



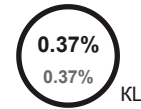
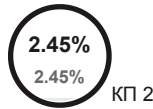
Звіт подібності

Метадані

Назва організації The Ivan Franko National University		підрозділ Біологічний факультет		
Заголовок ВІТАМІННИЙ ТА АМІНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД БІОМАСИ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ВИДІЛЕНИХ ІЗ ТРАДИЦІЙНИХ ПРОДУКТІВ КАРПАТСЬКОГО РЕГІОНУ				
Автор Марія Фуртак		Науковий керівник / Експерт доц. Василь Сирватка		
Кількість слів 9580	Кількість символів 70438	Дата звіту 12/12/2025	Дата редагування ---	ІД документу 332845502

Обсяг знайдених подібностей

Коефіцієнт подібності визначає, який відсоток тексту по відношенню до загального обсягу тексту було знайдено в різних джерелах. Зверніть увагу, що високі значення коефіцієнта не автоматично означають плагіат. Звіт має аналізувати компетентна / уповноважена особа.



10

Довжина фрази для коефіцієнта подібності 2

9580

Кількість слів

70438

Кількість символів

Тривога

У цьому розділі ви знайдете інформацію щодо текстових спотворень. Ці спотворення в тексті можуть говорити про МОЖЛИВІ маніпуляції в тексті. Спотворення в тексті можуть мати навмисний характер, але частіше характер технічних помилок при конвертації документа та його збереженні, тому ми рекомендуємо вам підходити до аналізу цього модуля відповідально. У разі виникнення запитань, просимо звертатися до нашої служби підтримки.

Заміна букв		2
Інтервали		0
Мікропробіли		58
Білі знаки		0
Парафрази (SmartMarks)		25

Джерела

Нижче наведений список джерел. В цьому списку є джерела із різних баз даних. Колір тексту означає в якому джерелі він був знайдений. Ці джерела і значення Коефіцієнту Подібності не відображають прямого плагіату. Необхідно відкрити кожне джерело і проаналізувати зміст і правильність оформлення джерела.

10 найдовших фраз

ПОРЯДКОВИЙ НОМЕР	НАЗВА ТА АДРЕСА ДЖЕРЕЛА URL (НАЗВА БАЗИ)	Кількість ідентичних слів (фрагментів)	Копіювати текст
1	http://repository.rshu.edu.ua/id/eprint/11704/1/%D0%93%D0%BE%D1%8E%D0%BA%D0%B0%20%D0%94%D0%90.pdf	29 0.30 %	
2	http://repository.rshu.edu.ua/id/eprint/11704/1/%D0%93%D0%BE%D1%8E%D0%BA%D0%B0%20%D0%94%D0%90.pdf	29 0.30 %	
3	http://repository.rshu.edu.ua/id/eprint/11704/1/%D0%93%D0%BE%D1%8E%D0%BA%D0%B0%20%D0%94%D0%90.pdf	29 0.30 %	

4	Експериментально-теоретичне обґрунтування розробки препаратів для профілактики акушерської патології і субклінічного маститу корів та їх фармако-токсикологічна характеристика 12/7/2020 Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv (Спеціалізована вчена рада патологія, фармакологія, паразитологія)	26 0.27 %
5	Розробка лабораторних методів контролю вітамінно-мінерального препарату, призначеного для профілактики акушерської патології у сук 12/13/2022 Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv (Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv)	19 0.20 %
6	http://repository.rshu.edu.ua/id/eprint/11704/1/%D0%93%D0%BE%D1%8E%D0%BA%D0%B0%20%D0%94%D0%90.pdf	19 0.20 %
7	Геномна характеристика та потенційна пробіотична дія штаму Enterococcus sp. SB12 6/4/2025 The Ivan Franko National University (Біологічний факультет)	18 0.19 %
8	http://repository.rshu.edu.ua/id/eprint/11704/1/%D0%93%D0%BE%D1%8E%D0%BA%D0%B0%20%D0%94%D0%90.pdf	17 0.18 %
9	http://repository.rshu.edu.ua/id/eprint/11704/1/%D0%93%D0%BE%D1%8E%D0%BA%D0%B0%20%D0%94%D0%90.pdf	15 0.16 %
10	http://repository.rshu.edu.ua/id/eprint/11704/1/%D0%93%D0%BE%D1%8E%D0%BA%D0%B0%20%D0%94%D0%90.pdf	14 0.15 %

База даних UKRNTI (0.00 %)

ПОРЯДКОВИЙ НОМЕР	ЗАГОЛОВОК	КІЛЬКІСТЬ ІДЕНТИЧНИХ СЛІВ (ФРАГМЕНТІВ)
------------------	-----------	--

з домашньої бази даних (0.19 %)

ПОРЯДКОВИЙ НОМЕР	ЗАГОЛОВОК	КІЛЬКІСТЬ ІДЕНТИЧНИХ СЛІВ (ФРАГМЕНТІВ)
1	Геномна характеристика та потенційна пробіотична дія штаму Enterococcus sp. SB12 6/4/2025 The Ivan Franko National University (Біологічний факультет)	18 (1) 0.19 %

з програми обміну базами даних (0.52 %)

ПОРЯДКОВИЙ НОМЕР	ЗАГОЛОВОК	КІЛЬКІСТЬ ІДЕНТИЧНИХ СЛІВ (ФРАГМЕНТІВ)
2	Експериментально-теоретичне обґрунтування розробки препаратів для профілактики акушерської патології і субклінічного маститу корів та їх фармако-токсикологічна характеристика 12/7/2020 Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv (Спеціалізована вчена рада патологія, фармакологія, паразитологія)	31 (2) 0.32 %
3	Розробка лабораторних методів контролю вітамінно-мінерального препарату, призначеного для профілактики акушерської патології у сук 12/13/2022 Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv (Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv)	19 (1) 0.20 %

з Інтернету (2.11 %)

ПОРЯДКОВИЙ НОМЕР	ДЖЕРЕЛО URL	КІЛЬКІСТЬ ІДЕНТИЧНИХ СЛІВ (ФРАГМЕНТІВ)
4	http://repository.rshu.edu.ua/id/eprint/11704/1/%D0%93%D0%BE%D1%8E%D0%BA%D0%B0%20%D0%94%D0%90.pdf	172 (9) 1.80 %

Список прийнятих фрагментів

ПОРЯДКОВИЙ НОМЕР	ЗМІСТ	КІЛЬКІСТЬ ОДНАКОВИХ СЛІВ (ФРАГМЕНТІВ)
------------------	-------	---------------------------------------

на тему: ВІТАМІННИЙ ТА АМІНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД БІОМАСИ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ВИДІЛЕНИХ ІЗ ТРАДИЦІЙНИХ ПРОДУКТІВ КАРПАТСЬКОГО РЕГІОНУ

)

Львів - 2025

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	4
1. Загальна характеристика молочнокислих бактерій, як пробіотиків.....	4
2. Пробиотичні властивості мікроорганізмів.....	6
3. Пробиотичні метаболіти мікроорганізмів.....	9
4. Характеристика <i>Enterococcus</i> sp, <i>Enterococcus faecium</i> та <i>Pedococcus acidilactici</i>	12
5. Визначення вмісту вітамінів, амінокислот та інших метаболітів за допомогою ВЕРХ.....	15
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	19
1. Нарощування біомаси мікроорганізмів.....	19
2. Визначення вмісту вітамінів за допомогою високоефективної рідинної хроматографії.....	21
3. Визначення вмісту амінокислот за допомогою високоефективної рідинної хроматографії.....	
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	25
ВИСНОВКИ.....	36
ЛІТЕРАТУРА.....	37

ВСТУП

Молочнокислі бактерії є дуже поширеною групою організмів. Їх можна знайти на рослинах що розпадаються, молочних продуктах та в організмі людини і тварин, де займають велику нішу і відіграють важливу роль у метаболізмі. У сучасній мікробіології та біотехнології значна увага приділяється вивченню молочнокислих бактерій, зокрема їх здатності синтезувати біологічно активні сполуки. Ці мікроорганізми відіграють важливу роль не лише у ферментації харчових продуктів, але й у формуванні корисних для здоров'я речовин, таких як вітаміни, амінокислоти, бактеріоцини, антиоксиданти та імунomodуючі сполуки. Така багатofункціональність молочнокислих бактерій відкриває нові перспективи для їх використання у медицині, фармації та харчовій промисловості.

Актуальність теми зумовлена зростаючим інтересом до натуральних біопродуктів і пробіотиків, які можуть замінити синтетичні добавки та антибіотики. Дослідження біосинтезу біологічно активних речовин дозволяє краще зрозуміти механізми метаболізму молочнокислих бактерій та розробити ефективні біотехнологічні стратегії для їх практичного застосування, що становить важливе теоретичне і прикладне значення.

Мета роботи: проаналізувати біосинтетичну активність і вміст біологічно активних сполук культур молочнокислих бактерій виділених із традиційних молочнокислих продуктів Карпатського регіону.

Завдання дослідження:

1. проаналізувати здатність молочнокислих бактерій синтезувати вітаміни, амінокислоти та інші біологічно активні речовини;
2. визначити якісний і кількісний склад синтезованих вітамінів біомаси молочнокислих бактерій та їх кондиційного середовища;
3. визначити якісний та кількісний склад амінокислот біомаси молочнокислих бактерій та їх кондиційного середовища.

Об'єкт дослідження: штами молочнокислих бактерій із традиційних молочнокислих продуктів Карпатського регіону.

Предмет дослідження: визначення кількісного і якісного складу синтезованих вітамінів та вмісту амінокислот штамами молочнокислих бактерій.

Розділ 1.

ОСОБЛИВОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ КУЛЬТУР МІКРООРГАНІЗМІВ

1. Загальна характеристика молочнокислих бактерій, як пробіотиків.

Молочнокислі бактерії - це мікроорганізми, об'єднані спільними властивостями і продуктами синтезу, що мають корисний вплив на організм людини та тварин. Більшість молочнокислих бактерій належать до пробіотиків, зокрема, *Lactobacillus* sp, *Bifidobacterium* sp і *Enterococcus* sp, а також інші види бактерій, як *Vacillus* sp. і *Clostridium butyricum*, дріжджі *Saccharomyces boulardii*. Їх об'єднує ряд спільних властивостей та доведений позитивний вплив на здоров'я людини та тварин, а також сприяння лікуванню різних захворювань, зокрема, кишкових інфекцій, запалення кишечника та харчових алергій шляхом додавання вибраних штамів до харчових продуктів [REF _Ref212299311 \r \h 36].

За іншим визначенням «Пробиотики це - живі мікроорганізми, які в організмі господаря надають їм переваги для підтримання здоров'я» [REF _Ref212299349 \r \h 31]. Вони володіють властивостями, які не є характерні для звичних продуктів харчування та мають позитивний вплив на мікробіоту кишечника. Існує також таке тлумачення пробіотичних мікроорганізмів як корисних агентів, здатних стабілізувати мікробне середовище та підсилювати імунний опір. Воно охоплює участь живих клітин бактерій у модуляції фізіологічних реакцій, блокуванні патогенів і виробленні метаболітів, що сприяють підтриманню біохімічного гомеостазу [REF _Ref212299489 \r \h 8].

Корисні властивості пробіотичних мікроорганізмів забезпечуються продуктами їх біосинтезу, зокрема, амінокислотами, що є джерелом для

синтезу протеїнів і ензимів. Також пробіотичні культури можуть виступати переносниками корисних для організму речовин і мікроелементів. Молочнокислі бактерії здатні переносити цитокини - біологічно активних сполук, що регулюють ріст, розвиток і функціонування різних клітин організму, а найбільше клітин імунної системи. Цитокини доставлені пробіотиками здатні відновлювати слизову поверхню кишечника, запобігаючи діареї, запаленню і виразок кишечника, втраті ваги і хворобі Крона [REF _Ref212299474 \r \h 18].

Поєднання пробіотичних та пребіотичних компонентів у форматі синбіотиків полягає в тому, щоб ввести в раціон або у фармацевтичний засіб окремі олігосахариди, інулін чи фруктоолігосахариди, які слугують додатковими факторами росту корисних бактерій. Синбіотики, сприяють пролонгованому ефекту й водночас знижують вірогідність повторних дисбіотичних епізодів [REF _Ref212297944 \r \h 14]. У виробничих процесах використовують ко-культивування - суміш кількох штамів, яка дає синергетичний ефект [REF _Ref212299551 \r \h 15].

Є зв'язок між пробіотиками й нейрокогнітивними функціями, зокрема, відомий вплив молочнокислих бактерій на зниження рівня стресу завдяки синтезу гамма-аміномасляних сполук і регуляції на рівні кишечник-мозок, що у період воєнних дій є актуальною проблемою через стан підвищеної тривожності населення. Тому фахівці пропонують доповнювати раціон пробіотичними інгредієнтами для корекції психоемоційних станів [REF _Ref212299564 \r \h 7].

Говорачи про використання пробіотиків важливою також є і безпека цих мікроорганізмів, що забезпечується такими їх характеристиками :

1. штами що використовуються для людей є людського походження;
2. вони виділені зі здорового шлунково-кишкового тракту людини;
3. історично доведена не патогенність;
4. вони не декон'юють жовчні солі;
5. вони не несуть трансмісивних генів стійкості до антибіотиків [REF _Ref212299694 \r \h 45].

Мікроорганізми з пробіотичною активністю придатні до виживання за низьких значеннях pH та наявності жовчі дають змогу отримати позитивну дію на всьому шляху травної системи [REF _Ref212299763 \r \h 19]. Цю стійкість забезпечують аденозинтрифосфат (АТФ) синтази (бета, гамма, епсилон та дельта-ланцюг, а також субодиниці b та c), L-лактатдегідрогенази, Na⁺/H⁺ антипортери та піруваткінази, які відповідають за кислотну толерантність клітини, гени синтезу яких були знайдені в геномі. Крім того, хололігліцингідролази, цитидинтрифосфат (СТР) синтази та глюкозамін-6-фосфатдезамінази, пов'язані з толерантністю до солей жовчних кислот. Крім того, в геномі також були ідентифіковані гени, пов'язані з адгезією, такі як кластери генів біосинтезу EPS, сортаза А (специфічна для LPXTG) та білок, що зв'язує фібронектин/фібриноген [REF _Ref214139721 \r \h 29].

Порівняльна характеристика різних джерел виділення пробіотичних мікроорганізмів: грудне молоко, ферментовані сири, тощо виявила, що роль початкового біотопу є суттєвою в їх безпечності. Аналіз генів токсинів, маркерів гемолізу також важливі для вивчення безпечності кінцевого продукту [3].

Для пробіотиків важливими є також такі властивості, як можливість колонізації епітеліальних поверхонь і персистенція в шлунково-кишковому тракті людини. Важливо уніфікувати стратегії збереження пробіотиків, бо на етапі виробництва регулярно втрачається частка життєздатних клітин, аби гарантувати позитивний результат у практичному застосуванні [REF _Ref212299706 \r \h 6]. Для збереження використовують методи ліофілізації, котрі підвищують ступінь збереження життєздатних клітин до 92-95%⁰. Серед описаних методів: застосування захисних середовищ із додаванням лактози чи сухого молока, поступове зниження температури й вакуумне сушіння [REF _Ref212299719 \r \h 5].

Важливим аспектом є збереження життєздатності мікроорганізмів у ферментованих молочних продуктах, зокрема, молочнокислих бактерій.

Виявлено, що життєздатність бактерій, таких як лактококи і лактобацили, може знижуватися за тривалого зберігання через накопичення їх метаболітів, зокрема, органічні кислоти, діацетил або інші інгібуючі сполуки. Тому важливим є підбір заквасок для різних молочнокислих продуктів, щоб зробити їх вміст максимально корисним [REF _Ref212300320 \r \h 50]. Також не менш важливою є температура зберігання. Дослідження показали, що вміст вітамінів групи В у інкубованому йогурті знизився порівняно з свіжим йогуртом, на близько 10%. Але дослідження продуктів виділення, після вживання йогурту з живими і зруйнованими температурою мікроорганізмами показали, що вміст вітамінів не змінився суттєво [REF _Ref212568313 \r \h 23].

Низка праць [REF _Ref212299605 \r \h 11, REF _Ref212297944 \r \h 14, REF _Ref212299551 \r \h 15] висвітлюють фактичну картину багатогранності пробіотиків. Усі вони наголошують, що підвищення попиту на подібні препарати зумовлено не лише зростанням рівня поінформованості споживачів, а й конкретною потребою у зменшенні ризику кишкових, респіраторних і метаболічних розладів. Згідно з численними дослідженнями, адекватне призначення пробіотиків забезпечує корекцію мікробіому до фізіологічної норми, має опосередкований вплив на імунну систему та дає додаткові гарантії міцнішої резистентності до хвороб.

Узагальнюючи: в багатьох оприлюднених матеріалах аналізується структура та функція пробіотичних агентів, висуваються теоретичні обґрунтування й наводяться фактичні підтвердження клінічної ефективності бактеріальних культур. Усе це демонструє, що концепція пробіотиків - невід'ємна частина сучасної біотехнології та медицини, де грамотно підібраний штаб, стабільний технологічний процес і належний контроль безпечності набувають надзвичайної актуальності [REF _Ref212299659 \r \h 1].

2. Пробиотичні властивості мікроорганізмів.

Пробиотики як групу корисних для організму мікроорганізмів виділи насамперед через низку властивостей, які сприяють покращенню стану людського організму. Найчастіше це саме представники молочнокислих бактерій, хоча можуть бути і інші види бактерій та дріжджів, які є характерними для кишкової мікробіоти людини. Вживання таких мікроорганізмів має позитивний вплив не тільки на шлунково-кишковий тракт. На даний момент науці відомі такі корисні властивості пробіотичних мікроорганізмів:

1. виявлення і антагонізм до патогенів;
2. імуностимуляція та імуномодуляція;
3. антиканцерогенна та антимутагенна дія;
4. полегшення симптомів непереносимості лактози;
5. позитивний вплив на здоров'я вагінальних/сечовивідних шляхів;
6. позитивний вплив на серцево-судинну систему і кровотворення ;
7. зменшення частоти та тривалості розладів ШКТ (в тому числі при прийомі антибіотиків);
8. збереження цілісності слизової оболонки [REF _Ref212299349 \r \h 31].

Молочнокислі бактерії виробляють бактеріоцини та інші секретовані речовини, які здатні пригнічувати ріст, адгезію та життєдіяльність багатьох патогенів, включаючи *H. pylori*, *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium difficile* та інші. Пізні штами *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediosoccus* та інші проявляють антибактеріальну активність різними способами, такими як вироблення білкових і небілкових антимікробних сполук, конкуренцію з патогенами за рецептори на клітинах кишечника, блокування прикріплення патогенів до слизу та клітин кишкового епітелію. Декілька штамів

Lactobacillus, зокрема *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* LB і *L. acidophilus* LA1, утворюють низькомолекулярні антимікробні речовини, що знищують багато грамнегативних і грампозитивних патогенів, але не шкодять корисним *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*. Ефективність цих штамів доведена як *in vitro*, так і *in vivo*. [REF _Ref212299311 \r \h 36, REF _Ref212299694 \r \h 45]. Застосування в умовах виробництва функціональних харчових продуктів з живими бактеріальними культурами часто забезпечує конкурентне витіснення небажаних мікробів [REF _Ref212299747 \r \h 20]. Пробиотики мають здатність стимулювати макрофаги та синтез інтерферонів через взаємодію компонентів клітинних стінок із рецепторами імунних клітин [REF _Ref212300335 \r \h 40]. Додавання мікроміцетів разом із бактеріями посилює загальний антагоністичний потенціал завдяки ширшому спектру синтезу метаболітів. Така комбінація суттєво впливає на аромат і поживні властивості продуктів харчування, створюючи додаткове інгібування патогенів [REF _Ref212299551 \r \h 15]. При вивченні застосування комплексних бактеріотерапевтичних засобів при інфекціях дихальної системи виявили скорочення періоду одужання та кількості ускладнень на 30% у пацієнтів, котрі приймали пробиотики. Фахівці припускають, що подібні ефекти зумовлені посиленням імунорегуляції, оскільки окремі бактеріальні компоненти здатні індукувати синтез інтерферонів і захисних пептидів [REF _Ref212299580 \r \h 10].

Молочнокислі бактерії можуть суттєво впливати на імунну систему, активуючи або пригнічуючи запальні реакції. Різні штами LAB стимулюють фагоцитоз, вироблення цитокінів і посилюють дію вакцин. Деякі штами індукують прозапальну відповідь у формі TNF- α у клітинній лінії макрофагів діють через Toll-подібний рецептор імунної системи TLR та шлях транскрипції NF- κ B. В цілому доведено що молочнокислі бактерії у деяких випадках покращують перебіг запальних захворювань кишечника [REF _Ref212299311 \r \h 36].

Пробиотики відомі також своєю антиоксидантною активністю. Мала кількість антиоксидантів може призводити до таких захворювань, як рак, цироз, атеросклероз та інших хронічних захворювань. Дослідженні штами *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* здатні пригнічували перекисне окислення лінолевої кислоти та поглинали вільні радикали. Колориметричні виміри підкреслюють, що ці властивості залежать від штаму [REF _Ref212299311 \r \h 36]. До вільних радикалів також належить оксид азоту NO і при надмірній продукції він може реагувати з аніон-радикалами з утворенням пероксинітриду - потужного окисника, що проковує запальну відповідь. Гени iNOS/COX-2, відповідають за синтез NO, експресуються з макрофагах, активованих ліпополісахаридами. Молочнокислі бактерії, які були дослідження, знижували експресію генів iNOS/COX-2, причому найсильніший інгібувальний ефект продемонстрував штам MG5048. Таке пригнічення експресії генів різні штами демонструють на різному рівні, але в загальних межах 37-69 % [REF _Ref215525967 \r \h 30].

Призначення пробиотичних *Bifidobacterium adolescentis* чи *Enterococcus durans* людям із порушеннями функцій печінки (включно з неалкогольними жировими гепатозами), призводило до покращення її функціонального стану та зниження концентрації тригліцеридів в крові. Позитивну дію пов'язують зі здатністю пробиотиків впливати на склад жовчних кислот і регулювати ліпідний обмін. Поряд із цим зберігається загальний протизапальний ефект, адже частина метаболітів (коротколанцюгові жирні кислоти) допомагають зміцнювати захисний бар'єр кишкового епітелію [REF _Ref212299489 \r \h 8].

Молочнокислі бактерії також мають позитивний вплив на серцевосудинну систему. Був досліджений вплив штамів *Enterococcus faecium* і *Lactobacillus pentosus* на редукцію холестерин. Досліджені штами вирощували в середовищі з холестерином. Було зафіксовано зменшення вмісту холестерину на 42 - 48% . Зниження рівню холестерину має позитивний вплив оскільки є профілактикою таких захворювань як атеросклероз і тромбоз [REF _Ref215266436 \r \h 52]. Коли лактобацили чи біфідобактерії культивують у середовищі, збагаченому на мікроелементи й легкозасвоювані білкові фракції, показники синтезу вітамінів і певних функціональних пептидів зростають удвічі. Особливо цікавим виглядає вироблення фолієвої кислоти й рибофлавіну, які мають велике значення у формуванні кров'яних клітин та енергетичному метаболізмі [REF _Ref212299747 \r \h 20].

Vacillus coagulans здатні виділяти спори і ензими ліпази, що мають посилену активність проти кишкових патогенів та можливість корекції дисбіозних станів у людини [REF _Ref212300370 \r \h 41]. Підвищений синтез захисних пептидів, одночасне продукування біомаси, екзополісахаридів і антимікробних речовин *Vacillus subtilis* досягали через зміну швидкості аерації, вміст азоту, рН середовища [REF _Ref212300385 \r \h 21].

Пробиотичні властивості мікроорганізмів залежать від різних параметрів, зокрема генетики, здатності до адгезії, продукції антагоністичних молекул і рівня толерантності до чинників травної системи.

3. Пробиотичні метаболіти мікроорганізмів.

У класифікації пробиотичних метаболітів традиційно згадують вітаміни (B1, B2, B6, B9, B12), незамінні амінокислоти (лізин, триптофан, метіонін), коротколанцюгові жирні кислоти (бутират, пропіонат, ацетат), екзополісахариди та низку сигнальних молекул із протизапальними властивостями. Зазначається, що саме завдяки цим речовинам формується додатковий корисний вплив на організм. Високий вміст вітамінів сприяє профілактиці гіповітамінозів у стресових обставинах, а продукування амінокислот поліпшує білковий обмін [REF _Ref212297944 \r \h 14].

Вітаміни групи-B переважно мають різну будову але найчастіше всі вони задіяні в підтримці гомеостазу і нормального метаболізму, а також у синтезі еритроцитів. Найкраще досліджені такі вітаміни, як B2, B9, B12. Так було виявлено збільшений вміст рибофлавіну в молочнокислих продуктах таких як йогурт (2,0 мг/л) порівняно з несквашеним молоком (1,2 мг/л), що відповідно може бути наслідком діяльності пробиотичних бактерій. Білки, що присутні в молоці покращують стабільність фолату та підвищують біодоступність 5-метилтетрагідрофолату (природної форми вітаміну) і фолієвої кислоти. Щодо кобаламіну то достеменно відомо що він не виробляється рослинами, тваринами і грибами а виключно мікроорганізмами, в тому числі і молочнокислими бактеріями [REF _Ref212300410 \r \h 33].

Вживання молочнокислих бактерій також підвищує вміст вітамінів групи B у організмі. Так у дослідженні вмісту вітамінів B1, B2 і B6 у крові було виявлено, що вміст вітаміну B1 значно зріс при вживанні 200 г йогурту на день. І також вміст вітамінів B2 і B6 не значно зріс у досліджуваних групах, які вживали пробиотичний і звичайний йогурт [REF _Ref212572690 \r \h 24].

Було досліджено різні шляхи біосинтезу вітамінів групи B, зокрема вітаміну B6. З'ясовано, що в шляху біосинтезу вітаміну B6 *de novo* беруть участь такі гени *garB*, *SerC*, *dxs* та *SerA* які продукують НАД-залежну гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу, фосфосерин амінотрансферазу, 1-дезоксид-D-ксилозу-5-фосфатсинтазу, D-3-фосфогліцератдегідрогеназу відповідного. В той час, як з відновним шляхом біосинтезу B6 пов'язані такі гени, як *PdxK* та *PdxH*, продуктами яких є піридоксалькіназа та піридоксамін-5'-фосфатоксидаза [REF _Ref214139721 \r \h 29].

Вітамін K який відіграє важливу роль в здоров'ї людини, а саме у міцності кісток і є складовою факторів згортання крові. Синтез цього вітаміну також підтверджено молочнокислими бактеріями, в тому числі лактококами і ентерококами. Штами, що є характерні для кишкової мікробиоти, здатні синтезувати таку форму цього вітаміну, як менахінон. Відсутність якого може спричинити такі клінічні розлади, як внутрішньочерепний крововилив у новонароджених і можливі переломи кісток внаслідок остеопорозу [REF _Ref212300421 \r \h 42].

Було проведено дослідження з додаванням молочнокислих бактерій до ананасогового соку, дано значно збільшено в ньому вміст вітаміну C. А також даний зразок мав антагоністичну дію на деякі збудники. Що свідчить про здатність пробиотичних мікроорганізмів синтезувати такі метаболіти, як аскорбінову кислоту а також бактерицидні агенти. Розвиток даного питання є перспективний в плані створення пробиотичних

продуктів харчування, які не мають за основу молочних продуктів [REF _Ref212300436 \r \h 17].

Синергія між кількома штамми покращує загальний баланс метаболітів, оскільки одні продукують початкові речовини, а інші перетворюють їх на більш корисні для організму форми. Спільне культивування штамів, які були виділені з йогурту: *L. lactis* C15, *S. thermophilus* T15 і *L. bulgaricus* HP1 разом із штамом *L. helveticus* MP12, який діє як постачальник вільних амінокислот, призвело до збільшення загального виходу біомаси та загальної кількості молочної кислоти та амінокислот. У такої закваски загальна максимальна концентрація амінокислот була вищою, ніж у йогурті (56,88 мг/100 г проти 36,26 мг/100 г), а вміст незамінних амінокислот (лейцин + ізолейцин + валін + лізин + фенілаланін + метіонін) був у 1,5 рази більший у кефірі [REF _Ref212299593 \r \h 3, REF _Ref215323601 \r \h 48]. Подібна взаємодія виявлена в ферментованих овочах, коли *Enterococcus faecium* та *Lactobacillus plantarum* сумісно сприяють накопиченню аскорбінової кислоти. Хоча цей вітамін переважно надходить із рослинної їжі, але діяльність бактерій підсилює його стабільність [REF _Ref212300496 \r \h 9].

Продукція амінокислот відіграє серйозну роль у підвищенні цінності ферментованих напоїв. Педіококи й ентерококи, вирощені у молочному середовищі, збільшують вміст лізину, метіоніну, а також триптофану, який є прекурсором серотоніну. Припускають, що покращення амінокислотного профілю здатне підтримувати нервову систему людини, бо у кризових ситуаціях психоемоційна стабільність стає особливо затребуваною [REF _Ref212299551 \r \h 15].

Важливі також дослідження способів, якими молочнокислі бактерії розщеплюють амінокислоти з середовища, оскільки вони також важливі для їх життєдіяльності. Більшість із шляхів метаболізму починаються зі специфічних ферментів, існують випадки наявності декількох ферментів для однієї амінокислоти, як наприклад для аспаргіну чи глутаміну. Детальні шляхи катаболізму цих амінокислот поки не з'ясовані але нам точно відомо, що в секвенсованих геномах є гени, які відповідають за синтез ферментів для початкового розщеплення амінокислот. Досліджені системи показують, що для транспорту амінокислот використовуються системи з використанням енергії [REF _Ref212327409 \r \h 25].

Не менш важливим аспектом є синтез гідролітичних ферментів молочнокислими бактеріями. Різні види *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* і біфідобактерії здатні синтезувати глюкозидази, амілази та ксиланози, які сприяють ферментації вуглеводів. Такі ензими можуть проявляти потенційний синергічний вплив на травлення і полегшити симптоми порушення всмоктування в кишечнику [REF _Ref212300421 \r \h 42]. *Enterococcus durans* проявив здатність утворювати протеолітичні ензими, що розщеплюють білки до амінокислот і біоактивних пептидів. Ці пептиди діють як природні консерванти, продовжуючи термін придатності харчових продуктів. Спільне культивування з *Pediococcus acidilactici* показує зростання біодоступності вітамінів групи B [REF _Ref212300360 \r \h 51].

Метаболіти, які здатні продукувати пробіотичні мікроорганізми є:

1. Вітаміни групи B. Рибофлавін, фолієва кислота, тіамін та інші, що беруть участь в енергетичному обміні й кровотворенні.
2. Незамінні амінокислоти. Лізин, триптофан, метіонін, які впливають на синтез білків і нейромедіаторів.
3. Ферменти. Глюкозидази, амілази та ксиланози а також протеолітичні ферменти, які беруть участь у розщепленні органічних речовин. Пробіотичні метаболіти формують унікальний корисний вплив, зокрема, вітаміни підтримують численні біохімічні перетворення, амінокислоти підсилюють білковий метаболізм, ферменти забезпечують якісне розщеплення органічних речовин з продуктів харчування.

4. Характеристика *Enterococcus* sp, *Enterococcus faecium* та *Pediococcus acidilactici*

Розглядаючи спектр пробіотичних мікроорганізмів, молочнокислих бактерій, зупинимось на характеристиці декількох, цікавих для нас видів.

Розглянемо представників роду *Enterococcus* як ключових гравців у стабілізації кишкового мікробного середовища, коли організм прагне позбутися дисбіозу чи інших деструктивних процесів. Серед них *Enterococcus faecium* і *Enterococcus durans*, що демонструють стійкість у молочних середовищах з різним вмістом лактози, а їхні ферментативні продукти змінюють органолептичні характеристики харчових систем [REF _Ref212300510 \r \h 13].

Enterococcus faecium є факультативно-анаеробний кок, що завдяки потужним біохімічним реакціям здатний продукувати бактеріоцини, котрі знешкоджують низку патогенів. В клінічному аспекті *E. faecium* застосовують при дисбактеріозах, оскільки рівень приживання в кишківнику може сягати 50-70%, через високий адгезивний потенціал [REF _Ref212299706 \r \h 6, REF _Ref212297944 \r \h 14, REF _Ref212299551 \r \h 15].

Здатність *Enterococcus faecium* розщеплювати певні білкові фракції посилює якість засвоєння поживних речовин і водночас поліпшує загальний стан кишкового епітелію [REF _Ref212299489 \r \h 8, REF _Ref212299605 \r \h 11].

Багато штамів ентерококів здатні виробляють невеликі білки, що належать до родини бактеріоцинів. За даний процес відповідають такі гени *entA*, *entB*, *entXa* та *entXb*, які кодуєть відповідні бактеріоцини *EntA*, *EntB*, *EnxA* та *EnxB*. Усі ці бактеріоцини належать до антимікробних пептидів II класу, багато з яких переробляються в активні утворюються поза бактеріальною клітиною і регулюють інші бактеріальні пептиди, які називаються феромонами. Вміст феромонів у продуктах синтезу показав позитивний результат, щодо антагоністичної активності проти *Listeria monocytogenes* [REF _Ref212300567 \r \h 49].

У генетичному аналізі представника ентерококів було встановлено, що серед 2623 відкритих рамок читування генів, 89 бере участь в обміні вітамінів і кофакторів. Наявності гени, що кодуєть біохімічні шляхи, відповідальні за синтез вітамінів B1, B2, B6, фолієвої та ліпоєвої кислот, що підтверджує відкриті раніше вітамінопродукуючу активність штамів [REF _Ref212300567 \r \h 49].

E. faecium в поєднанні з *Lactobacillus plantarum* здатні синергічно інгібувати грамнегативні збудники. Автори наводять приклад у харчових виробництвах, де ці два види використовують для бродіння овочів. Наприкінці процесу помічають помірно кисле середовище з одночасною присутністю вітамінів групи B, що надає продуктам функціональних ознак [REF _Ref212300589 \r \h 22]. Втім, інший автор наголошує, що *Enterococcus faecium* буває носієм генів резистентності до антибіотиків. Тому відбір виробничих штамів відбувається шляхом ретельних молекулярно-генетичних аналізів, аби уникнути можливості передавання небажаних детермінант [REF _Ref212299719 \r \h 5].

Ентерококи поширені у молочній промисловості й беруть участь у ферментації. В умовах оптимальних субстратів здатні виділяти протеолітичні ензими, які впливають на текстуру готових виробів. Наприклад, виявлена здатність *Enterococcus durans* продукувати молочну кислоту та допоміжні метаболіти, котрі пригнічують грибки роду *Candida*, що важливо під час виготовлення заквасок із пробіотичним ефектом [REF _Ref212300608 \r \h 16].

У порівнянні з *Enterococcus faecium*, штами *Enterococcus durans* чутливі до перевищення температури 40°C. Тому процеси культивування проектуєть у діапазоні 35-37°C. Тим не менш, ці ентерококи демонструють добру виживаність при коливаннях pH. Згадано й можливість паралельного синтезу вітамінів B2 та B9, що надає додаткову цінність ферментованому харчовим системам. Підкреслюється роль *Enterococcus durans* у збалансуванні складу готового продукту: коли кислотність досягає потрібного рівня, призупиняється поширення небажаних бактерій. Лікарі-гастроентерологи відзначають цей ентерокок при хронічних кишкових дисфункціях, оскільки він показав позитивний вплив на скорочення тривалості диспептичних проявів [REF _Ref212299605 \r \h 11, REF _Ref212299747 \r \h 20].

Pediococcus acidilactici описується як представник ряду *Lactobacillales*, що демонструє підвищену толерантність до солі (до 6-8%). Цю

властивість використовують під час квашення капусти чи огірків у досить солоному розчині. Наводяться підтвердження, що рН продукуюваної кислоти коливається в межах 3,5-4,0, що зменшує ризик росту патогенів. Також відзначена антилістерінова-активність педіококів за рахунок синтезу специфічних пептидів типу педіоцинів [REF_Ref212299580 \r \h 10, REF_Ref212300510 \r \h 13, REF_Ref212301107 \r \h 28, REF_Ref212301119 \r \h 38]. *P. acidilactici* поліпшує властивості кишкового бар'єра. Під час *in vitro*-тестувань, коли клітини кишкового епітелію культивували з екстрактами педіококів, відзначався підвищений синтез імунорегулювальних компонентів. Паралельно згадує про здатність цих бактерій утворювати екзополісахариди, що виконують функцію антиадгезивного щита проти патогенів [REF_Ref212300608 \r \h 4, REF_Ref212300589 \r \h 22].

Підсумовуючи, *Enterococcus faecium* вирізняється високою адгезією та антагонізмом, *Enterococcus durans* придатний для різних харчових ферментацій і характеризується помірною температурною толерантністю, а *Pediosoccus acidilactici* показує хорошу стійкість до солі й може продукувати бактеріоцини проти проєдставників роду *Listeria*.

Дослідження підтверджують, що кожен із зазначених видів, будучи частиною пробіотичного комплексу, вносить власний внесок у загальну стабілізацію кишкового біоценозу. Такі синергічні результати вигідно досягти, коли укладено мультикомпонентні рецептури: *E. faecium* + *P. acidilactici* або *E. durans* + *Lactobacillus plantarum* тощо [REF_Ref212299580 \r \h 10]. Звідси випливає ідея подальшого застосування методів високоефективної рідинної хроматографії, аби кількісно оцінити метаболіти, що виробляються кожним видом у мікробних консорціумах.

5. Визначення вмісту вітамінів, амінокислот та інших метаболітів за допомогою ВЕРХ

Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) успішно застосовується для визначення як жиророзчинних, так і водорозчинних вітамінів у біологічних і рослинних матрицях. Метод працює у режимі SRM, найчастіше з іонізацією ESI, і використовує протоновані іони як прекурсори. Хоча повне хроматографічне розділення не завжди потрібно, воно допомагає зменшити матричні ефекти, які є основною проблемою методу. Недоліками також є висока вартість обладнання і використання органічних розчинників. Було запропоновано підхід до кількісного аналізу метаболітів у культуральних рідинах *Enterococcus* та *Pediosoccus* за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії. Особливість полягає в тому, що зразки піддають складному етапу підготовки: очищення й фільтрація, видалення білкових домішок, а тоді пропускання через колонку з відповідним сорбентом. Отримані піки оцінюються за довжиною хвилі УФ- або флуориметричного детектора, і визначається кількісний вміст вітамінів чи амінокислот. Описуються процедури фракційного збору, коли кожен фракцію піддають додатковій детекції, наприклад, флуоресцентному аналізу або мас-спектрометрії. Ці глибші підходи дозволяють знайти слідові кількості деяких сполук - антибактеріальних пептидів чи антиоксидантних компонентів. На завершення процесу з'являється повна картина метаболітного профілю *Enterococcus* або *Pediosoccus*, що корисно як для фармацевтики, так і для харчових технологій [REF_Ref212299763 \r \h 19, REF_Ref215437273 \r \h 53].

Важливо зазначити, що під час ідентифікації вітамінів за допомогою ВЕРХ, варто звертати увагу на такі позначки, як час утримання і УФ-спектр. Таким чином порівнявши ці показники дослідного зразка з показниками стандартних зразків, можна з певністю зробити висновок про наявність чи відсутність у дослідному зразку вітамінів чи інших об'єктів дослідження. За допомогою цього науковці дослідили вміст вітаміну B12 у культурі *Lactobacillus plantarum*, порівнявши вище згадані параметри і знайшовши подібність, було доведено синтез вітамінів даним штамом молочнокислих бактерій [REF_Ref212301168 \r \h 35].

Переконали результати подано у публікації, де методом ВЕРХ встановили, що при вирощуванні *Bacillus coagulans* у середовищі з додаванням джерел азоту спостерігалася зростання синтезу вітаміну B2 майже на 40%. Лабораторні дані підтвердили, що навіть у промислових масштабах можна досягти підвищеної продукції метаболітів, якщо здійснити статистичну оптимізацію параметрів культивування [REF_Ref212300370 \r \h 41].

Також були проведенні дослідження де вміст вітамінів B3 і C у молочнокислих продуктах, були дослідженні протягом певного терміну зберігання у холодильнику. Результати показали, що протягом терміну зберігання в холодильнику вміст вітамін B3 підвищився, найбільший підйом відбувся в перші сім дні, за рахунок активності бактерій. Вітамін C мав найбільший вміст в перший день, після чого знизився і знову зріс, що також пов'язано з циклами життєдіяльності мікроорганізмів [REF_Ref212301191 \r \h 43].

Розглядаючи практичну сторону, можна пояснити, що визначення рівнів вітамінів B1, B2, B6, B9, B12 дає можливість відслідкувати, в яких умовах бактеріальні культури проявляють максимум продуктивності. Аналогічно моніторять утворення деяких антиоксидантних сполук чи органічних кислот [5]. У інших публікаціях згадується, що ВЕРХ практикують не тільки для первинного скринінгу штамів, а й для періодичних перевірок партій біопрепаратів, коли постає мета переконалися, що вміст метаболітів не знизився під час зберігання [REF_Ref212300335 \r \h 40].

Також у дослідженнях йдеться про використання ВЕРХ для оцінки амінокислотного профілю *Enterococcus faecium*: після 48 год ферментації було виявлено помітне збільшення лізину та триптофану [REF_Ref212301223 \r \h 27]. Подібний висновок було викладено у досліді з *Pediosoccus acidilactici*, де зафіксовано підвищення синтезу амінокислот на 25-30% за умови зміненої швидкості аерації. Вочевидь, ВЕРХ стає провідним методом, оскільки мікробіологи отримують достатню роздільну здатність і високоточний кількісний аналіз [REF_Ref212300360 \r \h 51].

Очевидна зручність ВЕРХ для контролю маркерів якості, серед яких - рибофлавін, фолієва кислота, лізин, триптофан. Логіка зрозуміла: щойно накопичення певної речовини сягає максимуму, ферментацію припиняють чи переводять до стадії концентрування штамів. Така схема виробництва йде в руслі загальної стратегії ефективного використання ресурсів і швидкого виходу на ринок [REF_Ref212301223 \r \h 27].

Науковці приділяють чимало уваги стандартизації методу: різні виробники пропонують колонки з урахуванням специфіки аналізованих молекул - полярні, неполярні чи йонно-парні варіанти. Вказано, що оптимальний розділ виникає при 35°C і тиску 120-150 бар у системі ВЕРХ. Також згадується про необхідність коректного валідування методики: перевіряють лінійність, повторюваність, межі виявлення. Оскільки це формує основу достовірності висновків [REF_Ref212299564 \r \h 7, REF_Ref212300589 \r \h 22].

У контексті аналізу літератури робимо висновок, що ВЕРХ ставить високу планку у виявленні та вимірюванні корисних речовин. Після цього етапу виробник може регулювати параметри вирощування, змінювати склад середовища, тривалість ферментації чи температурний режим. У кінцевому варіанті виходить пробіотичний продукт (препарат чи харчова матриця) із цільовим вмістом вітамінів B-групи, амінокислот і органічних кислот.

Підсумком стає думка, що сучасний метод ВЕРХ у поєднанні з адекватно відібраними бактеріальними штамми створює потужний інструмент, здатний перетворювати звичайний ферментований продукт на функціональний із високим вмістом вітамінів та амінокислот. Кожна лабораторна перевірка зменшує ризик браку і закріплює репутацію виробника, що позиціонує власні продукти як безпечні, поживні та привабливі для споживача [REF_Ref212300589 \r \h 22].

Таким чином, застосування ВЕРХ при визначенні метаболітів різних штамів молочнокислих бактерій розкриває широкі горизонти розвитку біофармацевтичних і харчових технологій, де безпека, стабільність і якісне наповнення продукту стають пріоритетом у непростих суспільних

обставинах.

Розділ 2.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Нарощування біомаси мікроорганізмів

Підготовка до нарощування біомаси мікроорганізмів.

Обладнання, посуд, реактиви:

- штами *Enterococcus faecium* 12, 18
- штами *Enterococcus* sp. 3/28, 3/29,
- штам *Pediococcus acidilactici* 1/8, 2/5
- ваги аналітичні
- дозатори різних об'ємів
- центрифуга
- пластиковий хімічний посуд
- скляний хімічний посуд
- пептон
- триптон
- дріжджовий екстракт
- глюкоза
- гідрофосфат калію
- цитрат амонію
- сульфат магнію
- сульфат марганцю
- полісорбат 80
- ацетат натрію
- трис / tris
- вода дистильована

Методика нарощування біомаси

Нарощування біомаси відбувалось у рідкому середовищі для глибинного нарощування біомаси. Приготування середовища відбувалось за таким складом:

Таблиця 1. **Середовище для глибинного нарощування біомаси молочнокислих бактерій**

Складники середовища Кількість г/л

Пептон 10

Триптон 10

Дріжджовий екстракт 5

Глюкоза 20

Гідрофосфат калію 2

Цитрат амонію 2

Сульфат магнію 0,1

Сульфат марганцю 0,05

Полісорбат 80 1 мл

Ацетат натрію [для *Pediococcus acidilactici*] 5

Трис / Tris [для *Enterococcus faecium/sp*] 5/1

Вода дистильована 1л

Всі компоненти середовища змішують розчиняючи їх в дистильованій воді. Приготоване середовище автоклавують (30-40 хв за температури 120 °С). Після цього додають мікроорганізми і очікують 12-18 годин для нарощення біомаси. Після цього середовище наливають у пробірки для центрифугування і центрифугують 10 хв при 4000 об/хв, таким чином осаджуючи біомасу на дні пробірки. Кондиційне середовище зливають і повторюють процес потрібну кількість раз. Підчас останнього етапу осадження осад розсуспендують в воді та проводять визначення кількості КУО та вагу біомаси. для підрахунку життєздатних клітин роводять десятикратне розведення 10 разів та посів на середовище TSB для визначення КУО.

Вагу вологої біомаси визначають зваживши пусті пробірки для центрифуги і пробірки вже наповнені біомасою. Результати віднімають і отримують вагу біомаси.

Підрахунок КУО відбувається шляхом прямого підрахунку кількості колоній на середовищах з певним розведенням і обчисленням результатів відповідно до розведення.

2. Визначення вмісту вітамінів за допомогою високоефективної рідинної хроматографії.

Визначення ідентичності тіамін гідрохлориду, рибофлавіну 5-фосфату, нікотинаміду, нікотинової кислоти, піридоксину, аскорбінової кислоти та кальцію пантотенату.

Визначення ідентичності проводять методом рідинної хроматографії, порівнюючи час виходу піків тіамін гідрохлориду, рибофлавіну 5-фосфату, нікотинаміду, нікотинової кислоти піридоксину, аскорбінової кислоти та кальцію пантотенату на хроматограмах робочого розчину суміші стандартних зразків та піків, що відповідають тіамін гідрохлориду, рибофлавіну 5-фосфату, нікотинаміду, нікотинової кислоти, піридоксину, аскорбінової кислоти та кальцію пантотенату на хроматограмах робочого розчину досліджуваної проби.

Підготовка до визначення кількісного вмісту тіамін гідрохлориду, рибофлавіну 5-фосфату, нікотинаміду, нікотинової кислоти, піридоксину, аскорбінової кислоти та кальцію пантотенату.

4 Обладнання, посуд, реактиви:

1. система високоефективної рідинної хроматографії, яка забезпечує створення достатнього тиску для прокачування елюента крізь аналітичну хроматографічну колонку зі швидкістю 1,0 мл/хв;
2. оптичний детектор, який забезпечує виявлення сигналу від елюента за оптичною густиною за довжини хвилі 200 нм (для кальцію пантотенату) та 265 нм (для решти водорозчинних вітамінів); (або за використання скануючого спектрофотометричного детектора в області 192 - 400 нм);
3. колонка хроматографічна, розміри: 250x4,6 мм, заповнена сорбентом Luna Omega 5 мкм Polar C18 100 Å або аналогічна;
4. ваги аналітичні з точністю зважування 0,0001 г;
5. баня ультразвукова Bandelin RK 103 Н або аналогічна;
6. шейкер орбітальний;
7. центрифуга Sigma або аналогічна;
8. дозатори різних об'ємів;
9. ацетонітрил для хроматографії (HPLC, gradient grade);
10. кислота фосфатна 14,65 М, 85%, Merck;
11. натрію гідроксид х.ч.;
12. **вода очищена Р, згідно з ДФУ 2.0, 2015, с 602;**
13. тіамін гідрохлориду, сертифікований стандартний зразок;
14. рибофлавіну 5-фосфату сертифікований стандартний зразок;
15. нікотинаміду сертифікований стандартний зразок;
16. нікотинової кислоти стандартний зразок;
17. піридоксину стандартний зразок;
18. аскорбінової кислоти стандартний зразок;
19. **кальцію пантотенату сертифікований стандартний зразок;**
20. **фільтри мембранні з розміром пор 0,2-0,5 мкм;**
21. **посуд лабораторний згідно з ДСТУ ISO 4787:2009 «Посуд лабораторний скляний. Посуд мірний. Методи використання та перевірення місткості».**

Підготовка розчину рухомої фази

Підготовка буферного розчину.

У склянку місткістю 1000 мл вносять 3 мл 14,65 М фосфатної кислоти, додають 900 мл води очищеної Р, перемішують. Доводять рН розчину до 3,0 за допомогою 1 М р-ну натрію гідроксиду. Вміст склянки **переносять у мірну колбу місткістю 1000 мл та доводять об'єм розчину до позначки водою очищеною Р, перемішують.**

Рухомою фазою є суміш ацетонітрилу буферний розчин (СВ) у градієнтному елююванні:

Таблиця 2. **Співвідношення компонентів рухомої фази можна змінювати для забезпечення достатнього розділення піків на хроматограмах розчинів досліджуваних препаратів.**

Т/хв	С	В
0	1	99
6	1	99
16	3	97
18	10	90
23	10	90
31	20	80
45	50	50
50	70	30
70	1	99
90	1	99

Підготовка робочого розчину суміші стандартних зразків водорозчинних вітамінів.

Близько по 25 мг (точна наважка) сертифікованих стандартних зразків кожного водорозчинного вітаміну поміщають у мірну колбу місткістю 1000 мл, додають 800 мл буферного розчину, **піддають дії ультразвуку впродовж 15 хвилин без додаткового нагрівання, охолоджують та доводять об'єм буферним розчином до позначки.**

100 мл розчину містить близько 0,025 мг водорозчинних вітамінів (тіамін гідрохлориду, рибофлавіну 5-фосфату, нікотинаміду, нікотинової кислоти, піридоксину, аскорбінової кислоти та кальцію пантотенату). Розчин досліджуваної проби використовують свіжоприготованим.

Підготовка робочого розчину досліджуваної проби.

Близько 1 г біомаси бактерій поміщають у пробірку для центрифуги місткістю 50 мл, додають 10 мл буферного розчину, розсуспендовують та струшують протягом 15 хвилин за допомогою шейкера. Потім зразки поміщають в центрифугу зі швидкістю обертання 3500 об/хв на 10 хвилин, для розділення. Після центрифугування відбирають рідку фазу в яку були екстраговані вітаміни. Розчин досліджуваної проби використовують свіжоприготованим.

3. Визначення вмісту амінокислот за допомогою високоефективної рідинної хроматографії.

Визначення ідентичності амінокислот.

Визначення ідентичності проводять методом рідинної хроматографії, порівнюючи час виходу піків досліджуваних амінокислот, а саме аргініну, аспарагіну, глутаміну, цитруліну, аспартату, проліну, аланіну, метіоніну, валіну, триптофану, феніланіну, лейцину, цистину, орнітину, лізину та таурину на хроматограмах робочого розчину суміші стандартних зразків та піків, що відповідають даним амінокислотам на хроматограмах робочого розчину досліджуваної проби.

Підготовка до визначення кількісного вмісту амінокислот.

4. Обладнання, посуд, реактиви:

22. система високоефективної рідинної хроматографії, яка забезпечує створення достатнього тиску для прокачування елюента крізь аналітичну хроматографічну колонку зі швидкістю 0,45 мл/хв;

23. оптичний детектор, який забезпечує виявлення сигналу від елюента за оптичною густиною за довжини хвилі 350 нм (або за

використання скануючого спектрофотометричного детектора в області 192 - 400 нм);

24. колонка хроматографічна, розміри: 250x3,0x3 мкм, заповнена сорбентом Acclaim Polar Advantage або аналогічна;

25. ваги аналітичні з точністю зважування 0,0001 г;

26. баня ультразвукова Bandelin RK103H або аналогічна;

27. термостат Memmert

28. водяна баня лабораторна;

29. дозатори різних об'ємів;

30. ацетонітрил для хроматографії (HPLC, gradient grade);

31. кислота хлоридна 15%;

32. кислота фосфатна х.ч.;

33. розчин натрію тетраборату 0,1 М (14,5 г/л);

34. 2,4-динітро-1-флуорбензол ;

35. розчин натрію дигідрогенфосфату рН 2,4, 0,02 М;

36. вода очищена Р, згідно з ДФУ 2.0, 2015, с. 602;

37. аргінін, сертифікований стандартний зразок;

38. аспарагін, сертифікований стандартний зразок;

39. глутамін, сертифікований стандартний зразок;

40. цитрулін, сертифікований стандартний зразок;

41. аспартат, сертифікований стандартний зразок;

42. пролін, сертифікований стандартний зразок;

43. аланін, сертифікований стандартний зразок;

44. метіонін, сертифікований стандартний зразок;

45. валін, сертифікований стандартний зразок;

46. триптофан, сертифікований стандартний зразок;

47. фенілаланін, сертифікований стандартний зразок;

48. лейцин, сертифікований стандартний зразок;

49. цистин, сертифікований стандартний зразок;

50. орнітин, сертифікований стандартний зразок;

51. лізин, сертифікований стандартний зразок;

52. таурин, сертифікований стандартний зразок;

53. фільтри мембранні з розміром пор 0,2-0,5 мкм;

54. посуд лабораторний згідно з ДСТУ ISO 4787:2009 «Посуд лабораторний скляний. Посуд мірний. Методи використання та перевірки місткості».

Підготовка розчину рухомої фази

Підготовка буферного розчину.

У склянку місткістю 1000 мл вносять 3,12 г натрію дигідрогенфосфату, додають 900 мл води очищеної Р, перемішують. Доводять рН розчину до 2,4 за допомогою 1 М р-ну фосфатної кислоти. Вміст склянки переносять у мірну колбу місткістю 1000 мл та доводять об'єм розчину до позначки водою очищеною Р, перемішують. Рухомою фазою є суміш буферний розчин : ацетонітрил (В : С) у градієнтному елюванні:

Таблиця 3. Схема градієнту

Час, хв Канал В, % Канал С, %

0 85 15

22 85 15

23 75 25

37 75 25

43 70 30

57 68 32

68 64 36

77 50 50

93 40 60

99 40 60

105 85 15

Підготовка робочого розчину суміші стандартних зразків амінокислот.

Близько до 10 мг (точна наважка) сертифікованих стандартних зразків кожної амінокислоти поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл доводять до мітки 0,1 М розчином натрію тетраборату (14,5 г/л). Потім піддають дії ультразвуку впродовж 15 хвилин без додаткового нагрівання і додатково розводять 1:5 0,1 М розчином натрію тетраборату (14,5 г/л).

0,5 мл проби вносять у пробірку з притертим корком, додають 4 мл натрію тетраборату та 0,5 мл 0,05 М розчину 2,4-динітро-1-флуорбензолу в ацетонітрилі. Суміш поміщають на водяну баню протягом 1 години за температури 60°C. Опісля швидко охолоджують в темному місці та додають 5 мл 50% розчину ацетонітрилу у воді. Розчин досліджуваної проби використовують свіжоприготованим.

Підготовка робочого розчину досліджуваної проби середовища вирощування.

Близько 10 мл проби наливають в колбу на 50 мл і доводять до мітки 0,1 М розчином натрію тетраборату (14,5 г/л). Потім піддають дії ультразвуку впродовж 15 хвилин без додаткового нагрівання і додатково розводять 1:5 0,1 М розчином натрію тетраборату (14,5 г/л).

Опісля 0,5 мл проби вносять у пробірку з притертим корком, додають 4 мл натрію тетраборату та 0,5 мл 0,05 М розчину 2,4-динітро-1-флуорбензолу в ацетонітрилі. Суміш поміщають на водяну баню протягом 1 години за температури 60°C. Опісля швидко охолоджують в темному місці та додають 5 мл 50% розчину ацетонітрилу у воді. Розчин досліджуваної проби використовують свіжоприготованим.

Підготовка робочого розчину досліджуваної проби біомаси.

З біомаси клітин відбирають наважку вагою 100 мг у колбу на 10 мл і доводять до мітки 15% розчином кислоти хлоридної та поміщають у

термостат Memmert протягом 7 годин за температури 140 С ° для кислотного гідролізу білків на амінокислоти. Опісля доводять рН до 9,6 4 М розчином натрію гідроксиду та поміщають в колбу на 50 мл і доводять об'єм 0,1 М розчином натрію тетраборату (14,5 г/л).

1 мл гідролізованої проби вносять у пробірку з притертим корком, додають 4 мл натрію тетраборату та 0,5 мл 0,05 М розчину 2,4-динітро-1-флуорбензолу в ацетонітрилі. Суміш поміщають на водяну баню протягом 1 години за температури 60°С. Опісля швидко охолоджують в темному місці та додають 5 мл 50% розчину ацетонітрилу у воді. Розчин досліджуваної проби використовують свіжоприготованим.

Розділ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

1. Результати хроматографічного дослідження вмісту вітамінів

В результаті хроматографічного дослідження, яке було здійснено на рідинному хроматографі WATERS Alliance 2695, було виявлено синтез мікроорганізмами таких вітамінів: В1, рибофлавін 5-фосфат (форма вітаміну В2), РР, В3 С В6 та В5. Визначення покладалось на подібність часу утримання і УФ-спектру кожного з вітамінів у стандартному зразку і дослідному зразку біомаси штамів, з цього ми можемо зробити висновок, що дані піки відповідають переліку вітамінів.

Для порівняння був використаний розчин стандартних зразків тіамін гідрохлориду, рибофлавіну 5-фосфату, нікотинаміду, нікотинової кислоти піридоксину, аскорбінової кислоти та кальцію пантотенату. Стандартні зразки зважили у такій кількості:

1. тіамін гідрохлориду - 23,3 мг;
2. рибофлавіну 5-фосфату - 49,6 мг;
3. нікотинаміду - 22,4 мг;
4. нікотинової кислоти - 25,3 мг;
5. піридоксину - 20,9 мг;
6. аскорбінової кислоти - 29,2 мг;
7. кальцію пантотенату - 28,5 мг.

Дані стандартні зразки розчинили у 1 літрі буферного розчину. На хроматограмах (рис. 1.1., рис. 1.2.) ми можемо бачити піки відповідних вітамінів за часом їх виходу. Час виходу кальцію пантотенату реєструвався при довжині хвилі 200 нм на відміну від інших вітамінів, які реєструвалися при довжині хвилі 265 нм.

Рис. 1.1. Хроматограма стандартних зразків вітамінів, Довжина хвилі 265 нм, Час утримання: вітаміну В1 - 4,7 хв, вітаміну РР - 6,1 хв, вітаміну В3- 12,2 хв, рибофлавін 5-фосфату - 30,6 хв.

Рис. 1.2. Хроматограма стандартних зразків вітамінів, Довжина хвилі 200 нм, Час утримання: В5 - 21,9 хв.

Для визначення кількісного вмісту вітамінів використовувалась біомаса молочнокислих бактерій. Штами мікроорганізмів утворили її у таких кількостях:

1. *Pediococcus acidilactici* 1/8 - 2,44 г, КУО 20,6·1010;
2. *Pediococcus acidilactici* 2/5 - 2,16 г, КУО 47,4·1010;
3. *Enterococcus faecium* 12 - 2,81 г, КУО 67,0·1010;
4. *Enterococcus faecium* 18 - 3,08 г, КУО 37,1·1010;
5. *Enterococcus* sp 3/28 - 1,91 г, КУО 37,8·1010;
6. *Enterococcus* sp 3/29 - 2,14 г, КУО 17,5·1010.

До отриманої біомаси додали по 20 мл буферного розчину, екстрагували змішуванням протягом 15 хвилин, потім розділяли за допомогою центрифуги. Отриманий супернатант, у якому екстрагувалися вітаміни, використовували для хроматографії.

Оскільки розведення стандартного зразку і препарату відрізнялось, ми не можемо порівнювати хроматограми стандартних зразків (рис. 1.1, рис. 1.2.) з хроматограмами досліджуваних зразків (рис. 2.1 - рис. 7.2.). Але є можливість порівняти рівень синтезу вітамінів між собою.

Рис. 2.1. Хроматограма вітамінів зразка *Pediococcus acidilactici* 1/8, Довжина хвилі 265 нм, Час утримання: вітаміну В1 - 4,7 хв, вітаміну РР - 6,1 хв, вітаміну В3- 12,2 хв, рибофлавін 5-фосфату - 30,6 хв.

Рис. 2.2. Хроматограма вітамінів зразка *Pediococcus acidilactici* 1/8, Довжина хвилі 200 нм, Час утримання: вітаміну В5 - 21,9 хв. Досліджуючи цей зразок *Pediococcus acidilactici* 1/8 (рис. 2.1. - рис. 2.2) ми можемо відзначити стабільний синтез вітамінів В1 та РР. Синтез В3 у зразку порівняно вищий. Рибофлавін 5-фосфат ми можемо бачити лише у невеликих кількостях, що може свідчити про те що він знаходиться в залишкових кількостях. Також видно хороший рівень синтезу вітаміну В5.

Рис. 3.1. Хроматограма вітамінів зразка *Pediococcus acidilactici* 2/5, Довжина хвилі 265 нм, Час утримання: вітаміну В1 - 4,7 хв, вітаміну РР - 6,1 хв, вітаміну В3- 12,2 хв, рибофлавін 5-фосфату - 30,6 хв.

Рис. 3.2. Хроматограма вітамінів зразка *Pediococcus acidilactici* 2/5, Довжина хвилі 200 нм, Час утримання: вітаміну В5 - 21,9 хв. На даному зразку *Pediococcus acidilactici* 2/5 (рис. 3.1. - рис. 3.2.) ми бачимо стабільний синтез вітамінів В1 та РР. Очевидний високий синтез В3 у зразку. Рибофлавін 5-фосфат ми можемо бачити лише у невеликих кількостях, що може свідчити про те що він знаходиться в залишкових кількостях. Також варто відзначити, що синтез вітаміну В5 у зразку 2/5 є значно меншим ніж у зразку *Pediococcus acidilactici* 1/8.

Рис. 4.1. Хроматограма вітамінів зразка *E. faecium* 12, Довжина хвилі 265 нм, Час утримання: вітаміну В1 - 4,7 хв, вітаміну РР - 6,2 хв, вітаміну В3- 12,2 хв, рибофлавін 5-фосфату - 30,7 хв.

Рис. 4.2. Хроматограма вітамінів зразка *E. faecium* 12, Довжина хвилі 200 нм, Час утримання: вітаміну В5 - 21,9 хв.

Рис. 5.1. Хроматограма вітамінів зразка *E. faecium* 18, Довжина хвилі 265 нм, Час утримання: вітаміну В1 - 4,7 хв, вітаміну РР - 6,2 хв, вітаміну В3- 12,1 хв, рибофлавін 5-фосфату - 30,7 хв.

Рис. 5.2. Хроматограма вітамінів зразка *E. faecium* 18, Довжина хвилі 200 нм, Час утримання: вітаміну В5 - 21,9 хв.

У зразках *E. faecium* (рис. 4.1. - рис. 5.2.) ми можемо бачити, що синтез вітамінів В1 та РР знаходиться на майже такому самому рівні як і в *P. acidilactici*. Синтез вітаміну В3 також залишається високим, хоча у штаму 18 він нижчий ніж у штаму 12. Рибофлавін 5-фосфат ми також можемо бачити лише у невеликих кількостях. В той час як синтез вітаміну В5 збільшений порівняно зі синтезом цього вітаміну у *P. acidilactici*.

Рис. 6.1. Хроматограма вітамінів зразка *Enterococcus* sp 3/28, Довжина хвилі 265 нм, Час утримання: вітаміну В1 - 4,7 хв, вітаміну РР - 6,2 хв, вітаміну В3- 12,2 хв, рибофлавін 5-фосфату - 30,7 хв.

Рис. 6.2. Хроматограма вітамінів зразка *Enterococcus* sp 3/28, Довжина хвилі 200 нм, Час утримання: вітаміну В5 - 21,9 хв.

Рис. 7.1. Хроматограма вітамінів зразка *Enterococcus* sp 3/29, Довжина хвилі 265 нм, Час утримання: вітаміну В1 - 4,7 хв, вітаміну РР - 6,2 хв, вітаміну В3- 12,2 хв, рибофлавін 5-фосфату - 30,7 хв.

Рис. 7.2. Хроматограма вітамінів зразка *Enterococcus* sp 3/29, Довжина хвилі 200 нм, Час утримання: вітаміну В5 - 21,9 хв.

Для *Enterococcus* sp (рис. 6.1. - рис. 7.2.) синтез В1, РР та рибофлавін 5-фосфату залишається на тому ж рівні що і в попередніх штаммах. Але ми можемо побачити високий рівень синтезу вітамінів В3 і В5 у порівнянні з іншими штаммами.

Було проведено додаткове дослідження в ході якого було також виявлено, окрім вище зазначених, синтез вітаміні В6 і С усіма штаммами мікроорганізмів. Ми можемо бачити результати на наступних хроматограмах (рис. 8. - рис. 10.), представлені лише декілька зразків оскільки результати подібні до попереднього дослідження.

Рис. 8. Хроматограма стандартних зразків вітамінів, Довжина хвилі 265 нм, Час утримання: вітаміну В1 - 3,7 хв, вітаміну С - 4,2 хв, вітаміну В3- 6,5 хв, вітаміну В6 - 8,1 хв.

Рис. 9. Хроматограма вітамінів зразка *Pediosoccus acidilactici* 2/5, Довжина хвилі 265 нм, Час утримання: вітаміну В1 - 3,4 хв, вітаміну С - 4,3 хв, вітаміну В3- 6,5 хв, вітаміну В6 - 8,3 хв.

Рис. 10. Хроматограма вітамінів зразка *E. faecium* 12, Довжина хвилі 265 нм, Час утримання: вітаміну В1 - 3,4 хв, вітаміну С - 4,3 хв, вітаміну В3- 6,5 хв, вітаміну В6 - 8,3 хв.

Отже ми можемо спостерігати у всіх досліджуваних штаммах значний синтез вітаміну В6, який знаходить на рівні близькому до синтезу В3 і трохи менший синтез вітаміну С, який можна порівняти з синтезом вітамінів В1 і РР. Також варто відмітити, що штамми *Pediosoccus acidilactici* 2/5 і *Enterococcus* sp 3/28, 3/29 залишаються лідерами в синтезі вітамінів.

Також було проаналізовано середовище вирощування мікроорганізмів, до і після того як в ньому відбулося нарощення біомаси усіх досліджуваних штамів молочнокислих бактерій (рис. 11.1-11.2).

Рис. 11.1. Хроматограма середовища до вирощування мікроорганізмів. Довжина хвилі 265 нм.

Рис. 11.2. Хроматограма середовища в якому вирощувалися мікроорганізми. Довжина хвилі 265 нм.

В самому середовищі, в якому були вирощені бактерії, вітамінів не було виявлено, вони могли розпастися або ж просто не були виділені в середовище. Але ми можемо точно сказати, що вітаміни, що ми виявили в біомасі бактерії, власне ними синтезовані а не спожиті з чистого середовища, яке ми теж проаналізували.

Ми можемо встановити концентрацію вітамінів у наших зразках біомаси, здійснивши обчислення за формулою:

де, S_0 - середнє значення площі піків стандартного зразка;

S_1 - середнє значення площі відповідних піків дослідного зразка;

F_0 - розрахунковий кінцевий об'єм за умови однступеневого розведення стандартного зразку в мл;

F_1 - розрахунковий кінцевий об'єм за умови однступеневого розведення дослідного зразку в мл;

m_0 - маса наважки речовини порівняння, використана для при підготовці стандартного зразка, в мг;

m_1 - маса наважки препарату, використана для при підготовці дослідного зразка, в мг.

Таблиця 4. Концентрація синтезованих вітамінів у зразках, мг/г

Досліджувані вітаміни	1/8	2/5	12	18	3/28	3/29
В1	0,15	0,12	0,26	0,15	0,23	0,17
С	0,024	0,061	0,029	0,028	0,15	0,13
РР	0,18	0,23	0,22	0,24	0,38	0,31
В3	0,97	3,08	0,59	0,41	1,19	2,53
В6	0,58	1,40	0,90	0,69	3,45	3,32
Рибофлавін 5-фосфат	0,014	0,013	0,0063	0,0059	0,012	0,011
В5	1,21	0,29	1,90	2,06	4,36	3,64

З даних таблиці 4. ми можемо бачити, що більшість штамів має достатній рівень синтезу вітамінів В3 В6 і В5, концентрація варіюється від близько 1 мг/г до близько 4 мг/г. Найбільший синтез цих вітамінів виявлений у штамів *Enterococcus* sp 3/28, 3/39, хоча за рівнем синтезу вітаміну В3 штам *Pediosoccus acidilactici* 2/5 його обходить. Концентрація таких вітамінів як В1 С і РР є нижчою за попередні у всіх зразках і у всіх випадках є меншою ніж 0,5 мг/г. І варто також відмітити що синтез рибофлавін 5-фосфату знаходиться на залишковому рівні у всіх штамів, концентрація не перевищує 0,02 мг/г.

2. Результати хроматографічного дослідження вмісту амінокислот

В результаті хроматографічного дослідження, яке було проведено на рідинному хроматографі UltiMate™ 3000 DIONEX, було виявлено синтез мікроорганізмами таких амінокислот: аргінін, аспарагін, глутамін, цитрулін, аспартат, пролін, аланін, метіонін, валін, триптофан, феніланін, лейцин, цистин, орнітин, лізин. Визначення покладалось на подібність часу утримання і УФ-спектру кожної з амінокислот у стандартному зразку і дослідному зразку біомаси штамів, з цього ми можемо зробити висновок, що дані піки відповідають переліку амінокислот.

Для порівняння був використаний розчин стандартних зразків амінокислот. Стандартні зразки зважили у такій кількості:

1. аргінін - 11,2 мг;
1. аспарагін - 13,4 мг;
2. глутамін - 11,3 мг;
3. цитрулін - 12,9 мг;
4. аспартат - 11,0 мг;
5. пролін - 10,6 мг;
6. аланін - 10,3 мг;
7. метіонін - 11,7 мг;
8. валін - 12,7 мг;
9. триптофан - 12,8 мг;
10. феніланін - 11,5 мг;
11. лейцин - 12,8 мг;
12. цистин - 7,9 мг;
13. орнітин - 12,9 мг;
14. лізин - 12,1 мг.

Дані стандартні зразки розчинили у 100 мл розчину натрію тетраборату, потім додатково розвели 1:5 і для дериватизації використали 0,5 мл проби і довели до 10 мл. На хроматограмі (рис. 12.) ми можемо бачити піки відповідних амінокислот за часом їх виходу. Час виходу амінокислот реєструвався при довжині хвилі 350 нм.

Рис. 12. Хроматограма стандартних зразків амінокислот. Довжина хвилі 350 нм, Час утримання амінокислот: Таурин - 25,8 хв, Аргінін - 29,9 хв, Аспаргін - 30,6 хв, Глутамін - 32,8 хв, Цитрулін - 33,6 хв, Аспартат - 36,4 хв, Пролін - 54,1 хв, Аланін - 54,9 хв, Метіонін - 76,7 хв, Валін - 77,5 хв, Лейцин+Феніланін+Триптофан - 83,5 хв, Цистин - 86,8 хв, Орнітин - 88,7 хв, Лізин - 92,5 хв.

Для визначення кількісного вмісту амінокислот використовувалась біомаса молочнокислих бактерій. Було відібрано такі кількості біомаси :

7. *Pediosoccus acidilactici* 1/8 - 97,8 мг ;
8. *Pediosoccus acidilactici* 2/5 - 107,4 мг;
9. *Enterococcus faecium* 12 - 93,9 мг ;
10. *Enterococcus faecium* 18 - 114,5 мг;
11. *Enterococcus* sp 3/28 - 96,2 мг ;
12. *Enterococcus* sp 3/29 - 102,6 мг .

До отриманої біомаси додали по 10 мл 30% хлоридної кислоти і проводили кислотний гідроліз, отримані зразки доводили до 50 мл розчином натрій тетраборату. 1 мл отриманого розчину використали для дериватизації у пробірках, об'єм розчину яких довели до 10 мл. Отриманий зразок використовували для хроматографії.

Далі представлені хроматограми проаналізованих зразків (рис. 13. - рис. 20.) на яких ми можемо бачити вміст досліджуваних амінокислот.

Рис. 13. Хроматограма дослідного зразка *Pediosoccus acidilactici* 1/8. Довжина хвилі 350 нм, Час утримання амінокислот : Аргінін - 29,5 хв, Аспаргін - 31,6 хв, Глутамін - 34,8 хв, Пролін - 59,7 хв, Аланін - 61,1 хв, Гістидин - 74,1 хв, Метіонін - 80,3 хв, Валін - 80,7 хв, Лейцин - 85,3 хв, Феніланін - 85,9 хв, Триптофан - 86,5 хв, Цистин - 87,8 хв, Орнітин - 91,2 хв, Лізин - 95,5 хв.

Рис. 14. Хроматограма дослідного зразка *Pediosoccus acidilactici* 2/5. Довжина хвилі 350 нм, Час утримання амінокислот : Аргінін - 29,5 хв, Аспаргін - 31,6 хв, Глутамін - 34,8 хв, Пролін - 59,7 хв, Аланін - 61,1 хв, Гістидин - 74,1 хв, Метіонін - 80,3 хв, Валін - 80,7 хв, Лейцин - 85,3 хв, Феніланін - 85,9 хв, Триптофан - 86,5 хв, Цистин - 87,8 хв, Орнітин - 91,2 хв, Лізин - 95,5 хв.

Ми можемо бачити що у зразку *Pediosoccus acidilactici* 2/5, збільшений вміст майже усіх досліджуваних амінокислот порівняно зі зразком *Pediosoccus acidilactici* 1/8.

Рис. 15. Хроматограма дослідного зразка *Enterococcus faecium* 12. Довжина хвилі 350 нм, Час утримання амінокислот: Аргінін - 29,5 хв, Аспаргін - 31,6 хв, Глутамін - 35,8 хв, Цитрулін - 39,6 хв, Пролін - 59,7 хв, Аланін - 61,1 хв, Гістидин - 74,1 хв, Метіонін - 80,6 хв, Валін - 80,9 хв, Лейцин - 85,3 хв, Феніланін - 86,0 хв, Триптофан - 86,5 хв, Цистин - 87,8 хв, Орнітин - 91,2 хв, Лізин - 95,3 хв.

Рис. 16. Хроматограма дослідного зразка *Enterococcus faecium* 18. Довжина хвилі 350 нм, Час утримання амінокислот : Аргінін - 29,5 хв, Аспаргін - 29,9 хв, Глутамін - 31,8 хв, Цитрулін - 36,6 хв, Пролін - 60,0 хв, Аланін - 61,1 хв, Гістидин - 74,3 хв, Метіонін - 80,6 хв, Валін - 80,9 хв, Лейцин - 85,3 хв, Феніланін - 86,0 хв, Триптофан - 86,5 хв, Цистин - 87,8 хв, Орнітин - 91,2 хв, Лізин - 95,3 хв.

Як і у штамів *Pediosoccus acidilactici*, штам *Enterococcus faecium* 18 характеризується збільшеним вмістом амінокислот у порівнянні зі штамом *Enterococcus faecium* 12. Проте, штам *Enterococcus faecium* 18, містить менше амінокислот ніж штам *Pediosoccus acidilactici* 2/5.

Рис. 17. Хроматограма дослідного зразка *Enterococcus* sp 3/28. Довжина хвилі 350 нм, Час утримання амінокислот : Аргінін - 29,5 хв, Аспаргін - 31,9 хв, Глутамін - 34,8 хв, Пролін - 59,0 хв, Аланін - 61,1 хв, Гістидин - 73,3 хв, Метіонін - 80,5 хв, Валін - 80,8 хв, Лейцин - 85,3 хв, Феніланін - 85,9 хв, Триптофан - 86,2 хв, Цистин - 87,8 хв, Орнітин - 91,2 хв, Лізин - 95,3 хв.

Рис. 18. Хроматограма дослідного зразка *Enterococcus* sp 3/29. Довжина хвилі 350 нм, Час утримання амінокислот : Аргінін - 29,5 хв, Аспаргін - 31,9 хв, Глутамін - 34,8 хв, Пролін - 59,7 хв, Аланін - 61,1 хв, Гістидин - 73,8 хв, Метіонін - 80,5 хв, Валін - 80,8 хв, Лейцин - 85,3 хв, Феніланін - 85,9 хв, Триптофан - 86,2 хв, Цистин - 87,8 хв, Орнітин - 91,2 хв, Лізин - 95,3 хв.

Штами *Enterococcus* sp 3/28, 3/29 містять амінокислоти у майже таких самих кількостях як і штами *Enterococcus faecium* 12,18, проте, характеризуються збільшенням вмістом окремих амінокислот, а саме аланіну, валіну, фенілаланіну і орнітину. Загальний рівень вмісту амінокислот у штамів *Enterococcus* sp 3/28, 3/29 залишається меншим ніж у штамі *Pediococcus acidilactici* 2/5.

Загалом у всіх зразках якісний і кількісний амінокислотний склад є подібним. Варто відмітити, що всіх зразках ми можемо бачити високий вміст таких амінокислот, як аланін, валін, фенілаланін і орнітин. Якщо порівнювати результати різних штамів між собою, то ми можемо помітити, що вміст всіх амінокислот у штамі *Pediococcus acidilactici* 2/5 є найбільшим.

Також було досліджено вміст амінокислот в середовищі вирощування біомаси (рис.16 - рис. 17) до і після вирощування, щоб з'ясувати чи бактерії взяли амінокислоти з середовища чи синтезували самостійно.

Рис. 19. Хроматограма дослідного зразка середовища до вирощування мікроорганізмів. Довжина хвилі 350 нм, Час утримання амінокислот: Аргінін - 30,0 хв, Аспаргін - 30,9 хв, Глутамін - 34,8 хв, Серин - 35,4 хв, Цитрулін - 36,5 хв, Пролін - 55,0 хв, Аланін - 55,6 хв, Гістидин - 70,8 хв, Метіонін - 77,1 хв, Валін - 78,0 хв, Лейцин+Фенілаланін+Триптофан - 83,5 хв, Цистин - 86,8 хв, Орнітин - 88,2 хв, Лізин - 92,3 хв.

Рис. 20. Хроматограма дослідного зразка середовища після вирощування мікроорганізмів. Довжина хвилі 350 нм, Час утримання амінокислот : Аргінін - 30,0 хв, Аспаргін - 30,9 хв, Цитрулін - 37,5 хв, Пролін - 55,0 хв, Аланін - 55,6 хв, Гістидин - 68,0 хв, Метіонін - 77,5 хв, Валін - 78,2 хв, Лейцин+Фенілаланін+Триптофан - 83,9 хв, Цистин - 86,8 хв, Орнітин - 89,0 хв, Лізин - 92,3 хв.

Ми можемо бачити, що в середовищі були присутні амінокислоти і до вирощування в ньому біомаси бактерій. Після вирощування концентрація амінокислот змінилась не значно, деякі амінокислоти збільшились у концентрації а деякі зменшилися. Це може свідчити про те, що мікроорганізми поглинали деякі амінокислоти для своїх потреб а деякі виділяли в середовище як продукти метаболізму.

Ми можемо встановити концентрацію амінокислот у наших зразках біомаси і середовища, здійснивши обчислення за формулою:

де, S0 - середнє значення площі піків стандартного зразка;

S1 - середнє значення площі відповідних піків дослідного зразка;

F0 - розрахунковий кінцевий об'єм за умови одноступеневого розведення стандартного зразку в $\frac{4}{m_0}$ мл;

F1 - розрахунковий кінцевий об'єм за умови одноступеневого розведення дослідного зразку в $\frac{4}{m_1}$ мл;

m0 - маса наважки речовини порівняння, використана для при підготовці стандартного зразка, в мг;

m1 - маса наважки препарату, використана для при підготовці дослідного зразка, в мг.

Щоб зробити висновки ми маємо проаналізувати і порівняти результати дослідження вмісту амінокислот з середовища і з біомаси. Концентрація виділених амінокислот представлена в таблицях 5 і 6.

Таблиця 5. Концентрація амінокислот в середовищі в мг/мл

	Досліджувані штами мікроорганізмів						Чисте середовище	
	1/8	2/5	12	18	3/28	3/29		
Таурин	0,03491	0,05068	0,86632	1,17607	0,24108	0,22383	0,03540	
Аргінін	0,04319	0,02476	0,06301	0,05906	0,44756	0,04774	0,55212	
Аспарагін	0,13883	0,12267	0,19257	0,118032	0,22742	0,03743	0,18674	
Глутамін	0,03007	0,06842	0,01780	0,18049	0,01219	0,01883	0,02632	
Цитрулін	0,04884	0,01899	0,03369	0,03315	0,02318	0,05259	0,03554	
Аспартат	0,03918	0,05433	0,02496	0,09329	0,02463	0,02773	0,03420	
Пролін	0,12183	0,26762	0,23222	0,34377	0,32878	0,28839	0,19940	
Аланін	0,34150	0,32567	0,46917	0,42091	0,45972	0,40807	0,45259	
Метіонін	0,10980	0,11510	0,14557	0,15605	0,18438	0,16495	0,14655	
Валін	0,27182	0,42336	0,39705	0,40697	0,44812	0,38193	0,36486	
Триптофан								
Фенілаланін				1,35275	1,56505	1,93423	1,96449	2,15307
Лейцин				1,89251	2,04302			
Цистин	0,42394	0,70282	0,56740	0,62642	0,21416	0,67946	0,12401	
Орнітин	0,45387	0,51914	0,64495	0,62922	0,70301	0,6670	0,70080	
Лізин	0,01480	0,08405	0,06284	0,01899	0,01940	0,01754	0,101724	

Таблиця 6. Концентрація амінокислот в біомасі бактерій в мг/г

	Досліджувані штами мікроорганізмів							
	1/8	2/5	12	18	3/28	3/29		
Аргінін	3,343896			5,391772	2,815301	3,226384	4,896450	4,572838
Аспарагін	0,217664	0,308838	0,212351	0,253205	0,268482	0,261517		
Глутамін	0,210289	0,294972	0,168963	0,211922	0,200525	0,183594		
Цитрулін	5,727067	7,774003	5,341869	5,306891	8,036415	7,698108		
Аспартат	3,351872	5,274980	2,766219	3,179287	4,539553	4,251490		
Пролін	2,703523	3,228082	1,966090	2,361654	2,572557	2,503072		
Аланін	5,838211	13,57701	4,471798	5,255477	8,586103	8,060912		
Метіонін	0,287604	0,521521	0,329645	0,345773	0,528856	0,491474		
Валін	3,757296	6,318747	2,915741	3,396443	5,532831	5,208068		
Триптофан								
Фенілаланін				16,87492	19,09736	9,265470	11,29045	16,09540
Лейцин				15,14933				
Цистин	0,245201	0,448100	0,209350	0,261160	0,327085	0,333404		
Орнітин	6,688760	12,30958	5,795330	6,576540	8,574469	8,097074		
Лізин	1,018239	1,541161	0,895896	0,96636	1,4646170	1,385966		

З даних таблиць 5 і 6 ми можемо бачити, що концентрація амінокислот в біомасі бактерій є більшою ніж в середовищі вирощування. Що може свідчити про те бактерії поглинали амінокислоти з середовища для своїх потреб і/або виділяли їх в невеликих кількостях. Також ми бачимо, що

всі штами бактерій мають подібний амінокислотний склад. Варто відзначити те, що в штамі *Pediococcus acidilactici* 2/5 амінокислоти знаходяться в найбільшій концентрації.

ВИСНОВКИ

1. Досліджувані штами мікроорганізмів *Enterococcus faecium* 12, 18, *Enterococcus* sp. 3/28, 3/29, *Pediococcus acidilactici* 1/8, 2/5 мали здатність синтезувати такі вітаміни: В1, рибофлавін 5-фосфат (форма вітаміну В2), РР, В3 та В5В .
2. В результаті хроматографічного дослідження виявлено вміст у біомасі досліджуваних мікроорганізмів такі амінокислоти: аргінін, аспарагін, глутамін, цитрулін, аспартат, пролін, аланін, метіонін, валін, триптофан, феніланін, лейцин, цистин, орнітин та лізин.
3. Рівень біосинтезу вітамінів В1 та РР штамами *E. faecium* знаходиться на такому самому рівні як і в *P. acidilactici*, проте синтез вітаміну В3 у штаму 18 нижчий ніж у штаму 12.
4. Для *Enterococcus* sp 3/28 та 3/29 синтез В1, РР та рибофлавін 5-фосфату є на тому ж рівні що і в інших досліджуваних штамів молочнокислих бактерій, проте є вищий рівень синтезу вітамінів В3 і В5 у порівнянні з іншими штамми.
5. Синтез рибофлавін 5-фосфату знаходиться на залишковому рівні у всіх досліджуваних штамів молочнокислих бактерій.
6. Штами *Enterococcus* sp. (3/28,3/29) синтезує вітаміни В3 , В5 і В6 у великих кількостях порівняно з іншими досліджуваними штамми, проте штам *Pediococcus acidilactici* (2/5) синтезує вітамін В3 в найбільшій кількості.
7. Усі штами характеризуються високим вмістом аланіну, валіну, фенілаланіну і орнітину, найбільше місять штами *Enterococcus* sp. (3/28,3/29) і *Pediococcus acidilactici* (2/5).
8. Усі штами мають подібний амінокислотний склад, проте штам *Pediococcus acidilactici* (2/5) містить найбільшу кількість усіх амінокислот.