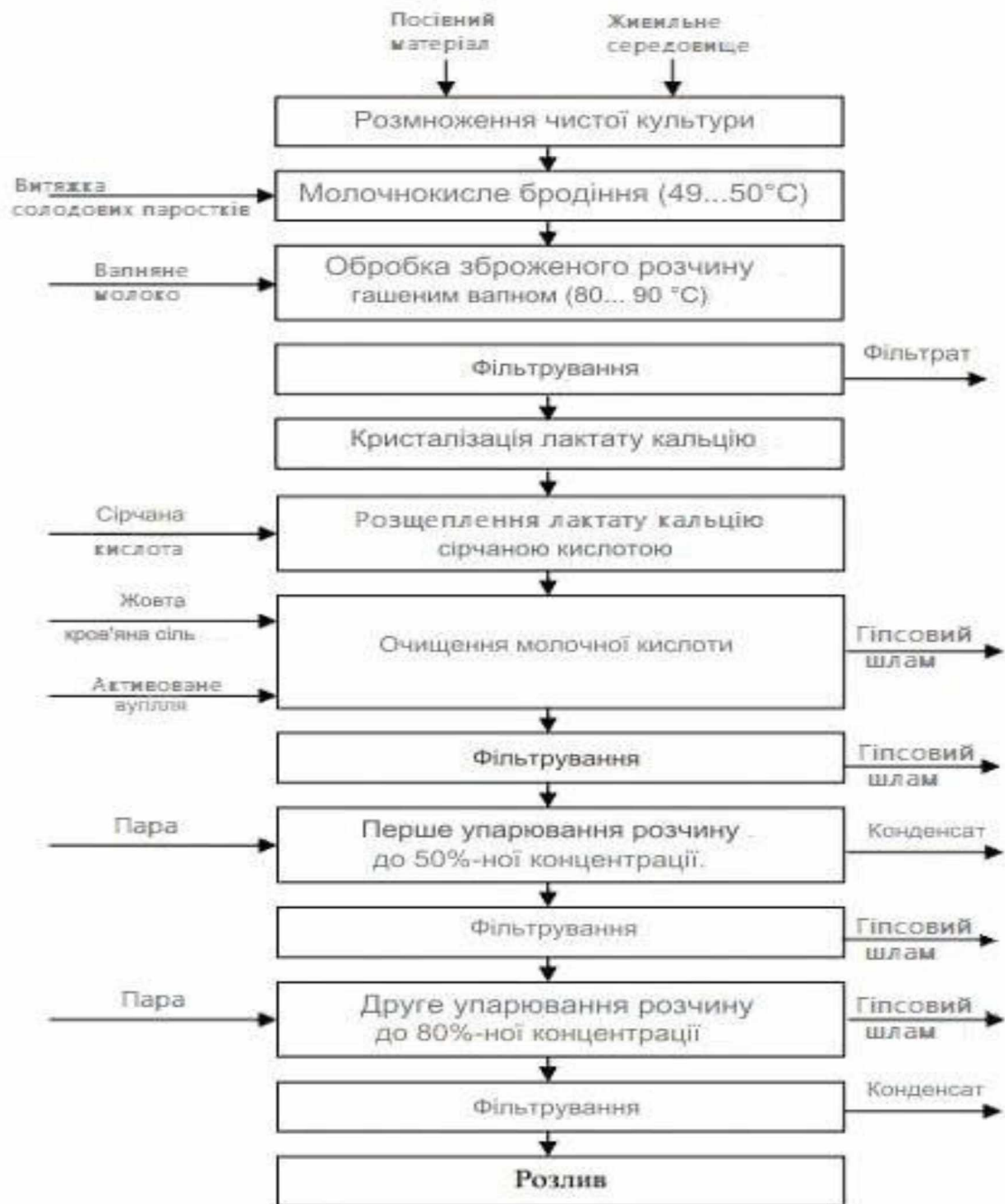


Рис.3.7 Технологічна схема синтезу молочної кислоти у виробничих умовах

Для досягнення економічної ефективності, забезпечення високої продуктивності та концентрації кінцевого продукту культуральної рідини, в останній час впроваджують нанофільтрації та мікрофільтрації в систему виробництва молочної кислоти, що дозволяє отримувати 95% чистої L(+) молочної кислоти.

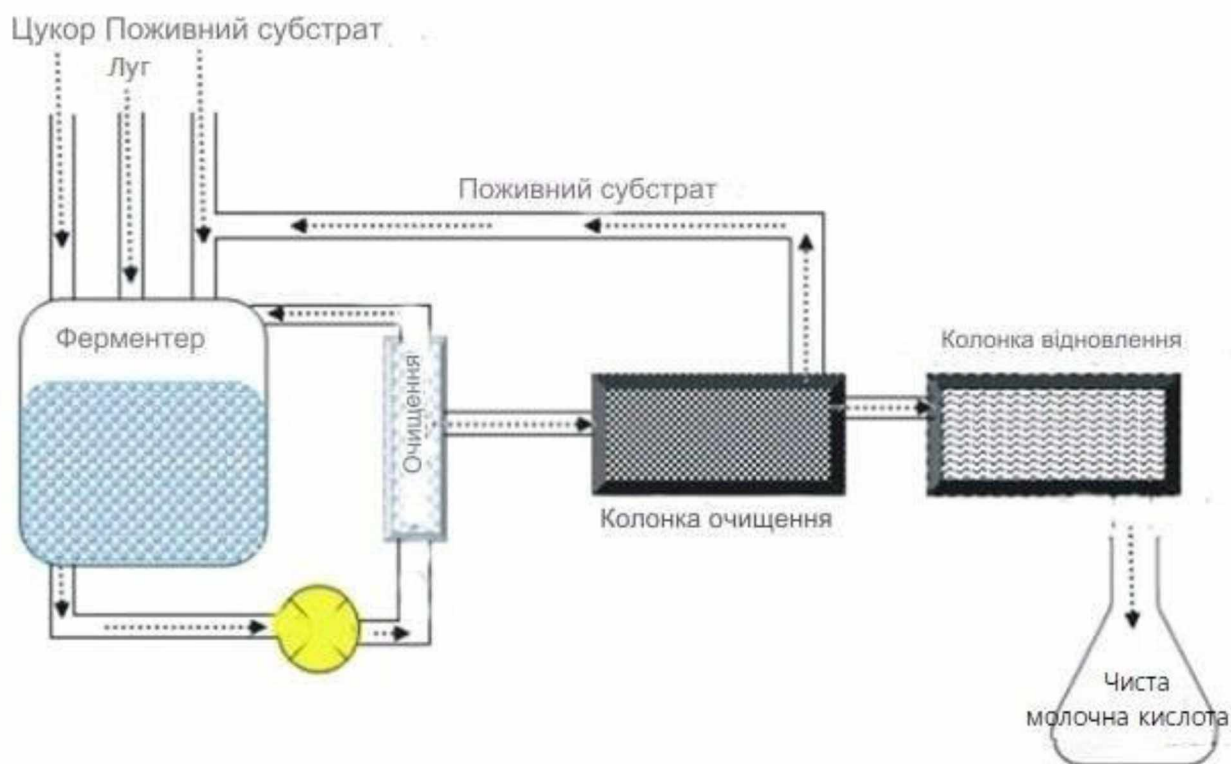


Рис.3.8 Одержання молочної кислоти з використанням мембранного реактора

Мембранний реактор являє собою систему, яка складається з біореактора з безперервним потоком живильного середовища і відведенням культуральної рідини з пропусканням її через мембранний фільтр та поверненням біомаси (рис. 3.7) [Т. Ghaffar, М. Irshad, Z. Anwar, Т. Aqil, Z. Zulifqar, А. Tariq, М. Kamran, N. Ehsan, S. Mehmood, J. of Radiation Research and Applied Sciences., 7, 2, April, 222–229 (2014);]

ВИСНОВКИ

1. З метою прискорення росту накопичення бактеріальної маси та більш тривалого терміну збереження культур удосконалена технологія культивування лактобактерій. З 6 варіантів вибрано третій варіант з внесенням до поживного середовища: лактози – 1,2 мас%, натрій фосфорнокислого двозаміщеного -0,3 мас.%, натрію лимоннокислого – 0,6 мас.%. Встановлено, що при культивуванні лактобактерій на середовищі № 3 збільшується вихід біомаси у 1,3 рази у порівнянні з контрольним середовищем або на $2,1 \times 10^6$ КОУ/ см³ більше ніж контролю.

2. Досліджено вплив кислотного стресорного фактора на ріст молочнокислих бактерій. За результатами досліджень рН були в межах від 5,5 до 8,5 Найінтенсивніший ріст бактерій відзначався при рН 6,5-7,5. Максимальне накопичення культур спостерігалось при рН – 7,0 (контроль $24,4 \pm 1,30$; дослід $25,3 \pm 1,14$ клітин). Найменша концентрація молочнокислих бактерій у поживному середовищі спостерігалась при рН – 8,5, що було як стресове рН середовище для МКБ.

3. За результатами статистичної обробки було встановлено, що найкращий ріст та розвиток лактобактерій відбувався за температури 37 °С – 40 °С, а *стресовою* температурою для МКБ, (КОУ/см³), тобто виживаємість бактерій було найменше) – це температура 30 °С та 45 °С – 50°С.

Таким чином, дослідження показали, що при різних температурних режимах і рН середовища найкращим з них є те, що має рН – 7,0, а інкубація посівного матеріалу проходить за температури 37 оС.

4. Дослідження впливу осмотичного стресу на культуру молочнокислих бактерій *Lactobacillus lactis* показали, що концентрація NaCl 6,5М мала інгібуючу дію на ріст культури МКБ.

5. Встановлено сублетальну концентрації стресора пероксиду водню на ріст культури молочнокислих бактерій р. *Lactobacillus lactis*. За результатами досліджень для даної культури молочнокислих бактерій є концентрація

пероксиду водню, що дорівнює 0,3 г/л, яка в подальшому була використана для отримання ліній молочнокислих бактерій, адаптованих до H₂O₂.

6. Отримані результати показали, що при культивуванні МКБ р. *Lactobacillus lactis* у лабораторному ферментері на сахарозі і буряковій мелясі остання зброджується з суттєво меншою швидкістю порівняно з глюкозою, що обмежує використання сахарозомістких субстратів для одержання молочної кислоти та обумовлює необхідність пошуку інших рішень для вдосконалення процесу культивування.

7. Для молочнокислих бактерій показано, що для вдосконалення ферментаційних процесів отримання молочної кислоти контрольований вплив стресорних факторів (низьких доз H₂O₂) та антистресорних факторів (видимого світла низької інтенсивності) може виступати як засіб для поліпшення показників біосинтезу з підвищенням виходу молочної кислоти. Показано, що стресована перексидом водню культура стає чутливою до невеликих доз видимого світла. Показано, що вплив H₂O₂ зумовлений фізіологічними ефектами, а не перебігом супутніх хімічних чи фотохімічних процесів окислення за участю H₂O₂.

8. Розглянуто загальну технологічну схему синтезу молочної кислоти. Показано, що вдосконалення технології виробництва молочної кислоти має бути засноване на використанні перспективних джерел вуглеводів для біоконверсії в цільовий продукт; оптимізація технологічних параметрів, удосконалення методів концентрування та очищення розчинів МК, використання відходів виробництва, що дозволить знизити енергоємність виробництва та антропогенне навантаження на навколишнє середовище.

ПРОПОЗИЦІЇ.

Отримані результати та висновки кваліфікаційної бакалаврської роботи можуть бути виробничим досвідом при проходженні виробничої практики на даному підприємстві та при практичній підготовці фахівців-біотехнологів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Акулевич О.В. Кінетика росту молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* на живильних середовищах з різноманітними джерелами вуглецевого й азотного живлення / О.В. Акулевич, Л.Б. Орябінська, О.М. Дуган // Наукові вісті НТУУ "КПІ". 2013. №3. 7–11 с.
2. І.В. Бондар, В.М. Гуляєв Промислова мікробіологія Харчова і агробіотехнологія. Навчальний посібник для студентів спеціальності 7.092901 Промислова біотехнологія. Дніпродзержинськ, видавництво ДДТУ, 2004. 280 с.
3. ДСТУ IDF 149A:2003 Культури молочнокислих заквасок. Визначення видового складу (IDF 149A:1997, IDT).
4. ДСТУ IDF 138:2003 Сухе молоко. Визначення *Staphylococcus aureus*. Методика підрахунку колоній за температури 37°C (IDF 138:1986, IDT).
5. ДСТУ ISO 6611/IDF 94:2007 Молоко та молочні продукти. Визначення колонієутворювальних одиниць дріжджів та/чи плісені. Метод підрахування колоній, що виростили за температури 25°C (ISO 6611/IDF 94:2004, IDT).
6. ДСТУ 4621:2006. КИСЛОТА МОЛОЧНА ХАРЧОВА. Загальні технічні умови. Україна: Держспоживстандарт України, 2007.
7. ДСТУ 2424-94 Промислова мікробіологія. Терміни та визначення
8. Кігель Н. Ф. Технології бактеріальних препаратів для функціональних продуктів і біологічно активних добавок [Текст]: автореф. дис. д-ра техніч. наук : 03.00.20 / Н. Ф. Кігель; [Укр. держ. ун-т харч. технологій]. К., 2003. 46 с.
9. Зикова Н.С. Біотехнологія селенвмісних пробіотиків : дис. канд. техн. наук : 03.00.20 / Н.С. Зикова. Одеса, 2017. 328 с.
10. Старовойтова С.О. Технологія пробіотиків: Підруч. / С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. Київ: НУХТ, 2012. 318 с.

11. Мельничук М.Л. Загальна (промислова) біотехнологія: Навч. посіб. / М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко, В.В. Бородай, Ю.В. Коломієць. Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. 252 с.
12. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : Підручник / Т. П. Пирог Київ: НУХТ, 2004. 471с.
13. Черевко О. І, Поперечний А. М. Процеси і апарати харчових виробництв: підручник / О. І. Черевко, А. М. Поперечний. 2-е видання, доп. та випр. X.: Світ Книг, 2014. 495 с.
14. Халіль А. Оптимізація процесів культивування у виробництві пробіотичних препаратів на основі лактобацил : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.20 "біотехнологія" / А. Халіль Київ, 2004. – 26 с.
15. Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсиколого-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів. Методичні вказівки.
16. Z S., Al. E. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera [Electronic resource]//NatCommun.2015.URL:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/514?genome_assembly_id=256471.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/514?genome_assembly_id=256471
17. Fuller R. History and development of probiotics // Probiotics. The scientific basis. – London: Chapman and Hall, 1992. P. 1–9.
18. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / [P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones та ін.] // The Firmicutes / [P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones and other]. – New York: Springer, 2009.– (2nd ed.). P. 465–511.
19. Jankovic I., Ventura M., Meylan V., Rouvet M., Elli M., Zink R. Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2 // J. Bacteriol. 2003. V. 185(11). P. 3288-3296.
20. *Lactobacillus mulieris* sp. nov., a new species of *Lactobacillus delbrueckii* group / [J. Rocha, J. Botelho, M. Ksiezarek etc.]. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2020. P. 1522–1527.

21. Moroni A. V., Arendt E. K., Dal Bello F. Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously fermented buckwheat and teff sour doughs // *Food Microbiology*. 2011. Vol. 28, Iss. 3. P. 497–502. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.016>.
22. Nyquist O. L., McLeod A., Brede D. A., Snipen L. [et al.]. Comparative genomics of *Lactobacillus sakei* with emphasis on strains from meat // *Molecular Genetics and Genomics*. 2011. Vol. 285, Iss. 4. P. 297–311. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0608-1>.
23. Papadimitriou K., Alegría Á., Bron P. A., de Angelis M. [et al.]. Stress physiology of lactic acid bacteria // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016. Vol. 80, Iss. 3. P. 837–890. DOI: <https://doi.org/10.1128/membr.00076-15>.
24. Papamanoli E., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., Kotzekidou P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties // *Meat Science*. 2003. Vol. 65, Iss. 2. P. 859–867. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00292-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00292-9).
25. Sawatari Y., Yokota A. Diversity and mechanisms of alkali tolerance in *Lactobacilli* // *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. Vol. 73, Iss. 12. P. 3909–3915. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02834-06>.
26. Skåra T., Axelsson L., Stefánsson G., Ekstrand B. [et al.]. Fermented and ripened fish products in the Northern European countries // *Journal of Ethnic Foods*. 2015. Vol. 2, Iss. 1. P. 18–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jef.2015.02.004>.
27. R., Shruthi B., Deepthi B. V., Sreenivasa M. Y. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Neera: A naturally fermenting coconut palm nectar // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01382>.
28. Cavanagh D., Fitzgerald G.F., McAuliffe O. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment // *Food Microbiol*. 2015. Vol. 47. P. 45–61.

29. J. et al. Adaptation of *Lactococcus lactis* to high growth temperature leads to a dramatic increase in acidification rate // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 14199.
30. Zhang J. et al. Enhanced acid tolerance in *Lactobacillus casei* by adaptive evolution and compared stress response during acid stress // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2012. Vol. 17, № 2. P. 283–289.

