

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА КАРПАТСЬКОГО РЕГІОНУ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

КУШНІР ІРИНА ІГОРІВНА

УДК 606:637.3:637.055

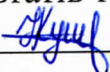
**ДИСЕРТАЦІЯ**

РОЗРОБЛЕННЯ ЗАКВАШУВАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ  
МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ *ENTEROCOCCUS*, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ТРАДИЦІЙНОЇ  
КАРПАТСЬКОЇ БРИНЗИ

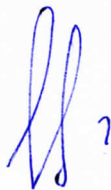
204 Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва  
20 Аграрні науки та продовольство

Подається на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 Ірина КУШНІР

Науковий керівник:



Орися ЦСАРИК,  
доктор сільськогосподарських наук,  
професор

Оброшине – 2023

## АНОТАЦІЯ

**Кушнір І. І. Розроблення заквашувального препарату із використанням мікроорганізмів роду *Enterococcus*, виділених із традиційної карпатської бринзи.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю: 204 Технології виробництва і переробки продукції тваринництва (20 Аграрні науки та продовольство) – Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, Львів, 2023, Інститут сільського господарства Карпатського регіону НААН України, Оброшине, 2023

Дисертаційна робота присвячена розробленню заквашувального препарату, виготовленого на основі молочнокислих бактерій (МКБ), виділених з природних екзотів і призначеного для виготовлення бринзи.

На початковому етапі розроблення заквашувального препарату вивчали пробіотичні та технологічні властивості *E. durans*, SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20, виділених традиційної карпатської бринзи.

Встановлено, що досліджувані штами ентерококів проявляли різну антагоністичну активність до умовно-патогенної мікрофлори, зокрема, *E. coli*, *S. enteritidis*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, проте до грам-позитивних мікроорганізмів (*S. aureus*) антагоністичної дії не встановили. Із збільшенням температури культивування ентерококів (20, 30 і 37°C) зростала їх антагоністична активність. Зокрема, найоптимальнішою температурою культивування була 37°C. За таких умов штам *E. durans* SB18 проявив найбільш виражену антагоністичну активність до усіх досліджуваних грам-негативних мікроорганізмів, у тому числі *P. aeruginosa*.

Досліджувані штами виявилися чутливими до широкого спектру антимікробних препаратів, за винятком гентаміцину, стрептоміцину, канаміцину та пеніцилінів. Важливо, що усі штами ентерококів були чутливими до ванкоміцину. За умови сумісного культивування ентерококів з умовно-патогенними мікроорганізмами виявили різний вплив на підвищення їх чутливості до антибіотиків. Наприклад, штами *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18 підвищували чутливість *S. aureus* до гентаміцину, відповідно, на 16,2 та 14,8%, а сумісне культивування *S. aureus* з ентерококами не впливало на зміну чутливості до амоксициліну. При цьому вираженіший вплив на зміну чутливості проявив штам *E. durans* SB18. Штам *E. durans* SB18 сприяв підвищенню чутливості *S. aureus* до ванкоміцину.

Виділені з традиційної карпатської бринзи штами ентерококів у різних кількостях синтезували біологічно активні речовини. Встановлено, що штам *E. durans* SB18 синтезує найбільшу кількість амінокислот, зокрема, незамінні амінокислоти – лізин, третіонін та лейцин+ізолейцин, концентрація яких була вищою, відповідно, на 10,3, 39,5 ( $p < 0,05$ ) та 5,8 %, а також замінні амінокислоти серин та гліцин, концентрація яких була, відповідно, на 30,0 та 16,2 % ( $p < 0,01$ ) вищою порівняно до контролю. Ентерококи синтезували вітаміни групи В, з-посеред яких найбільше В<sub>1</sub>, концентрація якого збільшувалась від 8,5 до 10 разів ( $p < 0,001$ ), у значних кількостях синтезують також вітаміни В<sub>3</sub>, та В<sub>5</sub>.

Встановлено, що усі досліджувані штами продукували у незначній кількості оцтову та пропіонову кислоти, проте тільки штам *E. durans* SB18 був здатний до синтезу молочної кислоти, зокрема, її концентрація вірогідно підвищувалась у 2,6 рази ( $p < 0,01$ ) порівняно до контролю.

Токсико-біологічними дослідженнями встановлено, що досліджувані штами ентерококів не патогенні, не інфекційні, не володіють каталазною активністю, не продукують лецитиназу, плазмокоагулазу та фібринолізин, що дає змогу віднести ці мікроорганізми до нешкідливих для макроорганізму.

Досліджувані штами проявляли високі технологічні властивості, зокрема, штами *E. durans* SB20 та SB18 проявили найкращі кислотоуворювальні властивості, оскільки були здатними знижувати рН середовища при їх культивуванні як на 24 год, так і на 48 год за різних температурних режимів, при цьому значення рН сягало 5 одиниць і менше. Крім того, досліджувані ентерококи по-різному накопичували біомасу, при цьому відзначено як міжвидову, так і міжштамову різницю. Найвищу інтенсивність росту за температури культивування 37°C спостерігали при культивуванні штамів *E. durans* SB18 та SB6. Штами ентерококів проявили високу солестійкість.

Ентерококи добре переносили несприятливі умови травного тракту, зокрема, виживали та розмножувались в умовах різних значень рН середовища та жовчі. Встановлено, що із досліджуваних чотирьох штамів ентерококів при показнику рН 4 два штами *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 виживали та проявляли добрі ростові властивості. При культивуванні штамів *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 за значення рН 5 оптична густина середовища була вищою, відповідно, у 9,8 та 10,8 рази ( $p < 0,001$ ). Ці самі штами проявили найкращі ростові властивості і за рН 6 та 7 одиниць. За культивування досліджуваних штамів ентерококів у середовищі із 20 та 40% жовчі та високих концентрацій Натрію хлориду (від 3 до 6,5%), вони упродовж 21 доби зберігали свою життєздатність.

Для створення заквашувального препатату з метою надання готовому продукту функціональних властивостей було використано перспективні для промисловості культури молочнокислих бактерій *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18, виділені з традиційної карпатської бринзи і які характеризувалися високими антагоністичними та технологічними властивостями. На основі цих штамів розробили п'ять композицій МКБ у різних співвідношеннях *L. lactis*, *Lb. plantarum* і *E. durans*: № 1 (50:25:25), № 2 (33:33:33), № 3 (50:40:10), № 4 (50:10:40), № 5 (70:15:15). При цьому встановили, що досліджувані штами МКБ не проявили міжвидового

антагонізму. Підтвердженням сумісності культивування МКБ була інтенсивність накопичення біомаси, активність кислотоутворення та антагоністична активність до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори. Так, за температури 37°C вища інтенсивність росту встановлена при культивуванні композицій № 1, № 2 та № 3, зокрема, оптична густина зростала, відповідно, у 17,9, 17,8 та 18,1 ( $p < 0,001$ ) рази порівняно до контролю. Однак, найкращі кислотоутворювальні властивості проявили композиції № 1, № 3 та № 5 за температури 32°C. За спільного культивування різних композицій МКБ за температури 32 та 37°C було встановлено, що всі композиції володіли помірною активністю щодо умовно-патогенних мікроорганізмів. Необхідно відзначити, що найвищу антагоністичну активність проявила композиція МКБ № 3. Для подальших досліджень вибрано композицію № 3 – *L. lactis*: *Lb. plantarum*: *E. durans* SB18 у співвідношенні 50:40:10.

При визначенні пробіотичних властивостей сформованої композиції МКБ встановили позитивний вплив на кровотворну функцію організму лабораторних тварин (білих щурів). Так, за 14 добового застосування композиції вірогідно зросла концентрація гемоглобіну, кількість еритроцитів, лейкоцитів та величина гематокриту, відповідно, на 14,9, 14,7, 22,5 ( $p < 0,05$ ) та 5,7 %. Застосування композиції МКБ стимулювало збільшення лакто- та біфідобактерій вмістимого товстого відділу кишечника білих щурів і сприяло вірогідному зменшенню чисельності умовно-патогенної та гнильної мікрофлори.

Застосування композиції МКБ упродовж усього періоду експерименту викликало інгібуючий вплив на інтенсивність процесів ПОЛ, що у свою чергу, призвело до зниження вмісту ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів. Зокрема, на 14-ту добу застосування консорціуму МКБ вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів знизився, відповідно, на 6,1 та 4,1%, а на 21-шу добу – на 14,9 та 22,1% ( $p < 0,01$ ). Застосування композиції МКБ спричинило зростання ЛАСК та зниження рівня ЦК. Поряд з цим, на 21-шу добу експерименту встановлено тенденцію до зниження вмісту загальних

ліпідів у тканині печінки щурів дослідної групи. Також у печінці щурів дослідної групи виявили менший вміст неестерифікованого холестеролу та більший – фосфоліпідів. У тварин дослідної групи вірогідно меншим було співвідношення між неестерифікованим холестеролом і фосфоліпідами. Тенденція до зниження рівня неестерифікованих жирних кислот і триацилгліцеролів вказує на позитивний вплив композиції МКБ на обмін ліпідів у печінці.

Враховуючи високі пробіотичні та технологічні характеристики композиції МКБ, на її основі розроблено заквашувальний пробіотичний препарат, який отримав назву «Ентероплан». У склад препарату входять такі штами МКБ: *L. lactis ssp. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18 у співвідношенні 50:40:10.

Бринза, виготовлена з використанням заквашувального препарату «Ентероплан» (*L. lactis*, *Lb. plantarum*, *E. durans*), порівняно із бринзою, виготовленою із препаратом RSF (Chr. Hansen), має вираженіший, більш насичений, вершковий смак та аромат і кращу консистенцію, що пов'язано із залученням виділених із традиційної карпатської бринзи мікроорганізмів, які в процесі своєї життєдіяльності сформували кращі органолептичні характеристики сиру. За результатами бальної оцінки бринзи за смаком, запахом та консистенцією дослідний зразок отримав 87 балів, а контрольний – 84. Під час процесу визрівання чисельність молочнокислої мікрофлори у дослідному зразку бринзи, виготовленому із заквашувальним препаратом «Ентероплан», була у 1,5-2 рази вищою порівняно з контрольним зразком. З огляду на це, заквашувальний препарат «Ентероплан» можна використовувати у технології бринзи у промислових умовах.

На основі одержаних результатів розроблено технічні умови України ТУ У 10.5–00492990–028:2021 затверджено ТК 132 Держспоживстандарту України «Засоби захисту тварин, корми і кормові добавки».

Наукову новизну досліджень підтверджено патентом України на корисну

модель «Спосіб визначення штамів ентерококів для створення пробіотичної закваски», № 202101868; заявл. 09.04.2021; опубл. 13.10.2021. Бюл. № 41.

**Ключові слова:** молочнокислі бактерії, ентерококи, молоко, антибіотикорезистентність, пробіотики, бактеріальні препарати, біологічна дія, сир, органолептична оцінка.

## ANNOTATION

**Kushnir I. I. Development of a starter preparation using microorganisms of *Enterococcus* isolated from traditional Carpathian cheese.** – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation on obtaining an educational and scientific degree of Doctor of Philosophy in the specialty 204 Technology of production and processing of animal husbandry products (20 Agricultural sciences and food). – Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies of Lviv, Lviv, 2023, Institute of Agriculture of the Carpathian Region of the National Academy of Sciences of Ukraine, Obroshyne, 2023.

The dissertation is devoted to the development of a starter preparation made on the basis of lactic acid bacteria (LAB) isolated from natural econishes and intended for the production of cheese.

At the initial stage of development of the starter preparation, were studied the probiotic and technological properties of *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 and *E. durans* SB20 isolated from traditional Carpathian cheese.

It was established that the studied strains of enterococci showed different antagonistic activity to opportunistic microflora, in particular, *E. coli*, *S. enteritidis*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, but to the gram-positive microorganisms (*S. aureus*) antagonistic activity have not been established. As the temperature of cultivation of enterococci increased (20, 30 and 37°C), their antagonistic activity also

increased. In particular, the most optimal cultivation temperature was 37°C. Under these conditions, the *E. durans* SB18 strain showed the most pronounced antagonistic activity against all tested gram-negative microorganisms, including *P. aeruginosa*.

The studied strains were sensitive to a wide range of antimicrobial drugs, with the exception of gentamicin, streptomycin, kanamycin and penicillins. Importantly that all strains of enterococci were susceptible to vancomycin. Under conditions of simultaneous cultivation of enterococci with opportunistic microorganisms were found different effects on increasing their sensitivity to antibiotics. For example, strains of *E. faecium* SB12 and *E. durans* SB18 increased the sensitivity of *S. aureus* to gentamicin by 16,2 and 14,8%, respectively, and the co-cultivation of *S. aureus* with enterococcus did not affect the change in sensitivity to amoxicillin. At the same time, the *E. durans* SB18 strain showed a more pronounced effect on the change in sensitivity. The *E. durans* SB18 strain contributed to increasing the sensitivity of *S. aureus* to vancomycin.

Strains of enterococci isolated from traditional Carpathian cheese in different quantities synthesized biologically active substances. It was established that the *E. durans* SB18 strain synthesizes the largest amount of amino acids, in particular, essential amino acids – lysine, trethionine and leucine + isoleucine, the concentration of which was higher, respectively, by 10,3, 39,5 ( $p < 0.05$ ) and 5,8%, and also non-essential amino acids serine and glycine, the concentration of which was, respectively, 30,0 and 16,2% ( $p < 0.01$ ) higher compared to the control. Enterococci synthesized vitamins of group B, among which vitamin B<sub>1</sub> the most. The concentration of vitamin B<sub>1</sub> increased from 8,5 to 10 times ( $p < 0.001$ ), vitamins B<sub>3</sub> and B<sub>5</sub> are also synthesized in significant quantities.

It was found that all studied strains produced small amounts of acetic and propionic acids, but only the *E. durans* SB18 strain was capable to synthesize lactic acid, in particular, it's concentration probably increased by 2,6 times ( $p < 0.01$ ) compared to the control.

Toxico-biological studies have established that the studied strains of enterococci are not pathogenic, not infectious, do not have catalase activity, do not produce lecithinase, plasma coagulase, and fibrinolysin, which makes it possible to classify these microorganisms as harmless to the macroorganism.

The studied strains showed high technological properties, in particular, *E. durans* SB20 and SB18 strains showed the best acid-forming properties, as they were able to reduce the pH of the medium during their cultivation as on 24 h and 48 h under different temperature regimes, herewith the pH value reached 5 units and less. In addition, the investigated enterococci accumulated biomass in different ways, and also there were noted interspecies and interstrain differences. The highest growth intensity by the cultivation temperature of 37°C was observed in the cultivation of strains *E. durans* SB18 and SB6. Enterococci strains showed high salt resistance.

Enterococci tolerated the adverse conditions of the digestive tract well, in particular, they survived and multiplied in conditions of different pH values of the environment and different concentration of bile. It was established that out of the four studied strains of enterococci at pH 4, two strains *E. durans* SB18 and *E. durans* SB20 survived and showed good growth properties. When *E. durans* SB18 and *E. durans* SB20 strains were cultivated at pH 5, the optical density of the medium was in 9.8 and 10.8 times higher, respectively ( $p < 0.001$ ). The same strains showed the best growth properties at pH 6 and 7 units. When the studied enterococci strains were cultivated in a medium with 20 and 40% bile and high concentrations of sodium chloride from 3 to 6.5%, they maintained their viability for 21 days.

To create starter preparation in order to give the finished product functional properties perspective for industry cultures of lactic acid bacteria *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 and *E. durans* SB18, isolated from traditional Carpathian cheese and which were characterized by high antagonistic and technological properties were used. On the basis of these strains five LAB compositions in different ratios of *L. lactis*, *Lb. plantarum* and *E. durans*: No. 1 (50:25:25), No. 2 (33:33:33), No. 3 (50:40:10), No. 4 (50:10:40), No. 5 (70:15:15 were

developed. At the same time, it was established that the studied strains of the LAB did not show interspecies antagonism. The compatibility of the cultivation of LAB was confirmed by the intensity of biomass accumulation, activity of acid formation and antagonistic property to pathogenic and opportunistic microflora.

Thus, at a temperature of 37°C, a higher intensity of growth was established during the cultivation of compositions №. 1, №. 2, and №. 3, in particular, the optical density increased, respectively, by 17,9, 17,8, and 18,1 times ( $p < 0.001$ ) compared to the control. However, compositions №. 1, №. 3, and № 5 showed the best acid-forming properties at a temperature of 32°C. During the co-cultivation of different compositions of LAB at temperatures of 32°C and 37°C, it was established that all compositions had moderate activity against opportunistic microorganisms. It should be noted that composition of LAB № 3 showed the highest antagonistic activity. For further studies, composition № 3 was chosen – *L. lactis*: *Lb. plantarum*: *E. durans* SB18 in the ratio: 50:40:10.

In determining the probiotic properties of the formed composition of the LAB, was established a positive effect on the hematopoietic function of the body of laboratory animals (white rats). Thus, during 14 daily use of the composition, the concentration of hemoglobin, the number of erythrocytes, leukocytes, and hematocrit increased by 14,9, 14.7, 22,5 ( $p < 0,05$ ), and 5.7%, respectively. The use of the composition of the LAB stimulated the increase of lacto- and bifidobacteria in the contained large intestine of white rats and contributed to a probable decrease the number of opportunistic and putrefactive microflora.

The use of the LAB composition during the all period of the experiment caused an inhibitory effect on the intensity of lipid peroxidation processes, which in turn led to a decrease in the content of thiobarbituric-active products and lipid hydroperoxides. In particular, on the 14th day of application of the LAB consortium, the content of thiobarbituric-active products and lipid hydroperoxides decreased, respectively, by 6,1 and 4,1%, and on the 21st day - by 14,9 and 22,1% ( $p < 0.01$ ). The use of the composition of the LAB caused an increase in lysozyme activity of blood

serum and a decrease in the level of circulating immune complexes. Along with this, on the 21st day of the experiment a tendency to decrease the content of total lipids in the liver tissue of rats of the experimental group was established. Also, in the liver of rats of the research group a lower content of non-esterified cholesterol and a higher content of phospholipids were found. In the animals of the experimental the ratio between non-esterified cholesterol and phospholipids group was probably lower. The tendency to decrease the level of non-esterified fatty acids and triacylglycerols indicates on the positive effect on lipid metabolism in the liver.

Taking into account the high probiotic and technological characteristics of the composition of the LAB, on its basis was developed a starter probiotic preparation, which was named "Enteroplan". The composition of the preparation includes the following strains of the LAB: *L. lactis ssp. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 and *E. durans* SB18 in a ratio of 50:40:10.

Bryndza – cheese made with the use of the starter "Enteroplan" (*L. lactis*, *Lb. plantarum*, *E. durans*), compared to cheese made with the preparation RSF (Chr. Hansen), has a more pronounced, richer, creamier taste and aroma and better consistency, which is connected with the involvement of microorganisms isolated from the traditional Carpathian cheese, which in the process of their vital activity formed the best organoleptic characteristics of the cheese. According to the results of the point evaluation of bryndza based on taste, smell and consistency, the test sample received 87 points, and the control sample received 84 points. During the ripening process, the number of lactic acid microflora in the test sample of cheese, which was made with the starter "Enteroplan" was 1.5-2 times higher compared to the control sample. In view of this, the starter «Enteroplan» can be used in the technology of brynza in industrial conditions.

Based on the obtained results, the technical conditions of Ukraine (TU U) 10.5–00492990–028:2021 were developed, TC 132 of the State Consumer Standard of Ukraine «Animal protection products, feed and feed additives» was approved.

The scientific novelty of the research is confirmed by the patent of Ukraine for

the utility model «Method of determining strains of enterococci for the creation of probiotic starter», No. u 202101868; statement 04/09/2021; publ. 13.10.2021. Bul. №. 41.

**Key words:** *lactic acid bacteria, enterococci, milk, antibiotic resistance, probiotics, bacterial preparation, biological action, cheese, organoleptic evaluation.*

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті в наукових виданнях, включених до переліку фахових видань

#### України:

1. The ability of enterococci extracted from traditional Carpathian cheese bryndza to produce biologically active substances / **I. I. Kushnir**, O. Y. Tsisaryk, S. H. Shalovylo, B. V. Gutyj, G. V. Kushnir, I. M. Slyvka, L. Y. Musiy. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*. 2020. V. 3 (3). С. 15–19. DOI: <https://doi.org/10.32718/ujvas3-3.03> (Здобувачка провела дослідження та підготувала статтю до публікації).

2. Інтенсивність росту та антибактеріальні властивості штамів *Enterococcus faecium* та *Enterococcus durans*, виділених із традиційної карпаської бринзи / **I. I. Кушнір**, О. Й. Цісарик, І. М. Сливка, Л. Я. Мусій, І. М. Кушнір, І. С. Семен. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки*. 2020. Т. 22, № 92. С. 42–49. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9208> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

3. **Кушнір І. І.** Вивчення патогенних властивостей ентерококів виділених із карпатської бринзи. *Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і інституту біології тварин*. 2020. Вип. 21, № 1. С. 119–125. DOI: <https://doi.org/10.36359/scivp.2020-21-1.14>

4. Властивості сформованих композицій пробіотичних штамів, виділених із карпатської бринзи / **I. I. Кушнір**, О. Й. Цісарик, І. М. Кушнір, І. С. Семен, І. М. Сливка, Л. Я. Мусій. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького*.

*Серія: Сільськогосподарські науки. 2020. Т. 22, № 93. С. 119–125. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9320> (Здобувачка провела дослідження та підготувала статтю до публікації).*

5. **Кушнір І. І.** Вплив рН і різних концентрацій солі та жовчі на ріст ентерококів, виділених з природних еконіш. *Збірник наукових праць «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»*. 2020. № 2 (158). С. 76–81. DOI: <https://doi.org/10.33245/2310-9289-2020-158-2-76-81>

6. **Кушнір І. І., Цісарик О. Й.** Вплив розробленої композиції молочнокислих бактерій, виділених із карпатської бринзи, на організм лабораторних тварин. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки. 2021. Т. 23, № 94. С. 9–15. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9402> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*

7. Цісарик О. Й., **Кушнір І. І.** Вміст ліпідів печінки щурів за дії композиції молочнокислих бактерій, виділених із традиційної карпатської бринзи. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування. 2021. № 7. С. 167–173. DOI: <https://doi.org/10.31890/vttp.2021.07.26> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*

8. Вплив ентерококів на чутливість умовно-патогенної мікрофлори до антибіотиків / **І. І. Кушнір**, І. С. Семен, О. Й. Цісарик, І. М. Кушнір. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки. 2021. Т. 23, № 95. С. 25–28. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9503> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).*

9. Технологія виготовлення бринзи з коров'ячого молока із застосуванням заквашувального препарату «Ентероплан» / **І. І. Кушнір**, О. Й. Цісарик, І. М. Кушнір, І. В. Скульська. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки. 2022. Т. 24, № 96. С. 9–15.*

DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9602> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

#### **Стаття в зарубіжному фаховому виданні:**

10. **Kushnir I. I.**, Tsisaryk O. Y. Antioxidant system of rats by the influence of composition of bacteria isolated from traditional carpathian cheese bryndza. *Poland, Colloquium-journal*. 2021. № 7 (94). P. 27–30. DOI: 10.24412/2520-6990-2021-794-27-29 (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

#### **Статті включені до наукових періодичних виданнях, які індексуються в наукометричних базах Scopus та/або Web of Science:**

11. Antagonistic activity of strains of lactic acid bacteria isolated from Carpathian cheese / L. Y. Musiy, O. Y. Tsisaryk, I. M. Slyvka, **I. I. Kushnir**. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020. Vol. 11, № 3. P. 572–578. DOI: <https://doi.org/10.15421/02201104> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

12. Identification and investigation of properties of strains *Enterococcus spp.* isolated from artisanal Carpathian cheese / I. Slyvka, O. Tsisaryk, L. Musii, **I. Kushnir**, M. Koziorowcki, A. Koziorowcka. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2022. Vol. 39. P. 102259. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102259> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

#### **Патенти України на корисну модель:**

13. **Кушнір І. І.**, Цісарик О. Й., Кушнір І. М., Сливка І. М., Гутий Б. В., Кушнір В. І., Семен І. С. Спосіб визначення штамів ентерококів для створення пробіотичної закваски: пат. 149039 Україна: МПК А23С 9/13 (2006.01), С12N 1/20 (2006/01). u202101868; заявл. 09.04.2021; опубл. 13.10.2021, Бюл. № 41. 5 с. (Здобувачка експериментально обґрунтувала спосіб визначення штамів ентерококів для створення пробіотичної закваски та підготувала матеріал для патенту).

### **Наявність завершеної наукової розробки:**

#### **Технічні умови:**

14. Цісарик О. Й., **Кушнір І. І.** Препарат заквашувальний «Ентероплан». Технічні умови ТУ У 10.5–00492990–028:2021. 22 с. *(Здобувачка брала участь у проведенні дослідів, оформленні технічних умов).*

#### **Рекомендації:**

15. Визначення вмісту амінокислот у продуктах життєдіяльності молочнокислих бактерій методом капілярного електрофорезу (методичні рекомендації) / І. Я. Коцюмбас, Т. Р. Левицький, **І. І. Кушнір**, Г. П. Ривак, Г. В. Кушнір, Б. І. Назар, Г. Ю. Федор, О. М. Вільха, Т. І. Шарій, Г. Ю. Неділька. ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок, Львів. 2020. 24 с. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці методичних рекомендацій).*

#### **Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

16. **Iryna Kushnir**, Iryna Slyvka, Orysia Tsisaryk. Charakterystyka szczepów *Enterococcus faecium* wyizolowanych z bryndzy karpackiej. *Ogólnouczelniana sesja był naukowych* (8 kwiecień 2016). Krakow, Polska. 2016. P. 96. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку).*

17. Properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from traditional Carpathian ewe's cheese / O. Tsisaryk, I. Slyvka, L. Musiy, **I. Kushnir**, T. Bocer. *J. of Dairy Sci.* Pittsburgh, Pennsylvania. June 25–28, 2017. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку).*

18. **Кушнір І. І.**, Цісарик О. Й. Підбір молочнокислих бактерій, ізольованих з природних еконіш, для виготовлення кисловершкового масла геродієтичного призначення. «Дні студентської науки у національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького»: матеріали студентської конференції (м. Львів, 25–26 квітня 2018 р.). Львів, 2018.

Ч. 2. С. 108–110. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку)*

19. Результати дослідження генерації електричного струму ряду мікробіологічних об'єктів / І. Я. Коцюмбас, І. М. Кушнір, О. І. Білий, Т. З. Гречух, Я. П. Ференсович, **І. І. Кушнір**. «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8) (з виставкою розробок та промислових зразків сенсорів): 8ма Міжнародна науково-технічна конференція (м. Одеса, 28 травня – 1 червня 2018 р.). Одеса, 2018. С. 50 *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку)*.

20. Дослідження *in vitro* автохтонних штамів роду *Enterococcus*, виділених із традиційних карпатських продуктів / О. Цісарик, І. Кушнір, І. Сливка, Л. Мусій. «Молодь і поступ біології»: матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 27–29 квітня 2020 р.). Львів, 2020. С. 150–151. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку)*.

## ЗМІСТ

|                                                                                                                     | Стор. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ                                                               | 20    |
| ВСТУП                                                                                                               | 21    |
| РОЗДІЛ 1 ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ МКБ У                                                                             |       |
| ХАРЧОВІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ (огляд наукової літератури)                                                                  | 28    |
| 1.1. Роль мікрофлори у забезпеченні життєдіяльності макроорганізму                                                  | 28    |
| 1.2. Характеристика мікроорганізмів роду <i>Enterococcus</i>                                                        | 33    |
| 1.3. Лактобактерії та їх біолого-технологічні властивості                                                           | 46    |
| 1.4. Використання пробіотичних культур у технології функціональних молочних продуктів                               | 53    |
| Висновки до розділу 1                                                                                               | 69    |
| РОЗДІЛ 2 УМОВИ, МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИКА                                                                                |       |
| ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ                                                                                               | 72    |
| 2.1. Схема проведення досліджень                                                                                    | 72    |
| 2.2. Методи досліджень                                                                                              | 73    |
| 2.2.1. Вивчення антагоністичної активності ентерококів                                                              | 73    |
| 2.2.2. Визначення чутливості умовно-патогенної мікрофлори до антибіотиків за сумісного культивування з ентерококами | 74    |
| 2.2.3. Синтезування ентерококами біологічно-активних речовин                                                        | 75    |
| 2.2.4. Визначення токсиколого-біологічних властивостей ентерококів                                                  | 76    |
| 2.2.5. Дослідження технологічних властивостей ентерококів                                                           | 80    |
| 2.2.6. Вивчення технологічних властивостей консорціуму штамів МКБ                                                   | 81    |
| 2.2.7. Виготовлення бринзи із використанням пробіотичної закваски «Ентероплан»                                      | 82    |
| 2.2.8. Статистичні методи                                                                                           | 83    |
| Висновки до розділу 2                                                                                               | 84    |
| РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ                                                                    | 85    |

|                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1. Визначення пробіотичних властивостей штамів ентерококів, виділених з традиційної карпатської бринзи           | 85  |
| 3.1.1. Дослідження антагоністичної активності ентерококів                                                          | 85  |
| 3.1.2. Вивчення чутливості ентерококів до антибіотиків                                                             | 90  |
| 3.1.3. Вивчення здатності ентерококів синтезувати біологічно-активні речовини та органічні кислоти                 | 96  |
| 3.1.4. Токсиколого-біологічна оцінка ентерококів                                                                   | 102 |
| 3.2. Дослідження технологічних ентерококів                                                                         | 108 |
| 3.2.1. Кислотоуворювальні властивості ентерококів                                                                  | 108 |
| 3.2.2. Вивчення швидкості накопичення біомаси ентерококами                                                         | 110 |
| 3.2.3. Стійкість ентерококів до різних концентрацій Натрію хлориду                                                 | 112 |
| 3.2.4. Стійкість ентерококів до різних значень рН                                                                  | 113 |
| 3.2.5. Стійкість ентерококів до різних концентрацій жовчі                                                          | 115 |
| 3.3. Розробка заквашувального пробіотичного препарату та вивчення його ефективності                                | 117 |
| 3.3.1. Підбір штамів молочнокислих бактерій для конструювання пробіотичного заквашувального препарату              | 117 |
| 3.3.2. Вплив композиції консорціуму молочнокислих бактерій на організм лабораторних тварин                         | 122 |
| 3.3.3. Вплив композиції консорціуму молочнокислих бактерій на мікрофлору кишечника білих щурів                     | 127 |
| 3.3.4. Вплив композиції консорціуму молочнокислих бактерій на систему антиоксидантного захисту лабораторних тварин | 129 |
| 3.3.5. Дослідження ліпідів печінки щурів за дії композиції молочнокислих бактерій                                  | 131 |
| 3.3.6. Виготовлення бринзи із заквашувальним препаратом «Енетроплан» та дослідження її властивостей                | 135 |
| Висновки до розділу 3                                                                                              | 147 |
| РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ                                                                         |     |

|                                                        |     |
|--------------------------------------------------------|-----|
| ДОСЛІДЖЕННЯ                                            | 149 |
| ВИСНОВКИ                                               | 169 |
| РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОГО<br>ВИРОБНИЦТВА | 173 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ                             | 174 |
| ДОДАТКИ                                                | 221 |

**ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ**

|             |   |                                         |
|-------------|---|-----------------------------------------|
| <b>ГПЛ</b>  | — | гідроперокси́ди лі́підів                |
| <b>ЛАСК</b> | — | лізоци́мна активні́сть сироватки кро́ві |
| <b>МКБ</b>  | — | моло́чнокислі́ бакте́рії                |
| <b>МРС</b>  | — | Ман, Рогоза, Шарп                       |
| <b>МПБ</b>  | — | м'ясо-пептонний бульйон                 |
| <b>КУО</b>  | — | колоніеутворюва́льні одини́ці           |
| <b>ОМП</b>  | — | окисна модифіка́ція протеї́нів          |
| <b>ПОЛ</b>  | — | пероксидне окисне́ння лі́підів          |
| <b>СЗМЗ</b> | — | сухий знежирений молочний залишок       |
| <b>СОД</b>  | — | супероксиддисмута́за                    |
| <b>ТБК</b>  | — | тіобарбіту́рова кислота                 |
| <b>ТУ У</b> | — | Техні́чні умо́ви Украї́ни               |
| <b>ЦІК</b>  | — | циркулюю́чі імунні́ комплекси           |

## ВСТУП

Біотехнологія відноситься до галузі, яка постійно та динамічно розвивається і ґрунтується на використанні мікроорганізмів для різних виробництв [1]. Важливим напрямком розвитку харчової біотехнології є надання сировині нових властивостей, внаслідок чого забезпечується широкий асортимент харчових продуктів, їх висока якість та безпечність [2, 3, 4]. З огляду на це, у різних галузях харчової промисловості все частіше використовують молочнокислі бактерії. З одного боку, їх можна використовувати як стартові культури у технологічних процесах (формування структурно-органолептичних характеристик продуктів), з іншого – як природні консерванти вихідної сировини і готових виробів [5, 6].

Особлива увага приділяється функціональним молочним продуктам, де ключову роль відіграють пробіотичні мікроорганізми, а фізіологічна цінність безпосередньо залежить від використаного пробіотичного штаму. Проте, головною проблемою формування фізіологічної цінності функціональних молочних продуктів є відсутність чіткої ідентифікації штамів пробіотичних мікроорганізмів [7]. Відомо, що стабільність біотехнологічних властивостей штамів лактобактерій збільшується у композиціях [8], тому важливим є підбір різних штамів молочнокислих бактерій для конструювання пробіотичного препарату.

У молочній промисловості дуже часто використовують ентерококи, виділені з природних екотопів [9], які здатні витримувати різні температури, а також жорсткі умови харчотравного тракту людини і залишатися при цьому життєздатними упродовж тривалого часу [10]. Ці бактерії проявляють різносторонній позитивний вплив на здоров'я людини, зокрема, відновлюють баланс мікробіоти кишкового тракту після викликаного антибіотиками дисбіозу [11], проявляють бактерицидну [12] і антивірусну активність [13], протипухлинний ефект [14] імуномодулювальну дію [15].

Важливо відзначити, що ентерококи завдяки високій ферментативній активності надають продуктам харчування унікальних сенсорних характеристик, у результаті чого створюються продукти з особливими органолептичними властивостями [16].

У технологічних процесах виготовлення молочних продуктів важлива роль належить бактеріоцинам ентерококів, як інгібіторам патогенної мікрофлори [17], завдяки чому вони виконують роль природних консервантів.

Симбіотична мікрофлора людей, які проживають в регіонах з різними кліматичними умовами, раціонами харчування не є абсолютно однаковою. Тому слід приймати до уваги тісну взаємодію між мікрофлорою людини та екзогенним мікробним світом [18-21]. Відповідно, найефективнішими є пробіотики, основу яких складають штами мікроорганізмів, що циркулюють у певній місцевості.

**Актуальність теми.** Сьогодні у вітчизняній молочній промисловості для виробництва кисломолочних продуктів і сирів здебільшого використовуються імпорتنі бактеріальні заквашувальні препарати. Використання вітчизняних заквашувальних препаратів є вкрай обмеженим, хоча дослідники вказують на позитивну роль для здоров'я людини застосування пробіотичних препаратів, до складу яких входять штами бактерій, які ізолювані в нашій кліматичній зоні і сформовані в природних еконішах.

З огляду на це, актуальним є розроблення заквашувальних препаратів для потреб молокопереробної промисловості на основі місцевих штамів мікроорганізмів, виділених з природних еконіш. Принциповою перевагою вітчизняних пробіотиків є адаптованість штамів мікроорганізмів до певної популяції населення. При цьому існують особливості видового і штамового різноманіття консорціумів залежно від географії і джерела виділення, які формувалися упродовж століть у природних еконішах.

Прикладом такої еконіші є бринза, яка виробляється непромисловим способом із сирого овечого молока. Бактерії, ізолювані з природних еконіш,

проявляють високі технологічні та пробіотичні властивості. Однак, необхідно відзначити, що у біотехнології продуктів харчування використовуються комерційні штами мікроорганізмів, тому створення пробіотичних заквашувальних препаратів на основі українських біоваріантів фізіологічної мікрофлори, виділеної з природних еконіш, є актуальним та важливим питанням, яке є маловивченим.

Значний внесок у вивченні ентерококів як стартових заквашувальних культур внесли Цісарик О.Й., Сливка І. М., Мироненко Л. Г., Amaral D.M.F., Silva, Reuben R. C., Mirtha Lorena Giménez Pereira та інші, проте використання їх в якості пробіотичних заквашувальних препаратів залишається маловивченим та потребує поглибленого дослідження.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами та темами.**

Дисертаційна робота є частиною наукової тематики кафедри технології молока і молочних продуктів Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького «Розроблення технології інноваційних молочних продуктів функціонального та геродієтичного призначення» (№ держреєстрації 0121U110078, 2021-2025), відділу розведення, технологій утримання та годівлі тварин Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН, ПНД 9 «Використання аграрного ресурсовиробничого потенціалу Карпатського регіону в умовах реалізації євроінтеграційних пріоритетів» (№ держреєстрації 0121U100402, 2021-2023) та виконувалася у рамках госпдоговірної тематики «Розроблення заквашувального препарату для йогурту «Карпатський» із залученням штамів молочнокислих бактерій, виділених із традиційних карпатських продуктів».

**Мета і завдання досліджень.** Мета роботи – розроблення біотехнології заквашувального пробіотичного препарату на основі молочнокислих бактерій, виділених з традиційної карпатської бринзи та встановлення її біологічних та технологічних параметрів. Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

- вивчити антагоністичну активність, чутливість до антибіотиків ентерококів, виділених з традиційної карпатської бринзи, та їх вплив на чутливість до антибіотиків умовно-патогенних мікроорганізмів;
- дослідити здатність ентерококів продукувати біологічно активні речовини;
- встановити токсиколого-біологічну оцінку ентерококів;
- дослідити технологічні властивості ентерококів;
- визначити стійкість ентерококів до умов шлунково-кишкового тракту;
- створити композицію молочнокислих бактерій для пробіотичного заквашувального препарату;
- дослідити вплив сформованої композиції молочнокислих бактерій на гематологічні показники та функціональний стан організму лабораторних тварин;
- дослідити вплив пробіотичного препарату на антиоксидантний статус, гуморальні фактори захисту організму та обмін ліпідів у печінці лабораторних тварин;
- виготовити сир з використанням пробіотичного препарату на основі консорціуму молочнокислих бактерій та дослідити його властивості.

*Об'єкт дослідження* – біотехнологія пробіотичного бактеріального препарату для виробництва сирів.

*Предмет дослідження* – безпечність ентерококів, біологічні властивості ентерококів, технологічні показники ентерококів, формування консорціуму молочнокислих бактерій, вплив бактеріального препарату на організм лабораторних тварин, властивості бринзи, виготовленої із бактеріальним препаратом.

**Методи дослідження:** мікробіологічні, біохімічні, гематологічні, біотехнологічні, математично-статистичний аналіз.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше науково обґрунтовано та експериментально підтверджено біотехнологічні аспекти створення

пробіотичного заквашувального препарату «Ентероплан» на основі молочнокислих бактерій, виділених із карпатської бринзи із залученням проедставників роду *Enterococcus*. Досліджено антагоністичну активність, антибіотикорезистентність та доведено безпечність ентерококів. Показано високу біологічну активність продуктів метаболізму ентерококів та вивчено їх технологічні властивості. Розроблено композицію молочнокислих бактерій для виготовлення пробіотичного препарату, сконструйовано препарат та вивчено його вплив на гематологічні, біохімічні показники, імунний стан, ліпідний обмін та стан антиоксидантної системи організму лабораторних тварин. Досліджено властивості бринзи, виготовленої із препаратом «Ентероплан».

Наукову новизну досліджень підтверджено патентом України на корисну модель «Спосіб визначення штамів ентерококів для створення пробіотичної закваски», № u 202101868; заявл. 09.04.2021; опубл. 13.10.2021. Бюл. № 41.

**Практичне значення одержаних результатів.** Проведеними дослідженнями підтверджено необхідність розробки нового заквашувального препарату, виготовленого на основі консорціуму молочнокислих бактерій, зокрема *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS1.0728 та *E. durans* SB18 у співвідношенні 50:40:10, виділених з природних еконіш. На основі проведених досліджень вивчено технологічні параметри ентерококів, такі як стійкість до низьких значень рН середовища, стійкість до високих концентрацій солі та жовчі, кислотоутворювальна здатність і відібрано найоптимальніший штам та досліджено технологічні властивості новоствореного препарату із його залученням.

Прикладне значення отриманих результатів досліджень полягає в обґрунтуванні можливості застосування препарату «Ентероплан» для виробництва сиру (бринзи).

На основі проведених досліджень розроблено технічні умови України 10.5–00492990–028:2021 Заквашувальний препарат «Ентероплан», затверджені ТК 132 Держспоживстандарту України «Засоби захисту тварин, корми і кормові

добавки» та методичні рекомендації з визначення вмісту амінокислот у продуктах життєдіяльності молочнокислих бактерій методом капілярного електрофорезу, затверджені ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок, 2020.

Матеріали дисертаційної роботи використовуються в освітньому процесі та науково-дослідницькій роботі студентів спеціальності «Харчові технології» Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантка самостійно проводила пошук і аналіз літературних джерел за темою роботи, підбір методів та методик, експериментальних та лабораторних досліджень, статистичну обробку та аналіз і узагальнення отриманих результатів. Програму наукових досліджень, інтерпретацію одержаних результатів, оформлення висновків дисертації, практичні рекомендації проведено під керівництвом наукового керівника. Особистий внесок у наукові праці, опубліковані у співавторстві, визначено у списку друкованих праць.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на засіданнях вченої ради Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, на Міжнародній конференції «Дні студентської науки у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького». – Львів, 12-13 травня 2016; на сесії Ogólnouczelniana sesja koł naukowych – Krakow, 2016; Студентської конференції «Дні студентської науки у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького» – Львів, 25-26 квітня 2018; 8-й Міжнародній науково-технічній конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8) (з виставкою розробок та промислових зразків сенсорів) – Одеса, 28 травня – 1 червня 2018; XVI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів, присвяченій 75-й річниці створення біологічного факультету та 90-й

річниці від дня народження М. Деркача «Молодь і поступ біології» – Львів, 27 – 29 квітня 2020; IX Міжнародній науково-практичній конференції «Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування» – Львів, 19-22 вересня 2021.

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 20 наукових праць, у тому числі 10 статей у наукових фахових виданнях України, 1 статтю у періодичному науковому виданні іншої держави, що входить до складу Європейського союзу, 2 статті у періодичних виданнях, що входять до наукометричної бази даних «Scopus» і «Web of Science», 1 патент на корисну модель, 1 методичні рекомендації, 1 технічні умови, та 5 тез наукових доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел (404 найменувань, у тому числі 231 латиницею). Робота викладена на 221 сторінках комп'ютерного тексту, містить 48 таблиці, 6 рисунки.

## **РОЗДІЛ 1 ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ МКБ У ХАРЧОВІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ (огляд наукової літератури)**

### **1.1. Роль мікрофлори у забезпеченні життєдіяльності макроорганізму**

Зацікавленість науковців до кишкової мікрофлори та її впливу на стан здоров'я значно зросла із розвитком нових молекулярно-генетичних технологій, що дало величезні можливості для вивчення кишкового мікробіому [25, 26], а наукові відкриття початку ХХІ століття стали основою для нового трактування поняття мікробіому і значення симбіонтної нормофлори у патогенезі інфекційних захворювань та безпосередньої участі у відновленні гомеостазу [27, 28]. Це, зокрема, відкриття організації мікробних асоціацій – біоплівки та системи регулювання всередині біоплівки і взаємодії із макроорганізмом, подальші дослідження факторів вродженого специфічного імунітету (Toll-рецептори і ORP), біологічний годинник, який регулює функціональну активність мікробіоти та організму людини [29].

Для того щоб підкреслити різноманітність мікрофлори, цей термін було замінено на «мікробіота», оскільки мікробіота складається не тільки з бактерій, але й з вірусів, грибків та багатоклітинних паразитів. Тому мікробіота є високорозвинена та складна екосистема, яка відіграє важливу роль у розвитку та підтриманні гомеостазу макроорганізму [30, 31]. При цьому знання та розуміння складу й функцій мікробіоти із розвитком науки та технологій постійно розширюються [32].

Так, в основному знання про взаємодію між організмом господаря та мікробіотою були отримані у дослідженнях на безмікробних мишах [30, 33, 34]. Зокрема, було встановлено негативний вплив відсутності мікрофлори на розвиток імунної системи [31, 35] та функціональний стан центральної нервової системи [36].

До того ж різні раціони значною мірою впливають на формування мікробіому кишечника людей [37-39], зокрема, при зменшенні споживання клітковини [40, 41], або збільшенні споживання білка [42]. Так, раціони з високим вмістом вуглеводів сприяють збільшенню кількості клостридій, румінококів за рахунок зменшення бактеріодів, біфідобактерій та ентеробактерій, а раціони з високим вмістом жиру сприяють розвитку толерантних до жовчі бактеріодів, у той час як високобілкові дієти сприяють збільшенню таких мікроорганізмів як *Roseburia sp.*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus sp.* та *Bacteroides* [43]. Таким чином, їжа є не стільки набором необхідних поживних речовин, який забезпечує ріст і розвиток макроорганізму, а й важливою складовою хорошого здоров'я [44], а порушення харчування впливає на функціонування імунної системи [45]. Кишковий мікробіом відіграє важливу роль у взаємодії між компонентами харчування, слизовою оболонкою та індигенною мікрофлорою [46, 47], при цьому також здійснюється контакт з навколишнім середовищем, оскільки мікроорганізми колонізують усі поверхні організму [48].

Мікробіом кишечника це динамічна екосистема, взаємодія якої з макроорганізмом має симбіотичні властивості внаслідок чого забезпечується нормальне фізіологічне функціонування кишечника, процеси травлення та метаболізму [49].

Відомо, що при народженні кишечник людини відносно стерильний [50, 51] і упродовж перших трьох років життя швидко колонізується і за складом нагадує склад мікрофлори дорослої людини [52, 53]. У цей ранній час організм є надзвичайно вразливим до впливу як корисних, так і патогенних мікроорганізмів [54].

Необхідно відзначити, що погіршення екологічної ситуації, збільшення кількості стресових явищ та масове, часто безконтрольне застосування антибіотиків спричиняє зниження адаптивної здатності організму, активує процеси симпатико-адреналової системи, що зумовлює нейрогуморальні зміни,

на які реагує мікрофлора, яка виробляє медіатори, що впливають на специфічну й неспецифічну резистентність організму [55, 56]. Встановлено, що порушення біологічної рівноваги між макроорганізмом та різноманітними популяціями мікробної флори спричиняє виникнення різноманітних захворювань [57].

У мікрогеномі кишечника людини, домінуючими типами мікрофлори є представники родів *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* та присутні в меншій кількості *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium* і *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio*, *Methanobrevibacter* [58].

Тому формування інтестинальної мікробіоти відіграє важливу роль для здоров'я макроорганізму. Внаслідок зміни рівноваги мікрофлори кишечника та конкурентного співвідношення мікроорганізмів, їх чисельності та складу мікробних видів, метаболічної активності розвивається дисбактеріоз. Дуже часто причиною цього є використання антибіотиків та різні стресові фактори [59, 60].

Розвиток дисбактеріозу веде до зниження природних захисних систем організму, основними ланками яких є мікрофлора, приєпітеліальний слизовий бар'єр, епітеліоцити та система локального імунного захисту [61]. Значною мірою дисбіотичні порушення можна розцінювати як передвісники відхилень фізіологічного статусу макроорганізму [62].

Необхідно відзначити, що чисельні наукові дослідження вказують на взаємний зв'язок між кишковою мікрофлорою та розвитком патології опорно-рухового апарату. Крім того, сьогодні доведено вплив кишкової мікробіоти на виникнення ожиріння та метаболічного синдрому [63].

Зі змінами складу кишкової мікрофлори тісно пов'язана така патологія як остеоартрит, особливістю якої є чіткий зв'язок остеоартриту колінних суглобів з ожирінням, а також остеоартриту кистей з проявами гіперглікемії та гіперліпідемії [64, 65]. Досліджено, що у хворих на остеоартрит при ожирінні збільшується кількість умовно-патогенних бактерій на тлі зменшення вмісту

бактероїдів, а із збільшенням ступеня ожиріння підвищується частота виділення ентерококів при зниженні їх абсолютної кількості у складі мікробіому [66.]. В активуванні запального процесу у хворих на ревматоїдний артрит важливу роль відіграє наявність такого мікроорганізму як *Prevotella copri* [67]. У випадку остеоартриту у тварин, застосування пребіотика – олігофруктози призводило до нормалізації кишкової мікрофлори та послаблення запальних процесів [68].

У експериментальних дослідженнях доведено також значну роль кишкової мікробіоти у генезі запального ушкодження хряща у тварин з ожирінням [69]. Таке ушкодження спричиняють бактерійні ліпополісахариди, які продукуються у процесі своєї життєдіяльності та відмирання грамнегативними ентеробактеріями. За умов підвищеної кишкової проникності рівень ліпополісахаридів підвищується не тільки в крові, але й у синовіальній рідині. При цьому їх концентрація безпосередньо залежить від ступеня ураження суглобів [70].

Антибіотичні речовини поширюються по всьому організму, незалежно від способу введення, знищуючи практично всі бактерії, що призводить до змін у кількісному та якісному складі нормальної мікрофлори. Необхідно зазначити, що при застосуванні антибіотиків відбувається збільшення числа умовно-патогенних бактерій в травному тракті внаслідок послаблення захисних сил макроорганізму та бар'єрної функції нормобіоти [71].

Застосування антибіотиків людям і тваринам безпосередньо впливає на біотоп, внаслідок чого створюються стійкі субпопуляції мікроорганізмів у сприйнятливій бактеріальній популяції [72]. Тому, вивчення кишкового мікробіоценозу є надзвичайно актуальною темою, оскільки мікробіома як у здоровому стані, так і за різних патологій тісно пов'язана з макроорганізмом і реагує на фактори навколишнього середовища, у тому числі на раціон харчування та ліки [73].

Якщо проаналізувати роль мікрофлори кишечника, то особливої уваги заслуговує мікрофлора тонкого відділу кишечника. Як відомо, у тонкому відділі

кишечника відбуваються фізіологічні процеси травлення та всмоктування поживних речовин, тому наявність великої кількості мікрофлори в цій ділянці розглядається як патологічний процес, що призводить до порушення функціональної діяльності різних органів травної системи [74]. З огляду на це, мікробіом тонкого відділу кишечника є певним біологічним індикатором змін в організмі, оскільки пригнічення однієї ланки екосистеми призводить до розбалансування та дестабілізації всього мікробіоценозу, який надзвичайно важко відновлюється [75].

Однак, автохтонні бактерії тонкого відділу виконують важливу протективну функцію, яка полягає у неспецифічному захисті еконіші від патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів [76]. Крім того, у дистальному відділі тонкого кишечника локалізуються лактобактерії, яким властива висока антагоністична активність до умовно патогенних мікроорганізмів, зокрема гнільних [77, 78].

Враховуючи те, що нормофлора відіграє важливу роль і у регуляції моторної функції кишечника, дисбактеріоз розглядається ще як один з факторів ризику розвитку захворювань. За цих умов нормалізація кишкового мікробіоценозу є необхідною умовою лікування дисбактеріозів [79, 80]. Надлишковий ріст умовно-патогенної мікрофлори супроводжується продукуванням умовно-патогенною мікрофлорою бактерійних ендотоксинів, які індукують продукцію цитокінів, що сприяє посиленню запальних процесів, і у таких випадках, виправданим є застосування елімінуючої протимікробної терапії [81, 82].

Тому питання дисбактеріозів повинно бути комплексним та включати як симптоматичну терапію, так і бути направленим на усунення причин порушення нормофлори [71]. Власне тому, розроблення широкого різноманіття біопрепаратів різних за складом та призначенням є альтернативою хіміотерапевтичним протимікробним препаратам [81,82].

Отже, нормофлора макроорганізму є особливим метаболічним органом, який у значній мірі впливає на функціональний стан внутрішніх органів, імунну систему, регулює життєво важливі функції організму. З огляду на це, нормальне функціонування макроорганізму безпосередньо залежить від формування та підтримання нормальної мікробної системи [83]. Власне тому, важливим і актуальним є забезпечення організму безпечними та ефективними харчовими продуктами, особливо функціонального призначення, виготовленими з використанням пробіотичних штамів мікроорганізмів, зокрема, молочнокислих бактерій, виділених з природних екологічних ніш.

## 1.2. Характеристика мікроорганізмів роду *Enterococcus*

Ентерококи – широко розповсюджені у природі бактерії, які у великій кількості знаходяться у молочних та інших харчових продуктах. Вони наділені значними біотехнологічними властивостями, зокрема, продукують бактеріюцини, проявляють пробіотичну дію, а тому використовуються у складі заквашувальних препаратів у молочній промисловості. Проте, незважаючи на те, що продукти, які містять ентерококи, мають тривалу історію безпечного вживання, немає єдиної думки щодо того, чи вони несуть загрозу харчових інфекцій, а також чи не є носіями потенційної патогенності [84].

Мікроорганізми роду *Enterococcus* володіють високотехнологічними властивостями, зокрема, здатністю росту за низьких значень рН середовища, стійкістю до високих температур, здатністю синтезувати біологічно активні речовини, високими антагоністичними властивостями до умовно-патогенної мікрофлори. З огляду на це, ентерококи використовують у складі заквашувальних препаратів при виготовленні таких ферментованих продуктів як бринзи, чедеру, салямі тощо [85].

Крім того, проведеними дослідженнями доведено можливість використання ентерококів в мікропаливних комірках та встановлено концентраційну та часову залежність змін параметрів генерації електричного

струму бактерійними клітинами [86].

У молочній промисловості ентерококи, завдяки здатності витримувати не тільки температуру охолодження, але й пастеризацію і залишатися при цьому життєздатними упродовж тривалого часу, дуже часто використовуються як природні закваски [10]. Крім того, ентерококи завдяки високій ферментативній активності надають продуктам харчування, особливо деяким видам середземноморських сирів, унікальних сенсорних характеристик, у результаті чого створюються продукти з особливими органолептичними властивостями [10].

У харчовій промисловості використовуються різні види ентерококів, зокрема, у молочній - *Enterococcus faecium* і *Enterococcus durans*. Встановлено, що ізолюваний із травного тракту косулі штам *E. durans* ВКПМ В-11960, може застосовуватися як пробіотичний заквашувальний препарат. Штам наділений низкою переваг, зокрема, скорочує термін сквашування молока, продукує молочну кислоту, антибіотичні речовини [88]. Інший штам – *E. durans* ВКПМ В-11171 виділений із фекалій поросят може використовуватися при виготовленні кисломолочних продуктів. При сквашуванні формується в'язкий молочний згусток, здатний рости за різних концентрацій солі (2-6,5% ) та жовчі (20, 30%) [89]. А виділений із фекалій телят штам *E. durans* ВКПМ В-11172 може використовуватися при виготовленні ряжанки. Перевагою цього штаму є те, що він здатний утворювати в'язкий молочний згусток, рости за різних концентрацій солі (2-6,5% ) та жовчі (20, 30%) та за температури молока 40-45°C, володіє антагоністичною активністю щодо *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* [90].

При виготовленні кефіру або сиру з успіхом можна використовувати виділений із мікрофлори кефірного грибка штам *E. durans* ВКПМ В-10093. Характерною властивістю цього штаму є здатність утворювати в'язкий молочний згусток, сквашування молока за 9 год, ріст за різних концентрацій солі (2-6,5% ), жовчі (20, 30%) та за температури 40-45°C [91].

Слід зауважити, що із молока на основі проведених біохімічних тестів та морфологічних характеристик було виділено 64 ізоляти, і як пробіотичні бактерії були відібрані *E. durans*, *E. lactis*, *L. casei* та *P. pentosaceus* [92].

Дослідженнями, проведеними у Марокко, виявлено високу кількість молочнокислих бактерій у молоці верблюда. Так, кількість лактобактерій коливалася в межах від  $2,5 \times 10^2$  до  $6 \times 10^7$  КУО/см<sup>3</sup>, кількість стрептококів – від  $4,2 \times 10^2$  до  $8 \times 10^7$  КУО/см<sup>3</sup>, лейконостоків – від  $5,4 \times 10^2$  до  $5,4 \times 10^7$  КУО/см<sup>3</sup>. Результати також показали, що лактобактерії та лактококи були переважаючими родами, їх кількість становила 37,5 та 25,8%, відповідно. При цьому, більшість становили такі види, як: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus casei* та *Lactobacillus plantarum* [93].

Проте, у подальшому дослідниками виявлено, що у зразках верблюжого молока, отриманого з різних зон Марокко, виявлено певне домінування ентерококів, особливо *Enterococcus faecalis*. Окрім ентерококів, у молоці виявлено і інші роди, у тому числі, педіококи, стрептококи, лактококи та лейконостоки [94].

Встановлено, що у молоці ентерококи становлять незначну кількість, проте вони були основною частиною мікробіоти істрійського сиру, при цьому домінуючими видами були *E. faecium* та *E. faecalis*, а незначну групу становили *E. durans* та *E. casseliflavus*. Слід відзначити, що за біотехнологічними ознаками та здатністю виживати в умовах травного тракту була істотна різниця між штамами одного виду [95].

У ферментованому верблюжому молоці більшість складали три роди: ентерококи, лактобактерії та лактококи, а серед ентерококів – штами *E. durans*; *E. faecalis*; *E. faecium*; *Lb. casei*; *Lb. curvatus*, *Lb. paracasei*, *Lb. sakia*, *L. lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*. Власне тому, для промислового виробництва традиційних кисломолочних продуктів місцеві штами молочнокислих бактерій становлять теоретичну основу для розроблення складу заквашувальних препаратів [96].

Проте, незважаючи на корисні властивості, окремі штами ентерококів здатні викликати псування харчових продуктів. Зокрема, наявність деяких штамів *E. faecium* може спричиняти псування консервованих продуктів за умови недостатньої обробки. Отже, у цьому аспекті постає питання щодо безпеки харчових продуктів та доцільності використання ентерококів як пробіотиків чи допоміжних культур. Тому, сьогодні надзвичайно актуальним є поглиблене вивчення властивостей окремих штамів ентерококів, виділених із харчових продуктів, що дозволить об'єктивно підібрати штами мікроорганізмів, які придатні для створення нових пробіотичних препаратів [97]. Штами, призначені для використання як пробіотики або у складі заквашувальних препаратів, не повинні мати вірулентні детермінанти, повинні бути чутливими до антибіотиків і при цьому наділені хорошими функціональними та технологічними властивостями [98].

Необхідно відзначити, що ентерококи, будучи облігатними представниками нормальної мікрофлори людини та тварин [99], можуть бути і потенціальними патогенними бактеріями [100].

Встановлено, що виникнення ентерокової інфекції пов'язане із наявністю широкого спектру факторів патогенності [101]. При цьому, синтез факторів патогенності відбувається за умови значної кількості ентерококів в макроорганізмі [102]. Крім того, було встановлено, що гени патогенності можуть передаватися від вірулентніших штамів ентерококів завдяки горизонтальному переносу [103], а головним механізмом горизонтального переносу є плазмідна передача. У ентерококів процес переносу плазмід регулюється механізмом кон'югації [104] і при інфекційних захворюваннях такий механізм передачі забезпечує максимальну швидкість поширення генів антибіотикорезистентності та патогенності [105].

Необхідно відзначити, що найбільш вивченим фактором патогенності ентерококів є цитолізін, який є цитолітичним токсином білкової природи [106], а також желатиназа, протеаза та гіалуронідаза [107, 108].

Поряд з цим, одним із критеріїв вірулентності ентерококів є їх стійкість до антибіотиків, оскільки в природі вони стійкі до пеніцилінів, цефалоспоринів, хінолонів, аміноглікозидів. Проте, важливим є те, що стійкість до антибіотиків не передається горизонтально, а тому немає ризику передачі її патогенним мікроорганізмам [109]. З іншого боку, встановлено, що у випадку захворювань, спричинених резистентними штамми ентерококів, є ризик передачі стійкості патогенним бактеріям, оскільки стійкість ентерококи набувають шляхом переносу плазмід за рахунок хромосомного обміну чи внаслідок мутації [110].

Встановлено, що для ентерококів характерна велика поширеність внутрішньородового та міжродового антагонізму, яка значною мірою пояснює значення бактерій цієї групи в колонізаційній резистентності біотопу макроорганізму [111].

Враховуючи те, що ентерококи можуть проявляти як патогенні, так і пробіотичні властивості, їх необхідно оцінювати з огляду безпеки. Тому надзвичайно важливим є впровадження рекомендацій щодо визначення пробіотичних властивостей ентерококів з метою їх залучення як лікувально-профілактичних засобів. При використанні таких штамів потрібно враховувати правильне застосування антибіотиків у гуманній та ветеринарній медицині [112].

У цьому аспекті слід зауважити, що серед 231 штамів ентерококів, виділених із традиційних турецьких зразків сиру, домінуючим видом був *E. faecalis*, а фенотип резистентності ентерококів був такий: налідиксинова кислота – 100%, канаміцин – 98,6%, рифампіцин – 78,4%, ампіцилін – 48,8%, ципрофлоксацин – 45,5%, еритроміцин – 18,8%, тетрациклін – 11,7%, пеніцилін G – 5,6%, хлорамфенікол – 4,2%, гентаміцин – 3,8% та стрептоміцин – 1,4%, проте жоден із штамів не був резистентним до ванкоміцину [113].

При аналізі динаміки висівання стафілококів та ентерококів із клінічного матеріалу виявили значну частку мікроорганізмів, що припадає на *E. faecalis* і *E. faecium*. Вивчення чутливості до антибіотиків показало, що оксацилін може

розглядатися як препарат вибору щодо резистентної грампозитивної кокової мікрофлори, а амоксицилін/клавуланат, у випадках інфекцій, зумовлених *E. faecalis* [114].

При скринінгу антибіотикорезистенті ентеробактерій та ентерококів, виділених із м'яса птиці та сільськогосподарських тварин встановили, що 40% ентерококів, виділених з м'ясних продуктів і 33% з молочних були стійкими до тетрацикліну і доксицикліну [115]. Слід відзначити, що у практиці гуманної медицини особливе занепокоєння належить ванкоміцинрезистентним ентерококам [116].

Не дивлячись на те, що ентерококи є представниками нормальної мікрофлори людини, частота їх виявлення з сечостатевих органів вагітних становить приблизно 28%, що може бути причиною таких ускладнень вагітності, як передчасні пологи, плацентарна недостатність, гіпотрофія плода. Крім того, ентерококи часто виділяють з полімікробних ран при внутрішньочеревних і тазових абсцесах. При цьому частота таких інфекцій зростає на тлі застосування антибіотиків цефалоспоринового ряду [117].

Встановлено, що збудником інфекційного ендокардиту поряд зі стафілококами є також ентерококи. Вони є третіми за частотою захворювання етіологічним чинником, так у 90% випадків у якості причини захворювання були виявлені *E. faecalis*, а в 3,8% – *E. faecium*, який характеризувався високою природною резистентністю до антибіотиків [118].

Для бактерій роду *Enterococcus* характерним є метаболізм бродильного типу. В анаеробних умовах глюкоза метаболізується в оцтову кислоту, ацетоїн і CO<sub>2</sub>. При значеннях рН середовища 5,0-6,0, штами *E. faecalis* стехіометрично перетворюють піруват в лактат, а при нейтральних або слабколужних значеннях рН піруват перетворюється в форміат, етанол і ацетат. У середовищах з гліцерином при аерації *E. faecalis* утворює оцтову кислоту і CO<sub>2</sub>. Крім того, *E. faecium* може окиснювати гліцерин до оцтової кислоти, CO<sub>2</sub> і невеликої кількості пероксиду водню [119].

Необхідно відзначити, що продукування органічних кислот антагоністично активними мікроорганізмами відіграє значну роль у забезпеченні колонізаційної резистентності біотопу. При цьому, органічні кислоти, зокрема, молочна кислота не тільки знижує рН середовища, внаслідок чого пригнічується ріст патогенів, але й спричиняє пермеабілізацію зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій та позбавляє мікроорганізми необхідних факторів росту і специфічно впливає на експресію ключових факторів вірулентності збудника [120]. Встановлено, що підвищення концентрації молочної кислоти, на відміну від оцтової, призводить як до суттєвого зниження рН, так і до збільшення антагоністичної активності молочнокислих бактерій як до грампозитивних, так і грамнегативних патогенних мікроорганізмів [121].

Стійкість до жовчі травної системи є необхідною умовою для колонізації та метаболічної активності бактерій у кишечнику, оскільки відомо, що клітинні мембрани мікроорганізмів є дуже чутливими до жовчних кислот [122]. Дослідженнями встановлено, що жовчні кислоти, які надходять у дванадцятипалу кишку, знижують виживання бактерій, тому ефективність пробіотичних штамів, у значній мірі, залежить від їх стійкості до жовчі [123]. Крім того, про використання ентерококами жовчі, як джерела поживних речовин, вказує їх здатність виживати і розмножуватися у середовищі з 30% концентрацією жовчі [124]. Механізми, за допомогою яких пробіотичні бактерії здатні витримати стрес, спричинений жовчними солями, залишаються не з'ясованими, однак, на думку деяких дослідників їх стійкість ґрунтується на гідролізі жовчних солей [125].

Важливість вивчення впливу жовчі на пробіотичні штами полягає у тому, що за високого осмотичного тиску і активності жовчних солей порушуються фосфоліпіди та білки клітинної мембрани, внаслідок чого змінюється її проникність, спричиняючи при цьому пошкодження мікроорганізму чи його загибель [126]. З іншого боку, жовчні солі відіграють важливу роль у перетравленні та засвоєнні жирів. Жовчні солі – це солі натрію або калію,

утворені комбінацією гліцину або таурину та жовчної кислоти [127].

Крім того, жовчні кислоти функціонують як молекули, що сприяють всмоктуванню поживних речовин у кишечнику, і як гормони, що регулюють обмін поживних речовин. Різні біотрансформації жовчних кислот, здійснювані бактеріями кишечника, регулюють структуру мікробіценозу кишечника та фізіологію макроорганізму [122]. Слід відзначити, що молочнокислі бактерії впливають на засвоєння холестеролу макроорганізмом за рахунок жовчно-сольового обміну цих бактерій [128].

Ентерококи також спроможні викликати аутоінфекцію, при цьому з двох клінічно значущих видів ентерококів: *E. faecium* і *E. faecalis*, патогеннішим потенціалом володіє *E. faecalis* [129]. За цих умов, важливим є вивчення патогенних властивостей ентерококів. Зокрема, при дослідженні клінічних ізолятів ентерококів *E. faecalis* та *E. faecium* виявлено фактори вірулентності на фенотиповому і генотиповому рівнях. Генетичні детермінанти вірулентності поширеніші серед клінічних ізолятів *E. faecalis*, при цьому набір генів, що кодують фактори вірулентності залежить від біотопу. Для *E. faecium* характерний ген, який кодує синтез гіалуронідази. Виявлено кореляційний зв'язок між фенотиповим проявом ознак і генотипом ентерококів [101].

При дослідженні клінічних ізолятів ентерококів, виділених від людей, яким застосовували пробіотик Лінекс, у склад якого входив *E. faecium* (Linex) встановили, що клінічні культури ентерококів несли гени патогенності, проте вони не були споріднені до штаму *E. faecium* (Linex), що входить до складу препарату [130].

При використанні ентерококів у біотехнології виробництва сирів виявили, що штами *E. faecium* EM485 та EM925, виділені із бразильських сирів Coalho, мали низький рівень гідрофобності, були безпечними щодо генів, пов'язаних з факторами вірулентності та продукуванням біогенного аміну та були сумісні із застосуванням у змішаній культурі для молочних продуктів. Однак, виявлена

стійкість до антимікробних препаратів заслуговувала на подальше поглиблене вивчення [131].

При дослідженні антигемоглобінової та антилактоферинової активності ентерококів, як представників симбіотичної мікрофлори кишечника та збудників інфекційних захворювань у дітей, встановили значно вищий рівень поширеності та вираженості їх активності, а також комбінації цих властивостей у клінічних ізолятів *E. faecalis* та *E. faecium* порівняно зі штамми, виділеними з кишечника здорових людей [132].

Механізм стійкості бактерій роду *Enterococcus* пов'язують із продукуванням речовин, що інактивують компоненти природної резистентності макроорганізму, зокрема, лізоцим, комплемент, гістоноподібні білки, катіонний білок тромбоцитів. При цьому, лізоцимрезистентність ентерококів пов'язують з модифікацією пептидоглікану і зміною електричного заряду поверхні бактеріальної клітини [133].

Дослідниками встановлено, що серед факторів патогенності ентерококів, виділених з фекалій людини, гемолітична активність була найпоширенішою ознакою *E. faecalis*. Лізис еритроцитів людини викликали також культури *E. faecium* і *E. durans*. Хоча фактори патогенності зустрічаються у ентерококів відносно рідко, окремі штамми з експресією двох і більше факторів патогенності можуть мати суттєве значення у розвитку ендогенних інфекцій, особливо на тлі імунodefіциту [134].

Крім того, дослідженнями встановлено, що *E. faecalis* продукує також біогенні аміни, тирамін та путресцин. Споживання продуктів з високою концентрацією цих сполук може спричинити проблеми зі здоров'ям. Тому зусилля вчених були направлені на створення подвійного мутанта *E. faecalis*, в якому відсутні кластери, що беруть участь у синтезі тираміну та путресцину [135].

Тому, при відборі окремих штамів ентерококів необхідним є дослідження їх щодо можливого прояву патогенності. Велике наукове зацікавлення

становить антагоністична активність ентерококів, зокрема, здатність ними синтезувати бактеріоцини. Безпека продуктів харчування стала проблемою у всьому світі, тому застосування молочнокислих бактерій та їх бактеріоцинів є перспективним у молочній промисловості. Виділені з сирого верблюжого молока бактеріоцини *E. faecium* S6 та R9 можуть бути використані для боротьби з *Listeria spp.* [136].

Бактеріоцини *E. hirae* ST57ACC, виділені із бразильського сиру були толерантними до різних температурних режимів, зокрема, температури від 4 до 100°C, та за температури 121°C – упродовж 15 хв. Крім того, досліджувані бактеріоцини упродовж 2 год залишалися активними в лужному та кислому середовищі (рН 2,0-10,0) [136, 137]. Крім того, надзвичайно важливою функцією бактеріоцинів є їх здатність зменшувати негативний вплив антибіотиків [138].

Необхідно відзначити, що ентероцини – бактеріоцини, які продукують ентерококи, проявляють інгібуючу активність до збудників харчових токсикоінфекцій [17]. При цьому їх дія направлена не тільки на грампозитивні мікроорганізми такі, як *Listeria monocytogenes*, але й на грамнегативні бактерії [139]. Тут необхідно відзначити, що виявлений бактеріоцин II класу – ентероцин TJUQ1, проявляв високу активність щодо *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* та *Salmonella spp* [140], проте для харчової промисловості основною проблемою є *Listeria monocytogenes*, оскільки її пов'язують зі здатністю рости за високої концентрації солі, низького значення рН середовища та різних температурних режимів (від 1 до 45°C) [141].

Бактеріоцини II класу – це немодифіковані, низькомолекулярні термостійкі пептиди з молекулярною масою < 10 кДа [142]. Механізми дії ентероцинів різний, внаслідок чого забезпечується бактерицидна чи бактеріостатична дія [143]. Встановлено, що дія бактеріоцинів II класу направлена на інгібування біосинтезу пептидоглікану клітин бактерій [144].

Застосування ентероцинів, зокрема, AS-48 та КП при виробництві

молочних продуктів мало бактерицидний ефект щодо *S. aureus* та *L. monocytogenes* [145]. Недавніми дослідженнями встановлено здатність ентероцинів знижувати кількість *L. monocytogenes* у сирі [146]. Також встановлено, що згубний вплив метаболітів ентерококів на лістерії відбувається за рахунок катіонних антимікробних пептидів з мембранолітичним механізмом дії [147].

Встановлено, що продукти метаболізму ентерококів проявляють слабку фунгіцидну дію щодо *Candida spp.*, однак здатні *in vitro* пригнічувати їх адгезію на епітеліальних клітинах [148].

При визначенні складу жирних кислот продуцента бактеріоцину штаму *E. italicus* ОНУ547, встановили, що у складі ліпідів переважали ненасичені жирні кислоти, зокрема, октадеценова кислота становила 61,5% [149]. Крім того, встановлено, що супернатант і пептидний екстракт, отримані з культури *E. faecium* L3, містили термостійкі низькомолекулярні пептиди, які інгібували ріст лістерій і деяких стрептококів, проте в меншій мірі, ніж живі культури ентерококів. На підставі отриманих даних можна вважати, що антагоністична активність ентерококів пов'язана з продукуванням ентероцинів і може бути посилена за наявності інших метаболітів [150].

Виділений із сирого верблюжого молока штам *Enterococcus faecium* S6, продукував термостійкі та стабільні в широкому діапазоні значень рН середовища (від 2 до 10 од.) ентероцини А, В та Р, які належать до класу II бактеріоцинів. За рахунок синергетичної дії вони проявляли бактерицидну дію щодо численних представників грампозитивних бактерій, у тому числі і лістерій [136, 151]. Теж надзвичайно важливою функцією бактеріоцинів є їх здатність зменшувати негативний вплив антибіотиків при виробництві кормів для птиці та свиней [138].

Бактерійні ізоляти *Lactobacillus*, *E. faecium* LCW 44, виділені з сирого верблюжого молока, здатні продукувати ентероцини L50A та L50B. Крім того, ентерокок показав високу стійкість до дії шлункових та кишкових соків

(виживання  $78 \pm 4\%$ ), а також знижував адгезію *Listeria monocytogenes*, відповідно, на 65 та 49%, виявляв найширший антибактеріальний спектр щодо кількох грампозитивних штамів, що належать до родів *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus*. Загалом, *E. faecium* LCW 44, має потенціал пробіотики для використання у гуманній та ветеринарній медицині [17].

Ентерококи проявляють високу стійкість за різних умов. Встановлено, що вони здатні адаптуватися до різних значень рН середовища, зокрема *E. faecalis* виживав у кислих умовах (рН 2,9-4,2) та в умовах різних концентраціях екстракту вапна і був досить стабільним упродовж перших 6-12 год [153]. При цьому було встановлено, що *E. faecalis*, вирощений у лужному середовищі, набував неправильної форми. Активність Na (+) K (+)-АТФази різко зросла з підвищенням рН середовища, тоді як активність H (+) K (+)-АТФази не зростала, за винятком рН 10. Помітне підвищення гідрофобності клітинної поверхні також спостерігалось із збільшенням рН середовища та часу культивування.

Результатами досліджень встановлено, що стійкість до низьких рН середовища є штамоспецифічною ознакою МБК. При цьому, встановлено, що більшість досліджуваних штамів МБК не росли на середовищі MRS після 48 годин культивування при значенні  $\text{pH} \leq 3$  та  $\text{pH} \geq 10$ , проте, деякі представники виживали при рН 4,0 упродовж 48 год [152].

Роль ентерококів, як пробіотичних препаратів, є багатогранна, зокрема, встановлено, що *E. faecium* L-3 прямо або опосередковано, за рахунок коригування дисбактеріозу, впливає на імунну систему при експериментальному розсіяному склерозі щурів, що дозволяє розглядати такі засоби для імунокорекції при аутоімунних, запальних і нейродегенеративних захворюваннях [154].

Крім того, доведено, що ентерококи можна використовувати для контролю пробіотичних препаратів у якості еталонних зразків, які попередньо

вивчають за морфологічними, культуральними, біохімічними властивостями, антагоністичною активністю, кислотоутворенням [155].

Позитивна роль ентерококів як пробіотичних препаратів встановлена при коригуванні експериментального дисбіозу у щурів за застосування індигенних штамів *E. faecium* та пробіотичного штаму *E. faecium* L-3. Так, за застосування індигенних штамів *E. faecium* виявляли виражений біфідогенний ефект, при цьому популяція ешерихій була збережена, проте зменшувалась кількість протею [156].

Застосування пробіотичних бактерій *Enterococcus faecium* L-3 спричинювало низькі рівні експресії прозапальних цитокінів (IL-8, TNF $\alpha$ ) в брижових лімфатичних вузлах та сироватці крові, а також підвищення в сироватці крові вмісту протизапальних цитокінів [157].

Крім того, встановлено, що використання пробіотичної форми *E. faecium* L-3 у недоношених новонароджених дітей з дуже низькою масою тіла позитивно впливало на динаміку маси тіла, зниження частоти ускладнень і мікробіоту кишечника. Профілактику ускладнень забезпечував високий рівень біфідобактерій, лактобацил, кишкової палички та ентерокока [158].

Отже, ентерококи широко розповсюджені у природі і є представниками нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини та тварин. При цьому даних щодо їх патогенності у наукових джерелах є незначна кількість і вони, у більшій мірі суперечливі. З іншого боку, надзвичайно цінні з біотехнологічної точки зору властивості, зокрема, здатність росту за низьких значень рН середовища, стійкість до високих температур, здатність синтезувати біологічно активні речовини, а також високі антагоністичні властивості до умовно-патогенної мікрофлори та здатність позитивно впливати на здоров'я людини роблять їх перспективними і надзвичайно ефективними при залученні до складу заквашувальних та пробіотичних препаратів.

### 1.3. Лактобактерії та їх біолого-технологічні властивості

Молочнокислі бактерії – це кислотостійкі, нерухомі грампозитивні коки або палички, які не утворюють спор, каталазонегативні. Вони характеризуються продукуванням молочної кислоти як головного кінцевого продукту метаболізму вуглеводного бродіння [159-161]. Крім того, ці бактерії широко розповсюджені в природі, їх можна зустріти в різноманітних середовищах, зокрема, біотопах людей та тварин, продуктах харчування, кормах, рослинах і ґрунті [162, 163]. Також є повідомлення про виділення МКБ із ферментованих продуктів, органічних добрив, зокрема, компостів, мікрофлори шлунково-кишкового тракту та вагінальних шляхів[161].

З промислової точки зору, мікроорганізми родів *Lactobacillaceae* та *Lactococcaceae* є найважливішими таксонами, оскільки серед них є найбільша кількість комерціалізованих молочнокислих бактерій, призначених для виробництва різноманітної харчової продукції [164].

Більшість МКБ входять до складу бактерій типу *Firmicutes*, ряду *Lactobacillales*, родини *Streptococcaceae*, що включає роди *Lactococcus*, *Leuconostoc* і *Streptococcus* і родини *Lactobacteriaceae*, до якої входить рід *Lactobacterium* з трьома під родами *Thermobacterium*, *Streptobacterium* і *Betabacterium*, а також роду *Enterococcus* та ін. Молочнокислі бактерії включають понад 30 родів та більше 300 видів, кількість яких продовжує зростати у міру виявлення нових видів [162-165].

Ідентифікація МКБ ґрунтується на критеріях, викладених Орла-Йенсенем у 1919 році, та включає морфологічну характеристику, режим ферментації глюкози, діапазони температур росту та схеми зброджування цукрів [159], і як доповнення філогенетичний аналіз на основі 16S рибосомної РНК послідовності генів (рРНК) [161]. Необхідно відзначити, що деякі види МКБ мають спільну схожість послідовностей у групах. В даний час секвенування цілого геному є загальним інструментом для ідентифікації молочнокислих

бактерій [159, 161]. Ідентифікація за допомогою секвенування надає важливу інформацію для редагування їх геному [166]. Потенційне застосування цих технологій включає розробку терапевтичних пробіотиків та штамів, які є стійкими до вірусів [167].

Враховуючи відсутність функціональної дихальної системи, МКБ отримують енергію за допомогою фосфорилування двома метаболічними шляхами, гомоферментативним та гетероферментативним. Перший шлях заснований на гліколізі з продукуванням переважно молочної кислоти, а другий характеризується виробленням молочної кислоти,  $\text{CO}_2$  та етанолу або ацетату [159].

У процесі росту та розмноження мікроорганізми виробляють і виділяють різні метаболіти, які в основному є побічними продуктами мікробної метаболічної діяльності [168]. Серед метаболітів МКБ необхідно виділити молочну кислоту та бактеріюцини, які постійно виробляються під час росту мікроорганізмів. З іншого боку, біомаса МКБ також може бути використана у харчовій промисловості, оскільки клітинна стінка цих бактерій складається з пептидоглікану, тейхоєвих та ліпотейхоєвих кислот, полісахаридів, які мають великий потенціал для застосування у біотехнологічних процесах [169]. Так, ліпотейхоєві кислоти можуть бути використані при лікуванні або профілактиці інфекційних захворювань порожнини рота, або як протизапальний засіб [170]. Молекули ліпотейхоєвої кислоти складаються з гліколіпіду та ковалентно зв'язаного гідрофільного полімеру гліцерофосфату [171]. Встановлено, що основна функція ліпотейхоєвої кислоти пов'язана з регуляцією автолітичних ферментів клітинної стінки під час поділу клітини, що має важливе значення для росту та проліферації клітин, а також проявляє й імуномодулювальні властивості. Крім того, у біотехнології ліпотейхоєва кислота має цілий ряд практичних застосувань, зокрема, її використовують для збагачення харчових матриць та розробки нових фармацевтичних продуктів [170, 171].

Однак, дослідженнями на мишах встановлено, що пероральне введення

чистої ліпотоїхоевої кислоти, одержаної з пробіотика *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, може спричиняти імунодепресивний ефект та розвиток пухлини шкіри [172].

Молочнокислі бактерії, в основному, використовуються у процесах бродіння, які можуть здійснюватися у твердому або рідкому станах. Бродіння у рідкому стані є найвивченішим та промислово впровадженим підходом, який спрямований на виділення органічних кислот, переважно молочної кислоти, етанолу, біологічно активних пептидів та інших речовин. Після ферментації проводять виділення та очищення з метою вилучення цих сполук із супернатанту або біомаси, яка може також володіти пробіотичним потенціалом [1].

В останні роки зросла зацікавленість до нових ізолятів МКБ, виділених з різних джерел з метою їх використання як пробіотиків або з іншою метою [173]. Сьогодні МКБ використовуються для виробництва широкого спектру хімічних речовин, що мають велику комерційну складову. Молочна кислота, що одержана в результаті ферментації лактобактеріями, є переважаючим промисловим продуктом і, як прогнозують, її виробництво зростатиме внаслідок великого попиту на полілактид [1]. Переважна більшість молочної кислоти виробляється біотехнологічними шляхами. При цьому, деякі штами молочнокислих бактерій можуть синтезувати лише один із двох ізомерів молочної кислоти, L (+) чи D (-), що дозволяє використовувати продукт для специфічних потреб. Більша частина біотехнологічного виробництва молочної кислоти скерована на отримання L (+) ізомеру, тому, що D (-) не може метаболізуватися клітинами макроорганізму і обмежує його використання у харчовій промисловості [174].

Завдяки своєму різнобічному метаболізму та здатності синтезувати широкий спектр корисних метаболітів МКБ широко використовуються у біотехнологічних процесах при виготовленні продуктів харчування. Крім того, завдяки антагоністичним властивостям вони є перешкодою для розвитку патогенних мікроорганізмів та мікроорганізмів, які викликають псування, а

також як протигрибкові та антимікотоксигенні засоби. МКБ використовуються, як продуценти бактеріоцинів та як нутрицевтики, пробіотики та заквашувальні препарати [159, 162, 163, 175-177]. Лактобактерії здатні синтезувати біологічно активні речовини, вітаміни групи В, К, незамінні амінокислоти, проявляють імуномодулювальну, антиканцерогенну та антимуtagenну дію [178].

Антагоністична активність лактобактерій залежить від джерела їх виділення, так *S. sonnei*, *S. fl exneri*, *S. aureus*, *P. carotovorum*, *S. epidermidis* та *C. albicans* виявились більш чутливими до штамів, виділених із ферментованих овочів, *S. enterica*, *P. fluorescens* та *P. syringae* до лактобактерій, виділених із кисломолочних продуктів [179], а також до дії органічних кислот, які вони продукують [180, 181]. Виражена антагоністична активність лактобактерій дає підстави стверджувати про можливість заміни хімічних консервантів у харчовій промисловості лактобацилами [179]. Однак, деякі вчені вважають, що молочна кислота та пероксид водню не є основними чинниками антагоністичної активності більшості штамів *L. plantarum*, а залежить від наявності у середовищі культивування глюкози чи твіну-80. При цьому спектр антагоністичної активності є штамоспецифічним і відрізняється щодо впливу на умовно-патогенні та фітопатогенні мікроорганізми [182].

Встановлено, що максимальний синтез антимікробних факторів лактобактеріями відбувається впродовж їх активного росту, зокрема, через 12 годин культивування, бактерії проявляли високу активність щодо біоплівкоутворювальних стафілококів. Проте, через 48 годин їхня активність зменшувалася майже у два рази [183].

Надзвичайно важливим є те, що управління з продовольства і медикаментів США (FDA) включили численні види МКБ та харчові добавки, отримані з них, до загальновизнаного інвентаризаційного списку (GRAS) [159, 184], а європейське управління з безпеки харчових продуктів присвоїло пробіотикам, які виготовлені на основі мікроорганізмів роду *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*, статус безпечних засобів [185].

Встановлено, що лактобактерії можуть тривалий час виживати поза макроорганізмом, так штам *Lactobacillus plantarum* ОНУ 12 упродовж 44 діб зберігав життєздатність в умовах ґрунту [186]. МКБ, виділені із шлунково-кишкового тракту кролів, були здатними виживати при рН 4,0-9,0 од., проявляли стійкість до концентрації жовчі від 20 до 40%, до 3% розчину гідроген хлориду, 5% натрію хлориду та 0,5% фенолу. При цьому, кількість життєздатних клітин становила  $10^3$ - $10^5$  КУО/см<sup>3</sup> після 48 год культивування [152].

Крім того встановлено, що лактобактерії проявляють варіабельну реакцію на травні ферменти та дію різних значень рН в залежності від конкретного штаму та діючого чинника. Виявлено, що штами ізольовані з м'ясної сировини, виявили найвищий рівень резистентності до різних значень рН середовища, а штами, ізольовані з автоферментованих овочів, виявилися стійкішими до дії травних ферментів, при цьому в середині популяції була також неоднорідна відповідь на дію чинника, що підтверджує варіабельність штамів МКБ [187]. При дослідженні *Lactobacillus sp.* В4 і В1, ізольованих з самозаквасних овочів, *Lactobacillus sp.* М6, отриманого з м'ясної сировини, та *Lactobacillus sp.*, виділеного з феціуму дітей, встановили варіабельну реакцію на дію хлориду натрію, солей жовчі і фенолу, яка залежала від специфічності штаму та концентрації активної речовини. Встановлено часткову залежність між стійкістю до досліджених чинників і джерел виділення лактобацил [188].

Пробіотичний ефект лактобактерій ґрунтується на їх високій швидкості росту, внаслідок чого швидко колонізується кишковий тракт, і таким чином модулюється кишкова мікрофлора та запобігається виникнення діарей та підвищуються імунні сили організму [189].

Важливо відзначити, що при дослідженні лактобактерій та біфідобактерій штами *L. rhamnosus* і *L. plantarum* були стійкими до дії штучного шлункового соку при рН 2,5 [190]. Оскільки рН шлункового соку людини становить приблизно 3,0 од., а час перетравлення їжі – 1-3 год, з огляду на це, здатність лактобактерій виживати в умовах низьких значень рН середовища упродовж 3

год, оцінюється як толерантність штамів до впливу шлункового соку [191].

Відомо, що пробіотики у шлунку буферизуються їжею чи іншим середовищем, і тому, швидше за все, вони не піддаються дії низьких значень рН, виняток становлять певні патологічні процеси, такі як кальциноз [190]. Крім того, при створенні пробіотиків на основі лактобактерій важливим є також їх стійкість до жовчних солей [190].

Згідно з дослідженнями вчених було встановлено зв'язок між зміною ваги тіла і складом мікробіоти кишечника людини та доведено, що мікробіота шлунково-кишкового тракту сприяла коригуванню маси тіла. У людей із низьким рівнем лактобактерій виявили збільшення маси тіла, тоді як у людей, що мали високий рівень лактобактерій – навпаки, зниження [192].

Необхідно відзначити, що у нормі домінуючими представниками вагінальної мікрофлори є мікроорганізми *Lactobacillus spp.*, які розщеплюють глікоген епітеліальних клітин в молочну кислоту, підвищуючи таким чином, кислотність середовища та продукують пероксид водню. За таких умов кисле середовище та пероксид водню пригнічують ріст умовно-патогенної мікрофлори, зокрема, стафілококів, стрептококів, кишкової палички, анаеробних бактерій [193, 194].

Встановлено, що стабільність біотехнологічних властивостей штамів лактобактерій збільшується у композиціях, зокрема, найперспективнішими для промислової апробації були композиції *Lactobacillus sp. M6+L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 444 і *Lactobacillus sp. M6+L. plantarum* 991 у однакових співвідношеннях [8].

Оскільки МКБ використовують у складі заквашувальних препаратів у молочній промисловості, то особливо важливими їх властивостями є технологічні, а саме, бетагалактозидазна активність, кислотоутворювальна здатність, солестійкість, здатність продукувати екзополісахариди. З огляду на це, при виробництві низьколактозних молочних продуктів актуальним завданням молочної промисловості і має значну практичну цінність є

застосування мікроорганізмів з високою здатністю до синтезу  $\beta$ -галактозидази, оскільки деякі люди страждають на непереносимість лактози, що пов'язано з генетично зумовленим дефіцитом ферменту  $\beta$ -галактозидази [195].

Лактазна активність пробіотичних препаратів здатна забезпечити належний рівень розщеплення лактози та її засвоєння. Тому, особливої уваги заслуговують препарати, які містять штами лактобактерій [196, 197].

У біотехнологічних процесах виготовлення молочних продуктів важливим є пошук ефективного складу бактеріальної композиції. Критеріями оцінювання композицій є технологічно важливі характеристики, зокрема, інтенсивність нагромадження клітин, синтез ароматичних сполук діацетилу та летких органічних кислот. Встановлено, що найефективнішим є залучення різних видів МКБ, що підвищує ароматоутворювальну та кислотоутворювальну здатність закваски [198]. При дослідженні 47 культур МКБ, виділених з домашніх кисломолочних продуктів, відібрано 11 штамів лактобактерій, які виявили достатній рівень термостійкості та незначну чутливість до солі й селітри, а також мали помірну протеолітичну активність та добрі синеретичні показники молочних згустків, що вказувало на перспективність їх використання у біотехнологічних процесах виробництва сиру [199].

Слід відзначити, що у харчовій промисловості екзополісахариди молочнокислих бактерій відіграють надзвичайно важливу роль, оскільки мають унікальні фізичні та реологічні властивості, які зумовлюють їх використання у якості в'язучих, стабілізуючих, гелеутворювальних агентів при виробництві кисломолочних продуктів [200]. При цьому здатність до продукування екзополісахаридів залежить від родової належності і наявності вуглеводів глюкози, фруктози чи лактози [201].

Отже, лактобактерії досить стійкі до різноманітних умов, зокрема, високих та низьких значень рН, дії травних ферментів, різних концентрацій жовчних кислот та солі. З іншого боку, високі антагоністичні властивості до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори, продукування біологічно

активних речовин, зокрема, бактеріоцинів, молочної кислоти, вітамів тощо дають можливість використовувати молочнокислі бактерії в гуманній медицині для лікування та профілактики дисбактеріозів. У харчовій промисловості МКБ використовують як стартові культури в технологічних процесах для формування органолептичних характеристик продуктів, а також як природні консерванти вихідної сировини і готових виробів. Власне тому, надзвичайно актуальним є проведення досліджень, спрямованих на дослідження пробіотичних та технологічних властивостей лактобактерій, виділених із природних еконіш, зокрема, традиційного карпатського сиру.

#### **1.4. Використання пробіотичних культур у технології функціональних молочних продуктів**

Нормальна мікрофлора людини відіграє надзвичайно важливу роль у підтриманні гомеостазу організму та формуванні механізмів імунітету. Порушення нормальної мікрофлори людини є важливою проблемою сучасної медицини. З огляду на це, застосування пробіотиків є найперспективнішим та найефективнішим шляхом лікування дисбіозів [202].

Існує декілька трактувань терміну пробіотики. Так, R. Fuller визначає «пробіотики» як живі мікроорганізми, застосування яких спричиняє позитивний ефект на макроорганізм за рахунок корекції кишкової мікрофлори [203]. ВООЗ сьогодні дає визначення пробіотиків як непатогенних для людини і тварин бактерій, що проявляють виражену антагоністичну активність до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів та забезпечують відновлення нормофлори макроорганізму [204].

В останні роки досліджуються процеси взаємодії пробіотичних штамів із макроорганізмом. Тому багато наукових робіт спрямовано на моделювання імунної відповіді, вироблення органічних кислот та антимікробних сполук, а також вивчення взаємодії з мікрофлорою господаря та вироблення корисних для макроорганізму вторинних метаболітів [205]. З огляду на це, важливо оцінити

потенційні пробіотичні мікроорганізми, щоб підтвердити їх користь для здоров'я людини та продемонструвати їх правильне використання. Варто зазначити, що характеристика пробіотиків отримується із досліджень проведених *in vitro* або *in vivo*, однак цю інформацію потрібно підтвердити для успішного використання в промислових масштабах біотехнологічних виробництв [205]. Оцінка пробіотиків ґрунтується на здатності штаму виживати в умовах шлунково-кишкового тракту, низькому рівні рН середовища та резистентності до лізоцимів [206]. При цьому, використовують також й інші характеристики пробіотичних ізолятів, зокрема, стійкість до жовчі, антибіотикорезистентність, адгезивні властивості [206, 207], продукування метаболітів з антимікробною активністю [208].

За призначенням пробіотики застосовують у різних сферах, зокрема, для забезпечення функціонального харчування, лікування та відновлення мікробіоценозу після застосування антибіотиків, з метою імунокорекції при інфекційних захворюваннях [209].

Однак, не дивлячись на призначення пробіотиків, при їх конструюванні до мікроорганізмів висуваються певні вимоги, зокрема, пробіотичні штами повинні бути безпечними, проявляти антагоністичні властивості до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори, бути стійкими до дії кислоти шлункового соку, травних ферментів та жовчі, мати високу швидкість росту, проявляти адгезивні властивості та колонізаційну резистентність, проявляти імуномодуляторну та імуногенну дію і бути технологічними при виробництві [210-212]. Пробиотики чинять різнобічний та позитивний вплив на макроорганізм, вони знижують проникність клітинних бар'єрів для токсинів, здійснюють дезінтоксикацію токсичних речовин, які продукують патогенні мікроорганізми [213]. Поряд з цим, пробиотики продукують різні біологічно активні речовини та сприяють виробленню макроорганізмом медіаторів, що позитивно впливають на функції травної, серцево-судинної систем та на обмінні процеси в цілому [214].

Отже, вплив пробіотиків на макроорганізм складний та багатогранний і може одночасно проходити у декількох напрямках, зокрема, підвищення захисних та посилення бар'єрних властивостей епітелію кишечника, конкуренції у порожнині кишечника з патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами та мати імуномодельований ефект [215].

Пробіотичні бактерії здатні інгібувати продукцію ІЛ-6, ІЛ-8 і стимулювати продукцію ІЛ-10 та знижувати активність NF-κB, ФНО-α, ІФН-γ [216]. Системний вплив пробіотичних препаратів полягає у підвищенні рівня неспецифічної клітинної імунної відповіді, яка характеризується активацією макрофагів, натуральних кілерів тощо [217]. При цьому імуномодуляторну дію здатні проявляти як моно-, так і полікомпонентні препарати [218, 219].

Встановлено, що пробіотики можуть надавати як імунологічні, так і неімунологічні ефекти. До імунологічних ефектів пробіотиків відносяться збільшення продукції IgA та активація локальних макрофагів, моделювання цитокінових профілів тощо. Пробіотики проявляють різноспрямований модуляторний вплив на імунну реактивність як на локальному рівні, так і системному. Локальна дія пробіотичних мікроорганізмів асоційована зі збільшенням кількості Ig A-позитивних клітин і макрофагів у тонкому відділі кишечника [219]. До неімунологічних ефектів належить продукція антимікробних пептидів, зміна рН середовища, конкуренція за поживні речовини з патогенними мікроорганізмами, посилення бар'єрної функції кишечника тощо [220].

Пробіотики, як правило, додають до їжі як добавки та забезпечують споживачам такі переваги, як підтримка здорової мікробіоти кишечника, зниження рівня холестеролу та регуляція імунної відповіді [221, 222]. Також пробіотики використовуються для лікування розладів травлення та шлунково-кишкових захворювань, а також захворювань шкіри, рота, сечовивідних шляхів та органів дихання [222, 223, 225,].

Більшість комерційно доступних видів пробіотиків належать до родів

*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* та *Bifidobacterium* [226, 227]. Проте, слід враховувати, що пробіотичні мікроорганізми не можуть надовго приживлятися у біотопах і їх фізіологічна роль є транзитною. Тому головне завдання при лікуванні дисбактеріозів пробіотиками є відновлення мікробного балансу та функцій індигенної мікрофлори. Пробіотична флора повинна створювати у біотопі умови для відновлення складу індигенної мікрофлори та її фізіологічних властивостей. При цьому надзвичайно важливою перевагою пробіотиків є те, що на відміну від антибіотиків вони не викликають утворення до них стійких форм бактерій [228] і не пригнічують імунітет, а стимулюють вироблення антитіл і його неспецифічних факторів [220, 230]. Біологічна ефективність пробіотичних препаратів визначається не лише властивостями штамів мікроорганізмів, що входять до складу препарату, а й технологією їх отримання, де ключовим є досягнення максимального виходу життєздатних клітин бактерій і корисних для макроорганізму біологічно активних речовин, які синтезуються штамми продуцентами [231].

Сьогодні біотерапію розглядають не лише як процес реімплантації нормофлори, яка зазнала змін при проведенні антибіотикотерапії, але і як процес ініціації механізмів відновленню гомеостазу [232]. Симбіотична мікрофлора людей, які проживають в регіонах з різними кліматичними умовами та раціонами харчування є абсолютно різною. Тому слід приймати до уваги тісну взаємодію між мікрофлорою людини та екзогенним мікробним світом [18, 19]. Тобто, найефективнішими є пробіотики, основу яких складають штами мікроорганізмів, що циркулюють у певній місцевості. Принциповою перевагою вітчизняних пробіотиків є адаптованість штамів мікроорганізмів до певної популяції населення. Тому, створення пробіотиків на основі українських біоваріантів фізіологічної мікрофлори є актуальним та важливим завданням біотехнології [20]. Перевагою застосування пробіотиків є можливість сумісного застосування з антибіотиками, оскільки для пробіотичних штамів характерна антибіотикорезистентність, проте, у таких випадках, є загроза поширення генів

стійкості [233].

Застосування пробіотиків коригуюче впливає на нормофлору та запобігає кількісним змінам представників патогенної і умовно-патогенної мікрофлори травного тракту. Встановлено негативний вплив на імунну опірність організму порушень складу кишкової нормофлори, яка часто супроводжується розвитком запальних процесів та порушенням цілісності кишкового бар'єру внаслідок чого розвивається системна ендотоксемія і генералізація асоційованого з ожирінням запалення [234]. При цьому у біотопі щурів розвиток глутаматного ожиріння спричиняв вірогідне зниження на два порядки кількості представників роду *Lactobacillus* на тлі збільшення кількості *E. coli* та *S. aureus*. Імуномодуляторна дія препарату пробіотика у тварин із ожирінням характеризувалася статевою диверсифікацією. У самок застосування препарату викликало відновлення функціональної активності перитонеальних макрофагів. Позитивні зміни у мікробіоті й імунній реактивності перитонеальної порожнини у самиць супроводжувалося зниженням вагових показників жирової тканини різної локалізації. У самців застосування пробіотика викликало такі самі ефекти, проте вірогідні зміни у вагових індексах жирової тканини не відзначали. Причиною зазначеного феномена може бути системна запальна імунна реакція [235].

Серед пробіотиків значне місце посідають препарати виготовлені на основі спороутворюючих мікроорганізмів. Такі препарати мають високу антагоністичну активність до умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів, здатні синтезувати різні вітаміни, зокрема, групи В, сприяти корекції дисвітамінозу, спричиненого застосуванням протимікробних препаратів, наділені протівірусними, протимікробними та імуномодулювальними властивостями [236, 237]. Крім того, спороутворюючі бактерії здатні синтезувати комплекс ферментів, що стимулюють і регулюють нормальне травлення, внаслідок чого поліпшується всмоктування в шлунково-кишковому тракті жиророзчинних вітамінів Е та Д. Позитивна дія цих бактерій направлена

і на імунну систему, зокрема, активуються макрофаги, стимулюється реплікація імуноглобулінів, підсилюється вироблення ендogenous інтерферону та лізоциму [238].

З огляду на це, необхідно відзначити, що імунна система макроорганізму є однією з найскладніших і маловивчених. Так, на протистояння організму різноманітним інфекційним збудникам впливає багато чинників, одним із головних є стан мікрофлори кишечника. Якщо у кишечнику переважають молочнокислі бактерії, то у цілому, забезпечується позитивний вплив на функціонування організму [239].

Тому використання пробіотиків, виготовлених на основі молочнокислих бактерій є надзвичайно актуальним питанням біотехнології, гуманної та ветеринарної медицини. Крім того, доведено, що різні штами МКБ, зокрема, *Lactobacillus plantarum* можливо використовувати як біологічний бар'єр, що дозволяє уповільнити розвиток патогенної мікрофлори [240].

Встановлено імуномодулювальні властивості штамів *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* IMVB-7281, *Lactobacillus casei* IMV B-7280, *Lactobacillus acidophilus* IMV B-7279, *Bifidobacterium animalis* VKL. У лабораторних тварин, інфікованих стафілококом, після застосування лакто- та біфідобактерій, нормалізувалася функціональна активність системи фагоцитозу а також збільшувалось продукування ендogenous інтерферону [241].

Використання лактобактерину після аплікацій на шкіру ітаконової кислоти коригуюче впливало на мікрофлору приєпітеліальної біоплівки слизової оболонки тонкого відділу кишечника, при цьому суттєво зростала кількість бактерій роду *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* на тлі зменшення патогенних та умовно патогенних бактерій *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Staphylococcus* та нормалізувався склад мікроорганізмів роду *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus* та *Bacillus* [242, 243].

Поряд із беззаперечним позитивним впливом молочнокислих бактерій на макроорганізм, необхідно відзначити, що пероральне введення пробіотика у

великих дозах призводило до погіршення загального стану білих мишей, зокрема, до транслокації бактерій в черевну порожнину, а у окремих тварин розвинувся перитоніт та загибель тварин. У крові тварин виявляли зростання продукції Т-лімфоцитами і НК-клітинами інтерферону, що вказувало на спрямованість імунної відповіді переважно клітинного типу та одночасне стимулювання протимікробної активності макрофагів [244].

Тому важливим є встановлення оптимальної концентрації пробіотичних штамів, оскільки дослідженнями встановлено, що для досягнення пробіотичного ефекту необхідне застосування штамів *Lactobacillus spp.* у достатньо високій кількості. За таких умов, лактобактерії здатні покращувати стан органів травлення, сечостатевої системи та регуляцію метаболітичних процесів [245].

У дослідженнях *in vivo* на мишах виявили пробіотичний потенціал штамів *Lactobacillus plantarum* B7 та *Lactobacillus rhamnosus* D1, виділених із традиційного бразильського сиру Мінас Серра да Канастра. Крім того, застосування цих штамів покращувало конверсію кормів, що сприяло підвищенню імунітету і, таким чином, посилювало захисні сили організму у боротьбі з інфекцією. Встановлено високу стійкість цих штамів до впливу шлункових кислот і солей жовчі, а також їх інгібуючу дію до *Listeria monocytogenes* [246]. Слід зазначити, що протилістерійна дія деяких штамів *Lactobacillus spp.* спостерігалася в м'ясі та молочних продуктах після їх внесення [247].

Як відомо, порушення рівноваги між ендогенною та патогенною мікрофлорою спричиняє функціональні розлади травної системи, що може бути причиною пригнічення емоційного стану людини та підвищення чутливості до стресу [248].

З огляду на це, дисбактеріоз і стресові стани взаємно підсилюють один одного, що в цілому спричинює порушення гомеостазу макроорганізму. При цьому в організмі виникає надмірна імунореактивність, а у тканинах проходить

активування пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та порушується функціональна взаємодія імунної та гіпоталамо-гіпофізарної систем [249, 250]. Пробіотичні препарати допомагають подолати такі стани. Дослідженнями доведено, що одним з механізмів антивираzkового профілактичного впливу пробіотичних штамів *B. animalis* VKL, *B. animalis* VKB та *Lb. casei* IMVB-7280 є відновлення ними про- та антиоксидантної рівноваги. Отримані результати вказують на ефективність застосування комбінованих пробіотиків у профілактиці стресіндукованих уражень, зокрема, виразкової хвороби шлунка [251, 252]. При цьому терапевтичний ефект МКБ пов'язують ще й із швидкою їх колонізацією слизової оболонки шлунка після утворення виразки [253, 254].

Порівняльна оцінка ефективності моно- та полікомпонентних пробіотичних штамів за профілактики стресіндукованих уражень та порушення антиоксидантної рівноваги щурів показала, що за умов різної тривалості введення не встановлено негативного впливу на ерозивно-виразкові ураження шлунка щурів [254, 255]. Проте, у подальших дослідженнях ефективною виявилась суміш пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL та *Bifidobacterium animalis* VKB (1:1), яка спричинила зменшення площі виразкових уражень на 31,3% порівняно з контрольною групою тварин. Полікомпонентний пробіотик, у склад якого входило чотири штами *Lactobacillus fermentum*, три штами *Lactobacillus plantarum* та шість штамів *Enterococcus faecium*, спричиняв зниження ПОЛ, які посилюються за дії стресу, в тому числі у слизовій оболонці шлунка [255], а також спричиняв посилення утворення секреторного імуноглобуліну А та зменшення дегрануляції тучних клітин [251, 256]. Враховуючи дані літератури щодо антиоксидантних властивостей пробіотиків [257], були проведені дослідження із встановлення їх впливу на процеси ліпопероксидації, зокрема, встановили зменшення на 18,6% концентрації ДК (дієнових кон'югатів) за 14-добового застосування суміші молочнокислих *Bifidobacterium animalis* VKL, VKB та *Lactobacillus casei* IMVB-7280, а також спостерігали зниження вмісту ТБК-активних продуктів на

23% та зниження активності каталази на 19% порівняно з групою щурів, які отримували воду [251].

Завдяки сучасним досягненням біотехнології для людства стали доступні надзвичайно важливі та корисні організму так звані функціональні харчові продукти. До функціональних продуктів належать харчові продукти із заданими властивостями. Це такі харчові продукти та інгредієнти, що містять біологічно активні речовини, зокрема, мінеральні речовини, амінокислоти, поліненасичені жирні кислоти, вітаміни, пребіотики, пробіотики, синбіотики. Сьогодні одним із найважливіших наукових напрямів біотехнології є розроблення та впровадження фундаментальних та практичних технологій виробництва продуктів харчування, нових нетрадиційних підходів і вдосконалення традиційних технологій виробництва функціональних продуктів [3, 4, 258, 259].

Згідно з проведеними дослідженнями за останні роки асортимент інноваційних функціональних продуктів харчування домінував на світовому ринку і становив понад 40% [3]. Левова частка світового виробництва функціональних продуктів харчування належить США, там виробляється 40% продуктів, друге місце належить країнам ЄС – близько 35%, де лідерами є Німеччина, Франція і Великобританія, третє місце – Японія (близько 25%) [2, 3].

При цьому, необхідно зауважити, що у різних країнах асортимент функціональних продуктів харчування представлений по-різному. Зокрема, у США, на молочні продукти припадає 6,0%, де переважають напої – 48,8%. Проте, у країнах Європейського Союзу молочні продукти та фруктові-молочні продукти функціонального харчування користуються великим попитом і їх частка складає, відповідно 64 та 23% [258-260]. Як і у країнах ЄС на вітчизняному ринку також наявна різноманітна харчова продукція функціонального призначення, зокрема, широко розповсюджені молочні пробіотичні продукти, частка яких становить 67%, зернові – 15% та хлібобулочні вироби – 10% [261-263]. Сучасний ринок харчових добавок

представлений широким асортиментом функціональних інгредієнтів та їхніх сумішей. Хімічна природа речовин, що входять до складу сумішей, різноманітна: білки рослинного і тваринного походження, похідні крохмалю, камеді, пектини, похідні целюлози тощо [264, 265].

У біотехнології харчових продуктів важливу роль відіграють живі культури мікроорганізмів. Так, незамінними у процесах бродіння тіста є дріжджі та молочнокислі бактерії [266]. Встановлено, що використання заквасок на основі молочнокислих бактерій *Lactobacillus buchneri*, *L. brevis*, *L. fermentum* при виробництві хліба дозволяє скоротити час бродіння і вистоювання тіста, оскільки в них інтенсивніше збільшується кислотність та показник підйимальної сили. Використання заквасок на основі МКБ впливає на технологічні характеристики виробів, зокрема, на формостійкість та пористість м'якуша [267]. У результаті зброджування цукрів у тісті МКБ утворюють молочну, оцтову, пропіонову, мурашину кислоти, спирт та вуглекислий газ, а також впливають на утворення аромату і смаку готових виробів [268, 269]. При використанні заквасок велике значення має тривалість бродіння, оскільки тривале бродіння сприяє розвитку супутньої мікрофлори, яка негативно впливає на якість продукції та здоров'я людей [270]. Поряд з цим при приготуванні заквасок через 120 год їх зберігання вони мали вираженіший аромат, у порівнянні зі свіжими заквасками [271]. Крім того, було доведено, що специфічними для житніх заквасок є лише два види МКБ – *L. brevis* і *L. plantarum* [272].

Встановлено, що використання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* у поєднанні з *L. plantarum* та *E. faecium* при виробництві хлібного квасу інтенсифікує технологічний процес та дозволяє отримати продукт з хорошими смаковими та ароматичними властивостями [273].

Найвагоміше значення пробіотичні МКБ відіграють у виробництві функціональних молочних продуктів, кисломолочних продуктів і сирів. Кисломолочні продукти відносять до функціональних, оскільки вони позитивно впливають на різноманітні функції макроорганізму, що, у свою чергу, поліпшує

стан здоров'я та знижує ризик розвитку захворювань [274]. Функціональні властивості кисломолочних продуктів забезпечуються не лише внесеними мікроорганізмами, але й тим, що у процесі молочнокислого бродіння продукт набуває нових корисних властивостей [275].

Основними властивостями функціональних кисломолочних продуктів є нормалізація кишкової мікрофлори, вплив на секреторну функцію травних залоз і перистальтику кишечника. Такі продукти пригнічують ріст патогенної, гнильної мікрофлори, стимулюючи ріст нормальної флори, покращують всмоктування кальцію, фосфору, магнію, заліза та мають високу біологічну цінність, оскільки містять незамінні амінокислоти, а також вітаміни [276].

Дослідженнями встановлено, що включення до раціону дітей кисломолочних продуктів активно коригує стан мікробіоценозу кишечника, при цьому збільшується кількість лакто- та біфідобактерій та зменшується кількість умовно-патогенної мікрофлори, за рахунок антагоністичного впливу молочнокислих бактерій [158].

Слід відзначити, що пробіотики, як продукти функціонального призначення здатні підвищувати неспецифічну резистентність організму людини та здійснювати біотрансформації селену із неорганічної форми в органічну [277].

Сьогодні одним із найпопулярніших кисломолочних продуктів завдяки високій харчовій цінності та користі для організму є йогурт [278]. Найчастіше для його виробництва використовують штами молочно-кислих бактерій, зокрема, *Streptococcus thermophilus* та *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* [279]. Доведено, що вживання йогурту в склад якого входить *L. gasseri* сприяло зниженню маси тіла у людей з ожирінням [280], а включення йогурту до раціону дітей корегує стан мікробіоценозу кишечника, внаслідок чого збільшується чисельність лакто- та біфідобактерій на тлі зменшення кількості умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів [45].

При виробництві йогурту високу ефективність встановлено при

використанні консорціуму заквасок пробіотичних штамів: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* та *Lactobacillus plantarum* [281]. Це пов'язано з тим, що штами *S. thermophilus* та *Lb. bulgaricus* метаболізують глюкозну частину лактози при цьому вивільняється галактоза та залишається велика кількість неферментованої лактози [282]. А як відомо, у людей із непереносимістю цих цукрів це є надзвичайно важливою проблемою [283], а у технологічному аспекті спричинює певні проблеми, зокрема, зниження якості ферментованих продуктів, дефекти текстури сиру тощо [284].

З огляду на це, важливим є проведення заходів щодо зменшення кількості лактози та галактози у продуктах функціонального призначення [285]. Одним із заходів спрямованим на отримання безлактозного молока є застосування лактази, яка використовується для гідролізу лактози в галактозу та глюкозу [286]. Однак, через свою дороговизну цей метод не знайшов свого застосування, а крім того нездатний вивести галактозу з молока, а виготовлені кисломолочні продукти придатні для людей з непереносимістю лише лактози [286]. Іншим підходом було створення модифікованого штаму *Lb. thermophilus* з фенотипом позитивної галактази, який спільно культивували з *Lb. bulgaricus* [287], проте, ефективність була низькою.

Виходом з цієї ситуації стало залучення у склад закваски для йогуртів штаму *Lactobacillus plantarum*, який присутній у ферментованих та кисломолочних продуктах [288]. Завдяки своїм унікальним властивостям, зокрема, безпечності та одночасно як головний представник нормофлори макроорганізму, має усі підстави бути залученим до складу заквашувальних препаратів для нових функціональних продуктів [289]. Доведено, що ферментоване молоко на основі *Lb. plantarum*, має функціональні властивості для здоров'я людини [246].

Встановлено, що застосування кормової пробіотичної добавки на основі штаму *Lactobacillus plantarum* IMB B-7679 спричинювало зниження у сироватці крові перепелів концентрації холестеролу та триацилгліцеролів [290]. Крім того,

у людей штами *Lactobacillus plantarum* мають ще й гіпохолестеринемічний ефект [291-294]. Очевидно, вплив цих бактерій на показники ліпідограми зумовлений наявністю у складі бактерій гідролази жовчних солей, завдяки якій відбувається елімінація жовчних кислот з ентерогепатичної циркуляції, що, відповідно, стимулює використання печінкою ендogenous холестеролу для продукції жовчних кислот [292-294].

Необхідно відзначити, що довготривале застосування людям *Lb. plantarum* спричинювало зниження рівня загального холестеролу та ліпопротеїнів низької щільності, що вказувало на їх додатковий гіпохолестеролемічний ефект [295]. При цьому, механізми ліпідознижуючого ефекту пробіотичних мікроорганізмів є видо-та штамоспецифічними [296].

Крім впливу на обмін холестеролу, штами *Lactobacillus spp.* ефективні в лікуванні ожиріння, артеріальної гіпертензії, метаболічного синдрому [296, 297]. Штами *Lb. plantarum* і *Lb. paracasei spp* були здатні також зменшувати розміри адипоцитарних клітин і жирового шару у мишей, які перебували на дієті з великим вмістом жирів [298, 299].

У виробництві твердих сичужних сирів найпроблемнішим є підбір композицій бактеріальних заквасок та їх кількості. Так, при збільшенні загальної кількості бактеріальної закваски підвищувалась кислотність молока та скорочувалась тривалість вимішування зерна, що забезпечувало формування органолептичних показників сичужних сирів [300].

У технології ферментованих молочних продуктів дитячого харчування доцільно використовувати як монокультури *Lactobacillus acidophilus* La-5 та *Bifidobacterium animalis* Bb-12, так і змішані культури *L. lactis ssp. lactis* + *L. lactis ssp. cremoris* + *L. lactis ssp. diacetylactis* + *L. mesenteroides*, при таких умовах отримують кисломолочний продукт з нормованими фізико-хімічними показниками, високими пробіотичними та гіпоалергенними властивостями [301].

Крім того, ферментовані продукти сприяють нормалізуванню мікробіоти

кишечника та підвищують імунітет і стійкість до захворювань [179]. Необхідно відзначити, що використання у складі заквашувальних композицій лактококів, лакто- та біфідобактерій призводить до синергізму їх протеолітичних властивостей, що забезпечує отримання кисломолочних продуктів з високим ступенем гідролізу білків, в тому числі алергенних фракцій [301-304].

Молочнокислі бактерії відіграють головну роль у забезпеченні мікробіологічної якості харчових продуктів. При виробництві кисломолочної продукції лактобактерії сприяють зменшенню рівня БГКП, внаслідок зниження кислотності продукту [305], а при виробництві сирів використання композиції штамів *L. lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus rhamnosus* та *L. plantarum* у концентрації  $4 \cdot 10^{11}$  КУО/г запобігає розвитку технічно шкідливих контамінантів, зокрема, маслянокислих бактерій [306].

Альтернативою хімічним консервантам є бактеріюцини молочнокислих бактерій, які являють собою низькомолекулярні пептиди з високою протимікробною дією проти збудників харчових інфекцій [307]. Слід зауважити, що проблема антибіотикорезистентності мікроорганізмів, особливо, у харчовому ланцюзі та попит на продукти харчування без застосування хімічних консервантів спричинило пошук природних антимікробних препаратів. Одним із таких шляхів є використання бактеріюцинів, які продукує штам *Enterococcus faecium* S6, виділений із сирого верблюжого молока. Зокрема, встановили високу протимікробну активність щодо *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* та *Escherichia coli*. Протимікробна дія ентероцинів полягала у руйнуванні клітинної стінки і поєднувалась із інгібувальною дією органічної кислоти. Крім того, встановили, що інгібування бактерій *L. monocytogenes* у зразках молока відбувалося упродовж одного тижня [308].

Протимікробна дія МКБ зумовлена, окрім продукування бактеріюцинів, ще й дією молочної кислоти, пероксиду гідрогену, діацетилу тощо [309]. Неочищену культуральну рідину, що містить бактеріюцини, можна використовувати як кормові добавки, а очищений екстракт як консервант [138,

144]. Так, у багатьох дослідженнях доведено високу ефективність застосування бактеріоцинів для біоконсервації продуктів харчування, зокрема, молочних [145, 146, 310, 311].

Формування антибіотикорезистентності у мікроорганізмів породило проблеми з одного боку безпечності харчових продуктів, а з другого – безпечності хімічних консервантів, що використовуються при виробництві продуктів харчування [142, 144]. Патогенні мікроорганізми легко розповсюджуються при виробництві продуктів харчування, а значить можуть інфікувати й людей [312].

У таких випадках застосовують різні антибактеріальні препарати, проте такий підхід спричиняє дисбаланс мікробіоти, що може призвести до порушення роботи травної системи та сприяти збільшенню різного роду захворювань [142]. З огляду на це, для зменшення використання антибіотиків у харчовій промисловості, велику зацікавленість становлять природні антимікробні препарати, які є надзвичайно перспективними у виробництві безпечних продуктів харчування без застосування хімічних консервантів [144]. Заквашувальні культури впливають на властивості ферментованих молочних продуктів та визначають їх безпечність та якість [314]. Так, було встановлено, що за низької активності заквашувальних культур розвиваються лактококи чи ацидофільні палички, які здатні утворювати слиз та тягучість [329].

Необхідно зауважити, що ферментовані харчові продукти домашнього виробництва, у тому числі молочні, є наслідком натуральної ферментації і є надзвичайно потужним джерелом оригінальних живих мікроорганізмів [315]. В цьому аспекті особливої уваги заслуговують дослідження направлені на вивчення мікрофлори, виділеної з природних еконіш, зокрема, бринзи, оскільки в багатьох країнах вона є традиційним продуктом харчування [316]. Завдяки оригінальній мікрофлорі, склад якої є унікальним, бринза позитивно впливає на організм людини [317]. Крім того, вона містить широкий спектр мікроорганізмів, які відіграють вирішальну роль у формуванні смакових та

ароматичних властивостей сиру. Мікроорганізми присутні протягом усього процесу виробництва сиру і є надзвичайно важливими для згортання та її дозрівання [318]. Дослідженнями встановлено, що загальна кількість бактерій у бринзі становила від 3,83 до 3,78 log КУО/г, ентерококів від 2,97 до 3,24 log КУО/г, кількість коліформних бактерій від 3,07 до 3,85 log КУО/г, молочнокислих бактерій від 3,05 до 3,13 log КУО/г, дріжджів від 2,19 до 2,54 КУО/г [319].

Для виготовлення бринзи використовують овече, або суміші овечого та коров'ячого молока [320]. Вважається, що овече молоко є джерелом білків, вітамінів, мінералів та поживних речовин [321].

Основними бактеріями бринзи, які виробляли у різних регіонах Словаччини були ентерококи, зокрема, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, а також мікроорганізми роду *Lactobacillus ssp.*, *Lactococcus lactis ssp.*, *Pediococcus ssp.* та *Streptococcus ssp.* [322-325].

Із карпатської бринзи, виготовленої з овечого молока, було виділено 106 штамів мікроорганізмів, які віднесли до родів *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* - *L. plantarum*, *Enterococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* Більшість штамів *L. lactis ssp. lactis*, *L. plantarum* та *L. mesenteroides* були активними кислотоутворюючими агентами та стійкими до 4% розчину кухонної солі [22].

Проте, слід зауважити, що при виробництві високоякісної, безпечної продукції та для високого виходу сиру велику роль відіграє якість молока [326].

Тому часто бринзу можна віднести до продуктів харчування, які несуть найбільший ризик для здоров'я, оскільки його виготовляють з непастеризованого овечого молока, або із суміші непастеризованого овечого та пастеризованого коров'ячого молока [327]. Так, у бринзі виявили грам-позитивні, грам-негативні бактерії та дріжджі [319], стафілокок [328], *Salmonella spp* [329], *Listeria monocytogenes* [330].

З огляду на це, велике значення відводиться пробіотичним властивостям заквашувальних мікроорганізмів, які завдяки своїм антагоністичним

властивостям інгібують ріст патогенних мікроорганізмів та запобігають псуванню харчових продуктів [331, 332].

Отже, завдяки сучасним досягненням науки, біотехнологічні методи використовуються у всіх галузях народного господарства, проте особливо актуальним є використання мікроорганізмів для створення продуктів харчування. У цьому аспекті необхідно відзначити використання мікроорганізмів при конструюванні пробіотичних препаратів. Завдяки високій антагоністичній активності до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори, адгезивним властивостям, колонізаційній резистентності, здатності проявляти імуномодуляторну, імуногенну дію та технологічним властивостям пробіотики відіграють надзвичайно важливу роль у забезпеченні здоров'я організму людини та тварин.

Важливими є створені на основі живих культур мікроорганізмів продукти харчування функціонального призначення, які здатні забезпечувати людей безпечними та якісними, а головне корисними продуктами харчування. Тому актуальним є залучення у біотехнологічні процеси живих культур МКБ для виготовлення як пробіотичних препаратів, так продуктів функціонального призначення та заквашувальних препаратів для виробництва кисломолочних продуктів і сирів, при цьому надзвичайно важливим є використання пробіотичних штамів, виділених з природних еконіш.

## **Висновки до розділу 1**

Згідно з новітніми дослідженнями нормофлора макроорганізму це якісне та кількісне співвідношення асоціацій мікроорганізмів окремих органів і систем, що підтримують біохімічну, метаболічну та імунну рівновагу макроорганізму необхідну для збереження його здоров'я. Вона є важливим фактором загального гомеостазу організму. Крім основного фізіологічного призначення нормальної мікрофлори, механічного захисту слизової оболонки,

пригнічення патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, надзвичайно важливою є їх імуномодулювальна дія.

Вплив несприятливих факторів зовнішнього середовища, неконтрольоване застосування протимікробних засобів веде до порушення рівноваги між корисною та патогенною мікрофлорою і, як результат, виникнення різних патологічних процесів. У таких випадках для відновлення мікробіоти макроорганізму виправданим є використання пробіотичних препаратів та продуктів функціонального призначення, виготовлених на основі пробіотичних штамів. Однак, для отримання ефективних та безпечних пробіотичних штамів, важливим є правильно оцінити та підібрати мікроорганізми, що входять до їх складу. Найперспективнішими пробіотиками чи пробіотичними перапаратами є МКБ. Серед яких необхідно виділити ентерококи, які володіють значними біотехнологічними властивостями, зокрема, здатністю росту за низьких значень рН середовища, стійкістю до високих температур, здатністю синтезувати біологічно активні речовини, високими антагоністичними властивостями до умовно-патогенної мікрофлори.

Також перспективними є лактобактерії, які завдяки своєму різнобічному метаболізму та здатності синтезувати широкий спектр корисних метаболітів широко використовуються у біотехнологічних процесах виготовлення продуктів харчування. При цьому необхідно відзначити надзвичайно високу ефективність використання молочнокислих бактерій у композиції, що підвищує ефективність біотехнологічного процесу та покращує якість готового продукту. З іншого боку важливим є залучення у біотехнологічні процеси мікроорганізмів, виділених у певній місцевості, оскільки ці штами адаптовані до певної популяції населення.

Аналізуючи дані літератури, слід відзначити, що на сьогодні усі пробіотики чи заквашувальні препарати для молочних продуктів виготовляються на основі комерційних пробіотичних штамів. Саме тому надзвичайно актуальним питанням харчової біотехнології є розробка

пробіотичних заквашувальних препаратів для молочних продуктів, виготовлених на основі мікроорганізмів, виділених з природних еконіш.

## РОЗДІЛ 2 УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Схема проведення досліджень

Дисертаційна робота виконувалась упродовж 2016-2023 років на кафедрі технології молока та молочних продуктів та кафедрі технології виробництва та переробки продукції тваринництва Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького, в акредитованих у Національному агенстві з акредитації України лабораторіях Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок та Інституту біології тварин. Дослідження проводили за схемою (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Схема проведення дослідження

Експериментальну частину дисертаційної роботи виконували на лабораторних тваринах у віварії Інституту. При маніпуляціях з тваринами дотримувались положення «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей» [333] та ухвали Першого національного конгресу з біоетики [334].

Дослідження були проведені в декілька етапів. На першому етапі вивчали пробіотичні властивості чотирьох штамів ентерококів, виділених із традиційної карпатської бринзи [22], які депоновані в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів. Зокрема, досліджували антагоністичну активність ентерококів, чутливість до антибіотиків, здатність синтезувати біологічно-активні речовини та органічні кислоти.

На другому етапі вивчали технологічні властивості ентерококів, такі як кислотоуворювальні властивості, швидкість накопичення біомаси, стійкість в умовах шлунково-кишкового тракту та до різних концентрацій кухонної солі

На третьому етапі сконструювали заквашувальний пробіотичний препарат, вивчили його вплив на організм лабораторних тварин та виготовили бринзу із використанням препарату «Енетроплан» та досліджували її властивості.

## **2.2. Методи досліджень**

### **2.2.1. Вивчення антагоністичної активності ентерококів**

Для встановлення антагоністичної активності, виділені з бринзи молочнокислі бактерії засівали у рідке середовище МРС (HiMedia, Індія) та культивували упродовж 24 та 48 год за температури 25, 30, 37°C, після чого культуральну рідину центрифугували при 3000 об/хв упродовж 10 хв і фільтрували через мембранні фільтри Minisart, діаметром 0,22 мкм.

Чашки Петрі, які містили 25 см<sup>3</sup> МРС агару, засівали суспензією відповідних тест-культур умовно-патогенних мікроорганізмів (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) у концентрації  $1 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup> і витримували 1 год за температури 37°C. Після цього у середовищі спеціальним профламованим свердлом діаметром 6 мм робили лунки і заповнювали їх отриманим супернатантом різних штамів ентерококів у кількості 100 мкл. Чашки витримували упродовж 2 год (для дифузії супернатанту), а потім інкубували в аеробних умовах упродовж 24 год за температури 37°C.

Антагоністичну активність досліджуваних штамів ентерококів оцінювали за діаметром зон затримки росту умовно-патогенних мікроорганізмів навколо лунок. Штами ентерококів вважалися неактивними при утворенні зони затримки росту 0-5 мм, мало активними – 5-10 мм, помірно активними – 11-20 мм, більше 20 мм – високоактивними.

### **2.2.2. Визначення чутливості умовно-патогенної мікрофлори до антибіотиків за сумісного культивування з ентерококами**

Для цього у рідке живильне середовище МПБ вносили досліджувані штами МКБ та штами умовно-патогенних мікроорганізмів *S. aureus* і *E. coli* у концентрації  $1 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>. Після 24 год інкубування за температури 37°C, виділяли чисті культури мікроорганізмів та визначали чутливість до антибіотиків. Для цього у чашки Петрі наливали 10 см<sup>3</sup> середовища Мюллера-Хінтона (нижній шар), після застигання агару наносили 10 см<sup>3</sup> цього ж середовища (верхній шар), яке містило  $1,5 \times 10^7$  КУО/см<sup>3</sup> відповідних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів. Після застигання середовища наносили диски з антибіотиками, які акуратно притискали пінцетом до середовища. Відразу після нанесення дисків чашки Петрі поміщали у термостат догори дном та інкубували за температурі 37°C упродовж 18-24 год. Після інкубування чашки поміщали догори дном на темну матову поверхню таким чином, щоб світло падало на них під кутом 45°. Діаметр зон затримки росту вимірювали з точністю до 1 мм.

### 2.2.3. Синтезування ентерококами біологічно-активних речовин

При визначенні якісного та кількісного складу амінокислот, до 0,1 г супернатанту ентерококів, вирощених на рідкому середовищі МРС упродовж 48 год, за температури 37°C, додавали 10 см<sup>3</sup> хлористоводневої кислоти, герметично закривали і перемішували. Гідроліз проводили за температури 110°C упродовж 14-16 годин. Після закінчення гідролізу суміш охолоджували до кімнатної температури та фільтрували. У скляні бюкси відбирали по 0,05 см<sup>3</sup> гідролізату і випаровували, після чого вносили 0,15 см<sup>3</sup> розчину натрію карбонату та 0,3 см<sup>3</sup> розчину ФІТЦ, ретельно перемішували і залишали на 35 хв. за кімнатної температури та висушували. Сухий залишок розчиняли у 0,5 см<sup>3</sup> бідистильованої води і використовували для дослідження. Детектування амінокислот проводили за довжини хвилі 254 нм [335].

При визначенні якісного та кількісного складу вітамінів групи В до 0,2 г супернатанту ентерококів, вирощених на рідкому середовищі МРС упродовж 48 год, додавали 5 см<sup>3</sup> робочого розчину, приготовленого згідно з методичними рекомендаціями, ставили на кип'ячу водяну баню на 5 хв., охолоджували, фільтрували і проводили детектування вітамінів за довжинами хвиль 200 та 267 нм [336].

При визначенні якісного та кількісного складу органічних кислот, до 0,5 г супернатанту ентерококів, вирощених на рідкому середовищі МРС упродовж 48 год, додавали 50 см<sup>3</sup> бідистильованої води, підігрітої до 70 С, перемішували на лабораторному струшувачі упродовж 10 хв. Після цього відбирали 1 см<sup>3</sup> фільтрату, відцентрифугували і проводили визначення кількісного та якісного вмісту органічних кислот. Детектування проводили за довжини хвилі 190 нм [337].

Визначення масової долі катіонів амонію, калію, натрію, магнію і кальцію проводили методом капілярного електрофорезу, що ґрунтується на кислотній обробці проб, подальшому розділенні і кількісному визначенні катіонів.

Дослідні зразки супернатанту ентерококів у кількості 1 см<sup>3</sup> вносили у віалу для кислотної обробки, додавали по 10 см<sup>3</sup> соляної кислоти перемішували і ставили у сушильну шафу на 14-16 год при температурі 110 С. Потім зразки охолоджували при кімнатній температурі та фільтрували. В скляні бюкси відбирали по 0,50 см<sup>3</sup> фільтрату та випаровували в струмені теплого повітря. Сухий залишок розчиняли в 0,50 см<sup>3</sup> дистильованої води і проводили визначення катіонів у дослідних зразках. Детектування проводили за довжини хвилі 190 нм [338].

#### **2.2.4. Визначення токсиколого-біологічних властивостей ентерококів**

При визначенні інфекційності ентерококів лабораторним мишам внутрішньошлункового вводили живі штами *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 у дозі 10<sup>8</sup> КУО на тварину, а при визначенні токсичності – інактивовані мікроорганізми у цій самій дозі.

Визначення ферментів, що відносяться до факторів патогенності, зокрема, каталази, лецитинази, плазмокоагулазної активності та фібринолітичних властивостей проводили за загальновизнаними мікробіологічними методиками (Лабинская, 2004) [339].

Вивчення подразнюючої дії досліджуваних штамів ентерококів на слизову оболонку очей проводили на статевозрілих кролях-альбіносах. Перед початком експерименту, проводили ретельний огляд очей з метою виявлення пошкоджень. Після цього, кожній тварині у кон'юнктивальний мішок лівого ока вносили по 0,1 см<sup>3</sup> досліджуваного штаму. Після чого, повіки закривали і витримували упродовж 1-2 с, при цьому праве око було контролем. Після застосування досліджуваного препарату тварин оглядали через 1, 24, 48, 72 години та упродовж 14 діб, при цьому враховували наявність гіперемії, набряку, виділень. Оцінку подразнюючої дії речовини на слизову оболонку очей проводили за появою вираженості гіперемії, набряку, виділень згідно бальної системи [340].

Вивчення подразнюючої дії досліджуваних штамів (*E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20) на шкірі проводили на кролях-альбіносах (по три тварини на кожний штам). Для цього за добу до проведення досліду вистригали шерсть на бокових ділянках шкіри, одна з яких була контролем. Площа обробленої поверхні становила 5-8% поверхні тіла тварин. Потім на попередньо підготовлені ділянки шкіри наносили по 0,5 см<sup>3</sup> досліджуваних ентерококів, зверху накладали марлевий тампон і фіксували його напівпрозорою пов'язкою. Подразнюючу дію досліджуваних штамів оцінювали зразу після закінчення 4-годинної експозиції та через 24, 48 і 72 годин. За цих умов враховували ступінь шкірної реакції (почервоніння, підвищення чутливості, припухлість, запалення), наявність еритеми і набряку, а також загальний стан лабораторних тварин. Час спостереження за тваринами становив 14 діб.

При вивченні гострої токсичності досліджуваних штамів ентерококів за принципом аналогів було сформовано чотири дослідні та контрольну групу білих мишей 2-3 місячного віку, масою тіла 20-22 г. Тваринам контрольної групи задавали ізотонічний розчин Натрію хлориду, тваринам I дослідної групи – *E. durans* SB6, II дослідної групи – *E. faecium*, III дослідної групи – *E. durans* SB18, тваринам IV дослідної групи – *E. durans* SB20. Досліджувані штами мікроорганізмів вводили у дозі  $1 \times 10^{11}$  КУО/см<sup>3</sup> зранку, натще внутрішньошлунково одноразово за допомогою шприца із зондом. Після задавання досліджуваних штамів спостереження за лабораторними тваринами вели упродовж 14 діб. При цьому враховували зовнішній вигляд, поведінку тварин, стан шерсті, видимих слизових оболонок, відношення до корму, час виникнення та характер інтоксикації, її важкість, перебіг, час загибелі тварин або їх одужання.

Визначення підгострої токсичності досліджуваних штамів ентерококів проводили на білих мишах 2-3-місячного віку, масою тіла 20-22 г. З цією метою за принципом аналогів було сформовано чотири дослідні і контрольну групи по

шість тварин у кожній. Досліджувані штами застосовували внутрішньошлунково, щоденно упродовж 28 діб, за допомогою металевго зонда. Тваринам контрольної групи задавали ізотонічний розчин Натрію хлориду, тваринам I дослідної групи – *E. durans* SB6, II дослідної групи – *E. faecium* SB12, III дослідної групи – *E. durans* SB18, тваринам IV дослідної групи – *E. durans* SB20. Тваринам усіх дослідних груп ентерококи задавали у дозі  $1 \times 10^{11}$  КУО/см<sup>3</sup>. Упродовж усього періоду експерименту за лабораторними тваринами вели спостереження, при цьому враховували зовнішній вигляд, поведінку тварин, стан шерстного покриву, видимих слизових оболонок, зміну загального стану тварин, поведінкові реакції, реакції на зовнішні подразники, летальність, зміну маси тіла тварин.

*Вплив композиції молочнокислих бактерій на гематологічні, біохімічні показники сироватки крові, ліпіди печінки та систему антиоксидантного захисту лабораторних тварин.*

Визначення впливу досліджуваної композиції консорціуму МКБ на організм лабораторних тварин проводили на білих щурах лінії Вістар масою тіла 160-180 г. З цією метою було сформовано за принципом аналогів контрольну та дослідну групи тварин по шість тварин в кожній. Тваринам першої (контрольної) групи вводили ізотонічний розчин натрію хлориду, тваринам другої групи – композицію пробіотичних штамів *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18 у співвідношенні 50:40:10 у дозі 1 см<sup>3</sup> ( $1 \cdot 10^7$  КУО/см<sup>3</sup>) на тварину. Досліджувану композицію вводили внутрішньошлунково за допомогою металевго зонда упродовж 21 діб.

У крові визначали: концентрацію гемоглобіну – гемоглобінціанідним методом (з ацетонціангідрином) [342], кількість еритроцитів та лейкоцитів – шляхом підрахунку на сітці Горяєва лічильної камери; лейкограму – шляхом мікроскопічної оцінки сухих, фіксованих метиловим спиртом та пофарбованих барвником Романовського-Гімза мазків крові [342].

Вміст альдегідних і кетонівих похідних окисної модифікації протеїнів

оцінювали за реакцією одержаних карбонільних похідних амінокислотної реакції з динітрофенілгідразином, як описано у Levine et al [343], активність лізоциму визначали нефелометричним методом за Дорофейчук В. Г. [344]. Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у сироватці крові визначали за методикою Гриневич Ю. А. із співавт. [345].

Для визначення ліпідного складу відбирали печінку щурів, тканини подрібнювали на холоді в скляних гомогенізаторах з наступним екстрагуванням загальних ліпідів хлороформ-метаноловою сумішшю у відношенні 2:1 за методом Фолча [346].

Екстракція ліпідів за Фолчем. До 1 г досліджуваного матеріалу додавали 20 мл суміші хлороформ-метанол (2:1). Через 12 годин суміш відфільтровували, додавали 1/5 частину 0,7 н КСІ за об'ємом і залишали до розділення на дві фази. Верхній водно-метанольний шар видаляли за допомогою водно-струменевого насоса, а нижній – хлороформний, що містить ліпіди, випаровували.

Розділення ліпідів на окремі фракції проводили методом висхідної одномірної тонкошарової хроматографії на скляних пластинках. Перед роботою пластинки активували 30 хв. при температурі 105°C в сушильній шафі. Проби ліпідів наносили на пластинку мікродозатором в кількості 40 мкл. розчину та укладали їх в хроматографічні камери. Рухомою фазою слугувала суміш гексану, діетилового ефіру і льодяної оцтової кислоти у відношенні 70:30:1. Одержані хроматограми проявляли в камері, насиченій парами йоду. Для ідентифікації окремих фракцій ліпідів використовували специфічні реагенти і очищені стандарти.

Концентрацію ТБК-активних продуктів у плазмі крові визначали за методикою Коробейникової Е. Н. [347]. Визначення супероксиддисмутазної активності проводили за методикою Дубініної Є. Є. зі співавт. [348]. Вміст гідропероксидів ліпідів у плазмі крові визначали за методом, описаним Мирончиком В. В. [349]. Глутатіонпероксидазну (ЕС 1.11.1.9) активність визначали в еритроцитах крові за Моїним В. М. [350].

Для вивчення впливу досліджуваної композиції консорціуму пробіотичних штамів на мікрофлору товстого відділу кишечника проводили мікробіологічне дослідження проб вмістимого на 21 добу експерименту. Для цього проводили послідовні десятикратні розведення проб, з наступним висіванням матеріалу на селективні живильні середовища. У вмістимому товстого відділу кишечника визначали кількість *E. coli*, *S. aureus*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* та грибів роду *Candida*. Кількість мікроорганізмів в 1 г вихідного матеріалу (С) розраховували за формулою:

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

де: N – середня кількість колоній в одній чашці;

V – об'єм суспензії, що вноситься при посіві;

K – кратність розведення.

Ідентифікацію мікроорганізмів проводили загальновизнаними методами з використанням визначника бактерій Берджі [351].

#### 2.2.5. Дослідження технологічних властивостей ентерококів

*Здатність виживати в умовах різних значень рН середовища та різних концентрацій солі та жовчі.*

З метою визначення здатності різних штамів *E. durans*, SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 рости в різних рН середовища, проводили їх культивування у рідкому МПБ. Для цього культури ентерококів культивували на твердому МРС за температури 37°C упродовж 18-20 год. Після чого стерильним ізотонічним розчином Натрію хлориду проводили змиви і готували завись мікроорганізмів на 0,5 одиниць за стандартом McFarland. У колби із рідким живильним середовищем МПБ вносили змиви культур із розрахунку  $1,5 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>. Досліджувані проби культивували за рН середовища від 3 до 9 одиниць, температури 37°C упродовж 24 год. Ріст ентерококів встановлювали за

зміною оптичної густини середовища культивування визначали за допомогою приладу КФК-3 при довжині хвилі 590 нм.

Здатність ентерококів рости у високих концентраціях жовчі встановлювали шляхом внесення культур (у кількості  $1,5 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>) у МПБ, що містив 20 та 40% медичної жовчі. Ріст ентерококів встановлювали за зміною оптичної густини середовища культивування. Здатність ентерококів виживати в умовах високих концентрацій Натрію хлориду визначали при внесенні культур (у кількості  $1,5 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>) у МПБ, що містив від 3 до 6,5% кухонної солі. У динаміці на 1, 2, 3, 5 та 7 доби проводили посіви на предмет виявлення життєздатних культур.

*Дослідження здатності ентерококів знижувати кислотність середовища культивування за різних температурних режимів.* З метою визначення здатності різних штамів *E. durans*, SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 знижувати кислотність середовища, проводили їх культивування у рідкому МРС. З цією метою культури ентерококів культивували на твердому МРС за температури 37°C упродовж 18-20 год. Після чого стерильним ізотонічним розчином Натрію хлориду проводили змиви і готували завись мікроорганізмів на 0,5 одиниць за стандартом McFarland. У колби із рідким живильним середовищем МРС вносили змиви культур із розрахунку  $1,5 \times 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>. Досліджувані проби культивували за таких температурних режимів: 25, 30, 37°C упродовж 24 та 48 год. Визначення рН середовища проводили потенціометрично за допомогою рН метра Master LAB. Оптичну густину середовища культивування визначали за допомогою приладу КФК-3 при довжині хвилі 590 нм.

#### **2.2.6. Вивчення технологічних властивостей консорціуму штамів МКБ**

Кислотоутворювальну активність консорціуму штамів МКБ оцінювали за

зниженням рН сквашеного молока. Бактерії інкубували в стерильному знежиреному молоці без внесення додаткових компонентів у термостаті при оптимальній для кожного виду МКБ температурі інкубації протягом 3, 6, 9, 24 год. Вимірювання рН проводили за допомогою електронного рН-метра «Muttler Toledo MP220». Титровану кислотність молока визначали за ГОСТ 3624-92 «Молоко і молочні продукти. Титрометричні методи визначення кислотності». Метод полягає у титруванні кислот і кислих солей, що знаходяться в молоці, розчином гідроксиду натрію в присутності індикатора. Титрована кислотність вимірюється в градусах Тернера. Кислотність молока (в °Т) дорівнює кількості розчину гідроксиду натрію (в мл) концентрацією 0,1 моль/л, якого було потрібно на титрування 10 мл молока, помноженого на 10. Перед проведенням аналізу готували контрольні еталони забарвлення, для чого в колбу місткістю 100 мл відмірювали 10 мл молока, 20 мл дистильованої води і 1 мл розчину сульфату кобальту (пентагідрат сульфату кобальту ( $\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) – розчин з масовою концентрацією сульфату кобальту 25 г/л). Суміш ретельно перемішували. Для проведення аналізу в конічну колбу місткістю 100 мл відміряли 10 мл молока і 20 мл дистильованої води. Додавали три краплі розчину фенолфталеїну (спиртовий розчин фенолфталеїну з концентрацією 10 г/л). Суміш ретельно перемішували і титрували розчином гідроксиду натрію (молярної концентрацією 0,1 моль/л) до появи слабо-рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 1 хв і відповідне еталону забарвлення. Перед проведенням експерименту був побудований калібрувальний графік, що дозволяє переводити значення рН в значення титрованої кислотності (в градуси Тернера).

### **2.2.7. Виготовлення бринзи із використанням пробіотичної закваски «Ентероплан»**

Для виготовлення контрольного зразку бринзи у лабораторних умовах було використано 3,5 л коров'ячого молока, для його згортання – бактеріальний препарат безпосереднього внесення RSF (Chr. Hansen, Данія, до складу якого

входять культури *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*) у кількості 0,12 г; ферментний препарат СНУ-МАХ (Chr. Hansen, Данія) у кількості 0,035 г у вигляді 1% водного розчину; кальцію хлориду (0,35 г у вигляді 40% водного розчину), а дослідного зразку – таку саму кількість молока та для зсідання молока аналогічні інгредієнти у вказаних кількостях, але замість заквашувального препарату RSF – заквашувальний препарат «Ентероплан» з дозою інокуляції  $1 \times 10^6 / \text{см}^3$ .

Сиропридатність молока за сичужно-бродильною та бродильною пробами визначали згідно ДСТУ 7357:2013; масову частку жиру, масову частку білка, густину молока, СЗМЗ визначали на апараті «Ekomilk» Butleh 2000 Ltd. Визначення масової частки жиру в бринзі проводили у відповідності до ГОСТ 5867-90, масової частки вологи – у відповідності до ГОСТ 3626-73, масової частки хлористого натрію – у відповідності до ГОСТ 3627-81.

Активну кислотність визначали потенціометричним методом з використанням рН-метра марки АРН-9, титровану кислотність визначали титрометрично (у градусах Тернера) згідно ГОСТу 3624-67, органолептичну оцінку сирів проводили згідно ДСТУ 6003:2008.

Чисельність молочнокислих бактерій визначали методом підрахунку колоній, що проросли на поживному середовищі MRS після відповідного часу інкубування (ДСТУ 7999:2015). Чисельність дріжджів та плісневих грибів досліджували згідно вимог нормативної документації (ДСТУ ISO 6611, 2007).

#### 2.2.8. Статистичні методи

Дані гематологічних, біохімічних, мікробіологічних досліджень обробляли статистично з вираховуванням середніх арифметичних величин (М), середньої квадратичної помилки (m) і ступеня вірогідності різниці (p) між показниками. Статистичну обробку результатів досліджень проводили за

методикою, описаною Ойвіним І. А. (1960) [352], з використанням статистичного програмного пакету Statystic 5,0 для Windows XP. Вірогідність розходжень між показниками оцінювали за критерієм Ст'юдента ( $p < 0,05$ ). Цифрові величини виражали в одиницях СІ.

## **Висновки до розділу 2**

Наведені методи та методики досліджень є сучасними та дають можливість отримати об'єктивний науковий матеріал. Дослідження проводяться на достатній кількості матеріалу та тварин. Методологічно вірно підібраний комплекс мікробіологічних, гематологічних, біохімічних та біотехнологічних досліджень, дасть можливість глибокого розкриття питань дисертаційної роботи. На сьогоднішній день ці методики є сучасні, достатньо апробовані і широко використовуються в наукових дослідженнях.

Дослідний матеріал включає комерційні та вітчизняні ізоляти молочнокислих бактерій, що відповідає національним потребам та сучасній світовій тенденції.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Визначення пробіотичних властивостей штамів ентерококів, виділених з традиційної карпатської бринзи

##### 3.1.1. Дослідження антагоністичної активності

При дослідженні антагоністичної активності супернатанту досліджуваних штамів ентерококів, які культивували упродовж 24 та 48 годин за температурних режимів 25, 30 та 37 °C щодо тест-культур *E. coli*, *S. enteritidis*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, отримали результати, наведені у таблицях 3.1-3.6. З наведених даних у таблиці 3.1 видно, що на 24 годину культивування всі чотири досліджувані штами ентерококів проявили помірну антагоністичну активність до тест-культури *P. mirabilis* за температури 25 °C. Проте, за цих умов, антагоністична активність штамів *E. durans* SB6, SB18, SB20, а також штаму та *E. faecium* SB12 щодо таких культур як *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus* та *P. aeruginosa* була відсутня.

Таблиця 3.1

**Антагоністична активність ентерококів упродовж 24 годин культивування за температури 25 °C ( $M \pm m$ , n=3)**

| Тест-культури         | Штами ентерококів    |                         |                       |                       |
|-----------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                       | <i>E. durans</i> SB6 | <i>E. faecium</i> SB 12 | <i>E. durans</i> SB18 | <i>E. durans</i> SB20 |
| <i>E. coli</i>        | —                    | —                       | —                     | —                     |
| <i>S. enteritidis</i> | —                    | —                       | —                     | —                     |
| <i>E. aerogenes</i>   | —                    | —                       | 9,6±0,3               | 10,3±0,3              |
| <i>P. mirabilis</i>   | 11,6±0,3             | 11,3±0,3                | 10,3±0,3              | 11,6±0,3              |

Продовження таблиці 3.1

|                      |   |   |   |   |
|----------------------|---|---|---|---|
| <i>S. aureus</i>     | — | — | — | — |
| <i>P. aeruginosa</i> | — | — | — | — |

Примітка: у цій і наступних таблицях “—” – відсутність зони затримки росту мікроорганізмів.

Також, слід зазначити, що штами *E. durans* SB18 та SB20 проявляли слабку антагоністичну активність до *E. aerogenes*.

У таблиці 3.2 приведені дані антагоністичної активності досліджуваних штамів ентерококів на 48 годину культивування за температури 25°C. Слід відзначити, що на 48 годину культивування у порівнянні з 24 годиною досліджувані штами були здатними пригнічувати ріст значної кількості патогенної мікрофлори. Однак, як і на 24 годину, усі штами ентерококів не проявляли антагоністичну активність щодо культури *S. aureus*.

Таблиця 3.2

**Антагоністична активність ентерококів упродовж 48 годин культивування за температури 25 °C (M±m, n=3)**

| Тест-культури         | Штами ентерококів       |                            |                          |                          |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                       | <i>E. durans</i><br>SB6 | <i>E. faecium</i><br>SB 12 | <i>E. durans</i><br>SB18 | <i>E. durans</i><br>SB20 |
| <i>E. coli</i>        | 11,3±0,3                | 11,6±0,3                   | 11,6±0,3                 | 11,6±0,3                 |
| <i>S. enteritidis</i> | 10,6±0,3                | 11,3±0,3                   | —                        | 11,6±0,3                 |
| <i>E. aerogenes</i>   | 11,3±0,3                | 11,6±0,3                   | 10,3±0,3                 | 10,3±0,3                 |
| <i>P. mirabilis</i>   | 12,3±0,3—               | 11,6±0,3                   | 12,3±0,3                 | 12,3±0,3                 |
| <i>S. aureus</i>      | —                       | —                          | —                        | —                        |
| <i>P. aeruginosa</i>  | 10,6±0,3                | —                          | 11,3±0,3                 | 11,6±0,3                 |

Проте, було встановлено помірну антагоністичну активність усіх штамів відносно таких культур як *E. coli* та *P. mirabilis*. Штами ентерококів *E. faecium* SB12

та

*E. durans* SB20 помірно пригнічували ріст *S. enteritidis*. Штами *E. durans* SB18, SB20 та SB6 володіли помірною та слабкою активністю щодо *P. aeruginosa*, тоді як штам *E. faecium* SB12 не пригнічував ріст цих бактерій.

Результати антагоністичної активності ентерококів на 24 та 48 годину культивування за температури 30 °C наведено у таблицях 3.3 та 3.4. З даних таблиці 3.3 видно, що у всіх чотирьох штамів відсутня здатність пригнічувати ріст культури *S. aureus*. Антагоністичною активність не володіли також штами *E. durans* SB6, *E. durans* SB18 та *E. faecium* SB12 щодо *P. aeruginosa*. Крім того, спостерігали помірну активність усіх штамів ентерококів до *P. mirabilis* та *S. enteritidis*. Здатність помірно пригнічувати ріст *E. aerogenes* виявлено у всіх штамів ентерококів, окрім штаму *E. durans* SB20, який володіє слабкою активністю. Також помірно пригнічувати ріст *E. coli* здатні усі штами *E. durans*, а штам *E. faecium* слабо пригнічував ріст цього мікроорганізму.

Таблиця 3.3

**Антагоністична активність ентерококів упродовж 24 годин культивування за температури 30 °C ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Тест-культури         | Штами ентерококів       |                            |                          |                          |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                       | <i>E. durans</i><br>SB6 | <i>E. faecium</i><br>SB 12 | <i>E. durans</i><br>SB18 | <i>E. durans</i><br>SB20 |
| <i>E. coli</i>        | 11,3±0,3                | 10,6±0,3                   | 11,3±0,3                 | 11,3±0,3                 |
| <i>S. enteritidis</i> | 11,3±0,3                | 11,6±0,3                   | 12,3±0,3                 | 11,3±0,3                 |
| <i>E. aerogenes</i>   | 12,3±0,3                | 11,3±0,3                   | 11,3±0,3                 | 10,3±0,3                 |
| <i>P. mirabilis</i>   | 11,3±0,3                | 11,3±0,3                   | 11,6±0,3                 | 11,6±0,3                 |
| <i>S. aureus</i>      | —                       | —                          | —                        | —                        |
| <i>P. aeruginosa</i>  | —                       | —                          | —                        | 9,6±0,3                  |

Також слід зазначити, що на 48 годину культивування ентерококів за температури 30°C (табл. 3.4), як і на 24 годину досліджувані штами не пригнічували ріст *S. aureus*. Було встановлено помірну антагоністичну активність штамів *E. durans* SB6, SB18, SB20 та *E. faecium* SB12 щодо

*P. mirabilis*, *E. aerogenes* та *E. coli*. Помірно пригнічували ріст *P. aeruginosa* усі ентерококи штамів *E. durans* крім *E. faecium*, який не проявляв антагонізму.

Таблиця 3.4

**Антагоністична активність ентерококів упродовж 48 год культивування за температури 30 °C (M±m, n=3)**

| Тест-культури         | Штами ентерококів       |                            |                          |                          |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                       | <i>E. durans</i><br>SB6 | <i>E. faecium</i><br>SB 12 | <i>E. durans</i><br>SB18 | <i>E. durans</i><br>SB20 |
| <i>E. coli</i>        | 11,6±0,3                | 11,3±0,3                   | 12,3±0,3                 | 11,6±0,3                 |
| <i>S. enteritidis</i> | 10,6±0,3                | 12,3±0,3                   | 10,6±0,3                 | 12,3±0,3                 |
| <i>E. aerogenes</i>   | 12,3±0,3                | 12,3±0,3                   | 11,6±0,3                 | 11,6±0,3                 |
| <i>P. mirabilis</i>   | 11,6±0,3                | 11,6±0,3                   | 11,3±0,3                 | 11,6±0,3                 |
| <i>S. aureus</i>      | —                       | —                          | —                        | —                        |
| <i>P. aeruginosa</i>  | 12,3±0,3                | —                          | 11,3±0,3                 | 11,6±0,3                 |

Результати антагоністичної активності ентерококів на 24 та 48 години культивування за температури 37°C наведено у таблицях 3.5 та 3.6. З даних, наведених у таблиці 3.5, видно, що усі досліджувані ентерококи володіли помірною антагоністичною активністю щодо *P. mirabilis*, *E. aerogenes* та *S. enteritidis*.

Таблиця 3.5

**Антагоністична активність ентерококів упродовж 24 годин культивування за температури 37 °C (M±m, n=3)**

| Тест-культури         | Штами ентерококів       |                            |                          |                          |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                       | <i>E. durans</i><br>SB6 | <i>E. faecium</i><br>SB 12 | <i>E. durans</i><br>SB18 | <i>E. durans</i><br>SB20 |
| <i>E. coli</i>        | 10,6±0,3                | 11,3±0,3                   | 10,6±0,3                 | 11,3±0,3                 |
| <i>S. enteritidis</i> | 11,6±0,3                | 11,6±0,3                   | 11,6±0,3                 | 11,3±0,3                 |
| <i>E. aerogenes</i>   | 11,3±0,3                | 12,3±0,3                   | 11,6±0,3                 | 11,6±0,3                 |
| <i>P. mirabilis</i>   | 12,3±0,3                | 12,3±0,3                   | 12,3±0,3                 | 11,6±0,3                 |

Продовження таблиці 3.5

|                      |   |   |          |   |
|----------------------|---|---|----------|---|
| <i>S. aureus</i>     | – | – | –        | – |
| <i>P. aeruginosa</i> | – | – | 11,6±0,3 | – |

Було встановлено, що штами *E. durans* SB6 та SB18 слабо пригнічували ріст *E. coli*, в той час як штами *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB20 помірно пригнічували цей мікроорганізм. Слід відзначити значну стійкість тест-штаму *P. aeruginosa* до трьох штамів ентерококів, за винятком *E. durans* SB18, де виявили помірну антагоністичну активність.

Таблиця 3.6

**Антагоністична активність ентерококів упродовж 48 годин культивування за температури 37 °C (M±m, n=3)**

| Тест-культури         | Штами ентерококів    |                         |                       |                       |
|-----------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                       | <i>E. durans</i> SB6 | <i>E. faecium</i> SB 12 | <i>E. durans</i> SB18 | <i>E. durans</i> SB20 |
| <i>E. coli</i>        | 12,6±0,3             | 11,6±0,3                | 12,3±0,3              | 12,3±0,3              |
| <i>S. enteritidis</i> | 12,6±0,3             | 11,6±0,3                | 12,6±0,3              | 12,6±0,3              |
| <i>E. aerogenes</i>   | 12,3±0,3             | 11,6±0,3                | 12,3±0,3              | 12,3±0,3              |
| <i>P. mirabilis</i>   | 12,3±0,3             | 12,3±0,3                | 12,3±0,3              | 11,6±0,3              |
| <i>S. aureus</i>      | –                    | –                       | –                     | –                     |
| <i>P. aeruginosa</i>  | 11,6±0,3             | 11,6±0,3                | 11,6±0,3              | –                     |

Як видно з даних, наведених у таблиці 3.6, усі досліджувані штами ентерококів проявляли помірну антагоністичну активність щодо таких мікроорганізмів як *E. coli*, *S. enteritidis*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis* та *P. aeruginosa*. Проте, штами *E. durans* SB6, SB18, SB20 та *E. faecium* SB 12 не проявляли антагоністичну активність до *S. aureus*.

Отже, досліджувані штами ентерококів проявляли різну антагоністичну активність щодо грам-негативних представників умовно-патогенної мікрофлори, зокрема *E. coli*, *S. enteritidis*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*,

*P. aeruginosa*, проте до грам-позитивних мікроорганізмів – *S. aureus* антагоністичної дії не встановили. Було встановлено, що із збільшенням температури культивування ентерококів зростала їх антагоністична активність. Зокрема, найоптимальнішою температурою культивування була 37°C. За таких умов тільки штам *E. durans* SB18 проявив помірну антагоністичну активність до усіх досліджуваних грам-негативних мікроорганізмів, у тому числі *P. aeruginosa*.

### 3.1.2. Вивчення чутливості ентерококів до антибіотиків

Гіпотеза резервуару генів резистентності припускає, що бактерії-коменсали (до яких, зокрема, відносять молочнокислі бактерії) можуть бути резервуаром генів стійкості з подальшим перенесенням таких генів до патогенних та опортуністичних мікроорганізмів [353]. Є дані, що гени стійкості до антибіотиків, які містяться у молочнокислих бактеріях, можуть передаватися до патогенних бактерій у процесі виробництва харчових продуктів або під час проходження їх через шлунковий тракт людини. Немає жодного бар'єру між патогенними мікроорганізмами (стрептококами), потенційно патогенними (ентерококами) та коменсалами (лактобацилами кишківника, лактококами), який би запобігав передачі набутої резистентності. Тому для біотехнологів, мікробіологів, спеціалістів, які працюють з харчовими продуктами, є очевидним факт, що необхідно уникати поширення бактерій, які несуть мобільні гени стійкості.

Результати визначення чутливості досліджуваних штамів ентерококів до антибіотиків наведено у табл. 3.7. За результатами проведених досліджень можна зробити висновок що досліджувані штами ентерококів продемонстрували високу чутливість до антибіотиків усіх груп (макроліди, тетрацикліни, фторхінолони, цефалоспорини, нітрофурани, хлорамфеніколи, глікопептиди, полімікани, рифампіцини), за винятком аміноглікозидів

(стрептоміцин, канаміцин) та пеніцилінів. Природна чутливість до аміноглікозидів пояснюється тим, що у анаеробів, якими є культури виду *E. faecium*, відсутні системи перенесення цих антибіотиків через плазматичну мембрану клітини [354].

Стійкість до пеніцилінів можна обґрунтувати наявністю в ентерококів спеціальних ферментів, які інактивують дію пеніциліну. Такі ферменти мають назву бета лактамази або пеніцилініази – група бактеріальних ензимів, здатних розривати бета-лактамне кільце деяких антибіотиків (пеніцилінів, цефалоспоринів, карбапенемів та монобактамів), що відносяться до класу бета-лактамів.

Таблиця 3.7

#### Чутливість досліджуваних штамів ентерококів до антибіотиків

| Диски з<br>антибіотиками    | Концентрація,<br>мкг | Зони затримки росту (мм) n=3, |           |          |          |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------|----------|----------|
|                             |                      | SB 20                         | SB 18     | SB 6     | SB 12    |
| Амоксицилін                 | 10                   | 25,6±0,3                      | 30,3±0,3  | 26±0,1   | 25±0,5   |
| Оксацилін                   | 5                    | 22,3±0,6                      | 22,3±0,3  | 21,3±0,3 | 19,6±0,3 |
| Гентаміцин                  | 10                   | 15,3±0,3                      | 16±0,3    | 13,6±0,3 | 14,6±0,3 |
| Стрептоміцин                | 10                   | -                             | 9,6±0,3   | -        | 10,3±0,3 |
| Канаміцин                   | 30                   | 9,6±0,3                       | 11,6±0,3  | 10,3±0,3 | 10,3±0,3 |
| Еритроміцин                 | 10                   | 21,3±0,3                      | 23,6±0,3  | 25,6±0,3 | 23,3±0,3 |
| Тилозин                     | 15                   | 24,6±0,3                      | 24,3±0,3  | 29,3±0,3 | 20,6±0,3 |
| Тетрациклін                 | 10                   | 31,6±0,3                      | 32±0,1    | 31,6±0,3 | 29,3±0,3 |
| Доксицикліну<br>гідрохлорид | 10                   | 30±0,5                        | 31,6±0,03 | 30,3±0,3 | 31,6±0,3 |
| Ципрофлоксацин              | 15                   | 18,6±0,3                      | 16,6±0,3  | 14,3±0,3 | 15,6±0,3 |
| Норфлоксац                  | 10                   | 18,6±0,3                      | 17,6±0,3  | 19,3±0,3 | 19±      |
| Цефалексин                  | 30                   | 21,3±0,3                      | 19,6±0,3  | 21±      | 19,3±0,3 |

Продовження таблиці 3.7

|               |     |          |             |          |          |
|---------------|-----|----------|-------------|----------|----------|
| Цефазолін     | 30  | 28,3±0,3 | 28,3±0,3    | 26,6±0,3 | 24,3±    |
| Нітрофуратоїн | 300 | 18,3±0,3 | 18±0,3      | 17,6±0,6 | 15,3±0,3 |
| Левоміцетин   | 30  | 23,6±0,3 | 25±0,3      | 24,6±0,3 | 25,6±0,3 |
| Ванкоміцин    | 30  | 20,3±0,3 | 21,3±0,3    | 20,6±0,3 | 20,6±0,3 |
| Поліміксин В  | 100 | -        | -           | -        | -        |
| Рифампіцин    | 15  | 31,3±0,3 | 32, 3, ±0,3 | 30,6±0,3 | 29,6±0,3 |

Примітка: зони затримки росту (мм) до 10,5 – стійкі; до 20,5 – помірно-чутливі; 20,5 і більше – чутливі.

Серед досліджуваних штамів ентерококів більшість виявилися чутливими до широкого спектру антимікробних препаратів, відповідно, такі штами надалі можуть бути використані як стартерні культури. З іншого боку важливим є встановлення впливу ентерококів на чутливість умовно-патогенної мікрофлори до антимікробних препаратів за умови сумісного культивування. Результати визначення чутливості *S. aureus* до антимікробних препаратів після спільного трьохдобового культивування із досліджуваними ентерококами, наведено у таблиці 3.8. Як видно з результатів дослідження, сумісне культивування *S. aureus* з ентерококами не впливало на зміну чутливості до пеніцилінів, зокрема, амоксициліну. При дослідженні аміноглікозидів встановили, що чутливість стафілококу до гентаміцину зростала за умови спільного культивування із штамми *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18, відповідно, на 14,8 ( $p<0,05$ ) та 13,1% ( $p<0,01$ ). Тенденцію до підвищення чутливості стафілококу до стрептоміцину відзначали також при культивуванні із *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18. До макролідів, зокрема, еритроміцину тільки один штам *E. durans* SB18 спричинював підвищення чутливості стафілококу на 3,2%. Вірогідне підвищення чутливості стафілококу до фторхінолонів спостерігали за спільного культивування із штамом *E. durans* SB18.

Таблиця 3.8

Вплив ентерококів на чутливість *S. aureus* до антибіотиків ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

| Антибіотики                 | <i>S. aureus</i><br>до спільного<br>культивування | <i>S. aureus</i> після спільного культивування з: |                            |                          |                          |
|-----------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                             |                                                   | <i>E. durans</i><br>SB6                           | <i>E. faecium</i><br>SB 12 | <i>E. durans</i><br>SB18 | <i>E. durans</i><br>SB20 |
| Амоксицилін                 | 24,3±0,3                                          | 24,3±0,3                                          | 23,3±0,3                   | 24,3±0,3                 | 23,6±0,3                 |
| Оксацилін                   | 23,3±0,3                                          | 23,6±0,3                                          | 22,6±0,3                   | 23,3±0,3                 | 23,3±0,3                 |
| Гентаміцин                  | 20,3±0,3                                          | 18,3±0,3                                          | 23,6±0,3**                 | 23,3±0,3*                | 19,3±0,3                 |
| Стрептоміцин                | 15,6±0,3                                          | 15,3±0,3                                          | 16,3±0,3                   | 16,6±0,3                 | 15,6±0,3                 |
| Канаміцин                   | 17,3±0,3                                          | 16,6±0,3                                          | 17,3±0,3                   | 18,3±0,3                 | 16,6±0,3                 |
| Еритроміцин                 | 21,6±0,3                                          | 20,6±0,3                                          | 21,6±0,3                   | 22,3±0,3                 | 20,6±0,3                 |
| Тилозин                     | 23,3±0,3                                          | 22,6±0,3                                          | 21,6±0,3*                  | 23,3±0,3                 | 21,6±0,3*                |
| Тетрацин                    | 22,3±0,3                                          | 22,6±0,3                                          | 22,6±0,3                   | 23,3±0,3                 | 22,6±0,3                 |
| Доксициклін<br>гідро хлорид | 23,3±0,3                                          | 23,6±0,3                                          | 24,3±0,3                   | 24,6±0,3*                | 23,6±0,3                 |
| Енрофлоксацин               | 26,3±0,3                                          | 26,6±0,3                                          | 27,3±0,3                   | 28,3±0,3*                | 27,3±0,3                 |
| Норфлоксацин                | 24,3±0,3                                          | 25,3±0,3                                          | 25,3±0,3                   | 25,6±0,3*                | 24,6±0,3                 |
| Цефалексин                  | 21,6±0,3                                          | 22,3±0,3                                          | 22,6±0,3                   | 25,6±0,3**               | 23,3±0,3*                |
| Цефазолін                   | 24,3±0,3                                          | 24,3±0,3                                          | 27,6±0,3**                 | 28,3±0,3**               | 24,3±0,3                 |
| Нітрофурантоїн              | 21,6±0,3                                          | 20,6±0,3                                          | 20,3±0,3*                  | 22,3±0,3                 | 21,3±0,3                 |
| Левоміцетин                 | 18,3±0,3                                          | 20,3±0,3*                                         | 20,6±0,3**                 | 21,3±0,3**               | 19,3±0,3                 |
| Ванкоміцин                  | 15,3±0,3                                          | 15,6±0,3                                          | 15,6±0,3                   | 16,3±0,3                 | 16,3±0,3                 |
| Поліміксин В                | 9,6±0,3                                           | 10,3±0,3                                          | 10,6±0,3                   | 11,3±0,3*                | 10,6±0,3                 |
| Рифампіцин                  | 25,6±0,3                                          | 25,3±0,3                                          | 27,3±0,3*                  | 27,3±0,3*                | 26,3±0,3                 |

Примітка: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ .

Зокрема, чутливість стафілококу до енрофлоксацину та норфлоксацину підвищувалась, відповідно, на – 7,6 та 5,3% ( $p < 0,05$ ). До  $\beta$ -лактамних антибіотиків, зокрема, цефазоліну, спільне культивування із штамами *E. faecium*

SB12 та *E. durans* SB18 сприяло підвищенню чутливості стафілококу, відповідно, на 13,5 та 16,4% ( $p<0,01$ ). Впливу досліджуваних штамів на чутливість стафілококу до глікопептидів, зокрема, ванкоміцину, не виявили.

Результати визначення чутливості *E. coli* до антимікробних препаратів після спільного трьохдобового культивування із досліджуваними ентерококами, наведено у таблиці 3.9. Як видно з результатів дослідження, сумісне культивування *E. coli* з ентерококами спричинювало незначне підвищення чутливості до пеніцилінів, зокрема, амоксициліну. Так, чутливість *E. coli* після сумісного культивування із штамми *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18 підвищувалась відповідно, на 5,1 та 7,5%. Чутливість *E. coli* до аміноглікозидів, зокрема, стрептоміцину зростає за умови спільного культивування із штамми *E. durans* SB6 та SB18, відповідно, на 7, 5 та 9,7% ( $p<0,05$ ). Вірогідне підвищення чутливості *E. coli* до фторхінолонів спостерігали за спільного культивування із штамом *E. faecium* SB 12 та *E. durans* SB18. Зокрема, чутливість *E. coli* до енрофлосацину підвищувалась, відповідно, на 7,6 та 5,3% ( $p<0,05$ ), а до норфлосацину, відповідно, на 3,8 та 4,9%. До  $\beta$ -лактамних антибіотиків, зокрема, цефазоліну спільне культивування із штамми *E. durans* SB6 та *E. faecium* SB12 сприяло підвищенню чутливості *E. coli* на 9,1% ( $p<0,05$ ), а при спільному культивуванні із *E. durans* SB18 на 14,1% ( $p<0,01$ ). Крім того, встановили підвищення чутливості до ванкоміцину *E. coli* на 11,6% ( $p<0,01$ ) при культивуванні із *E. faecium* SB 12.

Таблиця 3.9

**Вплив ентерококів на чутливість *E. coli* до антибіотиків ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Антибіотики | <i>E. coli</i> до<br>спільного<br>культивування | <i>E. durans</i><br>SB6 | <i>E. faecium</i><br>SB 12 | <i>E. durans</i><br>SB18 | <i>E. durans</i><br>SB20 |
|-------------|-------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1           | 2                                               | 3                       | 4                          | 5                        | 6                        |
| Амоксицилін | 13,6 $\pm$ 0,3                                  | 13,6 $\pm$ 0,3          | 14,3 $\pm$ 0,3             | 14,6 $\pm$ 0,3           | 13,6 $\pm$ 0,3           |
| Оксацилін   | -                                               | -                       | -                          | -                        | -                        |
| Гентаміцин  | 18,3 $\pm$ 0,3                                  | 19,3 $\pm$ 0,3          | 18,3 $\pm$ 0,3             | 18,7 $\pm$ 0,3           | 18,3 $\pm$ 0,3           |

Продовження таблиці 3.9

|                            |          |           |            |            |            |
|----------------------------|----------|-----------|------------|------------|------------|
| Стрептоміцин               | 13,3±0,3 | 14,6±0,3* | 13,3±0,3   | 14,3±0,3   | 13,6±0,3   |
| Канаміцин                  | 17,3±0,3 | 15,6±0,3* | 17,7±0,3   | 17,7±0,3   | 15,3±0,3*  |
| Еритроміцин                | 8,6±0,3  | 7,3±0,3*  | 9,3±0,3    | 8,3±0,3    | 9,3±0,3    |
| Тетрациклін                | 20,3±0,3 | 19,6±0,3  | 21,6±0,3*  | 20,6±0,3   | 18,6±0,3*  |
| Доксициклін<br>гідрохлорид | 15,3±0,3 | 16,3±0,3  | 18,3±0,3** | 17,6±0,3** | 18,3±0,3** |
| Енрофлоксацин              | 26,3±0,3 | 26,6±0,3  | 28,6±0,3** | 28,6±0,3** | 26,6±0,3   |
| Норфлоксацин               | 26,3±0,3 | 27,3±0,3  | 27,3±0,3   | 27,6±0,3*  | 26,3±0,3   |
| Цефалексин                 | 14,3±0,3 | 14,3±0,3  | 14,6±0,3   | 14,6±0,3   | 14,3±0,3   |
| Цефазолін                  | 18,6±0,3 | 20,3±0,3* | 20,3±0,3*  | 21,3±0,3** | 18,6±0,3   |
| Нітрофурантоїн             | 19,3±0,3 | 19,3±0,3  | 20,6±0,3*  | 21,3±0,3*  | 19,6±0,3   |
| Левоміцетин                | 21,3±0,3 | 20,7±0,3  | 20,6±0,3   | 21,3±0,3   | 21,3±0,3   |
| Ванкоміцин                 | 17,3±0,3 | 18,3±0,3  | 19,3±0,3*  | 17,6±0,3   | 16,6±0,3   |
| Поліміксин В               | 14,3±0,3 | 14,7±0,3  | 14,3±0,3   | 14,6±0,3   | 14,3±0,3   |
| Рифампіцин                 | 16,3±0,3 | 15,7±0,3  | 16,3±0,3   | 16,6±0,3   | 17,3±0,3   |

Примітка: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ .

Отримані результати експериментальних досліджень вказують на те, що, виділені із традиційної карпатської бринзи ентерококи, при сумісному культивуванні з умовно-патогенною мікрофлорою неоднорідно впливали на підвищення її чутливості до різних груп протимікробних препаратів, найвираженішу дію проявляв штам *E. durans* SB18.

Отже, досліджувані штами проявляли різну антагоністичну активність щодо грам-негативних представників умовно-патогенної мікрофлори. При цьому із збільшенням температури культивування ентерококів зростала їх антагоністична активність. Так, найоптимальнішою температурою культивування була 37°C. За таких умов тільки штам *E. durans* SB18 проявив помірну антагоністичну активність до усіх досліджуваних грам-негативних

мікроорганізмів. Крім того, штам *E. durans* SB18 при сумісному культивуванні з умовно-патогенною мікрофлорою найвираженіше впливав на підвищення її чутливості до протимікробних препаратів різних груп. Усі штами ентерококів є біологічно безпечними з точки зору антибіотикорезистентності.

### **3.1.3. Вивчення здатності ентерококів синтезувати біологічно-активні речовини та органічні кислоти**

Вибір штамів у біотехнології пробіотичного препарату має особливо важливе значення, оскільки від цього залежить його безпечність та якість. Серед головних характеристик пробіотичного штаму є здатність синтезувати біологічно активні речовини. Тому нами проведені дослідження із вивчення здатності ентерококів синтезувати біологічно активні речовини, зокрема, амінокислоти, вітаміни групи B та органічні кислоти.

Отримані дані з визначення амінокислот у дослідних зразках супернатанту ентерококів (табл. 3.10) вказують на те, що досліджувані штами у різних кількостях синтезували як замінні, так і незамінні амінокислоти. Було встановлено, що всі чотири штами ентерококів використовували для свого живлення такі замінні амінокислоти, як тирозин та пролін, а також незамінну – метіонін. Незамінну амінокислоту лізин у різних кількостях синтезували усі штами ентерококів. Однак, вірогідне підвищення рівня цієї амінокислоти спостерігали при культивуванні штамів *E. durans* SB18, *E. durans* SB20, зокрема, її концентрація вірогідно підвищувалась, відповідно, на 15,6 та 10,4% ( $p < 0,05$ ) порівняно до контролю. Фенілаланін та аланін усі досліджувані штами ентерококів практично не синтезували, проте і не використовували у процесі живлення. Вірогідне підвищення незамінної амінокислоти гістидину на 20 та 53,3% ( $p < 0,05$ ) виявили при культивуванні штамів *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18. Незначне підвищення незамінних амінокислот лейцину+ізолейцину зареєстрували при культивуванні *E. durans* SB6 та *E.*

*faecium* SB12 та *E. durans* SB18. Також встановили вірогідне підвищення синтезу треоніну ентерококами *E. durans* SB6 та *E. durans* SB18, відповідно, на 33,3 та 39,6% ( $p < 0,05$ ). Замінну амінокислоту серин були здатні синтезувати штами *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20, при цьому її концентрація зросла, відповідно, на – 40,0 ( $p < 0,001$ ), 30,0 та 35,0% ( $p < 0,01$ ), а штами *E. durans* SB6, та *E. durans* SB18 синтезували гліцин, концентрація якого зросла, відповідно, на 10,2 та 16,2% ( $p < 0,01$ ).

Таблиця 3.10

**Вміст амінокислот у супернатанті культур ентерококів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Амінокислоти,<br>%   | Контроль        | Штами ентерококів |                   |                   |                    |
|----------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|                      |                 | SB 6              | SB 12             | SB 18             | SB 20              |
| Аргінін              | 0,051±<br>0,002 | 0,032±<br>0,001   | 0,055±<br>0,002   | 0,029±<br>0,001   | 0,029±<br>0,003    |
| Лізин                | 0,077±<br>0,003 | 0,081±<br>0,001   | 0,079±<br>0,004   | 0,089±<br>0,003*  | 0,085±<br>0,001*   |
| Тирозин              | 0,030±<br>0,012 | 0,019±<br>0,002** | 0,019±<br>0,001** | 0,016±<br>0,001** | 0,016±<br>0,001**  |
| Фенілаланін          | 0,048±<br>0,001 | 0,049±<br>0,002   | 0,050±<br>0,004   | 0,049±<br>0,004   | 0,050±<br>0,002    |
| Гістидин             | 0,015±<br>0,001 | 0,014±<br>0,002   | 0,018±<br>0,001*  | 0,023±<br>0,004*  | 0,016±<br>0,001    |
| Лейцин+<br>ізолейцин | 0,120±<br>0,001 | 0,123±<br>0,001   | 0,112±<br>0,001   | 0,127±<br>0,002*  | 0,103±<br>0,004*   |
| Метіонін             | 0,033±<br>0,008 | 0,019±<br>0,002   | 0,016±<br>0,003   | 0,028±<br>0,004   | 0,016±<br>0,002    |
| Валін                | 0,049±<br>0,002 | 0,043±<br>0,002   | 0,031±<br>0,002** | 0,056±<br>0,006   | 0,025±<br>0,001*** |
| Пролін               | 0,103±<br>0,002 | 0,101±<br>0,002   | 0,092±<br>0,004   | 0,095±<br>0,0024  | 0,080±<br>0,003**  |

Продовження таблиці 3.10

|         |                  |                   |                    |                   |                   |
|---------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Треонін | 0,048±<br>0,002  | 0,064±<br>0,005*  | 0,047±<br>0,005    | 0,067±<br>0,004*  | 0,053±<br>0,006   |
| Серин   | 0,040±<br>0,0007 | 0,039±<br>0,002   | 0,056±<br>0,001*** | 0,052±<br>0,001** | 0,054±<br>0,001** |
| Аланін  | 0,095±<br>0,001  | 0,094±<br>0,001   | 0,0899±<br>0,001*  | 0,113±<br>0,006   | 0,099±<br>0,003   |
| Гліцин  | 0,167±<br>0,002  | 0,184±<br>0,002** | 0,167±<br>0,007    | 0,194±<br>0,011** | 0,171±<br>0,004   |

Примітка: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Як видно з результатів досліджень можливості синтезу вітамінів групи В (табл. 3.11), досліджувані штами синтезували їх у незначній кількості, за винятком вітаміну В<sub>6</sub> та В<sub>с</sub>. або взагалі їх не синтезували, зокрема, це відноситься до вітаміну В<sub>6</sub> та В<sub>с</sub>. Вітамін В<sub>с</sub> в невеликій кількості синтезував тільки штам *E. durans* SB18, а усі решта штами, очевидно, використовували її для свого живлення. У всіх дослідних зразках найбільше було виявлено вітаміну В<sub>1</sub>, його концентрація збільшувалась від 8,5 до 10,0 разів ( $p < 0,001$ ). Рибофлавін синтезували три штами ентерококів – *E. durans* SB6, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20, так його концентрація вірогідно зростала, відповідно, у – 4,1, 2,0 та 2,0 рази ( $p < 0,05$ ), а штам *E. faecium* SB12, очевидно, використовував цей вітамін, тому його не було виявлено. Слід зауважити, що усі штами ентерококів синтезували у значній кількості вітамін В<sub>3</sub>, зокрема, його концентрація вірогідно зростала, відповідно, у – 1,5, 1,5 ( $p < 0,05$ ), 1,5 ( $p < 0,01$ ) та 1,6 ( $p < 0,001$ ) рази. При цьому три штами ентерококів, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20, були здатні у великих кількостях синтезувати вітамін В<sub>5</sub>, так концентрація нікотинової кислоти зростала, відповідно, у – 2,9 ( $p < 0,05$ ), 8,4 та 9,5 ( $p < 0,001$ ) рази.

Таблиця 3.11

**Вітамінний склад супернатанту культур ентерококів**

| Вітаміни, %            | Контроль    | Штами ентерококів  |                    |                    |                    |
|------------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                        |             | SB 6               | SB 12              | SB 18              | SB 20              |
| Вітамін В <sub>1</sub> | 0,066±0,003 | 0,633±<br>0,032*** | 0,566±<br>0,027*** | 0,586±<br>0,042*** | 0,586±<br>0,023*** |
| Вітамін В <sub>2</sub> | 0,013±0,003 | 0,053±0,009*       | нв                 | 0,026±0,001*       | 0,026±<br>0,003*   |
| Вітамін В <sub>3</sub> | 0,443±0,023 | 0,643±<br>0,055*   | 0,643±<br>0,027**  | 0,663±<br>0,041**  | 0,710±<br>0,01***  |
| Вітамін В <sub>5</sub> | 0,046±0,003 | нв                 | 0,133±<br>0,018*   | 0,386±0,031*<br>** | 0,436±<br>0,042**  |
| Вітамін В <sub>6</sub> | 0,036±0,003 | 0,023±<br>0,0088   | нв                 | нв                 | нв                 |
| Вітамін В <sub>с</sub> | 0,27±0,007  | нв                 | нв                 | 0,31±0,020         | нв                 |

Примітка: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ \*\*\*; –  $p < 0,001$ ; нв – не виявлено

Результати досліджень з визначення вмісту органічних кислот у дослідних зразках подано у табл. 3.12.

Таблиця 3.12

**Органічні кислоти супернатанту культур ентерококів( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Органічні<br>кислоти, % | Контроль        | Штами ентерококів |                  |                  |                  |
|-------------------------|-----------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
|                         |                 | SB 6              | SB 12            | SB 18            | SB 20            |
| Лимонна                 | 0,027±<br>0,003 | 0,017±<br>0,007   | 0,021±<br>0,006  | 0,023±<br>0,007  | 0,017±<br>0,003  |
| Оцтова                  | 0,02±<br>0,006  | 0,03±<br>0,006    | 0,027±<br>0,009  | 0,037±<br>0,007  | 0,043±<br>0,013  |
| Пропіонова              | 0,023±<br>0,009 | 0,063±<br>0,003*  | 0,060±<br>0,006* | 0,056±<br>0,007* | 0,060±<br>0,006* |

Продовження таблиці 3.12

|           |                 |    |    |                  |                 |
|-----------|-----------------|----|----|------------------|-----------------|
| Бензойна  | 0,03±<br>0,012  | нв | нв | нв               | 0,08±<br>0,012* |
| Сорбінова | 0,023±<br>0,007 | нв | нв | нв               | нв              |
| Молочна   | 0,033±<br>0,007 | нв | нв | 0,087±<br>0,009* | нв              |

Примітка: \* –  $p < 0,05$ ; нв – не виявлено

З даних таблиці видно, що всі досліджувані штами ентерококів не синтезували сорбінову кислоту, а бензойну кислоту продукував тільки штам *E. durans* SB20, концентрація якої збільшувалась у 2,7 ( $p < 0,05$ ) рази. Необхідно відзначити, що лише штам *E. durans* SB18 був здатний до синтезу молочної кислоти, зокрема, її концентрація вірогідно підвищувалась у 2,6 рази ( $p < 0,05$ ).

Поряд з цим, тенденцію до підвищення концентрації оцтової кислоти спостерігали при культивуванні *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20. Вірогідне підвищення у 2,7, 2,6, 2,4 та 2,6 рази ( $p < 0,05$ ) концентрації пропіонової кислоти виявили в усіх досліджуваних штамів ентерококів *E. durans*, SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20. Синтез оцтової і пропіонової кислоти матиме вплив на формування смако-ароматичних властивостей продуктів.

Аналіз результатів досліджень з визначення вмісту катіонів (Амонію, Калію, Натрію, Магнію, Кальцію) у супернатанті ентерококів, які наведено у таблиці 3.13, показав, що лише Кальцій був наявний у значних кількостях.

Таблиця 3.13

#### Макроелементи супернатанту культур ентерококів ( $M \pm m$ , $n=3$ )

| Макроелементи,<br>% | Контроль        | Штами ентерококів |                 |                  |                  |
|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|
|                     |                 | SB 6              | SB 12           | SB 18            | SB 20            |
| Am                  | 0,226±<br>0,002 | 0,032±<br>0,001   | 0,032±<br>0,002 | 0,031±<br>0,0006 | 0,030±<br>0,0003 |
| K                   | 0,112±<br>0,005 | 0,108±<br>0,004   | 0,115±<br>0,003 | 0,112±<br>0,003  | 0,111±<br>0,004  |

Продовження таблиці 3.13

|    |                  |                  |                  |                  |                  |
|----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Na | 0,249±<br>0,004  | 0,243±<br>0,009  | 0,247±<br>0,008  | 0,259±<br>0,007  | 0,248±<br>0,009  |
| Mg | 0,005±<br>0,0003 | 0,005±<br>0,0003 | 0,005±<br>0,0003 | 0,005±<br>0,0003 | 0,004±<br>0,0003 |
| Ca | 0,005±<br>0,0003 | 0,009<br>±0,002* | 0,012±<br>0,004* | 0,008±<br>0,002* | 0,007±<br>0,001* |

Примітка: \* –  $p < 0,05$ .

Зокрема, встановили вірогідне підвищення у 1,8, 2,4, 1,6 та 1,4 рази ( $p < 0,05$ ) вмісту Кальцію у супернатанті, де культивували відповідно, штами *E. durans*, SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20. Щодо інших макроелементів істотних відмінностей порівняно з контролем не виявили.

Отже, виділені з традиційної карпатської бринзи штами ентерококів *E. durans*, SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20, здатні до синтезу біологічно активних речовин. Досліджувані штами у різних кількостях синтезують як замінні, так і незамінні амінокислоти. Встановлено, що штам *E. durans* SB18 синтезує найбільшу кількість амінокислот, зокрема, незамінні амінокислоти – лізин, третіонін та лейцин+ізолейцин, концентрація яких була вищою, відповідно, на 10,3, 39,5 ( $p < 0,05$ ) та 5,8%, а також замінні амінокислоти серин та гліцин, концентрація яких збільшилася, відповідно, на 30,0 та 16,2% ( $p < 0,01$ ) порівняно до контролю.

У всіх дослідних зразках найбільше було виявлено вітаміну B<sub>1</sub> його концентрація збільшувалась від 8,5 до 10,0 разів ( $p < 0,001$ ). Ентерококи *E. durans*, SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 здатні синтезувати вітамін B<sub>3</sub>, зокрема, його концентрація вірогідно зросла, відповідно, у 1,5 ( $p < 0,05$ ), 1,5 ( $p < 0,05$ ), 1,5 ( $p < 0,05$ ) та 1,6 ( $p < 0,001$ ) рази. Ентерококи *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 синтезують вітамін B<sub>5</sub>, концентрація якого зросла, відповідно, у 2,9 ( $p < 0,05$ ), 8,4 ( $p < 0,05$ ) та 9,5 ( $p < 0,001$ ) рази порівняно до контролю.

Встановлено, що усі досліджувані штами продукували у значній кількості

пропіонову кислоту, у незначній – оцтову, проте тільки штам *E. durans* SB18 був здатний до синтезу молочної кислоти, зокрема, її концентрація вірогідно підвищувалась у 2,6 рази ( $p < 0,01$ ) порівняно до контролю.

При визначенні макроелементів у супернатанті, де культивували штами *E. durans*, SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20, встановили вірогідне підвищення рівня Кальцію, відповідно, у – 1,8, 2,4, 1,6 та 1,4 рази ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.4. Токсиколого-біологічна оцінка ентерококів

Початковим етапом токсико-біологічних досліджень є встановлення небезпечної дії досліджуваного штаму на організм лабораторних тварин. Оскільки патогенність є видовою генетичною ознакою мікроорганізму тому було проведено дослідження із визначення таких факторів патогенності, як інфекційність та токсичність.

У результаті проведених досліджень встановили, що при дослідженні інфекційності за внутрішньошлункового введення живих ентерококів у дозі  $10^8$  КУО на тварину, а при дослідженні токсичності – інактивованих мікроорганізмів, білі миші залишалися живими. Упродовж 14-добового періоду спостереження лабораторні миші були активними, мали задовільний апетит. Видимі слизові оболонки були блискучими, блідо-рожевого кольору, шерсть була гладкою, блискучою. Тварини зберігали рефлекторну збудливість на звукові та світлові подразники, змін у кольорі сечі та калу не спостерігали, загальна поведінка тварин експериментальних і контрольної груп не відрізнялася. Крім того, було встановлено, що за введення різних штамів ентерококів маса тіла тварин у дослідних групах була на рівні величин тварин контрольної групи.

Отже, досліджувані штами ентерококів *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 не патогенні, оскільки були неінфекційні та

нетоксичні, тобто не спричиняли будь-яких клінічних симптомів і відхилень від загального стану білих мишей.

При розробленні пробіотичних препаратів надзвичайно важливу роль відводять показникам безпечності виробничих штамів. Тому за відсутністю ферментів, що відносяться до факторів патогенності, було визначено нешкідливість ентерококів, що були виділені з карпатської бринзи. Результати дослідження наведено у таблиці 3.14. Як видно з даних, наведених у таблиці, у досліджуваних штамів ентерококів відсутні ферменти, що відносяться до факторів патогенності. Зокрема, вони не володіють каталазною активністю, яка властива патогенним аеробним та факультативно-анаеробним мікроорганізмам, також не виявлено продукування лецитинази, яка викликає деполімеризацію мембран клітин макроорганізму. Крім того, досліджувані ентерококи не продукують плазмокоагулазу та фібринолізин, що вказує на апатогенні властивості досліджуваних мікроорганізмів.

Таблиця 3.14

**Наявність ферментів патогенності у різних штамів ентерококів**

| Ферменти                    | Штами ентерококів       |                           |                          |                          |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                             | <i>E. durans</i><br>SB6 | <i>E. faecium</i><br>SB12 | <i>E. durans</i><br>SB18 | <i>E. durans</i><br>SB20 |
| Каталаза                    | —                       | —                         | —                        | —                        |
| Продукування лецитинази     | —                       | —                         | —                        | —                        |
| Плазмокоагулазна активність | —                       | —                         | —                        | —                        |
| Фібринолітичні властивості  | —                       | —                         | —                        | —                        |

Примітка: «—» – відсутність фермента

При виготовленні та практичному застосуванні досліджуваних штамів можливе їх попадання на відкриті ділянки шкіри і слизові оболонки. Тому при дослідженні патогенних властивостей досліджуваних штамів ентерококів визначали їх вплив на шкіру та пошкодження слизових оболонок кон'юнктиви очей кроликів альбіносів.



Продовження таблиці 3.15

|                                                                   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------------------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Гіперемія                                                         | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Набряк                                                            | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Оцінка шкідливої дії препарату на слизовій оболонці 3 кроля, бали |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Виділення                                                         | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Гіперемія                                                         | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Набряк                                                            | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>E. durans</i> SB20                                             |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Оцінка шкідливої дії препарату на слизовій оболонці 1 кроля       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Виділення                                                         | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Гіперемія                                                         | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Набряк                                                            | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Оцінка шкідливої дії препарату на слизовій оболонці 2 кроля, бали |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Виділення                                                         | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Гіперемія                                                         | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Набряк                                                            | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Оцінка шкідливої дії препарату на слизовій оболонці 3 кроля, бали |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Виділення                                                         | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Гіперемія                                                         | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Набряк                                                            | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

При вивченні подразнювальної дії на слизову оболонку очей (табл. 3.15) встановили, що відразу після застосування досліджуваних штамів ентерококів була незначна гіперемія кон'юнктиви та сльозовиділення, яке зникало упродовж доби. При цьому, слід зазначити, що у подальшому виділень, гіперемії, набряку та змін у судинах не встановлено.

Отже, застосування досліджуваних штамів ентерококів не викликало подразнювальної дії на слизову оболонку ока.

При вивченні подразнювальної дії досліджуваних штамів ентерококів на шкіру тварин було встановлено, що застосування досліджуваних штамів упродовж чотиригодинної експозиції не викликало появи місцевого почервоніння, припухлості, запалення, підвищення чутливості та набряку шкіри. Упродовж 14-ти добового періоду спостереження не було виявлено будь-яких змін у поведінці та загальному стані тварин.

Наступним етапом досліджень було визначення гострої токсичності. При

вивченні гострої токсичності було встановлено, що внутрішньошлункове застосування досліджуваних штамів ентерококів не викликало ознак гострого отруєння, загибелі та захворювань лабораторних тварин. При цьому, упродовж 14-добового періоду спостереження, тварини дослідних груп були активними, мали задовільний апетит, зберігали рефлексорну активність, слизові оболонки зберігали природній блідо-рожевий колір, шкіра була гладкою, блискучою, поряд з тим не було виявлено будь-яких змін у поведінці тварин.

Тривале (28-ми добове) застосування досліджуваних штамів (*E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20) теж не викликало загибелі та захворювань лабораторних мишей. Тварини, упродовж усього експерименту були активними, охоче поїдали корми, будь-яких змін у поведінці та зовнішньому вигляді тварин не було виявлено. При цьому відзначали тенденцію до зростання маси тіла тварин (табл. 3.16).

Таблиця 3.16

**Динаміка маси тіла мишей за застосування досліджуваних штамів  
ентерококів, г ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )**

| Групи тварин | Доби експерименту |                 |
|--------------|-------------------|-----------------|
|              | 14                | 28              |
| Контроль     | 24,6 $\pm$ 0,49   | 28,5 $\pm$ 0,62 |
| I дослідна   | 25,5 $\pm$ 0,67   | 29,7 $\pm$ 0,61 |
| II дослідна  | 25,7 $\pm$ 0,49   | 29,8 $\pm$ 0,54 |
| III дослідна | 25,8 $\pm$ 0,60   | 30,2 $\pm$ 0,48 |
| IV дослідна  | 25,7 $\pm$ 0,67   | 30,0 $\pm$ 0,52 |

Зокрема, на 14 добу експерименту маса тіла тварин, яким застосовували досліджувані штами *E. durans* SB6 (I дослідна група), *E. faecium* SB12 (II дослідна група), *E. durans* SB18 (III дослідна група), *E. durans* SB20 (IV дослідна група) зростала, відповідно, на – 3,7, 4,5, 4,8 та 4,5% порівняно до величин контрольної групи тварин. На 28-у добу експерименту спостерігали

аналогічну ситуацію, зокрема, у тварин дослідних груп, які отримували досліджувані штами (*E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20) маса тіла була вищою, відповідно, на – 4,2, 4,6, 5,9 та 5,3% , порівняно до показників величин тварин контрольної групи.

Отже, досліджувані штами ентерококів *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 є непатогенними та неінфекційними, не володіють каталазою активністю, не продукують лецитиназу, плазмокоагулазу та фібринолізин. Одноразове застосування штамів *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 не викликало подразнюючої дії на слизові оболонки очей та шкіру, ознак інтоксикації, загибелі та захворювань тварин, що дає змогу віднести дані мікроорганізми до нешкідливих для макроорганізму.

### Результати досліджень розділу 3.1. опубліковано в наукових працях:

1. Інтенсивність росту та антибактеріальні властивості штамів *Enterococcus faecium* та *Enterococcus durans*, виділених із традиційної карпаської бринзи / **І. І. Кушнір**, О. Й. Цісарик, І. М. Сливка, Л. Я. Мусій, І. М. Кушнір, І. С. Семен. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки*. 2020. Т. 22, № 92. С. 42–49. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9208>

2. Вплив ентерококів на чутливість умовно-патогенної мікрофлори до антибіотиків / **І. І. Кушнір**, І. С. Семен, О. Й. Цісарик, І. М. Кушнір. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки*. 2021. Т. 23, № 95. С. 25–28. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9503>

3. The ability of enterococci extracted from traditional Carpathian cheese bryndza to produce biologically active substances / **I. I. Kushnir**, O. Y. Tsisaryk, S. H. Shalovylo, B. V. Gutyj, G. V. Kushnir, I. M. Slyvka, L. Y. Musiy. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*. 2020. V. 3 (3). С. 15–19. DOI: <https://doi.org/10.32718/ujvas3-3.03>

4. **Кушнір І. І.** Вивчення патогенних властивостей ентерококів виділених

із карпатської бринзи. *Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і інституту біології тварин*. 2020. Вип. 21, № 1. С. 119–125. DOI: <https://doi.org/10.36359/scivp.2020-21-1.14>

5. Визначення вмісту амінокислот у продуктах життєдіяльності молочнокислих бактерій методом капілярного електрофорезу (методичні рекомендації) / І. Я. Коцюмбас, Т. Р. Левицький, **І. І. Кушнір**, Г. П. Ривак, Г. В. Кушнір, Б. І. Назар, Г. Ю. Федор, О. М. Вільха, Т. І. Шарій, Г. Ю. Неділька. ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок, Львів. 2020. 24 с.

### **3.2. Дослідження технологічних властивостей ентерококів**

#### **3.2.1. Кислотоутворювальні властивості ентерококів**

У біотехнології мікробних препаратів особливе місце належить кислотоутворювальній здатності виробничих штамів і їх стійкості до несприятливих умов росту і розвитку. З огляду на це, на початковому етапі досліджень було вивчено кислотоутворювальні властивості досліджуваних штамів ентерококів за їх культивування у рідкому живильному середовищі МРС.

При визначенні здатності різних штамів ентерококів знижувати рН середовища на 24 годину культивування за різних температурних режимів, отримали дані, наведені у таблиці 3.17. Як видно з даних, на 24 годину культивування за температури 25°C два штами – *E. durans* SB20 та *E. durans* SB18 проявили найвищу здатність знижувати рН середовища. Зокрема, вони знижували рН середовища МРС до  $5,0 \pm 0,08$  та  $5,01 \pm 0,04$  од. відповідно, що становило 24,5 та 24,4% ( $p < 0,001$ ) щодо контролю. Крім цього, було встановлено, що за температури 30°C, штами *E. durans* SB6 та SB18, здатні відповідно знижувати рН на – 26,7 та 26,4%. За температури культивування

37°C найкраще, з огляду зниження рН середовища, проявив себе штам *E. durans* SB20, оскільки був здатним знизити його на 30,3%, а *E. durans* SB18 – на 29,9% ( $p < 0,001$ ).

Таблиця 3.17

**Зміна рН середовища на 24 годину культивування ентерококів за різних температурних режимів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Штами мікроорганізмів  | Температура культивування |                   |                    |
|------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|
|                        | 25°C                      | 30°C              | 37°C               |
| Контроль               | 6,63 $\pm$ 0,01           | 6,4 $\pm$ 0,21    | 6,64 $\pm$ 0,03    |
| <i>E. durans</i> SB6   | 5,05 $\pm$ 0,04***        | 4,69 $\pm$ 0,03** | 4,67 $\pm$ 0,03*** |
| <i>E. faecium</i> SB12 | 5,02 $\pm$ 0,03***        | 4,75 $\pm$ 0,20** | 4,66 $\pm$ 0,03*** |
| <i>E. durans</i> SB18  | 5,01 $\pm$ 0,04***        | 4,71 $\pm$ 0,03** | 4,65 $\pm$ 0,02*** |
| <i>E. durans</i> SB20  | 5,0 $\pm$ 0,08***         | 4,74 $\pm$ 0,02** | 4,63 $\pm$ 0,02*** |

Примітка: \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ .

При дослідженні здатності досліджуваних штамів ентерококів знижувати рН середовища на 48 годину культивування за різних температурних режимів, отримали дані, наведені у таблиці 3.18.

Таблиця 3.18

**Зміна рН середовища на 48 годину культивування ентерококів за різних температурних режимів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Штами мікроорганізмів   | Температура культивування |                    |                    |
|-------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
|                         | 25°C                      | 30°C               | 37°C               |
| Контроль                | 6,64 $\pm$ 0,03           | 6,6 $\pm$ 0,02     | 6,63 $\pm$ 0,03    |
| <i>E. durans</i> SB6    | 4,84 $\pm$ 0,02***        | 4,64 $\pm$ 0,03*** | 4,63 $\pm$ 0,02*** |
| <i>E. faecium</i> SB 12 | 4,83 $\pm$ 0,01***        | 4,63 $\pm$ 0,03*** | 4,62 $\pm$ 0,02*** |
| <i>E. durans</i> SB18   | 4,8 $\pm$ 0,02***         | 4,62 $\pm$ 0,02*** | 4,61 $\pm$ 0,01*** |
| <i>E. durans</i> SB20   | 4,81 $\pm$ 0,02***        | 4,63 $\pm$ 0,02*** | 4,57 $\pm$ 0,03*** |

Примітка: \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Так, за результатами дослідження було встановлено, що на 48 годину культивування за температури 25°C штами *E. durans* SB18 та штами *E. durans* SB20 проявили себе як добрі кислотоутворювачі, оскільки знижували рН, відповідно, на 27,7 та 27,6%. За температури 30°C штами *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20, а також штами *E. faecium* SB12 знижували рН, відповідно, на – 30,0, 29,8 та 29,8%. Також було встановлено, що за температури 37°C штами *E. durans* SB20 та SB18 найбільше знижували рН, відповідно, на 31,1 та 30,5% порівняно з контролем.

Отже, отримані результати досліджень вказують на те, що штами *E. durans* SB20 та штами *E. durans* SB18 проявили найкращі кислотоутворюючі властивості, оскільки були здатними знижувати рН середовища при їх культивуванні як на 24 години, так і на 48 годину за різних температурних режимів, зокрема, 25°C, 30°C та 37°C, при цьому значення рН сягало 5 і менше одиниць.

### 3.2.2. Вивчення швидкості накопичення біомаси ентерококами

Результати досліджень зміни оптичної густини на 24 години культивування наведено у табл. 3.19.

Таблиця 3.19

#### Зміна оптичної густини середовища на 24 години культивування ентерококів за різних температурних режимів ( $M \pm m$ , $n=3$ )

| Штами мікроорганізмів   | Температура культивування |                |                |
|-------------------------|---------------------------|----------------|----------------|
|                         | 25°C                      | 30°C           | 37°C           |
| Контроль                | 0,092±0,002               | 0,091 ±0,026   | 0,085±0,01     |
| <i>E. durans</i> SB6    | 1,446±0,039***            | 1,551±0,03***  | 1,480±0,024*** |
| <i>E. faecium</i> SB 12 | 1,593±0,052***            | 1,620±0,014*** | 1,513±0,018*** |
| <i>E. durans</i> SB18   | 1,610±0,017***            | 1,632±0,023*** | 1,499±0,01***  |
| <i>E. durans</i> SB20   | 1,621±0,01***             | 1,589±0,01***  | 1,551±0,039*** |

Примітка: \*\*\* –  $p < 0,001$ .

У біотехнології бактеріальних препаратів важливим етапом виробництва є створення максимально продуктивних умов накопичення біомаси, що є одним із основних факторів, який визначає якість готового продукту. Тому за зміною оптичної густини живильного середовища було визначено у динаміці швидкість накопичення біомаси досліджуваними ентерококами за їх культивування у рідкому МРС середовищі.

При визначенні оптичної густини на 24 годину культивування ентерококів за температури 25°C було встановлено, що найвищу інтенсивність росту проявили штами *E. durans* SB20 та *E. durans* SB18, при цьому оптична густина живильного середовища була у 17,6 та 17,5 разів вищою, ніж у контролі. Також, слід зазначити, що за температури 37°C зміна оптичної густини усіх досліджуваних штамів коливалась в межах 1,480-1,551 од.

У табл. 3.20 наведені результати досліджень зміни оптичної густини середовища на 48 годину культивування мікроорганізмів. Зокрема, було встановлено, що за температури 25°C суттєвіші зміни оптичної густини спостерігали на 48 годину культивування штамів *E. durans* SB6 та *E. faecium* SB 12. Так, показники оптичної густини були відповідно в 17,7 та 17,3 рази вищими у порівнянні із значенням контрольного зразка. Проте, за температури культивування 37°C найвищу інтенсивність росту спостерігали при культивуванні штамів *E. durans* SB18 та *E. durans* SB6, де оптична густина була, відповідно, у 18,3 та 18,2 рази вищою у порівнянні із контрольним зразком.

Таблиця 3.20

**Зміна оптичної густини середовища на 48 годину культивування ентерококів за різних температурних режимів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Штами мікроорганізмів | Температура культивування |                     |                     |
|-----------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|
|                       | 25°C                      | 30°C                | 37°C                |
| Контроль              | 0,090 $\pm$ 0,0037        | 0,090 $\pm$ 0,003   | 0,087 $\pm$ 0,002   |
| <i>E. durans</i> SB6  | 1,594 $\pm$ 0,02***       | 1,622 $\pm$ 0,02*** | 1,581 $\pm$ 0,01*** |

|                         |                |                |               |
|-------------------------|----------------|----------------|---------------|
| <i>E. faecium</i> SB 12 | 1,561±0,027*** | 1,611±0,017*** | 1,563±0,02*** |
|-------------------------|----------------|----------------|---------------|

Продовження таблиці 3.20

|                       |                |               |                |
|-----------------------|----------------|---------------|----------------|
| <i>E. durans</i> SB18 | 1,539±0,018*** | 1,560±0,02*** | 1,590±0,016*** |
| <i>E. durans</i> SB20 | 1,552±0,035*** | 1,594±0,01*** | 1,542±0,02***  |

Примітка: \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Дослідженнями встановлено, що найвищу інтенсивність росту за температури культивування 37°C спостерігали при культивуванні штамів *E. durans* SB18 та *E. durans* SB6.

### 3.2.3. Стійкість ентерококів до різних концентрацій Натрію хлориду

При визначенні здатності ентерококів виживати у різних (3-6,5%) концентраціях Натрію хлориду встановили, що упродовж 21 доби досліджувані штами зберігали свою життєздатність (табл. 3.21).

Таблиця 3.21

#### Виживання ентерококів за різних концентрацій Натрію хлориду

| Концентрація солі | Доба культивування | Штами ентерококів    |                         |                       |                       |
|-------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                   |                    | <i>E. durans</i> SB6 | <i>E. faecium</i> SB 12 | <i>E. durans</i> SB18 | <i>E. durans</i> SB20 |
| 3                 | 1                  | +                    | +                       | +                     | +                     |
|                   | 7                  | +                    | +                       | +                     | +                     |
|                   | 21                 | +                    | +                       | +                     | +                     |
| 4                 | 1                  | +                    | +                       | +                     | +                     |
|                   | 7                  | +                    | +                       | +                     | +                     |
|                   | 21                 | +                    | +                       | +                     | +                     |
| 5                 | 1                  | +                    | +                       | +                     | +                     |
|                   | 7                  | +                    | +                       | +                     | +                     |
|                   | 21                 | +                    | +                       | +                     | +                     |
| 6                 | 1                  | +                    | +                       | +                     | +                     |
|                   | 7                  | +                    | +                       | +                     | +                     |
|                   | 21                 | +                    | +                       | +                     | +                     |
| 6,5               | 1                  | +                    | +                       | +                     | +                     |
|                   | 7                  | +                    | +                       | +                     | +                     |
|                   | 21                 | +                    | +                       | +                     | +                     |

Примітка: + – наявність росту ентерококів

Таким чином, усі штами ентерококів здатні виживати за високих концентрацій Натрію хлориду, що має принципово важливе значення для сироробства.

### 3.2.4. Стійкість ентерококів до різних значень рН

Надзвичайно актуальним завданням у біотехнологічному процесі конструювання нових ефективних пробіотичних препаратів є відбір стійких до метаболітів травної системи штамів мікроорганізмів. Саме тому перед нами постало завдання вивчити здатність ентерококів, виділених із традиційної карпатської бринзи, виживати та розмножуватись в умовах різних значень рН середовища та різних концентрацій жовчі.

При визначенні здатності ентерококів рости у кислому, нейтральному та лужному значеннях рН живильного середовища отримали дані, наведені у таблиці 3.22. За значення рН 3 ріст досліджуваних штамів ентерококів не спостерігали, оскільки оптична густина МПБ була на рівні показників контролю. При показнику рН 4 лише два штами *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 були здатні виживати та проявляти ростові властивості. Було встановлено, що із підвищенням рН зростала оптична густина середовища культивування. Так, при значенні рН 5 штами ентерококів *E. durans* SB6 та *E. faecium* SB12 проявляли добрі ростові властивості, проте штами *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 давали суттєвіший ріст порівняно з контролем, зокрема, оптична густина цих середовищ збільшувалась, відповідно, у 9,8 та 10,8 рази ( $p < 0,001$ ). Найкращими ростовими властивостями за рН 6 та 7 характеризувалися штами *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20, оскільки оптична густина середовища була вірогідно вищою порівняно до контролю, відповідно, у 19,6 18,2 19,8 і 20,6 разів для SB18 та 20,5 20,1 18,3 і 20,2 рази для SB20. *E. durans* SB18 у порівнянні із *E. durans* SB20 проявляв кращі ростові

властивості.

Необхідно відзначити, що в лужному середовищі при рН 8 та 9 усі досліджувані штами ентерококів проявляли досить хороші ростові властивості. Однак, слід відзначити, що найкращі ростові властивості проявляв штамп *E. durans* SB20. Так, при рН 8 оптична густина була у 21,0 рази вищою ніж у контролі, проте при підвищенні рН до 9 оптична густина дещо зменшувалась, однак залишалася вищою від контролю у 19,7 рази.

Таблиця 3.22

**Зміна оптичної густини середовища при культивування ентерококів за різних значень рН середовища ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| рН<br>середовища,<br>од | Контроль     | Штами ентерококів       |                            |                          |                          |
|-------------------------|--------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                         |              | <i>E. durans</i><br>SB6 | <i>E. faecium</i><br>SB 12 | <i>E. durans</i><br>SB18 | <i>E. durans</i><br>SB20 |
| 3                       | 0,012±0,0009 | 0,013±0,000<br>7        | 0,014±0,000<br>6           | 0,013±0,0009             | 0,013±0,001              |
| 4                       |              | 0,070±<br>0,001***      | 0,071±<br>0,001***         | 0,073±<br>0,0003***      | 0,072±<br>0,002***       |
| 5                       |              | 0,033±<br>0,0003***     | 0,012±<br>0,00033          | 0,118±<br>0,00033***     | 0,129±<br>0,0003***      |
| 6                       |              | 0,229±<br>0,0006***     | 0,122±<br>0,0003***        | 0,237±<br>0,0007***      | 0,219±<br>0,0009***      |
| 7                       |              | 0,114±<br>0,0003***     | 0,175±<br>0,0003***        | 0,247±<br>0,0009***      | 0,242±<br>0,0009***      |
| 8                       |              | 0,148±<br>0,0003***     | 0,179±<br>0,00066***       | 0,242±<br>0,0003***      | 0,258±<br>0,002***       |
| 9                       |              | 0,114±<br>0,0003***     | 0,147±<br>0,0003***        | 0,215±<br>0,0009***      | 0,237±<br>0,002***       |

Примітка: \*\*\* –  $p < 0,001$

Отже, із досліджуваних чотирьох штамів ентерококів при показнику рН 4 два штами *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 були здатні виживати та проявляти ростові властивості. За значення рН 5 і 6 *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 також проявили вищу стійкість і відповідно кращі ростові властивості.

### 3.2.5. Стійкість ентерококів до різних концентрацій жовчі

У подальшому було досліджено здатність ентерококів виживати в умовах високої концентрації жовчі, результати досліджень наведено у таблиці 3.23. Отримані дані вказують на те, що в умовах 20 та 40% концентрації жовчі досліджувані штами ентерококів зберігали свою життєздатність та проявляли ростові властивості. Найвищий ріст за концентрації жовчі 20% встановлено для двох штамів ентерококів – *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20, оптична густина середовища культивування цих штамів була вищою порівняно до контролю, відповідно, на – 61,9 та 58,9 % ( $p < 0,001$ ).

Таблиця 3.23

**Зміна оптичної густини середовища при культивування ентерококів за різних концентрацій жовчі ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Концентрація жовчі, % | Контроль           | Штами ентерококів        |                           |                          |                          |
|-----------------------|--------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                       |                    | <i>E. durans</i> SB6     | <i>E. faecium</i> SB 12   | <i>E. durans</i> SB18    | <i>E. durans</i> SB20    |
| 20                    | $0,078 \pm 0,001$  | $0,113 \pm 0,0015^{***}$ | $0,120 \pm 0,0014^{***}$  | $0,126 \pm 0,002^{***}$  | $0,124 \pm 0,001^{***}$  |
| 40                    | $0,008 \pm 0,0007$ | $0,015 \pm 0,0003^{***}$ | $0,017 \pm 0,00033^{***}$ | $0,017 \pm 0,0003^{***}$ | $0,015 \pm 0,0003^{***}$ |

Примітка: \*\*\* –  $p < 0,001$

При культивуванні штамів *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18 у середовищі 40% концентрації жовчі оптична густина була вищою у 2,2 рази

( $p < 0,001$ ) порівняно до контролю, а при культивуванні *E. durans* SB6 та *E. durans* SB20 оптична густина середовища була вищою, відповідно, у – 2,1 та 1,9 рази ( $p < 0,001$ ).

Отже, за культивування досліджуваних штамів ентерококів у середовищі із 20 та 40% жовчі вони зберігали свою життєздатність та проявляли ростові властивості.

Аналізуючи результати досліджень попередніх розділів встановлено, що для залучення ентерококів у якості пробіотичного продукту найперспективнішим був штам *E. durans* SB18, оскільки проявляв вираженіші антагоністичні властивості та більшою мірою підвищував чутливість до антибіотиків *S. aureus* і *E. coli*, він невірулентний, не токсичний, не токсигенний, пропродукував біологічно активні речовини, зокрема найвищу кількість окремих незамінних амінокислот, єдиний з-посеред досліджуваних штамів продукував молочну кислоту. Крім того, *E. durans* SB18 проявив найбільш виражені технологічні властивості та найвищу стійкість до низьких значень рН.

### Результати досліджень розділу 3.2. опубліковано в наукових працях:

1. Інтенсивність росту та антибактеріальні властивості штамів *Enterococcus faecium* та *Enterococcus durans*, виділених із традиційної карпаської бринзи / **І. І. Кушнір**, О. Й. Цісарик, І. М. Сливка, Л. Я. Мусій, І. М. Кушнір, І. С. Семен. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки*. 2020. Т. 22, № 92. С. 42–49. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9208>

2. **Кушнір І. І.** Вплив рН і різних концентрацій солі та жовчі на ріст ентерококів, виділених з природних еконіш. *Збірник наукових праць «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»*. 2020. № 2 (158). С. 76–81. DOI: <https://doi.org/10.33245/2310-9289-2020-158-2-76-81>

### **3.3. Розробка заквашувального пробіотичного препарату та вивчення його ефективності**

#### **3.3.1. Підбір штамів молочнокислих бактерій для конструювання пробіотичного заквашувального препарату**

Біотехнологія пробіотичних препаратів та заквасок спрямована на стабілізування технологічного процесу та підвищення пробіотичних властивостей готового продукту за рахунок продукування мікроорганізмами біологічно активних речовин. Для підвищення ефективності пробіотичних препаратів використовують багатовидові консорціуми бактерій, при цьому вони повинні бути максимально спорідненими до біоценозу людини. З огляду на це, для надання продукту функціональних властивостей було використано перспективні для промисловості культури молочнокислих бактерій *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18, виділені з традиційної карпатської бринзи.

Штам *L. lactis* IMAU 32258 був вибраний як основний кислотоутворювач, оскільки відомо що саме штами цього виду характеризуються високою кислотоутворювальною здатністю. *L. lactis* є основним представником заквашувальних композицій при виробництві кисломолочних продуктів та сирів, сквашене ним молоко має рівномірний, щільний згусток, добрий смак і приємний кисломолочний запах.

Штам *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 був вибраний як штам із пробіотичними властивостями згідно літературних даних і наших попередніх досліджень [355-357]. При визріванні сирів *Lb. plantarum* відіграє надзвичайно важливу роль, оскільки може розмножуватися після зброджування лактози і рости за високих концентрацій кухонної солі. Завдяки синтезу бактеріоцинів він здатний пригнічувати ріст маслянокислих бактерій та кишкової мікрофлори.

Штам *E. durans* SB18 з-посеред ентерококів, ізольованих із традиційної карпатської бринзи, проявив добрі ростові, кислотоутворювальні властивості, а також стійкість до низьких значень рН і високих концентрацій кухонної солі і жовчі та здатність синтезувати біологічно активні речовини, про що вказано вище.

Таким чином, було сформовано композицію мікроорганізмів, яка включала такі штами МКБ: *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18. Ці штами, ізольовані із традиційної карпатської бринзи і є її типовими представниками, тому нами було зроблено припущення, що вони забезпечать продуктові добрі функціональні та сенсорні властивості.

За умов спільного використання МКБ у складі пробіотичного препарату надзвичайно важливим є встановлення їх сумісності. Так, було встановлено, що досліджувані штами молочнокислих бактерій не проявили міжвидового антагонізму (табл. 3.24).

Таблиця 3.24

**Сумісність пробіотичних штамів *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18**

| Тест-штами                       | <i>Lb. plantarum</i> KLDS 1.0728 | <i>L. lactis</i> IMAU 32258 | <i>E. durans</i> SB18 |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| <i>Lb. plantarum</i> KLDS 1.0728 | x                                | -                           | -                     |
| <i>L. lactis</i> IMAU 32258      | -                                | x                           | -                     |
| <i>E. durans</i> SB18            | -                                | -                           | x                     |

Примітка: «-» – відсутність зон затримки росту мікроорганізмів.

Було сформовано п'ять композицій із різними співвідношеннями штамів *L. lactis*, *Lb. plantarum* і *E. durans*: № 1 (50:25:25), № 2 (33:33:33), №3 (50:40:10), №4 (50:10:40), № 5 (70:15:15), відповідно.

Для підтвердження можливості сумісного культивування молочнокислих бактерій дослідили інтенсивність накопичення біомаси, активність

кислотоутворення та антагоністичні властивості до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори. При спільному культивуванні композицій мікроорганізмів було визначено швидкість їх росту за зміною оптичної густини за температури 32 та 37°C (табл. 3.25). Так, за температури 32°C вища інтенсивність росту встановлена при культивуванні композицій № 1, № 2 та № 5.

У попередніх дослідженнях нами встановлено, що за цієї температури штам *E. durans* SB18 демонстрував високу інтенсивність росту самотійно, вона переважала контроль у 17,9 рази. За температури 37°C на 24 годину вищу зміну оптичної густини живильного середовища спостерігали при культивуванні композицій № 1, № 2 та № 3, зокрема, вона зростала, відповідно, у 17,9, 17,8 та 18,1 ( $p < 0,001$ ) рази порівняно до контролю. Порівнюючи зміну оптичної густини середовища, при культивуванні *E. durans* SB18 самотійно за температури 37°C, було встановлено, що оптична густина середовища зростала у 17,6 рази, тоді як за використання консорціуму мікроорганізмів у композиції № 1, № 2 та № 3 була вищою, відповідно, на – 1,6, 1,1 та 2,8 %.

Таблиця 3.25

**Зміна оптичної густини середовища за культивування композицій МКБ за різних температурних режимів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Композиції                | Оптична густина, одиниці |                        |
|---------------------------|--------------------------|------------------------|
|                           | 32°C                     | 37°C                   |
| Контроль                  | 0,103 $\pm$ 0,0002       | 0,104 $\pm$ 0,0002     |
| Композиція № 1 (50:25:25) | 2,012 $\pm$ 0,0044***    | 1,863 $\pm$ 0,0013***  |
| Композиція № 2 (33:33:33) | 2,072 $\pm$ 0,0031***    | 1,855 $\pm$ 0,0010***  |
| Композиція № 3 (50:40:10) | 1,561 $\pm$ 0,0019***    | 1,885 $\pm$ 0,0014 *** |
| Композиція № 4 (50:10:40) | 2,049 $\pm$ 0,0025***    | 1,796 $\pm$ 0,0006***  |
| Композиція № 5 (70:15:15) | 1,857 $\pm$ 0,0012***    | 1,837 $\pm$ 0,0036***  |

Примітка: \*\*\* –  $p < 0,001$ .

При визначенні здатності різних композицій *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18 знижувати рН середовища, отримали дані (табл. 3.26), які вказують на те, що на 24 годину культивування за температури 32°C кращі кислотоутворювальні властивості проявили композиції № 3, № 4 та № 5, оскільки знижували рН, відповідно, на 32,8, 33,3 та 32,8%, до 4,87-4,91 одиниць. За температури 37°C сформовані композиції були здатними знижувати рН до 5,03-5,12 одиниць, при цьому кращі кислотоутворювальні властивості проявили композиції № 1, № 3 та № 5. Порівнюючи кислототворювальну здатність композицій за різних температур, встановили, що кращий її прояв для всіх композицій за температури 32 °C.

Таблиця 3.26

**Зміна рН середовища за культивування композицій МКБ за різних температурних режимів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Композиції                | рН середовища        |                      |
|---------------------------|----------------------|----------------------|
|                           | 32°C                 | 37°C                 |
| Контроль                  | 7,31 $\pm$ 0,0012    | 7,34 $\pm$ 0,0032*** |
| Композиція № 1 (50:25:25) | 4,93 $\pm$ 0,002***  | 5,03 $\pm$ 0,002***  |
| Композиція № 2 (33:33:33) | 4,92 $\pm$ 0,0024*** | 5,06 $\pm$ 0,0037*** |
| Композиція № 3 (50:40:10) | 4,91 $\pm$ 0,002***  | 5,03 $\pm$ 0,0024*** |
| Композиція № 4 (50:10:40) | 4,87 $\pm$ 0,0045*** | 5,12 $\pm$ 0,002***  |
| Композиція № 5 (70:15:15) | 4,91 $\pm$ 0,002***  | 5,05 $\pm$ 0,002***  |

Примітка: \*\*\* –  $p < 0,001$ .

При визначенні антагоністичних властивостей досліджуваних композицій пробіотичних штамів при культивуванні за температури 32°C (табл. 3.27) встановили, що вони володіли помірною антагоністичною активністю до усіх тест культур патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів.

Таблиця 3.27

**Антагоністична активність різних композицій консорціуму МБК за температури культивування 32°C (M±m, n=3)**

| Тест-штами<br>мікроорганізмів | Композиції      |                 |                 |                 |                 |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                               | № 1<br>50:25:25 | № 2<br>33:33:33 | № 3<br>50:40:10 | № 4<br>50:10:40 | № 5<br>70:15:15 |
| <i>E. coli</i>                | 14,3±0,3        | 14,6±0,3        | 12,6±0,3        | 14,3±0,3        | 12,3±0,3        |
| <i>S. enteritidis</i>         | 10,6±0,3        | 10,3±0,3        | 13,6±0,3        | 13,6±0,3        | 10,6±0,3        |
| <i>E. aerogenes</i>           | 11,6±0,3        | 11,6±0,3        | 12,3±0,3        | 12,3±0,3        | 11,3±0,3        |
| <i>P. mirabilis</i>           | 11,3±0,3        | 11,6±0,3        | 11,6±0,3        | 11,6±0,3        | 11,3±0,3        |
| <i>S. aureus</i>              | 11,3±0,3        | 12,6±0,3        | 14,3±0,3        | 13,6±0,3        | 10,6±0,3        |
| <i>P. aeruginosa</i>          | 11,6±0,3        | 12,3±0,3        | 12,6±0,3        | 11,6±0,3        | 12,6±0,3        |

При цьому, композиції № 1, № 2 та № 5 проявили дещо меншу активність щодо *Salmonella enteritidis*, в той час як композиція № 3 проявила найвищу антагоністичну активність до *Staphylococcus aureus*, досить високу активність порівняно з іншими композиціями вона проявила і щодо *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Enterobacter aerogenes*.

При культивуванні досліджуваних композицій консорціуму мікроорганізмів за температури 37°C (табл. 3.28) встановлено, що вони усі проявляли також помірну антагоністичну активність щодо усіх тест-культур патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Щодо *Salmonella enteritidis* всі композиції володіли дещо нижчою антагоністичною активністю, за винятком композиції № 3, де вона була найвищою. Найвищу антагоністичну активність для цієї композиції також зареєстровано і щодо *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus*. Необхідно зазначити, що попередніми дослідженнями було встановлено, що *E. durans* SB18, який входить до досліджуваних композицій, за 24 годину культивування за температури 37°C проявляв помірну антагоністичну активність до досліджуваних тест-мікроорганізмів, за винятком

*S. aureus*.

Таблиця 3.28

**Антагоністична активність різних композицій консорціуму МБК за температури культивування 37°C ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Тест-штами<br>мікроорганізмів | Композиції      |                 |                 |                 |                 |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                               | № 1<br>50:25:25 | № 2<br>33:33:33 | № 3<br>50:40:10 | № 4<br>50:10:40 | № 5<br>70:15:15 |
| <i>E. coli</i>                | 13,3±0,3        | 14,3±0,3        | 12,6±0,3        | 13,3±0,3        | 11,6±0,3        |
| <i>S. enteritidis</i>         | 10,3±0,3        | 10,6±0,3        | 12,3±0,3        | 10,6±0,3        | 10,3±0,3        |
| <i>E. aerogenes</i>           | 11,6±0,3        | 11,6±0,3        | 12,3±0,3        | 11,3±0,3        | 11,6±0,3        |
| <i>P. mirabilis</i>           | 11,3±0,3        | 12,3±0,3        | 11,6±0,3        | 12,6±0,3        | 12,3±0,3        |
| <i>S. aureus</i>              | 10,3±0,3        | 11,3±0,3        | 11,6±0,3        | 10,3±0,3        | 10,6±0,3        |
| <i>P. aeruginosa</i>          | 12,3±0,3        | 12,3±0,3        | 13,6±0,3        | 11,3±0,3        | 11,6±0,3        |

Отже, можна зробити висновок, що за спільного культивування різних композицій консорціуму пробіотичних мікроорганізмів за температур 32 та 37°C було встановлено, що всі композиції володіли помірною активністю щодо досліджуваних тест-культур патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Однак, звертає на себе увагу найвищий прояв антагоністичної активності композиції № 3 у співвідношенні 50:40:10 щодо *Staphylococcus aureus*, а також досить високий щодо *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Enterobacter aerogenes*, як за температури 32°C, так і за 37°C.

### **3.3.2. Вплив композиції консорціуму молочнокислих бактерій на організм лабораторних тварин**

Оскільки, композиція *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18 у співвідношенні 50:40:10 є найоптимальнішою для залучення у якості пробіотичного препарату, у подальшому доцільним є вивчення її впливу

на морфологічні показники крові, мікрофлору кишечника, фактори неспецифічної резистентності, антиоксидантну систему та біохімічні показники сироватки крові білих щурів.

При визначенні морфологічних показників крові щурів за 14 добового застосування встановили, що композиція пробіотичних штамів молочнокислих бактерій позитивно впливала на кровотворну функцію організму лабораторних тварин. Так, при визначенні впливу консорціуму мікроорганізмів на гематологічні показники (табл. 3.29) встановлено вірогідне зростання концентрації гемоглобіну на 14,9% ( $p<0,05$ ), кількості еритроцитів на 14,7% ( $p<0,05$ ), кількості лейкоцитів на 22,5% ( $p<0,05$ ) та величини гематокриту на 5,7%, порівняно до величин контрольної групи. Крім того, було встановлено, що застосування препарату упродовж 14 діб викликало зростання середньої концентрації гемоглобіну в еритроциті (МСНС) на 9,8% ( $p<0,05$ ) та тенденцію до зниження середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті (МСН) та середнього об'єму еритроцита (MCV), відповідно, на – 0,45 та 9,04%, порівняно до показників контрольної групи.

При визначенні лейкограми периферичної крові щурів було встановлено, що застосування досліджуваного препарату в тварин дослідної групи викликало тенденцію до зростання кількості нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів, відповідно, на – 6,0, 0,5 та 19,8% на тлі незначного зниження кількості еозинофілів.

*Таблиця 3.29*

**Гематологічні показники тварин 14 добу експерименту ( $M\pm m$ ,  $n=3$ )**

| Показники       | Групи тварин     |                   |
|-----------------|------------------|-------------------|
|                 | Контрольна       | Дослідна          |
| Гемоглобін, г/л | 143,0 $\pm$ 5,19 | 164,3 $\pm$ 2,33* |
| Еритроцити, Т/л | 6,45 $\pm$ 0,26  | 7,40 $\pm$ 0,14*  |
| Лейкоцити, Г/л  | 14,2 $\pm$ 0,82  | 17,4 $\pm$ 0,69*  |
| Гематокрит, %   | 36,7 $\pm$ 0,66  | 37,5 $\pm$ 0,55   |

Продовження таблиці 3.29

|                       |           |            |
|-----------------------|-----------|------------|
| МСН, пг               | 22,3±1,67 | 22,2±0,15  |
| МСНС, г/дл            | 38,9±0,78 | 42,7±0,59* |
| MCV, мкм <sup>3</sup> | 57,2±2,30 | 52,03±0,93 |
| Еозинофіли, %         | 2,66±0,88 | 0,33±0,33  |
| Нейтрофіли, %         | 28,3±2,19 | 30,0±2,0   |
| Лімфоцити, %          | 67,3±1,86 | 67,7±1,45  |
| Моноцити, %           | 1,67±0,33 | 2,00±0,58  |

Примітка: \* –  $p < 0,05$ .

З метою оцінки функціонального стану організму лабораторних тварин за дії композиції пробіотичних штамів визначили вагові коефіцієнти маси внутрішніх органів (табл. 3.30).

Таблиця 3.30

**Вагові коефіцієнти маси внутрішніх органів білих щурів  
на 14 добу експерименту ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Органи       | Групи тварин |            |
|--------------|--------------|------------|
|              | Контрольна   | Дослідна   |
| Печінка      | 29,3±0,26    | 34,6±1,21* |
| Легені       | 10,8±0,16    | 10,3±0,67  |
| Серце        | 3,61±0,098   | 3,35±0,16  |
| Селезінка    | 4,29±0,10    | 4,71±0,05* |
| Нирка права  | 3,74±0,07    | 3,75±0,22  |
| Нирка ліва   | 3,41±0,15    | 3,84±0,16  |
| Тимус        | 1,99±0,07    | 2,41±0,11* |
| Маса тіла, г | 195,2±5,33   | 210,0±2,31 |

Примітка: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,0001$ .

У результаті проведених досліджень встановили, що на 14 добу

експерименту суттєвого впливу зазнавали як центральні, так і периферичні органи імунної системи. Зокрема, відносні вагові коефіцієнти маси тимуса та селезінки зросли, відповідно, на – 21,1 ( $p<0,05$ ) та 9,8% ( $p<0,05$ ). Виявлені зміни можуть вказувати на самооновлення імунної системи та активуванням взаємодії імунокомпетентних клітин, оскільки в тимусі проходять процеси проліферації клітин-попередників та їх диференціювання і дозрівання, а у селезінці – формування специфічної імунної відповіді. Також відзначали, що застосування досліджуваної композиції викликало зростання вагового коефіцієнту маси печінки на 18,1 ( $p<0,05$ ), порівняно до величин контрольної групи, що, очевидно, може вказувати на підвищення білоксинтезувальної функції печінки. Змін відносних вагових коефіцієнтів маси легень, серця, та нирок не виявили. Крім того, 14-добове застосування досліджуваного засобу викликало зростання маси тіла на 7,6%.

При визначенні гематологічних показників встановили, що на 21 добу застосування досліджуваних пробіотичних штамів (табл. 3.31) залишалася тенденція до зростання концентрації гемоглобіну на 8,1%, кількості еритроцитів та лейкоцитів, відповідно, на 8,3 та 4,5%, а величини гематокриту лише на 1,0 %.

Таблиця 3.31

**Гематологічні показники тварин на 21 добу експерименту ( $M\pm m$ ,  $n=3$ )**

| Показники             | Групи тварин     |                  |
|-----------------------|------------------|------------------|
|                       | Контрольна       | Дослідна         |
| Гемоглобін, г/л       | 145,3 $\pm$ 2,03 | 157,0 $\pm$ 3,61 |
| Еритроцити, Т/л       | 6,66 $\pm$ 0,32  | 7,21 $\pm$ 0,45  |
| Лейкоцити, Г/л        | 13,2 $\pm$ 1,42  | 13,8 $\pm$ 2,11  |
| Гематокрит, %         | 38,5 $\pm$ 1,04  | 38,9 $\pm$ 1,10  |
| МСН, пг               | 21,8 $\pm$ 0,87  | 21,9 $\pm$ 1,24  |
| МСНС, г/дл            | 37,8 $\pm$ 0,50  | 40,1 $\pm$ 0,49* |
| MCV, мкм <sup>3</sup> | 57,9 $\pm$ 1,49  | 54,2 $\pm$ 2,17  |

Продовження таблиці 3.31

|               |           |           |
|---------------|-----------|-----------|
| Еозинофіли, % | 1,67±1,20 | 1,33±0,33 |
| Нейтрофіли, % | 34,7±4,06 | 25,0±9,54 |
| Лімфоцити, %  | 61,0±4,04 | 72,7±9,87 |
| Моноцити, %   | 2,67±0,88 | 1,0±0,0   |

Примітка: \* –  $p < 0,05$ .

Крім того, було встановлено, що застосування препарату упродовж 21 діб викликало зростання середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті (MCH) та середньої концентрації гемоглобіну в еритроциті (MCHC), відповідно, на 0,5% та 6,1% ( $p < 0,05$ ) на тлі зниження середнього об'єму еритроцита (MCV) на 6,4% порівняно до величин контрольної групи. При визначенні морфологічного складу лейкоцитів периферичної крові щурів було встановлено, що застосування досліджуваного препарату в тварин дослідної групи викликало тенденцію до зростання кількості лімфоцитів на 19,2% на тлі незначного зниження кількості нейтрофілів, моноцитів та еозинофілів.

При визначенні функціонального стану організму лабораторних тварин за 21 добового застосування композиції пробіотичних штамів (табл. 3.32) встановили тенденцію до зростання вагових коефіцієнтів маси печінки на 4,4%, тимусу на 5,2%, а маси тіла тварин на 4,6% ( $p < 0,05$ ) порівняно до величин контрольної групи. Поряд з цим, відзначали, що застосування досліджуваного препарату не спричинило вірогідних змін маси легень, серця, селезінки нирок.

Таблиця 3.32

**Вагові коефіцієнти маси внутрішніх органів білих щурів за застосування на 21 добу експерименту ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Органи  | Групи тварин |           |
|---------|--------------|-----------|
|         | Контрольна   | Дослідна  |
| Печінка | 38,8±1,21    | 40,5±1,68 |
| Легені  | 8,24±0,32    | 7,69±0,48 |

Продовження таблиці 3.32

|              |            |             |
|--------------|------------|-------------|
| Серце        | 3,46±0,12  | 3,57±0,10   |
| Селезінка    | 5,15±0,64  | 5,07±0,22   |
| Нирка права  | 3,50±0,09  | 3,27±0,04   |
| Нирка ліва   | 3,58±0,09  | 3,51±0,13   |
| Тимус        | 1,94±0,06  | 2,04±0,15   |
| Маса тіла, г | 207,2±0,70 | 216,7±2,17* |

Примітка: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,0001$ .

Отже, можна стверджувати, що молочнокислі бактерії сформованого консорціуму проявили позитивний вплив на організм щурів. Цей вплив базується на різносторонніх біологічних ефектах пробіотичних штамів, зокрема, *Enterococcus durans* SB18, нормалізації рН, здатності синтезувати біологічно активні речовини, як от вітаміни, органічні кислоти, амінокислоти, антагоністичній активності та здатності виживати в умовах низьких значень рН та високих концентрацій жовчі.

### 3.3.3. Вплив композиції консорціуму консорціуму молочнокислих бактерій на мікрофлору кишечника білих щурів

Застосування композиції молочнокислих бактерій позитивно впливало на нормофлору кишечника лабораторних тварин (табл. 3.33), зокрема, стимулювало збільшення лакто- та біфідобактерій вмістимого товстого відділу кишечника білих щурів. Так, встановили вірогідне збільшення кількості біфідобактерій та лактобактерій, відповідно, на 4,3 та 5,2 ( $p < 0,001$ ) порівняно з тваринами контрольної групи. Також слід зауважити, що на 14 добу експерименту застосування досліджуваної композиції сприяло вірогідному зменшенню чисельності умовно-патогенної та гнильної мікрофлори. Кількість

кишкової палички, золотистого стафілокока та грибів роду *Candida* вірогідно знижувалась відносно контролю на 4,7 ( $p<0,01$ ), 2,6 ( $p<0,05$ ) та 13,3% ( $p<0,001$ ), відповідно, все це вказувало на оздоровлення організму лабораторних тварин.

Таблиця 3.33

**Вплив консорціуму молочнокислих бактерій на мікрофлору кишечника білих щурів на 14 добу експерименту ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Мікроорганізми            | Кількість КУО/г, log |                     |
|---------------------------|----------------------|---------------------|
|                           | Контрольна група     | Дослідна група      |
| Біфідобактерії            | 8,53 $\pm$ 0,02      | 8,90 $\pm$ 0,01***  |
| Лактобактерії             | 9,89 $\pm$ 0,02      | 10,41 $\pm$ 0,05*** |
| Кишкова паличка           | 5,86 $\pm$ 0,01      | 5,58 $\pm$ 0,02***  |
| <i>S.aureus</i>           | 5,64 $\pm$ 0,02      | 5,49 $\pm$ 0,02*    |
| Гриби роду <i>Candida</i> | 6,88 $\pm$ 0,01      | 5,96 $\pm$ 0,01***  |

Примітка: \* –  $p<0,05$ , \*\* –  $p<0,01$ , \*\*\* –  $p<0,001$ .

На 21 добу застосування композиції молочнокислих бактерій позитивний вплив на нормофлору кишечника лабораторних тварин зберігався (табл. 3.34).

Таблиця 3.34

**Вплив консорціуму молочнокислих бактерій на мікрофлору кишечника білих щурів на 21 добу експерименту ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Мікроорганізми            | Кількість КУО/г, log |                     |
|---------------------------|----------------------|---------------------|
|                           | Контрольна група     | Дослідна група      |
| Біфідобактерії            | 8,57 $\pm$ 0,02      | 8,95 $\pm$ 0,01***  |
| Лактобактерії             | 9,89 $\pm$ 0,02      | 10,47 $\pm$ 0,05*** |
| Кишкова паличка           | 5,88 $\pm$ 0,03      | 5,52 $\pm$ 0,04**   |
| <i>S.aureus</i>           | 5,69 $\pm$ 0,02      | 5,52 $\pm$ 0,02*    |
| Гриби роду <i>Candida</i> | 6,86 $\pm$ 0,01      | 5,93 $\pm$ 0,02***  |

Примітка: \* –  $p<0,05$ , \*\* –  $p<0,01$ , \*\*\* –  $p<0,001$ .

На тлі суттєвого збільшення лактобактерій на 5,8% ( $p<0,001$ ) та кількості біфідобактерій на 4,4% ( $p<0,001$ ) у вмістимому товстого відділу кишечника білих щурів на 14 добу досліду встановили значне зниження чисельності умовно-патогенної та гнильної мікрофлори. Так, кількість кишкової палички, золотистого стафілокока та грибів роду *Candida* вірогідно знижувалась відносно контролю, відповідно, на 6,1 ( $p<0,01$ ), 2,9 ( $p<0,05$ ) та 13,5% ( $p<0,001$ ).

### 3.3.4. Вплив композиції консорціуму молочнокислих бактерій, на систему антиоксидантного захисту лабораторних тварин

Застосування композиції молочнокислих бактерій *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS1.0728 та *E. durans* SB18 упродовж усього періоду експерименту викликало інгібуючий вплив на інтенсивність процесів ПОЛ, що у свою чергу, призводило до зниження вмісту ТБК-активних продуктів та гідроперекисів ліпідів (табл. 3.35).

Таблиця 3.35

#### Показники пероксидного окиснення ліпідів плазми крові щурів ( $M\pm m$ , $n=3$ )

| Показники                      | 14 доба          |                  | 21 доба          |                    |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|
|                                | Контрольна група | Дослідна група   | Контрольна група | Дослідна група     |
| ТБК-активні продукти, нмоль/мл | 4,459 $\pm$ 0,29 | 4,184 $\pm$ 0,32 | 3,966 $\pm$ 0,40 | 3,374 $\pm$ 0,09   |
| ГПЛ, од.Е/мл                   | 2,18 $\pm$ 0,08  | 2,09 $\pm$ 0,12  | 2,26 $\pm$ 0,06  | 1,76 $\pm$ 0,012** |

Примітка: \*\* –  $p<0,01$ .

Зокрема, на 14 добу застосування консорціуму молочнокислих бактерій вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів знижувався, відповідно, на 6,1 та 4,1%, а на 21 добу – на 14,9 та 22,1% ( $p<0,01$ ). Оскільки

пероксидне окиснення ліпідів є фізіологічним процесом і відображає ступінь впливу молекулярного кисню на мітохондріальні ліпіди в нормальних фізіологічних умовах і визначається здатністю регулювати структурно-функціональний стан мембран [358], виявлені зміни можуть вказувати на посилення антиоксидантних та дезінтоксикаційних властивостей молочнокислих бактерій.

Надзвичайно важливим ферментом антиоксидантного захисту організму є супероксиддисмутаза (СОД), яка є первинною лінією захисту від окисних пошкоджень і забезпечує переривання ланцюгів кисневозалежних вільно-радикальних реакцій [358].

При вивченні активності СОД (табл. 3.36) було встановлено, що застосування досліджуваної композиції молочнокислих мікороорганізмів упродовж 14 діб викликало її зростання на 6,3%, а на 21 добу експерименту цей показник був вірогідно вищим на 9,6% ( $p < 0,05$ ). Отже, зростання активності СОД може вказувати на активацію метаболічних процесів, зокрема, підвищеної потреби у  $O_2$ , і посиленням генерації активних форм оксигену.

Таблиця 3.36

**Активність СОД та вміст продуктів окисної модифікації  
протеїнів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Показники                        | 14 доба          |                  | 21 доба          |                  |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                  | Контрольна група | Дослідна група   | Контрольна група | Дослідна група   |
| СОД (U/ml)                       | 4,13 $\pm$ 0,26  | 4,39 $\pm$ 0,13  | 4,18 $\pm$ 0,11  | 4,58 $\pm$ 0,03* |
| ОМП <sub>430</sub> ( $\mu$ M/ml) | 3,68 $\pm$ 0,13  | 3,36 $\pm$ 0,10  | 3,57 $\pm$ 0,11  | 3,51 $\pm$ 0,09  |
| ОМП <sub>370</sub> ( $\mu$ M/ml) | 0,78 $\pm$ 0,021 | 0,75 $\pm$ 0,029 | 0,79 $\pm$ 0,025 | 0,75 $\pm$ 0,017 |

Примітка \* –  $p < 0,05$ .

Оцінку окисного ушкодження різних компонентів клітини здійснювали за вмістом продуктів окисної модифікації протеїнів (ОМП). При цьому, слід відзначити, що показник ОМП є одним із ранніх та надійних індикаторів

ураження тканин, оскільки похідні ОМП є стабільними [358]. Саме тому вивчали вплив досліджуваної композиції молочнокислих бактерій на ОМП. Як видно з даних, наведених у таблиці 3.36, довготривале застосування консорціуму молочнокислих бактерій викликало незначне зниження ОМП<sub>430</sub> та ОМП<sub>370</sub>, що, ймовірно, може вказувати на інгібуючу дію досліджуваної композиції на процеси ОМП.

Визначення впливу досліджувальної композиції на гуморальні фактори захисту представлені у таблиці 3.37

Таблиця 3.37

**Гуморальні фактори захисту сироватки крові щурів ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Показники    | 14 доба          |                 | 21 доба          |                 |
|--------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
|              | Контрольна група | Дослідна група  | Контрольна група | Дослідна група  |
| ЛАСК, %      | 35,7 $\pm$ 2,33  | 36,0 $\pm$ 1,15 | 28,7 $\pm$ 0,88  | 31,3 $\pm$ 1,45 |
| ЦІК, ммоль/л | 41,0 $\pm$ 1,0   | 39,0 $\pm$ 3,46 | 45,0 $\pm$ 3,51  | 38,7 $\pm$ 1,86 |

Було встановлено, що на 14 добу експерименту ЛАСК зросла лише на 0,8%. Поряд з тим відзначали зниження рівня ЦІК на 4,9%, порівняно до величин контрольної групи. Тоді як на 21 добу експерименту ЛАСК зросла на 9,1%, а рівень ЦІК знижувався на 14%. Виявлені зміни можуть вказувати на підвищення факторів гуморального захисту та нормалізацію гомеостазу.

### **3.3.5. Дослідження ліпідів печінки щурів за дії композиції молочнокислих бактерій**

Маса тіла є одним із показників, що характеризує ризик розвитку метаболічного синдрому і пов'язаних з ним захворювань. Тому ми дослідили масу тіла щурів і встановили (рис. 3.1), що у тварин дослідної групи спостерігалася тенденція до її незначного підвищення, що, очевидно, пов'язано із кращою конверсією корму за дії композиції молочнокислих бактерій. У

нашому експерименті щурів утримували на збалансованому раціоні.

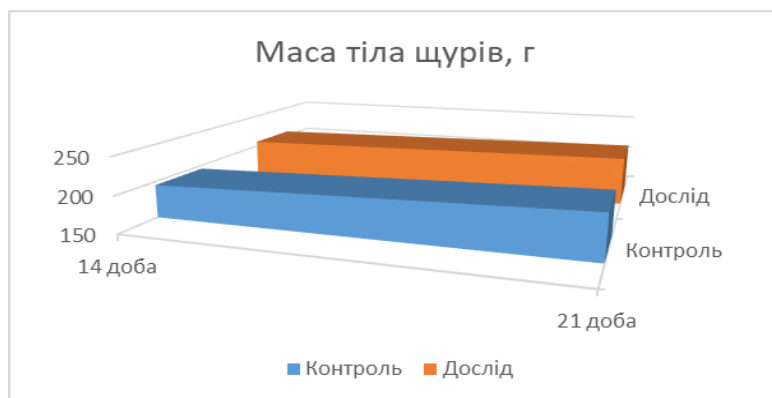


Рис. 3.1 Маса тіла щурів за дії композиції молочнокислих бактерій.

При визначенні вмісту загальних ліпідів у печінці на 14 добу експерименту встановили, що у дослідній групі вони були незначно вищими і складали 2,9 проти 2,8 г/100 г сирової маси (табл. 3.38).

Таблиця 3.38

**Вміст загальних ліпідів і співвідношення їх класів у печінці щурів на 14 добу експерименту ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Показники                              | Групи тварин |            |
|----------------------------------------|--------------|------------|
|                                        | Контрольна   | Дослідна   |
| Загальні ліпіди, г/100 г сирової маси  | 2,8±0,17     | 2,9±0,10   |
| Класи ліпідів, % від загальних ліпідів |              |            |
| Фосфоліпіди                            | 30,86±1,32   | 32,36±0,53 |
| Неестерифікований холестерол           | 24,04±1,20   | 21,10±1,0* |
| НЕЖК                                   | 17,31±1,89   | 17,66±1,21 |
| Триацилгліцероли                       | 15,81±0,97   | 15,13±1,09 |
| Естери холестеролу                     | 11,98±1,0    | 13,90±1,1  |
| Холестерол/Фосфоліпіди                 | 0,77±0,14    | 0,65±0,12  |

Примітка: \* –  $p < 0,05$ .

За цих умов, встановлено міжгрупові відмінності щодо окремих класів. Так, у щурів, яким задавали композицію бактерій, відзначено вірогідно менший вміст неестерифікованого холестеролу – у 1,4 рази, при цьому вміст

естерифікованого холестеролу був вищий у 1,2 рази порівняно з контрольною групою. Рівень загального холестеролу був дещо нижчим у складі ліпідів печінки тварин дослідної групи. Зниження рівня вільного холестеролу та підвищення його естерифікованої форми вказують на зниження вмісту холестеролу у складі мембран та зниження їх жорсткості. Головними жирними кислотами, які беруть участь у естерифікації холестеролу, є ліолева або олеїнова.

Рівень фосфоліпідів у складі ліпідів проявив тенденцію до підвищення у щурів дослідної групи. Важливо підкреслити, що у тварин дослідної групи було меншим співвідношення неестерифікований холестерол/фосфоліпіди, ніж у тварин контрольної групи.

Щодо рівня неестерифікованих жирних кислот і триацилгліцеролів, то істотних міжгрупових відмінностей на 14 добу експерименту не встановлено.

На 21 добу експерименту варто відзначити тенденцію до зниження вмісту загальних ліпідів у тканині печінки щурів дослідної групи (табл. 3.39).

*Таблиця 3.39*

**Вміст загальних ліпідів і співвідношення їх класів у печінці щурів на 21 добу експерименту ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Показники                              | Групи тварин |              |
|----------------------------------------|--------------|--------------|
|                                        | Контрольна   | Дослідна     |
| Загальні ліпіди, г/100 г сирової маси  | 3,07±0,06    | 2,9±0,30     |
| Класи ліпідів, % від загальних ліпідів |              |              |
| Фосфоліпіди                            | 28,62±0,60   | 31,38±0,48** |
| Неестерифікований холестерол           | 24,74±0,74   | 22,45±0,37*  |
| НЕЖК                                   | 17,38±1,89   | 15,89±1,53   |
| Триацилгліцероли                       | 18,63±0,41   | 17,75±0,68   |
| Естери холестеролу                     | 10,62±0,30   | 12,54±0,51*  |
| Холестерол/Фосфоліпіди                 | 0,86±0,07    | 0,72±0,005*  |

Примітка: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

Крім того, міжгрупові відмінності співвідношень класів ліпідів у печінці щурів були вираженішими. Встановлено менший вміст неестерифікованого холестеролу в 1,1 рази та більший – фосфоліпідів у печінці щурів, які отримували мікробіальну композицію, – також у 1,1 раза. Варто відзначити, що у них вірогідно меншим було співвідношення між неестерифікованим холестеролом і фосфоліпідами. Крім того, встановлено тенденцію до зменшення вмісту неестерифікованих жирних кислот і триацилгліцеролів у печінці щурів дослідної групи. Тенденція до зниження рівня неестерифікованих жирних кислот і триацилгліцеролів вказує на позитивний вплив на обмін ліпідів у печінці.

Отже, можемо зробити висновок, що застосування консорціуму молочнокислих бактерій *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS1.0728 та *E. durans* SB18 у співвідношенні 50:40:10 позитивно впливало на кровотворну функцію організму лабораторних тварин. Зокрема, на 14 добу експерименту вірогідно зросла концентрація гемоглобіну, кількість еритроцитів та лейкоцитів, а також величина гематокриту порівняно до величин контрольної групи. Крім того, молочнокислі бактерії сформованої композиції здійснювали позитивний вплив на центральні і периферичні органи імунної системи, на що вказували відносні вагові коефіцієнти маси тимуса та селезінки. Застосування консорціуму молочнокислих бактерій позитивно впливало на нормофлору кишечника лабораторних тварин. Так, на 14 добу експерименту вірогідно збільшувалась кількість лакто- та біфідобактерії вмістимого товстого відділу кишечника білих щурів та тлі вірогідного зниження кількості кишкової палички, золотистого стафілокока та грибів роду *Candida*.

Застосування композиції молочнокислих бактерій упродовж усього періоду експерименту викликало інгібуючий вплив на інтенсивність процесів ПОЛ, що у свою чергу, призводило до зниження вмісту ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів, а зростання активності СОД вказує на активацію метаболічних процесів. Таким чином, аналізуючи стан системи

антиоксидантного захисту можемо зробити висновок, що застосування консорціуму молочнокислих бактерій посилювало антиоксидантну та дезінтоксикаційну здатність організму лабораторних тварин.

Встановлено позитивний вплив і на гуморальні фактори захисту, зокрема підвищення лізоцимної активності сироватки крові та зниження рівня ЦІК, що вказувало на підвищення факторів гуморального захисту та нормалізацію гомеостазу. Крім того, композиція молочнокислих бактерій здійснила позитивний вплив на ліпідний склад тканини печінки. Зокрема, встановлено зниження рівня неестерифікованого холестеролу, тенденцію до підвищення рівня фосфоліпідів та естерифікованого холестеролу, а також зниження співвідношення неестерифікований холестерол/фосфоліпіди у тканині печінки.

### **3.3.6. Виготовлення бринзи із заквашувальним препаратом «Енетроплан» та дослідження її властивостей**

При створенні пробіотичного заквашувального препарату технологічні властивості мікроорганізмів є ключовим моментом, які визначають ефективність і якість готового продукту. З огляду на це, при вивченні швидкості накопичення біомаси композицією *L. lactis*, *Lb. plantarum*, *E. durans* SB18 у співвідношенні 50:40:10 (табл. 3.40) встановили, що при трьохгодинній експозиції за температури культивування 32°C оптична густина середовища була у 5,2 раза вищою в порівнянні до контролю, а за температури 37°C – у 5,4 рази. Необхідно відзначити, що при шести- та дев'ятигодинному культивуванні композиція МКБ краще накопичувала біомасу за температури 37°C. Зокрема, за шести годинного інкубування МКБ за температури 32°C оптична густина середовища зросла у 14,7, а за температури 37°C – у 15,2 рази. На 24 годину інкубування накопичення біомаси композицією МКБ за двох температурних режимів було фактично однаковим, що може вказувати на припинення розмноження мікроорганізмів внаслідок зменшення кількості поживних речовин у середовищі культивування.

Таблиця 3.40

**Зміна оптичної густини середовища за культивування консорціуму МКБ**

| Термін<br>інкубування,<br>год | Контроль                |              | Консорціум МКБ |               |
|-------------------------------|-------------------------|--------------|----------------|---------------|
|                               | Температура інкубування |              |                |               |
|                               | 32°C                    | 37°C         | 32°C           | 37°C          |
| 3                             | 0,089±0,003             | 0,088 ±0,003 | 0,46±0,002***  | 0,48±0,001*** |
| 6                             |                         |              | 1,31±0,002***  | 1,34±0,001*** |
| 9                             |                         |              | 1,50±0,001***  | 1,56±0,003*** |
| 24                            |                         |              | 2,02±0,002***  | 2,00±0,001*** |

Примітка: \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Отримані дані з накопичення біомаси композицією МКБ корелюються із їх кислотоутворювальними властивостями (табл. 3.41).

Таблиця 3.41

**Зміна рН середовища за культивування консорціуму МКБ**

| Термін<br>інкубування,<br>год | Контроль                |              | Консорціум МКБ |               |
|-------------------------------|-------------------------|--------------|----------------|---------------|
|                               | Температура інкубування |              |                |               |
|                               | 32°C                    | 37°C         | 32°C           | 37°C          |
| 3                             | 6,933±0,002             | 6,927 ±0,001 | 6,21±0,005***  | 6,14±0,003*** |
| 6                             |                         |              | 5,05±0,001***  | 5,03±0,002*** |
| 9                             |                         |              | 4,83±0,004***  | 4,83±0,003*** |
| 24                            |                         |              | 4,25±0,001***  | 4,25±0,002*** |

Примітка: \*\*\* -  $p < 0,001$ 

Нами було встановлено, що кислотоутворювальна здатність на третю годину культивування за температури 32°C та 37°C була незначною і підвищувалась, відповідно, на 10,4 та 11,4%. Значне збільшення кислотоутворювальної здатності спостерігали на шосту годину культивування.

Зокрема, за цих температурних режимів вона зросла, відповідно, на 27,2 та 27,3%. Необхідно відзначити, що на відміну від накопичення біомаси композицією МКБ за температури 32°C та 37°C кислотоутворювальна здатність була фактично на одному рівні. На дев'яту годину культивування зниження рН середовища відбулося на 30,3% для двох температурних режимів, а на 24 годину – на 38,7% за 32°C та на 38,6% – за температури 37°C. Таким чином, температура культивування суттєво не впливала на кислотоутворення композиції МКБ, однак за температури 37°C накопичення біомаси відбувалося інтенсивніше.

У результаті проведених досліджень розроблено пробіотичний препарат до складу якого входять *L. lactis ssp. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18 у співвідношенні 50:40:10, який отримав назву Препарат заквашувальний «Ентероплан» Технічні умови ТУУ 10.5–00492990–028:2021.

Традиційну бринзу виготовляють із овечого молока. Важливо зазначити, що отримати овече молоко у великій кількості для промислового виробництва бринзи є досить складно. Альтернативою є використання коров'ячого, козячого молока або суміші коров'ячого та овечого молока. Для виготовлення бринзи ми використали коров'яче молоко.

Таблиця 3.42

#### Показники безпеки молока

| Показники                                          | Максимально-допустимі рівні | Результат   |
|----------------------------------------------------|-----------------------------|-------------|
| БГКП (коліформні бактерії), в 0,1 см <sup>3</sup>  | Не допускається             | Не виявлено |
| <i>Staphylococcus aureus</i> в 1,0 см <sup>3</sup> | Не допускається             | Не виявлено |
| <i>Salmonella spp.</i> в 25 см <sup>3</sup>        | Не допускається             | Не виявлено |

Перед початком експерименту визначили мікробіологічні показники безпеки молока, зокрема, наявність коліформних бактерій, *Staphylococcus aureus*

та патогенних мікроорганізмів роду *Salmonella* (табл. 3.42).

Досліджуване молоко за зовнішнім виглядом та консистенцією було однорідною рідиною, без осаду та пластівців. Колір білий з кремовим відтінком, однорідний за всією масою. Смак та запах – чистий, молочний без сторонніх не властивих свіжому молоку присмаків та запахів. За результатами досліджень кількості мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів та соматичних клітин (табл. 3.43) та за складом і фізико-хімічними показниками (табл. 3.44) молоко згідно з ДСТУ 3662:2018 відносилось до вищого ґатунку.

Таблиця 3.43

**Кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних  
мікроорганізмів та соматичних клітин у молоці**

| Показники                                                                                           | Значення | Максимально-<br>допустимі рівні |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|---------------------------------|
| Кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів, тис. КУО/см <sup>3</sup> | 150      | ≤300                            |
| Кількість соматичних клітин, тис/см <sup>3</sup>                                                    | 90       | ≤400                            |

Таблиця 3.44

**Склад та фізико-хімічні властивості молока**

| Показники                                   | Досліджуване молоко |
|---------------------------------------------|---------------------|
| Масова частка жиру, %                       | 5,35±0,18           |
| Масова частка сухого знежиреного залишку, % | 9,86±0,09           |
| Густина, кг/м <sup>3</sup>                  | 32,2±0,49           |
| Масова частка білка, %                      | 3,57±0,08           |
| Титрована кислотність, °Т                   | 18±0,57             |
| Активна кислотність, од. рН                 | 6,7±0,05            |

У подальшому визначили сиропридатність молока пробою на зброджування та сичужно-бродильною пробою (табл. 3.45). За показниками

сиропридатності досліджуване молоко оцінюється як добре.

Таблиця 3.45

**Показники сиропридатності молока**

| Показники               | Характеристика згустку                                                                                                                          | Оцінка якості молока |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Бродильна проба         | Молоко зсідалося без відшарувань сироватки та бульбашок газу. Згусток щільний із незначними смужками.                                           | Добра                |
| Сичужно-бродильна проба | Згусток суцільний з гладенькою поверхнею, пружний на дотик, без вічок на розрізі, плаває в прозорій, неслизуватій та негіркій на смак сироватці | Добра                |

Згідно з технологією виготовлення бринзи молоко охолодили та залишили для визрівання за температури  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ , упродовж 10-12 год. Далі провели його нормалізацію. Метою нормалізації молока є отримання продукту із бажаним вмістом жиру, а при виробництві сирів – і білка. За нашими розрахунками для виготовлення бринзи із нормативними показниками необхідно було отримати нормалізовану суміш із вмістом жиру 3,28%, нормалізацію здійснили знежиреним молоком. Нормалізовану суміш піддали пастеризації. Враховуючи те, що від режиму теплової обробки молока залежать органолептичні показники, синеретичні властивості згустку, вихід сиру та його біологічна цінність, вибір температурного режиму відіграє ключову роль. Найоптимальнішим температурним режимом пастеризації сирого молока, яка забезпечує необхідні синеретичні та структурно-механічні властивості сичужного згустку є  $73\pm 2^{\circ}\text{C}$  з витримуванням 20-23 с [362]. Власне тому, за такого температурного режиму провели пастеризацію нормалізованої суміші. Після пастеризації молочну суміш охолодили до температури заквашування  $33\pm 1^{\circ}\text{C}$  та внесли бактеріальний препарат, ферментний препарат та хлорид кальцію. Після внесення відповідних інгредієнтів молочну суміш ретельно

перемішали упродовж 10-12 хв. Зсідання молока проводили в термостаті за температури  $33 \pm 1^\circ\text{C}$ , при цьому постійно контролювали кислотність молока (рис. 3.2). Після 90 хв експозиції активна кислотність молочної суміші дослідного зразка становила 5,3 од, контрольного – 5,4 од.

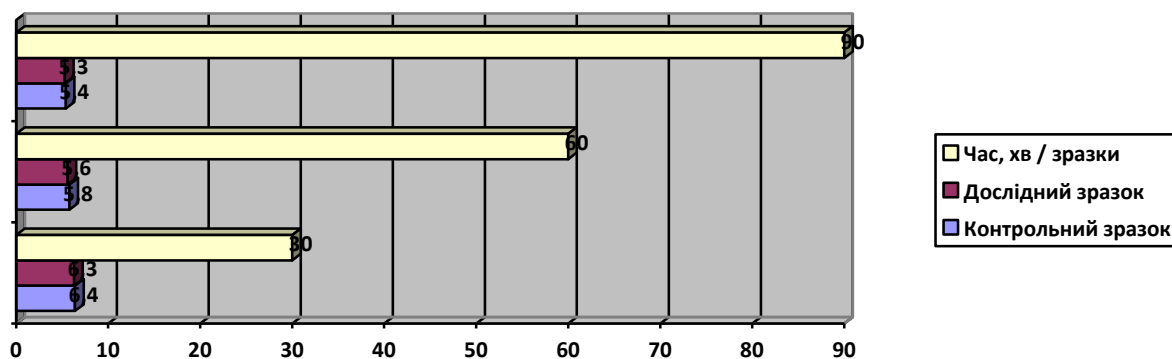


Рис. 3.2 Активна кислотність молока при його зсіданні.

Згусток розрізали на кубики розмірами  $1 \times 1 \times 1$  см та залишили у спокої на 12-15 хв для відділення сироватки. Метою оброблення згустку та сирного зерна є регулювання процесу синерезису з метою створення оптимальних умов для перебігу під час визрівання фізико-хімічних, біохімічних та мікробіологічних процесів, які формують специфічність кожного виду сиру. В міру готовності зерна сироватку зливали з поверхні зерна, яке осіло на дно, після чого зерно піддавали самопресуванню упродовж 12 год та пресуванню сирного пласта упродовж 3 год. Відпресований пласт товщиною 5-6 см заливали розсолон кухонної солі 18% концентрації.

Слід зазначити, що кухонна сіль є обов'язковим інгредієнтом при виробництві сирів, особливо, розсольних. Вона надає сирам не тільки відповідного смаку, але й впливає на перебіг процесів, що пов'язані з визріванням сиру, формуванням його структури і консистенції. Натрій хлорид посилює гідролітичну здатність сичужного ферменту під час визрівання сиру, гальмує життєдіяльність гнильних бактерій, при цьому сприяє розвитку молочнокислої мікрофлори і продукуванню нею ферментів. Помірна кількість солі підвищує ступінь гідратації білків сиру, впливаючи на формування

пластичної консистенції, запобігаючи небажаним перетворенням сірковмісних амінокислот, що спричиняє утворення сірководню. При цьому при зниженні вмісту кухонної солі виникає гіркота, що негативно впливає на його смакові властивості [361, 362].

З огляду на це, тривалість просолювання залежить від концентрації кухонної солі у розсолі. Згідно ДСТУ 7065-2009 вміст солі у сирі виготовленого із коров'ячого молока повинен становити 2-5%, проте під час зберігання бринзи після визрівання у розсолі дозволено підвищення масової частки кухонної солі до 7% і появи гостро-солоного смаку. Тому з метою досягнення максимального осмотичного перенесення води з розсолу та максимальної дифузії солі в сир і його просолювання, для розсолу взяли 180 г кухонної солі (у перерахунку на 1 дм<sup>3</sup>), тобто засолювали у 18% розчині кухонної солі, а для рівномірного просолювання бруски сиру повністю занурили у розсіл. Весь технологічний процес здійснювали за температури 10-12°C. Оскільки вміст кухонної солі в сирі регламентований нормативною документацією, під час соління контролювали її концентрацію. Зокрема, встановили, що у контрольному та дослідному зразку на четверту годину засолювання її вміст становив, відповідно, 4,4 та 4,5% (рис.3.3).

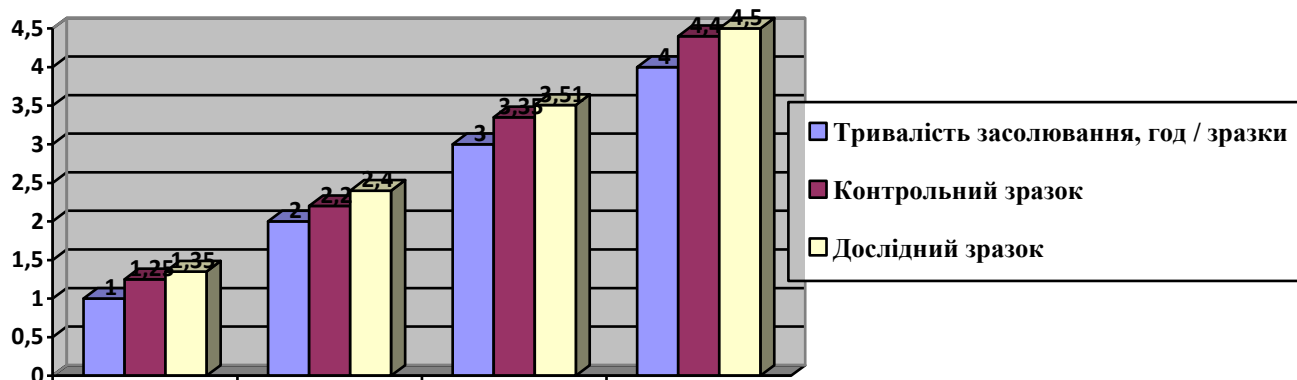


Рис. 3.3 Вміст кухонної солі у бринзі

Після засолювання бринзи, для підтримки необхідного вмісту солі у продукті впродовж усього терміну визрівання та зберігання, її вийняли і

занурили у розчин кухонної солі. Оскільки масова частка солі у сирі уже становила 4%, то приготували 4% розчин кухонної солі, температурою 10-12°C, що дасть змогу забезпечити підтримку необхідного вмісту солі у продукті впродовж усього терміну визрівання та зберігання [362].

Після цього бринза у розчині солі визрівала упродовж 20 діб за температури 6-8°C. Виготовлену бринзу зберігали у холодильнику упродовж 60 діб, враховуючи 20-ти добове визрівання, та визначали активну кислотність під час зберігання. У результаті проведених досліджень встановили, що після 40 добового зберігання активна кислотність бринзи контрольного зразка бринзи становила 4,05, а дослідного – до 4,00 од. (табл. 3.46), вона знизилась, відповідно, на – 7,4 і 8,3%.

Таблиця 3.46

**Активна кислотність бринзи упродовж терміну зберігання, од. рН**

| Зразки      | Тривалість зберігання (вік сиру), доби |         |         |         |         |
|-------------|----------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|             | 0 (20)                                 | 10 (30) | 20 (40) | 30 (50) | 40 (60) |
| Контрольний | 4,35                                   | 4,31    | 4,21    | 4,13    | 4,05    |
| Дослідний   | 4,33                                   | 4,29    | 4,18    | 4,10    | 4,00    |

За органолептичними показниками (табл. 3.47) виготовлений дослідний зразок бринзи мав більш виражений і насичений вершковий, в міру солоний смак та запах. Проте, необхідно відзначити, що смак дослідного зразка був кращим у порівнянні із контрольним.

Таблиця 3.47

**Органолептичні показники бринзи, виготовленої з коров'ячого молока**

| Назва показника | Характеристика                                              |                                                                                     |
|-----------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|                 | Контрольний зразок                                          | Дослідний зразок                                                                    |
| Смак і запах    | Чистий, в міру солоний, без сторонніх присмаків та запахів. | Виражений, насичений, вершковий, в міру солоний, без сторонніх присмаків та запахів |

Продовження таблиці 3.47

|                  |                                                                                        |                                                           |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Консистенція     | Однорідна, ламка, але не крихка                                                        | Однорідна, пластична в міру щільна.                       |
| Рисунок          | З поодинокими вічками неправильної форми.                                              | З поодинокими вічками неправильної форми.                 |
| Колір            | Білий, однорідний за всією масою.                                                      | Білий, однорідний за всією масою.                         |
| Зовнішній вигляд | Поверхня чиста, з відбитками серветки.<br>Кірка відсутня. Незначна деформація головки. | Поверхня чиста, з відбитками серветки.<br>Кірка відсутня. |

А консистенція контрольного зразка була однорідна, не крихка, а дослідного – однорідна, пластична, в міру щільна. За іншими органолептичними показниками суттєвих розбіжностей не встановлено. Можна припустити, що насиченіший смак пов'язаний із залучення мікроорганізмів *L. lactis*, *Lb. plantarum*, *E. durans*, які в процесі своєї життєдіяльності і сформували кращі органолептичні характеристики сиру.

За результатами балової оцінки бринзи (рис. 3.4) більшу кількість балів отримав дослідний зразок. У порівнянні із контрольным зразком смак, запах та консистенція дослідного зразка була оцінена вище. Слід зазначити, що оцінювали сир у 95 балів, оскільки не враховували оцінювання пакування та маркування.

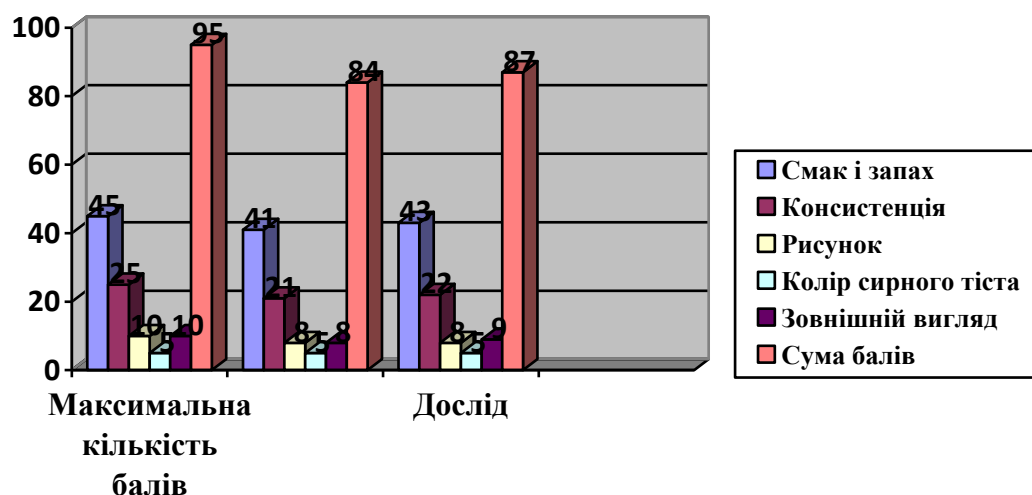


Рис. 3.4 Балова оцінка зрілої бринзи, виготовленої з коров'ячого молока

За фізико-хімічними показниками контрольні та дослідні зразки зрілої бринзи істотно не відрізнялися (рис. 3.5).

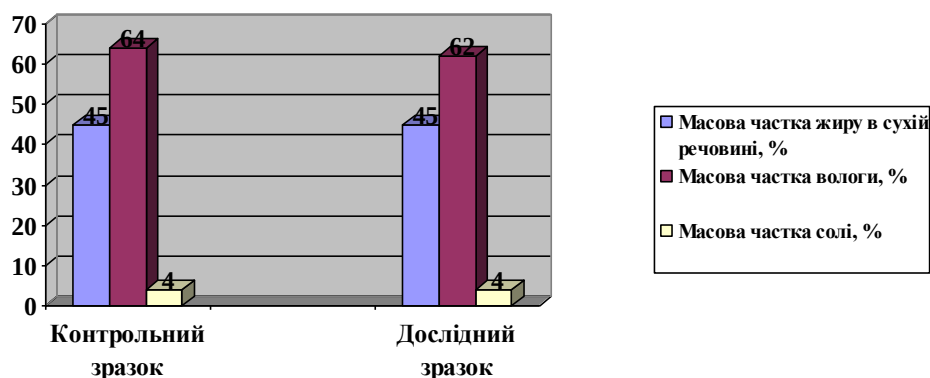


Рис. 3.5 Фізико-хімічні показники зрілої бринзи

Важливим є контроль за чисельністю молочнокислої мікрофлори під час визрівання сиру, оскільки від цього, як вже було зазначено, залежить перебіг біохімічних процесів і формування властивостей сиру. Встановили, що упродовж 20-ти добового терміну визрівання бринзи кількість молочнокислих бактерій була на досить високому рівні і коливалася в контрольному зразку від

$(6,6 \pm 0,28) \times 10^5$  до  $(2,5 \pm 0,23) \times 10^5$  КУО/г, а дослідному зразку – від  $(8,1 \pm 0,30) \times 10^5$  до  $(6,1 \pm 0,18) \times 10^5$  КУО/г (табл. 3.48).

Таблиця 3.48

**Кількість молочнокислих бактерій, КУО/г ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )**

| Зразки | Свіжий сир                   | 5 доба визрівання            | 10 доба визрівання           | 15 доба визрівання           | 20 доба визрівання           |
|--------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| К      | $(6,6 \pm 0,28) \times 10^5$ | $(5,8 \pm 0,15) \times 10^5$ | $(4,5 \pm 0,27) \times 10^5$ | $(3,8 \pm 0,26) \times 10^5$ | $(2,5 \pm 0,23) \times 10^5$ |
| Д      | $(8,1 \pm 0,30) \times 10^5$ | $(7,7 \pm 0,25) \times 10^5$ | $(7,5 \pm 0,27) \times 10^5$ | $(6,9 \pm 0,14) \times 10^5$ | $(6,1 \pm 0,18) \times 10^5$ |

Примітка: К – контрольний зразок, Д – дослідний зразок

Слід відзначити, що у дослідному зразку кількість молочнокислих бактерій була вищою.

У процесі виготовлення бринзи важливим є контроль чисельності мікрофлори сторонньої мікрофлори. Слід відзначити, що у процесі зберігання виготовлених зразків бринзи патогенної мікрофлори, зокрема мікроорганізмів роду *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, БГКП, плісневих та дріжджоподібних грибків не виявляли.

Отже, можна зробити висновок, що композиція МКБ (*L. lactis*, *Lb. plantarum*, *E. durans*) за технологічними характеристиками, зокрема, швидкістю накопичення біомаси, кислотоутворювальною здатністю та дослідженими раніше пробіотичними властивостями придатна для розробки заквашувального препарату «Ентероплан». Бринза, виготовлена із використання препарату «Ентероплан», порівняно із бринзою, виготовленою із препаратом RSF, має вираженіший, більш насичений, вершковий смак та аромат і кращу консистенцію, що пов'язано із залученням виділених із традиційної карпатської бринзи мікроорганізмів, які в процесі своєї життєдіяльності сформували кращі органолептичні характеристики сиру.

Крім того, під час процесу визрівання чисельність молочнокислої мікрофлори у зразку бринзи, виготовленому із заквашувальним препаратом «Ентероплан», була у 1,5-2 рази вищою порівняно з контрольним зразком.

Таким чином, заквашувальний препарат «Ентероплан» покращує органолептичні властивості виготовленої бринзи, а тому придатний до промислового використання.

### **Результати досліджень розділу 3.3. опубліковано в наукових працях:**

1. Властивості сформованих композицій пробіотичних штамів, виділених із карпатської бринзи / **І. І. Кушнір**, О. Й. Цісарик, І. М. Кушнір, І. С. Семен, І. М. Сливка, Л. Я. Мусій. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки*. 2020. Т. 22, № 93. С. 119–125. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9320>

2. **Кушнір І. І.**, Цісарик О. Й. Вплив розробленої композиції молочнокислих бактерій, виділених із карпатської бринзи, на організм лабораторних тварин. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки*. 2021. Т. 23, № 94. С. 9–15. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9402>

3. **Kushnir I. I.**, Tsisaryk O. Y. Antioxidant system of rats by the influence of composition of bacteria isolated from traditional carpathian cheese bryndza. *Poland, Colloquium-journal*. 2021. № 7 (94). P. 27–30. DOI: 10.24412/2520-6990-2021-794-27-29

4. Цісарик О. Й., **Кушнір І. І.** Вміст ліпідів печінки щурів за дії композиції молочнокислих бактерій, виділених із традиційної карпатської бринзи. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*. 2021. № 7. С. 167–173. DOI: <https://doi.org/10.31890/vttp.2021.07.26>

5. Технологія виготовлення бринзи з коров'ячого молока із застосуванням заквашувального препарату «Ентероплан» / **І. І. Кушнір**, О. Й. Цісарик, І. М. Кушнір, І. В. Скульська. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки*. 2022. Т. 24, № 96. С. 9–15. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9602>

6. **Кушнір І. І.**, Цісарик О. Й., Кушнір І. М., Сливка І. М., Гутий Б. В., Кушнір В. І., Семен І. С. Спосіб визначення штамів ентерококів для створення пробіотичної закваски. Пат. № 149039, Україна: МПК А23С 9/13 (2006.01), С12N 1/20 (2006/01) u2021 01868, заявл. 09.04.2021; опубл.13.10.2021. Бюл. № 41, 5 с.

7. Цісарик О. Й., **Кушнір І. І.** Препарат заквашувальний «Ентероплан». Технічні умови ТУ У 10.5–00492990–028:2021. 22 с.

### Висновки до розділу 3

Узагальнюючи результати досліджень, можна підсумувати, що досліджувані штами ентерококів проявляли різну антагоністичну активність щодо грам-негативних представників умовно-патогенної мікрофлори. При цьому із збільшенням температури культивування ентерококів зростала їх антагоністична активність. Так, найоптимальнішою температурою культивування була 37°C. За таких умов тільки штам *E. durans* SB18 проявив помірну антагоністичну активність до усіх досліджуваних грам негативних мікроорганізмів. Крім того, цей штам за сумісного культивування з умовно-патогенною мікрофлорою найвираженіше впливав на підвищення її чутливості до різних груп протимікробних препаратів.

Встановлено, що досліджувані штами ентерококів *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 є непатогенними та неінфекційними, не проявляють каталазну активність, не продукують лецитиназу, плазмокоагулазу та фібринолізин. За спільного культивування різних композицій консорціуму пробіотичних мікроорганізмів було встановлено, що всі композиції володіли помірною активністю щодо досліджуваних тест-культур патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів.

Встановлено, що з усіх досліджуваних штамів ентерококів, ізольованих із традиційної карпатської бринзи, *E. durans* SB18 проявив добрі ростові, кислотоутворювальні властивості, а також стійкість до низьких значень рН і

високих концентрацій кухонної солі і жовчі та здатність синтезувати біологічно активні речовини. Власне, це і послугувало аргументом для залучення його у склад консорціуму МКБ для конструювання пробіотичного заквашувального препарату. З цією метою використано перспективні для промисловості культури МКБ *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18, виділені з традиційної карпатської бринзи. Еспериментальними дослідженнями встановлено, що оптимальним для штамів *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18 було співвідношення 50:40:10.

Застосування МКБ у такому складі позитивно впливало на кровотворну функцію організму лабораторних тварин, центральні і периферичні органи імунної системи та на нормофлору кишечника лабораторних тварин. Застосування композиції МКБ посилювало антиоксидантну та дезінтоксикаційну здатність організму лабораторних тварин. Встановлено також позитивний вплив на гуморальні фактори захисту та на ліпідний склад тканини печінки. За технологічними характеристиками, зокрема, швидкістю накопичення біомаси, кислотоутворювальною здатністю, стійкістю до дії жовчних кислот та високих концентрацій кухонної солі, а також пробіотичними властивостями композиція придатна для розробки заквашувального препарату «Ентероплан». Бринза, виготовлена із використання препарату «Ентероплан», порівняно із бринзою, виготовленою із препаратом RSF, має вираженіший, більш насичений, вершковий смак та аромат і кращу консистенцію, що пов'язано із залученням виділених із традиційної карпатської бринзи мікроорганізмів, які в процесі своєї життєдіяльності сформували кращі органолептичні характеристики сиру.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

При проведенні дослідження з вивчення пробіотичних та технологічних властивостей молочнокислих бактерій, використали виділені з традиційної карпатської бринзи штами *L. lactis*, *Lb. plantarum* та *E. durans*. При цьому головна увага була зосереджена на представнику ентерококів, тому що їх використання у складі пробіотичних препаратів чи заквасок на сьогодні є дискусійним, оскільки вони, будучи представниками нормофлори людини та тварин, одночасно можуть бути і потенційними патогенами [99, 100], а також викликати псування харчових продуктів.

Тому при створенні пробіотичних препаратів, для об'єктивної оцінки ентерококів, є гостра необхідність поглибленого їх вивчення [97]. Як відомо штами, призначені для використання у якості пробіотиків або бактеріальних заквасок, не повинні бути вірулентними [87].

При вивченні токсиколого-біологічних параметрів, виділених із традиційної карпатської бринзи ентерококів *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 встановили, що вони непатогенні, оскільки були неінфекційні та нетоксичні, тобто не спричиняли будь-яких клінічних симптомів і відхилень загального стану лабораторних тварин. Крім того, у досліджуваних штамів ентерококів відсутні ензими, що відносяться до факторів патогенності, зокрема, каталаза, лецитиназа, плазмокоагулаза та фібринолізин, що вказує на апатогенні властивості досліджуваних мікроорганізмів. При вивченні подразнювальної дії досліджуваних штамів ентерококів на шкіру тварин було встановлено, що застосування досліджуваних штамів не викликало появи місцевого почервоніння, припухлості, запалення, підвищення чутливості та набряку шкіри.

Вивчення гострої токсичності ентерококів дало підставу стверджувати про їх нетоксичність, оскільки внутрішньошлункове застосування не викликало ознак гострого отруєння, загибелі та захворювань лабораторних тварин. Необхідно відзначити, що і тривале (28-ми добове) застосування досліджуваних штамів також не викликало загибелі та захворювань дослідних тварин. Лабораторні тварини упродовж усього експерименту були активними, охоче поїдали корми, будь-яких змін у поведінці та зовнішньому вигляді тварин не було виявлено. При цьому відзначали тенденцію до зростання маси тіла тварин, зокрема, на 28-у добу експерименту у тварин дослідних груп, які отримували досліджувані штами (*E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20), маса тіла була вищою, відповідно, на 4,2, 4,6, 5,9 та 5,3% порівняно до показників величин тварин контрольної групи [364].

Науковці відзначають, що одним із критеріїв вірулентності ентерококів є їх стійкість до антибіотиків, а у випадку застосування резистентних ентерококів є ризик передачі стійкості патогенним бактеріям [109]. Саме тому велика увага була зосереджена на дослідженні резистентності ентерококів до антибіотиків, а також їх впливу на резистентність умовно- та патогенних бактерій. Було встановлено, що досліджувані штами були чутливими до широкого спектру антимікробних препаратів (макролідів, тетрациклінів, фторхінолонів, цефалоспоринів, нітрофуранів, хлорамфеніколів, глікопептидів, поліміканів, рифампіцинів), що характеризує їх як авірулентних [365]. Важливою перевагою пробіотиків, на відміну від антибіотиків, є те, що вони не викликають утворення стійкості до них бактерій [228]. При поглибленому вивченні цього питання встановили, що досліджувані штами ентерококів за сумісного культивування з умовно-патогенними мікроорганізмами здатні впливати на їх чутливість до антибіотиків. Так, сумісне культивування *S. aureus* з ентерококами спричиняло підвищення його чутливості до аміноглікозидів. Зокрема, чутливість стафілококу до гентаміцину зростала, за умови спільного культивування із штамами *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18, відповідно, на 8,0

( $p < 0,05$ ) та 13,1% ( $p < 0,01$ ). Принагідно слід зауважити, що спільне культивування стафілококу та кишкової палички лише із штамом *E. durans* SB18 вираженіше впливало на чутливість патогенів до різних груп протимікробних засобів.

У механізмі пробіотичної дії молочнокислих бактерій особливої уваги заслуговує антагоністична дія. Створене пробіотичними штамми антагоністичне середовище для патогенних мікроорганізмів блокує їх рецептори-зв'язування з клітинами організму внаслідок чого створюються умови для росту і розвитку корисних бактерій [367]. Необхідно зауважити, що антагоністична активність зумовлена продукуванням різних біологічно активних речовин [368]. При цьому штамми бактерій, що формують пробіотичний препарат, відбираються за здатністю продукувати різні біологічно активні речовини [369].

При вивченні антагоністичної дії супернатанту досліджуваних штамів ентерококів, які культивували упродовж 24 годин, встановили, що за температури 25°C антагоністична активність була виражена досить слабо. Лише два штамми *E. durans* SB18 та SB20 проявили помірну антагоністичну активність до тест-культур *P. mirabilis* та *E. aerogenes*. Із збільшенням терміну інкубування до 48 годин антагоністична активність ентерококів зростала, проте її вираженість було неоднорідною. За цих умов, необхідно зазначити, що здатність пригнічувати ріст грам позитивних мікроорганізмів, зокрема, *S. aureus* у всіх досліджуваних ентерококів за різних температурних режимів була невираженою. За температури 30°C упродовж 24 годин культивування спостерігали помірну активність усіх штамів ентерококів до *P. mirabilis* та *S. enteritidis*, а ріст *E. aerogenes* помірно пригнічувати три штамми ентерококів, окрім штаму *E. durans* SB20, який володів слабкою активністю. Усі штамми *E. durans* здатні помірно пригнічували ріст *E. coli*, а штам *E. faecium* слабо пригнічував ріст цього мікроорганізму.

Також слід зазначити, що на 48 годину культивування ентерококів за

температури 30°C встановлено помірну антагоністичну активність штамів *E. durans* SB6, SB18, SB20 та *E. faecium* SB12 до *P. mirabilis*, *E. aerogenes* та *E. coli*. Помірно пригнічували ріст *P. aeruginosa* усі штами *E. durans*, крім *E. faecium*, який не проявляв антагонізму. Антагоністична активність ентерококів зростала із збільшенням температури їх культивування. Зокрема, найоптимальнішою температурою культивування була 37°C. За таких умов штам *E. durans* SB18 проявив найбільш виражену антагоністичну активність до усіх досліджуваних грам негативних мікроорганізмів, у тому числі і до *P. aeruginosa*. Таку неоднорідність антагоністичних властивостей ентерококів до умовно патогенних залежно від штамової належності доведено й іншими авторами [370].

Як вже відзначали, головною характеристикою пробіотичного штаму є зданість синтезувати біологічно активні речовини, зокрема, амінокислоти, вітаміни та органічні кислоти. Крім того, необхідно відзначити, що основними властивостями функціональних кисломолочних продуктів є нормалізація кишкової мікрофлори, вплив на секреторну функцію травних залоз і перистальтику кишечника. Такі продукти пригнічують ріст патогенної, гнильної мікрофлори, стимулюючи ріст нормальної флори, покращують всмоктування кальцію, фосфору, магнію, заліза мають високу біологічну цінність, містять незамінні амінокислоти, а також вітаміни [275, 276].

Значення амінокислот для живого організму визначається їх унікальною роллю в побудові та проміжному синтезі основних структурних компонентів клітин (білків, нуклеїнових кислот, низькомолекулярних азот- і сірковмісних сполук) та реалізації через ці комплекси більшості функцій, які забезпечують взаємозв'язок різних систем із навколишнім середовищем [371].

Отримані дані з визначення амінокислот вказують на те, що досліджувані штами ентерококів у різних кількостях синтезували як замінні, так і незамінні амінокислоти. Було встановлено, що незамінну амінокислоту лізин у різних кількостях синтезували усі штами ентерококів. Однак, при культивуванні

штамів *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 її концентрація вірогідно підвищувалась, відповідно, на 15,6 та 10,4% ( $p < 0,05$ ) порівняно до контролю. Вірогідне підвищення незамінної амінокислоти гістидину на 20 та 53,3% ( $p < 0,05$ ) виявляли при культивуванні штамів *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18.

Незначне підвищення незамінних амінокислот лейцину+ізолейцину відбувалося при культивуванні *E. durans* SB6 та *E. faecium* SB12 та *E. durans* SB18. Також встановили вірогідне підвищення синтезу треоніну ентерококами *E. durans* SB6 та *E. durans* SB18, відповідно, на 33,3 та 39,6% ( $p < 0,05$ ). Замінну амінокислоту серин були здатні синтезувати штами *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20, при цьому її концентрація зростала, відповідно, на – 40,0 ( $p < 0,001$ ), 30,0 та 35,0% ( $p < 0,01$ ), а штами *E. durans* SB6, та *E. durans* SB18 синтезували гліцин, концентрація якого зростала, відповідно, на – 10, 2 та 16,2% ( $p < 0,01$ ). Характеризуючи функції виявлених амінокислот, слід зазначити, що лізин незамінна амінокислота, що входить до складу практично усіх білків і є необхідна для росту, відновлення тканин, виробництва антитіл, гормонів, ферментів, альбумінів. Ця амінокислота має протівірусну дію. Лейцин, ізолейцин і треонін впливають на процеси росту. За нестачі лейцину зменшується маса тіла, виникають зміни в нирках і щитоподібній залозі. Гліцин виконує роль природного гальмівного медіатора, що взаємодіє з гліцинергічними та ГАМК-рецепторами. Завдяки цим властивостям гліцин здатний захищати нейрони від надлишкового впливу катехоламінів, різке збільшення вмісту яких супроводжує стрес будь-якої генези [372].

З огляду на це використання амінокислот у структурі харчування набуває дедалі більшого значення, і дослідження у цьому напрямі виявляють нові функції амінокислот і їхній специфічний вплив на організм людини [373].

Не менш важливу роль відіграють вітаміни, які необхідні для метаболічних процесів в організмі. Зокрема, вітамін B5 регулює вуглеводний і білковий обміни в організмі та функцію підшлункової залози. Вітамін B3 відіграє важливу роль у білковому, вуглеводному і, особливо, у ліпідному

обміні, крім того бере участь у синтезі ацетилхоліну і стероїдних гормонів.

Досліджувані ентерококи синтезували вітаміни групи В у різних концентраціях. Зокрема, штам *E. durans* SB18 у невеликій кількості синтезував фолієву кислоту. Усі ентерококи найбільше синтезували вітамін В<sub>1</sub> його концентрація збільшувалась від 8,5 до 10,0 разів ( $p < 0,001$ ). Рибофлавін синтезували три штами ентерококів – *E. durans* SB6, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20, так концентрація вітаміну В<sub>2</sub> вірогідно зростала, відповідно, у – 4,1, 2,0 та 2,0 рази ( $p < 0,05$ ). Слід зауважити, що усі чотири штами ентерококів *E. durans*, SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 синтезували у значній кількості вітамін В<sub>3</sub>, зокрема, його концентрація вірогідно зростала, відповідно, у 1,5, 1,5 ( $p < 0,05$ ), 1,5 ( $p < 0,01$ ) та 1,6 ( $p < 0,001$ ) рази. При цьому три штами ентерококів *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 були здатні у великих кількостях синтезувати вітамін В<sub>5</sub>, так концентрація нікотинової кислоти зросла, відповідно, у 2,9 ( $p < 0,05$ ), 8,4 та 9,5 ( $p < 0,001$ ) рази.

Отже, синтезовані ентерококами вітаміни групи В хоча хімічно і відрізняються один від одного проте діють синергічно, що дозволяє підтримувати гомеостаз організму та відіграють головну роль в обмінних процесах, зокрема, виробленні енергії та утворенні еритроцитів [374].

Одним із важливих класів біологічно активних речовин, які регулюють численні процеси організму та виявляють антимікробну і протизапальну дію, є органічні кислоти. Вони є проміжними продуктами оксидації вуглеводів, жирів і білків, окрім того беруть участь у синтезі амінокислот, алкалоїдів, стероїдів [375]. Органічні кислоти проявляють широкий спектр біологічної дії на організм як людини, так і тварин і відіграють важливу роль у підтриманні імунного статусу організму [376, 376]. Необхідно відзначити, що продукування органічних кислот антагоністично активними мікроорганізмами відіграє значну роль у забезпеченні колонізаційної резистентності біотопу. При цьому, органічні кислоти, зокрема, молочна кислота не тільки знижує рН середовища, внаслідок чого пригнічується ріст патогенів, але й спричиняє пермеабілізацію

зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій та позбавляє мікроорганізми необхідних факторів росту і специфічно впливає на експресію ключових факторів вірулентності збудника [120].

Результати досліджень з визначення вмісту органічних кислот вказують на те, що лише штам *E. durans* SB18 був здатний до синтезу молочної кислоти, зокрема, її концентрація вірогідно зросла у 2,6 рази ( $p < 0,05$ ).

Поряд з цим, тенденцію до підвищення концентрації оцтової кислоти спостерігали при культивуванні *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20. Вірогідне підвищення у 2,7, 2,6, 2,4 та 2,6 рази ( $p < 0,05$ ) концентрації пропіонової кислоти виявили в усіх досліджуваних штамів ентерококів *E. durans*, SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20.

Синтез оцтової і пропіонової кислоти матиме вплив на формування смако-ароматичних властивостей продуктів. Підвищення концентрації молочної кислоти спричинює зниження рН середовища та збільшення антагоністичної активності молочнокислих бактерій, власне чим і пояснюється антагоністичні властивості досліджуваних нами ентерококів [121].

Аналіз результатів досліджень з визначенню вмісту катіонів (Амонію, Калію, Натрію, Магнію, Кальцію) у супернатанті ентерококів показав, що лише Кальцій був наявний у значних кількостях. Зокрема, встановили вірогідне підвищення у 1,8, 2,4, 1,6 та 1,4 рази ( $p < 0,05$ ) вмісту Кальцію у супернатанті, де культивували, відповідно, штамми *E. durans*, SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20. Щодо інших макроелементів істотних відмінностей порівняно з контролем не виявили.

Отже, виділені з традиційної карпатської бринзи штамми ентерококів *E. durans*, SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 проявляли пробіотичні властивості, зокрема, були антагоністично активними до умовно-патогенних мікроорганізмів, синтезували біологічно активні речовини, при цьому найактивнішим був штам *E. durans* SB18.

Окрім пробіотичних властивостей штамми повинні характеризуватися

відповідними технологічними характеристиками від яких залежать органолептичні, функціональні та споживчі властивості готового продукту. З даних наукової літератури відомо, що ентерококи володіють високотехнологічними властивостями, зокрема, здатністю росту за низьких значень рН середовища, стійкістю до високих температур тощо [378], а завдяки своїй високій ферментативній активності надають продуктам харчування особливих органолептичних властивостей [87]. Також оцінка пробіотиків ґрунтується на здатності штаму виживати в умовах шлунково-кишкового тракту – низькому рівні рН середовища, високої концентрації жовчі [206].

При визначенні здатності досліджуваних штамів ентерококів до кислотоутворення встановили, що на 24 годину культивування за температури 25°C два штами *E. durans* SB20 та *E. durans* SB18 проявили найвищу здатність знижувати рН середовища. Зокрема, вони знижували рН середовища МРС, відповідно, на 24,5 та 24,4% ( $p < 0,001$ ) порівняно з контролем. Така сама тенденція зберігалася за температури 30°C, рН середовища знижувалось на 26,7 та 26,4% відповідно, а за температури культивування 37°C на – 29,9 та 30,3%.

Позитивну тенденцію до кислотоутворення ентерококів спостерігали і на 48 годину культивування за різних температурних режимів. При цьому необхідно відзначити, що два штами *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 проявили себе як добрі кислотоутворювачі, а температура 37°C була оптимальною.

Зниження кислотності середовища пов'язане із продукуванням органічних кислот антагоністично активними мікроорганізмами, що також забезпечує і колонізаційну резистентність біотопу [120].

Крім того, встановили, що досліджувані штами ентерококів володіли високими технологічними властивостями з огляду їх використання у виготовленні бринзи, оскільки виживали упродовж 21 доби у різних (3-6,5%) концентраціях Натрію хлориду.

При конструюванні пробіотичних препаратів до мікроорганізмів висуваються певні вимоги, зокрема, пробіотичні штами повинні бути

безпечними, проявляти антагоністичні властивості до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори, бути стійкими до дії кислоти шлункового соку, травних ферментів та жовчі, мати високу швидкість росту [211, 379, 380].

При визначенні здатності ентерококів рости у кислому, нейтральному та лужному значеннях рН живильного середовища встановили, що за значення рН 3 ріст досліджуваних штамів ентерококів не спостерігали, проте із збільшенням значення рН підвищувались ростові властивості ентерококів. Зокрема, за рН 4 лише два штами *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 були здатні виживати та проявляти добрі ростові властивості, а при значенні рН 5 усі чотири штами ентерококів проявляли добрі ростові властивості, проте штами *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 проявляли суттєвіший ріст порівняно з контролем. Зокрема, оптична густина цих середовищ збільшувалась у 9,8 та 10,8 рази ( $p < 0,001$ ) відповідно. Найкращими ростовими властивостями за показника рН 6 та 7 характеризувалися штами *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20, оскільки оптична густина середовища була вищою у 19,6, 18,2 та 20,5 20,1 рази ( $p < 0,001$ ), відповідно, порівняно до контролю. Дослідженнями доведено, що стійкість до низьких значень рН середовища є штамоспецифічною ознакою молочнокислих бактерій [152].

Необхідно відзначити, що в лужному середовищі при рН 8 та 9 усі досліджувані штами ентерококів також проявляли досить хороші ростові властивості. Однак, деякі автори встановили, що *E. faecalis*, вирощений у лужному середовищі, набував неправильної форми, а рН 11 є смертельним для ентерокока [381].

Клітинні мембрани мікроорганізмів є дуже чутливими до жовчних кислот, тому стійкість до жовчі є необхідною умовою для колонізації та метаболічної активності бактерій у кишечнику [122]. Жовчні кислоти знижують виживання бактерій, тому ефективність пробіотичних штамів, у значній мірі, залежить від їх стійкості до жовчі [123].

Отримані експериментальні дані вказують на те, що в умовах 20 та 40%

концентрації жовчі досліджувані штами ентерококів зберігали свою життєздатність та проявляли ростові властивості. Найвищий ріст за концентрації жовчі 20% проявляли два штами ентерококів – *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20, оптична густина середовища культивування цих штамів була вищою порівняно до контролю на 61,9 та 58,9% ( $p < 0,001$ ), відповідно. При підвищенні концентрації до 40% штам *E. durans* SB18 також проявив кращу здатність виживати в умовах високої концентрації жовчі.

Виявлена у ентерококів здатність виживати у екстремальних умовах корелюється із результатами здатності молочнокислих бактерій виживати при значеннях рН від 4,0 до 9,0, стійкості до 20- 40% концентрації жовчі, до 3% розчину гідроген хлориду, 5% натрію хлориду та 0,5% фенолу [152].

При виробництві кисломолочних продуктів велику роль відіграє кратність і відтворювання штаму [317]. Тому ми вивчали здатність ентерококів до накопичення біомаси за різних температурних режимів. Встановили, що на 24 годину культивування ентерококів за температури 25°C найвищу інтенсивність росту мали штами *E. durans* SB20 та *E. durans* SB18, при цьому оптична густина живильного середовища була в 17,6 та 17,5 разів вищою, ніж у контролі. Проте, на 48 годину культивування при цій температурі суттєві зміни оптичної густини спостерігали у штамів *E. durans* SB6 та *E. faecium* SB12. За температури культивування 37°C найвищу інтенсивність росту спостерігали при культивуванні штамів *E. durans* SB18 та *E. durans* SB6, де оптична густина була відповідно у 18,3 та 18,2 рази вищою у порівнянні із контрольним зразком.

Дослідженнями встановлено, що у продуктах харчування міститься консорціум МКБ, зокрема, ентерококи були основною частиною мікробіоти істрійського сиру [95], а у ферментованому верблюжому молоці більшість складали три роди: ентерокок, лактобактерія та лактокок, а серед ентерококів – штами *Enterococcus durans*; *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*. Власне тому, для промислового виробництва традиційних кисломолочних продуктів підбір місцевих штамів МКБ складав теоретичну основу для розробки

заквашувальних препаратів [96].

Для підвищення ефективності пробіотичних препаратів і формування специфічних властивостей готового продукту використовують багатовидові консорціуми бактерій, які повинні бути максимально спорідненими до біоценозу людини. Тому, для надання продукту функціональних властивостей нами було використано перспективні для промисловості культури молочнокислих бактерій *L. lactis*, *Lb. plantarum* та *E. durans* SB18, виділені з традиційної карпатської бринзи. Серед усіх досліджуваних ентерококів вибір впав саме на штам *E. durans* SB18, оскільки він проявив добрі ростові, кислотоутворювальні властивості, а також стійкість до низьких значень рН і високих концентрацій кухонної солі і жовчі та здатність синтезувати біологічно активні речовини. Основним представником заквашувальних композицій при виробництві кисломолочних продуктів прийнято вважати *L. lactis*, який характеризується активним кислотоутворенням. Молоко, сквашене *L. lactis*, має рівномірний, щільний згусток, добрий смак і приємний кисломолочний запах. *Lb. plantarum* відіграє надзвичайно важливу роль при визріванні сирів, оскільки може розмножуватися після зброджування лактози і рости за високих концентрацій кухонної солі. Завдяки синтезу бактеріоцинів цей штам здатний пригнічувати ріст маслянокислих бактерій та кишкової мікрофлори.

Для підтвердження можливості сумісного культивування відібраних штамів МКБ встановили, що вони не володіли міжвидовим антагонізмом. В подальшому необхідно було вибрати оптимальне співвідношення окремих штамів. Для цього створили п'ять різних композицій *L. lactis*, *Lb. plantarum*, *E. durans* SB18, у співвідношеннях: № 1 (50:25:25), № 2 (33:33:33), № 3 (50:40:10), № 4 (50:10:40) та № 5 (70:15:15).

Біологічна ефективність пробіотичних препаратів визначається не лише властивостями використаних штамів мікроорганізмів, а й технологією їх отримання, де головним і вкрай важливим є досягнення максимального виходу життєздатних клітин бактерій і синтезованих біологічно активних речовин

[382]. Для встановлення оптимального варіанту композиції дослідили інтенсивність накопичення біомаси, активність кислотоутворення та антагоністичні властивості до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори. При визначенні швидкості накопичення біомаси встановили, що за температури 32°C вища інтенсивність росту була при культивуванні композицій № 1, № 2 та № 5. За температури 37°C на 24 годину вищу зміну оптичної густини живильного середовища спостерігали при культивуванні композицій № 1, № 2 та № 3, зокрема, вона зростала, відповідно, у 17,9, 17,8 та 18,1 ( $p < 0,001$ ) рази порівняно з контролем.

При визначенні здатності різних композицій МКБ знижувати рН середовища встановили, що на 24 годину культивування за температури 32°C кращі кислотоутворювальні властивості проявили композиції № 3, № 4 та № 5, оскільки знижували рН, відповідно, на 32,8, 33,3 та 32,8%. За температури 37°C кращі кислотоутворювальні властивості проявили композиції № 1, № 3 та № 5.

Порівнюючи кислототворювальну здатність композицій за різних температур, встановили, що кращий її прояв для всіх композицій був за температури 32°C. При цій температурі досліджувані композиції проявляли помірну антагоністичну активність до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. При цьому, необхідно відзначити високу антагоністичну активність композиції № 3 до *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Enterobacter aerogenes*. За температури 37°C також встановили найвищу антагоністичну активність композиції № 3.

Враховуючи те, що композиція *L. lactis*, *Lb. plantarum* та *E. durans* SB18 у співвідношенні 50:40:10 є найоптимальнішою, у подальшому вивчили її вплив на морфологічні показники крові, мікрофлору кишечника, фактори неспецифічної резистентності, антиоксидантну систему, біохімічні показники сироватки крові білих щурів та вміст ліпідів у печінці.

Вплив пробіотиків є різносторонній, так окрім імуномодулювальної дії пробіотиків встановлено також і позитивний вплив на морфологічні показники

крові. Зокрема, при застосуванні пробіотиків на основі молочнокислих бактерій підвищувався вміст гемоглобіну, кількість еритроцитів та лейкоцитів у крові піддослідної птиці [383]. При визначенні морфологічних показників крові щурів за 14 добового застосування ми встановили, що композиція пробіотичних штамів молочнокислих бактерій позитивно впливала на кровотворну функцію організму лабораторних тварин. Так, встановлено вірогідне зростання концентрації гемоглобіну на 14,9% ( $p < 0,05$ ), кількості еритроцитів на 14,7% ( $p < 0,05$ ), кількості лейкоцитів на 22,5% ( $p < 0,05$ ) та величини гематокриту на 5,7% порівняно до величин контрольної групи. Крім того, було встановлено, що застосування препарату упродовж 14 діб викликало зростання середньої концентрації гемоглобіну в еритроциті (МСНС) на 9,8% ( $p < 0,05$ ) та тенденцію до зниження середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті (МСН) та середнього об'єму еритроцита (MCV), відповідно, – на 0,45 та 9,04%, порівняно до показників контрольної групи. При визначенні лейкограми периферичної крові щурів було встановлено, що застосування досліджуваного препарату в тварин дослідної групи викликало тенденцію до зростання кількості нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів, відповідно, на 6,0, 0,5 та 19,8% на тлі незначного зниження кількості еозинофілів.

Крім того, суттєвого впливу зазнавали як центральні, так і периферичні органи імунної системи. Зокрема, відносні вагові коефіцієнти маси тимуса та селезінки зросли, відповідно, на 21,1 ( $p < 0,05$ ) та 9,8% ( $p < 0,05$ ). Виявлені зміни можуть вказувати на самооновлення імунної системи та активування імунокомпетентних клітин, оскільки в тимусі проходять процеси проліферації клітин-попередників та їх диференціювання і дозрівання, а у селезінці – формування специфічної імунної відповіді. Також відзначали, що застосування досліджуваної композиції викликало зростання вагового коефіцієнту маси печінки на 18,1% ( $p < 0,05$ ) порівняно до величин контрольної групи, що очевидно може вказувати на підвищення білоксинтезувальної функції печінки. На 21 добу застосування композиції МКБ така тенденція зберігалася.

Отже, можна стверджувати, що молочнокислі бактерії сформованого консорціуму проявили позитивний вплив на організм щурів. Цей вплив базується на різносторонніх біологічних ефектах пробіотичних штамів, зокрема *Enterococcus durans* SB18, – нормалізації рН, здатності синтезувати біологічно активні речовини, як от вітаміни, органічні кислоти, амінокислоти, антагоністичній активності та здатності виживати в умовах низьких значень рН та високих концентрацій жовчі.

Застосування композиції молочнокислих бактерій позитивно впливало на нормофлору кишечника лабораторних тварин, зокрема, стимулювало збільшення лакто- та біфідобактерій вмістимого товстого відділу кишечника білих щурів, а також сприяло вірогідному зменшенню чисельності умовно-патогенної та гнильної мікрофлори. На це також вказують Родіонов В. П. із співавт., які встановили, що включення до раціону дітей кисломолочних продуктів активно коригує стан мікробіоценозу кишечника, внаслідок чого збільшується кількість лакто- та біфідобактерій та зменшується кількість умовно-патогенної мікрофлори за рахунок антагоністичного впливу молочнокислих бактерій [45].

Порушення рівноваги між ендогенною та патогенною мікрофлорою спричиняє функціональні розлади травної системи, що може бути причиною підвищення чутливості до стресу [384]. З огляду на це, дисбактеріоз і стресові стани взаємно підсилюють один одного, що в цілому спричинює порушення гомеостазу макроорганізму. При цьому, в організмі виникає надмірна імунореактивність, а у тканинах проходить активування ПОЛ та порушується функціональна взаємодія імунної та гіпоталамо-гіпофізарної систем [385, 386]. Підтверджено, що за умов дії стресу посилюються процеси ПОЛ в організмі [255].

Дослідженнями встановлено, що одним з механізмів дії пробіотиків є відновлення ними про- та антиоксидантної рівноваги. Дослідженнями встановлено ефективність застосування комбінованих пробіотиків у

профілактиці стресіндукованих уражень [251].

Враховуючи дані літератури щодо антиоксидантних властивостей пробіотиків [257], науковцями були проведені дослідження із встановлення їх впливу на процеси ліпопероксидації, зокрема, встановили зменшення концентрації ДК за 14-добового застосування суміші молочнокислих, а також спостерігали зниження вмісту ТБК-активних продуктів та активності каталази порівняно з контрольною групою щурів [387].

Застосування композиції МКБ упродовж усього періоду експерименту викликало інгібуючий вплив на інтенсивність процесів ПОЛ, що, у свою чергу, призводило до зниження вмісту ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів. Зокрема, на 14 добу застосування консорціуму МКБ вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів знижувався, відповідно, на 6,1 та 4,1%, а на 21 добу на – 14,9 та 22,1% ( $p < 0,01$ ). Оскільки пероксидне окиснення ліпідів є фізіологічним процесом і відображає ступінь впливу молекулярного кисню на мітохондріальні ліпіди в нормальних фізіологічних умовах і визначається здатністю регулювати структурно-функціональний стан мембран [388], виявлені зміни можуть вказувати на посилення антиоксидантних та дезінтоксикаційних властивостей молочнокислих бактерій.

Надзвичайно важливим ферментом антиоксидантного захисту організму є супероксиддисмутаза (СОД), яка є первинною лінією захисту від окисних пошкоджень і забезпечує переривання ланцюгів кисневозалежних вільно-радикальних реакцій [388].

При вивченні активності СОД встановлено, що застосування досліджуваної композиції молочнокислих мікроорганізмів упродовж 14 діб викликало її зростання на 6,3%, а на 21 добу експерименту цей показник був вірогідно вищим на 9,6% ( $p < 0,05$ ). Отже, зростання активності СОД може вказувати на активацію метаболічних процесів, зокрема, підвищеної потреби в  $O_2$ , і посиленням генерації активних форм оксигену.

Оцінку окисного ушкодження різних компонентів клітини здійснювали за

вмістом продуктів окисної модифікації протеїнів (ОМП). При цьому, слід відзначити, що показник ОМП є одним із ранніх та надійним індикатором ураження тканин, оскільки похідні ОМП є стабільними [388]. Саме тому вивчали вплив досліджуваної композиції МКБ на ОМП. Довготривале застосування консорціуму молочнокислих бактерій викликало незначне зниження ОМП<sub>430</sub> та ОМП<sub>370</sub>, що, ймовірно, може вказувати на інгібуючу дію досліджуваної композиції на процеси ОМП.

Сучасні дослідження показали, що вплив пробіотиків на макроорганізм складний та багатогранний. Так, молочнокислі бактерії підвищують захисні та посилюють бар'єрні властивості епітелію кишечника, проявляють імуномодулювальний ефект, зокрема, впливають на гуморальний і клітинний імунітет. Крім того, активують клітини Т-кілери, В-лімфоцити, печінкові, перитонеальні макрофаги та мононуклеарні фагоцити [389, 390]. При цьому імуномодулювальний ефект залежав від тривалості їх застосування. Зокрема, після семидобового застосування відзначали лише часткове збільшення кількості макрофагів та підвищення показників їх поглинальної активності, а значне зростання значень цих показників починалося з 14 доби і тривало до 21 доби [389].

Досліджувана композиції спричинювала підвищення факторів гуморального захисту та нормалізацію гомеостазу на що вказувало зростання ЛАСК крові на 14 добу на 0,8% та зниження рівня ЦІК на 4,9%, а на 21 добу експерименту ЛАСК зростала на 9,1%, а рівень ЦІК знижувався на 14%.

Оскільки маса тіла є одним із показників, що характеризує ризик розвитку метаболічного синдрому і пов'язаних з ним захворювань, ми дослідили масу тіла щурів і встановили, що у тварин дослідної групи спостерігалася тенденція до її незначного підвищення, що, очевидно, пов'язане із кращою конверсією корму у них за дії композиції молочнокислих бактерій.

Доведено позитивний вплив МКБ на обмін ліпідів при метаболічному синдромі, зокрема біфідобактерій [391], лактобактерій [392, 393],

термофільного стрептококу [394]. Однак, мало досліджень щодо такого впливу ентерококів [395, 396].

При визначенні вмісту загальних ліпідів у печінці на 14 добу застосування консорціуму МКБ, де одним із компонентів був *E. durans* SB 18, встановили, що у дослідній групі вони були незначно вищими і складали 2,9 проти 2,8 г/100 г сирової маси. За цих умов, встановлено міжгрупові відмінності щодо окремих класів. Так, у щурів, яким задавали композицію бактерій, відзначено вірогідно менший вміст неестерифікованого холестеролу у 1,4 рази, при цьому вміст естерифікованого холестеролу був вищий у 1,2 раза, порівняно з контрольною групою. Рівень загального холестеролу був дещо нижчим у складі ліпідів печінки тварин дослідної групи. Зниження рівня вільного холестеролу та підвищення його естерифікованої форми вказують на зниження вмісту холестеролу в складі мембран та зниження їх жорсткості. Головними жирними кислотами, які беруть участь у естерифікації холестеролу, є лінолева або олеїнова. Рівень фосфоліпідів у складі ліпідів проявив тенденцію до підвищення у щурів дослідної групи. Відомо, що фосфоліпіди становлять основу клітинних мембран, забезпечуючи їх пластичність. При зниженні синтезу фосфоліпідів швидкість виходу жирних кислот із печінки зменшується, що сприяє накопиченню жиру. Важливо підкреслити, що у тварин дослідної групи було меншим співвідношення неестерифікованого холестерол/фосфоліпіди, ніж у тварин контрольної групи.

Оскільки штам *E. durans*, що входить до складу композиції мав високу стійкість до жовчі, можна спрогнозувати, що мікробна композиція, крім впливу на метаболізм ліпідів у печінці, має вплив і на всмоктування холестеролу з кишківника.

На 21 добу експерименту варто відзначити тенденцію до зниження вмісту загальних ліпідів у тканині печінки щурів дослідної групи. Крім того, міжгрупові відмінності співвідношень класів ліпідів у печінці щурів були вираженішими. Встановлено менший вміст неестерифікованого холестеролу в

1,1 рази та більший – фосфоліпідів у печінці щурів, які отримували мікробіальну композицію – також у 1,1 раза. Варто відзначити, що у них вірогідно меншим було співвідношення між неестерифікованим холестерином і фосфоліпідами. Крім того, встановлено тенденцію до зменшення неестерифікованих жирних кислот і триацилгліцеролів у печінці щурів дослідної групи.

Необхідно відзначити, що жирні кислоти і триацилгліцероли можуть походити з чотирьох джерел, зокрема, з ліпогенезу *de novo*, запасів цитоплазматичних триацилгліцеролів, жирних кислот, отриманих з триацилгліцеролів залишків ліпопротеїнів, що безпосередньо поглинаються печінкою, та неестерифікованих жирних кислот плазми, звільнених в жировій тканині [397].

Неестерифіковані жирні кислоти забезпечують утворення триацилгліцеролів – головного фонду ліпопротеїнів дуже низької густини [398] і зниження синтезу та секреції холестерол-ліпопротеїнів високої щільності, що призводить до підвищення синтезу холестерол-ліпопротеїнів низької щільності і зниження секреції триацилгліцеролів з печінки та патологічних розладів ліпідного метаболізму [399]. Тому тенденція до зниження рівня неестерифікованих жирних кислот і триацилгліцеролів вказує на позитивний вплив на обмін ліпідів у печінці.

Традиційні молочні продукти, в тому числі й бринзу, виготовляють із сирого овечого молока непромисловим способом. Їх мікробна композиція формувалася упродовж багатьох століть [16, 400], вона відповідальна за надання специфічних органолептичних і фізико-хімічних властивостей молочним продуктам [21], в тому числі й бринзі [401, 402]. Також з-посеред представників мікрофлори природних біоценозів є культури, наділені функціональними властивостями [403-405].

Незважаючи на світову тенденцію залучення мікробіальних культур, виділених із природних еконіш, до заквашувальних препаратів, які

використовуються у молочній промисловості, в Україні, на жаль, вони не знаходять належного застосування. До винятків належать дослідження мікрофлори традиційної карпатської бринзи [406] та використання штамів молочнокислих бактерій, виділених з неї для формування заквашувальних препаратів для сиру [401], масла [404], йогурту «Карпатський» [405].

Нами було сформовано композицію бактеріальних культур для виробництва кисломолочних продуктів і сиру із залученням штамів *L. lactis ssp. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18, виділених із традиційної карпатської бринзи і встановлено оптимальне співвідношення між ними 50:40:10, відповідно. На основі цієї композиції МКБ розроблено заквашувальний препарат, який отримав назву «Ентероплан» [405].

Сьогодні зростає попит на розсольні сири, зокрема, й бринзу, оскільки вона є не тільки смачною, але ще й корисною, зокрема, було встановлено, що вона містить велику кількість білків із збалансованим складом амінокислот, ліпідів, вітамінів, мінеральних елементів [407, 408]. Тому удосконалення і розроблення нових технологій виробництва бринзи є важливим.

Обов'язковою технологічною операцією при виробництві бринзи у промислових умовах є пастеризація молока, яка забезпечує, насамперед, отримання безпечної для споживання людини продукції. При пастеризації знищується патогенна, умовно-патогенна мікрофлора і паралельно істотно знижується чисельність корисної мікрофлори молока, тому при промисловому виробництві необхідно додавати заквашувальний препарат. Саме від складу бактеріального препарату залежить формування органолептичних та фізико-хімічних показників готового продукту. Для зсідання молока ми використали розроблений нами пробіотичний препарат «Ентероплан» у порівнянні із препаратом RSF.

Бринза, виготовлена з використанням заквашувального препарату «Ентероплан» (*L. lactis*, *Lb. plantarum*, *E. durans*) порівняно із бринзою, виготовленою із препаратом RSF, має вираженіший, більш насичений,

вершковий смак та аромат і кращу консистенцію, що пов'язано із залучення виділених із традиційної карпатської бринзи мікроорганізмів, які в процесі своєї життєдіяльності сформували кращі органолептичні характеристики сиру. За результатами балової оцінки бринзи за смаком, запахом та консистенцією дослідний зразок отримав 87 балів, а контрольний – 84.

Під час процесу визрівання чисельність молочнокислої мікрофлори у дослідному зразку бринзи, виготовленому із заквашувальним препаратом «Ентероплан», була у 1,5-2 рази вищою порівняно з контрольним зразком. З огляду на це, заквашувальний препарат «Ентероплан» можна використовувати у технології бринзи у промислових умовах.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети та завдань, проведено дослідження із вивчення пробіотичних та технологічних властивостей молочнокислих бактерій, виділених з природних еконіш, та на їх основі розроблено заквашувальний препарат, призначений для виготовлення бринзи. На основі експериментально отриманих даних доведено ефективність препарату та науково обгрунтовано його застосування.

1. Встановлено, що виділені, із традиційної карпатської бринзи штами ентерококів *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20, проявляють пробіотичні властивості. Вони є антагоністично активними до умовно-патогенної мікрофлори, зокрема, *E. coli*, *S. enteritidis*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*. Штам *E. durans* SB18 проявив найбільш виражену антагоністичну активність до усіх досліджуваних грамнегативних мікроорганізмів. Ентерококи є біологічно безпечними з точки зору антибіотикорезистентності. При сумісному культивуванні ентерококів із *S. aureus* та *E. coli* встановлено позитивний їх вплив на чутливість до деяких антибіотиків, при цьому штам *E. durans* SB18 найбільшою мірою сприяв підвищенню чутливості.

2. Досліджувані штами ентерококів проявили здатність синтезувати незамінні амінокислоти, найбільшу їх кількість синтезував штам *E. durans* SB18, зокрема, лізину, третіоніну та лейцин+ізолейцину, концентрація яких була вищою, відповідно, на 10,3, 39,5 ( $p < 0,05$ ) та 5,8% порівняно з контролем. Усі штами ентерококів синтезували у великій кількості віт. В<sub>1</sub>, у невеликій – віт. В<sub>3</sub>. Віт В<sub>6</sub> у невеликій кількості синтезував лише штам SB18. Усі досліджувані штами продукували пропіонову кислоту, концентрація якої була в 2,4-2,7 рази вищою порівняно з контролем, у незначній кількості – оцтову кислоту, молочну

кислоту синтезував лише штам *E. durans* SB18.

3. Штами ентерококів є непатогенними та неінфекційними, не проявляють каталазну активність, не продукують лецитиназу, плазмокоагулазу та фібринолізин. Одноразове застосування штамів не викликало подразнюючої дії на слизові оболонки очей та шкіру, ознак інтоксикації, загибелі та захворювань лабораторних тварин не виявлено, що дає змогу віднести штами ентерококів до нешкідливих для макроорганізму.

4. Найвищу здатність знижувати кислотність середовища за температури 37°C проявили штами *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20, на 24 годину культивування рН середовища знижувалося на 29,9 та 30,3% ( $p < 0,001$ ), а на 48 годину – на 30,6 та 31,1% ( $p < 0,001$ ), відповідно. Найвищу інтенсивність росту за температури культивування 37°C спостерігали при культивуванні штамів *E. durans* SB18 та *E. durans* SB6. Досліджувані штами ентерококів здатні упродовж 21 доби виживати в умовах 3-6,5% концентрації Натрію хлориду.

5. За значення рН 4 два штами *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 були здатні виживати та проявляти ростові властивості. Ці штами проявили найкращі ростові властивості за рН 5 – оптична густина середовища при культивуванні штамів *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20 була вищою, відповідно, у 9,8 та 10,8 рази ( $p < 0,001$ ) порівняно з контролем. При культивуванні ентерококів у 20 і 40% концентрації жовчі найкращий ріст виявили у штамів *E. durans* SB18 та *E. durans* SB20. В умовах 40% концентрації жовчі оптична густина при культивуванні штамів *E. faecium* SB 12 та *E. durans* SB18 була вищою порівняно до контролю у 2,2 рази ( $p < 0,001$ ).

6. Розроблено композицію молочнокислих бактерій на основі штамів, виділених з традиційної карпатської бринзи *L. lactis* IMAU 32258, *Lb. plantarum* KLDS 1.0728 та *E. durans* SB18, які проявили високий ступінь біосумісності, та встановлено їх оптимальне співвідношення 50:40:10. Таке співвідношення штамів забезпечило добру кислотоутворювальну активність, високу інтенсивність накопичення біомаси та найбільш виражений прояв

антагоністичної активності до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори, зокрема до *S. aureus*.

7. Встановлено, що застосування розробленої композиції молочнокислих бактерій позитивно вплинуло на кровотворну функцію організму лабораторних тварин. На 14 добу експерименту вірогідно зросла концентрація гемоглобіну, кількість еритроцитів та лейкоцитів, відповідно, на 14,9 ( $p < 0,05$ ), 22,8 ( $p < 0,05$ ) та 4,5%, порівняно до величин контрольної групи. Молочнокислі бактерії сформованої композиції позитивно вплинули на центральні і периферичні органи імунної системи. Встановлено позитивну дію на мікрофлору кишечника лабораторних тварин. На 14 добу експерименту у вмістимому товстого відділу кишечника білих щурів вірогідно збільшилась кількість лакто- та біфідобактерії, відповідно, на 4,3 та 5,2% ( $p < 0,001$ ) та тлі вірогідного зниження кількості кишкової палички, золотистого стафілокока та грибів роду *Candida*, відповідно, на 4,7 ( $p < 0,01$ ), 2,6 ( $p < 0,05$ ) та 13,3% ( $p < 0,001$ ) порівняно з тваринами контрольної групи. Аналогічний вплив зберігався і на 21 добу експерименту.

8. Застосування розробленого препарату спричинило зниження вмісту продуктів ПОЛ, ТБК-активних продуктів, вмісту продуктів ОМП, що вказує на посилення антиоксидантних властивостей організму. Молочнокислі бактерії сформованої композиції позитивно вплинули на гуморальні фактори захисту організму лабораторних тварин, зокрема, на 21 добу їх застосування лізоцимна активність сироватки крові зросла на 9,1%. Встановлено позитивний вплив на ліпідний склад тканини печінки, на 21 добу експерименту вірогідно знизився рівень неестерифікованого холестеролу (на 10,2%). підвищився рівень фосфоліпідів (на 9,6%) і знизилось співвідношення між ними (0,72 проти 0,86).

9. Бринза, виготовлена із пробіотичним заквашувальним препаратом «Ентероплан» відзначається вираженішим та насиченішим вершковим смаком і ароматом та кращою консистенцією порівняно з бринзою, виготовленою із препаратом RSF, що пов'язано із залучення виділених із традиційної

карпатської бринзи мікроорганізмів, які в процесі своєї життєдіяльності сформували кращі органолептичні характеристики сиру.

## **РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОГО ВИРОБНИЦТВА**

1. Препарат «Ентероплан» рекомендовано використовувати у технології бринзи у промислових умовах. Для виготовлення бринзи рекомендуємо використовувати пробіотичний препарат «Ентероплан» в дозі інокуляції  $10^6$  КУО/см<sup>3</sup> сировини.

2. Теоретичні дані можуть бути використані в освітньому процесі та науково-дослідницькій роботі студентів спеціальності «Технології виробництва та переробки продукції тваринництва», «Харчові технології».

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Multi-Product lactic acid bacteria fermentations: A review / Jose Anibal Mora, Jessica Montero-Zamora, Natalia Barboza et al. *Fermentation*. 2020. Vol. 6. № 23. P. 1-21. DOI:10.3390/fermentation6010023.
2. Капрельянц Л. Функціональні продукти і нутрицевтики – сучасні підходи харчової науки. *Вісник Львівського університету. Серія: Біологічна*. 2016. № 73. С. 441.
3. Функціональні продукти харчування: перспективи в Україні / Л. В. Капрельянц, А. В. Єгорова, Л. В. Труфкаті, Л. Г. Пожіткова. *Харчова наука і технологія*. 2019. №13 (2). С. 15-23.
4. Рудавська Г. Б., Вежлівцева С. П., Бузіян М. І. Інноваційні інгредієнти для кондитерських виробів фізіологічно-функціонального призначення. *Молодий вчений*. 2018. № 5 (57). С. 396-399.
5. Баль-Прилипко Л. В., Леонова Б. И. Аналитический скрининг путей применения бактериальных препаратов в производстве мясных изделий. *Сетевой научно-практический журнал «Научный результат»*. Серия: *Технология бизнеса и сервиса*. 2015. № 3. С. 37-44.
6. Басюл О. В., Ямборко Г. В., Іваниця В. О. Вплив складу захисних середовищ на збереження життєздатності та біотехнологічні властивості ліофілізованих бактерій *Lactobacillus plantarum* ONU 315. *Вісник ОНУ. Біологія*. 2014. Т. 19. № 1 (34). С. 9-15. DOI: 10.18524/2077-1746.2014.1(34).39796.
7. Голуб Б. Передумови формування асортименту функціональних молочних продуктів. *Товари і ринки*. 2014. № 2. С. 17-23.
8. Страшнова І. В., Маяковська А. І., Басюл О. В. Створення і оцінка біотехнологічної цінності композицій лактобактерій. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2016. № 2 (34). С. 61-74. DOI: 10.18524/2307-

4663.2016.2(34).71793.

9. Ahmed W., Sidhu J. P. S., Toze S. Speciation and frequency of virulence genes of *Enterococcus* spp. isolated from rainwater tank samples in Southeast Queensland, Australia. *Environ. Sci. Technol.* 2012. Vol. 46. № 12. P. 6843-6850. DOI: 10.1021/es300595g.

10. Giorgio Giraffa. Functionality of enterococci in dairy products. *Inter. J. of Food Microbiol.* 2003. Vol. 88. № 2-3. P. 215-222. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00183-1.

11. The influence of probiotic *Enterococcus faecium* strain L5 on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics / E. Tarasova, E. Yermolenko, V. Donets et al. *Benef. Microbes.* 2010. Vol. 1 № 3. P. 265-270. DOI: 10.3920/BM2010.000.

12. Probiotic attributes of indigenous *Lactobacillus* spp. isolated from traditional fermented foods and beverages of north-western Himalayas using in vitro screening and principal component analysis / Anila Kumari, Kunzes Angmo, Monika, Tek Chang Bhalla. *J. of Food Sci. Technol.* 2016. Vol. 53. № 5. P. 2463-2475. DOI: 10.1007/s13197-016-2231-y.

13. Inhibitory influence of *Enterococcus faecium* on the propagation of swine influenza A virus in vitro / Zhenya Wang, Weidong Chai, Michael Burwinkel et al. *PLoS ONE.* 2013. 8 (1). e53043. DOI: 10.1371/journal.pone.0053043.

14. Mongkol Thirabunyanon, Penrat Hongwittayakorn. Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013. Vol. 169. № 2. P. 511-525. DOI: 10.1007/s12010-012-9995-y.

15. Immunostimulatory effects triggered by *Enterococcus faecalis* CECT7121 probiotic strain involve activation of dendritic cells and interferon-gamma production / M. A. Molina, A. M. Diaz, C. Hesse et al. *PLoS ONE.* 2015. 10 (5). e0127262. DOI: 10.1371/journal.pone.0127262.

16. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from croatian fresh soft cheese and Serbian white pickled cheese / Ksenija Uroic, Milica Nikolic, Blazenka Kos et al. *J. of Food Technol. and Biotechnol.* 2014. Vol. 52. № 2. P. 232-241.
17. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* LCW 44: A high potential probiotic candidate from raw camel milk / A. Vimont, B. Fernandez, R. Hammami et al. *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8. 865. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00865.
18. Шендеров Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 3. Пробиотики и функциональное питание. М.: ГРАНТЪ, 2001. 288с.
19. Широбоков В. П., Янковський Д. С, Димент Г. С. Мікробна екологія людини з кольоровим атласом. К.: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2008. 312 с.
20. Янковский Д. С., Моисеенко Р. А., Дымент Г. С. Особенности отечественных мультипробиотиков. *Современная педиатрия*. 2009. № 3 (25). С. 79-86.
21. Bacterial microbiota compositions of naturally fermented milk are shaped by both geographic origin and sample type / Z. Zhong, Q. Hou, L. Kwok et al. *J. of Dairy Sci.* 2016. Vol. 99. № 10. P. 7832-7841. DOI: 10.3168/jds.2015-10825.
22. Strains of lactic acid bacteria isolated from traditional Carpathian cheese / I. M. Slyvka, O. Y. Tsisaryk, G. V. Dronyk, L. Y. Musiy. *Regul. Mech. in Biosyst* 2018. Vol. 9. № 1. P. 62-68. DOI: 10.15421/021808.
23. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties / Daniel M. F. Amaral, Luana F. Silva, Sabrina N. Casarotti et al. *J. of Dairy Sci.* 2017. Vol. 100. № 2. P. 933-949. DOI: 10.3168/jds.2016-11513.
24. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties / R. C. Reuben, P. C. Roy, S. L. Sarkar et al. *J. of Dairy Sci.* 2020. Vol. 103. № 2. P. 1223-1237. DOI: 10.3168/jds.2019-17092.
25. Human genetics shape the gut microbiome / Julia. K. Goodrich, Jillian L. Waters, Angela C. Poole et al. *Cell*. 2014. Vol. 159. №4. P 789-799.

DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.053.

26. Metagenomics and development of the gut microbiota in infants / Y. Valles, M. J. Gosalbes, L. E. De Vries et al. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012. Vol. 18. № 4. P. 21-26. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03876.x.

27. Андрух В. С. Мікробіота. Людина. Дисбактеріоз. Бактеріальні пробіотики. Правда та міфи. *Медицинские аспекты здоровья мужчины*. 2013. № 3 (9). С. 65-69.

28. Бережний В. В., Козачук В. Г. Нові можливості використання мультиштамових синбіотиків у педіатричній практиці. *Современная педиатрия*. 2016. № 1. С. 33-39.

29. Guandalini S., Cernat E., Moscoso D. Prebiotics and probiotics in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in children. *Benef. Microbes*. 2015. Vol. 6. № 2. P. 209-217. DOI: 10.3920/BM2014.0067.

30. David W. Victor 3rd, Eamonn M. M. Quigley. The microbiome and the liver: The basics. *Semin. in Liver Disease*. 2016. Vol. 36. № 4. P. 299-305. DOI: 10.1055/s-0036-1593879.

31. Role of the microbiome in human development / Maria Gloria Dominguez-Bello, Filipa Godoy-Vitorino, Rob Knight, Martin J. Blaser. *J. Recent advances in basic science. Gut*. 2019. Vol. 68. № 6. P. 1108-1114. DOI:10.1136/gutjnl-2018-317503.

32. Marcus J. Claesson, Adam G. Clooney, Paul W. O'Toole. A clinician's guide to microbiome analysis. *Nat. Rev. Gastroenter. Hepatol.* 2017. Vol. 14. № 10. P. 585-595. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.97.

33. Ryoji Ito, Takeshi Takahashi, Mamuro Ito. Humanized mouse models: Application to human diseases. *J. of Cell Physiol.* 2018. Vol. 233. № 5. 3723-3728. DOI: 10.1002/jcp.26045.

34. Atanu Adak, Mojibur R. Khan. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell. and Mol. Life Sci.* 2019. Vol. 76. № 3. P. 473-493. DOI: 10.1007/s00018-018-2943-4.

35. Tayfun Uzbay. Germ-free animal experiments in the gut microbiota studies. *Curr. Opin. in Pharmacol.* 2019. Vol. 49. P. 6-10. DOI: 10.1016/j.coph.2019.03.016.
36. Timothi G. Dinan, John F. Cryan. The microbiome gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterol. Clin. of Nort Amer.* 2017. Vol. 46. № 1. P. 77-89. DOI: 10.1016/j.gtc.2016.09.007.
37. Population level analysis of gut microbiome variation / Gwen Falony, Marie Joossens, Sara Vieira-Silva et al. *Science*. 2016. Vol. 352. № 6285. P. 560-564. DOI: 10.1126/science.aad3503.
38. Maryam Tidjani Alou, Jean-Christophe Lagier, Didier Raoult. Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. *Human Microbiome J.* 2016. Vol. 1. P. 3-11. DOI:10.1016/j.humic.2016.09.001.
39. Na Zhang, Zhongjie Ju, Tao Zuo. Time for food: The impact of diet on gut microbiota and human health. *Nutrition*. 2018. Vol. 51-52. P. 80-85. DOI: 10.1016/j.nut.2017.12.005.
40. Small intestinal microbial dysbiosis underlies symptoms associated with functional gastrointestinal disorders / George B. Saffouri, Robin R. Shields-Cutler, Jun Chen et al. *Nature Commuic.* 2019. Vol. 10. № 1. P. 1-11. DOI:10.1038/s41467-019-09964-7.
41. Edward C. Deehan, Jens Walter. The fiber gap and the disappearing gut microbiome: Implications for human nutrition. *Trends in Endocrinol. & Metabol.* 2016. Vol. 27. № 5. P. 239-242. DOI: 10.1016/j.tem.2016.03.001.
42. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity / Siohan F. Clarke, Eileen F. Murphy, Orla O'Sullivan et al. *Gut*. 2014. Vol. 63. № 12. P. 1913-1920. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-306541.
43. Linking longterm dietary patterns with gut microbial enterotypes / Gary D. Wu, Jun Chen, Christian Hoffmann et al. *Science*. 2011. Vol. 334 № 6052. P. 105-108. DOI: 10.1126/science.1208344.
44. Традиційна їжа: концепція, біологічно активні компоненти, їх потенційний вплив на здоров'я людини / М. Р Мудрик, Т. М Сакалош,

Л. М. Бугина та ін. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія: Медицина*. 2009. Вип. 37. С. 113-119.

45. Вплив кисломолочної продукції на мікробіоценоз та місцевий імунітет кишечника у дітей раннього віку: результати дослідження / І. М. Матвієнко, Л. В. Квашніна, В. П. Родіонов, О. М. Кравченко. *Перинатология и педиатрия*. 2014. № 1 (57). С. 43-50.

46. New aspects the regulation of immune response through balance Th1/Th2 cytokines / N. O. Tymoshok, L. M. Lazarenko, R. V. Bubnov et al. *The EPMA J*. 2014. Vol. 5. № 1: A134. DOI: 10.1186/1878-5085-5-S1-A134.

47. The role of beneficial bacteria wall elasticity in regulating innate immune response / V. V. Mokrozub, L. M. Lazarenko, L. V. Sichel et al. *The EPMA J*. 2015. Vol. 6. № 13. P. 1-15. DOI: 10.1186/s13167-015-0035-1.

48. The role of the gut microbiota in nutrition and health / Harry J. Flint, Karen P. Scott, Petra Louis, Sylvia H. Duncan. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2012. Vol. 9. № 10. P. 577-589. DOI: 10.1038/nrgastro.2012.156.

49. Volker Mai, Peter V. Draganov. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World J. of Gastroenterol*. 2009. Vol. 15. № 1. P. 81-85. DOI: 10.3748/wjg.15.81.

50. W. Allan Walker. Bacterial colonization of the newborn gut, immune development, and prevention of disease. *Ser. Nestec Ltd. Vevey. S. Karger AG Basel*. 2017. Vol. 88. P. 23-33. DOI: 10.1159/000455210.

51. Lack of detection of a human placenta microbiome in samples from preterm and term deliveries / Jacob S. Leiby, Kevin McCormick, Scott Sherrill-Mix et al. *Microbiome*. 2018. Vol. 6. № 1. P. 196. DOI: 10.1186/s40168-018-0575-4.

52. Paediatrician's perspective of infant gut microbiome research: current status and challenges / Paul M. Ryan, Catherine Stanton, R. Paul Ross et al. *Arch. of Dis. in Child*. 2019. Vol. 104. № 7. P. 701-705. DOI: 10.1136/archdischild-2019-316891.

53. Intestinal microbiota in early life and its implications on childhood health /

Lu Zhuang, Haihua Chen, Sheng Zhang et al. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 2019. Vol. 17 № 1. P. 13-25. DOI: 10.1016/j.gpb.2018.10.002.

54. Programming bugs: Microbiota and the developmental origins of brain health and disease / Martin G. Codagnone, Simon Spichak, Siobhain M. O'Mahony et al. *Biolog. Psychiatry*. 2019. Vol. 85. № 2. P. 150-163. DOI: 10.1016/j.biopsych.2018.06.014.

55. Michael T. Bailey, Harald Engler, John F. Sheridan. Stress induces the translocation of cutaneous and gastrointestinal microflora to secondary lymphoid organs of C57BL/6 mice. *J. of Neuroimmunology*. 2006. Vol. 171. № 1-2. P. 29-37. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2005.09.008.

56. Amine neuromediators, their precursors and oxidation products in biomass and culture of *Escherichia coli* K-12 / V. A. Shishov, T. A. Kirovskaya, V. S. Kudrin, A. V. Oleskin. *Appl. biochemistry and microbiology*. 2009. Vol. 45. № 45. P. 494-497. DOI:10.1134/S0003683809050068.

57. Effect of a multispecies probiotic supplement on quantity of irritable bowel syndrome related intestinal microbial phylotypes / A. Lyra, L. Krogius-Kurikka, J. Nikkilä et al. *BMC Gastroenterol*. 2010. Vol. 10. P. 110. DOI: 10.1186/1471-230X-10-110.

58. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases / F. Karlsson, V. Tremaroli, J. Nielsen, F. Backhed. *Diabetes*. 2013. Vol. 62. № 10. P. 3341-3349. DOI: 10.2337/db13-0844.

59. Ohman L., Simren M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat. Rev. Gastroenterol. & Hepatol*. 2010. Vol. 7. № 3. P. 163-173. DOI: 10.1038/nrgastro.2010.4.

60. Макаренко О. М., Петров П. І., Лугіна С. В. Сучасний погляд на проблему профілактики та лікування дисбактеріозу. *Вісник ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія»*. 2016. Т. 16. Вип. 2 (54). С. 294-300.

61. Quigley E. M. M. Microflora modulation of motility. *J. of Neurogastroenterol. and Motil*. 2011. Vol. 17. № 2. P. 140-147. DOI:

10.5056/jnm.2011.17.2.140.

62. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment / X. C Morgan, T. L. Tickle, H. Sokol et al. *Genome Biol.* 2012. Vol. 13. № 9. R. 79. DOI: 10.1186/gb-2012-13-9-r79.

63. The human microbiome and obesity: Moving beyond associations / P. Maruvada, V. Leone, L. M. Kaplan, E. B. Chang. *Cell Host & Microbe.* 2017. Vol. 22. № 5. P. 589-599. DOI: 10.1016/j.chom.2017.10.005.

64. Association of metabolic syndrome with knee and hand osteoarthritis: A community-based study of women / M. T. Sanchez-Santos, A. Judge, M. Gulati et al. *Semin. in Arthritis and Rheumatism.* 2019. Vol. 48. № 5. P. 791-798. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2018.07.007.

65. Courties A., Sellam J., Berenbaum F. Metabolic syndrome associated osteoarthritis. *Curr. Opin. in Rheumatol.* 2017. Vol. 29. № 2. P. 214-222. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000373.

66. Гульнева М. Ю., Носков С. М., Малафеева Э. В. Микробиоценоз кишечника при сочетании ожирения и остеоартрита. *Проблемы эндокринологии.* 2012. № 3. С. 12-15.

67. Maeda Y., Takeda K. Role of gut microbiota in rheumatoid arthritis. *J. of Clinic. Medic.* 2017. Vol. 6. № 60. P. 1-7.

68. Targeting the gut microbiome to treat the osteoarthritis of obesity / Eric M. Schott, Christopher W. Farnsworth, Alex Grier et al. *JCI Insight.* 2018. Vol. 3. № 8. e95997. DOI: 10.1172/jci.insight.95997.

69. Hernandez C. J. The microbiome and bone and joint disease. *Cur. Rheumatol Rep.* 2018. Vol. 19. № 12. P. 77. DOI: 10.1007/s11926-017-0705-1.

70. Both systemic and local lipopolysaccharide (LPS) burden are associated with knee OA severity and inflammation / Z. Y. Huang, T. Stabler, F. X. Pei, V. B. Kraus. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016. Vol. 24. № 10. P. 1769-1775.

71. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea: meta-analysis / A. L. D'Souza, C. Rajkumar, J. Cooce, C. J. Bulpitt. *BMJ.* 2002. № 8. P. 324.

72. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems / M. Ferri, E. Ranucci, P. Romagnoli, V. Giaccone. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.* 2017. Vol. 57. № 13. P. 2857-2876. DOI: 10.1080/10408398.2015.1077192.

73. Кишковий мікробіом й остеоартрит / О. Ю. Губська, А. А. Кузьмінець, В. М. Гуцул, І. О. Лавренчук. *Гастроентерологія*. 2019. Т. 53. № 2. С. 132-137.

74. Алешукина А. В. Патогенез дисбактериоза кишечника. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2012. № 3. С. 74-78.

75. Гаморак Г. П. Ефективність лактобактерину для відновлення порушеного якісного і кількісного складу мікрофлори товстої кишки білих щурів, які зазнали 20-денної аплікації на шкіру ітаконової кислоти, та профілактика порушень мікробіоценозу за умов дії ітаконової кислоти. *Буковинський медичний вісник*. 2015. Т. 19. № 4. С. 51-58. DOI: 10.24061/2413-0737.XIX.4.76.2015.210.

76. Bergey`s manual of systematic bacteriology / D. R. Boone, R. W. Gastenhdz, M. George et all. *New York: Springer-Verlag*. 2001. P. 56-59.

77. Сабельникова Е. А. Клинические аспекты дисбактериоза кишечника. *Экспериментальная и клиническая гастроентерология*. 2011. № 3. С. 111-116.

78. Dobler G., Braveny I. Recent taxonomic changes and update of nomenclature for bacteria identified in clinical material. *Eur. J. of Clin. Microbiol. Infect. Di.* 2003. Vol. 22. № 11. P. 643-646. DOI: 10.1007/s10096-003-1017-0.

79. Яковенко Э. П., Лаврентьева С. А., Яковенко А. В. Инновационные пробиотики – ключ к управлению функциями нормальной кишечной микрофлоры. *Лечащий Врач*. 2012. № 7. С. 30-32.

80. Vincent B. Young The intestinal microbiota in health and disease. *Curr. Opin. in Gastroenterol.* 2012. Vol. 28. № 1. P. 63-69. DOI: 10.1097/MOG.0b013e32834d61e9.

81. Сучасний стан розробки та застосування пробіотичних, пребіотичних та синбіотичних препаратів / С. В. Калініченко, Є. М. Бабич, Т. А. Рижкова та ін. *Аннали Мечниковського інституту*. 2013. № 3. С. 5-12.

82. Кордон Т. І. Принципи створення, механізм дії та клінічне застосування пробіотиків (огляд). *Аннали Мечниковського інституту*. 2014. № 4. С. 8-16.

83. The aging gut microbiota: new perspectives / E. Biagi, M. Candela, C. Franceschi, P. Brigidi. *Ageing Research Reviews*. 2011. Vol. 10. № 4. P. 428-429. DOI: 10.1016/j.arr.2011.03.004.

84. Giraffa G., Carminati D., Neviani E. Enterococci isolated from dairy products: A review of risks and potential Technological Use. *J. of Food Protection*. 1997. Vol. 60. № 6. P. 732-738. DOI: 10.4315/0362-028X-60.6.732.

85. Суворов А. Н., Захаренко С. М., Алехина Г. Г. Энтерококки как пробиотики выбора. *Клиническое питание*. 2003. № 1. С. 26-29.

86. Результати дослідження генерації електричного струму ряду мікробіологічних об'єктів / І. Я. Коцюмбас, І. М. Кушнір, О. І. Білий та ін. 8<sup>ма</sup> Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8) (з виставкою розробок та промислових зразків сенсорів), (м. Одеса, 28 травня – 1 червня, 2018 р.). Одеса, 2018. С. 50.

87. Enterococci in foods a - conundrum for food safety / Charles M.A.P. Franz, Michael E. Stiles, K. H. Schleifer, Wilhelm H. Holzapfel. *Inter. J. of Food Microbiology*. 2003. Vol. 88 № 2-3. P. 105-122. DOI:10.1016/s0168-1605(03)00174-0.

88. Штамм лактобактерий *Enterococcus durans* – продуцент молочной кислоты и антибиотических веществ: пат. 2 603 087 С1 Рос. Федерация: С12N 1/20, А61К 35/744, С12R 1/01 / Цугкиев Б. Г., Рамонова Э. В., Мкртычан М. В., Гадзаонов Р. Х., Дзасохов Ч. Б. – № 2015130677/10; заявл. 23.07.2015; опубл. 20.11.2016, Бюл. № 32. 4 с.

89. Штамм *Enterococcus durans* ВКПМ В-873, используемый для производства кисломолочных продуктов и пробиотических препаратов: пат. 2012 102 851 А Рос. Федерация: С12N 1/20 / Цугкиев Б. Г., Кабисов Р. Г., Петрукович А. Г., Нагорная В. Г. – № 2012102851/10; заявл. 27.01.2012; опубл.

10.08.2013, Бюл. № 22. 1 с.

90. Штамм *Enterococcus durans* ВКПМВ-11172, используемый для производства кисломолочных продуктов: пат. 2 588 475 Рос. Федерация: С12N 1/20, 2461620 С1 / Цугкиев Б. Г., Олисаев С. В., Дзасохов Ч. Б. – № 2014152726; заявл. 24.12.2014; опубл. 27.06.2016, Бюл. № 18. 4 с.

91. Штамм *Enterococcus durans*, используемый для производства кисломолочных напитков: пат. 2 461 620 Рос. Федерация RU: С12N 1/20, А61К 35/74, С12R 1/01 / Цугкиев Б. Г., Рамонова Э. В., Цугкиева И. Б., Соловьева Ю., Хозиев А. М., Кабисов Р. Г., Петрукович А. Г., Шевченко Е. И. – заявл. 2018139696; опубл. 06.11.2019, Бюл. № 31 (73).

92. Study of lactic acid bacteria community from raw milk of Iranian one humped camel and evaluation of their probiotic properties / N. Davati, F. T. Yazdi, S. Zibaee, F. Shahidi et al. *Jundishapur J. of Microbiology*. 2015. Vol. 8. № 5. e16750. DOI: 10.5812/jjm.8(5)2015.16750.

93. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco / K. Khedid, M. Faïd, A. Mokhtari et al. *Microbiol. Research*. 2009. Vol. 164. № 1. P. 81-91. DOI: 10.1016/j.micres.2006.10.008.

94. Microbiological quality assessment of Moroccan camel's milk and identification of predominating lactic acid bacteria / N. Benkerroum, A. Boughdadi, N. Bennani, K. Hidane. *World J. of Microbiol. and Biotechnol.* 2003. Vol. 19. № 6. P. 645-648.

95. Characterization of enterococcal community isolated from an artisan istrian raw milk cheese: Biotechnological and safety aspects / M. M. Fuka, Z. A. Maksimovic, I. Tanuwidjaja et al. *Food Technol. & Biotechnol.* 2017. Vol. 55. № 3. P. 368-380. DOI: 10.17113/ftb.55.03.17.5118.

96. Microflora identification of fresh and fermented camel milk from Kazakhstan / S. Akhmetsadykova, A. Baubekova, G. Konuspayeva et al. *Emirates J. of Food and Agric.* 2014. Vol. 26. № 4. P. 327-332. DOI: 10.9755/ejfa.v26i4.17641.

97. Arizcun C., Barcina Y., Torre P. Identification and characterization of

proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *Inter. J. of Food Microbiol.* 1997. Vol. 38. № 1. P. 17-24. DOI: 10.1016/s0168-1605(97)00091-3.

98. Franz C. M., Holzapfel W. H., Stiles M. E. Enterococci at the crossroads of food safety. *Inter. J. of Food Microbiol.* 1999. Vol. 47. № 1 (1-2). P. 1-24. DOI: 10.1016/s0168-1605(99)00007-0.

99. Wide distribution of virulence genes among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates / S. Soheili, S. Ghafourian, Z. Sekawi et al. *The Scientific World J.* 2014. 623174. 6 p. DOI: 10.1155/2014/623174.

100. Grace J. Yuen, Frederick M. Ausubel. Enterococcus infection biology: Lessons from invertebrate host models. *The J. of Microbiol.* 2014. Vol. 52. № 3. P. 200-210. DOI: 10.1007/s12275-014-4011-6.

101. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков / О. В. Бухарин, И. В. Вальшева, О. Л. Карташова, М. В. Сычёва. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2013. № 3. С. 12-18.

102. Fuqua W. C., Winans S. C., Greenberg E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *J. of Bacteriol.* 1994. Vol. 176. № 2. P. 269-275. DOI: 10.1128/jb.176.2.269-275.1994.

103. Manson J. M., Hancock L. E., Gilmore M. S. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance and other traits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107. № 27. P. 12269-12274. DOI: 10.1073/pnas.1000139107.

104. Mohamed J. A., Huang D. B. Biofilm formation by enterococci. *J. of Med. Microbiol.* 2007. Vol. 56. № 12. P. 1581-1588. DOI: 10.1099/jmm.0.47331-0.

105. Thoendel M., Horswill A. R. Biosynthesis of peptide signals in gram-positive bacteria. *Adv. In Appl. Microbiol.* 2010. Vol. 71. P. 91-112. DOI: 10.1016/S0065-2164(10)71004-2.

106. Van Tyne D., Martin M. J., Gilmore M. S. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins.* 2013. Vol. 5. № 5. P. 895-911. DOI:

10.3390/toxins5050895.

107. A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a hylEfm genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates / Jenny A Laverde Gomez, Willem van Schaik, Ana R. Freitas et al. *Inter. J. of Medical Microbiol.* 2011. Vol. 301. № 2. P. 165-175. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.08.015.

108. Мироненко Л. Г., Перетятко Е. Г. Изучение желатиназной активности на генетическом и фенотипическом уровне у *Enterococcus sp.*, выделенных из разных экотопов. *Вісник проблем біології і медицини*. 2013. Вип. 4. Т. 1 (104). С. 239-242.

109. Marothi Y. A., Agnihotri H., Dubey D. Enterococcal resistance – an overview. *Indian J. of Medical Microbiol.* 2005. Vol. 23. № 4. P. 214-219. DOI:10.1016/S0255-0857(21)02524-X.

110. In vitro conjugative transfer of VanA vancomycin resistance between enterococci and listeriae of different species / F. Biavasco, E. Giovanetti, A. Miele et al. *Eur. J. of Clin. Microbiol. & Infect. Dis.* 1996. Vol. 15. № 1. P. 50-59. DOI: 10.1007/BF01586185.

111. Вальшев А. В., Герцен Н. В. Бактериоциногенез энтерококков кишечной микрофлоры человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013. № 5. С. 104-107.

112. Ben Braïek O, Smaoui S. Enterococci: Between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed Research Intern.* 2019. Vol. 2019. Article ID 5938210. DOI: 10.1155/2019/5938210.

113. Sanlibaba P., Senturk E. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of enterococci from traditional cheeses in Turkey. *Inter. J. of Food Properties*. 2018. Vol. 21. № 1 P. 1955-1963. DOI:10.1080/10942912.2018.1489413.

114. Динамика устойчивости к антибиотикам и частота выделения стафилококков и энтерококков у больных отделений реконструктивной хирургии / Н. С. Богомолова, Л. В. Большаков, С. М. Кузнєцова, Т. Д. Орешкина. *Антибиотики и химиотерапия*. 2011. Т. 56. № 5-6. С. 37-45.

115. Короткевич Ю. В. Анализ резистентности к антибиотикам энтеробактерий и энтерококков, выделяемых из пищевых продуктов. *Вопросы питания*. 2016. Т. 85. № 2. С. 5-13.
116. Опыт сдерживания распространения ванкомицинрезистентных энтерококков в отделении реанимации новорожденных / А. В. Любимова, Н. А. Шаляпина, А. Г. Гончаров и др. *Медицинский альманах*. 2015. № 5 (40). С. 96-99.
117. Энтерококки и их роль в перинатальной патологии / К. А. Оганян, О. Н. Аржанова, С. Л. Зациорская, А. М. Павичева. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2015. Т. 64. № 5. С. 48-54.
118. Новые возможности терапии энтерококкового инфекционного эндокардита / В. П. Тюрин, В. Г. Гудымович, Л. В. Волкова и др. *Клиническая медицина*. 2016. Т. 94 № 4. С. 255-259.
119. Вальшев А. В. Антимикробные соединения энтерококков. *Журнал микробиологии*. 2014. № 5. С. 119-126.
120. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid / S. C. J. De Keersmaecker, T. L. A. Verhoeven, J. Desair et al. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006. Vol. 259. № 1. С. 89-96. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00250.x.
121. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids / S. Tejero-Sariñena, J. Barlow, A. Costabile et al. *Anaerobe*. 2012. Vol. 18. № 5. P. 530-538. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2012.08.004.
122. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria / J. M. Ridlon, S. C. Harris, S. Bowhmik et al. *Gut microbes*. 2016. Vol. 7. № 1. P. 22-39. DOI: 10.1080/19490976.2015.1127483.
123. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile / R. P. K. Sahadeva, S. F. Leong, K. H. Chua et al. *Inter. Food Research J.* 2011. Vol. 18. № 4. P. 1515-1522.

124. Interspecies diversity, safety and probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* isolated from dairy food and human faeces / A. Bhardwaj, K. Gurpreed, H. Gupta et al. *World J. of Microbiol. and Biotechnol.* 2011. Vol. 27. № 3. P. 591-602. DOI:10.1007/s11274-010-0494-4.

125. The Tolerance of *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus curvatus* originated from bovine colostrum towards acidity and bile salts as probiotics candidate / R. Safitri, K. Khusnul, L. B. Roostita et al. *Advance J. of Food Sci. and Technol.* 2016. Vol. 11. № 1. P. 60-63. DOI:10.19026/ajfst.11.2355.

126. Begley M., Gahan C. G. M., Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. Vol. 29. № 4. P. 625-651. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.09.003.

127. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity / H. Tanaka, K. Doesburg, T. Iwasaki, I. Mierau. *J. of Dairy Sci.* 1999. Vol. 82. № 12. P. 2530-2535. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75506-2.

128. Ruiz L., Margolles A., Sanchez B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front. in Microbiol.* 2013. Vol. 4. 396. P. 1-8. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00396.

129. Энтерококки желудочно-кишечного тракта: особенности, факторы патогенности, антибиотикорезистентность / Е. И. Иванова, Е. А. Кунгурцева, У. М. Демченко, Е. В. Григорова. *Инфекционные болезни.* 2017. Т. 15. № 3. С. 58-64. DOI: 10.20953/1729-9225-2017-3-58-64.

130. Генетическая идентификация как способ выявления патогенных и симбиотических штаммов энтерококков / А. Е. Вершинин, В. В. Колоджиева, Е.И. Ермоленко и др. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2008. № 5. С. 83-87.

131. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses / K. M. Dos Santos, A. D. Vieira, H. O Salles et al. *Braz. J. of Microbiol.* 2015. Vol. 46. № 1. С. 237-249. DOI: 10.1590/S1517-838246120131245.

132. Сычева М. В., Карташова О. Л. Биологические свойства энтерококков различного происхождения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, 2015. № 4. С. 17-21.

133. Бухарин О. В., Вальшев А. В. Механизмы устойчивости энтерококков к антимикробным белкам и пептидам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2012. № 5. С. 89-94.

134. Вальшев А. В., Герцен Н. В. Факторы патогенности энтерококков кишечной микрофлоры человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2012. № 4. С. 41-44.

135. Construction and characterization of a double mutant of *Enterococcus faecalis* that does not produce biogenic amines / M. Perez, M. Calles-Enríquez, B. Del Rio et al. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9. № 1.:16881. DOI: 10.1038/s41598-019-53175-5.

136. Characterization of semipurified enterocins produced by *Enterococcus faecium* S6 isolated from raw camel milk / R. Rahmeh, A. Akbar, M. Kishk et al. *J. Of Dairy Sci*. 2018. Vol. 101. № 6. P. 4944-4952. DOI: 10.3168/jds.2017-13996.

137. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese / V. Q. Cavicchioli, A. C. Camargo, S. D. Todorov, L. A. Nero. *J. of Dairy Sci*. 2017. Vol. 100. № 4. P. 2526-2535. DOI: 10.3168/jds.2016-12049.

138. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production / Amel B. Lagha, Bruno. Haas, Marcelo Gottschalk, Daniel Grenier. *Vet. Res*. 2017. Vol. 48:22. 12 p. DOI: 10.1186/s13567-017-0425-6.

139. Khan H., Flint S., Pak-Lam Yu. Enterocins in food preservation. *Inter. J. of Food Microbiol*. 2010. Vol. 141. № 1-2. P. 1-10. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.005.

140. Purification, characterization and mode of action of enterocin, a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* TJUQ1 / X. Qiao, R. Du, Y. Wang, Y. Han, Z. Zhou. *Inter. J. of Biol. Macromolec*. 2020. Vol. 144. P. 151-159. DOI:

10.1016/j.ijbiomac.2019.12.090.

141. *Listeria monocytogenes* in food processing facilities, food contamination, and human listeriosis: The Brazilian scenario / A. C. Camargo, J. J. Woodward, D. R. Call, L. A. Nero. *Foodborne Pathog. and Disease*. 2017. Vol. 14. № 11. P. 623-636. DOI: 10.1089/fpd.2016.2274.

142. Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 2013. Vol. 11. № 2. P. 95-105. DOI: 10.1038/nrmicro2937.

143. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria / Sabrina da Silva Sabo, M. Vitolo, J. M. Domínguez González et al. *Food Res. Int.* 2014. Vol. 64. P. 527-536. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.07.041.

144. Silva Celia C. G., Silva Sofia P. M., Ribeiro. Susana. C. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9. 594. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00594.

145. Application of lactococcin BZ and enterocin KP against *Listeria monocytogenes* in milk as biopreservation agents / Z. Yildirim, N. Öncül, M. Yildirim, S. Karabiyikl. *Acta Aliment.* 2016. Vol. 45. № 4. P. 486-492. DOI:10.1556/066.2016.45.4.4.

146. Characterization and application of antilisterial enterocins on model fresh cheese / S. C. Ribeiro, R. P. Ross, C. Stanton, C. C. G. Silva. *J. of Food Protec.* 2017. Vol. 80. № 8. P. 1303-1316. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-031.

147. Вальшев А. В., Васильченко А. С. Морфологические изменения клеток листерий под действием метаболитов энтерококков кишечной микрофлоры человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014. № 6. С. 78-81.

148. Александрова Н. А., Заславская М. И., Вахромова М. В. Антагонистические взаимоотношения энтерококков с кандидами на уровне вагинального биотопа и в экспериментах *in vitro*. *Медицинский альманах*. 2016.

№ 5. С. 91-94.

149. Мерліч А. Г., Коротаєва Н. В. Склад жирних кислот бактерій штаму *Enterococcus italicus* ОНУ547. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2018. № 3 (43). С. 75-81. DOI:10.18524/2307-4663.2018.3(43).142237.

150. Влияние пробиотических энтерококков на рост *Streptococcus agalactiae* / Е. И. Ермоленко, А. Ю. Черныш, И. В. Марцинковская, А. Н. Суворов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007. № 5. С. 73-77.

151. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme / C. M. A. P. Franz, M. J. Van Belkum, W. H. Holzapfel et al. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007. Vol. 31. № 3. P. 293-310. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x.

152. Похилько Ю. М., Кравченко Н. О. Стійкість бактерій роду *Lactobacillus* до метаболітів травної системи. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2017. № 2 (38). С. 101-111.

153. Mubarak Z., Soraya C. The acid tolerance response and pH adaptation of *Enterococcus faecalis* in extract of lime *Citrus aurantiifolia* from Aceh Indonesia. *F1000 Res.* 2018. 7. 287. DOI: 10.12688/f1000research.13990.2.

154. Влияние пробиотических энтерококков и глатирамера ацетата на тяжесть экспериментального аллергического энцефаломиелита у крыс / И. Н. Абдурасулова, Е. И. Ермоленко, А. В. Мацулевич и др. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016. № 4. Р. 463-479.

155. Спосіб визначення штамів ентерококів для створення еталонних зразків пробіотичних препаратів: пат. 53335 Україна: (2009) С12 N 11/00 / Мойсєєва Г. В., Настояща Н. І., Сахнюк О. М., Кривошлик М. О. – № u 201001090; заявл. 03.02.2010; опубл. 11.10.2010, Бюл. № 19. 8 с.

156. Влияние индигенных энтерококков на микробиоту кишечника и поведение крыс при коррекции экспериментального дисбиоза / Е. И. Ермоленко, И. Н. Абдурасулова, М. П. Котылева и др. *Российский физиологический журнал*

им. И. М. Сеченова. 2017. Т. 103. № 1. С. 22-37.

157. Влияние пробиотиков на продукцию цитокинов в системах *in vitro* и *in vivo* / О. В. Аверина, Е. И. Ермоленко, А. Ю. Ратушный и др. *Медицинская иммунология*. 2015. Т. 17. № 5. С. 443-454.

158. Гончар Н. В., Ло Скиаво Л. А., Суворов А. Н. Влияние использования пробиотического штамма энтерококка на динамику массы тела, снижение частоты осложнений и изменения микробиоты кишечника у глубоко недоношенных новорожденных детей. *Вопросы детской диетологии*. 2016. № 1. С. 5-14.

159. Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, 5th ed. / G. Vinderola, A. C. Ouwehand, S. Salminen, A. Wright. *CRC Press: Boca Raton, FL, USA*. 2019. 764 p.

160. Comparative genomics of the genus *Lactobacillus* reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification / E. Salvetti, H. M. B. Harris, Giovanna E. Felis, P. W. O'Toole. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. Vol. 84. № 17. e00993-18. DOI: 10.1128/AEM.00993-18.

161. Endo A., Tanizawa Y., Arita M. Isolation and identification of lactic acid bacteria from environmental samples. *Methods in Molecul. Biology (Clifton N. J.)*. 2019. Vol. 1887. P. 3-13.

162. Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina / L. G. Ruiz Rodríguez, F. Mohamed, J. Bleckwedel et al. *Front. Microbiol.* 2019. Vol. 10. Article 1091. P. 1-26. DOI:10.3389/fmicb.2019.01091.

163. Lifestyles in transition: Evolution and natural history of the genus *Lactobacillus* / Rebecca M. Duar, Xiaoxi B. Lin, Jinshui Zheng et al. *FEMS Microbiol. Rev.* 2017. Vol. 41. № 1. P. 27-48

164. Giovanna E. Felis, Elisa Salvetti, Sandra Torriani. Systematics of lactic acid bacteria: Current status. In *biotechnology of lactic acid bacteria: Novel Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2015. P. 25-31.

165. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification / T. Ghaffar, M. Irshad, Z. Anwar et al. *J. of Radiat. Res. and Appl. Sci.* 2014. Vol. 7. № 2. P. 222-229. DOI:10.1016/j.jrras.2014.03.002.

166. Genome editing of lactic acid bacteria: Opportunities for food, feed, pharma and biotech / R. A. Börner, V. Kandasamy, A. M. Axelsen et al. *FEMS Microbiology Letters*. 2019. Vol. 366. fny291. P.1-12. DOI: 10.1093/femsle/fny291.

167. Van Pijkeren J.-P., Barrangou R. Genome editing of Food grade Lactobacilli to develop therapeutic probiotics. *Microbiol. Spectr.* 2017. Vol. 5. № 5. P. 1-25. DOI: 10.1128/microbiolspec.BAD-0013-2016.

168. Pinu F. R., Villas-Boas S. G. Extracellular microbial metabolomics: The state of the art. *Metabolites*. 2017. Vol. 7. №43. P. 1-16.

169. Proteomic studies on lactic acid bacteria: A review / K. Sri Vinusha, K. Deepika, T. S. Johnson et al. *Biochem. Biophys. Rep.* 2018. Vol. 14. P. 140-148. DOI: 10.1016/j.bbrep.2018.04.009.

170. *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid inhibits oral multispecies biofilm. / A. Reum Kim, Ki Bum Ahn, Cheol-Heui Yun et al. *J. of Endodont.* 2019. Vol. 45 № 3. P. 310-315. DOI: 10.1016/j.joen.2018.12.007.

171. Brown S., John P Santa Maria Jr., Walker S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 2013. Vol. 67. P. 313-336. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155620.

172. Lipoteichoic acid from *Lactobacillus rhamnosus* GG as an oral photoprotective agent against UV-induced carcinogenesis / F. S. Weill, E. M. Cela, M. L. Paz et al. *Br. J. of Nutr.* 2013. Vol. 109. № 3. P. 457-466. DOI: 10.1017/S0007114512001225.

173. Puebla-Barragan S., Reid G. Forty-five-year evolution of probiotic therapy. *Microb. Cell*. 2019. Vol. 6. № 4. P. 184-196. DOI: 10.15698/mic2019.04.673.

174. Gou M., Song W. The growing U.S. bioeconomy: Drivers, development and constraints. *New Biotechnol.* 2019. Vol. 49. P. 48-57.

175. Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: A

comprehensive review / F. A. Sadiq, B. Yan, F. Tian et al. *Compr. Rev. in Food Sci. and Food Saf.* 2019. Vol. 18. № 5. P. 1403-1436. DOI:10.1111/1541-4337.12481.

176. Saadat Y. R., Khosroushahi A. Y., Gargari B. P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydr. Polymers*. 2019. Vol. 217. P. 79-89. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.04.025.

177. Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: A sustainable approach for healthier Foods / M. G. Venegas-Ortega, A. C. Flores-Gallegos, J. L. Martínez-Hernández et al. *Compr. Rev. in Food Sci. and Food Saf.* 2019. Vol. 18. № 4. P. 1039-1051. DOI:10.1111/1541-4337.12455.

178. Ravishankar R. V., Januma A. B. Beneficial microbes in fermented and functional Foods. Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2014. P. 600.

179. Василюк О. М., Коваленко Н. К., Гармашева І. Л. Антагоністичні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів України. *Мікробіологічний журнал*. 2014. Т. 76. № 3. С. 24-30.

180. Антагоністична активність лактобактерій, ізольованих із ферментованих рослинних продуктів із В'єтнаму / Ж. Ю. Сергєєва, О. В. Басюл, О. Г. Горшкова та ін. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2016. № 4 (36). С. 50-59.

181. Антагоністична активність продуктів метаболізму бактерій *Lactobacillus plantarum* та *Enterococcus italicus* за сумісної дії проти фітопатогенних бактерій / А. Г. Мерліч, І. Д. Женько, Н. В. Ліманська, В. О. Іваниця. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2017. № 3 (39). С. 45-54.

182. Дослідження природи антагоністичної дії штамів *Lactobacillus plantarum* щодо умовно-патогенних та фітопатогенних мікроорганізмів / І. Л. Гармашева, О. М. Василюк, Н. К. Коваленко, Л. Т. Олещенко. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2015. № 2. С. 49-58.

183. Лаврик Г. С., Корнійчук О. П. Антимікробна активність лактобацил відносно стафілококів, виділених з біоплівки хворих *Acne Vulgaris*.

*Мікробіологія і біотехнологія*. 2020. № 1. С. 69-78.

184. Russo P., Spano G., Capozzi V. Safety evaluation of starter cultures. *Starter Cultures in Food Production*. John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK. 2017. P. 101-128. DOI:10.1002/9781118933794.ch6.

185. Kizerwetter-Świda M., Binek M. Assessment of the probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from chickens. *Pol. J. of Vet. Sci.* 2016. Vol. 19. № 1. P. 15-20. DOI: 10.1515/pjvs-2016-0003.

186. Здатність *Lactobacillus plantarum* ОНУ 12 до виживання в умовах ґрунту / Н. В. Ліманська, О. В. Басюл, Т. В. Суворова та ін. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2019. № 1. С. 16-23.

187. Страшнова І., Ямборко Г., Васильєва Н. Вплив деяких чинників шлунково-кишкового тракту на життєздатність лактобацил, виділених із різних екологічних ніш. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2019. Вип. 81. С. 130-138. DOI:10.30970/vbi.2019.81.14.

188. Страшнова І. В., Ямборко Г. В., Васильєва Н. Ю. Стійкість штамів лактобацил, виділених з різних джерел, до деяких агресивних чинників травного тракту. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2019. № 2. С. 38-50.

189. Anticancer potential against cervix cancer (HeLa) cell line of probiotic: *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from human breast milk / M. S. Riaz Rajoka, H. Zhao, Y. Lu et al. *Food & Functions*. 2018. Vol. 9. № 5. P. 2705-2715. DOI: 10.1039/c8fo00547h.

190. Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum / W. Liu, M. Chen, L. Duo et al. *J. Of Dairy Sci.* 2020. Vol. 103. № 5. P. 4013-4025. DOI: 10.3168/jds.2019-17602.

191. In vitro screening of lactic acid bacteria with probiotic properties from traditional fermented Yak yogurt / Chen Xiao-yong., Li Jian., Zhao Xin et al. *Food and Fermentation Industries*. 2016. Vol. 42. № 4. P. 85-90.

192. Oral *Lactobacillus* counts predict weight gain Susceptibility: A 6-Year Follow-Up Study / J. A. Rosing, K. C. Walker, A. H. Jensen Benjamin,

B. L. Heitmann *Obes. Facts.* 2017. Vol. 10. № 5. P. 473-482. DOI: 10.1159/000478095.

193. Хрянин А. А., Решетников О. В. Бактериальный вагиноз: новые перспективы в лечении. *Медицинский совет.* 2015. № 9. С. 26-33.

194. Видовое разнообразие вагинальных лактобацилл в норме и при дисбиотических состояниях / О. В. Будиловская, Е. В. Шипицына, Е. Н. Герасимова и др. *Журнал акушерства Женских болезней.* 2017. Т. 66. № 2. С. 24-32. DOI: 10.17816/JOWD66224-32.

195.  $\beta$ - Галактозидазна активність бактерій, як критерій відбору штамів до складу бактеріальних препаратів / О. І. Потемська, Н. Ф. Кігель, С. Г. Даниленко, К. В. Копилова. *Харчова наука і технологія.* 2017. Т. 11. Вип. 3. С. 35-41. DOI:10.15673/fst.v11i3.604.

196. Сравнительная оценка эффективности различных схем профилактического приема мультипробиотика Симбитер в двойном слепом плацебо контролируемом исследовании у детей / С. А. Крамарев, О. В. Выговская, В. В. Бережной и др. *Современная педиатрия.* 2011. № 1 (35). С. 111-117.

197. Лактазная недостаточность у больных с постинфекционным синдромом раздраженного кишечника и роль микрофлоры кишечника в ее развитии (результаты рандомизированного двойного слепого контролируемого исследования) / П. Л. Щербаков, А. И. Парфенов, И. Н. Ручкина и др. *Экспериментальная и клиническая. Гастроентерология.* 2012. № 5. С. 91-98.

198. Боднарчук О. В. Вибір складу комплексної заквашувальної композиції для кисломолочних продуктів та дослідження закономірностей її функціонування. *Продовольчі ресурси. Серія: Технічні науки.* 2015. № 4. С. 75-80.

199. Шугай М. О. Пошук і характеристика молочнокислих бактерій, перспективних для виробництва сиру. *Збірник наукових праць Вінницького національного аграрного університету. Серія: Технічні науки.* 2015. Т. 2.

№. 1(89). С. 153-158.

200. Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from chinese paocai and biosorption of Pb(II) by its exopolysaccharide / M. Feng, X. Chen, C. Li et al. *J. of Food Sci.* 2012. Vol. 77. № 6. P. 111-117. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02734.x.

201. Продукція екзополісахаридів штамами молочнокислих бактерій, ізольованих з ферментованих продуктів / І. Л. Гармашева, Н. К. Коваленко, О. М. Василюк, Л. Т. Олещенко. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2017. № 4 (40). С. 76-84. DOI: 10.18524/2307-4663.2017.4(40).118933.

202. Production of functional probiotic, prebiotic and synbiotic ice creams / T. Di Criscio, A. Fratianni, R. Mignogna et al. *J. of Dairy Sci.* 2010. Vol. 93. № 10. P. 4555-4564. DOI:10.3168/jds.2010-3355.

203. Fuller R. History and development of probiotics. In: *Probiotics*, Springer, Netherlands. 1992. P. 1-8. DOI:10.1007/978-94-011-2364-8\_1.

204. Калініченко С. В., Коротких О. О., Тіщенко І. Ю. Сучасні напрямки створення та удосконалення пробіотиків. *Український біофармацевтичний журнал*. 2016. № 1 (42). С. 4-10.

205. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: From biology to the clinic / Mary Elen Sanders, Daniel J. Merenstein, Gregor Reid et al. *Nat. Rev. Gastroenterol. and Hepatol.* 2019. Vol. 16. № 10. P. 605-616. DOI: 10.1038/s41575-019-0173-3.

206. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine / A. García-Ruiz, D. González de Llano, A. Esteban-Fernández et al. *Food Microbiol.* 2014. Vol. 44. P. 220-225.

207. Safety evaluation and colonisation abilities of four lactic acid bacteria as future probiotics / Z. C. Dlamini, R. L. S. Langa, O. A. Aiyegoro, A. I. Okoh. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019. Vol. 11. № 2. P. 397-402.

208. Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics / S. E. Evivie, G. C. Huo, J. O. Igene, X. Bian. *Food &*

*Nutr. Res.* 2017. Vol. 61. (1). 1318034.

209. Старовойтова С. О., Карпов О. В. Перспективи використання пробіотичних мікроорганізмів в функціональних продуктах харчування та медицині. *Харчова промисловість*. 2015. № 18. С. 76-80.

210. Мікробіологічні аспекти пробіотичних препаратів / О. В. Крисенко, Т. В. Скляр, А. І. Вінніков та ін. *Вісник Дніпропетровського університету. Серія: Біологія. Екологія*. 2010. Вип. 18. Т. 2. С. 19-24.

211. Дубровская М. И., Мухина Ю. Г., Нетребенко О. К. Пробиотики и формирование микробиоценоза у детей первого года жизни. *Лечащий врач*. 2003. № 5. С. 58-60.

212. Хорошилова Н. В. Иммунотерапевтические аспекты применения пробиотиков в клинической практике. *Лечащий врач*. 2003. № 2. С. 71-73.

213. Chrallampopoulos D. C., Rastall R. A. Prebitics and probiotics science and technology. UK: Springer. 2009. 1265 p.

214. Бондаренко В. М. Молекулярно-клітинні механізми терапевтичної дії пробіотичних препаратів. *Фарматека*. 2010. № 2 (196). С. 26-32.

215. Корниенко Е. А., Нетребенко О. К. Пробиотики: Механизмы действия и показания в соответствии с международными рекомендациями в педиатрии. *Педиатрия. Журнал им. Г. Н. Сперанского*. 2016. Т. 95. № 1. С. 109-121.

216. Evaluation of immune response, microbiota and blood markers after probiotic bacteria administration in obese mice induced by a high-fat diet / I. N. Núñez, C. Galdeano Maldonado, A. De Moreno de LeBlanc, G. Perdigon. *Nutrition*. 2014. Vol. 30 № 11-12. P. 1423-1432.

217. Kotzampassi K., Giamarellos-Bourboulis E. J., Stavrou G. Obesity as a consequence of gut bacteria and diet interactions. *ISRN Obesity*. 2014. Vol. 2014. 651895. P. 1-8. DOI: 10.1155/2014/651895.

218. Ashraf R., Nagendra. P. Shah. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr*. 2014. Vol. 54. № 7. P. 938-956.

DOI: 10.1080/10408398.2011.619671.

219. Skivka L. M. Immunomodulatory properties of the human intestinal microbiota and prospects for the use of probiotics for prophylaxis and correction of inflammatory processes. *Biotechnologia Acta*. 2015. Vol. 8. № 3. P. 28-44.

220. Ткач С. М., Пучков К. С. Роль пробиотиков в коррекции нарушений кишечной микробиоты. *Сучасна гастроентерологія*. 2014. № 3 (77). С. 59-65.

221. Novel probiotics and prebiotics: road to the market / H. Kumar, S. Salminen, H. Verhagen et al. *Curr. Opin. in Biotechnol.* 2015. Vol. 32, P. 99-103. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.021.

222. Tendencies and Challenges in Worldwide Scientific Research on Probiotics / J. L. Aleixandre-Tudó, L. Castelló-Cogollos, J. L. Aleixandre, R. Aleixandre-Benavent. *Probiot. and Antimicrob. Proteins*. 2019. Vol. 12. № 3. P. 785-797. DOI: 10.1007/s12602-019-09591-0.

223. In situ  $\beta$ -glucan fortification of cereal-based matrices by *Pediococcus parvulus* 2.6: Technological aspects and prebiotic potential / A. Pérez-Ramos, M. L. Mohedano, P. López et al. *Int. J. of Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. № 7. 1588. DOI: 10.3390/ijms18071588.

224. Deo D., Davray D., Kulkarni R. A diverse repertoire of exopolysaccharide biosynthesis gene clusters in *Lactobacillus* revealed by comparative analysis in 106 sequenced genomes. *Microorganisms*. 2019. Vol. 7. № 10. 444. DOI: 10.3390/microorganisms7100444.

225. Lolou V., Panayiotidis M. I. Functional role of probiotics and prebiotics on skin health and disease. *Fermentation*. 2019. Vol. 5. № 2. 41. DOI:10.3390/fermentation5020041.

226. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut / A. Rivière, M. Selak, D. Lantin et al. *Front. in Microbiol.* 2016. Vol. 7. 979. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00979.

227. How probiotics face food stress: They get by with a little help / D. Fiocco, A. Longo, M. P. Arena et al. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.* 2020. Vol. 60. № 9.

P. 1552-1580. DOI: 10.1080/10408398.2019.1580673.

228. Probiotics, prebiotics and the gastrointestinal tract in health and disease / L. Vitetta, D. Briskey, H. Alford et al. *Inflammopharmacol.* 2014. Vol. 22. №3. P. 135-154. DOI: 10.1007/s10787-014-0201-4.

229. Серебрякова Е. Н. Применение пробиотиков для профилактики и лечения диарей у детей. *Трудный пациент.* 2014. № 5. Т. 12. С. 20-25.

230. Кушнір І. М., Семен І. С., Майба У. З. Вивчення біологічних властивостей пробіотичних штамів мікроорганізмів. *Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин.* 2015. Вип. 16. № 2. С. 207-212.

231. Софронова Л. А., Иляш В. М. Биосинтетическая активность бацилл, обуславливающая их пробиотический эффект. *Мікробіологічний журнал.* 2017. Т. 79. № 6. С. 120-136.

232. Похиленко В. Д., Перельгин В. В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность. *Химическая и биологическая безопасность.* 2007. № 2-3. С. 20-41.

233. Оришак Е. А., Щеглов В. С., Нилова Л. Ю. Сравнительная характеристика антибиотикорезистентности некоторых представителей микробиоты кишечника и пробиотических штаммов. *Проблемы медицинской микологии.* 2013. Т. 15. № 4. С. 74-80.

234. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases / C. M. Ferreira, A. T. Vieira, M. A. Ramirez Vinolo et al. *J. of Immunol. Res.* 2014. 689492. DOI: 10.1155/2014/689492.

235. Вплив мультипробіотика «Симбітер ацидофільний» на мікрофлору кишечника та функціональну активність перитонеальних макрофагів щурів із глутаматним ожирінням / В. В. Позур, М. П. Рудик, Т. М. Сергійчук та ін. *Біологічні Студії.* 2016. Т. 10. № 1. С. 61-74.

236. Bader J., Albin A, Stahl U. Spore-forming bacteria and the irutilisation as probiotics. *Benef. Microb.* 2012. Vol. 3. № 1 P. 67-75. DOI: 10.3920/BM2011.0039.

237. Probiotic actions on diseases: implications for therapeutic treatments / Y-H. Chiu, S-L. Lin, J-J. Tsai, M-Y. Lin. *Food & Funct.* 2014. Vol. 5. P. 625-634. DOI: 10.1039/c3fo60600g.

238. Вплив пробіотичного препарату біоспорину на мікробіоту кишки здорового організму в експерименті / А. Гураль, Т. Руминська, Р. Шикула, О. Корнійчук. *Праці наукового товариства ім. Шевченка. Медичні науки.* 2016. Т. 47. С. 41-46.

239. Лапшин О. В., Одинець М. О. Кишкова мікрофлора: вплив на здоров'я людини. *Ліки України.* 2014. № 7-8 (183-184). С. 30-33.

240. Віннікова Л. Г., Ямборко Г. В., Кишеня А. В. Вплив молочнокислих бактерій на поверхневу мікробіоту м'яса. *Харчова наука і технологія.* 2015. Т. 9. № 3. С. 31-35.

241. Effect of probiotic strains of lacto- and bifidobacteria on the activity of macrophages and other parameters of immunity in cases of *Staphylococcosis* / V. V. Mokrozub, L. M. Lazarenko, L. P. Babenko et al. *Мікробіологічний журнал.* 2012. Т. 74 № 6. С. 90-98.

242. Куцик Р. В., Гаморак Г. П. Вплив 20-денних аплікацій на шкіру ітаконової кислоти у дозі 20 мг/см<sup>2</sup> на мікрофлору порожнини дистального відділу тонкої кишки та процес її самовідновлення через 15 днів. *Галицький лікарський вісник.* 2011. Т. 18. № 3. С. 44-47.

243. Гаморак Г. П. Профілактика дисбіозу і корекція лактобактерином якісного і кількісного складу мікрофлори дистального відділу тонкої кишки білих щурів, яким протягом 20 днів проводили аплікацію на шкіру ітаконовою кислотою. *Клінічна та експериментальна патологія.* 2015. Т. 14. № 3 (53). С. 36-44.

244. Исследование влияния больших доз пробиотика Бифидумбактерин и микроорганизмов аутофлоры кишечника на организм белых мышей и показатели клеточного иммунитета / И. Ю. Чичерин, И. В. Дармов, Н. А. Багачева и др. *Медицинский советник Поволжья.* 2013. № 1 (6). С. 85-90.

245. Kavita R. Pandey, Sures. R. Naik, Babu. V. Vakil. Probiotics, prebiotics and synbiotics – a review. *J. of Food Sci Technol.* 2015. Vol. 52. № 12. P. 7577-7587. DOI: 10.1007/s13197-015-1921-1.

246. Short communication: In vitro and in vivo probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* B7 and *Lactobacillus rhamnosus* D1 isolated from Minas artisanal cheese / G. L. C. Valente, L. B. Acurcio, L. P. V. Freitas et al. *J. of Dairy Sci.* 2019. Vol. 102. № 7. P. 5957-5961. DOI: 10.3168/jds.2018-15938.

247. Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria / Y. Ortiz-Rivera, R. Sánchez-Vega, N. Gutiérrez-Méndez et al. *J. of Dairy Sci.* 2017. Vol. 100. № 6. P. 4258-4268.

248. Bowe P. W., Logan C. A. Acne vulgaris, probiotics and the gut-brain-skin axis-back to the future? *Gut Pathogens.* 2011. Vol. 3. № 1. P. 1-11. DOI: 10.1186/1757-4749-3-1.

249. Stress-dependent and gender specific neuroregulatory roles of the apelin receptor in the hypothalamic pituitaryadrenal axis response to acute stress / M. J. F. Newson, G. R. Pope, E. M. Roberts et al. *J. of Endocrinol.* 2013. Vol. 216. № 1. P. 99-109. DOI: 10.1530/JOE-12-0375.

250. Lorin A. Neuman- Lee, Susannah S. French. Wound healing reduces stress induced immune changes: evidence for immune prioritization in the side-blotched lizard. *J. of Comp. Physiol. B.* 2014. Vol. 184. № 5. P. 623-629. DOI: 10.1007/s00360-014-0826-z.

251. Вплив моно-, полі- та комбінованих пробіотиків на виразкоутворення, викликане іммобілізаційним стресом / О. В. Вірченко, Т. М. Фалалєєва, Т. В. Берегова та ін. *Фізіологічний журнал.* 2015. Т. 61. № 1. С. 35-41.

252. Профілактична дія пробіотичних штамів *Bifidobacterium animalis* VKL і VKB на стресіндуковані ураження в слизовій оболонці шлунка щурів / М. Я. Співак, Л. М. Лазаренко, Т. М. Фалалєєва та ін. *Фізіологічний журнал.*

2013. T. 59. № 2. С. 23-30.

253. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats / Emily K. Y. Lam, L. Yu, Helen P. S. Wong et al. *Eur. J. of Pharmacol.* 2007. Vol. 565. № 1-3. P. 171-179. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.02.050.

254. A study on the protective activity of kefir against gastric ulcer / Yahya T. Orhan, Cem Karagözlü, Sülen Sarioğlu et al. *Turk. J. of Gastroenterol.* 2012. Vol. 23. № 4. P. 333-338. DOI: 10.4318/tjg.2012.0343

255. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration / D. Das, D. Bandyopadhyay, M. Bhattacharjee, R. K. Banerjee. *Free Radic. Biol. Med.* 1997. Vol. 23. № 1. P. 8-18. DOI: 10.1016/s0891-5849(96)00547-3.

256. Effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions / A. Senol, M. Isler, A. G. Karahan et al. *Turk J. of Gastroenterol.* 2011. Vol. 22. № 1. P. 18-26. DOI:10.4318/tjg.2011.0151.

257. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides / Chin-Feng Liu, Kuo-Chuan Tseng, Shen-Shih Chiang et al. *J. Of the Sci. of Food and Agricult.* 2011. Vol. 91. № 12. P. 2284-2291. DOI: 10.1002/jsfa.4456

258. Сімахіна Г., Науменко Н. Інновації у харчових технологіях. *Товари і ринки*. 2015. № 1. С. 189-201.

259. Козонова Ю. А. Огляд закордонного ринку функціональних продуктів. *Мясное дело*. 2009. № 4. С. 28-29.

260. Капрельянц Л. В. Функциональные продукты питания: современное состояние и перспективы развития. *Продукты и ингредиенты*. 2004. № 1. С. 22-24.

261. Голуб Б. Сучасні підходи до формування споживних властивостей синбіотичних харчових продуктів. *Товари і ринки*. 2007. № 2. С. 58-64.

262. Михайлов В. М., Чуйко М. М., Чуйко А. М. Маркетингові дослідження щодо підвищення ефективності просування на вітчизняний ринок нових функціональних продуктів. *Прогресивні техніка та технології харчових*

*виробництв ресторанного господарства і торгівлі*. 2014. Вип. 1. С. 7-15.

263. Сімахіна Г. О., Стеценко Н. О., Науменко Н. В. Біологічно активні речовини в харчових технологіях. К.: НУХТ, 2016. 455 с.

264. Зобкова З. С. Пищевые добавки и функциональные ингредиенты. *Молочная промышленность*. 2007. № 10. С. 6-10.

265. Тихомирова Н. А. Продукты функционального питания. *Молочная промышленность*. 2013. № 6. С. 46-48.

266. Квасников Е. И., Несторенко О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: Наука, 1975. 392 с.

267. Корженівська А. О., Даниленко С. Г., Гетьман І. А. Дослідження впливу закваски на основі молочнокислих бактерій на якість хліба. *Продовольчі ресурси*. 2019. Т. 7. № 13. С. 87-94.

268. Дробот В. І. Довідник з технології хлібопекарського виробництва. Довідник : навч. посіб. / 2-е вид., перероб. і допов. Київ, 2019. 580 с.

269. Structural differences between rye and wheat breads but not total fiber content may explain the lower postprandial insulin response to rye bread / Katri S. Juntunen, David E. Laaksonen, Karin Autio et al. *Amer. J. of Clin. Nut.* 2003. Vol. 78. № 5. P. 957-964. DOI: 10.1093/ajcn/78.5.957.

270. Шевченко С. Влияние органических кислот на свойства теста и качество хлебобулочных изделий. *Хлібопекарська і кондитерська промисловість України*. 2014. № 3 (112). С. 38.

271. Грушковська А. О., Даниленко С. Г., Хоньків М. О. Вплив молочнокислих бактерій на показники житньої закваски. *Вчені записки ТНУ імені В.І. Вернадського. Серія: Технічні науки*. 2019. Т. 30 (69). Ч. 2. № 4. С. 92-97.

272. Wlodarczyk M. Associated cultures of lactic acid bacteria and yeast in the industrial production of bread. *Acta Alim. Pol.* 1985. Vol. 11 (35). P. 345-359.

273. Підбір культур мікроорганізмів для виробництва хлібного квасу / М. Є. Сагайдак, Р. О. Бліщ, В. Л. Прибильський та ін. *Науковий вісник*

*ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. Серія: Харчові технології.* 2016. Т. 18. № 2 (68). С. 87-91. DOI:10.15421/nvlvet6817.

274. Болгова Н. В. Підходи до створення функціональних молочних продуктів. *Технологии XXI века: сб. тезисов по матер. 21-й Междунар. науч. конф. г. Глухов, 8-10 сентября, 2015 г. Глухов.* 2015. Ч. 1. С. 27-28.

275. Бережний В. В., Дрох Г. В., Бондарець Ю. І. Використання кисломолочних продуктів функціонального харчування у практиці лікарів педіатрів та лікарів загальної практики – сімейних лікарів. *Современная педиатрия.* 2015. № 8 (72). С. 82-87. DOI 10.15574/SP.2015.72.82.

276. Кітченко Л. М. Функціональні кисломолочні продукти покращать здоров'я споживача. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Тваринництво.* 2014. Вип 2/1 (24). С. 148 - 152.

277. Капрельянц Л. В., Трегуб Н. С. Селенобогащенные пробиотические продукты функционального назначения *Мікробіологія і біотехнологія.* 2016. № 1. С. 6-18.

278. Aryana J. K., Olson W. D. A 100-year review: Yogurt and other cultured dairy products. *J. of Dairy Sci.* 2017. Vol. 100. № 12. P. 9987-10013. DOI: 10.3168/jds.2017-12981.

279. A method for manufacturing superior set yogurt under reduced oxygen conditions / H. N. Horiuchi, E. Liu Inoue, M. Fukui et al. *J. of Dairy Sci.* 2009. Vol. 92. № 9. P. 4112-4121. DOI: 10.3168/jds.2008-1747.

280. Ткач С. М., Тимошенко О. С., Дорофієва А. А. Роль кишкової мікробіоти у розвитку ожиріння та інсулінорезистентності. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія.* 2016. № 1 (53). С. 7-16.

281. Low-sugar yogurt making by the co-cultivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 with yogurt starter cultures / S. S. Zhang, Z. S. Xu, L. H. Qin, J. Kong. *J. of Dairy Sci.* 2020. Vol. 103. № 4. P. 3045-3054. DOI: 10.3168/jds.2019-17347.

282. Turner K. W., Martley F. G. Galactose fermentation and classification

of thermophilic lactobacilli. *Appl. and Environ. Microbiol.* 1983. Vol. 45. № 6. P. 1932-1934. DOI: 10.1128/aem.45.6.1932-1934.1983.

283. Silanikove N., Leitner G., Merin U. The interrelationships between lactose intolerance and the modern dairy industry: Global perspectives in evolutionary and historical backgrounds. *Nutrients.* 2015. Vol. 7. № 9. P. 7312-7331. DOI:10.3390/nu7095340.

284. Wu Q., Cheung C. K. W., Shah N. P. Towards galactose accumulation in dairy foods fermented by conventional starter cultures: Challenges and strategies. *Trends in Food Sci. & Technol.* 2015. Vol. 41. № 1. P. 24-36. DOI:10.1016/j.tifs.2014.08.010.

285. Acceptance of sugar reduction in flavored yogurt / M. Chollet, D. Gille, A. B. Schmid et al. *J. of Dairy Sci.* 2013. Vol. 96. № 9. P. 5501-5511. DOI: 10.3168/jds.2013-6610.

286. Harju M., Kallioinen H., Tossavainen O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: technological aspects. *Inter. Dairy J.* 2012. Vol. 22. № 2. P. 104-109. DOI:10.1016/j.idairyj.2011.09.011.

287. Preparation of low galactose yogurt using cultures of Gal (+) *Streptococcus thermophilus* in combination with *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* / K. Anbukkarasi, T. UmaMaheswari, T. Hemalatha et al. *J. of Food Sci. & Technol.* 2014. Vol. 51. № 9. P. 2183-2189. DOI: 10.1007/s13197-014-1262-5.

288. Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond / M. L. Marco, D. Heeney, S. Binda et al. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017. Vol. 44. P. 94-102. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.11.010.

289. Spontaneous food fermentations and potential risks for human health / V. Capozzi, M. Fragasso, R. Romaniello et al. *Fermentation.* 2017. Vol. 3. № 4. 49. DOI:10.3390/fermentation3040049.

290. Вплив пробіотичних препаратів на біохімічні показники крові та печінки перепелів / О. С. Цехмістренко, С. І.Цехмістренко, В. С. Бітюцький, та ін.. *Сучасні технології у тваринництві та рибництві: навколишнє середовище-*

виробництво продукції- екологічні проблеми: збірник матеріалів 73-ї Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Київ, 3-4 квітня, 2019 р. Київ, 2019. С. 229-231.

291. An *in vivo* assessment of the cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* ECGC 13110402 in normal to mildly hypercholesterolaemic adults / A. Costabile, I. Buttarazzi, S. Kolida et al. *PLoS One*. 2017. Vol. 12. № 12. e0187964. DOI: 10.1371/journal.pone.0187964.

292. Effect of probiotic *Lactobacillus* on lipid profile: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials / Y. Wu, Q. Zhang, Y. Ren, Z. Ruan, Z. Ruan. *PLoS One*. 2017. Vol. 12. № 6. e0178868. DOI: 10.1371/journal.pone.0178868.

293. Mechanisms responsible for the hypocholesterolaemic effect of regular consumption of probiotics / S. A. Reis, L. L. Conceição, D. D. Rosa et al. *Nutr. Res. Rev.* 2017. Vol. 30. № 1. P. 1-14. DOI: 10.1017/S0954422416000226.

294. Cholesterol lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults / M. C. Fuentes, T. Lajo, J. M. Carrión, J. Cuñé. *Brit. J. of Nutr.* 2013. Vol. 109. P. 1866-1872. DOI: 10.1017/S000711451200373X.

295. Гіполіпідемічна ефективність пробіотика *Lactobacillus plantarum* у пацієнтів з ішемічною хворобою серця / В. П. Шипулін, В. В. Чернявський, А. В. Неверовський, Л. М. Парунян. *Український терапевтичний журнал*. 2018. № 3-4. С. 27-33.

296. Mingqian He, Bingyin Shi. Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics. *Cell & Bioscience*. 2017. Vol. 7. № 54. P. 1-14. DOI: 10.1186/s13578-017-0183-1.

297. Tang W. H. W., Kitai T., Hazen Stanley L. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circulation. Researsh*. 2017. Vol. 120. № 7. P. 1183-1196. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309715.

298. Modulation of gut microbiota during probiotic – mediated attenuation of

metabolic syndrome in high fat diet – fed mice / J. Wang, H. Tang, C. Zhang et al. *The ISME J.* 2015. Vol. 9. № 1. P. 1-15. DOI: 10.1038/ismej.2014.99.

299. Wiest R., Lawson M., Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J. of Hepatol.* 2014. Vol. 60. № 1. P. 197-209. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.07.044.

300. Vlasenko I., Semko T., Palamarchuk V. The influence of the composition of bacterial starter cultures on the maturation process and the quality of hard rennet cheese. *Technology audit and production reserves.* 2020. Vol. 1. № 3 (51). P. 48-52. DOI: 10.15587/2312-8372.2020.192599.

301. Ткаченко Н. А. Заквашувальні композиції бактерій для технологій кисломолочних продуктів дитячого харчування. *Мікробіологія і біотехнологія.* 2016. № 1. С. 55-67.

302. Ткаченко Н. А., Українцева Ю. С., Авершина А. С. Медико-біологічні дослідження білкових паст для дитячого харчування. *Наукові праці ОНАХТ.* 2016. Т. 48. С. 105-110.

303. Ткаченко Н. А., Українцева Ю. С. Фракційний склад білків в пастах для дитячого харчування. *Збірник наукових праць ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького.* 2015. №4 (64). Т. 17. С. 165-173.

304. Заквашувальні композиції для дитячих кисломолочних продуктів з підвищеними протеолітичними властивостями / Н. А. Ткаченко, Ю. В. Назаренко, А. С. Авершина, Ю. С. Українцева. *Східно-Європейський журнал передових технологій.* 2014. Т. 2. №12 (68). С. 66-71. DOI: 10.15587/1729-4061.2014.23388.

305. Дослідження впливу молочнокислих бактерій у складі готового продукту на пригнічення росту бактерій групи кишкових паличок / В. М. Гуляєв, І. М. Корнієнко, А. Т. Лашкова та ін. *Збірник наукових праць Дніпровського державного технічного університету (технічні науки).* 2018. Т. 2 № 33. С. 87-91. DOI 10.31319/2519-2884.33.2018.205.

306. Огляд інноваційних біотехнологій заквашувальних культур та

бактеріальних препаратів Інституту продовольчих ресурсів НААН / Н. Ф. Кігель, С. Г. Даниленко, О. В. Науменко, О. І. Потемська. *Продовольчі ресурси*. 2017. № 9. С. 195-202.

307. Metabolic fluxes in lactic acid bacteria – a review / J. F. Valenzuela, L. A. Pinuer, G. A. Cancino, B.. R. Yanez. *Food Biotechnol.* 2015. Vol. 29. № 2. P. 185-217. DOI:10.1080/08905436.2015.1027913.

308. Characterization and application of antimicrobials produced by *Enterococcus faecium* S6 isolated from raw camel milk / R. Rahmeh, A. Akbar, T. Alonaizi, et al. *J. Dairy Sci.* 2020. Vol. 103. № 12. P. 11106-11115. DOI: 10.3168/jds.2020-18871.

309. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food – animal production / N. Vieco-Saiz, Y. Belguesmia, R. Raspoet, et al. *Front. in Microbiol.* 2019. Vol. 10. 57. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00057.

310. Alves F. C. B., Barbosa L. N., Andrade B. F. M. T. Short communication: Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. *J. Dairy Sci.* 2016. Vol. 99. № 3. P. 1831-1836. DOI: 10.3168/jds.2015-10025.

311. Mode of action of leucocin K7 produced by *Leuconostoc mesenteroides* K7 against *Listeria monocytogenes* and its potential in milk preservation / F. Shi, Y. Wang, Y. Li, X. Wang. *Biotechnol. Lett.* 2016. Vol. 38. № 9. P. 1551-1557. DOI:10.1007/s10529-016-2127-y.

312. Da Costa P. M., Loureiro L., Matos A. J. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment. *Int. J. of Environ. Res. and Public Health.* 2013. Vol. 10. № 1. P. 278-294. DOI: 10.3390/ijerph10010278.

313. Zhi Y. Kho., Sunil K. Lal. The human gut microbiome – a potential controller of wellness and disease. *Front. in Microbiol.* 2018. Vol. 9. Article 1835. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01835.

314. Матвеева О. Л., Старинщак В. В., Решетняк Л. Р. Біологічна активність заквашувальних композицій кисломолочних продуктів. *Проблеми екологічної біотехнології*. 2018. № 2. С. 1-11.

315. Виділення та ідентифікація бактерій роду *Lactobacillus* з ферментованих продуктів різних регіонів України / О. М.Василіук, Н. К. Коваленко, І. Л. Гармашева, Л. Т. Олещенко. *Мікробіологічний журнал*. 2014. Т. 76. № 2. С. 3-9.

316. Mokoena M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and application against uropathogens: A mini-review. *Molecules*. 2017. Vol. 22. № 8. 1255. DOI: 10.3390/molecules22081255.

317. Bintsis T. Lactic acid bacteria: their application in foods. *J. of Bacteriol. & Mycol.: Open Access*. 2018. Vol. 6. № 2. P. 89-94. DOI: 10.15406/jbmoa.2018.06.00182.

318. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production / B. Tilocca, N. Costanzo, V. M. Morittu et al. *J. of Proteomics*. 2020. Vol. 210. 103534. DOI:10.1016/j.jprot.2019.103534.

319. Microbiota of the traditional slovak sheep cheese «Bryndza» / M. Kačániová, S. Kunová, J. Štefániková et al. *J. of Microbiol. Biotechnol. and Food Sciences* 2019. Vol. 9 (Special). P. 482-486. DOI: 10.15414/jmbfs.2019.9.special.482-486.

320. Traditional Slovak products as functional foods / D. Toth, J. Brindza, E. Panghyova, S. Silhar. *Function. Properties of Traditional Foods*. 2016. P. 75-86. DOI: [https://DOI.org/10.1007/978-1-4899-7662-8\\_5](https://DOI.org/10.1007/978-1-4899-7662-8_5).

321. Sheep milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development / C. F. Balthazar, T. C. Pimentel, L. L. Ferrão et al. *Comp. Rev. in Food Sci. and Food Safety*. 2017. Vol. 16. № 2. P. 247-262. DOI: 10.1111/1541-4337.12250.

322. Characterization of May bryndza cheese from various regions in Slovakia based on microbiological, molecular and principal volatile odorants examination /

N. Šaková, J. Sádecká, J. Lejková, et al. *J. of Food and Nutr. Research*. 2015. Vol. 54. № 3. P. 239-251.

323. Microorganisms and volatile aroma-active compounds in bryndza cheese produced and marketed in Slovakia / J. Sádecká, Z. Čaplová, M. Tomáška et al. *J. Of Food and Nutr. Research*. 2019. Vol. 58. № 4. P. 382-392.

324. Bryndza cheese of slovak origin as potential resources of probiotic bacteria / M. Kačániová, P. Borotová, M. Terentjeva et al. *Potravinarstvo Slovak J. of Food Sci*. 2020. Vol. 14. P. 641-646. DOI:10.5219/1413.

325. The characteristic of sheep cheese «Bryndza» from different regions of Slovakia based on microbiological quality / M. Kačániová, L. Nagyová, J. Štefániková et al. *Potravinarstvo Slovak J. of Food Sci*. 2020. Vol. 14. 69-75. DOI: 10.5219/1239.

326. Santillo A., Albenzio M. Sensory profile and consumers' liking of functional ovine cheese. *Foods*. 2015. Vol. 4. № 4. P. 665-677. DOI: 10.3390/foods4040665.

327. Walter F Schlech. Epidemiology and Clinical Manifestations of *Listeria monocytogenes*. *Infection Microbiol Spectr*. 2019. Vol. 7. № 3. Doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0014-2018.

328. Cheese microbial risk assessments – a review / K. H. Choi, H. Lee, S. Lee et al. *Asian-Austr. J. of Anim. Sci*. 2016. Vol. 29. № 3. P. 307-314. DOI: 10.5713/ajas.15.0332.

329. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk / C. Verraes, G. Vlaemynck, S. Van Weyenberg et al. *Inter. Dairy J*. 2015. Vol. 50. P. 32-44. DOI:10.1016/j.idairyj.2015.05.011.

330. *Listeria monocytogenes* in milk: Occurrence and recent advances in methods for inactivation / S. H. I. Lee, L. P. Cappato, J. T. Guimarães et al. *Beverages*. 2019. Vol. 5. № 1. 14 p. DOI: 10.3390/beverages5010014.

331. Belicová A., Mikulášová M., Dušínský R. Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak bryndza cheese.

*BioMed Research Inter.* Vol. 2013. Article ID 760298. 8p. DOI: 10.1155/2013/760298.

332. Preliminary screening of lactic acid bacteria against *Escherichia coli* and the research of probiotic potential for the screening bacteria / Du Jin-cheng, Xu Min, Li Bai-liang et al. *Sci. and Technol. of Food Industry*. 2016. Vol. 37. № 13. P. 152-156. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.13.022.

333. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Council of European. Strasbourg, 1986. № 123. 51 p.

334. Кундієв Ю. І. Сучасні проблеми біоетики. К.: Академперіодика, 2009. 278 с.

335. Корми та кормова сировина. Визначення вмісту амінокислот методом капілярного електрофорезу з використанням системи капілярного електрофорезу «Капель-105/105М» (методичні рекомендації) / І. Я. Коцюмбас, Т. Р. Левицький, Г. П. Ривак та ін. Львів, 2013. 32 с.

336. Премікси. Визначення вмісту вітамінів групи В (В1, В2, В3, В5, В6 і Вс) методом капілярного електрофорезу з використанням системи капілярного електрофорезу «Капель-105/105М» (методичні рекомендації) / І. Я. Коцюмбас, Т. Р. Левицький, Г. П. Ривак та ін. Львів, 2013. 26 с.

337. Визначення вмісту органічних кислот у продуктах життєдіяльності молочнокислих бактерій методом капілярного електрофорезу з використанням системи капілярного електрофорезу «Капель-105/105М» (методичні рекомендації) / І. Я. Коцюмбас, Т. Р. Левицький, І. І. Кушнір, та ін. Львів, 2021. 28 с.

338. Комбікорми, премікси, бвмд і сировина для їх виробництва. Визначення вмісту калію, натрію, магнію, амонію і кальцію методом капілярного електрофорезу з використанням системи капілярного електрофорезу «Капель-105/105М» (методичні рекомендації) / І. Я. Коцюмбас, С. П. Долецький, Т. Р. Левицький та ін. Львів, 2016. 27 с.

339. Лабинская А. С., Блинковская Л. П., Ещина А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учебное пособие. М.: Медицина, 2004. 576 с.

340. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І. Я. Коцюмбас та ін.; за заг. ред. І. Я. Коцюмбаса. Львів: Триада плюс, 2006. 360 с.

341. Ветеринарно-санітарна та технологічна експертиза молока: навчальний посібник / Н. А. Ткаченко, О. П. Чагаровський, Н. О. Дец, Л. О. Ланженко, О. А. Кручек. Рівне: Овід, 2018. 235 с.

342. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник; под ред. проф. И. П. Кондрахина. М.: КолосС, 2004. 520 с.

343. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R. L. Levine, D. Garland, C. N. Oliver et al. *Methods in Enzymol.* 1990. Vol. 186. P. 464-478. DOI: 10.1016/0076-6879(90)86141-h.

344. Дорофейчук В. Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом. *Лабораторное дело.* 1968. № 1. С. 28-30.

345. Гриневич Ю. А. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных. *Лабораторное дело.* 1981. № 8. С. 493-496.

346. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. of Biol. Chem.* 1957. Vol. 226. № 1. P. 497-509.

347. Коробейникова Е. Н. Модификация метода определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой. *Лабораторное дело.* 1989. № 7. С. 8-9.

348. Дубинина Е. Е., Сальникова Л. Я., Ефимова Л. Ф. Активность и изоферментный спектр СОД эритроцитов. *Лабораторное дело.* 1983. № 10. С. 30-33.

349. Мирончик В. В. Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях: пат. № 1084681 А, СССР. № 3468369/28-13; заявл.

08.07.82; опубл. 07.04.84, Бюл. № 13. 5 с.

350. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лабораторное дело*. 1986. № 12. С. 724-727.

351. Определитель бактерий Берджи / Под редакцией Д. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. М.: Мир. 1997. 799 с.

352. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований. *Патологическая физиология и экспериментальные исследования. Терапия*. 1960. № 4. С. 76-79.

353. Ammor M. S, Flórez A. B, Mayo B. Antibiotic resistance in non enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol*. 2007. Vol. 24. № 6. P. 559-570. DOI: 10.1016/j.fm.2006.11.001.

354. Ботина С. Г. Видовая идентификация и паспортизация молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического типирования. *Молочная промышленность*. 2008. № 3. С 52-54.

355. Цісарик О. Й., Сливка І. М., Мусій Л. Я. Дослідження впливу складу захисного середовища на збереження життєздатності ліофілізованих бактерій *L. lactis* та *L. plantarum*, виділених із традиційної карпатської бринзи. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького*. 2017. Т. 19. № 75. С. 29-34. DOI:10.15421/nvlvet7506.

356. Підбір молочнокислих бактерій, ізольованих з природних екзотів, для виготовлення кисловершкового масла геродієтичного / О. Й.Цісарик, І. М. Сливка, Л. Я. Мусій, І. І. Кушнір. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. Серія: Харчові технології*. 2018. Т. 20. № 85. С. 35-40. DOI:10.15421/nvlvet8507.

357. Antagonistic activity of strains of lactic acid bacteria isolated from Carpathian cheese / L. Y. Musiy, O. Y. Tsisaryk, I. M. Slyvka, I. I. Kushnir. *Regul. Mech. in Biosyst*. 2020. Vol. 11. № 4. P. 572-578. DOI:10.15421/022089.

358. Галенова Т. І., Ракша Н. Г., Савчук О. М. Зміна біохімічного профілю

організму за умов тетрахлорметан-індукованого ураження печінки у щурів. *Scientific J. Sci. Rise.: Biological Sci.* 2016. № 2 (2). С. 47-54.

359. Цехмістренко С. І., Кононський О. І. Біохімія молока та молокопродуктів: навч. Посібник. Біла Церква, 2014. 168 с.

360. Галух Б. І.. Технологічні режими соління бринзи і їх вплив на якісні показники готового продукту. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького*. 2013. Т. 15. № 1 (55). Ч. 3. С. 58-63.

361. Скульська І. В., Цісарик О. Й. Вплив часткової заміни хлориду натрію на протеоліз при виробництві бринзи. *Восточно-Європейський журнал передових технологій*. 2014. № 5/11 (71). С. 23-27. DOI: 10.15587/1729-4061.2014.27591

362. Скульська І. В., Цісарик О. Й. Удосконалення технології виготовлення бринзи. *Вчені записки ТНУ імені В .І. Вернадського. Серія: Технічні науки*. 2019. Т. 30 (69). Ч. 2. № 6. С. 146-150. DOI:10.32838/2663-5941/2019.6-2/26.

363. Цісарик О. Й., Скульська І. В. Удосконалення технології виробництва бринзи шляхом зменшення вмісту хлориду натрію. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького*. 2013. Т. 15. № 3 (57). Ч. 4. С. 126-131.

364. Кушнір І. І. Вивчення патогенних властивостей ентерококів виділених із карпатської бринзи. *Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і інституту біології тварин*. 2020. Т. 21. № 1. С. 119-125. DOI: 10.36359/scivp.2020-21-1.14

365. Kushnir I., Slyvka I., Tsisaryk O. Description strains *Enterococcus faecium* isolated from Carpathian brine cheese. *Ogolnouczeniiana sesja kol naukowych*. Krakow, 2016. P. 96.

366. Properties of the strains *Enterococcus faecium* isolated from traditional Carpathian ewe's cheese / О .Tsisaryk, I. Slyvka, L. Musiy, I. Kushnir, T. Bocer. *J. Of Dairy Sci. Pittsburgh, Pennsylvania*. 2017. Vol. 100. №. 2. P. 57 (M144).

367. Захарова И. Я., Павлова И. Н. Литические ферменты

микроорганизмов. К.: Наукова думка, 1985. 216 с.

368. Цой И. Г., Сапаров А. С., Тимофеева И. К. Иммуностимулирующее действие лактобактерий на цитотоксичность естественных киллеров и продукцию интерферона. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1994. № 6. С. 112-113.

369. Значення фітокомпонента в середовищі культивування для продуцентів нових синбіотичних препаратів / Л. І. Акименко, О. І. Гордієнко, В. С. Тиндик, І. М. Мандзя. *Ветеринарна Біотехнологія*. 2018. Вип. 32 (1). С. 34-43. DOI.org/10.31073/vet\_biotech32(1)-2.

370. Гармашева І. Л. Таксономічне положення і біологічна активність ентерококів: автореф. дис.... канд.. біол. наук: 03.00.07. Київ, 2009. 23 с.

371. Физиология животных и этология / Скопичев, В. Г., Эйсымонт, Т. А., Алексеев Н. П. и др. М.: Колос, 2004. 720 с.

372. Применение глицина в лечении пациентов, страдающих расстройством адаптации / О. В. Григорова, Л. В. Ромасенко, А. З. Файзуллоев и др. *Практическая медицина*. 2012. № 2 (57). С. 178-182.

373. Chiaki Sano. History of glutamate production. *The American J. of Clinical Nutr.* 2009. Vol. 90. № 3. 7285-7325. DOI: 10.3945/ajcn.2009.27462F .

374. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders / Hannah Blencowe, Simon Cousens, Bernadette Modell, Joy Lawn. *Inter. J. of Epidemiol.* 2010. Vol. 39. № 1. P. i110-i121. DOI:10.1093/ije/dyq028.

375. Черних В. П., Зименковский Б. С., Гриценко И. С. Органическая химия. Кн. 3. Гетероциклические и природные соединения: учебн. Х.: Основа, 1997. 248 с.

376. Effect of dietary supplementation of organic acids and essential oils on immune function and intestinal characteristics of experimentally infected rabbits / R. Cardinali, P. G. Rebollar, A. Dal Bosco et al. *9th World Rabbit Congress, June 10-13, Verona, Italy*. 2008. P. 573-577.

377. Effects of diets supplemented with organic acids and nucleotides on

growth, immune responses and digestive tract development in weaned pigs / D. N. Lee, S. R. Liu, Y. T. Chen et al. *J. of Anim. Physiol. and Anim. Nutr. (Berl.)*. 2007. Vol. 91. № 11-12. P. 508-518. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2007.00684.x.

378. Суворов А. Н., Захаренко С. М., Алехина Г. Г. Энтерококки как пробиотики выбора. *Клиническое питание*. 2003. № 1. С. 26-29.

379. Хорошилова Н. В. Иммунотерапевтические аспекты применения пробиотиков в клинической практике. *Лечащий врач*, 2013. № 2. С. 71-73.

380. Shujun Ran, Zhiyan He, Jingping Liang. Survival of *Enterococcus faecalis* during alkaline stress: changes in morphology, ultrastructure, physiochemical properties of the cell wall and specific gene transcripts *J. Archives of Oral Biology*. 2013. Vol. 58. № 11. P. 1667-1676. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2013.08.013.

381. Софронова Л. А. Пробиотичні властивості бактерій роду *Bacillus* і взаємодія препаратів на їх основі з макроорганізмом: автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.07. Київ, 2015. 40 с.

382. Лысенко С. Н., Васильев А. В., Сочинская О. Н. Использование пробиотиков после антибиотиков. *Птицеводство*. 2010. № 10. С. 42-44.

383. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics-A comparison of functionality and efficacy / H. M. Timmerman, C. J. M. Koning, L. Mulder et al. *Inter. J. of Food Microbiol.* 2004. Vol. 96. № 3. P. 219-233. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.012.

384. Галенова Т. І., Ракша Н. Г, Савчук О. М. Зміна біохімічного профілю організму за умов тетрахлорметан-індукованого ураження печінки у щурів. *Scientific J. ScienceRise: Biological Sci.* 2016. № 2 (2). P. 47-54.

385. Імуностимулююча активність пробіотичних препаратів з вмістом штамів лактобактерій / Н. І. Настояща, О. М Сахнюк, М. О. Кривошлик та ін. *Лабораторна діагностика*. 2011. № 2 (56). С. 26-31.

386. Експериментальне вивчення імуностимулюючої дії еталонного штаму біфідобактерій / М. О. Кривошлик, Н. І. Настояща, О. М Сахнюк та ін. *Довкілля та здоров'я*. 2011. № 3 (58). С. 53-57.

387. *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome / Jinjin Chen, Ren Wang, Xiao-Fang Li, Rui-Liang Wang. *Br. J. of Nutr.* 2012. Vol. 107. №10. P. 1429-1434. DOI: 10.1017/S0007114511004491.

388. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adipo-nectin production / Sun-Woo Kim, Kun-Young Park, Bobae Kim et al. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2013. Vol. 431. № 2. P. 258-263. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.121.

389. Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet induced obesity / Sae-Rom Yoo, Young-Jae Kim, Do-Young Park et al. *.Obesity (Silver Spring)*. 2013. Vol. 21. № 12. P. 2571-2578. DOI: 10.1002/oby.20428.

390. Xiong Ma, Jing Hua, Zhiping. Li. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J. of Hepatol.* 2008. Vol. 49. № 5. P. 821-830. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.05.025.

391. Probiotic properties of *Enterococcus* strains isolated from traditional naturally fermented cream in China / Lidong Guo, Tingting Li, Yaru Tang et al. *Microb. Biotechnol.* 2016. Vol. 9. № 6. P. 737-745. DOI: 10.1111/1751-7915.12306.

392. Beneficial effects of probiotic cholesterol lowering strain of *Enterococcus faecium* WEFA23 from infants on diet induced metabolic syndrome in rats / Fen Zhang, Liang Qiu, Xiongpeng Xu et al. *J. of Dairy Sci.* 2017. Vol. 100. № 3. P. 1618-1628. DOI: 10.3168/jds.2016-11870.

393. Extracellular fatty acids are not utilized directly for the synthesis of very-low-density lipoproteins in primary culture of rat hepatocytes / G. F. Gibbons, S. M. Bartlett, C. E. Sparks, J. D. Sparks. *Biochem. J.* 1992. Vol. 287. № 3. 749-753. DOI: 10.1042/bj2870749.

394. Effects of low calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia / Jian-Gao Fan, Lan Zhong, Zheng-Jie Xu et al. *World J. Of Gastroenterol.* 2003. Vol. 9. № 9. P. 2045-2049. DOI: 10.3748/wjg.v9.i9.2045.

395. Effect of niacin on LXR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  expression and HDL-induced cholesterol efflux in adipocytes of hypercholesterolemic rabbits / Shui-ping Zhao, Jun Yang, Jing Li, Dong et al. *Inter. J. of Cardiol.* 2008. Vol. 124. № 2. P. 172-178. DOI: 10.1016/j.ijcard.2006.12.032.

396. Сливка І. М., Цісарик О. Й. Властивості молочнокислих бактерій виділених із традиційних молочних продуктів України. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького*. 2016. Т. 18. № 1 (65). Ч. 3. С. 126-132.

397. Використання бакконцентрату геробактерин у технології бринзи / І. М. Сливка, О. Й. Цісарик, Л. Я. Мусій, І. М. Скульська. *Харчова наука і технологія*. 2017. Т. 11. № 4. С. 81-89.

398. Цісарик О. Й., Сливка І. М., Мусій, Л. Я. Скринінг технологічних властивостей природних штамів молочнокислих бактерій. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2017. Т. 19. № 80. С. 88-92. DOI:10.15421/nvlvet8018.

399. Probiotic attributes of indigenous *Lactobacillus spp.* isolated from traditional fermented foods and beverages of north-western Himalayas using in vitro screening and principal component analysis / Alina Kumari, Kunzes, Angmo, Monika, Tek Chand Bhalla. *J. Food Sci. and Technol.* 2016. Vol. 53. № 5. P. 2463-2475. DOI: 10.1007/s13197-016-2231-y.

400. Підбір молочнокислих бактерій, ізольованих з природних еконіш, для виготовлення кисловершкового масла геродієтичного призначення / О. Й. Цісарик, І. М. Сливка, Л. Я. Мусій, І. І. Кушнір. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького*. 2018. Т. 20. № 85. С. 35-40. DOI: 10.15421/nvlvet8507.

401. Властивості сформованих композицій пробіотичних штамів, виділених із карпатської бринзи / І. І. Кушнір, О. Й. Цісарик, І. М. Кушнір та ін. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки*. 2020. Т. 22. № 93. С. 119-125. DOI: 10.32718/nvlvet-a9320.

402. Identification and Investigation of properties of strains *Enterococcus spp.*

Isolated from artisanal Carpathian cheese / I. Slyvka, O. Tsisaryk, L. Musii et al. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2022. Vol. 39. P. 102259.

403. Скульська І. В., Цісарик О. Й. Вміст вільних амінокислот бринзи в залежності від складу мікробіальної композиції. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького*. 2014. Т. 16. № 3 (60). Ч. 4. С. 152-160.

404. Папакіна Н. С. Виробництво додаткової продукції вівчарства *Theoretical and empirical scientific research: concept and trends: Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ» with Proceedings of the International Scientific and Practical Conference. Oxford, United Kingdom: Oxford Sciences Ltd. & European Scientific Platform*. 2020. Vol. 1. P. 108-110. DOI 10.36074/24.07.2020.v1.40.

405. Технологія йогурту «Карпатський» із використанням штаму *Enterococcus faecium*, як допоміжної культури з пробіотичними властивостями / О. Й. Цісарик, І. М. Сливка, Г. В. Дроник та ін. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Серія: Харчові технології*. 2021. Т. 23. № 96. С. 93-101. DOI 10.32718/nvlvet-f9616.

## ДОДАТКИ

## ДОДАТОК А

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

## Статті в наукових виданнях, включених до переліку фахових видань

## України:

1. The ability of enterococci extracted from traditional Carpathian cheese bryndza to produce biologically active substances / **I. I. Kushnir**, O. Y. Tsisaryk, S. H. Shalovylo, B. V. Gutyj, G. V. Kushnir, I. M. Slyvka, L. Y. Musiy. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*. 2020. V. 3 (3). С. 15–19. DOI: <https://doi.org/10.32718/ujvas3-3.03> (Здобувачка провела дослідження та підготувала статтю до публікації).

2. Інтенсивність росту та антибактеріальні властивості штамів *Enterococcus faecium* та *Enterococcus durans*, виділених із традиційної карпаської бринзи / **I. I. Кушнір**, О. Й. Цісарик, І. М. Сливка, Л. Я. Мусій, І. М. Кушнір, І. С. Семен. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки*. 2020. Т. 22, № 92. С. 42–49. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9208> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

3. **Кушнір І. І.** Вивчення патогенних властивостей ентерококів виділених із карпатської бринзи. *Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і інституту біології тварин*. 2020. Вип. 21, № 1. С. 119–125. DOI: <https://doi.org/10.36359/scivp.2020-21-1.14>

4. Властивості сформованих композицій пробіотичних штамів, виділених із карпатської бринзи / **I. I. Кушнір**, О. Й. Цісарик, І. М. Кушнір, І. С. Семен, І. М. Сливка, Л. Я. Мусій. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки*. 2020. Т. 22, № 93. С. 119–125. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9320> (Здобувачка провела дослідження та підготувала статтю до публікації).

5. **Кушнір І. І.** Вплив рН і різних концентрацій солі та жовчі на ріст ентерококів, виділених з природних еконіш. *Збірник наукових праць «Технологія*

*виробництва і переробки продукції тваринництва». 2020. № 2 (158). С. 76–81. DOI: <https://doi.org/10.33245/2310-9289-2020-158-2-76-81>*

6. **Кушнір І. І.**, Цісарик О. Й. Вплив розробленої композиції молочнокислих бактерій, виділених із карпатської бринзи, на організм лабораторних тварин. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки.* 2021. Т. 23, № 94. С. 9–15. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9402> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

7. Цісарик О. Й., **Кушнір І. І.** Вміст ліпідів печінки щурів за дії композиції молочнокислих бактерій, виділених із традиційної карпатської бринзи. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування.* 2021. № 7. С. 167–173. DOI: <https://doi.org/10.31890/vttp.2021.07.26> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

8. Вплив ентерококів на чутливість умовно-патогенної мікрофлори до антибіотиків / **І. І. Кушнір**, І. С. Семен, О. Й. Цісарик, І. М. Кушнір. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки.* 2021. Т. 23, № 95. С. 25–28. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9503> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

9. Технологія виготовлення бринзи з коров'ячого молока із застосуванням заквашувального препарату «Ентероплан» / **І. І. Кушнір**, О. Й. Цісарик, І. М. Кушнір, І. В. Скульська. *Науковий вісник ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького. Серія: Сільськогосподарські науки.* 2022. Т. 24, № 96. С. 9–15. DOI: <https://doi.org/10.32718/nvlvet-a9602> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

#### **Стаття в зарубіжному фаховому виданні:**

10. **Kushnir I. I.**, Tsisaryk O. Y. Antioxidant system of rats by the influence of composition of bacteria isolated from traditional carpathian cheese bryndza. *Poland,*

*Colloquium-journal*. 2021. № 7 (94). P. 27–30. DOI: 10.24412/2520-6990-2021-794-27-29 (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

**Статті включені до наукових періодичних виданнях, які індексуються в наукометричних базах Scopus та/або Web of Science:**

11. Antagonistic activity of strains of lactic acid bacteria isolated from Carpathian cheese / L. Y. Musiy, O. Y. Tsisaryk, I. M. Slyvka, **I. I. Kushnir**. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020. Vol. 11, № 3. P. 572–578. DOI: <https://doi.org/10.15421/02201104> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

12. Identification and investigation of properties of strains *Enterococcus* spp. isolated from artisanal Carpathian cheese / I. Slyvka, O. Tsisaryk, L. Musii, **I. Kushnir**, M. Koziorowcki, A. Koziorowcka. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2022. Vol. 39. P. 102259. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102259> (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та написанні статті).

**Патенти України на корисну модель:**

13. **Кушнір І. І.**, Цісарик О. Й., Кушнір І. М., Сливка І. М., Гутий Б. В., Кушнір В. І., Семен І. С. Спосіб визначення штамів ентерококів для створення пробіотичної закваски: пат. 149039 Україна: МПК А23С 9/13 (2006.01), С12N 1/20 (2006/01). u202101868; заявл. 09.04.2021; опубл. 13.10.2021, Бюл. № 41. 5 с. (Здобувачка експериментально обгрунтувала спосіб визначення штамів ентерококів для створення пробіотичної закваски та підготувала матеріал для патенту).

**Наявність завершеної наукової розробки:**

**Технічні умови:**

14. Цісарик О. Й., **Кушнір І. І.** Препарат заквашувальний «Ентероплан». Технічні умови ТУ У 10.5–00492990–028:2021. 22 с. (Здобувачка брала участь у проведенні дослідів, оформленні технічних умов).

### Рекомендації:

15. Визначення вмісту амінокислот у продуктах життєдіяльності молочнокислих бактерій методом капілярного електрофорезу (методичні рекомендації) / І. Я. Коцюмбас, Т. Р. Левицький, **І. І. Кушнір**, Г. П. Ривак, Г. В. Кушнір, Б. І. Назар, Г. Ю. Федор, О. М. Вільха, Т. І. Шарій, Г. Ю. Неділька. ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок, Львів. 2020. 24 с. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці методичних рекомендацій).*

### Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

16. **Iryna Kushnir**, Iryna Slyvka, Orysia Tsisaryk. Charakterystyka szczepów *Enterococcus faecium* wyizolowanych z bryndzy karpackiej. *Ogólnouczelniana sesja był naukowych* (8 kwiecień 2016). Krakow, Polska. 2016. P. 96. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку).*

17. Properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from traditional Carpathian ewe's cheese / O. Tsisaryk, I. Slyvka, L. Musiy, **I. Kushnir**, T. Bocer. *J. of Dairy Sci.* Pittsburgh, Pennsylvania. June 25–28, 2017. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку).*

18. **Кушнір І. І.**, Цісарик О. Й. Підбір молочнокислих бактерій, ізольованих з природніх еконіш, для виготовлення кисловершкового масла геродієтичного призначення. «Дні студентської науки у національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького»: матеріали студентської конференції (м. Львів, 25–26 квітня 2018 р.). Львів, 2018. Ч. 2. С. 108–110. *(Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку)*

19. Результати дослідження генерації електричного струму ряду мікробіологічних об'єктів / І. Я. Коцюмбас, І. М. Кушнір, О. І. Білий, Т. З. Гречух, Я. П. Ференсович, **І. І. Кушнір**. «Сенсорна електроніка та

*мікросистемні технології» (СЕМСТ-8) (з виставкою розробок та промислових зразків сенсорів): 8ма Міжнародна науково-технічна конференція (м. Одеса, 28 травня – 1 червня 2018 р.). Одеса, 2018. С. 50 (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку).*

20. Дослідження *in vitro* автохтонних штамів роду *Enterococcus*, виділених із традиційних карпатських продуктів / О. Цісарик, І. Кушнір, І. Сливка, Л. Мусій. «Молодь і поступ біології»: матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів (м. Львів, 27–29 квітня 2020 р.). Львів, 2020. С. 150–151. (Здобувачка брала участь у проведенні досліджень, аналізі отриманих результатів та підготовці тез до друку).

**ДОДАТОК Б****АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ**

Міжнародна конференція «Дні студентської науки» (ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького, 12-13 травня 2016, Львів)- *виступ на секційному засіданні.*

Сесія наукових кіл «Ogólnouczelniana sesja był naukowych»-Krakow, kwiecień, 2016.- *виступ на секційному засіданні.*

Студентська конференція «Дні студентської науки у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького» (ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького, 25-26 квітня 2018, Львів) - *виступ на секційному засіданні.*

XVIII Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8) (з виставкою розробок та промислових зразків сенсорів). 28 травня-1 червня 2018, Одеса.

XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів присвячена 75 річниці створення біологічного факультету та 90 річниці від дня народження М. Деркача «Молодь і поступ біології» (Львівський національний університет ім. І. Франка, 27-29 квітня 2020, Львів) - *виступ на секційному засіданні*

IX Міжнародна науково-практична конференція «Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування» (ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, 19-22 вересня 2021, Львів) - *виступ на секційному засіданні.*

УДК 637.3:577.112.34:543.638.3

Методичні рекомендації розглянуті та погоджені ТК ІІ? Інститу захисту тварин, корми та кормові добавки (протокол № 4 від 11.10.2020 р.).

Методичні рекомендації розглянуті та схвалені на засіданні вченої ради ДНДКІ ветеринарних та кормових добавок (протокол № 7 від 12.10.2020 р.).

**Розробники:** Коцюмбас І.Я., Левицький Т.Р., Кушнір І.І., Ривак Г.П., Кушнір Г.В., Назар Б.І., Федор Г.Ю., Вільха О.М., Шарій Т.І., Неділька Г.Ю.

**Рецензенти:**

Гутий Б.В. – доктор ветеринарних наук, професор кафедри фармакології і токсикології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З.Гжицького;

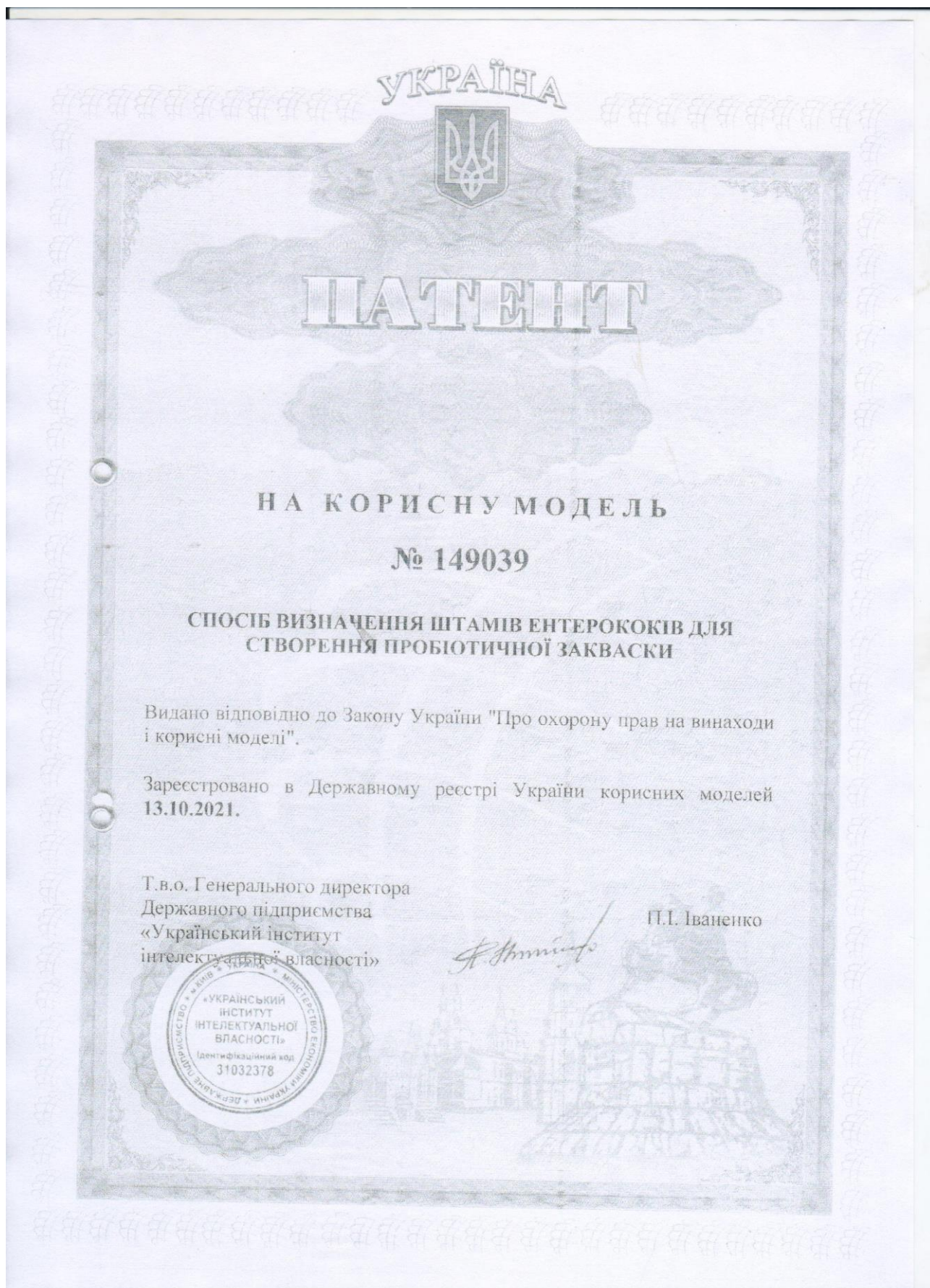
Патерга І.П. – кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок.

**Визначення** вмісту амінокислот у продуктах життєдіяльності молочнокислих бактерій методом капілярного електрофорезу (методичні рекомендації) / [Коцюмбас І.Я., Левицький Т.Р., Кушнір І.І., Ривак Г.П., Кушнір Г.В., Назар Б.І., Федор Г.Ю., Вільха О.М., Шарій Т.І., Неділька Г.Ю.]. – Львів: Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, 2020. – 24 с.

Методичні рекомендації призначені для спеціалістів ветеринарної медицини, слухачів факультетів післядипломної освіти, студентів аграрних вузів та вузів ветеринарної медицини III-IV рівня акредитації

**Зміст**

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Вступ                                                                         | С. |
| 2. Сфера застосування                                                            | 4  |
| 3. Метод випробувань                                                             | 4  |
| 3.1 Засоби виміральної техніки, устаткування, реактиви та матеріали              | 4  |
| 3.2 Приготування до випробувань                                                  | 5  |
| 3.3 Випробування                                                                 | 6  |
| 3.4 Обробка результатів випробувань                                              | 7  |
| 3.5 Оформлення результатів випробувань                                           | 14 |
| 3.6 Контроль якості результатів досліджень при реалізації методики в лабораторії | 15 |
| 4. Вимоги безпеки                                                                | 17 |
| 5. Вимоги до кваліфікації операторів                                             | 18 |
| 6. Джерела інформації                                                            | 18 |
| Додаток А (обов'язковий)                                                         |    |
| Додаток Б (інформаційний)                                                        |    |
| Додаток В (інформаційний)                                                        |    |
| Додаток Г (рекомендований)                                                       |    |





УКРАЇНА

(19) UA (11) 149039 (13) U

(51) МПК

A23C 9/13 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

|                                                                    |                      |                               |                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) Номер заявки:                                                 | u 2021 01868         | (72) Винахідник(и):           | Кушнір Ірина Ігорівна (UA),<br>Цісарик Оріся Йосипівна (UA),<br>Кушнір Ігор Михайлович (UA),<br>Сливка Ірина Миколаївна (UA),<br>Гутий Богдан Володимирович (UA),<br>Кушнір Володимир Ігорович (UA),<br>Семен Ірина Семенівна (UA) |
| (22) Дата подання заявки:                                          | 09.04.2021           | (73) Володілець (володільці): | Львівський національний<br>університет ветеринарної<br>медицини та біотехнологій імені<br>С.З. Гжицького,<br>вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010 (UA)                                                                              |
| (24) Дата, з якої є чинними<br>права інтелектуальної<br>власності: | 14.10.2021           |                               |                                                                                                                                                                                                                                    |
| (46) Публікація відомостей<br>про державну<br>реєстрацію:          | 13.10.2021, Бюл.№ 41 |                               |                                                                                                                                                                                                                                    |

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ШТАМІВ ЕНТЕРОКОКІВ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ПРОБІОТИЧНОЇ ЗАКВАСКИ

## (57) Реферат:

Спосіб визначення штамів ентерококів для створення пробіотичної закваски включає виділення, ідентифікацію та встановлення властивостей. Штами ентерококів виділяють із традиційних національних молочних продуктів та додатково проводять оцінку показників антагоністичної активності, стійкості ентерококів до кухонної солі, соляної та жовчних кислот, технологічних параметрів кислотоутворення та швидкості накопичення біомаси та підбирають штамми ентерококів, на основі отриманих показників, з найкращими характеристиками для створення пробіотичної закваски.

UA 149039 U

## ДОДАТОК Д

ДКПП 10.51

УКНД 67.100.20

**ПОГОДЖЕНО**

Директор ДНДКІ ветпрепаратів та  
кормових добавок, д.вет.наук,  
професор, академік НААН

“19” 10 2021 рр. І. Я. Коцюмба

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Ректор Львівського  
національного університету  
ветеринарної медицини та  
біотехнологій імені С. З. Ґжицького,

член-кореспондент НААН, д.вет.наук,  
професор

В. В. Стибель

2021 рік

**ПРЕПАРАТ ЗАКВАШУВАЛЬНИЙ “ЕНТЕРОПЛАН”****Технічні умови****ТУУ 10.5-00492990-028:2021**

(Уведено вперше)

Дата надання чинності 2021

Без обмеження строку чинності

**РОЗРОБЛЕНО**

Завідувач кафедри технології  
молока і молочних продуктів  
Львівського національного  
університету ветеринарної  
медицини та біотехнологій імені  
С.З.Ґжицького, д.с.-г.н.

О. Й. Цісарик

“05” 10 2021 рік

Аспірант кафедри технології  
молока і молочних продуктів  
Львівського національного  
університету ветеринарної  
медицини та біотехнологій  
імені С. З. Ґжицького

І. І. Кушнір

“05” 10 2021 рік