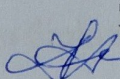


**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології**

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ

« 6 » 06 2024р

**Дипломна робота
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»**

**на тему: «Властивості пробіотичних штамів *Streptococcus thermophilus* та
отримання на їх основі нових препаратів»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БМ-01

Олександра ГОЛІКОВА

Керівник:

доцент кафедри біоенергетики,
біоінформатики та екобіотехнології,

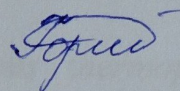
к.т.н., Лоліта МАРИНЧЕНКО

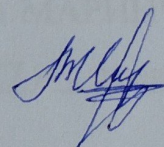
Рецензент:

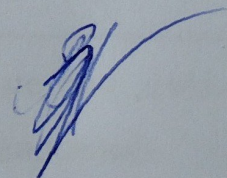
доцент кафедри

промислової біотехнології та біофармації

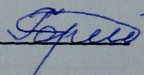
к.б.н. Віта ЛІНОВИЦЬКА







Засвідчую, що у цій дипломній
роботі немає запозичень з праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Студент: 

Київ-2024 року

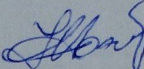
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)
Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»
Освітньо–професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ

«15» 04 2024р.

ЗАВДАННЯ

на дипломну роботу студенту

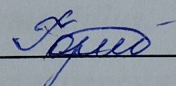
Олександрі ГОЛІКОВІЙ

1. Тема роботи: «Властивості пробіотичних штамів *Streptococcus thermophilus* та отримання на їх основі нових препаратів», керівник роботи Лоліта МАРИНЧЕНКО, кандидат технічних наук, затверджені наказом по університету від «27» травня 2024р. № 2117-с
2. Термін подання студентом роботи 6 червня 2024 р.
3. Вихідні дані до роботи: домашні кисломолочні продукти, методи виділення пробіотичних культур та методи дослідження властивостей виділених штамів *Streptococcus thermophilus*.
4. Зміст роботи: вступ, літогляд, розділи «Матеріали та методи» і «Результати і обговорення», вимоги до охорони праці, висновки, список використаних джерел.
5. Перелік ілюстративного матеріалу: презентація.
6. Дата видачі завдання 15 квітня 2024 р.

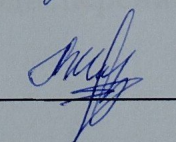
Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1	Підготовка огляду літератури за темою дипломної роботи	15.04.24– 22.04.24	
2	Скринінг МКБ у відібраних кисломолочних продуктах	23.04.24– 03.05.24	
3	Ідентифікація виділених колоній на культуральні, морфологічні та фізіолого-біохімічні ознаки	03.05.24 –20.05.24	
4	Проведення досліджень з виділеним штамом та створення на його основі пробіотичних препаратів	20.05.24 – 30.05.24	
5	Аналіз та опис результатів експериментальної частини	31.05.24 – 12.06.24	
6	Опис заходів з охорони праці та безпеки	13.06.24–15.06.24	
7	Формулювання висновків	15.06.24–16.06.24	
8	Оформлення дипломної бакалаврської роботи	16.06.24– 18.06.24	
9	Подання дипломної бакалаврської роботи на кафедру для рецензування		
10	Подання дипломної бакалаврської роботи на затвердження завідувачу кафедри		

Студент

 Олександра ГОЛІКОВА

Керівник

 Лоліта МАРИНЧЕНКО

РЕФЕРАТ

Робота містить: вступ, 4 розділи, висновки, список використаних джерел. Кількість сторінок – 98; кількість рисунків – 26; кількість таблиць – 10; кількість використаних джерел – 82.

У роботі проаналізовано літературні джерела за тематикою, з якого визначено загальну концепцію пробіотичних препаратів, поширення в природі, біосинтетичну активність, втрату вірулентності та механізм набуття антибіотикорезистентності деякими штамами *St. thermophilus* щодо актуальності розробки нових пробіотичних препаратів зі застосуванням нових виділених природних штамів *Streptococcus thermophilus*. Досліджено та проаналізовано механізми дії основних біотехнологічних та пробіотичних властивостей.

Метою роботи є відбір біотехнологічно активних штамів *St. thermophilus* зі спонтанно утворених кисломолочних продуктів домашніх господарств і визначення характеристики їх біологічних та пробіотичних властивостей, релевантних для створення пробіотичних препаратів.

Наукова новизна роботи. У роботі вперше виділено та досліджено нові активні штами *St. thermophilus* з кисломолочних продуктів домашнього господарства.

Практичне значення роботи отримані нові штами *St. thermophilus* можуть бути застосовані для створення нових ефективних сухих пробіотичних препаратів та бактеріальних концентратів ліофілізованої закваски для прямої інокуляції.

Ключові слова: *Streptococcus thermophilus*, пробіотичні іммобілізовані препарати, пробіотичні властивості, високодисперсний кремнезем.

ABSTRACT

The work contains: an introduction, 4 chapters, conclusions, a list of used sources. The total number of pages is 95; the number of figures– 28; the number of tables is 9; and the number of references is 81.

The work analyzes literature sources regarding the relevance of developing new probiotic preparations using newly isolated natural strains of *Streptococcus thermophilus*. The mechanisms of action of the main biotechnological and probiotic properties have been studied and analyzed.

The aim of the work is the selection of biotechnologically active strains of *St. thermophilus* from spontaneously formed fermented milk products of households and the determination of the characteristics of their biotechnological and probiotic properties, relevant for the creation of probiotic preparations.

The scientific novelty of the work consists in the isolation of a new culture of a highly active natural strain of *Streptococcus thermophilus* for the creation of new effective immobilized probiotic preparations.

The practical significance of the work on the creation of new effective dry probiotic preparations and bacterial concentrates of lyophilized starter for direct inoculation using selected biotechnologically active strains of *Streptococcus thermophilus*.

Key words: *Streptococcus thermophilus*, immobilized probiotic preparations, probiotic properties, highly dispersed silica.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	9
1.1 Історія відкриття, досліджень і еволюція застосування пробіотиків	9
1.2 Загальні поняття про пробіотичні препарати та продукти для відновлення нормофлори	12
1.3 Класифікація пробіотичних препаратів та продуктів для відновлення нормофлори	17
1.4 Систематичне положення <i>Streptococcus thermophilus</i>	19
1.5 Поширення <i>Streptococcus thermophilus</i> в екосистемі	23
1.6 Морфологічні ознаки <i>Streptococcus thermophilus</i>	23
1.7 Культуральні ознаки <i>Streptococcus thermophilus</i>	24
1.8 Фізіолого-біохімічні ознаки <i>Streptococcus thermophilus</i>	26
1.9 Безпека застосування <i>Streptococcus thermophilus</i>	32
1.10 Резистентність <i>Streptococcus thermophilus</i> до природніх інгібіторів шлунково-кишкового тракту	34
1.11 Антагонізм <i>Streptococcus thermophilus</i> до умовно-патогенного та патогенного мікробіому	37
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	42
2.1 Об'єкти дослідження	42
2.2 Матеріали, обладнання та реактиви	42
2.2.1 Матеріали	42
2.2.2 Обладнання та лабораторний посуд	43
2.2.3 Реактиви	44
2.3 Методи дослідження	47
2.3.1 Первинна ідентифікація мікрофлори домашніх кисломолочних продуктів за культуральними ознаками	47
2.3.2 Підрахунок отриманих колоній та розрахунок КУО	49
2.3.3 Ідентифікація мікрофлори домашніх кисломолочних продуктів за морфологічними ознаками	49
2.3.4 Ідентифікація мікрофлори домашніх кисломолочних продуктів за фізіолого-біохімічними ознаками	50

2.3.5 Виділення чистих культур термофільних стрептококів за комплексом ознак	50
2.3.6 Дослідження антогонізму виділеного штаму щодо умовно-патогенної мікрофлори	50
2.3.7 Дослідження антибіотикорезистентності виділеного штаму	51
2.3.9 Визначення β -галактозидазної активності	53
2.3.10 Визначення вологоутримуючої здатності	53
2.3.11 Визначення кількості летких сполук	53
2.3.12 Статистична обробка результатів.....	54
2.3.13 Реологічні параметри згустку	54
2.3.14 Створення на основі виділеної чистої культури сухі іммобілізовані пробіотичні препарати.....	55
3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	57
3.1 Первинна ідентифікація мікрофлори домашніх кисломолочних продуктів за культуральними ознаками	57
3.2 Підрахунок отриманих колоній та розрахунок КУО	59
3.3 Ідентифікація мікрофлори домашніх кисломолочних продуктів за морфологічними ознаками.....	61
3.4 Ідентифікація мікрофлори домашніх кисломолочних продуктів за фізіолого-біохімічними ознаками	64
3.5 Виділення чистих культур термофільних стрептококів за комплексом ознак	66
3.6 Дослідження антогонізму виділеного штаму щодо умовно-патогенної мікрофлори	70
3.7 Дослідження антибіотикорезистентності виділеного штаму	69
3.8 Характеристики молочнокислого продукту, сквашеного виділеною культурою	68
3.9 Створення на основі виділеної чистої культури сухі іммобілізовані пробіотичні препарати	72
3.10 Реологічні параметри згустку	73
4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ	73
Загальні вимоги охорони праці під час роботи в лабораторії	76

Засоби індивідуального захисту	77
Правила пожежної безпеки в лабораторії	77
Правила електробезпеки в лабораторії	78
Правила роботи з хімічними речовинами	80
Біологічна безпека.....	82
Перша допомога у разі нещасних випадків у лабораторії.....	82
ВИСНОВКИ	86
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	87

ВСТУП

В ході численних клінічних досліджень останніх десятиліть у вивченні етіологічних механізмів розвитку як інфекційних, так і неінфекційних хвороб визначено передову роль мікробіологічного фактору на загальний стан організму. Незбалансоване харчування, сидячий або малорухливий спосіб життя, стресові фактори, забруднення екосистеми, нераціональна антибіотикотерапія обумовлюють те, що переважаюча частка людей з усього світу страждають від різноманітних захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Так, за міжнародним епідеміологічним аналізом встановлено, що в індустріально розвинених країнах поширеність уповільнення транзиту їжі по ШКТ – функціональний закреп, спостерігалась в 16% працездатного населення, а в осіб віком понад 60 років дана проблема спостерігалась ще частіше – у 36% [1].

Внаслідок цього зростає тенденція до використання пробіотиків, що відображається у попиті на пробіотичні препарати на ринку України, що динамічно зростає і лише за 2018 рік було реалізовано більше 8,1 млн одиниць препаратів пробіотиків на понад ніж 1,2 млрд. грн [2].

Величезний арсенал біопрепаратів включає різні за складом та призначенням лікарські засоби, харчові добавки та функціональні продукти харчування. Якщо препарати першого покоління призначалися суто з метою відновлення складу втраченої нормофлори, то на сьогодні з біотерапією пов'язують ряд пробіотичних властивостей: імуномодуючого, антимікробного, протизапального, антиоксидаційного, антиканцерогенного, протидіабетичного та антиатерогенного характеру, тощо, що диктує нові стандарти для створення конкурентноспроможних препаратів.

Одним з найвживаніших та найбільш затребуваних молочнокислих бактерій (МКБ) в біотехнологічній та молочній промисловостях є штами *Streptococcus thermophilus*. Йогурт, ряжанка, Геролакт, варенець, Мечніковська та ацидофільна простокваша, кисломолочний сир, отриманий пришвидшеним способом, сметана «Любительська», тверді сири високої температури нагрівання та плавлені сири – це лише невеликий перелік всієї низки кисломолочних та функціональних продуктів,

отриманих завдяки ферментації даним видом, що характеризується низкою позитивних властивостей і перевіреним широким досвідом застосування [20, 32].

В сучасних біопрепаратах останнього покоління включають композиції від двох і більше компонентів, у яких завдяки асоціації мікроорганізмів та допоміжних стабілізуючих речовин тривалий час підтримується висока активність, що забезпечує сумачію ефектів при їх використанні.

Відтак пошук і селекція нових чистих біологічно активних культур з природних джерел для поповнення колекцій штамів мікроорганізмів, дослідження їх пробіотичних властивостей з врахуванням технологічних параметрів на розвиток моно- та багатоштамових композицій і подальшого створення на базі клінічних досліджень пробіотичних препаратів з метою корекції індигенного мікробіому людини є доцільним та актуальним завданням для науково-дослідницької діяльності.

Метою даної роботи є відбір біотехнологічно активних штамів *St.thermophilus* зі спонтанно утворених кисломолочних продуктів домашніх господарств і визначення характеристики їх біологічних та пробіотичних властивостей, релевантних для створення пробіотичних препаратів.

Завданнями роботи є:

- здійснити літературний огляд для розкриття загальної концепції понять пробіотичних препаратів та їх еволюції, формування характеристики цільового біологічного агенту – *Streptococcus thermophilus* за рядом біологічних та пробіотичних властивостей;
- провести скринінг кисломолочних продуктів домашнього приготування на наявність штамів термофільних стрептококів за морфолого-культуральними ознаками;
- дослідити фізіолого-біохімічні властивості відібраних зразків, виділених із спонтанних кисломолочних продуктів домашніх господарств;
- дослідити виділені культури на пробіотичні властивості: антагонізм щодо видів умовно-патогенної мікрофлори та антибіотикорезистентність;

- дослідити біотехнологічні характеристики продукту отриманого на базі виділеного штаму.

Об'єктами дослідження є зразки спонтанних кисломолочних продуктів, використані як джерело для скринінгу молочнокислих бактерій (МКБ), та новий штам *Streptococcus thermophilus*, який був виділений з цих зразків

Предметом дослідження є морфологічні, фізіологічні та біотехнологічні властивості виділених штамів та сухих препаратів на їх основі.

Методи дослідження: у процесі виконання завдання було використано мікробіологічні, біохімічні та технологічні методи аналізу, які відповідали меті дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів.

У роботі вперше виділено та досліджено нові активні штами *St.thermophilus* з кисломолочних продуктів домашнього господарства.

Практична цінність: отримані нові штами *St.thermophilus* можуть бути застосовані для створення нових ефективних сухих пробіотичних препаратів та бактеріальних концентратів ліофілізованої закваски для прямої інокуляції.

Апробація результатів. Роботу було виконано на базі відділу біотехнологій ІПР НААН України в рамках НДР 39.00.02.16П Провести підбір штамів *Streptococcus sthermophilus* для полівидових комбінацій заквашувальних культур № ДР0124U000862. За матеріалами досліджень було опубліковано такі матеріали конференції:

Golikova O. S., Marynchenko L., Nizhelska O. The "surface - particles" interaction can be evaluated by changes in the fractal dimension of this surface. «Нанотехнології та наноматеріали» (НАНО-2023): 11-а міжнародна конференція, Буковель, 16–19 серпня 2023. Київ, 2023.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Історія відкриття, досліджень і еволюція застосування пробіотиків

З моменту низки відкриттів про мікроорганізми, як окремої та унікальної форми життя, в другій половині XVII століття розпочались і до нині не вщухають дискусії щодо взаємин «людина-мікробіота», вивчаючи роль, вплив та участь в регулюванні фізіолого-біохімічних процесів в організмі людини. Уявлення про мікрофлору зазнавали значних перетворень відповідно до рівня пізнання в даній сфері.

Умовно можна виділити 4 ключових етапи у розвитку вчення про мікробіоценоз:

- 1) «Споглядальний» – відкриття наприкінці XVII століття Антонія Ван Левенгука, що вперше спостерігав за мікроорганізмами, яких він назвав «анімалькулями» і виявив їх наявність в організмі людини та тварин.
- 2) «Накопичувальний» – ідентифікація та класифікація наявних мікроорганізмів у різноманітних біотопах; початок вивчення не лише шкідливої, а й еубіотичної ролі деяких видів з людиною (А. Нісле, І.І. Мечников, М.Ф. Гамалія, Г.Н. Габричевський, Л.Г. Перетц та інші).
- 3) «Конкретизуючий» – впровадження в 80-90-ті XX ст. загальновідомих способів культивування, в тому числі облігатно анаеробних бактерій; застосування засад гнотобіології, що сприяло цілеспрямованому аналізу участі нормальної мікрофлори та її компонентів у підтриманні гомеостазу організму-хазяїну або ж навпаки у виникненні деяких патологічних станів, викликаних різними представниками мікрофлори (О.В. Чахава, Б.А. Шендеров, А.О. Тамм та інші).
- 4) «Аналітичний» – вивчення молекулярних реакцій і біохімічних шляхів, що описують зв'язок між мікробіотою і макроорганізмом під кінець 90-их років XX ст. давали повною мірою оцінити потенціал даного симбіозу та розкрити можливі передумови переходу від коменсалітичного співіснування до паразитизму (І.В. Домарадський, А.В. Дубінін, В.Н. Бабін, М.Д. Ардатська, О.Н. Мінушкін та інші) [3].

Слід також згадати основні здобутки вчених, які відіграли суттєву роль в становленні мікробної екології людини і розвитку застосування пробіотиків.

Луї Пастер (1822-1895), французький мікробіолог і хімік, розглядав сутність біохімічних процесів мікроорганізмів, їхнього впливу в екосистемі та житті людини. Він встановив повсюдну поширеність мікроорганізмів і біологічну природу бродіння, позаяк до його досліджень панувала теорія самозародження життя – мимовільної появи живої речовини з неживої, і вважалося, що ферментація чи гниття – це спонтанний хімічний процес, який відбувається без участі живих істот. Пастер же продемонстрував, що бродіння викликають дріжджі – мікроскопічні одноклітинні гриби. Це відкриття лягло в основу таких галузей харчової промисловості, як пивоваріння, виноробство і молочнокислого виробництва. Також у 1865 р. Луї Пастером запропоновано метод боротьби з небажаною і патогенною мікрофлорою рідин, а саме термічна обробка за температури нижче точки кипіння (не більше 100 °C) на нетривалий час. Даний термічний вплив, який згодом назвуть в його честь «пастеризацією», зазвичай є достатнім, аби нівелювати вегетативні форми патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів, водночас не змінюючи значно органолептичні показники продукту.

Практично одночасно з досягненнями Л. Пастера, світ побачив знакові роботи видатного німецького бактеріолога Роберта Коха (1843-1910). У 1884 році він сформулював, так звані, постулати/тріаду Коха – правила визначення інфекційних захворювань, з яких логічно формулювалось досягнення того, що далеко не всі мікроорганізми є патогенними для людини [3, 4].

Один з найвагоміших вкладів у розвиток пробіотичної терапії належить українському біологу, професору Пастерівського інституту в Парижі Іллі Ілліїновичу Мечникову (1845-1916), який став одним із перших, хто окреслив оздоровчу роль мікрофлори у житті людини. Він довів, що вся площа шкіри та слизових оболонок вкриті полімікробною біоплівкою. І.І.Мечников припускав, що наявні протеолітичні мікроби, метаболітами яких є токсичні речовини (аміак, феноли, індол), викликають «кишкову аутоінтоксикацію» і стимулюють

геронтологічні процеси. Закрити потребу в підтримці та оздоровленні мікробіоценозу запропоновано за допомогою продуктів і препаратів на основі так званих «благородних» рас пробіотичних бактерій, зокрема молочнокислими бактеріями (МКБ), що приводить до пригнічення та заміщення патогенної мікрофлори, і відповідно зниження концентрації впливу шкідливих метаболітів. І.І. Мечниковим на початку минулого століття був розроблений пробіотичний препарат «Лактобацилін» – чисті культури виду лактобактерій *Lactobacillus bulgaricus*, які він йменував «болгарською паличкою». А у 1903 році в публікацію вийшли його «Етюди про природу людини», присвячені баченню І. Мечникова наукової і філософської сторони застосування подібних препаратів – «ортобіозу», тобто вмінню «жити правильно». Завдяки подальшій серії робіт на подібну тематику І.І. Мечников у 1908 р. одержав Нобелівську премію [3, 5, 9].

У спробах скорегувати чи замінити кишкову мікробіоту живими апатогенними організмами в лікуванні порушень шлунково-кишкового тракту виконано й інші науково-дослідні розробки пробіотичних препаратів. Німецький вчений Альфред Нісле у 1917 виділив з екскрементів солдата Першої світової війни непатогенний штам *Escherichia coli*, який не провокував розвиток ентероколіту під час масового поширення шигельозу. Отриманий А.Нісле штам *Escherichia coli* Nissle 1917 – один із небагатьох зразків пробіотичних препаратів, не пов'язаних з МКБ.

Подальший розвиток пробіотиків відбувся завдяки Анрі Тісє, французькому вченому з Пастерівського інституту. У 1899 році він вперше ізолював *Bifidobacterium* з калу грудного немовляти для подальшого її введення. Він висунув гіпотезу про перспективу заміщення цієї бактерією патогенної мікрофлори, яка викликає діарею. В 1930 році японський мікробіолог і лікар Мінору Шірата (1899-1982), ізолював штам *Lacticaseibacillus paracasei* Shirota (раніше відомий як *Lactobacillus casei* Shirota) для боротьби зі спалахом діареї. З 1935 року пробіотичний продукт Yakult випускається на основі цього штаму [5, 6].

Вважається, що сам термін «пробіотик» вперше застосовано у 1953 р. німецьким професором Вернером Коллатом (1892–1970) для досить широко позначення неорганічних і органічних добавок, потрібних для підтримки здоров'я хворих, що страждають так званою формою недостатнього харчування в результаті вживання надлишкової кількості високоочищених продуктів у раціоні. Більш сучасної інтерпретації термін набув у 1995 році завдяки бельгійському професору медицини М. Роберфройду та англійському професору харчової мікробіології Г.Р. Гібсону: "пробіотики – це харчові включення мікробного походження, що демонструють позитивні впливи на макроорганізм через регуляцію кишкової мікрофлори" [3, 7].

Такими були піонерські дослідження пробіотичних препаратів, аналогічно пошук клінічних досліджень у PubMed людини пропонує близько 50 тисяч опублікованих результатів робіт щодо пробіотиків, понад 15 тисяч – для пребіотиків і трохи більше тисячі – про постбіотики. Незважаючи на те, що дослідження стосуються гетерогенних тестованих пробіотичних штамів і досліджуваних популяцій, накопичені клінічні докази підтверджують думку, що позитивні ефекти мають місце бути і піддаються вимірюванню через низку різноманітних кінцевих показників.

1.2 Загальні поняття про пробіотичні препарати та продукти для відновлення нормофлори

В дійсності не існує єдиного і чітко визначеного всіма терміну або дефініції для окреслення всього спектру дії біологічно похідних реагентів для позитивного впливу на здоров'я макроорганізмів, зокрема формування, захисту та нормалізації складу та функції мікрофлори кишківнику. Навколо цього досі ведеться активна наукова полеміка. Термінологія варіюється від контексту та специфіки того чи іншого продукту:

- пробіотики (жива мікробіомаса нормофлори);
- пребіотики (неперетравлювальні субстрати та дієтичні інгредієнти, що сприяють вибіркового збільшенню біологічної активності та росту популяцій фізіологічної мікрофлори у кишечнику);

- постбіотики, метаболітики або препарати метаболітного типу (фізіологічні активні метаболіти або рештки пробіотичної біомаси);
- симбіотики (походить від слова «симбіоз» – співіснування, мультиштамові пробіотичні препарати) або синбіотики (походить від слова «синергізм» – взаємно обумовлена інтенсифікація ефекту, комбінований препарат, який містить як пробіотики, так і пребіотики)
- препарати на основі інактивованих мікроорганізмів;
- продукти функціонального харчування (продукти харчування, що містять біологічно-активні компоненти (жива біомаса, її метаболіти, інші сполуки) і забезпечують корисну дію під час регулярного споживання на організм у цілому або певні системи чи їхні функції);
- нутрицевтики (біологічно активні добавки, що є поживними субстратами для оздоровлення кишечника)[8, 9, 13].

Під «пробіотиками» перш за все розуміють фармацевтичні препарати чи харчові біологічно-активні добавки, основою яких є живі клітини мікрофлори, які сприяють покращенню ряду реакцій організму. Відтак пробіотичними препаратами послуговуються не тільки у лікуванні стійких дисбактеріозів, зокрема метаболічного походження, але й у випадках потреби профілактики їх розвитку у всіх демографічних вікових групах [9].

В сучасних реаліях офіційно термін «пробіотик» був затверджений Продовольчою та сільськогосподарською організацією (ФАО) ООН та ВООЗ у 2001 р., згідно з яким: «пробіотики – це мікроорганізми, що при вживанні у адекватних кількостях, сприяють покращенню здоров'ю людини». Також Міжнародна наукова асоціація з питань пробіотиків і пребіотиків (ISAPP) запропонувала таке визначення: «пробіотики – це живі мікроорганізми, введення раціональних кількостей яких, забезпечує позитивний вплив на організм господаря». Для визначення продукту як пробіотика потрібні клінічні докази користі для здоров'я та безпеки їх призначеного використання. Пробіотики можуть мати різні способи застосування, холобіонтів (люди та тварини), цільові групи населення, місця дії (кишечник та інші органи), тощо.

Мертві мікроорганізми, їх компоненти та продукти життєдіяльності не підпадають під класифікацію пробіотиків [10, 11].

У системі державних стандартів України існує декілька визначень для пробіотичних препаратів. За ДСТУ біотехнологічної сфери регламентується дефініція: «пробіотики – концентрат симбіотичної мікрофлори кишечника людини, застосовуваний для відновлення нормального біоценозу в разі захворювання на дизбактеріоз» [12]. На рівні з цим ДСТУ молочної промисловості надає пробіотикам таку дефініцію: «живі мікроорганізми, які забезпечують корисну дію на організм споживача, нормалізуючи склад та функції мікрофлори шлунково-кишкового тракту», також за цим самим стандартом окремо виділяють термін «пребіотики»: «харчові неперетравні добавки, які поліпшують здоров'я споживача вибіркоvim стимулюванням росту та активності корисної мікрофлори кишечника» [13]. Найбільш популярними пребіотиками на цей час є полі- та олігофруктани, соєві олігосахариди та галактоолігосахариди. Їх можна добути як з природних джерел, так і штучно, використовуючи біотехнології або хімічний синтез. Прогнозується, що в найближчі роки світове виробництво пребіотиків значно зросте і сягне кількох сотень тисяч тонн на рік [8, 15].

Окремо від «пробіотиків» та «пребіотиків» займає доволі новий в науковій спільноті термін «постбіотик». Функціональні біологічно-активні сполуки, що утворюються в матриці під час анаеробної ферментації органічних поживних речовин, таких як пребіотики, для генерації енергії у формі аденозинтрифосфату, а також побічні продукти цієї метаболічної послідовності й називаються постбіотиками. В основному це низькомолекулярні розчинні сполуки, що виділяються живою мікрофлорою або вивільняються після лізису мікробної клітини. Прикладами вивчених постбіотиків є: коротколанцюгові жирні кислоти, фрагменти мікробних клітин, позаклітинні полісахариди, клітинні лізати, тейхоева кислота, вітаміни, тощо [16].

Термін "постбіотики" з'являється в літературі та подекуди зазначається в комерційних продуктах, однак ця категорія має обмежені вказівки щодо її

визначення. Так, наприклад, Управління з продовольства і медикаментів США (FDA) не зазначає «постбіотик» в окрему категорію в класифікації пробіотичних продуктів та пов'язаних з ним речовини [16, 17].

Однак, дослідження останніх років демонструють, що навіть у свіжій, добовій культурі штаму живі клітини співіснують з нежиттєздатними (рис. 1.1), кількість яких експоненціально зростає наприкінці терміну придатності. Фактично це означає, що нежиттєздатні або мертві клітини, які неможливо враховувати, застосовуючи традиційний метод висіву на чашки Петрі для підрахунку клітин, можуть становити значну частину популяції пробіотичної культури, а, відповідно, впливати на важливі показники.

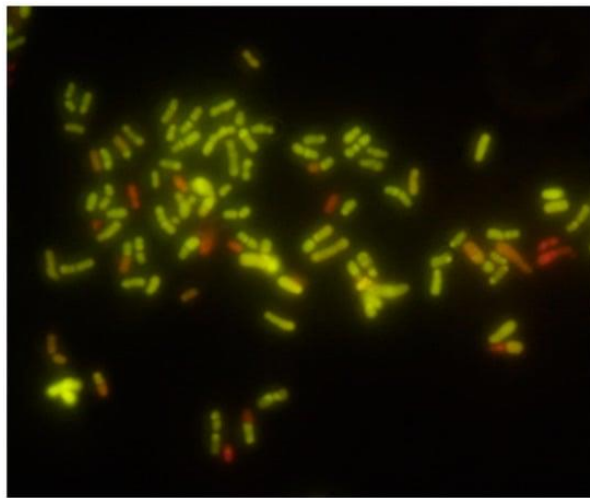


Рисунок 1.1 – Препарат *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* INL1 під флуоресцентною мікроскопією (збільшення $\times 1000$) після фарбування флуоресцентним зондом життєздатності клітин: живі клітини забарвлені зеленим кольором, а нежиттєздатні — жовтогарячим і червоним; культуру штаму витримували протягом ночі (18 годин, 37 °C, анаеробіоз) фарбували LIVE/DEAD® BacLight™ [18].

Тому нещодавно, в 2021 році, нововведеним терміном «постбіотик» зайнялась Інтернаціональна наукова асоціація з питань пробіотиків і пребіотиків (ISAPP), визначивши його як «препарат із неживих мікроорганізмів та/або їх компонентів, який приносить позитивний ефект для здоров'я господаря», тож питання часу коли даний термін укоріниться та стане загальновживаним [18, 19].

А «синбіотик» є препаратом комбінації пробіотичного компонента з пребіотичним (іноді й постбіотичним) з метою посилення позитивного ефекту продукту на організм(рис. 1.2) [17, 20].



Рисунок 1.2 – Схема заємовз'язку та головних функцій понять: «пробіотик», «пребіотик», «постбіотик» і «синбіотик» [17, 21].

В розробці пробіотичних засобів здійснюється строгий відбір мікробних штамів за рядом параметрів, які узагальнено можна звести до таких:

1. безпечність штамів для цільових макроорганізмів, призначених для включення до складу пробіотиків;
2. антагоністичні властивості відносно патогенної та умовно-патогенної мікрофлори;
3. резистентність до травних інгбіторів: лізоциму слини, шлункового соку і його травних ферментів (пепсин), травних ферментів підшлункової залози (ліпази) та жовчних кислот;
4. адгезивні властивості та колонізаційна резистентність;
5. антибіотикорезистентність;

6. питома швидкість росту пробіотичних культур висока в порівнянні з коменсальною мікрофлорою, що забезпечує швидше освоєння живильного субстрату та підвищує продуктивність клітин пробіотичних штамів;
7. технологічна придатність штаму у виробництві (стабільність під час культивування і подальших етапів технологічного процесу);
8. імуногенний та імономодулюючий ефект пробіотичного препарату [14].

1.3 Класифікація пробіотичних препаратів та продуктів для відновлення нормофлори

Пробіотичні препарати можуть диференціювати за рядом критеріїв:

- за формою випуску: рідкі; сухі препарати [27].
- за кількістю наявних штамів: монопробіотики – отримані на основі одного штаму чи виду мікроорганізмів; асоційовані пробіотики – містять від двох до тридцяти штамів.
- за кінцевим споживачем: гетеропробіотики – пробіотики, що призначаються широкому колу макроорганізмів (людина, тварини); гомопробіотики – пробіотики, що назначають залежно від видової належності свого хазяїна, від біоматеріалу якого найчастіше були виділені для представників того самого виду; аутопробіотики –пробіотики, які містять аутоштами або аутоасоціації штамів нормальної мікрофлори, попередньо ізольованих від конкретної особи, тобто призначені для індивідуальної корекції мікробіому певної особи(ни) [3,8].
- за систематичним положенням:
 1. молочнокислі бактерії (лактобацили (*Lactobacillus plantarum*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. amylovorus*, *L. salivarius*));
 2. біфідобактерії (*Bifidobacterium animalis*, *B. infantis*, *B. thermophilus*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*);
 3. лейкоστοки;
 4. педіококи;
 5. пропіоновокислі бактерії, аерококи, стрепто- та ентерококи;

6. гриби і дріжджі зокрема (*Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*);

7. інші типи бактерій (*E. coli* M-17, *B. subtilis*, *B. laterosporus*, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. megaterium*) [8,14].

Також серед пробіотиків виділяють 6 поколінь:

- I. монокомпонентні препарати –ліофілізат живих монокультур мікроорганізмів-представників нормальної мікрофлори кишечника (лактобактерин, колибактерин, біфідумбактерин, ацилакт).
- II. симбіотики – комбінація штамів з 2–4 компонентів живих МКБ з іншими представниками природної мікрофлори (біфідобактерії), що дає змогу забезпечити як замісну, так і конкурентну дію до патогеної флори (лінекс, біфіформ, капсули йогурту).
- III. пребіотики і комбінаційні препарати –харчові неперетравні добавки або непатогенні, проте нетипові для нормофлори спороутворювальні монокультури, зокрема дріжджі *Saccharomyces boulardii*, клінічна дія яких пов'язана з антагонізмом до агресивної мікрофлори кишківнику (лактолоза, інулін-нутрімед, ентерол 250, бактисубтил, біоспорин, А-бактерин, флонівін БС, аеробакт).
- IV. синбіотики –комбінація пробіотиків і пребіотиків (біфілакт-екстра, екстралакт, вітабаланс 3000).
- V. рекомбінантні пробіотики – модифіковані пробіотичні штами за допомогою генетичної інженерії штамів (субалін).
- VI. полікомпонентні комбіновані препарати або мультипробіотики – багатощамові пробіотичні препарати нового покоління (симбітер та симбітер-2)[3,8, 9, 14].

Для пребіотичних компонентів вченим Б.А. Шендеровим з іншими співавторами запропоновано поділити їх на такі групи:

- спирти і моносахариди (ксилобіоза, ксиліт, рафіноза, мелібіоза, сорбіт);

- олігосахариди (лактоза, соєві олігосахариди, латітололігосахариди, галактоолігосахариди, фруктоолігосахариди, ізомальтоолігосахариди, діксилоолігосахариди, лацитол);
- полісахариди (пектини, інουλін, хітозан, β -глюкани, пулулан, декстрин);
- амінокислоти (аргінін, глютамінова кислота, валін);
- пептиди (молочні або соєві);
- ферменти (протеази сахароміцетів, β -мікробні галактозидази);
- ненасичені жирні кислоти (ейкозопентаєнова кислота);
- органічні кислоти (лимонна, оцтова, пропіонова);
- антиоксиданти (вітаміни С, Е, А, глутатіон, убіхінол, солі селену α -, β -каротини й інші каротиноїди)
- мікробні та рослинні екстракти (дріжджовий, картопляний, кукурудзяний, рисовий, морквяний, гарбузовий, часниковий)
- інші (пара-аміно-метил-бензойна кислота (ПАМБА), крохмальна патока, глюконова кислота, лізоцим, лактоферин, лецитин, лектини різноманітного походження, тощо) [3, 8].

Постбіотики класифікуються подібно до пребіотиків на основі їх елементарного складу як:

- вуглеводи (тейхоеві кислоти та багаті галактозою полісахариди);
- білки (молекула р40, р75, лактоцепін);
- ліпіди (бутират, ацетат, пропіонат, лактат, плазмалоген, похідний від диметилацетилу);
- вітаміни (вітаміни групи В);
- органічні кислоти (3-фенілочна кислота та пропіонова);
- інші складні молекули (ліпотейхоеві кислоти, муропептиди, похідні від пептидогліканів) [14].

1.4 Систематичне положення *Streptococcus thermophilus*

На цей час таксономічне положення *Streptococcus (salivarius subsp.) thermophilus* визначають таким чином(рис.1.5):

Таблиця 1 – Систематичне положення *Streptococcus (salivarius subsp.) thermophilus* [29, 35].

Домен	Bacteria
Відділ	Bacillota/ Firmicutes
Клас	Bacilli
Порядок	Lactobacillales
Родина	Streptococcaceae
Рід	<i>Streptococcus</i>
Вид	<i>Streptococcus (salivarius subsp.) thermophilus</i>

Слово «streptococcus» походить від грецького «streptos» — скручений в ланцюжок – і «kokkos» – зерно, і вперше цей термін був використаний у 1874 році Білльротом як дескриптор кокоїдних бактерій, що утворюють ланцюжки, які зазвичай виявлялись в ранах і виділення з тіл тварин. А Розенбах у 1884 році вперше застосував родову назву *Streptococcus* в описі ланцюгоутворювального кока, виділеного з гнійних уражень у людини. Він дав цій бактерії видове позначення *Streptococcus pyogenes*. Згодом рід *Streptococcus* був перегрупований у 4 основні групи: гнійні, оральні, фекальні та молочні; *Streptococcus thermophilus*, колись віднесений до групи *viridans* (оральні), тепер включений до групи *lactic* (молочні) або наводиться іноді окремо як некласифікований [31, 32].

Streptococcus thermophilus має багато спільних фенотипових і генетичних ознак з іншими молочнокислими бактеріями, але відношення їх до монофілетичної групи є доволі складним і спірним завданням навіть на цей час. Таксономія *Streptococcus thermophilus* протягом історії кілька разів коригувалась і змінювалась, що ускладнювало регулювання цього виду в ферментованих продуктах. *Streptococcus thermophilus*, описаний вперше Orla-Jensen в 1919 і *Streptococcus salivarius*, виділений раніше в в 1906 були схвалені для генетичного порівняння та затверджені в списках Міжнародного журналу систематичної та еволюційної

мікробіології (IJSEM) у 1980 році. Згодом у 1984 році *Streptococcus thermophilus* був перекласифікований як *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* на основі методу гібридизації ДНК-ДНК, оскільки було виявлена значна подібність з вище згаданим видом бактерії, поширеної в ротовій порожнині і у верхніх дихальних шляхах, і термофільний стрептокок також був схвалений у списку перевірки IJSEM № 15 у 1984 році. Прийняття цієї нової номенклатури мікробіологічною спільнотою, включаючи промислових мікробіологів, які займаються маркетингом молочних заквасок, було досить повільним. Були деякі, хто фактично опирався цій зміні назви, виходячи з того, що ці види займають зовсім різні екологічні ніші та мають ряд фізіологічних відмінностей. Проте згодом, в 1987 його було знову відновлено до видового рівня після більш детальних досліджень гібридизації ДНК. Хоча обидві видові назви досі є вживаними.

У переліку MCF Міжнародної молочної федерації (IDF) таксономія *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* використовувалася в Бюлетені IDF № 455/2012 (IDF, 2012), IDF № 495/2018 (IDF, 2018), IDF № 514/2022 (IDF, 2022). Нещодавно експерти IDF додатково проаналізували генетичну спорідненість між *Streptococcus thermophilus* і *Streptococcus salivarius* на основі гена 16S рРНК, гена домашнього господарства *hcsA*, філогенії основних генів, середньої ідентичності нуклеотидів (ANI) і цифрової гібридизації ДНК-ДНК (dDDH). Результати сучасного аналізу підтверджують те, що *Streptococcus thermophilus* і *Streptococcus salivarius* є двома різними видами [25, 26, 30].

Він також є унікальним серед інших патогенних стрептококів тим, що не має специфічного для роду антигену Ленсфілда, через що і не є гемолітичним [25, 26, 31].

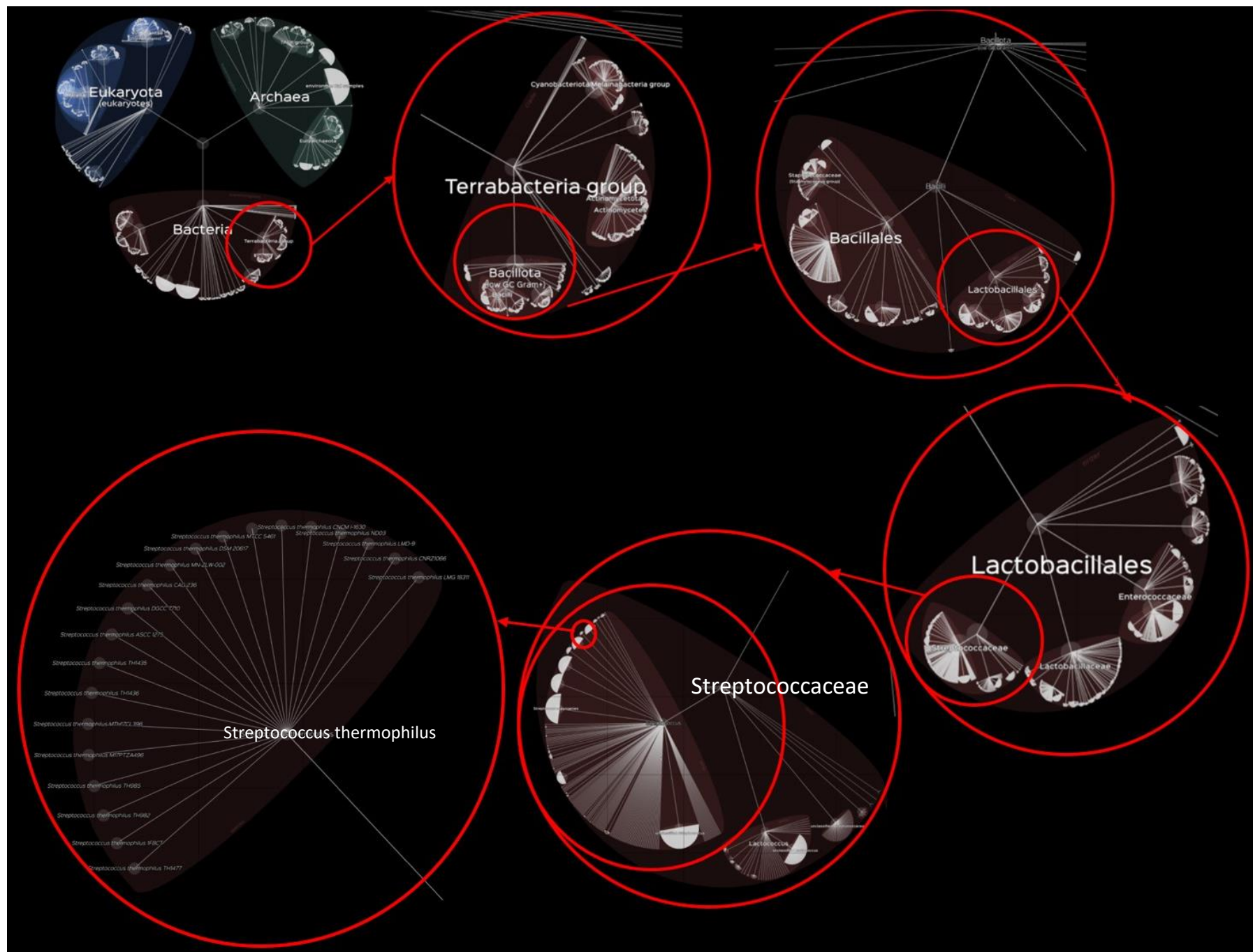


Рисунок 1.5 – Таксономічна карта *Streptococcus thermophilus* [27].

1.5 Поширення *Streptococcus thermophilus* в екосистемі

Молочнокислі стрептококи та лактококи є доволі поширеними в екосистемі, життєздатність яких спостерігалась на багатьох субстратах: в ґрунті, на рослинах (квіткові суцвіття, листки, плоди, ризосфера), в кормах тваринництва, молочних і м'ясних продуктах, кишечнику тварин і людини. Практичне підтвердження наявності на рослинах *S. thermophilus*

Термофільний стрептокок, стійкий до короткотривалої невисокотемпературної пастеризації, розповсюджується часто на обладнанні для доїння, а також на ємностях, в яких зберігається або з якими контактують молочні продукти, і власне найбільше у сирому молоці та кисломолочних продуктах [22].

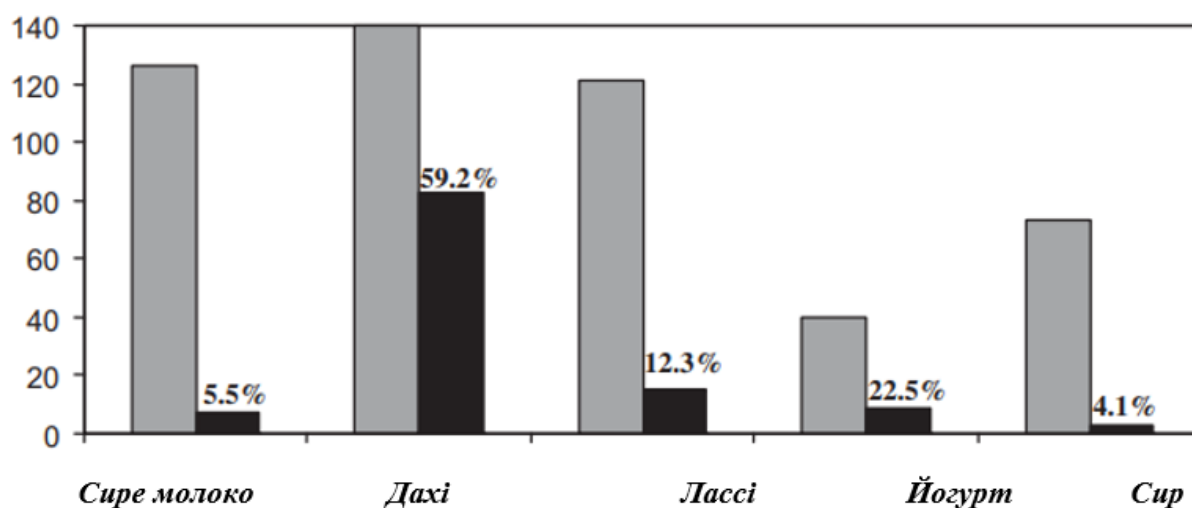


Рисунок 1.6 – Частота виявлення ізолятів *S. thermophilus* у молоці та молочних продуктах у домашніх умовах на Індійському субконтиненті: всього колоній – ■ (позначено сірим), *S. thermophilus* – ■ (позначено чорним) [32].

1.6 Морфологічні ознаки *Streptococcus thermophilus*

За загальним визначенням трьохтомної довідникової Encyclopedia of Food Microbiology 1999 року: *Streptococcus thermophilus* — грампозитивна бактерія (виражена пептидогліканова стінка) з округлими або овоїдними клітинами діаметром 0,7–0,9 мкм, яка є природнім біонтом сирого молока в багатьох частинах світу. Слід зазначити, що для них характерний незначний поліморфізм, тобто у межах виду форма клітин (від строго шароподібних до овальної) і розміри (від 0,5

мкм до 1 мкм) можуть коливатись (рис.1.7). Нерухливі, не утворюють ні ендоспор, ні капсул [25, 34].

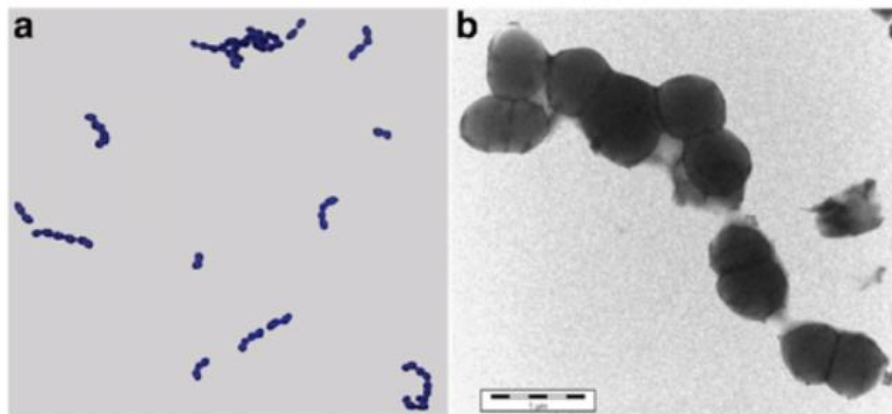


Рисунок 1.7 – Мікрофотографії *S. thermophilus*: а) на оптичному мікроскопі, попередньо пофарбованих за Грамом (за збільшення $\times 1000$); б) на трансмісійному електронному мікроскопі, клітини пофарбовані за допомогою 10% (мас./об.) РТА (масштабна шкала відповідає 1 мкм).

Даний вид коків утворюють пари з двох зв'язаних клітин (диплококи) на початку розвитку та типові ланцюжки та зчлени з десятків, з'єднаних послідовно коків, звідки й має походження їх назва (з грец. στρεπτο — «скручений у ланцюжок»). На контрасті з іншими лактококами формує дещо більші і довші ланцюжки з кулястих клітин, що дає змогу їх розрізнити мікроскопіюванням [22].

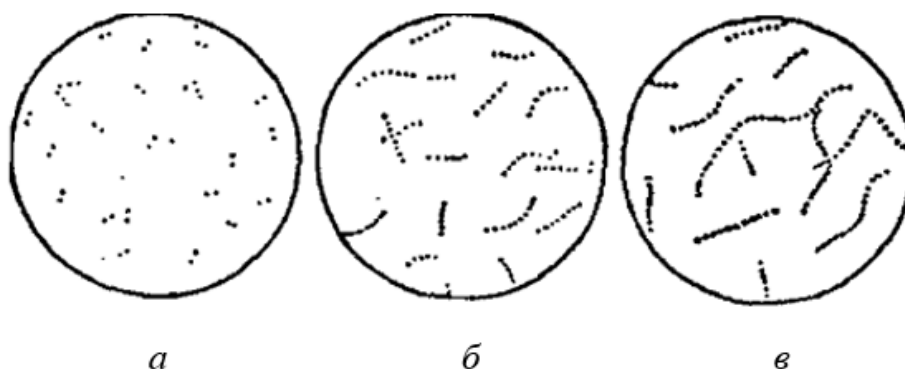


Рисунок 1.8 – Молочнокислі лактококи: а – *Lactococ. lactis*; б – *Lactococ.cremoris*; в – *St.thermophilus* [22].

1.7 Культуральні ознаки *Streptococcus thermophilus*

Факультативний анаероб, гомоферментативний – кінцевим метаболітом, в основному є молочна кислота. Наприкінці рН культивованого бульйону сягає 4,0-4,5. Але подекуди стверджують про проміжне положення термофільного

стрептококу між гомо- та гетероферментативними бактеріями, оскільки він може продукувати ацетоїн, як додатковий метаболіт, та деякі штами здатні до синтезу діацетилу.

Попри назву «термофіл» оптимум температурного режиму для *Streptococcus thermophilus* є 37-45 °С, гранична – 15-52 °С, також витримує короткотривалу низькотермічну пастеризацію (протягом 30 хвилин за температури 60°C та впродовж 15 хвилин за 75°C), тому часто залишається після пастеризації у молоці.

Відібрані штами швидко сквашують молоко тривалість ферментації займає 3,5-7 год. Чиста культура згортає молоко, утворюючи рівний щільний коагулят сметаноподібної чи в'язкої консистенції з характерним вершковим запахом і смаком, приблизно за 3,5-6 годин з граничною кислотністю 110-120°Т.

Гранична кислотність сквашеного за допомогою *Streptococcus thermophilus* молока складає 110-120°Т, а граничні рН росту: 4,5-8,0. Бактерія повністю припиняє свій ріст при 10°C і рН 9,6. Цей вид також чутливий до солі, максимальна допустима концентрація NaCl складає 2-6,5% [22, 25].

Серед *Streptococcus thermophilus* виділяють слизоутворюючі штами, що в молоці формують драглисті, більш рідкі згустки, та неслизоутворюючі, які утворюють щільний згусток, подекуди з незначним відділенням сироватки [25].

На твердих живильних середовищах *Streptococcus thermophilus* утворює кремово-білі поверхневі колонії діаметром 0,5–3,0 мм із випуклою зернистою структурою та глибинні «лодочки», рідко з відростками (рис.1.9) [22, 38].

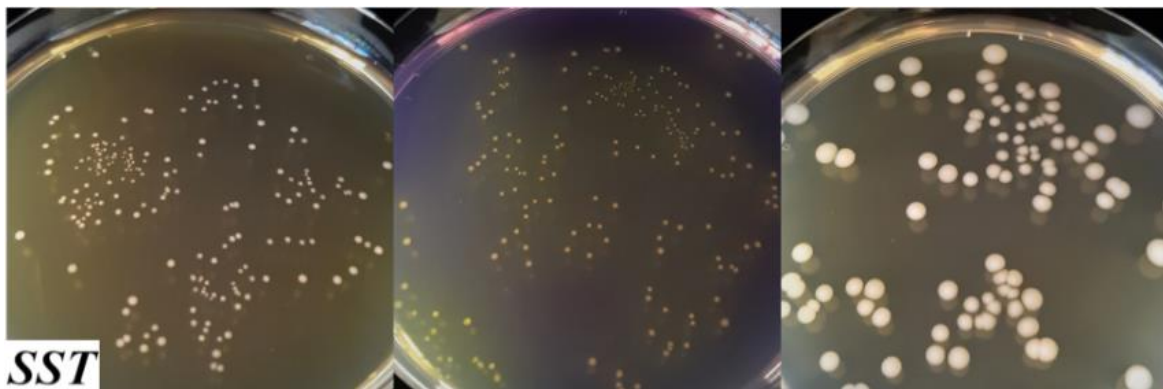


Рисунок 1.9 – Типова морфологія колоній *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, вирощених на різних типах середовищ: M17 (ліворуч), ST (посередині) і SPY (праворуч) [37].

1.8 Фізіолого-біохімічні ознаки *Streptococcus thermophilus*

Для промислових виробництв такі параметри термофільного стрептококу як швидкість бродіння та підкислення молока мають вирішальне значення та залежать від їх здатності використовувати цукри з середовища. Не менш важливим є те, що вуглеводний обмін *S. thermophilus* напряду пов'язаний зі здатністю колонізації травного тракту, що було підтверджено в дослідженнях на гнітобіотичних лабораторних щурах-гнотобіонтах[39].

Вуглеводи є основним джерелом енергії для росту бактерій та можуть метаболізуватися молочнокислими бактеріями через гомоферментативне або гетероферментативне бродіння. *S. thermophilus* ферментує цукри за допомогою шляху Ембдена-Мейєргофа-Парнасадо для пірувату, який перетворюється у молочну кислоту лактатдегідрогеназою. Гетероферментативний метаболізм характеризується також виробленням форміату, ацетату, етанолу та/або CO₂, окрім лактату. Гомолактичний метаболізм може змінитися на змішаний за певних умов: обмеження в доступі до вуглецю або у надлишку вуглеводів. Для всього виду характерний метаболізм глюкози, лактози та фруктози, тоді як утилізація галактози, манози, сахарози, мальтози, мелібіози та рафінози залежить від штаму.

S. thermophilus у споживанні надає перевагу лактозі над глюкозою як основному джерелу вуглецю та енергії. *S. thermophilus* швидко перетворює лактозу на молочну кислоту через гліколітичні шляхи, такі як оцтова кислота, ацетальдегід, мурашина кислота та діацетил. Стартові лактококові штами транспортують лактозу в клітину за допомогою проникності лактозопермеази (LacS) та фосфоенолпіруват-залежної фосфотрансферазної системи (PEP-PTS). Транспорт та гідроліз лактози контролюється опероном *lac*, під час росту на лактозі індукується його транскрипція. Він кодує лактозопермеазу (LacS) і цитоплазматичну β-галактозидазу (LacZ), завдяки останній відбувається розщеплення лактози на глюкозу та галактозу. Глюкоза фосфорилується глюкокіназою до глюкозо-6-фосфату, а потім утилізується шляхом гліколізу. Галактоза перетворюється на глюкозо-1-фосфат за допомогою шляху Лелуара, який складається з регулятора GalR, галактокінази (GalK), галактозо-1-фосфатуридилтрансферази (GalT), UDP-

глюкозо-4-епімерази (GalE) і галактосемутаротаза (GalM). Було виявлено, що вони організовані в кластері генів *galRKTEM* [39, 40].

Слід зазначити, що крім зброджування лактози, розщеплення галактози є бажаною фенотипічною ознакою для промислових штамів, оскільки надлишок галактози зумовлює нагромадження небажаних молочнокислих бактерій, що негативно впливає як на вузуальні, органолептичні, так і технологічні показники.

Також використання термофільними стрептококами галактози приводить до утворення нуклеотидних цукрів, які є попередниками екзополісахаридів (ЕПС). Слабовиражений метаболізм галактози може бути лімітуючим фактором виробництва ЕПС.

Промотор *gal* відіграє ключову роль у формуванні галактозних метаболічних шляхів *S. thermophilus*. Було виявлено, що точкові мутації в промоторній області *gal*-оперону призводять до низького рівня експресії ферментів шляху Лелуара в розщепленні галактози. Низький рівень активності галактокінази (GalK) у галактозонегативних штамів *S. thermophilus*, ймовірно, зумовлений слабкою трансляцією *galK*-мРНК, пов'язаною з мутаціями в ділянці зв'язування рибосом.

Вуглеводний обмін *S. thermophilus* тісно пов'язаний з виробництвом позаклітинних полісахаридів у вигляді капсульних полісахаридів (КПС) або вище згаданих екзополісахаридів (ЕПС). Перші знаходяться на поверхні бактеріальної клітини та формують захисну капсулу, другі ж вивільняються у середовище культивування під час росту бактерій і не прикріплюються до клітини.

Синтез ЕПС характерний для всіх штамів *S. thermophilus*. Екзополісахариди є природніми біоагусниками, що надають типову в'язкість, текстуру та смак, а також запобігають синерезису (відділення сироватки) ферментованих молочних продуктів. ЕПС представляють собою довголанцюгові полісахариди, що складаються з розгалужених, повторюваних одиниць моносахаридів, дисахаридів або похідних цукрів. Розрізняють гомополісахариди, які складаються з одного типу сахариду, і гетерополісахариди з повторюваними одиницями різнопохідних цукрів. Більшість штамів *S. thermophilus* синтезують гетерополісахариди, що

складаються переважно з галактози, глюкози та рамнози в різних співвідношеннях, також виявляють і ацетил-галактозамін, фукозу та ацетильовану галактозу.

Біосинтез ЕПС регулюється та визначається кластером генів *eps* (участь у регуляції виробництва ЕПС – *epsA*, *epsB*; визначення довжини ланцюга ЕПС – *epsC*, *epsD*; утворення повторюваних одиниць – *epsE*, *epsF*, *epsG*, *epsH* та *epsI*; полімеризація та виведення ЕПС – *epsK*, *epsL* та *epsM*). Якщо біосинтез ЕПС в *L. lactis* пов'язаний з плазмідами, то в *S. thermophilus* всі відповідальні гени за це розташовані в хромосомі.

На здатність *S. thermophilus* продукувати ЕПС впливають два фактори: вибраний штам та умови культивування, такі як температура, джерела вуглецю, джерела азоту, рН. Загалом, кількість ЕПС, що виробляється *S. thermophilus*, знаходиться на відносно низькому рівні: від 50 до 400 мг/л у молочному середовищі, при цьому молекулярна маса ЕПС становить $4-5 \times 10^5$ Да [39, 41]. Детальну схему метаболізму лактози, галактози, фруктози та сахарози і біосинтезу ЕПС термофільного стрептококу наведено на рис.1.10.

Ріст молочнокислих бактерій обмежується низьким вмістом вільних амінокислот у молоці, що натомість має велику кількість білків. Тому, щоб задовольнити потребу в джерелах азоту метаболітична система кожної МКБ адаптується індивідуально для гідролізу білків, щоб забезпечити клітини основними амінокислотами. Протеолітична система складається із: зовнішньої клітинозакріпленої системи протеаз, здатної до первинного гідролізу казеїну; системи імпортування в клітину отриманих амінокислот і пептидів, та набору ендогенних пептидаз для внутрішньоклітинного розкладу отриманих пептидів.

Тип протеїнази та протеолітична активність залежно від МКБ, наразі встановлено п'ять типів позаклітинних протеїназ: PrtP (*L. paracasei*, *L. lactis*), PrtH (*Lactobacillus helveticus*), PrtR (*Lactobacillus rhamnosus*), PrtS (*S. thermophilus*), PrtB (*L. bulgaricus*). Протеолітична система *S. thermophilus* включає більше 20 протеолітичних ферментів, включаючи: клітинно-закріплену протеїназу PrtS, ендопептидази (PepO, PepF), дипептидази (PepD, PepV), трипептидазу PeoT та пролінові пептидази (PeoX, PepQ, PeoP).

Окрім того, існують значні відмінності в протеолітичній активності різних штамів в межах одного виду. Серед 30 протестованих штамів *S. thermophilus*: 12 демонстрували активність протеїнази клітинної оболонки (PrtS⁺), 3 демонстрували незначну активність PrtS (PrtS^{+/-}), а 8 штамів не мали протеїназної активності, хоча містили відповідний ген *prtS*. Існує припущення, що відсутність активності PrtS у штамів PrtS⁻, ймовірно, є результатом зміни регуляції *prtS*. Попередні дослідження показали, що існує тісний зв'язок між високою здатністю підкислення та високою протеолітичною активністю штамів *S. thermophilus*.

Типи послідовностей міжгенних спейсерів (*ITS-фрагментів*) 16S–23S були пов'язані з однаковими фенотиповими властивостями. На даний момент у *S. thermophilus* виявлено чотири типи, включаючи *ITS-St-I*, *ITS-St-II*, *ITS-St-III* та *ITS-St-IV* [39].

Протеолітична система розділена на 3 послідовні етапи. Першим кроком є розщеплення білків протеїназою PrtS, яка закріплюється на клітинній стінці специфічним ферментом — сортазою А (SrtA), та активізується за відсутності глутаміну та метіоніну. Другим етапом є транспорт утворених пептидів, інтегрованих системою Dpp з 5 білками (DppA, DppB, DppC, DppD і DppE), які регулюються АТФ і утворенням протонів (NAD⁺); та транспорт олігопептидів, що здійснюється системою Ami, інтегрованою в систему оперонів із 7 білків (Ami1, Ami2, Ami3, AmiC, AmiD, AmiE та AmiF), які регулюються АТФ і активуються присутністю сірководневої амінокислоти. Транскрипційний регуляторний білок ComR, пов'язаний із згаданою системою Ami, регулюється відповідним пептидом ComS. Нарешті, третій крок – розрізання пептидів 14 типами внутрішньоклітинних пептидаз, з яких 5: PepO, PepS, PepX, PepN і PepC, відрізняються характеристиками та специфічністю від інших молочнокислих бактерій [39, 42]. Детальну схему біохімічних перетворень протеолітичної системи термофільного стрептококу наведено на рис. 1.11.

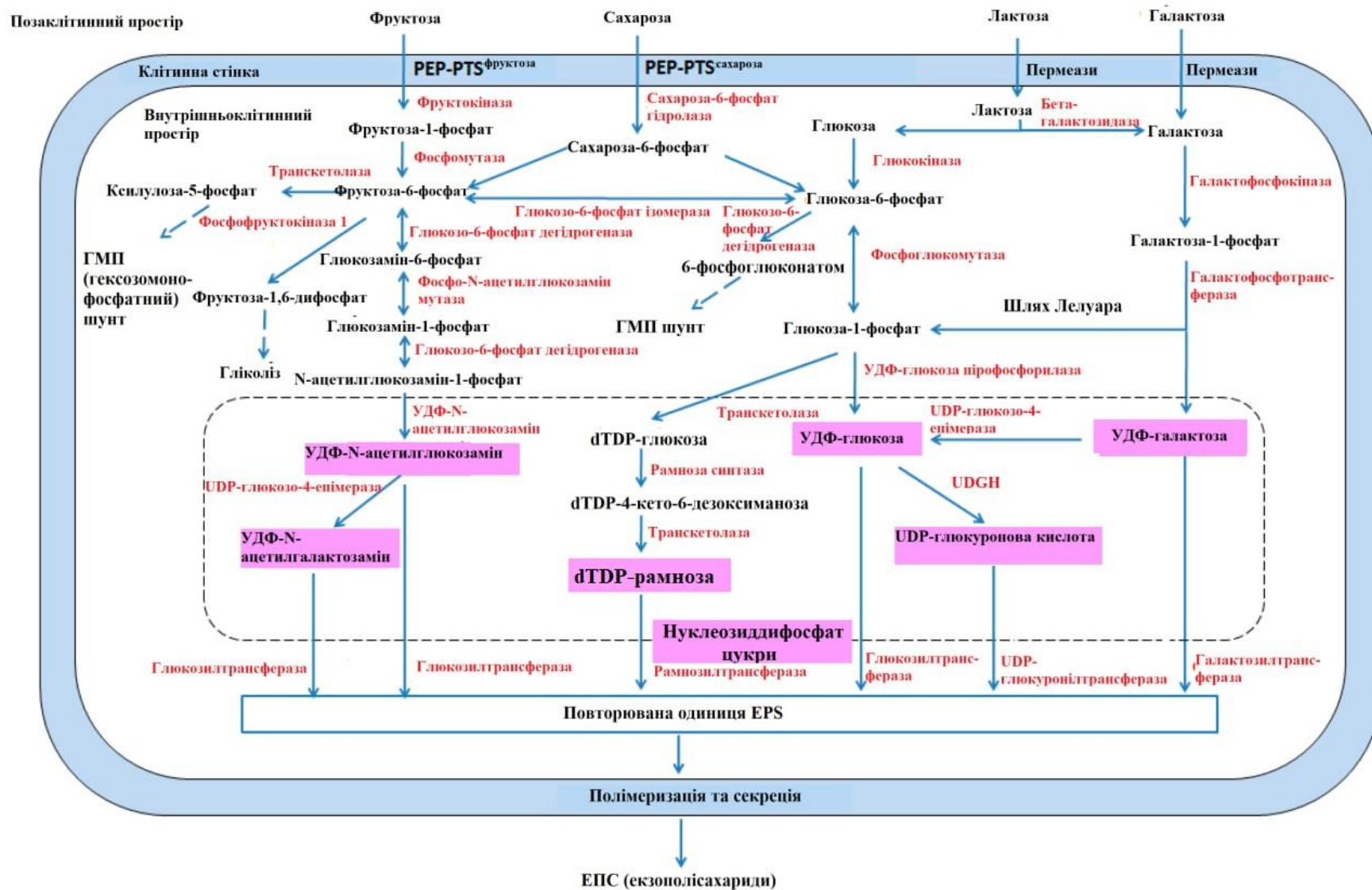


Рисунок 1.10 – Шляхи метаболізму цукрів та біосинтезу екзополісахаридів (ЕПС) у *S. thermophilus* (сині стрілки вказують на реакцію; подвійна стрілка вказує на двонаправлену реакцію; пунктирні стрілки вказують на часткову реакцію; слова з червоним шрифтом позначають ферменти; слова з рожевим кольором тла вказують на цукри NDP (нуклеозиддифосфат)) [39].

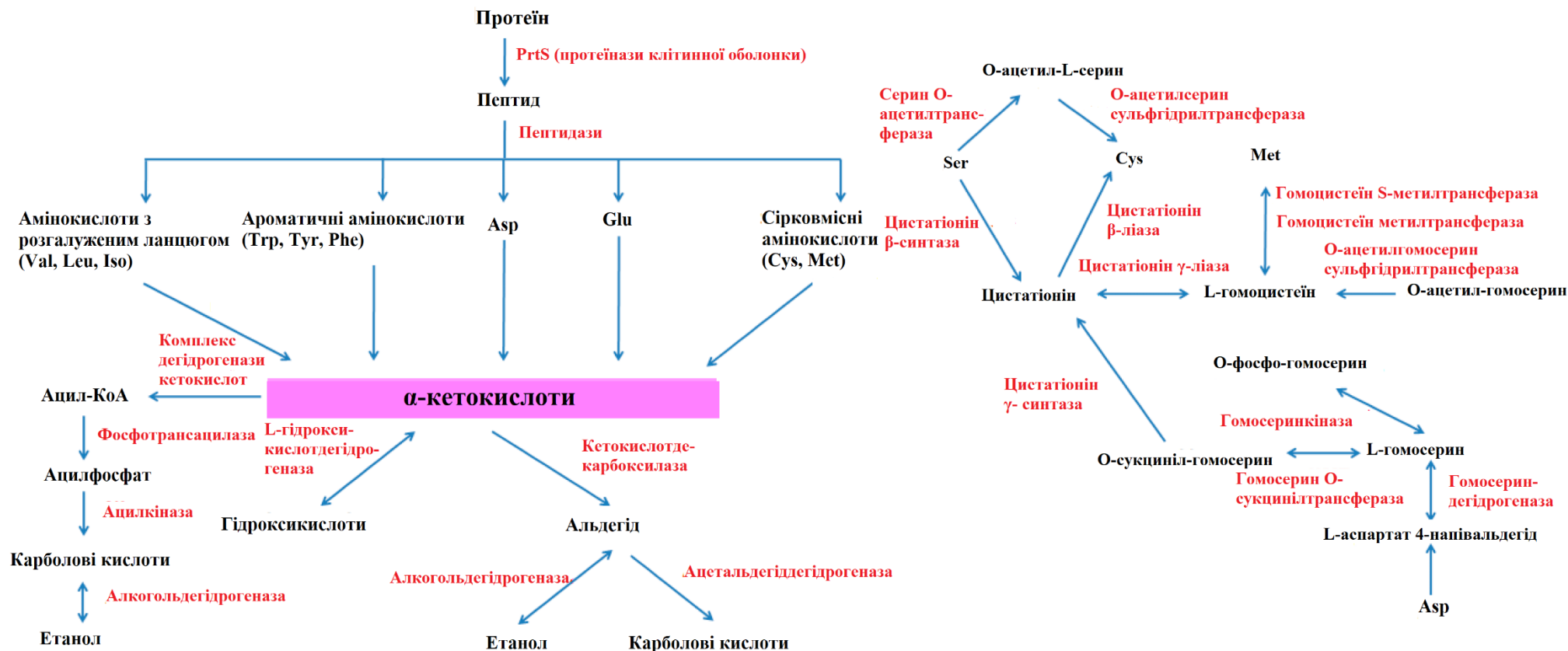


Рисунок 1.11 – Протеолітична система та метаболізм амінокислот у *S. thermophilus* (сині стрілки вказують на реакцію; подвійна стрілка вказує на двонаправлену реакцію; слова з червоним шрифтом позначають задіяні ферменти; скорочення назв амінокислот: Leu – лейцин, Iso – ізолейцин, Trp – триптофан, Tyr – тирозин, Phe – фенілаланін, Asp – аспарагінова кислота, Glu – глутамінова кислота, Cys – цистеїн, Met – метіонін, Ser – серин) [39].

1.9 Безпека застосування *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus, маючи близько 1900 кодуєчих послідовностей в однокільцевій хромосомі, з яких 80% є загальнофенотиповими для роду, досі є філогенетично близьким до патогенних та умовно-коменсальних стрептококів. Проте формування і еволюція даного виду для адаптації до чітко визначеної та вузької екологічної ніші – молочного середовища, відбувалась головним чином за рахунок горизонтального переносу генів та природної конкуренції з штамами молочнокислих бактерій, що привело до стабілізації структури геному.

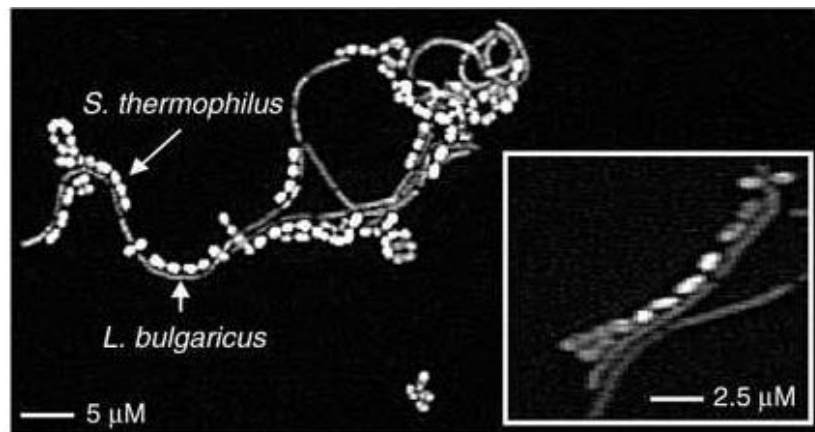


Рисунок 1.12 – Синбіотична адгезія *S. thermophilus* і *L. bulgaricus* у рідкому бульйоні[43].

Завдяки горизонтальним переносам відбувається інтеграція низки важливих промислових фенотипових ознак, таких як виробництво бактеріоцину (*blp*, *lab*), системи рестрикції–модифікації або толерантність до кисню. Було виявлено, що ділянка розміром всього 17 кб, що містить вставні копії-послідовності (*IS*-копії) та мозаїку фрагментів, більш ніж на 90% ідентична ДНК *Lb. bulgaricus*, *L. cremoris* і *L. lactis* (рис. 1.12, 1.13). Ця область містить гени, що кодуєть транспозази, білки холодового шоку та білки, що беруть участь у біосинтезі метіоніну. *S. thermophilus* має потенціал для запозичення нових генів, що кодуєть нешкідливі фенотипові ознаки та походять від інших видів молочних мікроорганізмів, які вважаються безпечними, а перенесення генів між *S. thermophilus* та іншими комменсальними стрептококами в дослідженнях нині не спостерігалось.

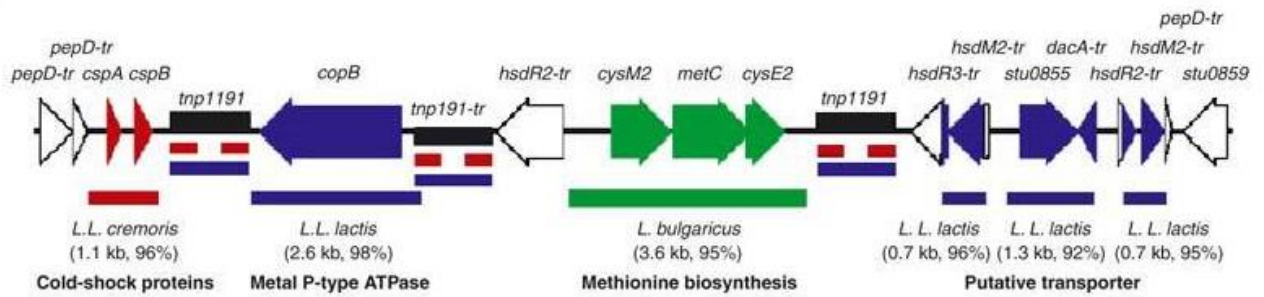


Рисунок 1.13 – Схематичне зображення мозаїчної області латерального переносу гена, що охоплює фрагменти ДНК з більш ніж 90% ідентичністю ДНК з *Lactococcus lactis subsp.lactis* (блакитний), *Lactococcus lactis subsp.cremoris* (червоний) і *Lactobacillus bulgaricus* (зелений) [43].

Беручи до уваги передбачувану природню швидкість росту та мутацій від 1 до 10 поділів на день, загальний предок для термофільного стрептококу та інших вірулентних видів існував приблизно 10^7 поколінь тому назад, тобто за 3–30 тисяч років, що відповідає тривалості молочної діяльності людини, що почалась, як вважають, близько 7000 років тому [39, 44].

Тож в процесі цього розвитку гени вірулентності та інші неактивні гени поступово деградували і зникали за відсутності потреби у разі стабільного перебування в молочному середовищі: 10% від загального геному *S. thermophilus* не функціонують через зміщення рамки зчитування, нейтральні мутації, делеції або укорочення, які загалом називаються псевдогенами. Понад чверть пов'язаних з вірулентністю генів відсутні у *S. thermophilus*, проте були наявні як у *S. pyogenes*, так і в *S. pneumoniae* : 25 з 92 (використовуючи BLASTP із пороговим значенням 10–10), і майже 40% із них (9 з 25) знаходяться в областях, які є колінеарними в двох геномах. Зокрема вірулентні гени пов'язані з вуглеводним метаболізмом стрептококів (кодування *butA* (ацетоїнредуктази) і *adhE* (алкоголь-ацетальдегіддегідрогенази)), які в *S. thermophilus* були значно втрачені та мають лише 19–36% подібності з іншими видами роду. І навпаки, специфічні функціональні кластери для лактози, основного вуглеводу молока, присутній у геномі *S. thermophilus* та відсутній в інших стрептококах. Тобто всі гени

вірулентності стрептококів, які характерні для даного роду, або неактивні, або повністю відсутні у *S. thermophilus*[39, 43].

Нешкідливість *S. thermophilus* як харчового мікроорганізму підтверджена широкою та багаторічною практикою використання, тривалою історією асоціації термофільного стрептококу з МКБ у співкультурах, в ході якої стало зрозуміло що саме екологічна близькість, а не філогенетична спорідненість є необхідною умовою для латерального перенесення генів, завдяки чому в 2017 році отримав статус "Загально визнаний як безпечний" ("GRAS") від Адміністрації з питань харчових продуктів та лікарських засобів (FDA), а Європейським органом з безпеки харчових продуктів (EFSA) надано статус " Кваліфікований презумпцією безпеки" ("QPS") [44, 45].

1.10 Резистентність Streptococcus thermophilus до природніх інгібіторів шлунково-кишкового тракту

Первинне заселення кишківника мікробіомом починається ще з моменту проходження родових шляхів, а продовжується під час вигодовуванні немовляти грудним молоком або сумішами та переходу до дорослого харчування.

В одному з досліджень було оцінено бактеріальний склад молока породіль. За винятком одного зразку молока, відібраного від однієї учасниці, яка здала його лише 2 рази, замість трьох, було виділено і оцінено геномні ДНК бактерій з молока, зібраного у 3 моменти часу протягом 4-тижневого інтервалу від 16 здорових жінок (без маститу), що годують грудьми, методологія якого передбачає зменшення забруднення зразків шкірною мікрофлорою. Ділянка V1-V2 бактеріального гена 16S рРНК була ампліфікована з ДНК за допомогою універсальних праймерів, і завдяки штрих-кодуванню піросеквенування ампліконів дало приблизно 300 000 зчитувань. Щоб дослідити наявні роди бактерій, послідовності були віднесені до найімовірніших родів бактерій за допомогою байєсівського класифікатора Проєкту рибосомної бази даних (RDP). Одним з найбільш поширених родів у грудному молоці були в першу чергу *Streptococcus*, що демонструє їх високу виживаність і пристосованість до людського організму (рис.1.14) [45].

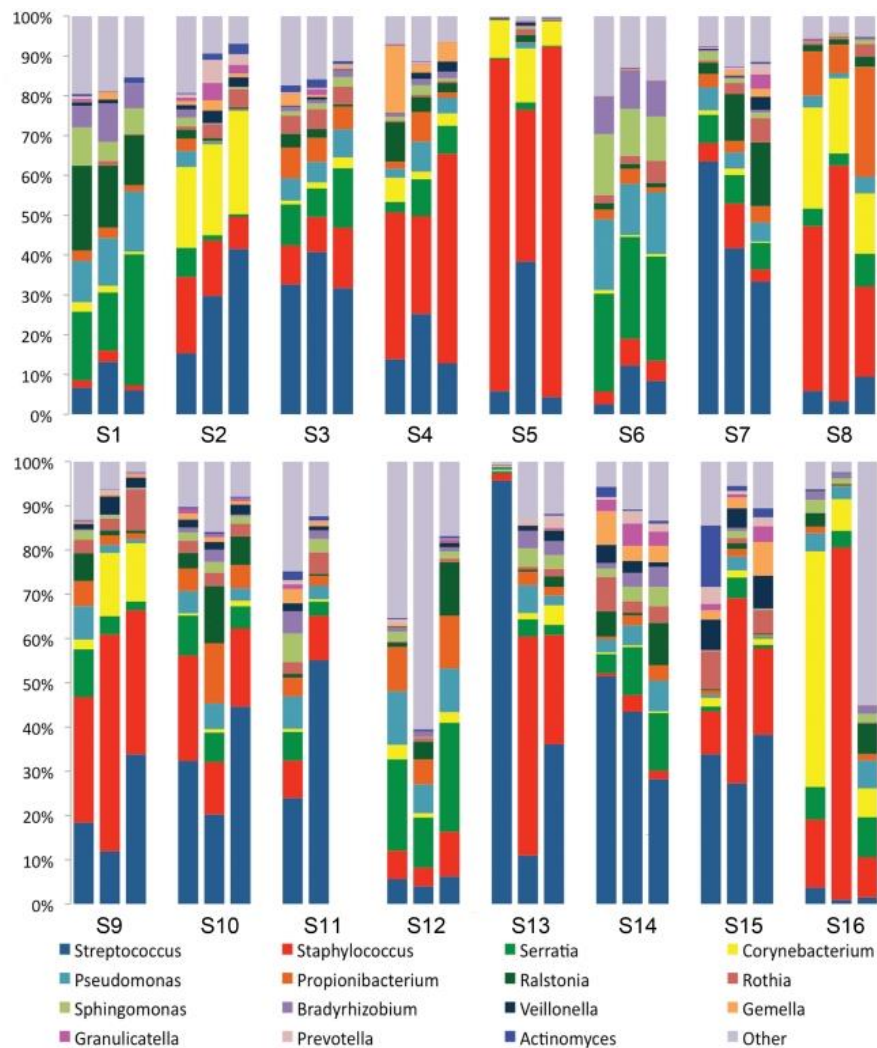


Рисунок 1.14 – Відносний склад 15 найпоширеніших родів бактерій в грудному молоці від 16 здорових породіль у 3 повторюваностях (окрім учасниці №11–2 рази)[45].

Якщо пробіотики приймають перорально, бактеріяїопиняються в несприятливих фізичних і біохімічних умовах, включаючи низький рН шлунка, емульгуючу та антимікробну дію жовчі, травні ферменти та перистальтичну елімінаціютощо.На відміну від *Bifidobacteria* та деяких *Lactobacillus*, які також використовуються у виробництві молочних продуктів, *S. thermophilus*, які були відібрані для промислового застосування, як правило, демонструють низьку здатність до виживання у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту людини (рис.1.15). Проте загальне відновлення життєздатних після проходження всього ШКТ*S. thermophilus* у фекаліях після вживання йогурту з даною закваскою продемонструвало, що досить значна кількість бактеріальних клітин може вижити

через шлунково-кишковий тракт людини: у добровольців, що споживали добову дозу $10^{11,4}$ *S. thermophilus*, який містився в йогурті, ці бактеріальні клітини якого можна було відновити з більшості зразків фекалій із загальною життєздатною кількістю від $10^{2,6}$ до $10^{6,5}$ КУО/г. Крім того, метагеномне дослідження, спрямоване на каталогізацію мікробних спільнот у зразках фекалій людини, виявило присутність ДНК *S. thermophilus* у більш ніж 90% протестованих європейців.

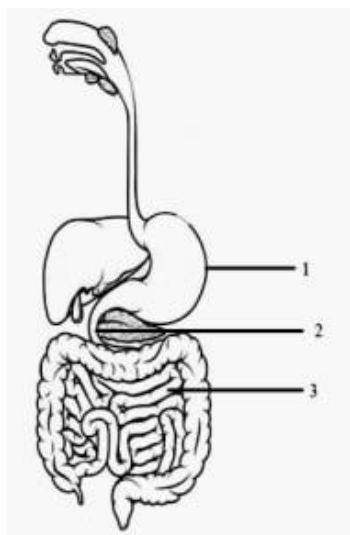


Рисунок 1.15 – Водневий показник різних відділів ШКТ: 1– шлунок (рН – 1-2); 2 – дванадцятипала кишка (рН – 5,6-7,9) ; 3 – тонкий кишечник (рН – 7,5–9) [24].

Оскільки шлунок є першим агресивним середовищем для *S. thermophilus*, важливо перевірити штами на функції, що сприяють виживанню в кислому шлунковому середовищі. Попередні дослідження, що оцінювали рівень виживаності термофільного стрептокока під впливом симуляції шлункового соку, вже показали, що кількість життєздатних клітин зазвичай знижувалася більш ніж на 2-4 десяткових логарифмічних одиниць, особливо коли значення рН було 2,5 або нижче. За іншими дослідженнями виявлено, що *S. thermophilus* не демонстрував життєздатність під час одностодінної інкубації за рН 2,0, тоді як інкубація за децю вищих значеннях рН: 2,5, 2,8 або 3,0 не давала суттєвих результатів на життєздатність.

Зазвичай експерименти з оцінки толерантності до шлункової кислоти проводять, інкубуючи бактеріальні клітини в розчинах на основі HCl у статичних умовах *in vitro*. Проте такі експериментальні аналізи не враховують ні послідовні

стресуючі фактори, яких бактерії зазнають через ШКТ, ні впливу позитивних впливів наявних харчових мас, які можуть покращити життєздатність бактерій, абсорбцію у травному середовищі. Більш реалістичного прогнозу резистентності до інгібіторів верхніх відділів ШКТ можна досягти за допомогою динамічної моделі ТІМ (шлунково-кишкової моделі TNO), яка точно моделює фізико-хімічні умови в шлунку та тонкому кишечнику людини.

Механізми відповіді на кислотний стрес (ATR) грампозитивних бактерій включають такі стратегії: експорт іонів H^+ за допомогою протонних насосів (глутаматдекарбоксилаза та F1F0 АТФаза); алкалізація позаклітинного середовища шляхом виробництва амінів за допомогою систем амінокислотних декарбоксилаз або уреаз; виробництво загальних шоківих білків або ферментів, що захищають або відновлюють протонами пошкоджені білки; функціональні зміни в складі клітинної оболонки[46].

1.11 Антагонізм *Streptococcus thermophilus* до умовно-патогенного та патогенного мікробіому

Серед всієї варіації мікробіотичної взаємодії для пробіотичних препаратів специфічними і визначальними є антагоністичні властивості (рис.116).

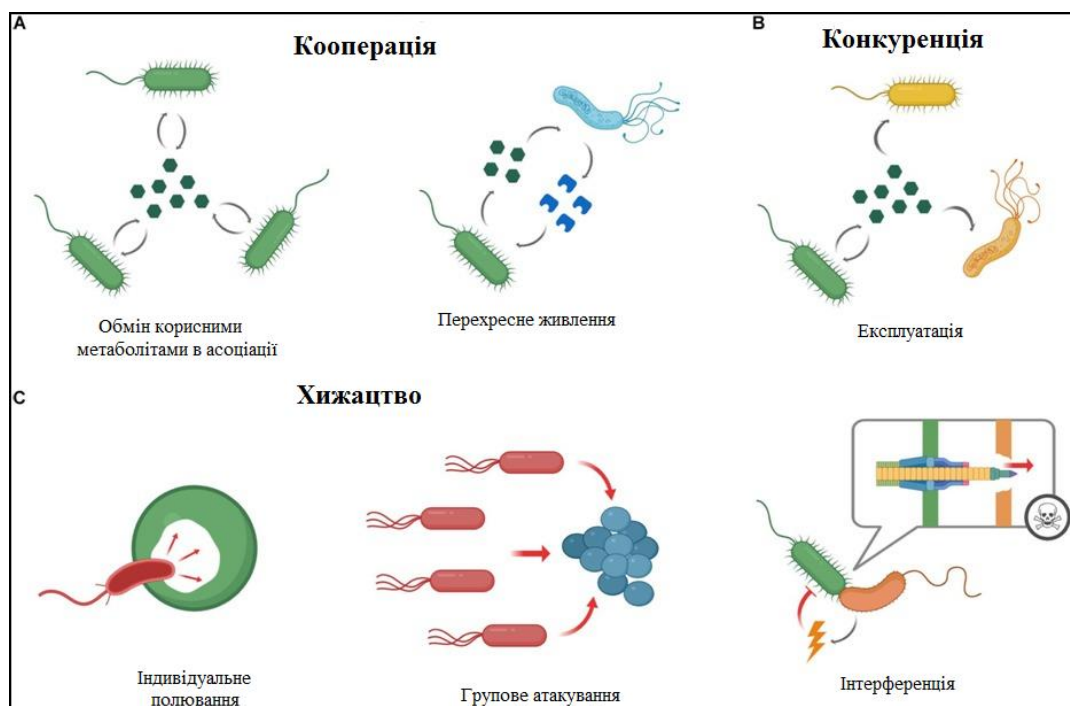


Рис. 1.16 – Види мікробіомної взаємодії [47].

Антогонізм *S. thermophilus* до умовно-патогеної флори обумовлений кількома механізмами:

1. Продукція органічних кислот та інших метаболітів – *S. thermophilus* здатен синтезувати молочну кислоту та діацетил, що мають виражену антимікробну активність проти сторонньої мікрофлори та інгібують розвиток гнилистих та патогенних бактерій, таких як: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*;
2. Продукція бактеріоцинів: специфічні білки, що виробляються *S. thermophilus* та інгібують життєдіяльність клітин інших штамів того самогороду або споріднених видів бактерій, було підтверджено в дослідженнях подібну дію на такі види: *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pediococcus acidilactici*;
3. Конкуренція за поживні речовини екологічної ніші: *S. thermophilus* ефективно конкурує з патогенами за поживні речовини та місця прикріплення на епітеліальних клітинах кишечника, що обмежує атипове розмноження та колонізацію шкідливої мікрофлори [44, 47].

1.12 Імуномодулююча активність *Streptococcus thermophilus*

Окрім вже загальновивченої регуляції термофільним стрептококом мікробіому кишківника, він має вплив на клітини вродженого імунітету, такі як макрофаги та дендритні клітини, сприяючи підвищенню їх фагоцитарної активності. Дослідження продемонстрували також, що *S. thermophilus* індукує продукцію цитокінів, таких як інтерлейкін-6 (IL-6), інтерлейкін-10 (IL-10) і фактор некрозу пухлини (TNF- α), що безпосередньо впливають на регуляцію запальної відповіді та координації імунної реакції.

Вплив на адаптивний імунітет *S. thermophilus* може модулюватися через взаємодію з В- і Т-лімфоцитами. В ряді досліджень було показано, що його присутність стимулює продукцію антитіл, що вказує на потенціал у покращенні гуморальної імунної відповіді, сприяє розвитку регуляторних Т-клітин, що відіграє

одну з ключових ролей у підтримці імунного гомеостазу та запобігання аутоімунним реакціям[48].

1.13 Біосинтетична та травна активність *Streptococcus thermophilus*

Однією з найбільш відомих та досліджених біосинтетичних функцій *S. thermophilus* є його здатність до розщеплення лактози та галактози, завдяки наявності β -галактозидази. Це особливо важливо для людей з непереносимістю лактози, оскільки сприяє сприйняттю та кращому засвоєнню молочних продуктів.

Окрім вже вище розглянутих пробіотичних властивостей термофільного стрептококу, виробництво гамма-аміномасляної, фолієвої кислоти та їх похідних термофільним стрептококом відіграє значну роль в нейромедіації, стимулюванні метаболізму та імунної системи людини.

Виділення в порожнину ШКТ коротколанцюгових жирних кислот та лактату зміцнюють епітеліальний бар'єр кишечника, підтримують баланс корисної мікрофлори та мають протизапальні властивості через зниження рівня прозапальних цитокінів, а кон'югована лінолева кислота має ряд позитивних властивостей: антиканцерогенні (індукція апоптозу ракових клітин), антидіабетичні, антиатерогенні властивості (зниження рівню загального та LDL-холестерину, що в свою чергу, зменшує ризик розвитку атеросклерозу та серцево-судинних захворювань) (рис.1.18) [49].

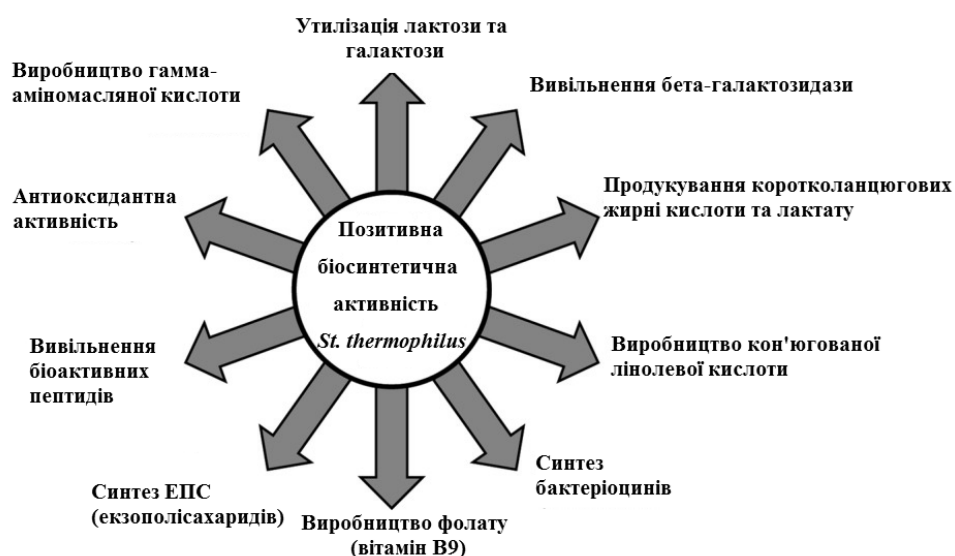


Рисунок 1.18 – Загальна схема біосинтетичної активності термофільного стрептококу, що має позитивний вплив на організм людини[49]

1.14 Резистентність *Streptococcus thermophilus* до антибіотиків

За декількома дослідженнями антибіотикорезистентності *Streptococcus thermophilus* виявили наявність стійкості до декількох класів антибіотиків серед ізолятів з сирого молока. В одному з них було досліджено за відповідних мінімальних інгібуючих концентрацій (MIC) дію 16 антимікробних агентів (антибіотиків) для відібраних 41 ізолятів з 106 наявних *S. thermophilus*, що показало наявність:

- 7 штамів, резистентних до тетрацикліну (MIC ≥ 8 мкг/мл);
- 2 штамів, резистентних до еритроміцину та кліндаміцину (MIC 128 та ≥ 16 мкг/мл відповідно);
- 1 штаму, резистентного до стрептоміцину (MIC 128 мкг/мл) та неоміцину (MIC 256 мкг/мл).

Подальший генетичний аналіз показав, що стійкість до тетрацикліну була пов'язана з геном *tet(S)*, а до еритроміцину та кліндаміцину — з геном *ermB*. В обох випадках гени резистентності були інтегровані в хромосому, що підтверджено результатами гібридизації.

Подальше секвенування геномів резистентних штамів виявило, що *tet(S)* і *ermB* були оточені фрагментами елементів вставки (*IS*), що могло сприяти їх поширенню серед інших бактерій. Ген *ermB*, зокрема, мав генетичну структуру, схожу на кон'югативні плазмідні, такі як *pRE25* з *Enterococcus faecalis*, що вказує на потенціал для горизонтального переносу. Аналіз геному також виявив 4 специфічні амінокислотні заміни в метилтрансферазі RsmG у штамі, резистентному до стрептоміцину/неоміцину, що могло б пояснити його резистентність. Важливим висновком дослідження є те, що за умов виробництва йогурту не було виявлено горизонтального переносу генів *tet(S)* або *ermB* від *S. thermophilus* до *Lactobacillus delbrueckii*. Це свідчить про низький ризик передачі цих генів іншим бактеріям у харчових продуктах [50, 51, 52].

Також здійснена оцінка поширеності даної властивості серед ізолятів: штами *Streptococcus thermophilus* мали найвищу поширеність резистентності до тетрацикліну (31,25%), ампіциліну (31,25%), гентаміцину (25%), еритроміцину (25%), пеніциліну (12%) і ципрофлоксацину (20,83%), а найнижчу – до ванкоміцину (2,08%) та лінкоміцину (4,16%). Серед ізолятів *S. thermophilus* найчастіше виявлено наступні гени стійкості до антибіотиків *aadA-D* (20,83%), *tetK* (16,66%), *blaZ* (14,58%), *ermA* (14,58%) і *gyrA* (12,50%), при цьому в жодному не було виявлено ген стійкості *vanA*, що є передумовою чутливості до ванкоміцину [51].

	Кількість ізолятів, стійких до певного антибіотика (%)												
	C30	Cip	G10	E15	T30	Nit	A10	Rif	Van	P10	Lin	Kan	S10
S. thermophilus	3 (6.25)	10 (20.83)	12 (25)	12 (25)	15 (31.25)	8 (16.66)	15 (31.25)	5 (10.41)	1 (2.08)	12 (25)	2 (4.16)	4 (8.33)	5 (10.41)
	Розподіл генів стійкості до антибіотиків серед ізолятів (%)												
	ermA	tetK	tetM	blaZ	cat1	gyrA	rpoB	vanA	linA	nfsA	strA-strB		
	7 (14.58)	8 (16.66)	2 (4.16)	7 (14.58)	1 (2.08)	6 (12.50)	1 (2.08)	—	1 (2.08)	3 (6.25)	2 (4.16)		

Рисунок 1.19 – Параметри антибіотикорезистентності *Streptococcus thermophilus* (скорочення антибіотиків C30: хлорамфенікол (30 мкг), Cip: ципрофлоксацин (5 мкг), G10: гентаміцин (10 мкг), E15: еритроміцин (15 мкг), T30: тетрациклін (30 мкг), Nit: нітрофурантоїн (300 мкг), A10: ампіцилін (10 мкг), Rif: рифампін (5 мкг), Van: ванкоміцин (30 мкг), P10: пеніцилін (10 мкг), Lin: лінкоміцин (15 мкг), Kan: канаміцин (30 мкг) і S10: стрептоміцин (10 мкг); проаналізовані гени стійкості: *ermA* – до еритроміцину, *tetK* і *tetM* – до тетрациклінів, *blaZ* – до пеніцилінів, *cat1* – до хлорамфеніколу, *gyrA* – макролідів, *rpoB* – до рифампіну, *vanA* – до ванкоміцину, *linA* – до лінкоміцину, *nfsA* – до L-нітрофурантоїну і *strA-strB* – стрептоміцинів) [51].

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Об'єкти дослідження

Об'єктами дослідження виступали зразки кисломолочних продуктів та культура *Streptococcus thermophilus*, яка була виділена з цих зразків.

2.2 Матеріали, обладнання та реактиви

2.2.1 Матеріали

Матеріалом досліджень було 8 кисломолочних продуктів з домашніх угідь, а саме 4 види кисломолочних сирів різного походження та сироватка, кисле молоко (самоквас) і кисломолочний сир, отримані з ізолюваного домашнього господарства:

- № 1 – сир твердий без назви, у вигляді «трикутників»;
- № 2 – сир твердий без назви, у вигляді «кульок»;
- № 3 – сир без назви, солоний підкопчений;
- № 4 – сир «Світанок»;
- № 5 – сир «Черемош»;
- № 6 – сир кисломолочний домашній;
- № 7 – кисле молоко (самоквас);
- № 8 – сироватка [53].

Для досліджень використовували додаткові матеріали:

- музейні культури умовно-патогенних мікроорганізмів: *B. subtilis* B-901, *C. utilis* Y-984, *C. albicans* Y-2681, *C. albicans* Y-1981, *P. aeruginosa* B-900, *St. aureus*-918, *E. coli* B-906, *E. coli* B-926, *C. tropicalis* Y-2473.
- депоновані відділом біотехнологій ІПР НААН штами термофільного стрептококу: *Streptococcus thermophilus* 66-1, *Streptococcus thermophilus* 27-1, *Streptococcus thermophilus* 74-1, *Streptococcus thermophilus* био-2;

- диски з антибіотиками: цефтриаксон (30 мкг), левоміцетин (30 мкг), стрептоміцин (30 мкг), офлоксацин (5 мкг), доксициклін (30 мкг)[54];
- препарати "Ентеросгель" та "Токсин.Net" [55];

Всі матеріали відповідали нормативній документації та зберігалися відповідно до умов, зазначених виробником.

2.2.2 Обладнання та лабораторний посуд

Перелік необхідного для проведення експериментальної частини посуду та обладнання:

- чашки Петрі (скляні, поліпропіленові);
- спиртівка;
- скальпель;
- електронні ваги;
- лабораторні ступка та товкач;
- пробірки (скляні);
- марлеві пробки до пробірок;
- вата;
- фільтрувальний папір;
- штативи для пробірок;
- термостатні шафи (з температурним режимом на: 30 °, 37 °, 43 °C);
- мікробіологічна петля;
- мікробіологічна голка;
- шпатель Дригальського Т-форми;
- мірні піпетки (об'ємом 0,1 см³ та 1 см³);
- предметні скельця;
- колби Ерленмєєра;
- бюретка для титрування;
- баночки;
- секундомір;

- лінійка;
- холодильник (з температурним режимом – 4°C);
- біокулярний мікроскоп "Motic"
- рН-метр "Tasto AG";
- спектрофотометр «NanoDrop 2000» ;
- віскозиметр В 3-246;
- ротаційний віскозиметр "RHEOTEST II" з вимірювальною системою циліндр-циліндр (S/S₃);
- лабораторна плита;
- водяна баня;
- настільна центрифуга;
- сушильна шафа СЕШ-3М.

2.2.3 Реактиви

В ході виконання експериментів використано наступні реактиви:

- вода дистильована [56];
- вода питна [57];
- фізіологічний розчин [58];
- спирт ректифікований [59];
- реактив Неслера;
- фенолфталеїн;
- 0,1 М розчин гідроксиду натрію;
- фосфатний буфер;
- β-меркаптоетанол;
- додецилсульфат натрію;
- хлороформ;
- ONPG (орто-нітрофенил-β-галактозид)
- кріопротектори: желатин і сахароза;
- стерилізоване знежирене відновлене молоко, розлите по 10 мл в стерилізовані пробірки[60];
- 0,1% розчин метиленового синього.

2.2.4 Поживні та селективні середовища, використані у роботі

Під час проведення досліджень було використано 5 типів поживних та селективних середовищ, приготованих на базі ІПР НААН: гідролізатний бульйон (ГА), гідролізований агар з кальцієм цитратом для виділення аромоутворюючих (ГА+Ca²⁺), тверде середовище Lee (Лі), селективні середовища Enterococci-агар (Enter-агар) та Streptococcus-агар (St-агар):

- 1) Гідролізатний бульйон (ГА): 300 г/л сухого молока, 1 л дистильованої води (може коригуватись в залежності від отриманого об'єму), 5 г/л панкреатину, 20 мл хлорофлорму, 15 г агару.
(умови приготування: розведене молоко закип'ятити, опісля охолодити до температури 55°C, довести рН до 7,8-8,0, додати панкреатин і хлороформ та залишити у термостаті на 3 дні; отриману суміш відфільтрувати скрізь паперовий фільтр, додати агар, розвести з дистильованою водою у пропорції 1:1, скоригувати рН готового середовища до 7,2-7,4 та стерилізувати 1 атм 15 хв).
- 2) Гідролізований агар з кальцієм цитратом для аромоутворюючих (ГА+Ca²⁺): 1 л гідролізатного бульйону, 10 г кальцій лимнокислого, 5 або 50 г дріжджового автолізу/екстракту відповідно, 10 г сахарози, 15 г агару.
(умови приготування: до підготованого гідролізатного бульйону додати потрібні реактиви, довести рН до 6,5 та простерилізувати за 1 атм 15 хв).
- 3) Селективне тверде середовище Lee (Лі): 10 г/л пептону, 5 г/л лактози, 3 г/л кальцій карбонату, 5 г/л дріжджового екстракту, 0,5 г/л гідрофосфату натрію, 18 г/л агару.
(умови приготування: замішати інгредієнти в заданих пропорціях, довести рН до 6,8-7,2 та простерилізувати 1 атм 15 хв).
- 4) Селективне середовище Enterococci-агар (Enter-агар): 10 г/л пептону, 5 г/л хлориду натрію, 0,2 г/л азиду натрію, 3,4 г/л калію фосфорнокислого 2-ох заміненого, 1,6 г/л монофосфат калію, 0,5 г/л бичої жовті, 1,0 г/л Tween® 80, 0,25 г/л хромогенної суміші, 11 г/л агару [61].

(умови приготування: замішані інгредієнти розвести з питною водою згідно пропорцій, довести рН до 6,8-7,2 та простерилізувати 1 атм 15 хв).

5) Селективне середовище Streptococcus-агар (St-агар): 10 г/л пептону, 5 г/л дріжджового екстракту, 2 г/л калію фосфорнокислого 2-ох заміщеного, 12-15 г/л агару, 6 мл/л 0,5% індикатору бромкризоловий пурпуровий. (умови приготування: замішані інгредієнти розвести з питною водою згідно пропорцій, довести рН до 6,8 та простерилізувати 1 атм 15 хв).

6) Середовище на виявлення здатності утворювати аміак із аргініну: 5 г/л гідрофосфату калію, 0,5 г/л глюкози, 3 г/л аргініну.

(умови приготування: замішані інгредієнти розвести з 1 л питної водою згідно пропорцій та простерилізувати 1 атм 15 хв).

2.3 Методи дослідження

Вивчаючи наявну мікробіоту відібраних молочнокислих продуктів, проведено ряд дій для цілеспрямованого пошуку молочнокислих бактерій з метою відбору чистих культур нових диких біотехнологічно активних штамів термофільного стрептококу та оцінки їх пробіотичних властивостей. Виділення та аналіз цільових культур мікроорганізмів здійснювали за загальноприйнятими мікробіологічними і специфічногалузевими стандартами [62, 63, 64].

Відповідні дослідження здійснено на базі відділу біотехнологій Інституту продовольчих ресурсів НААН України.

Далі представлено загальну схему експериментальної частини (рис.2.1).

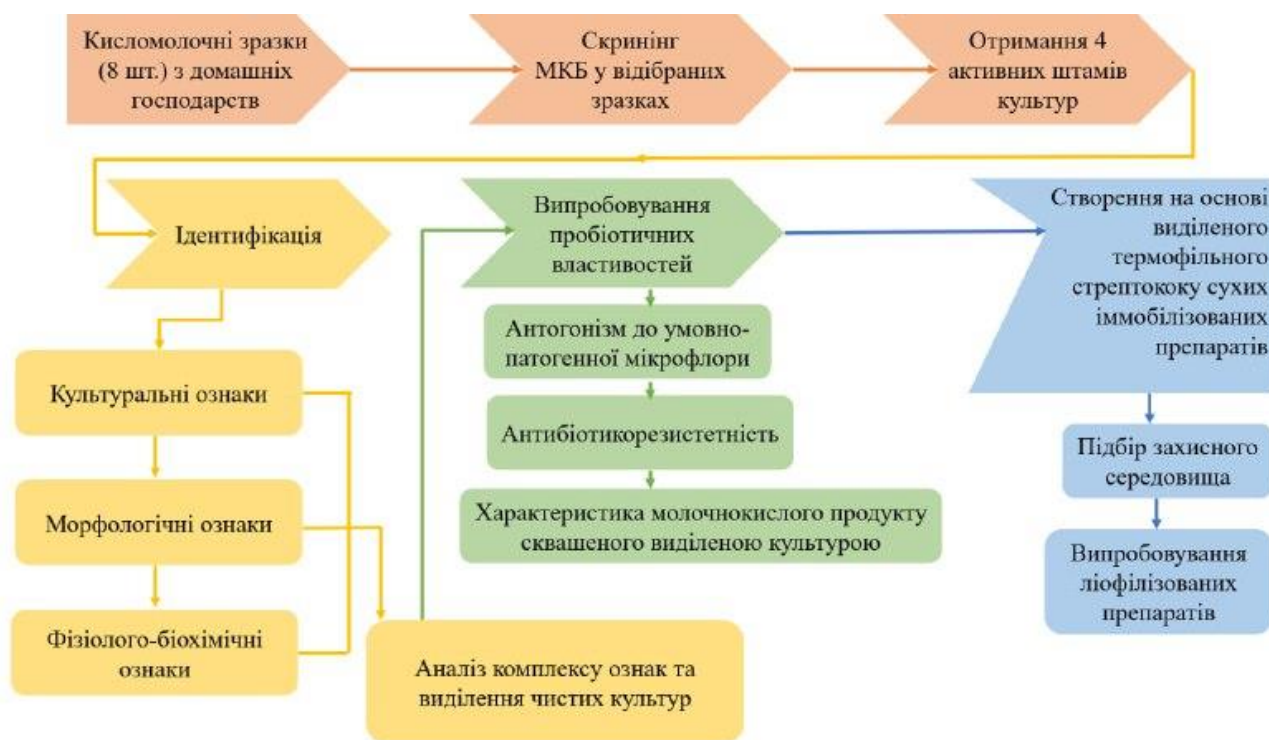


Рис. 2.1 – Схема проведення експериментальної частини

2.3.1 Первинна ідентифікація мікрофлори домашніх кисломолочних продуктів за культуральними ознаками

Як джерела для скринінгу було обрано вісім кисломолочних продуктів з різних домашніх господарств.

На початку готували розчини 6 зразків з сирів: попередньо відділивши потрібну масу скальпелем, зважували по 5 г продуктів і гомогенізували 310 мл фізіологічного розчину. Сироватка і самоквас додатково не обробляли. Далі робили

десяткові розведення приготових для досліджень розчинів з кратністю від 10^{-1} до 10^{-7} . Останні 3 розведення, а саме з кратністю 10^{-5} , 10^{-6} та 10^{-7} відбирали для посіву на тверді селективні середовища [65]:

- Гідролізатний бульйон (ГА);
- Гідролізований агар з кальцієм цитратом для аромоутворюючих (ГА+Ca²⁺);
- Селективне тверде середовище Lee (Лі);
- Селективне середовище Enterococci-агар (Enter-агар);
- Селективне середовище Streptococcus-агар (St-агар).

Чашки Петрі з середовищем ГА культивували за двох типів температурного режиму: 30 °С і 43 °С; чашки з ГА+Ca²⁺ – за 30°С; середовища Lee (Лі) – за 30 °С і 43 °С; а середовища з St-агаром і Enter-агаром – за 37 °С.

З вирослих не забруднених ні дріжджами, ні пліснявою чашок Петрі було відібрано поодинокі колонії можливих типових ізолятів культури *S. thermophilus* за належними культуральними ознаками.

Культури термофільного стрептококу утворюють:

- у твердому гідролізатному агарі (ГА) поверхневі випуклі біло-сірідрібні округлі колонії з рівним краєм;
- на поживних середовищах гідролізованого агару з кальцієм цитриновокислим (ГА+Ca²⁺) – білі круглі колонії зі зонами просвітлення;
- на Lee-агарі – колонії жовтого кольору із зонами просвітлення;
- на St-агарі – жовтуваті колонії з жовтим ореолом;
- на Enterococci-агарі – блідорожеві колонії, з червоно-фіолетовим центром.

Відібрані колонії ресуспендували у рідке середовище – відновлене сухе знежирене стерилізоване молоко та культивували у термостаті за температури 37 °С протягом однієї доби для накопичення бактеріальної маси.

Отримані накопичувальні культури перевивали на відновлене сухе знежирене стерилізоване молоко, відбираючи на кожному з перевиванні зразки для перевивання, які за культуральними ознаками відповідали типовим згусткам, утвореним *S.termophilus*. Відібрані пробірки зі зразками для перевивання мали не драглистий, не розшарований щільний згусток, що не розколювався.

Після цього робили перевивання на відновлене сухе знежирене стерилізоване молоко тричі для адаптації до молочного середовища. Несквашені зразки було відкинуто.

2.3.2 Підрахунок отриманих колоній та розрахунок КУО

Калькуляцію колоній проводили чашковим методом Коха[66]. Розрахунок КУО за даними здійснювали за формулою[67]:

$$lgN = lg\left(\frac{n \cdot d}{V}\right),$$

де N – кількість КУО/см³, n – кількість колоній на чашці, d – ступінь розведення, V – об'єм зразка, який висівали на чашку Петрі, см³.

2.3.3 Ідентифікація мікрофлори домашніх кисломолочних продуктів за морфологічними ознаками

Зі зразків сквашеного молока з адаптованими до молока культурами було виготовлено препарати для мікроскопіювання, зафарбовані 0,1% метиленового синього, розглядали препарати під мікроскопом та відбирали зразки за морфологічними ознаками. Дослідження морфологічних ознак проводили мікроскопіюванням імерсійно на бінокулярному мікроскопі Motic (FischerBioblock, США) за збільшень $\times 1000$ ($\times 100$ – об'єктив і $\times 10$ – окуляр) [68].

Потенційні термофільні стрептококи мали вигляд дрібних коків, зібраних попарно (диплококи) на початку культивування та довгі звивисті ланцюжки коків [67].

2.3.4 Ідентифікація мікрофлори домашніх кисломолочних продуктів за фізіолого-біохімічними ознаками

Для ідентифікації виділених чистих культур використовували наступні тести [69]:

- 1) визначення рівня зброджування вуглеводів при культивуванні у середовищі за Скородумовою: в кожную пробірку додавали по 1мл 10%-го розчину того чи іншого вуглеводу та 0,1мл відібраної чистої культури. Посіви інкубували протягом 48 год за температури 30° С. По кольору середовища візуально визначали зброджування відповідного вуглеводу (зміна рН – зміна кольору – відповідний рівень зброджування).
- 2) метаболізм аргініну: в підготоване спеціальне стерильне поживне середовище, розлите у пробірки по 2 мл, вносили 0,1мл досліджуваної культури та інкубували при 30° С протягом 2 діб, далі на фарфорову пластинку наносили 1 краплину досліджуваної культури і 1 краплину реактива Неслера (осад помаранчевого кольору – наявність утвореного амоніаку з аргініну).
- 3) визначення каталазної активності: культуру нарощували у пробірках зі скошеним поживним агаром, до складу якого входив 1% глюкози, протягом 2 діб за температури 30° С, після інкубації у пробірку до утворення біомаси бактерії вливали 1мл 3% розчину пероксиду водню (H_2O_2) (утворення бульбашок газу – наявність каталази).

2.3.5 Виділення чистих культур термофільних стрептококів за комплексом ознак

Після проведення низки тестів вибрані зразки знову розсівали на агаризовані середовища ГА, а потім переносили в рідке молочне середовище та повторювали перевивання тричі для виділення та накопичення культур стрептококу термофільного.

2.3.6 Дослідження антагонізму виділеного штаму щодо умовно-патогенної мікрофлори

Дослідження проводилось за методом лунок [70].

Спочатку для проведення дослідів готували: чисту виділену культуру, патогенні тест-культури, перевиваючи їх двічі протягом 3 діб для активності, та відбирали біомасу, що містила *S. thermophilus* і *Lb. bulgaricus*. Для підготовки зразку біомаси робили одне кратне розведення фізіологічним розчином 1г біомаси з концентрацією 10^9 КУО/мл. Також готували зразки біомаси та виділеної культури з високодисперсним кремнеземом. Біомасу з "Ентеросгелем" (ЕГ) та біомасу з "Токсин.Net" (TN) замішували у співвідношення 1:9 – 0,5 г біомаси з 4,5 г відповідного сорбенту та залишали на 15 хвилин для фіксування. Зразки чистої виділеної культури з "Ентеросгелем" замішували у пропорції 1:1 (1 г культури і 1 г високодисперсного кремнезему).

Далі готували суспензії з живих добових культур умовно-патогенної мікрофлори з контрольованою концентрацією. Для цього мікробіологічною петлею набирали і переносили у пробірку з фізіологічним розчином незначну кількість добової культури, що виросла на скошеному агарі в пробірці. Візуально порівнювали каламутність інокульому з стандартом каламутності, який перед використанням ретельно струшували. Використаний стандарт каламутності 0,5 за МакФарландом відповідає концентрації 10^8 КУО/ мл.

На гідролізований агар піпеткою вносили 0,1 мл вибраного патогену із використанням шпателя Дригальського висівали культуру газоном на чашках Петрі. Після чого просушували поверхню засіяних середовищ, залишаючи чашки Петрі привідкритими на 5 хвилин в межах 15 см асептичності пальника.

Далі на відстані не менше 20 мм одна від одної пробійником робили лунки і вносили 0,1 см³ того чи іншого підготовленого зразку. Протягом належних 2 годин чашки Петрі залишали для дифузії зразка при кімнатній температурі, а потім інкубували при 37° С 72 години. Всі маніпуляції було проведено в околі пальника. Після 3-ьох денного інкубування отриманий результат – діаметр зони пригнічення росту, вимірювали лінійкою.

2.3.7 Дослідження антибіотикорезистентності виділеного штаму

Дослідження проводилось за дифузійними методами з використанням дисків антибіотиків [71, 72]. Аналогічно до попереднього дослідів з визначення

антагоністичних властивостей для проведення експерименту чашки Петрі з щільним середовищем засівали газоном тест-культурами. Тільки тест-культурами слугували не патогени, а виділені культури зі зразків кисломолочних продуктів.

Далі набирали піпеткою 0,1 мл відібраних культур по чергово переносили на поверхню чашки Петрі, рівномірно розподіляли шпателем Дригальського по поверхні. Чашки Петрі підсушували 5 хв в межах 15 см асептичності пальника без додаткового нагрівання, за кімнатної температури для випаровування зайвої вологи. В межах 15 хв після введення інокулюму досліджуваних зразків, на поверхню поживного середовища переносили диски з антибіотиками, акуратно притискаючи їх пінцетом. Аплікацію дисків проводили прокаленим стерильного пінцетом. Відстань між дисками або від диску до краю чашки повинна бути не менше 15-20 мм. Після аплікації дисків чашки Петрі поміщають у термостат при температурі 37°C протягом 24 год.

2.3.8 Вимірювання рН та титрованої кислотності

Для визначення рівня рН електрод рН-метра занурювали у суспензії досліджуваних зразків. Значення рН, коли показник стабілізується, фіксували. Між вимірюваннями електрод промивали дистильованою водою, щоб запобігти перенесенню забруднень, а також задля уникнення хибних результатів досліджуваних культур. Після чого рН-електрод акуратно, щоб не призвести до накопичення статичного заряду, промакували фільтрувальним папером, щоб видалити надлишок води для промивання. Вимірювання рівня рН проводили за допомогою лабораторного рН-метра «Tasto AG».

Титровану кислотність визначали методом титрування у градусах Тернера. Для цього у мірну колубу відбирали 5 г зразку, розведеного у 50 мл дистильованої води з додаванням 4-5 крапель 1% фенолфталеїну, розчином 0,1 М натрій гідроксиду до появи стійкого блідо рожевого забарвлення.

Далі показник титрованої кислотності обчислювали за кількістю лугу, що пішла на титрування формулою:

$$X = \frac{a \cdot 100}{G \cdot 10} \cdot K,$$

де X – титрована кислотність, ° Тернера; a – об'єм 0,1 М NaOH, см³; G – маса зразку, г; K – поправочний коефіцієнт ($K = 1$).

2.3.9 Визначення β -галактозидазної активності

Для визначення β -галактозидазної активності до 0,1 мл вибраного зразку додавали 4,9 мл фосфатного буферу, доводили рН до 7,0 з MgSO₄ та β -меркаптоетанолом. Далі з цього зразку відбирали 2 мл і додавали 2 краплі 0,1% додецилсульфату натрію та 4 краплі хлороформу.

Суміш ставили на 5 хв на водяну баню за температури 28°C. Після цього додавали 0,4 мл ONPG (4 мг/мл) і повертали на водяну баню ще на 10 хв. Після цього додавали 1 мл 1М Na₂CO₃ за рН 11. Відцентрифугували протягом 15 хв і вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 420 нм, контролем було стерилізоване знежирене відновлене молоко.

β -галактозидазна активність проявлялась кількістю о-нітрофенолу, який виділяється в ході ферментативної реакції за одиницю часу в переліку на 1 мл реакційної суміші (досліджуваного зразку) і визначали за формулою[73]:

$$\beta - gal. = 1000 \cdot (A / tV),$$

дет – час реакції; V – об'єм зразку для аналізу; A – оптична густина за 420 нм.

2.3.10 Визначення вологоутримуючої здатності

Згусток відібраного зразку добре перемішували до однорідної маси. Роздріблений згусток заливали у 3 пробірки для центрифугування на 10 мл до мітки. Пробірки поміщали на 10 хв у водяну баню за температури 30-35°C, після чого центрифугували протягом 30 хв і визначали кількість сироватки, що виділилась [74].

2.3.11 Визначення кількості летких сполук

До 30 мл культури додавали 1 мл 5 %-го розчину сірчаної кислоти та проводили перегонку з водяною парою. Перегонку було зрегульовано так, щоб зібрати 30 мл дистиляту. Отриманий дистилят титрували 0,1М розчином NaOH із 1 краплею 1 %-го розчину фенолфталеїну. Кількість мл витраченого розчину

NaOH, який був використаний на нейтралізацію отриманого 30 мл дистилату визначає кількість летких сполук [75].

2.3.12 Статистична обробка результатів

Всі досліді виконано щонайменше у 3 повторностях, тому для математичної обробки результатів застосовували статистичні методи [76]. Статистична обробка результатів здійснена у системній програмі ExcelMSOffice. Використано критерій Стьюдента для рівня значущості $p = 0,05$ та наступні статистичні показники [77]:

1. середнє арифметичне:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n},$$

де x – наявні показники, n – кількість здійснених вимірювань;

2. стандартне відхилення:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}};$$

3. коефіцієнт Стьюдента:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}{n}}};$$

4. довірчий інтервал:

$$\Delta x = t_{\alpha, k} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}.$$

2.3.13 Реологічні параметри згустку

Реологічні параметри згустку оцінювали ротаційним віскозиметром з системою циліндр-циліндр. Згусток відібраного зразку об'ємом 30 см³ вносили в проміжок циліндрів ротаційного віскозиметра. В результаті обертальної сили ротора шари згустку зміщувалися. Реологічні параметри згустку визначались за обертальною швидкістю ротора та силою опору, що виникала в ході його обертання. Вимірювання проводилися поетапно, починаючи з низьких і поступово збільшуючи швидкості деформації.

Показники приладу за даної швидкості деформації використовували для визначення напруження зсуву (Па) за формулою:

$$\tau = Z \cdot \alpha,$$

де α – фіксовані показники приладу; Z – константа циліндра ($Z = 7,8$ Па/од);
 τ – напруження зсуву, Па;

Ефективну в'язкість (величина внутрішнього тертя) відібраних зразків розраховували за наступним співвідношенням:

$$\eta_{\text{еф}} = \tau / D r \cdot 100,$$

де τ – напруження зсуву, Па; D_r – константне значення граничного напруження зсуву для кожного режиму руйнування коагуляту, Па²/с; $\eta_{\text{еф}}$ – внутрішнє тертя, мПа·с.

Відносна колова швидкість розраховується за формулою:

$$\omega = 2 \pi R_{\text{в}} N,$$

де $R_{\text{в}}$ – радіус внутрішнього циліндра, м; N – частота обертання ротора, с⁻¹;

ω – відносна колова швидкість обертання внутрішнього циліндра, м/с.

Для побудови кривої рівняння залежності ефективної в'язкості від колової має вигляд:

$$\eta_{\text{еф}} = B \omega^{-m},$$

де m – показник степеню інтенсивності руйнування структури дослідного матеріалу, B – показник, що відповідає значенню ефективної в'язкості при коловій швидкості 1 м/с [78].

2.3.14 Створення на основі виділеної чистої культури сухі іммобілізовані пробіотичні препарати

Готуються декілька зразків з виділеною культурою та біомасою:

1. 0,1 г чистої біомаси *S. thermophilus* і *Lb. bulgaricus*;
2. комбінація культури без "Ентеросгелю" зі захисним середовищем (ЗС): сахароза+желатин у співвідношенні 1:2;
3. комбінація культури з "Ентеросгелем", без ЗС;
4. комбінація культури з 5 г "Ентеросгелю" зі ЗС сахароза+желатин у співвідношенні 1:1;

5. комбінація культури з 5 г "Ентеросгелю" зіЗС сахароза+желатин у співвідношені 1:2;
6. комбінація культури з 5 г "Ентеросгелю" з захисним середовищем (ЗС): сахароза+желатин у співвідношені 1:3;
7. комбінація культури з 5 г "Ентеросгелю" з захисним середовищем (ЗС): сахароза+желатин у співвідношені 1:4.

Приготовані зразки піддаються ліофільній сушці.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Первинна ідентифікація мікрофлори домашніх кисломолочних продуктів за культуральними ознаками

З відібраних 8 гомогенізованих кисломолочних продуктів, за винятком сироватки та самоквасу, було здійснено десяткові кратні розведення та висіяно останні 3 розведення з кратністю 10^{-5} , 10^{-6} та 10^{-7} на селективні середовища за методикою 2.3.1. Враховуючи кількість селективних середовищ, температурних режимів і того, що було розсіяно по 3 останніх розведення (10^{-5} , 10^{-6} та 10^{-7}), то для первинного відбору було одержано $7 \times 3 \times 8 = 168$ чашок Петрі.

Інкубовані чашки Петрі за відповідних температурних режимів – 30° , 37° , 43° °C, оцінювали спершу візуально. На середовищах можуть проростати, окрім молочнокислих бактерій, дріжджі та пліснява. Це пов'язано не з методичними похибками проведення експерименту, а з тим, що оскільки домашні продукти були ферментовані та відібрані в недосконало асептичних умовах, вони частково контамінуються сторонньою мікрофлорою. Забруднені чашки Петрі відкидались і подальшому скринінгу не підлягали.

З незабруднених ні дріжджами, ні пліснявою чашок Петрі було відібрано колонії за відповідними культуральними ознаками можливих типових ізолятів культури *S. thermophilus* (рис. 3.1).

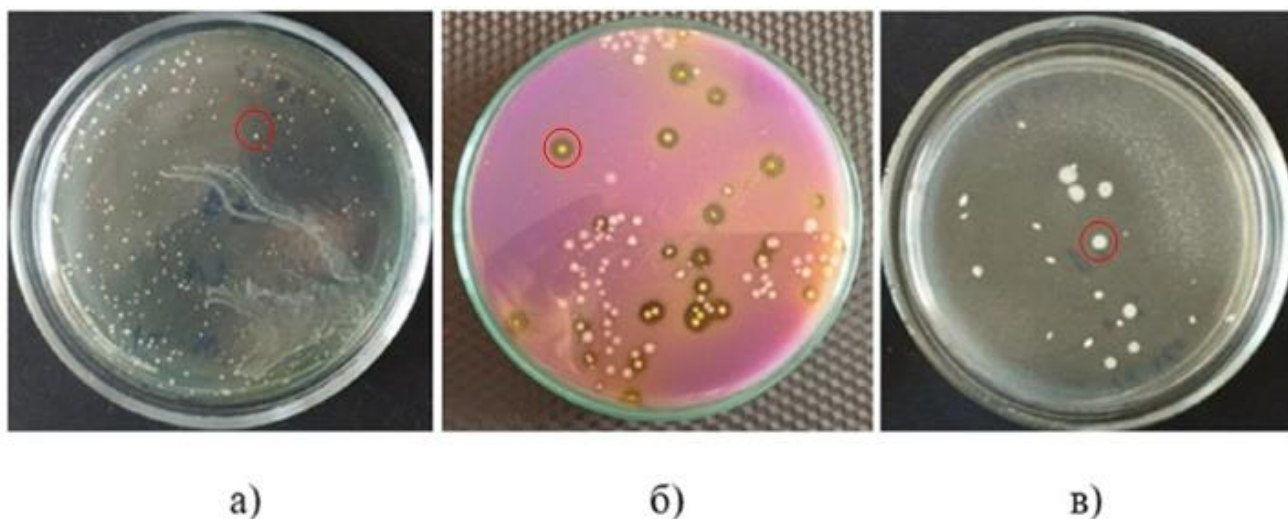


Рисунок 3.1 – Виявлені колонії-ізоляти з типовими культуральними ознаки

термофільного стрептококу на селективних середовищах: а) ГА; б) Lee (Лі); в) ГА+Ca²⁺.

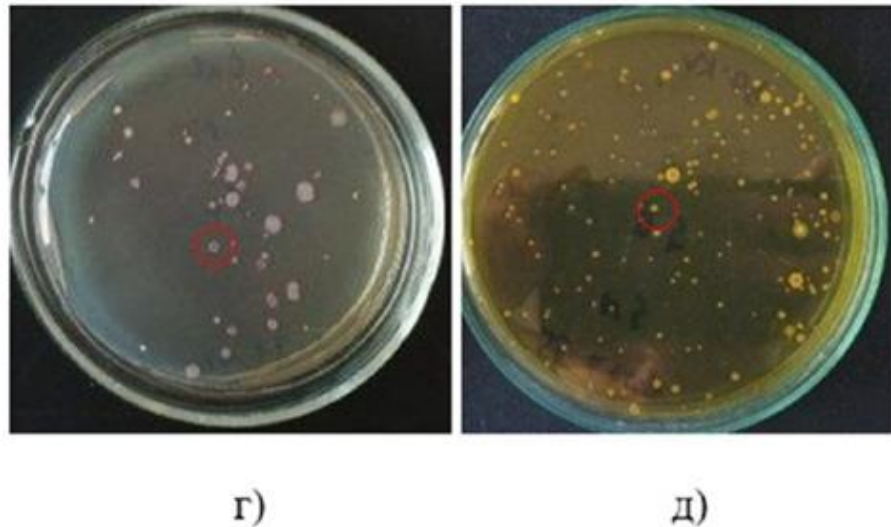


Рисунок 3.2 – Виявлені колонії-ізоляти з типовими культуральними ознаки термофільного стрептококу на селективних середовищах: г) Enter-агар; д) St-агар. Можливі культури термофільного стрептококу, які відібрано на скринінг:

- поверхневі біло-сірі дрібні круглі колонії з рівним краєм з ГА;
- жовті колонії із зонами просвітлення та жовтим ореолом на тлі фуксинового середовища з середовища Лі;
- білі дрібні круглі колонії зі зонами просвітлення з середовища ГА+Ca²⁺;
- блідорожеві колонії, з червоно-фіолетовим центром з Enter-агару;
- жовтуваті колонії з жовтим ореолом на тлі фіолетового середовища з St-агару.

В результаті такого первинного культурального відбору було отримано 126 ізолятів, які ресуспендували на відновлене знежирене молоко для подальшого дослідження. Після трьох послідовних перевивань протягом 10 днів з 126 пробірок з культурами було відкинуто 20 пробірок через неактивність (несквашене молоко). Натомість було відібрано найбільш активні культури для подальшого скринінгу, які в рідкому середовищі – молоці, відповідали типовому коагуляту сквашенню молока термофільним стрептококом (рівний щільний коагулят без відділення сироватки сметаноподібної чи в'язкої консистенції).

3.2 Підрахунок отриманих колоній та розрахунок КУО

За чашковим методом Коха було здійснено підрахунок утворених на п'яти' день інкубування колоній. Результат калькуляції наведено в таблиці 3.1

Таблиця 3.1 – Кількість отриманих колоній на чашках Петрі.

№ зразку	Врахування розведення	ГА 30°	ГА 43°	Lee (Лі) 30°	Lee (Лі) 43°	Enter-агар 37°	St-агар 37°
1	$\times 10^5$	газон	газон	газон	газон	газон	газон
	$\times 10^6$	200	360	220	359	220	244
	$\times 10^7$	24	45	31	37	33	29
2	$\times 10^5$	272	20	11	180	21	120
	$\times 10^6$	33	2	1	11	2	7
	$\times 10^7$	—	—	—	—	—	—
3	$\times 10^5$	236	—	220	—	—	124
	$\times 10^6$	25	—	19	—	—	10
	$\times 10^7$	—	—	—	—	—	—
4	$\times 10^5$	газон	54	газон	252	301	газон
	$\times 10^6$	292	4	204	18	29	160
	$\times 10^7$	30	—	27	3	1	15
5	$\times 10^5$	газон	газон	газон	газон	газон	газон
	$\times 10^6$	196	30	328	110	47	120
	$\times 10^7$	16	5	27	15	3	28
6	$\times 10^5$	67	—	10	8	2	7
	$\times 10^6$	8	—	1	2	—	—
	$\times 10^7$	—	—	—	1	—	—

Продовження таб.3.1

7	$\times 10^5$	газон	15	газон	29	16	145
	$\times 10^6$	газон	1	газон	3	1	9
	$\times 10^7$	484	—	240	—	—	—
8	$\times 10^5$	290	84	газон	103	—	288
	$\times 10^6$	20	7	123	17	—	20
	$\times 10^7$	3	—	13	—	—	—

На основі підрахунку за методом Коха було розраховано кількість колонієутворювальних одиниць (КУО). Калькуляцію кількості колоній з середовища $\text{ГА} + \text{Ca}^{2+}$ не проводили через неможливість розділити колонії від частинок кальцію вузально, та відповідно оцінити коректну кількість колоній.

Таб. 3.2 – Розраховані $\lg \text{КУО}/\text{см}^3$ досліджуваних зразків.

№ зразку	ГА 30°	ГА 43°	Lee (Лі) 30°	Lee (Лі) 43°	Enter-aгар 37°	St-aгар 37°
1	2,66±0,43	2,92±0,42	2,73±0,39	2,87±0,46	2,74±0,38	2,72±0,41
2	2,72±0,42	1,54±0,46	1,26±0,48	2,39±0,57	1,55±0,47	2,2±0,58
3	2,63±0,45	—	2,55±0,49	—	—	2,79±1,01
4	2,78±0,46	1,91±0,53	2,69±0,41	2,21±0,89	2,02±1,17	2,50±0,48
5	2,56±0,51	1,90±0,36	2,79±0,51	2,42±0,40	1,89±0,57	2,58±0,38
6	2,11±0,43	—	1,24±0,46	1,23±0,38	1,00	1,54
7	3,53	1,33±0,55	3,23	1,77±0,45	1,34±0,78	2,30±0,57
8	2,24±0,92	2,12±0,50	2,42±0,46	2,36±0,35	—	2,62±0,54

3.3 Ідентифікація мікрофлори домашніх кисломолочних продуктів за морфологічними ознаками

Найбільш активні культури, які в рідкому середовищі – молоці, відповідали типовому коагуляту сквашенню молока термофільним стрептококом, піддались скринінгу за морфологічними ознаками. Найкращі за морфологічними ознаками чотири культури мали такий вигляд (рисунок 3.3):

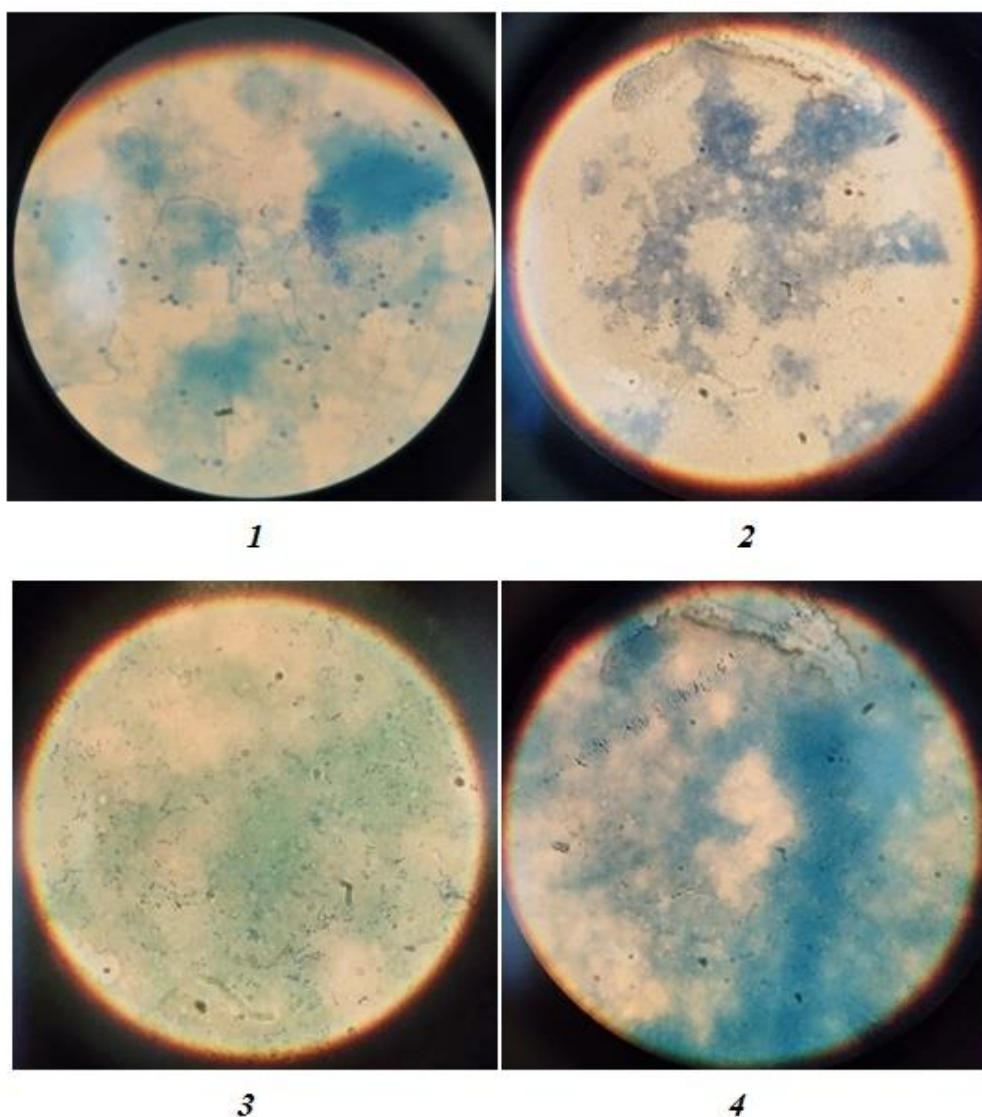


Рисунок 3.3 – Мікроскопування виділених адаптованих до молочного середовища ізолятів (електронний мікроскоп, збільшення 10x100):

1 – №6 *St-agar* 5, 2 – №1 *Enter-agar* 1, 3 – №1 *Ent-agar* 9, 4 – №2 *Ent-agar* 8.

Для більшої точної ідентифікації за морфологічними ознаками проведено також мікроскопіювання переживлених депонованих штамів *Streptococcus*

thermophilus з колекції музейних культур відділу біотехнологій ІПР НААН (рисунок 3.4)

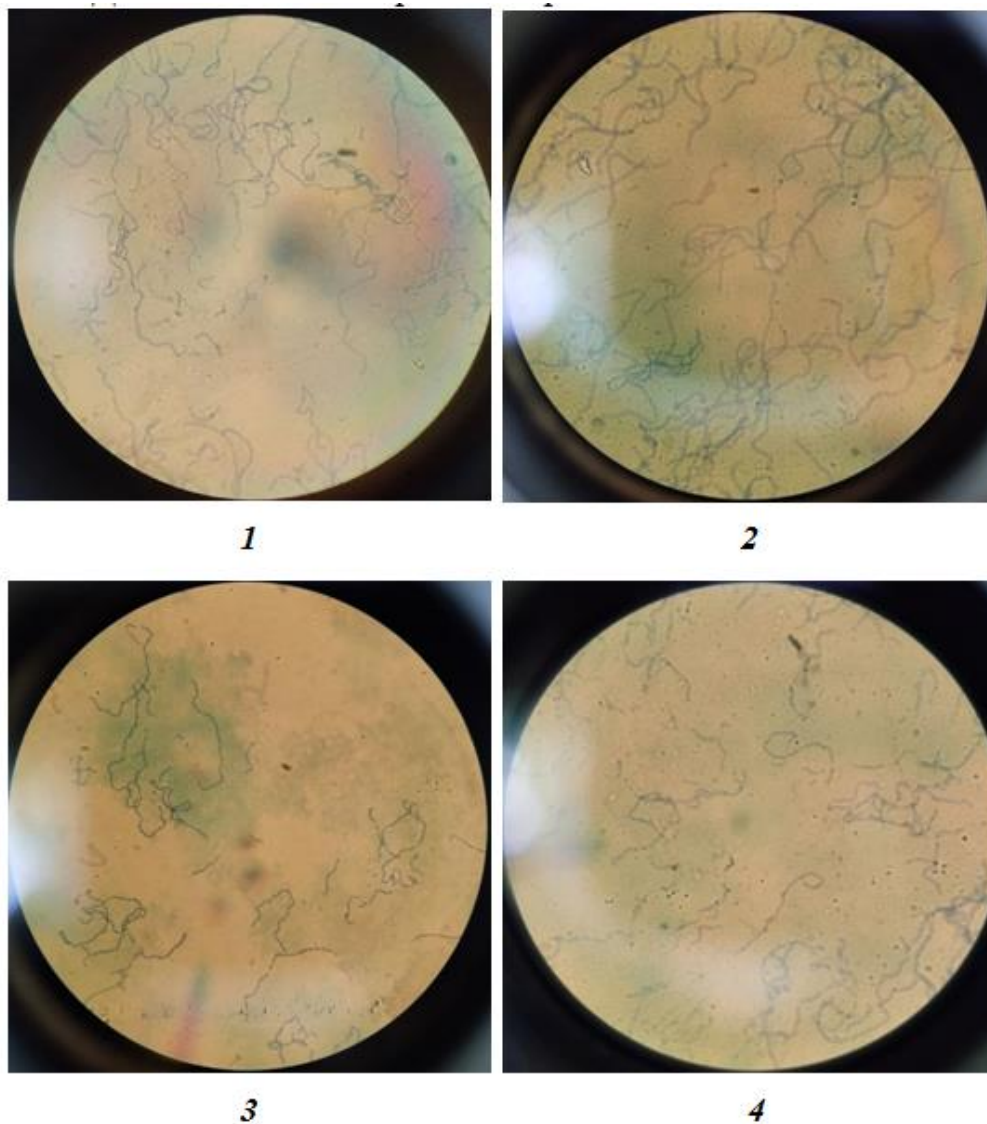


Рисунок 3.4 – Мікроскопування депонованих штамів *S.thermophilus* (світловий мікроскоп, збільшення 10x100): 1 – 66-1, 2 – 27-1, 3 – 74-1, 4 – био-2.

Опис морфологічних ознак досліджуваних культур:

1. №6 *St-agar* 5 (культура отримана культивуванням колонії-ізоляту зразку від кисломолочного домашнього сиру на *St*-агарі) – короткі ланцюжки коків, диплококи, наявні дріжджі;
2. №1 *Enter-agar* 1 (культура отримана культивуванням колонії-ізоляту зразку від сиру твердого без назви, у вигляді «трикутників» на *Enter*-агарі) – поодинокі коки, зустрічаються диплококи;

3. №1 Enter-агар 9 (культура отримана культивуванням колонії-ізоляту зразку від сиру твердого без назви, у вигляді «трикутників» на Enter-агарі) – поодинокі коки, короткі ланцюжки дрібних коків;
4. №2 Enter-агар 8 (культура отримана культивуванням колонії-ізоляту зразку від сиру твердого без назви, у вигляді «кульок» на Enter-агарі) – одиничні коки, короткі ланцюжки дрібних коків, наявні дріжджі.

В ході порівняння з депонованими штамами *S.termophilus* найбільша морфологічна подібність спостерігалась у №6 St-агар 5 з био-2 та №1 Ent-агар 9 з 74-1 .

Таблиця 3.5 – Кількість отриманих колоній чистих культур на чашках Петрі.

Назва зразку	Кількість підрахованих колоній за розведень:		
	$\times 10^5$	$\times 10^6$	$\times 10^7$
№1 Enter-агар 1	газон	432	39
№1 Enter-агар 9	газон	352	35
№2 Enter-агар 8	1560	161	14
№6 St-агар 5	газон	газон	384

Отже, концентрація клітин №1 Ent- 1 становила $3,9-4,3 \cdot 10^8$, №1 Ent- 9 – $3,5 \cdot 10^8$, №2 Ent- 8 – $1,4-1,6 \cdot 10^8$, №6 St- 5 – $3,84 \cdot 10^9$.

3.4 Ідентифікація мікрофлори домашніх кисломолочних продуктів за фізіолого-біохімічними ознаками

З 4 отриманими культурами було проведено ряд фізіолого-біохімічних тестів на виявлення метаболізму вуглеводів, амінокислот, ферментативну активність. Результат оформлено у вигляді таблиці 3.3.

Таблиця 3.3 – Результати біохімічних тестів досліджуваних зразків.

Тип середовища	Джерело вуглецю	Результати тесту росту			
		№1 Ent. 1	№1 Ent. 9	№2Ent.8	№6 St.5
Прості цукри	Глюкоза	+	+	+	+
	Галактоза	+	+	+	+
	Фруктоза	+	+	+	+
	Ксилоза	+	+	— +	— +
	Рамноза	+	—	— +	— +
Дисахариди	Сахароза	+	+	+	+
	Лактоза	+	+	+ —	+
	Мальтоза	+	—	+	— +
	Мелібіюза	+	—	—	— +
Трисахариди	Рафіноза	— +	—	—	— +
Полісахариди	Інулін	— +	— +	—	—
	Декстрин	+	—	+	— +
Спирти	Гліцерин	+ —	— +	—	— +
	Маніт	+	— +	—	— +
	Сорбіт	— +	—	— +	— +
	Інозит	— +	—	—	— +
Метаболізм аргініну		—	+	+	—
Каталазна активність		—	—	—	—

Зовнішні маркери біохімічних тестів вуглеводів : "+" – жовтий колір, "-" – бірюзовий, "+ – " – брудно-жовтий, "- +" – зелений.

За рядом таких ознак культури №6 St.5 було віднесено до штаму виду *Streptococcus thermophilus*:

- відсутність повноцінного зброджування таких вуглеводів як: ксилоза, рамноза, інουλін, гліцерин, маніт, сорбіт;
- здатність до утилізації таких вуглеводів: глюкоза, галактоза, фруктоза, сахароза, лактоза;
- нездатність до утворення аміаку з аргініну;

За низкою наступних ознак культуру №1 Ent. 1 ідентифіковано як штам *Leuconostoc mesenteroides*.

- відсутність повноцінного зброджування: рамнози, мальтози, рафінози, інуліну, декстрину, сорбіту, інозиту;
- зброджування: глюкози, галактози, фруктози, ксилози, сахарози, гліцерину, маніту;
- відсутність утворення амоніаку з аргініну.

Ідентифікація культури №1 Ent. 9 та №2 Ent. 8 за рядом їх фізіологічних ознак є дещо ускладненим, ймовірно за все вони відносяться до роду *Lactococcus*.

3.5 Виділення чистих культур термофільних стрептококів за комплексом ознак

Здійснено аналіз за комплексом досліджених культуральних, морфологічних та фізіолого-біохімічних ознак. Результат даного сринінгу 4 культур представлено у вигляді таблиці 3.4.

Таблиця 3.4 – Результати комплексного аналізу виділених культур.

Назва зразку	Опис		Відношення до роду/виду за фізіологічними ознаками
	колоній	мікропрепарату	
№1 Enter-агар 1	біла, кругла	одиночні коки, диплококи	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
№1 Enter-агар 9	біла, кругла	диплококи, короткі ланцюжки дрібних коків	<i>Lactococcus</i>
№2 Enter-агар 8	білі, круглі та дрібні «лодочки»	одиночні коки, короткі ланцюжки коків	<i>Lactococcus</i>
№6St-агар 5	сірувато біла, кругла	диплококи, короткі та довгі ланцюжки коків	<i>Streptococcus thermophilus</i>

Після проведення низки тестів відібрані зразки знову розсівали на агаризовані середовища ГА для очищення від дріжджів і виділення чистих культур, а потім переносили в рідке молочне середовище, перевивали тричі для адаптації і накопичення культур стрептококу термофільного на молоці (рис.3.5). Кількість колоній було підраховано.

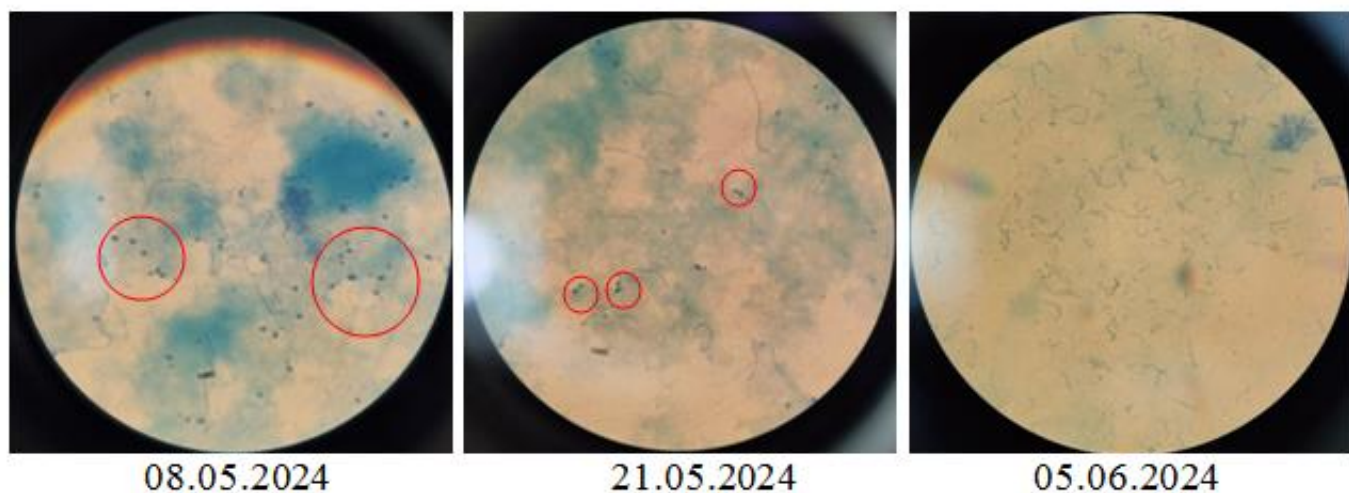


Рисунок 3.5 – Мікроскопіювання проміжних виділених зразків та виділення чистої культури зі забруднених дріжджами зразків шляхом розсівання на ГА і методичного перевивання.

Таблиця 3.5 – Кількість отриманих колоній чистих культур на чашках Петрі.

Назва зразку	Врахування розведення		
	$\times 10^5$	$\times 10^6$	$\times 10^7$
№1 Enter-агар 1	газон	432	39
№1 Enter-агар 9	газон	352	35
№2 Enter-агар 8	1560	161	14
№6 St-агар 5	газон	газон	384

Отже, концентрація клітин №1 Ent- 1 становила $3,9-4,3 \cdot 10^8$, №1 Ent- 9 – $3,5 \cdot 10^8$, №2 Ent- 8 – $1,4-1,6 \cdot 10^8$, №6 St- 5 – $3,84 \cdot 10^9$.

3.6 Характеристики кисломолочного продукту, сквашеного виділеною культурою

За допомогою виділеної культури *Streptococcus thermophilus* було сквашено молоко і отримано кисломолочний продукт, характеристики якого наведено в таблиці 3.8. Продукт характеризувався високою в'язкістю, вологоутримувальною в'язкістю, достатнім рівнем летких жирних кислот та активністю β -галактозидази.

Таблиця 3.6 – Характеристика отриманого сквашуванням виділеною культурою молочного продукту.

№6 St.5	Вологоутримуюча здатність, %	Леткі жирні кислоти, мекв /100 мл продукту	Активність β -галактозидази, од / мл	В'язкість, мПа·с
	76,1	37,4	706	135,52

3.7 Дослідження антибіотикорезистентності виділеного штаму

На основі виділеного штаму було створено іммобілізований на високодисперсному кремнеземі продукт. Попередніми дослідженнями встановлено, що такі іммобілізовані продукти характеризуються підвищеною стійкістю до жорстких умов шлунково-кишкового тракту (ШКТ), зокрема низького рівня рН в шлунку та дії жовчі в дванадцятипалій кишці[1]. Тому було досліджено стійкість таких продуктів до антибіотиків. Стійкість мікроорганізмів до антибіотиків вважається небажаною властивістю, оскільки існує ризик горизонтального переносу даної властивості патогенним видам. Проте, з огляду на застосування пробіотиків під час вживання антибіотиків для профілактики дисбактеріозів стійкість до антибіотиків може відігравати позитивну роль.

Було досліджено чутливість виділеного штаму та комплексного пробіотичного препарату на основі кремнезему до 5 антибіотиків: цефтриаксон, левоміцетин, стрептоміцин, офлоксацин, доксициклін. Результати дослідження стійкості до антибіотиків досліджуваних зразків наведено в таблиці 3.7.

Залежно від діаметра зони пригнічення росту мікроорганізмів поділяють на резистентні, помірно резистентні та чутливі. Розмір зони затримки росту залежно від стійкості штаму до антибіотиків:

1. резистентний ($d < 10 \text{ мм}$);
2. помірно резистентний ($10 \leq d < 20 \text{ мм}$);
3. чутливий ($d \geq 20 \text{ мм}$) [79].

Таблиця 3.7 – Результати дослідження антогонізму.

№	Антибіотики	Зони пригнічення росту, мм	
		№ 6 St-5	№6 St-5+EG
1	Цефтриаксон	—	—
2	Левоміцетин	15	—
3	Стрептоміцин	12	—
4	Офлоаксацин	—	—
5	Доксициклін	—	12

Встановлено, що виділений штам та продукт на основі цього штаму проявляли стійку невразливість до дії цефтриаксону та офлоксацину. Високодисперсний кремнезем посилює цю властивість.

3.8 Дослідження антагонізму виділеного штаму щодо умовно-патогенної мікрофлори

Для дослідження антагонізму біомаси асоційованих культур *St. thermophilus* і *Lb. bulgaricus*, отриманих на дослідно-промисловому виробництві ІПР, високодисперсного кремнезему («Ентеросгель», «Токсин.NET») було проведено дослідження з тестовими культурами умовно-патогенних мікроорганізмів. Результати цих досліджень представлено в таблиці 3.6.

Найбільш виражені антагоністичні властивості спостерігалися у біомаси асоціації *S. thermophilus* і *Lb. bulgaricus* до 5 патогенних тест-культур. Дещо покращені результати антагонізму до окремих видів відносно біомаси спостерігались у зразках комбінації біомаси з високодисперсним кремнеземом. Виділена чиста культура №6 St. 5 мала антогонізм до *St.aureus-918*, зона затримки росту діаметром 12 мм, і до *E.coliB-926*, зона затримки росту якого становила 13 мм. Аналогічно до впливу комбінації сорбентів з біомасою, культура №6 St. 5 мала кращі показники за присутності високодисперсного кремнезему.

Таблиця 3.8 – Результати дослідження антагонізму.

Культури тестових патогенних мікроорганізмів	Біомаса	Біомаса +ЕГ	Біомаса +TN	ЕГ	TN	№6 St. 5	№6 St.5 +ЕГ
<i>B. subtilis</i> B-901	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. utilis</i> Y-984	15 мм	—	18 мм	—	—	—	—
<i>C. albicans</i> Y-2681	15 мм	—	—	15 мм	—	—	—
<i>C. albicans</i> Y-1981	12 мм	—	—	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i> B-900	—	—	—	—	—	—	—
<i>St. aureus-918</i>	15 мм	16 мм	—	—	—	12 мм	14 мм
<i>E. coli</i> B-906	—	—	—	12 мм	13 мм	13 мм	16 мм
<i>E. coli</i> B-926	14 мм	18 мм	—	—	—	—	—

3.9 Створення на основі виділеної чистої культури сухі іммобілізовані пробіотичні препарати

1.



2.



Рис. 3.6 – Вигляд висушених із захисним середовищем пробіотичних препаратів за різних співвідношень: 1 – до висушування; 2 – після висушування.

Для дослідження впливу захисного середовища на виживання клітин у комплексному препараті після ліофільного сушіння проводили з додаванням до іммобілізованої на гідрогелі «Ентеросгель» біомаси асоціації *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum* та *Lactobacillus brevis* желатиново-сахарозного середовища (1:10) та такого самого середовища з додаванням 10 % знежиреного молока. Висушені препарати зі збільшенням частки захисного середовища (від 1:2 до 1:4) набували вигляду від порошку до таблетки.

Результати показали, що другий варіант захисного середовища був кращий для збереження життєздатності асоціації молочнокислих культур, а виживаність клітин за збільшення кількості захисного середовища не виявилась значимо кращою. До того ж, додавання кріопротектора до іммобілізованої біомаси у співвідношенні 1:2 технологічніше, адже після висушування отримали порошок, а не клейку масу.

3.10 Реологічні параметри згустку

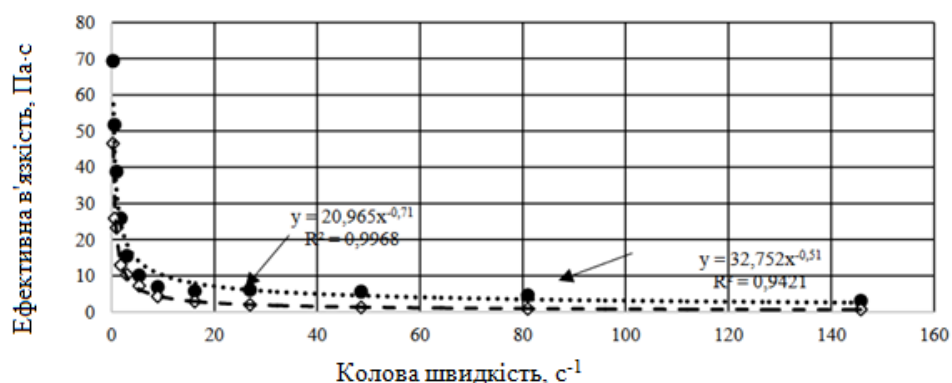


Рис. 3.7 – Крива текучості згустку кисломолочного продукту, сквашеним культурою: $\diamond$ – №6 St. 5; $\bullet$ – іммобілізованим на "Ентеросгелі" №6 St. 5.

Таб. 3.9 – Характеристика отриманого сквашуванням виділеною культурою молочного продукту.

Зразок	Ефективна в'язкість, мПа·с	Вологозатримуюча здатність, %
№6 St. 5	$20,2 \pm 1,1$	76
№6 St. 5+ ЕГ	$23,1 \pm 0,9$	74

При збільшенні напруження зсуву ефективна в'язкість у №6 St. 5 зменшується швидше, тоді як у штамах іммобілізованому №6 St. 5+ ЕГ – пізніше. Останній має високу міцність, отже можна припустити, що іммобілізовані культури є більш стійкими до механічного впливу.

Основні біотехнологічні властивості виділених штамів наведено в табл.3.10.

Таб. 3.10 –Характеристика біотехнологічних властивостей у виділеному штамі та в пробіотичному препараті.

Зразок	Урожайність, * 10 ¹⁰ КУО/мл	Молокозсідальна активність, год	Гранична кислотність, °Т	Кількість молочної кислоти, %	Синерезис, %	Кількість ДА, мкг/100 см ³	Ліолітична активність, 10 ⁻⁷ нМхв ⁻¹ мл ⁻¹ КУО ⁻¹
№6 St.5+ЕГ	10,8	3,5	114	0,78	28	160	0,32
№6 St. 5	7,6	4,0	120	0,84	26	170	0,25

Відібрані культури були високопродуктивними, з високою МЗА, помірною ЕКУ, низьким рівнем протеолітичної та ліполітичної активності. Вони утворювали молочний згусток з добрим синерезисом та високим вмістом ароматичних сполук діацетилу, летких кислот. Загалом, такий технологічний та біологічний потенціал культур зможе забезпечити стабільний перебіг технологічного процесу виробництва молочного продукту та високі санітарні його показники.

4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ

В ході даних досліджень, зазначених в розділі "*Методи*", застосовувалися горючі та небезпечні речовини й матеріали. Використовувалися електрична, механічна та теплова енергії.

Науково-дослідна робота виконувалась в Інституті продовольчих ресурсів Національної академії аграрних наук України. Робота здійснена з урахуванням вимог охорони праці, пожежної та правил безпеки в надзвичайних ситуаціях. Під час роботи неухильно дотримувалися вимог охорони праці, пожежної безпеки та правил поведінки в надзвичайних ситуаціях.

В мікробіологічних лабораторіях науково-дослідних інститутів, як і в інших установах виробничої практики, існують ряд потенційно небезпечних і шкідливих факторів, зокрема:

- біологічні (мікроорганізми: бактерії, віруси, рикетсії, спірохети, хламідії, гриби; гельмінти, найпростіші та ін., а також продукти їх життєдіяльності; макроорганізми: тварини, людина і продукти їх життєдіяльності; культури клітин і тканин, генетичні фрагменти, діагностичні препарати тощо);
- хімічні (реактиви, дезінфекційні засоби, канцерогенні, подразнюючі, сенсibiliзуючі, мутагенні, алергенні та інші речовини);
- механічні (виробниче обладнання (обладнання, що працює під тиском, центрифуги, лабораторне скло, ріжучий, колючий інструментарій, гострі краї, задирки та ін.));
- фізичні (електричний струм, ультрафіолетове, електромагнітне випромінювання, недостатня освітленість, відхилення вологості і температури робочої зони від встановлених норм, підвищена (знижена) рухомість повітря, підвищений вміст шкідливих речовин у повітрі робочої зони, підвищений шум, гаряча вода та пара);
- людські (нервово-психічні, фізичні (перевантаження

персоналу), акти вандалізму та ін.);

- пожежонебезпека [80].

У зв'язку з наявністю цих факторів приймаються заходи зі забезпечення належної техніки безпеки, виробничої санітарії та охорони праці для поліпшення умов роботи і безпеки працівників [81, 82].

Здійснено аналіз ймовірних факторів небезпеки, розглянуті і запропоновані наступні заходи та рекомендації.

Загальні вимоги охорони праці під час роботи в лабораторії

До лабораторії допускаються лише особи, які пройшли вступний інструктаж з техніки безпеки та охорони праці. Цей інструктаж є обов'язковим для всіх нових працівників, незалежно від їх освіти, стажу роботи та посади, а також для студентів, які проходять практику або досліджують дипломні роботи чи магістерські дисертації.

Двічі на рік проводиться періодичний інструктаж з техніки безпеки на робочому місці. Проведення всіх видів інструктажу фіксується в журналі. Завідувач лабораторії призначає відповідальну особу, яка проводить вступний інструктаж, контролює виконання правил техніки безпеки в лабораторії та веде журнал інструктажу. Перед виконанням нових видів робіт, роботою з новими приладами або небезпечними речовинами, а також у разі порушення правил техніки безпеки проводиться позаплановий інструктаж.

Розпорядженням по лабораторії призначаються відповідальні за дотримання правил техніки безпеки в кожному робочому приміщенні, правильне зберігання легкозаймистих, вибухонебезпечних та отруйних речовин, санітарний стан приміщень, забезпеченість засобами індивідуального захисту та аптечками першої допомоги з необхідним набором медикаментів. Всі працівники лабораторії повинні бути забезпечені необхідним спецодягом та засобами індивідуального захисту.

Розпорядженням по лабораторії призначаються відповідальні за дотриманням правил техніки безпеки в кожному робочому приміщенні, правильне зберігання легкозаймистих, вибухонебезпечних і отруйних речовин, санітарний стан приміщень, забезпеченість засобами індивідуального захисту та аптечками першої допомоги з необхідним набором медикаментів.

Усі працюючі в лабораторії повинні бути забезпечені необхідним спецодягом та засобами індивідуального захисту.

Засоби індивідуального захисту

В лабораторії обов'язково одягати бавовняний халат. При роботі з їдкими та отруйними речовинами, окрім халата, слід використовувати фартухи, засоби захисту очей та рук. Якщо робота пов'язана з виділенням отруйних газів або пилу, необхідно застосовувати респіратори або інші захисні засоби для органів дихання.

Для захисту рук від кислот, лугів, солей та розчинників використовуйте спеціальні гумові рукавички без пошкоджень. При роботі з високими температурами використовуйте бавовняні або термостійкі рукавички. Для захисту очей застосовуйте окуляри, щитки або маски.

Правила пожежної безпеки в лабораторії

Вимоги пожежної безпеки повинні неухильно дотримуватися у всіх приміщеннях лабораторії, які також повинні бути оснащені засобами пожежогасіння. Лабораторія має бути обладнана пожежними кранами (не менше одного на поверх) з пожежними рукавами. У кожному робочому приміщенні повинні бути присутні вогнегасники.

На видному місці в приміщенні лабораторії має бути розміщений план евакуації співробітників на випадок пожежі. Група з 3-5 осіб, що призначається розпорядженням по лабораторії з числа співробітників, організовує всі протипожежні заходи та проходить інструктаж з протипожежної безпеки від місцевої пожежної команди. Всі, хто працює в лабораторії, повинні знати правила

поводження з вогне- та вибухонебезпечними речовинами, газовими приладами, а також вміти користуватися протигазом, вогнегасником та іншими засобами пожежогасіння, наявними в лабораторії.

Зберігання горючих матеріалів та встановлення предметів, які загороджують проходи і доступ до засобів пожежогасіння, заборонені в приміщеннях лабораторії і в безпосередній близькості від них (в коридорах, під сходами). Установка лабораторних і нагрівальних приладів, їх використання та монтаж електропроводки без дозволу завідувача лабораторії та особи, відповідальної за протипожежні заходи, заборонені. Всі нагрівальні прилади повинні бути встановлені на термоізолюючих підставках. Експлуатація несправних лабораторних і нагрівальних приладів заборонена. Після закінчення роботи в усіх приміщеннях необхідно вимкнути електроенергію, газ та воду.

У разі виявлення пожежі, задимлення або інших ознак пожежі особа, що працює в лабораторії, зобов'язана:

- негайно повідомити про пожежу пожежну службу за телефоном.
- Довести до відома завідувача лабораторією, який, у свою чергу, повинен сповістити співробітників та студентів, вжити заходів для їх евакуації та ліквідації пожежі, а також заходів щодо обмеження поширення вогню та ліквідації пожежі.

Правила електробезпеки в лабораторії

Для безпечної роботи з електроустановками всі приміщення лабораторії повинні відповідати вимогам електробезпеки.

Електрообладнання з напругою понад 36 В, а також обладнання та механізми, які можуть знаходитися під напругою, мають бути надійно заземлені. Для відключення електромереж на входах повинні бути встановлені рубильники або інші доступні пристрої. Відключення всієї мережі, за винятком чергового освітлення, здійснюється за допомогою загального рубильника.

З метою запобігання електротравматизму забороняється:

- Працювати з несправними електричними приладами та установками.
- Перевантажувати електромережу.
- Переносити та залишати без нагляду ввімкнені електроприлади.
- Працювати поблизу відкритих частин електроустановок та торкатися до них.
- Загромаджувати прохід до електричних пристроїв.

Про всі виявлені дефекти в ізоляції проводів, несправності рубильників, штепсельних вилок, розеток, а також заземлення та огорожень слід негайно повідомляти електрику. У разі перерви в подачі електроенергії електроприлади повинні бути негайно вимкнені. Використання електроприладів класу "0" в межах одного робочого місця заборонено.

Також категорично заборонено:

- Торкатися до корпусу пошкодженого приладу або струмопровідних частин з порушеною ізоляцією одночасно з заземленим обладнанням (інший прилад зі справним заземленням, водопровідні труби, опалювальні батареї).
- Торкатися до пошкодженого приладу, стоячи на вологій підлозі.

У разі ураження електричним струмом необхідно якомога швидше звільнити потерпілого від його дії.

- Відключіть електроприлад, якого торкається потерпілий, за допомогою вимикача або рубильника.
- Якщо неможливо швидко відключити електроприлад, звільніть потерпілого від струмопровідних частин за допомогою дерев'яного або іншого непровідного предмета.
- У всіх випадках ураження електричним струмом негайно викличте лікаря.

Правила роботи з хімічними речовинами

У процесі роботи в хімічній лабораторії необхідно дотримуватись вимог техніки безпеки. В лабораторії під час роботи з хімічними реактивами повинні перебувати не менше двох осіб. Починаючи роботу, слід оглянути своє робоче місце, звільнити його від непотрібних предметів і навести порядок. Перевірити необхідно перед початком роботи справність обладнання, рубильників, наявність заземлення та інші технічні аспекти.

Їдкі й отруйні речовини, а також органічні розчинники використовуються тільки у витяжних шафах. При визначенні запаху хімічних речовин слід обережно нюхати, направляючи пари або гази до себе рукою. Роботи, при яких можливе підвищення тиску, перегрівання або поломка скляного приладу з розбризкуванням гарячих або їдких продуктів, також виконуються у витяжних шафах. Виконавець робіт має бути в захисних окулярах, рукавичках та фартуху. Стулки витяжної шафи піднімаються на висоту не більше 20-30 см, щоб у шафі були лише руки, а спостереження за процесом велось через скло шафи. Витяжна вентиляція під час роботи з хімічними реактивами повинна бути увімкнена за 30 хвилин до початку робіт і вимикатись не раніше, ніж через 30 хвилин після їх завершення. Набирати реактиви в піпетки ротом заборонено, для цього використовують гумові груші або інші пристрої.

Змішування або розведення хімічних речовин, що супроводжується виділенням тепла, проводиться в термостійкому або порцеляновому посуді. Упарювання розчинів в склянках слід ретельно перемішувати через різну щільність шарів розчину, що може спричинити викидання рідини. Для запобігання опіків і уражень від бризок і випарів, нахилитись над посудом з киплячою або нагрітою рідиною заборонено. Нагрівати посуд зі звичайного скла на відкритому вогні без азбестованої сітки не можна. Пробірку з рідиною під час нагрівання слід тримати отвором від себе і від інших. Нагрівати рідини в колбах або приладах, що не сполучаються з атмосферою, заборонено. Нагріту посудину не закривають притертою пробкою до її охолодження до температури навколишнього середовища.

Роботу з концентрованими кислотами і лугами слід проводити тільки у витяжній шафі з використанням захисних засобів (рукавичок, окулярів). Під час роботи з парами азотної кислоти або олеуму необхідно також вдягати гумовий фартух. Концентровані кислоти, як азотна, сірчана, соляна, зберігаються у витяжній шафі в скляному посуді об'ємом не більше 2 дм³. У місцях зберігання кислот не допускається зберігати легкозаймисті речовини. Розбавлені розчини кислот зберігаються в скляному посуді, а лугів – в поліетиленовій тарі. Приготування розчинів сірчаної, азотної та інших кислот проводиться шляхом додавання їх у воду тонким струменем при постійному перемішуванні. Для цього використовують термостійкий посуд. Додавати воду в кислоти заборонено! При потраплянні кислоти на шкіру уражене місце слід негайно промити водою протягом 10-15 хвилин, а потім нейтралізувати 2-5 % розчином гідрокарбонату натрію. Пролиту кислоту засипають піском, після чого місце посипають вапном або содою і промивають водою.

До роботи з легкозаймистими рідинами (ЛЗР) допускаються особи, які ознайомились з інструкціями з пожежної безпеки і пройшли відповідний інструктаж. Перед роботою з ЛЗР слід перевірити наявність і готовність засобів пожежогасіння. Роботи з ЛЗР виконуються тільки у витяжній шафі. Перегонка і нагрівання ЛЗР з низькою температурою кипіння проводяться в круглодонних колбах на банях, заповнених теплоносієм (вода, масло, пісок). Для нагрівання бань використовуються електроплитки з закритими нагрівальними елементами. Під час перегонки ЛЗР необхідно постійно стежити за роботою холодильника. Заборонено нагрівати на водяних банях речовини, що можуть реагувати з водою з вибухом або виділенням газів. Лабораторні установки з ЛЗР розбирають тільки після охолодження до кімнатної температури. При витоку або займання ЛЗР слід вимкнути всі електронагрівальні прилади і при необхідності знеструмити лабораторію. Місце витоку ЛЗР засипають сухим піском і збирають дерев'яним або пластиковим совком. Металеві совки не використовуються. Ємності з ЛЗР не повинні перебувати поруч з нагрітими предметами або під прямими сонячними променями, що може спричинити підвищення тиску всередині ємності і

руйнування скляної пляшки. При заповненні скляних пляшок ЛЗР «під пробку» підвищення температури на 5-10 °С може спричинити руйнування пляшки. Щоб запобігти цьому, ЛЗР не доливають в пляшки на 10 см³ до краю. Перекисні сполуки вимагають такої ж обережності в поводженні, як і інші пожежонебезпечні речовини. При роботі з ними розігрівання вище температури розкладання не допускається. Обов'язково дотримується чистота робочого місця, приладів і посуду. Для гасіння органічних перекисів використовують воду, для неорганічних – сухий пісок, порошкові суміші і вуглекислотні вогнегасники.

Сухі реактиви беруть порцеляновими ложками або шпателями, брати їх незахищеними руками заборонено. Тверді речовини зважують тільки з використанням тари, насипати їх безпосередньо на чаші ваг заборонено. Роботи з отруйними і шкідливими твердими речовинами проводяться тільки у витяжній шафі з усіма запобіжними заходами. При змішуванні твердих речовин, особливо органічних, слід уникати утворення пилу, що може бути вибухонебезпечним. Заборонено змішувати сухі реактиви поблизу ввімкнених електронагрівальних приладів. Роботи з порошкоподібними речовинами виконуються в місцях без протягів або сильного руху повітря. Випадково розсипаний реактив не можна висипати назад у ту ж банку.

Роботи з лужними металами виконуються у витяжній шафі на чистому і сухому місці, з використанням мінімальних кількостей металів, захисних окулярів і гумових рукавичок. Щоб уникнути займання лужних металів, не допускається попадання на них води. Робота з отруйними газоподібними речовинами проводиться обов'язково у витяжній шафі. Силу тяги у витяжній шафі необхідно перевірити перед початком роботи. При поганій або недостатній тязі робота з отруйними газами заборонена. Під час роботи з отруйними газами необхідно мати наготові протигаз [81].

Біологічна безпека

Безпечне проведення досліджень з потенційно небезпечними мікроорганізмами потребує дотримання суворих протоколів біобезпеки.

Оновлений текст описує ключові аспекти біобезпеки в біотехнологічних лабораторіях, роблячи акцент на сучасних підходах та міжнародних стандартах.

Ідентифікація та оцінка ризиків починається з визначення небезпечних компонентів. Перед початком роботи дослідник мусить чітко визначити всі потенційно небезпечні біологічні агенти, з якими буде вестися робота. Це включає мікроорганізми, їх токсини, алергени та інші біологічні матеріали, які можуть становити загрозу для здоров'я людини. На основі ідентифікованих небезпек проводиться оцінка ризику, що передбачає аналіз ймовірності виникнення несприятливих подій та їх потенційних наслідків. Це дозволяє визначити рівень біобезпеки, необхідний для даного дослідження.

Застосовані заходи контролю ризиків поділяють на:

- первинні бар'єри – це фізичні бар'єри, що запобігають прямому контакту працівників з біологічно небезпечними агентами (закриті посудини та контейнери, засоби індивідуального захисту (ЗІЗ), такі як рукавички, маски, респіратори, захисні окуляри, закриті системи (біобоксові бокси, центрифуги з герметичними роторами)
- вторинні бар'єри – додаткові бар'єри, що запобігають поширенню біологічно небезпечних агентів за межі лабораторії (шлюзи з піднебічним тиском, спеціальні системи вентиляції з фільтрами, обмежений доступ до лабораторних приміщень)

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) визначає чотири рівні біобезпеки (ББ) для роботи з біологічно небезпечними агентами:

- ББ1: Мінімальний ризик. Робота з непатогенними або слабо патогенними мікроорганізмами.
- ББ2: Помірний ризик. Робота з помірно патогенними мікроорганізмами.
- ББ3: Високий ризик. Робота з високо патогенними мікроорганізмами, які можуть спричинити серйозні захворювання.

- ББ4: Дуже високий ризик. Робота з дуже небезпечними патогенними мікроорганізмами, які можуть спричинити летальні захворювання.

Кожен рівень ББ передбачає чітко визначені практики, обладнання та ЗІЗ, необхідні для мінімізації ризиків.

Важливим компонентом біобезпеки є дотримання належних мікробіологічних практик (НМП). Це сукупність правил та процедур, спрямованих на мінімізацію ризику зараження під час роботи з біологічно небезпечними агентами. НМП включають:

- ретельне миття рук та дезінфекцію;
- правильне використання ЗІЗ;
- стерилізацію та дезінфекцію обладнання та робочих поверхонь;
- раціональне та обережне поводження з біологічними матеріалами;
- заборону на їжу, пиття та нанесення макіяжу в лабораторії [82].

Перша допомога у разі нещасних випадків у лабораторії

Про нещасний випадок потерпілий або очевидець зобов'язані негайно повідомити завідувача лабораторії. Очевидець повинен організувати першу допомогу потерпілому та викликати лікаря. Під час роботи в хімічній лабораторії найбільш імовірні такі види уражень: отруєння, поранення, опіки, втрата свідомості.

У разі поранень (неглибоких порізів) необхідно перш за все видалити уламки з рани, зупинити кровотечу, промити рану 2 % розчином перманганату калію, спиртом (або іншим антисептичним засобом) і забинтувати. При забрудненні рани слід обробити її перексидом водню. У разі сильної кровотечі на кінцівку вище рани необхідно накласти давлячу пов'язку. Туге перев'язування стерильною марлею зупиняє кровотечу з ран на інших частинах тіла. Викликати лікаря необхідно при сильній кровотечі.

Опіки поділяються на термічні та хімічні. Причиною термічних опіків можуть бути дотики незахищеними руками до розпечених або сильно нагрітих предметів, лабораторного обладнання, займання легкозаймистих або горючих рідин чи твердих речовин. Хімічні опіки виникають при дії на шкіру різних хімічних речовин, переважно кислот і лугів. Перша допомога при опіках як термічного, так і хімічного походження полягає у промиванні ураженого місця великою кількістю прохолодної води. Мета промивання термічного опіку – охолодження місця опіку. Використовувати лід для охолодження обпечених ділянок шкіри заборонено! При опіках третього і четвертого ступеня необхідно звернутися до лікаря. При хімічних опіках уражене місце спочатку слід промити великою кількістю води, після чого слабким розчином соди (при опіках кислотами) або лимонної чи оцтової кислоти (при опіках лугами).

Перша допомога при втраті свідомості вимагає чіткого алгоритму дій. Укладіть потерпілого на рівну поверхню (підлогу, лаву, стіл) так, щоб голова була нижче тулуба, а ноги – вище, що забезпечить приплив крові до голови. Якщо немає можливості укласти людину, посадіть її на стілець або хоча б на підлогу, нахиливши голову якнайнижче, щоб плечі торкалися колін. Забезпечте доступ свіжого повітря (відкрийте вікно, якщо потерпілий знаходиться в приміщенні). Поверніть голову потерпілого набік, щоб блювотні маси не потрапили в дихальні шляхи. Звільніть одяг, який стискає дихальні шляхи (комір, пояс). Перевірте пульс. Якщо він відсутній або слабо відчувається, відразу викликайте «швидку»! Дайте потерпілому вдихнути пари нашатирного спирту, для чого потрібно злегка змочити ватний тампон нашатирним спиртом і потримати його на відстані 1-2 см від носа. Якщо нашатирю немає, окропіть обличчя прохолодною водою або протріть рушником, змоченим у холодній воді. Якщо людина не приходить до тями більше 5 хвилин, незважаючи на всі вжиті заходи, негайно викликайте «швидку допомогу»! [81]

ВИСНОВКИ

1. Здійснено літературний огляд за тематикою, з якого визначено загальну концепцію пробіотичних препаратів, поширення в природі, біосинтетичну активність, втрату вірулентності та механізм набуття антибіотикорезистентності деякими штамами *St. thermophilus*.
2. Провести скринінг кисломолочних продуктів домашнього приготування на наявність штамів термофільних стрептококів за морфолого-культуральними ознаками. В результаті проведеного скринінгу 8 кисломолочних продуктів домашнього приготування було виявлено 126 типових колоній-ізолятів за культуральними ознаками на твердому середовищі
3. Досліджено фізіолого-біохімічні властивості відібраних зразків та визначено комплексом ознак один штам, який може належати *Streptococcus thermophilus*.
4. Визначено антибіотикорезистентність виділеного штаму до дії цефтриаксону та офлоксацину та антагонізм щодо умовно-патогенних штамів *E.coli*B-906 та *St.aureus*-918.
5. Визначено біотехнологічні характеристики продукту отриманого на базі вискодисперсного кремнезему: вологоутримувальна здатність – 76,1 %, вміст летких жирних кислот - 37,4 мекв/100 мл продукту, активність β -галактозидази – 706 од/мл, в'язкість 135,52 мПа·с.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Forootan M. Chronic constipation: A review of literature / Forootan M., Bagheri N., Darvishi M.. // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. – №97.
2. Ірина Бондарчук. Пробиотики як незамінний елемент злагодженої роботи організму — досвід українського виробника / Ірина Бондарчук. // «Щотижневика АПТЕКА». – 2019. – №19.
3. Технологія пробіотиків / С. О.Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирок. – Київ: НУХТ, 2012. – 318 с.
4. Меднікова М. І. Луї Пастер, Роберт Кох та Фердінанд Кон — основоположники мікробіології та імунології [Електронний ресурс] / Марина Іванівна Меднікова // *Наукові записки молодих учених*, 0(3). – 2019. – Режим доступу до ресурсу: <https://phm.cuspu.edu.ua/ojs/index.php/SNYS/article/view/1620>.
5. Пробиотики і пребіотики. Глобальні практичні рекомендації Всесвітньої Гастроентерологічної Організації (WGO) [Електронний ресурс] // Медична лабораторія DIAGEN. – 2021. – Режим доступу до ресурсу: https://diagen.com.ua/wp-content/uploads/2022/04/probiotiki_compressed.pdf.
6. Gut microbes and exploring probiotics. Yakult's probiotics research investigates the diverse impact of gut microbes on human health [Електронний ресурс] // Yakult. – 2021. – Режим доступу до ресурсу: <https://www.nature.com/articles/d42473-021-00335-9>.
7. Сирохман І.В. Товарознавство харчових продуктів функціонального призначення / Сирохман І.В., Завгородня В.М.. – Київ: Центр учбової літератури, 2009. – 544 с.
8. Старовойтова, С. О. Сучасні підходи до підтримання та відновлення нормальної мікрофлори людини. Частина 1 / С. О. Старовойтова. - Київ, 2014. - 58 слайдів.
9. Милославський Д.К. Пробиотики: від Іллі Мечникова до сьогодення (до 175-річчя від народження І.І. Мечникова) / Милославський Д.К. // *Східноєвропейський журнал внутрішньої та сімейної медицини* /

Милославський Д.К.. – Харків: ДУ « Національний інститут терапії імені Л.Т.Малої НАМН України», 2020. – С. 109–115.

10. Аналіз особливостей розвитку ринку пробіотиків в світі та Україні [Електронний ресурс] / Немченко А.С., Міщенко В.І., Винник О.В., Тув А.Д. // Національний фармацевтичний університет. – 2019. – Режим доступу до ресурсу: <https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/21008/1/167-168.pdf>.
11. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic / Colin Hill, Francisco Guarner, Gregor Reid та ін.]. // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2014. – №11. – С. 506–514.
12. ДСТУ 3803-98 Біотехнологія. Терміни та визначення.
13. ДСТУ 2212:2003 Молочна промисловість. Виробництво молока та кисломолочних продуктів. Терміни та визначення понять.
14. Мікробіологічні аспекти пробіотичних препаратів / Крисенко О. В., Скляр Т. В., Вінніков А. І. та ін.]. // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2010. – №18. – С. 19–24.
15. Glenn R. Gibson. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics / Glenn R. Gibson, GleMarcel B. Roberfroid // The Journal of Nutrition / Glenn R. Gibson, GleMarcel B. Roberfroid., 1995. – (125; № 6). – С. 1401–1412.
16. Postbiotics: Current Trends in Food and Pharmaceutical Industry / Thorakkattu P., Khanashyam A. C., Khanashyam A. C. та ін.]. // Foods. – 2022. – №11. – С. 3094.
17. Narin A. Modeling Gut Microbiome Effects In Alternative Animal Models – Finding The Happy Biota For A Long And Healthy Life [Електронний ресурс] / A. Narin, H. Huston, C. Hopkins // Invivo Biosystems. – 2022. – Режим доступу до ресурсу: <https://invivobiosystems.com/wp-content/uploads/2022/11/Microbiome.pdf>.
18. Vinderola G. The Concept of Postbiotics / Vinderola G., Sanders M.E., Salminen S. // Foods / Vinderola G., Sanders M.E., Salminen S.. – Basel, 2022. – (11; 8). – С. 1077.

- 19.Vinderola G. Definition of postbiotics: A panel debate in Amsterdam [Електронний ресурс] / Gabriel Vinderola // ISAPP Science Blog. – 2022. – Режим доступу до ресурсу: <https://isappscience.org/definition-of-postbiotics-a-panel-debate-in-amsterdam/>
- 20.Хижняк О.С. Біотехнологічні аспекти створення препаратів на основі пробіотиків / Хижняк О.С., Краснопольський Ю.М. // Вісник Нац. техн. ун-ту "ХПІ" : зб. наук. пр. Темат. вип. / Хижняк О.С., Краснопольський Ю.М.. – Харків: НТУ «ХПІ», 2012. – (950; № 44). – С. 72–78.
- 21.Infant Formula Supplemented with Biotics: Current Knowledge and Future Perspectives / S.Salminen, B. Stahl, G. Vinderola, H. Szajewska. // Nutrients. – 2020. – №12. – С. 1952.
- 22.Старовойтова А.А. Мікробіологія молока і молочних продуктів [Електронний ресурс] / А.А. Старовойтова. - Біла Церква: Технологіко-економічний коледж Білоцерківського національного аграрного університету, 2017. - 153 с.
- 23.Streptococcus thermophilus strains: Multifunctional lactic acid bacteria / R.Iyer, S. Tomar, T. Uma Maheswari, R. Singh. // International Dairy Journal. – 2010. – 20 (3). – С. 133–141.
- 24.Лях В. Пробиотики як сучасні превентивні препарати захворювань шлунково-кишкового тракту / В. Лях, В. Червецова, А. Кричківська. // Chemistry, Technology and Application of Substance. – 2018. – №1. – С. 72–77.
- 25.Robinson R. Fermented milk | Yoghurt / R.K. Robinson // Encyclopedia of Food Microbiology / R.K. Robinson., 1999. – С. 784–791.
- 26.L. Pearce. STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS / L. Pearce, S. Flint // Encyclopedia of Dairy Sciences / L. Pearce, S. Flint., 2022. – С. 2577–2582.
- 27.Сучасний стан розробки та застосування пробіотичних, пребіотичних та синбіотичних препаратів / [С. В. Калініченко, Є. М. Бабич, Т. А. Рижкова та ін.]. // Анналі Мечниковського інституту. – 2013. – №3. – С. 5–12.

28. Damien M. de Vienne. Lifemap: Exploring the Entire Tree of Life [Електронний ресурс] / Damien M. de Vienne // NCBI. – 2023. – Режим доступу до ресурсу: <https://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/?tid=1308>.
29. Taxonomy Browser of *Streptococcus thermophilus* [Електронний ресурс] // NCBI-National Library of Medicine – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=1308>.
30. IDF position paper on clarifying taxonomy of dairy starter culture *Streptococcus thermophilus* [Електронний ресурс] // International Dairy Federation AISBL. – 2024. – Режим доступу до ресурсу: https://cdn.shopify.com/s/files/1/0603/5167/6609/files/IDF_Position_paper_on_clarifying_taxonomy_of_dairy_starter_culture_Streptococcus_thermophilus_2024.pdf?v=1707227378.
31. Ottogalli G. Taxonomic relationships between *Streptococcus thermophilus* and some other streptococci / G. Ottogalli, A. Galli, F. Dellaglio. // Cambridge University Press. – 2009. – №46. – С. 127–131.
32. Tagg J. *Streptococcus*: A Brief Update on the Current Taxonomic Status of the Genus / J. Tagg, P. Wescombe, J. Burton. // Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. – 2011. – С. 123–140.
33. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria / R. Iyer, S. Tomar, T. Uma Maheswari, R. Singh. // International Dairy Journal. – 2010. – №20. – С. 133–141.
34. Шульга Н. М. Мікроскопіювання у санітарно-мікробіологічному контролі виробництва молочних продуктів: навч. посіб. / Н. М. Шульга, А. О. Бовкун, Л. А. Млечко. – Київ: ПІДО НУХТ, 2008. – 49 с.
35. The complete genome sequence of the yogurt isolate *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 2 / [V. Alexandraki, M. Kazou, J. Blom та ін.]. // Standards in Genomic Sciences. – 2017. – №12. – С. 12–18.
36. Lactic Acid Bacteria | *Streptococcus thermophilus* / J. Harnett, G. Davey, A. Patrick та ін.] // Encyclopedia of Dairy Sciences / J. Harnett, G. Davey, A. Patrick та ін.], 2011. – С. 143–148.

37. Evaluation of a new culture medium for the enumeration and isolation of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* from cheese / N. Shani, D. Isolini, D. Marzohl, H. Berthoud. // *Food Microbiology*. – 2020. – 95:103672.
38. Guevarra R. Viable Counts of Lactic Acid Bacteria in Philippine Commercial Yogurts / R. Guevarra, V. Barraquio. // *International Journal of Dairy Processing & Research (IJDPR)*. – 2015. – №2. – C. 24–28.
39. New Insights into Various Production Characteristics of *Streptococcus thermophilus* Strains / Yanhua Cui, Tingting Xu, Tingting Xu та ін.]. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – 17 (10).
40. Metabolic Profiles of Carbohydrates in *Streptococcus thermophilus* During pH-Controlled Batch Fermentation / Gefei Liu, Yali Qiao, Yanjiao Zhang та ін.]. // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – №11.
41. Production of the exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus*: Effect of growth conditions on fermentation kinetics and intrinsic viscosity / C. Shene, N. Canquil, S. Bravo, M. Rubilar. // *International Journal of Food Microbiology*. – 2008. – №124. – C. 279–284.
42. Proteolytic System of *Streptococcus thermophilus* / Gabriela Mariana Rodríguez-Serrano, Jose Mariano Garcia-Garibay, Alma Elizabeth Cruz-Guerrero та ін.]. // *J. Microbiol. Biotechnol.*. – 2018. – №28. – C. 1581–1588.
43. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus* / [A. Bolotin, B. Quinquis, P. Renault та ін.]. // *Nature Portfolio*. – 2004. – №12. – C. 1554–1558.
44. Delorme C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus* / Christine Delorme. // *International Journal of Food Microbiology*. – 2008. – №126. – C. 274–277.
45. Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk / Katherine M. Hunt, James A. Foster, Larry J. Forney та ін.]. // *PLoS One*. – 2011. – №6.
46. Use of the dynamic gastro-intestinal model TIM to explore the survival of the yogurt bacterium *Streptococcus thermophilus* and the metabolic activities induced

- in the simulated human gut / [O. Uriot, W. Galia, A. Awussi та ін.]. // Food Microbiology. – 2016. – №53. – С. 18–29.
- 47.Figueiredo A. Cooperation and Conflict Within the Microbiota and Their Effects On Animal Hosts / A. Figueiredo, J. Kramer. // Frontiers in Ecology and Evolution. – 2020. – №8.
- 48.The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli / Rimantas Sapranaukas, Giedrius Gasiunas, Christophe Fremaux та ін.]. // Nucleic Acids Research. – 2011. – №39. – С. 9275–9282.
- 49.The genomic basis of the Streptococcus thermophilus health-promoting properties / Emeline Roux, Aurélie Nicolas, Florence Valence та ін.]. // BMC Genomics. – 2022. – №23.
- 50.Antimicrobial susceptibility of Streptococcus gallolyticus isolated from humans and animals / Ryohei Nomoto, Le Hong Thuy Tien, Tsutomu Sekizaki, Ro Osawa. // Jpn J Infect Dis.. – 2013. – №66.
- 51.Antibiotic Resistance Profile of Indigenous Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus Strains Isolated from Traditional Yogurt / Bahareh Moghimi, Maryam Ghobadi Dana, Reza Shapouri, Maryam Jalili. // Journal of Food Quality. – 2023.
- 52.Ana B. Flórez. Antibiotic Resistance-Susceptibility Profiles of Streptococcus thermophilus Isolated from Raw Milk and Genome Analysis of the Genetic Basis of Acquired Resistances / Ana B. Flórez, Baltasar Mayo. // Front Microbiol.. – 2017. – №8.
- 53.ДСТУ 4834:2007 Молоко та молочні продукти. Правила приймання, відбирання та готування проб до контролювання.
- 54.ТУ У 24.4-21615987-001:2009 Набір дисків з антибіотиками для визначення чутливості мікроорганізмів до лікарських засобів.
- 55.Реєстраційне посвідчення лікарського засобу "Ентеросгель" № UA/4415/02/01/.
- 56.ДСТУ ISO 3696:2003 Вода для застосовування в лабораторіях. Вимоги та методи перевіряння (ISO 3696:1987, IDT).

- 57.ДСанПіН 2.2.4-171-10 Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною.
- 58.ДСТУ ISO 6887-1:2003 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Готування досліджуваних проб, вихідної суспензії та десятикратних розведень для мікробіологічного досліджування. Частина 1. Загальні правила готування вихідної суспензії та десятикратних розведень (ISO 6887-1:1999, IDT).
- 59.ДСТУ 4221:2003 Спирт етиловий ректифікований. Технічні умови. Зміна № 1. Поправка № 1.
- 60.ДСТУ 4273:2015 Молоко та вершки сухі. Загальні технічні умови.
- 61.Ентерокок селективний агар по Slanetz-Bartley для мембранного фільтрування підст., 500 г [Електронний ресурс] // ТОВ «ХІМЛАБОРРЕАКТИВ» – Режим доступу до ресурсу: <https://shop.hlr.ua/ua/enterokokk-selektivnyy-agar-po-slanetz-bartley-dlya-membrannogo-filtrovaniya-osnovan-500-g-235984.html>.
- 62.ДСТУ ISO 6887-1:2003 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Готування досліджуваних проб, вихідної суспензії та десятикратних розведень для мікробіологічного досліджування. Частина 1. Загальні правила готування вихідної суспензії та десятикратних розведень (ISO 6887-1:1999, IDT).
- 63.ДСТУ 7999:2015 Продукти харчові. Методи визначання молочнокислих бактерій.
- 64.ДСТУ ISO 9232/IDF 146:2012 Йогурт. Ідентифікація характерних мікроорганізмів (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* та *Streptococcus thermophilus*) (ISO 9232:2003 (IDF 146:2003), IDT).
- 65.ДСТУ ISO 6887-1:2003 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Готування досліджуваних проб, вихідної суспензії та десятикратних розведень для мікробіологічного досліджування. Частина 1. Загальні правила готування вихідної суспензії та десятикратних розведень (ISO 6887-1:1999, IDT)

- 66.ISO 7889:2003 | IDF 117:2003 Yogurt — Enumeration of characteristic microorganisms — Colony-count technique at 37 degrees C.
- 67.Methods for General and Molecular Microbiology / C. A. Reddy, Terry J. Beveridge, John A. Breznak, George Marzluf. – Вашингтон: American Society for Microbiology Press, 2007. – 1069 с.
- 68.ДСТУ 7357:2013 Молоко та молочні продукти. Методи мікробіологічного контролювання.
- 69.Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. – М: Пищ.промышл. – 1975. – 255с.
- 70.Вивчення специфічної активності антифунгальних лікарських засобів. Методичні рекомендації / ДФЦ МОЗ України; уклад.: Ю. Л. Волянський, І. С. Гриценко, В. П. Широбоков та ін. Київ. 2018. 38 с.
- 71.ДСТУ EN ISO 20776-1:2014 Клінічні лабораторні дослідження та тест-системи для діагностики in vitro. Випробування чутливості інфекційних агентів та оцінювання характеристик засобів для випробування антимікробної чутливості. Частина 1. Референтний метод випробування in vitro активності антимікробних агентів щодо аеробних мікроорганізмів, які швидко ростуть, збудників інфекційних захворювань (EN ISO 20776-1:2006, IDT)
- 72.ISO 10932:2010 | IDF 223:2010 Milk and milk products — Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB).
- 73.Школетей О., Первинний відбір мікроміцетів з β -галактозидазною активністю. – Мікроб. журнал. – 1973. - №2. – С. 155 – 156.
- 74.Лабораторний практикум з технології молока та молочних продуктів / З.С.Соколова, Л. В. Чекулаєва, Н. К. Ростроса, Л. І. Лакомова, В. Г. Тиняков.— М: Легка та харчова.промисловість, 1984. - 216 с.
- 75.Методи аналізу молока та молочних продуктів / Ініхов Г.С., Бріо Н.П.- 3-во “Пищ.промисл.” - 1971. - 423с.

- 76.Лапач С.М., Чубенко О.В., Бабіч П.М.Статистичні методи у медико-біологічних дослідженнях з використанням Excel.- Київ: Моріон, 2001. - 408 с.
- 77.Ali Z., Bhaskar S.B. Basic statistical tools in research and data analysis // Indian J Anaesth. 2016. Vol. 60, № 9. P. 662.
- 78.Касьянова Н.О., Скорченко Т.А. Дослідження реологічних властивостей кисломолочних десертів з натуральними соками // Молочна промисловість – 2004. - №1. С. 20-23.
- 79.Гарда, С.О.Визначення стійкості до антибіотиків перспективних штамів для пробіотиків /С.О. Гарда, С.Г. Даниленко, Г.С. Литвинов. // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2013. – № 3. – С. 24-27
- 80.ДСП 9.9.5.-080-02 Державні санітарні правила та норми, гігієнічні нормативи. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю.
- 81.Особливості дотримання техніки безпеки при роботі в біохімічній та хімічній лабораторіях: навч. посібник для студентів та викладачів вузів / К. В. Александрова, В. М. Швець, М. В. Дячков, Д. А. Васильєв. - Запоріжжя: [ЗДМУ], 2017. – 76 с.
- 82.М. Ціник. Біобезпека та охорона праці / М. Ціник, О. Бесараб, В. Мотроненко. // Біомедична інженерія і технологія. – 2021. – №5. – С. 52–58.