

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ  
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ  
Завідувач випускової кафедри  
\_\_\_\_\_ М. М. Барановський  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 р.

## **ДИПЛОМНА РОБОТА**

**(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)**

ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ «БАКАЛАВР»  
СПЕЦІАЛЬНІСТЬ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»  
ОСВІТНЬО-ПРОФЕСІЙНА ПРОГРАМА «ЕКОЛОГІЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА  
БІОЕНЕРГЕТИКА»

**Тема: «Вплив натрію, калію та кальцію на розвиток *Lactococcus lactis*»**

Виконавець: студент ЕТ-403Б

Телюк П.А.

Керівник: к.біол.н., доцент

Шаблій Л.М.

Нормоконтролер:

Дражнікова А.В.

Київ 2021

# НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ М. Барановський

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 р.

## ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

**Телюка Павла Андрійовича**

1. Тема дипломної роботи: «Вплив натрію, калію та кальцію на розвиток *Lactococcus lactis*» затверджена наказом ректора від «11» травня 2021 р. № 715/ст.
2. Термін виконання роботи: з 10 травня по 20 червня 2021 р.
3. Вихідні дані роботи: Фахові періодичні та наукові видання за темою дипломної роботи, нормативна документація.
4. Зміст пояснювальної записки: Вступ. Літературний огляд. Об'єкти та методи дослідження. Вплив мікроелементів на розвиток Вплив натрію, калію та кальцію на розвиток *Lactococcus lactis*. Висновки. Список використаних джерел.
5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: таблиць 6, рисунків 4.

## 6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Узгодження змісту дипломної роботи з дипломним керівником.	10.05.2021	
2	Складання плану виконання бакалаврської дипломної роботи.	10.05.2021	
3	Збір інформації за темою дипломної роботи: «Вплив натрію, калію та кальцію на розвиток <i>Lactococcus lactis</i> ».	11-17.05.2021	
4	Ознайомлення з методиками дослідження	18-20.05.2021	
5	Аналіз та обробка отриманих даних.	21-24.05.2021	
6	Оформлення практичної частини дипломної роботи на основі отриманих результатів.	25-26.05.2021	
7	Формулювання висновків та рекомендацій.	27-28.05.2021	
8	Перевірка дипломної роботи керівником.	31.05.2021	
9	Попередній захист дипломної роботи.	03.06.2021	
10	Захист дипломної роботи.	17.06.2021	

7. Дата видачі завдання: «10» травня 2021 р.

Керівник дипломної роботи \_\_\_\_\_ Шаблій Л.М.

Завдання прийняла до виконання \_\_\_\_\_ Телюк П.А.

## РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Вплив натрію, калію та кальцію на розвиток *Lactococcus lactis*»: 58 с., 4 рис., 5 табл., 38 літературних джерела, з них 18 англійською мовою, 2 додатки.

Об'єкт дослідження: розвиток молочнокислих бактерій, зокрема *Lactococcus lactis*.

Мета роботи: вивчення впливу натрію, калію та кальцію на розвиток *Lactococcus lactis*.

Методи дослідження: загальнонаукові, а саме теоретичні (аналіз, пояснення, класифікація, синтез, узагальнення, індукція, дедукція) та емпіричні (спостереження, опис).

Ключові слова: МІКРООРГАНІЗМ, МОЛОЧНОКИСЛА БАКТЕРІЯ, *LACTOCOCCUS LACTIS*, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, КЛІТИНА, КАЛІЙ, НАТРІЙ, КАЛЬЦІЙ

## ЗМІСТ

Вступ .....	6
Розділ 1 Місце бактерій у біосфері та їх роль у біотехнологічних виробництвах .....	9
1.1. Місце бактерій у біосфері .....	9
1.2. Роль молочнокислих бактерій у біотехнологічних виробництвах .....	13
1.3. Морфологічна характеристика молочнокислих бактерій .....	17
1.4. Фізіологічна характеристика молочнокислих бактерій .....	21
1.5. Особливості морфології та фізіології <i>Lactococcus lactis</i> .....	29
1.6. Висновки до розділу .....	30
Розділ 2 Об'єкти і методи дослідження .....	32
2.1. Культивування молочнокислих бактерій.....	32
2.2. Культивування <i>Lactococcus lactis</i> .....	33
2.3. Приготування розведення матеріалів, що містять молочнокислі бактерії.....	33
2.4. Посів молочнокислих бактерій для підрахунку .....	34
2.5. Метод визначення найбільш вірогідної кількості бактерій.....	35
2.6. Ідентифікація молочнокислих бактерій.....	37
2.7. Виділення чистої культури.....	40
2.8. Дослідження та ідентифікація клітин.....	42
2.9. Висновки до розділу .....	43
Розділ 3 Вплив макроелементів на розвиток <i>Lactococcus lactis</i> .....	44
3.1. Вплив складу поживних середовищ на розвиток мікроорганізмів .....	44
3.2. Вплив кальцію на розвиток <i>L. lactis</i> .....	45
3.3. Вплив натрію на розвиток <i>L. lactis</i> .....	47
3.4. Вплив калію на розвиток <i>L. lactis</i> .....	49

3.5.	Висновки до розділу .....	51
	Висновки.....	52
	Список бібліографічних посилань використаних джерел .....	54
	Додаток А .....	58
	Додаток Б .....	59

## ВСТУП

Наша планета населена величезною кількістю різноманітних живих істот, які разом із місцями свого мешкання складають біосферу. Представників живої природи поділяють умовно на дві великі групи: макросвіт і мікросвіт (грецьк. *makros* – великий, *mikros* – маленький). До макросвіту відносяться живі організми, які ми бачимо неозброєним оком: більшість тварин і рослин. До мікросвіту відносяться організми такого маленького розміру, що їх не видно неозброєним оком, тобто мікроорганізми: бактерії, міцеліальні та дріжджові гриби, одноклітинні водорості та найпростіші, а також віруси.

Мікроорганізми знаходяться скрізь: у ґрунті, воді, повітрі, на предметах, що нас оточують, на продуктах харчування та кормах, на рослинах, на поверхні тіла та всередині організмів тварин і людини, їх знаходять у кригах Антарктиди та в розпечених гейзерах, у піску пустель, воді морів і океанів, ґрунтах, повітрі.

Величезне поширення мікроорганізмів пояснюється їхніми загальними властивостями: малим розміром, інтенсивністю та пластичністю обміну речовин.

Розмір більшості мікроорганізмів коливається від 0,01 до 50 мкм. Розмір клітин бактерій становить у середньому 0,5-3 мкм, середня довжина паличкоподібних бактерій дорівнює 2-5 мкм. При цьому об'єм бактеріальної клітини дорівнює близько 1 мкм<sup>3</sup>. Розмір вірусів ще менший: від 10-15 до 200 нм.

Малі розміри клітин зумовлюють дуже велике співвідношення поверхні клітин із їх об'ємом порівняно з макроорганізмами. Це забезпечує високу швидкість обміну речовин мікроорганізмів із зовнішнім середовищем (крізь усю поверхню клітини) та їхній швидкий ріст. Відомі бактерії, які діляться кожні 20-30 хв. і навіть кожні 8-10 хв. Унаслідок цього з однієї клітини масою біля  $2,5 \times 10^{-12}$  г за 2-4 доби в сприятливих умовах могла б утворитися біомаса біля  $10^{10}$  тонн і більше. Насправді таке не відбувається через обмеження сторонніми, часто шкідливими факторами.

Мікроорганізми характеризуються фізіологічною різноманітністю метаболічних процесів і гнучкістю обміну речовин з навколишнім середовищем. Завдяки цьому вони можуть розвиватися на різноманітних субстратах: на папері, в ґрунті, на солоних, сухих, концентрованих харчових продуктах тощо - тобто навіть там, де не можуть жити тварини та рослини.

Отже широке поширення мікроорганізмів пояснюється винятковою витривалістю в несприятливих умовах, здатністю легко пристосовуватися до різних факторів довкілля, разюче швидким розмноженням і малими розмірами.

Діяльність мікроорганізмів різноманітна, а її наслідки великі: вони підтримують глобальний процес кругообігу речовин і енергії на Землі; їхня космічна роль полягає в тому, що вони є з'єднуючою ланкою між живою та неживою природою й цим підтримують дію глобального закону збереження матерії та енергії.

Найбільш значущою є роль мікроорганізмів у кругообігу вуглецю та азоту. Кожна жива істота обов'язково містить у собі вуглець, азот, кисень, водень у вигляді складних сполук У вигляді простих речовин вони не засвоюються ані рослинами, ані тваринами. Вони потрібні тваринам і рослинам у зв'язаній формі – в органічних і неорганічних сполуках.

Як будь-яка жива істота, бактерії потребують живлення, а їхня життєдіяльність залежить від різних факторів навколишнього середовища. Вивчення впливу цих факторів є актуальним завданням біотехнології, оскільки розширює знання про перебіг біотехнологічних процесів та дозволяє ними керувати.

Метою дослідження є вивчення впливу натрію, калію та кальцію на розвиток *Lactococcus lactis*.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні завдання:

1. Визначити місце молочнокислих бактерій у біосфері та біотехнологічних виробництвах.
2. Надати морфофізіологічну характеристику молочнокислих бактерій, зокрема *Lactococcus lactis*.
3. Розглянути об'єкти та методи дослідження молочнокислих бактерій, зокрема *Lactococcus lactis*.



4. Визначити вплив макроелементів на розвиток *Lactococcus lactis*.

Об'єктом дослідження є розвиток молочнокислих бактерій, зокрема *Lactococcus lactis*.

Предметом дослідження є вплив натрію, калію та кальцію на розвиток *Lactococcus lactis*.

При виконанні дослідження використовувались загальнонаукові методи, а саме теоретичні (аналіз, пояснення, класифікація, синтез, узагальнення, індукція, дедукція) та емпіричні (спостереження, опис).

# РОЗДІЛ 1

## МІСЦЕ БАКТЕРІЙ У БІОСФЕРІ ТА ЇХ РОЛЬ У БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВАХ

### 1.1. Місце бактерій у біосфері

Ще за стародавніх часів живий світ поділяли на царство рослин і царство тварин - доти, доки було мало відомостей про мікроорганізми

Перші повідомлення про існування найдрібніших живих істот належать нідерландському натуралісту Антоні ван Левенгуку (1632-1723). Він виготовив ручним способом лінзи зі збільшенням у 150-300 разів, сконструював перший мікроскоп, описав і замалював клітини мікроорганізмів. Роботи А. ван Левенгука поклали початок першому, морфологічному, періоду розвитку мікробіології, коли йшло накопичення знань лише про зовнішню форму мікробів, особливості їхньої будови [1].

Мікроорганізми віднесли до третього царства, для якого Е. Геккель у 1866 р. запропонував назву «протисти». За Геккелем це, головним чином, одноклітинні. За будовою клітин їх було розподілено на дві чітко обмежені групи: вищі протисти (водорості, гриби та найпростіші, що мають рослинні та тваринні риси клітин) та нижчі протисти (бактерії). Окремою групою були віруси, які не здатні розмножуватись самостійно, а лише всередині живих клітин.

Бактерії та гриби довгий час (до другої половини ХХ ст.) виносилися до царства Рослин, тому для позначення сукупності мікроорганізмів у певному середовищі користувалися терміном «мікрофлора».

Відомий мікробіолог Г. Шлегель розробив у 1987 р класифікацію, за якою живі істоти поділяються на три царства: тварини, рослини та протисти. Протисти поділяються на еукаріоти (найпростіші, водорості та гриби) та прокаріоти (еубактерії та архебактерії).

Наприкінці минулого століття була розроблена класифікація, згідно з якою живі істоти поділяються на три надцарства: акаріоти, тобто неклітинні (віруси, віроїди та пріони), прокаріоти, тобто доядерні (археї та бактерії), еукаріоти, тобто ядерні (найпростіші, водорості, гриби, рослини, тварини) [1].

Мікроорганізми присутні у біосфері Землі всюди, їх життєдіяльність вносить найважливіший вклад у круговорот вуглецю, азоту, сірки, фосфору й інших елементів, а також підтримує динамічну рівновагу в біосфері. Природними середовищами перебування мікроорганізмів є ґрунт, вода, організми рослин, тварин і людини.

Ґрунт рясно заселений мікроорганізмами, тому що в ньому є все необхідне для життя: органічні речовини, волога, захист від сонячних променів. Ґрунт є природним і сприятливим середовищем для збереження та розвитку мікроорганізмів, він є джерелом мікробів для всього довкілля. У ґрунті зустрічаються всі форми мікроорганізмів, які є на Землі: бактерії, віруси, дріжджі, гриби, найпростіші.

Загальне число мікроорганізмів в 1 г ґрунту може сягати 1-5 млрд. В одному шарі 1 га ґрунту міститься 5-10 т живої ваги бактерій, однак у різних шарах кількість мікроорганізмів неоднакова. У верхньому шарі ґрунту (шар менше 0,5 см) мікроорганізмів дуже мало. На глибині від 1 до 40 см число мікроорганізмів найбільше. В цьому шарі налічують у середньому 10-50 млн. на 1 м. У відносно чистих ґрунтах цей показник дорівнює 1,5-2 млн. на 1 м<sup>2</sup>. Глибше 40 см число мікроорганізмів знижується, в глибших шарах їхнє число невелике.

Анаеробні бактерії, які складають біля 10% бактерій ґрунту, існують у тих самих шарах, що й аеробні, тому що аеробні мікроорганізми, поглинаючи кисень, створюють умови для розвитку анаеробів [1].

Вода є сприятливим середовищем для існування мікроорганізмів, оскільки містить необхідні для їхньої життєдіяльності речовини, але в незначній кількості.

Кількість мікроорганізмів збільшується у воді восени й навесні - після дощів і танення снігу. В сонячні дні мікробів у поверхневих шарах менше, ніж у хмарні, за рахунок згубної дії ультрафіолетових променів. Прозорі води містять менше

бактерій, ніж каламутні, тому що ультрафіолетові промені можуть проникати на велику глибину.

З біологічної точки зору мікронаселення води ділиться на власне для того чи іншого водоймища, обумовлене його фізико-хімічними, біологічними особливостями (автохтонне), та не власне, яке потрапляє у водоймище ззовні, з різних джерел забруднення (алохтонне).

Основним джерелом забруднення водоймищ є стічні води. Зі стоками до водоймищ потрапляють різноманітні мікроорганізми, в тому числі й патогенні, та речовини, які мікроорганізми можуть використовувати як поживе.

Характер мікробіоти визначається специфічними умовами даного водоймища. У залежності від складу поживних речовин у воді можуть розмножуватися автотрофи (нітрифікуючі, сіркобактерії, тіонові бактерії, залізобактерії) та гетеротрофи (гниль і і бактерії, маслянокислі, збудники бродіння пектинових речовин та клітковини, гриби, водорості). Гетеротрофи проводять у водоймищах корисний процес - мінералізацію органічних речовин, які потрапляють із частинками ґрунту та стічними водами. Завдяки їхній діяльності відбувається один із механізмів самоочищення води в природі [1].

Сукупність мікроорганізмів, які пристосувалися до життя в організмі людини й тварин і не викликають будь-яких порушень фізіологічних функцій макроорганізму, називається нормальною мікробіотою.

Нормальну мікробіоту людини підрозділяють на облігатну та факультативну. До облігатної мікробіоти відносяться сапрофітні та умовно-патогенні мікроорганізми, максимально пристосовані до існування в організмі хазяїна. Факультативна мікробіота є випадковою та тимчасовою. Вона визначається надходженням мікроорганізмів із навколишнього середовища, а також станом імунної системи макроорганізму.

В ротовій порожнині людини основна маса бактерій локалізується в зубному нальоті. В 1 г сухої маси зубного нальоту міститься не менше 250 млн. мікробних клітин. Постійними мешканцями ротової порожнини є стрептококи, лактобацили, коринебактерії, бактероїди, а також дріжджові гриби, актиноміцети, мікоплазми,

спірохети. До факультативних мешканців відносяться ентеробактерії, спороутворюючі бактерії та синьогнійна паличка.

У нормально функціонуючому шлунку людини мікроорганізми відсутні, що обумовлюється бактерицидною дією шлункового соку внаслідок кислої реакції. При патологічному зсуві рН у нейтральний і лужний бік у шлунку в незначній кількості зустрічаються *Sarcina ventriculi*, *Bacillus subtilis* і деякі дріжджі.

У тонкому кишечнику живе порівняно мало бактерій ( $10^2$ - $10^3$ ), переважно аеробні форми. Проте в товстому кишечнику міститься значна кількість мікробів, що відносяться до понад 260 різних видів факультативних облигатних анаеробів. За добу з фекаліями людини виділяється близько  $17^{10}$  бактерій, які складають 1/3 сухої маси фекалій. Основними мешканцями товстого кишечника є бактероїди, біфідобактерії, фекальний ентерокок, кишкова паличка, молочнокислі бактерії та ін. Молочнокислі бактерії в кишечнику виступають у ролі антагоністів проти гнильної мікробіоти та деяких патогенних мікробів.

Із навколишнього повітря разом із пилом у дихальні шляхи людини й тварин надходить багато мікробів. Завдяки захисній функції епітелію та бактерицидній дії лізоциму й муцину слизової оболонки носа та носоглотки велика частина мікроорганізмів затримується у верхніх дихальних шляхах. Бронхи та альвеоли легень практично стерильні. В складі мікробіоти верхніх дихальних шляхів містяться відносно постійні мікроби, представлені стафілококами, коринебактеріями, стрептококами, бактероїдами, капсульними грамнегативними бактеріями та ін. Крім бактерій, у верхніх дихальних шляхах протягом тривалого часу в латентному стані можуть перебувати деякі віруси, зокрема аденовіруси. При послабленні імунних сил організму в результаті переохолодження чи виснаження умовно патогенні мікроорганізми викликають гострі катари, ангіни, бронхіти та пневмонії.

Субстратом для живлення бактерій на поверхні шкіри служать виділення потових і сальних залоз, а також відмерлі клітини епітелію. Найбільше багата на мікроорганізми шкіра відкритих частин тіла – рук, обличчя, шиї. Мікробіота шкіри в основному складається зі сапрофітних бактерій – стафілококів, бацил, мікобактерій, коринебактерій, дріжджів.

Нормальна мікробіота в організмі людини й тварин відіграє важливу роль у формуванні природного імунітету. Облігатні мікроорганізми, які продукують речовини типу антибіотиків, молочну кислоту, спирти, пероксид водню та інші сполуки, проявляють антагоністичні властивості відносно багатьох патогенних бактерій [1].

## **1.2. Роль молочнокислих бактерій у біотехнологічних виробництвах**

Значну роль у живій природі, сільському господарстві і нормальній життєдіяльності людини відіграють молочнокислі бактерії, які у природі зустрічаються на поверхні рослин (наприклад, на листках, фруктах, овочах, зернах), ризосфері та прикореневій зоні, в гниючому мулі, зовнішніх і внутрішніх епітеліальних покриттях людини, тварин, птахів, риби. Природним місцем існування молочнокислих мікроорганізмів є також молоко і кисломолочні продукти. Розповсюдження у біосфері та корисні властивості молочнокислих бактерій дозволили їм здавна зайняти особливе місце в різних галузях народного господарства.

Молочнокислі бактерії (МКБ) є однією з комерційно цінних груп мікроорганізмів. МКБ має довгий досвід застосування у молочному, хлібопекарському, рибному та м'ясному виробництві, хоча першу чисту культуру МКБ (*Bacterium lactis*, тепер відому як *Lactococcus lactis*) отримав Лістер лише у 1873 р. [2].

З незапам'ятних часів разом з їжею люди використовували молочнокислі бактерії, вживаючи такі харчові продукти, як кисле молоко, кумис, кефір, квас, квашена капуста і т.ін., не усвідомлюючи при цьому, що захищають певною мірою від шкідливого впливу кишкового загнивання та хвороботворних бактерій. Використання кисломолочних продуктів для профілактики та лікування зустрічається в «Каноні лікарської науки» Абу Ібн Сіні. На Русі використовували кисле молоко, яке скисало самостійно, або ряжанку, що являла собою кип'ячене молоко, заправлене особливою закваскою.

З часом для лікування різноманітних захворювань, особливо хронічних з тривалим перебігом або дистрофічними патологічними процесами, люди почали широко вживати їжу, харчові домішки та лікарські засоби, які містили молочнокислі бактерії.

Наукове обґрунтування ролі лактобацил для запобігання розвитку гнильних процесів у травному тракті, а також для боротьби з передчасною старістю людини було вперше зроблене на початку ХХ століття І.І. Мечниковим. Він перший привернув увагу дослідників до використання антагоністичних властивостей молочнокислих бактерій в боротьбі з гнильною мікрофлорою травного тракту. І.І. Мечников вважав, що всмоктування продуктів життєдіяльності гнильних мікроорганізмів, які знаходяться в кишковому тракті людини, таких, як індол, фенол, скатол, отруєє організм, зумовлюючи передчасну старість, а в окремих випадках навіть смерть. Мечников висунув ідею про заміну шкідливої флори кишечника на корисну. Він вважав, що це може бути здійснено за рахунок вживання молока, зброженого бактеріями *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* та іншими, що можуть пригнічувати патогенні мікроби.

Рекомендоване ним системне вживання кисломолочних продуктів на основі болгарської палички було одним з найбільш перспективних шляхів медицини ХХ століття і мало великий вплив на розвиток вчення про антагонізм мікроорганізмів та антибіотиків, дало поштовх для створення бактерійних препаратів, які використовуються для корекції і нормалізації мікрофлори кишечника. Більшість таких препаратів мають назву «еубіотики» або «пробіотики» та складаються з живих (рідкої культури або зброженого молока) чи ліофільно висушених бактерій родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* або їх сумішей [2].

Молочнокислі бактерії були споконвіку пов'язані з бродінням продуктів та їх консервацією, і сьогодні вони, безумовно, є найважливішою групою промислових мікроорганізмів, ринок збуту яких сягає мільярдів доларів. Молочнокислі бактерії використовуються як заквасочні культури для бродіння молока, овочів, м'яса, риби та злаків, а також кормів для тварин у вигляді силосу [3].

У харчовій промисловості ферментацію застосовують головним чином для одержання молочних продуктів. У сквашуванні молока зазвичай беруть участь стрептококи й молочнокислі бактерії; лактоза при цьому перетворюється в молочну кислоту. Шляхом використання інших реакцій, які супроводжують головний процес або йдуть при наступній обробці, одержують й інші продукти переробки молока: сметану, йогурт, сир й ін. Властивості кінцевого продукту залежать при цьому від характеру й інтенсивності реакцій ферментації. У молоці при ферментації можуть протікати шість основних реакцій, і в результаті утворюється молочна, пропіонова або лимонна кислота, спирт, масляна кислота або ж відбувається газоутворення. Головна мета цих реакцій - утворення молочної кислоти. На ній засновані всі способи ферментації молока. Лактоза молока при цьому гідролізується з утворенням галактози й глюкози. Звичайно галактоза перетворюється в глюкозу ще до сквашування. Найвні в молоці бактерії перетворюють глюкозу в молочну кислоту.

Різні процеси ферментації молока проводяться в контрольованих умовах. Протягом багатьох тисячоріч вони здійснювалися за участю бактерій, вже присутніх у молоці. У наш час для цього використовують різноманітні закваски, що дозволяє одержувати молочні продукти потрібної якості й типу. Культури бактерій, що застосовуються при цьому, можуть представляти або один якийсь штам певного виду, або кілька штамів або видів. Комерційні культури-закваски складаються з бактерій, що утворюють молочну кислоту й ароматичні речовини (табл. 1.1).

Давнім продуктом, що одержується шляхом ферментації, є йогурт. Після термообробки молоко заквашують додаванням 2-3% закваски йогурту. Головну роль тут грають бактерії *Streptococcus thermophilus* й *Lactobacillus bulgaricus*. Для одержання бажаної консистенції продукту, смаку й запаху ці організми повинні бути в культурі приблизно в рівних кількостях.

Один з найдавніших способів, заснованих на ферментації молока – сироваріння. При виробництві сиру зберігається харчова цінність молока. Відомі найрізноманітніші сири – від м'яких до твердих.



## Функціональна роль деяких бактерій, використовуваних при переробці молока

Культура	Функція	Використання
<i>Propionibacterium</i> <i>P. shermanii</i> <i>P. petersonii</i>	Формування смаку	Виготовлення сиру
<i>Lactobacillus</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. lactis</i>	Утворення молочної кислоти	Закваска для виготовлення сирів
<i>Leuconostoc</i> <i>Leuc. dextransum</i> <i>Leuc. citreum</i>	Утворення смакових речовин з лимонної кислоти (в основному з діацетилу)	Виробництво сметани, вершкового масла, заквасок
<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> <i>L. lactis</i> <i>L. cremoris</i>	Утворення молочної кислоти	Виробництво йогурту і сиру, закваски для сирів

Різниця між ними визначається тим, що всі натуральні м'які сири містять багато води (50-60%), а тверді – усього лише 13-34%. Хоча властивості сирів різноманітні, у процесі виробництва всіх їх є багато загального. Перший етап – це підготовка культури молочнокислих бактерій і засів нею молока. Потім молоко згортають, для чого звичайно застосовують фермент ренін. Після відділення водянистої рідини (сироватки) отриману сирну масу піддають термообробці й пресують у формах. Далі згусток солять і ставлять на дозрівання.

Область використання власне *L. lactis* не обмежується виробництвом молочних продуктів. За думкою деяких вчених *L. lactis* є справжньою фабрикою з виробництва різноманітних продуктів біотехнології. Дослідження показали

потенціал *L. lactis* у виробництві бактеріоцину як біоконсерванту проти *Listeria monocytogenes* [4, 5], і ці бактеріоцини були визнані корисними також для клінічного застосування [6] шляхом запобігання / зменшення утворення біоплівки.

Найбільш відомим і найкраще охарактеризованим лантібіотиком є нізин (термін «лантібіотик», отриманий від Шнелла [7] як антибіотик, що містить лантіонін).

*L. lactis* також використовується при переобці відходів для отримання етанолу як біопалива [8]. Короткий зміст промислової продукції, виробленої за допомогою *L. lactis*, узагальнено в таблиці додатку А.

### **1.3. Морфологічна характеристика молочнокислих бактерій**

Молочнокислі бактерії – це основна мікрофлора, яка використовується при виробництві молочних продуктів. За останньою класифікацією, наведеною у Визначнику Bergey (Берджи), молочнокислі бактерії віднесені до двох окремих родин – *Streptococcaceae* (кулькоподібними) та *Lactobacillaceae* (паличкоподібними), що включає три підроди: *Thermobacterium* (термобактерії), *Streptobacterium* (стрептобактерії) і *Betabacterium* (бетабактерії). Деякі вчені і на цей час відносять молочнокислі палички до родини *Lactobacteriaceae*, ураховуючи те, що ці мікроорганізми не утворюють спор.

Серед паличкоподібних (рис. 1.1) найбільше значення мають представники роду *Lactobacillus* родини *Lactobacillaceae*. Це прямі або зігнуті палички, розташовані поодинокі або ланцюжками, нерухомі [1].

До першої групи в підрід *Thermobacterium* віднесені облігатні гомоферментативні лактобактерії, до підроду *Streptobacterium* увійшла друга група, яка об'єднує факультативні гетероферментативні лактобактерії, третя група молочнокислих паличок представлена облігатними гетероферментативними лактобактеріями, віднесеними до підроду *Betabacterium*.

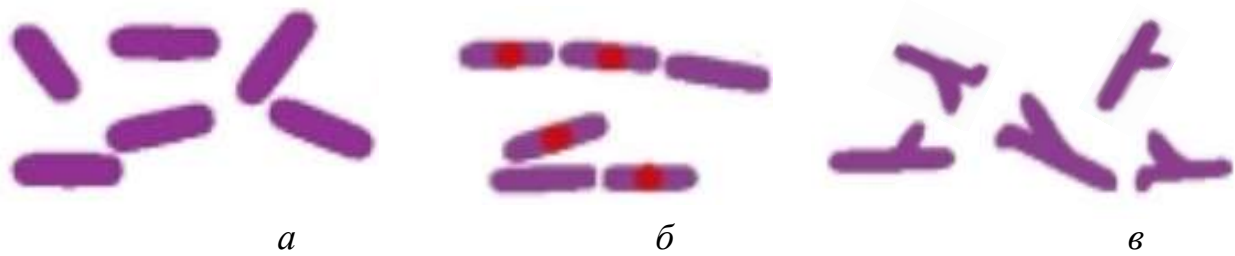


Рис. 1.1 Зовнішній вигляд паличкоподібних молочнокислих бактерій:

*a* – палички, *б* – бацили, *в* – біфідобактерії

Такий поділ є до певної міри умовним, оскільки багато нещодавно описаних видів не підходять під характеристики властивостей підродів за температурою зростання, морфологією та іншими особливостями.

До першої групи увійшли 15 видів гомоферментативних молочнокислих паличок та 11 видів факультативних гетероферментативних лактобактерій. До другої групи віднесені 11 видів факультативних гетероферментативних лактобактерій. Третя група лактобактерій об'єднує 18 видів облігатних гетероферментативних лактобактерій.

Лактобактерії – палички розміром 4-15 x 0,5-0,6 мкм зустрічаються зігнуті і булавоподібні форми, також короткі кокобактерії. Вони, як правило, нерухомі, спор і капсул не утворюють, за Грамом фарбуються позитивно. Утворення ланцюжків обумовлене тим, що ділення клітин відбувається тільки в одній площині, воно характерно для певних видів і навіть підвидів. Інтенсивність утворення ланцюжків залежить від фази зростання і рН середовища. Асиметричний розвиток і ділення клітин приводять до утворення ланцюжків, розташованих по колу.

Формування інволюційних (змінених) форм клітин може спостерігатися при симбіотичному зростанні, наприклад, у зернах кефірів, під впливом високої концентрації гліцину, D-амінокислот або антибіотиків, що активно діють на клітинну стінку.

Глибинні колонії термобактерій можуть бути темними жовтувато-бурими, іноді з короткими нитками, що відходять. На відміну від глибинних поверхневі колонії крупніші, локоноподібні або зернисті. Глибинні колонії стрептобактерій

мають лодочкоподібну форму, іноді з вирощуванням. Слизисті колонії утворює один вид – *Lbm. confusus*.

Сферичні бактерії, або коки (грецьк. *kokkos* – ягода), зазвичай мають форму кульки, але бувають у формі боба або овальні. Клітини можуть розташовуватися хаотично або утворювати скупчення, форма яких залежить від характеру їхнього поділу. За характером взаємного розташування молочнокислі коки поділяють на групи:

– диплококи (грецьк. *diploos* – подвійний) (рис. 1.2 а) також діляться в одній площині, але утворені пари клітин не розходяться; типовими представниками є збудники епідемічного менінгіту та гонореї; серед диплококів є збудники молочнокислого бродіння – *Lactococcus lactis* та інші;

– стрептококи (грецьк. *streptos* – намисто) (рис. 1.2 б) діляться в одній площині, але зв'язок між клітинами зберігається й утворюються ланцюжки різної довжини, як, нагадують намисто; серед стрептококів багато патогенних для людини, які викликають різні захворювання: скарлатину, ангіну, гнійні запалення та інше, частина їх є сапрофітами, представниками нормальної мікробіоти людини; приклад – *Streptococcus thermophilus*.



Рис 1.2 Зовнішній вигляд сферичних молочнокислих бактерій:

а – диплококи, б – стрептококи

Усі молочнокислі бактерії, незалежно від класифікації, мають спільні властивості – позитивно забарвлюються за Грамом (Гр<sup>+</sup>), не утворюють спор, нерухомі, не викликають видимого розпаду білків, є факультативними анаеробами.

Рід *Leuconostoc* (від грец. *leucos* – білий, безбарвний; *nostoc* – водорості, узагальнена назва; *leuconostoc* - безбарвні слизисті рослини) об'єднує 9 видів: *Leu. mesenteroides*, *Leu. lactis*, *Leu. amelibiosum*, *Leu. carnosum*, *Leu. citreum*, *Leu. gelidum*, *Leu. oenus*, *Leu. paramesenteroides*, *Leu. pseudomesenteroides*.

У молочній промисловості має значення вид *Leu. mesenteroides*, він включає три підвиди: *Leu. dextranicum*, *Leu. cremoris*, *Leu. Mesenteroides*.

Лейконостоки мають сферичні, дещо витягнуті клітини розміром 0,5-0,7 x 0,7-1,2 мкм. Розміщуються парою або ланцюжками, нерухомі, спор не утворюють. *Leu. cremoris* має клітини, які зазвичай шикуються в довгі подвійні ланцюжки.

Лейконостоки на щільних середовищах утворюють дрібні (до 1 мм в діаметрі) гладкі крупи сірувато-білих колоній; на середовищах, що містять сахарозу, утворюють дрібні слизисті колонії. При посіві лейконостоків уколом на щільне середовище вони розвиваються уздовж уколу з невеликим поверхневим зростанням. Бульйонні культури часто мають однорідне помутніння, але штами утворюють довгі ланцюжки і осад. Ріст лейконостоков ніколи не буває швидким. Найбільш активними є штами *Leu. mesenteroides*, які мають короткий період генерації. Їх добрий ріст може бути одержаний протягом 24-годинної інкубації при 30 °С.

У рід *Streptococcus* входить один вид молочнокислих коків – *Streptococcus thermophilus* (термофільний стрептокок). *Streptococcus thermophilus* є грампозитивним, має кулясті або еліпсоподібні клітини діаметром 0,7-0,9 мкм, частіше розташовані довгими ланцюжками. За величиною клітини кругліші, ніж клітини молочного стрептокока. Термофільний стрептокок спор і капсул не утворює, нерухомий.

У рідких середовищах росте так само, як і лактококи. На поверхні щільних живильних середовищ термофільний стрептокок утворює дуже дрібні колонії округлої форми із зернистою структурою.

Рід *Lactococcus* (від грец. *lactococcus* – молочний) включає п'ять видів типових лактококів *Lac. lactis*. Він об'єднує три підвиди: *Lac.lactis subspecies lactis* (молочний лактокок); *Lac. lactis subsp. cremoris* (вершковий лактокок); *Lac.lactis*

*subsp. hordnie*. В підвид *Lac. lactis subsp. lactis* ароматизуючий біологічний варіант, який називається *Lac. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*.

Окремі чотири види належать до роду *Lactococcus*: *Lac. garvieae*, *Lac. piscium*, *Lac. plantarum*, *Lac. raffinolactis*, а також підвид *Lac. lactis subsp. hordniae* перенесені в рід *Lactococcus* із інших родів.

Лактококи являють собою овальні клітини розміром 0,5-1,2x0,5-1,5 мкм, які розташовані у вигляді коротких ланцюжків або попарно; нерухомі, спор і капсул не утворюють.

#### **1.4. Фізіологічна характеристика молочнокислих бактерій**

Молочнокислі бактерії – це факультативні анаероби, які використовують як джерело енергії вуглеводи і утворюють в якості основного продукту бродіння молочну кислоту (за цією ознакою їх об'єднують в окрему групу мікроорганізмів). У всіх молочнокислих бактерій виявляються складні потреби в факторах росту: вітамінах групи В, амінокислоти, пуринів і піримідинів. Відмітна фізіологічна особливість молочнокислих бактерій - їх висока стійкість до молочної кислоти. Здатність молочнокислих бактерій утворювати і переносити досить високі концентрації молочної кислоти має важливе селективне значення, так як така властивість дає їм можливість успішно конкурувати з більшістю інших бактерій в середовищах, багатих поживними речовинами.

Молочнокислі бактерії зазвичай здатні тільки до бродіння. Молочнокислим бродінням називають анаеробне розкладання вуглеводів молочнокислими бактеріями з утворенням молочної кислоти та інших продуктів. Залежно від того, які молочнокислі бактерії викликають це бродіння і які при цьому утворюються продукти, воно буває двох типів – типове, або гомоферментативне, і нетипове, або гетероферментативне. За цією ознакою молочнокислі бактерії розділяють на дві фізіолого-біохімічні підгрупи, що розрізняються по продуктам, які утворюються з глюкози в результаті бродіння: гомоферментативні і гетероферментативні (ця класифікація була запропонована А.І. Ключвер та Г.Л. Донкером в 1925 році).

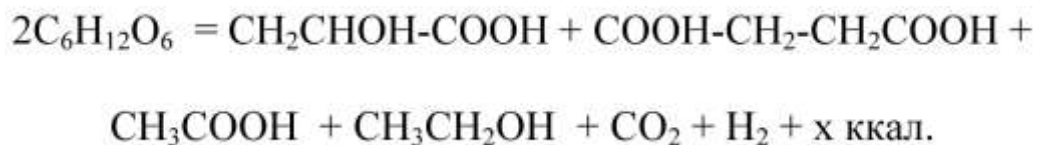
Хімізм гомоферментативного молочнокислого бродіння простий. Він полягає в гладкому розщепленні гексози на дві молекули молочної кислоти без утворення газоподібних продуктів за наступним сумарним рівнянням:



Проміжними продуктами при цьому бродінні є піровиноградна кислота і водень. Приєднуючи водень, піровиноградна кислота утворює молочну кислоту [9].

Хімізм нетипового молочнокислого бродіння складніший, так як тут при зброджуванні вуглеводів, поряд з молочною кислотою, гетероферментативні бактерії утворюють ряд інших з'єднань: оцтову і бурштинову кислоти, етиловий спирт, вуглекислоту і водень.

Ускладнення процесу бродіння пов'язано з тим, що ці бактерії містять в своїх клітинах фермент карбоксилазу, а у гомоферментативних бактерій він відсутній. Загальний хімізм цього процесу може бути представлений схематичним рівнянням так:



Представники роду *Lactobacillus* мають аеротолерантний тип метаболізму. Здійснюють гомоферментативне або гетероферментативне молочнокисле бродіння [1].

Гомоферментативні термобактерії ферментують вуглеводи виключно до молочної кислоти. У переважній більшості вони розвиваються при 15 °С і не ростуть при 45 °С. Гетероферментативні термобактерії можуть ферментувати вуглеводи до молочної кислоти або до молочної, оцтової і мурашиної кислот, етилового спирту та інших продуктів.

Стрептобактерії є гетероферментативними мезофілами, які не ростуть при 15 °С і розвиваються при 45 °С, можуть ферментувати вуглеводи до молочної кислоти або оцтової і мурашинної кислот. По гомології ДНК серед стрептобактерій розрізняють три основні комплекси видів або підвидів.

Бетабактерії ферментують вуглеводи до молочної і оцтової кислот, етанолу і CO<sub>2</sub>. По відношенню до температури вони є мезофілами, які ростуть при 45 °С і не культивуються при 15 °С. До цієї групи входять всі облігатні гетероферментативні лактобактерії, віднесені до підроду *Betabacterium*. Виняток становить *Lbm. bifementans*, який ферментує глюкозу гомоферментативно до L-молочної кислоти, але залежно від рН утворювана молочна кислота може розщеплюватися до оцтової кислоти, CO<sub>2</sub> і навіть H<sub>2</sub>.

Характерною ознакою *Streptococcus thermophilus* є широкий діапазон температур зростання – від 20 до 50 °С. Оптимальною є температура 37-40°С. Слабкий ріст спостерігається при 50 °С, а температура 53 °С затримує ріст.

*Streptococcus thermophilus* за енергією кислотоутворення перевершує всі молочнокислі стрептококи, досягаючи рівня термофільних лактобактерій. Він сквашує молоко через 3,5-6 год., гранична кислотність складає 110-115 °Т. Сквашування молока відбувається швидше при додаванні до нього дріжджового екстракту (0,3 %) і сахарози (3 %). У цих умовах спостерігається збільшення розміру клітин в 2 рази більше, ніж при вирощуванні в звичайному молоці.

Особливістю термофільного стрептокока є слабовиражена цукролітична активність. Його штами постійно ферментують тільки лактозу, глюкозу і сахарозу, іноді зброджують рафінозу і, як правило, не ферментують маніт, інουλін, гліцерин, сорбіт.

Характерною властивістю цього виду вважають здатність зброджувати сахарозу і відсутність ферментації мальтози. Каталазу не утворює. Деякі штами утворюють діацетил, у невеликій кількості синтезують ацетоїн, унаслідок чого поліпшується якість молочних продуктів. Багато культур термофільних стрептококів утворюють в'язкі тягучі згустки молока.

*Streptococcus thermophilus* нестійкий до метиленового синього, хлористого натрію і лужної реакції середовища (рН 9,6). У рідкому середовищі, що містить глюкозу і 4 % NaCl, термофільний стрептокок кислоту не утворює, не розвивається за наявності в середовищі 0,1 % метиленового голубого, не відновлює лакмусове молоко, не росте на середовищі з концентрацією пеніциліну 0,01 мкг/см<sup>3</sup> і



стрептоміцину 5 мкг/см<sup>3</sup>, тому його використовують у якості тест-культури при виявленні антибіотиків у молоці. Чутливий до дії специфічних бактеріофагів.

*Streptococcus thermophilus* володіє відносно високою термостійкістю. Він витримує температуру 75 °С протягом 15 хв і 65 °С протягом 30 хв., внаслідок чого складає значну частину залишкової мікрофлори в молоці після пастеризації.

Лейконостоки є факультативними анаеробами. Ростуть на спеціальних живильних середовищах. Оптимальна температура зростання 20-30 °С, а мінімальна складає 5 °С. Порівняно з лактококами лейконостоки вимогливіші до складу поживних середовищ.

Для розвитку всіх видів лейконостоків необхідні амінокислоти і комплексні чинники зростання – нікотинова кислота + біотин і пантотенова кислота або похідні від цієї кислоти: ціанокобаламін (вітамін В<sub>12</sub>).

*Leu. cremoris* зростає протягом 48 год при температурі 22-30 °С. При культивуванні штамів, що поволі ростуть, до бульйонних середовищ додають 0,05 % солянокислого цистеїна. *Leu. oenus* дещо відрізняється від інших видів. Він краще росте в кислому середовищі, яке містить томатний сік, з початковою рН 4,2-4,8. Росте поволі, його культивують при 22 °С протягом 5-7 днів. Інші види лейконостоків не можуть рости в кислотних середовищах, переважаючих для *Leu. oenus*.

Лейконостоки є хемоорганотрофами з облігатною потребою в зброджуваному вугледоді. Вони ферментують глюкозу з утворенням кислоти і звичайно газу; основними продуктами бродіння є також етанол D(-)-ізомер молочної кислоти і ароматичні речовини – діацетил, ацетоїн і 2,3-бутиленглицоль.

Лейконостоки є слабкими кислотоутворювачами, молоко часто не згортають, протеолітичною активністю не володіють, індол і аміак не утворюють, нітрати не відновлюють. Кінцеву рН при зростанні в рідкому середовищі з глюкозою доводять до 4,4-5,0.

*Leu. dextranicum* є слабким кислотоутворювачем, згортає молоко через 2-3 доби. Граничну кислотність доводить до 70-80 °Т.

*Leu. cremoris* поволі розвивається в молоці і його не сквашує, оскільки гранична кислотність досягає тільки 40-50 °Т.

Основну масу діоксиду вуглецю лейконостоки виробляють із лимонної кислоти, тому додавання її в молоко сприяє утворенню CO<sub>2</sub>. Крім того, бактерії роду *Leuconostoc* здатні утворювати діоксид вуглецю за допомогою гетероферментативного розщеплювання молочного цукру.

Етиловий спирт лейконостоки утворюють під дією ферментів фосфокетолаз. Деякі штами мають окислювальний механізм метаболізму і замість етилового спирту утворюють оцтову кислоту.

Більшість видів лейконостоків засвоюють цитрати з утворенням ароматичних речовин – ацетоїну і діацетилу, але ця властивість може бути втрачена у штамів, що зберігаються тривалий час у лабораторних умовах.

Встановлено стимулюючу дію марганцю на зростання і утворення діацетилу бактеріями роду *Leuconostoc*.

Кількість марганцю в коров'ячому молоці залежить від пори року: весною його вміст складає 8-20 мкг/л, влітку і восени – 25-85 мкг/л. У зв'язку з цим у маслі, виготовленому за допомогою заквасок, що містять *Leuconostoc*, весною діацетилу буде менше, ніж влітку і восени.

Утворення діацетилу і ацетоїну в помітних кількостях спостерігається тільки у *Leu. cremoris* і *Leu. dextranicum* (оптимальна температура складає 18-20 °С). Воно відбувається тільки при низькому значенні рН (менше 6,0), тобто при накопиченні у великій кількості молочної кислоти.

Враховуючи все це, *Leu. cremoris* і *Leu. dextranicum* із найбільшим ефектом ароматоутворення використовують у багатоштамових заквасках у поєднанні з *Leu. lactis* або *Leu. cremoris* або обома разом. Застосування

*Leu. cremoris* найбільш доцільне там, де необхідно одержати м'який довготривалий аромат, наприклад, у виробництві стійкого до зберігання масла.

*Leu. dextranicum* разом з іншими ароматоутворюючими стрептококами частіше вводять до складу заквасок для сирів.

Лейконостоки володіють ліполітичною активністю. Вони взмозі розщеплювати триглицериди, але перш за все моно- і дигліцериди, що зустрічаються в молоці, сирі та маслі після дії молочних і бактерійних ліпаз. Ліполіз вивільняє жирні кислоти (масляну, капронову, каприлову, капринову, меристинову, олеїнову) і їх продукти розпаду, що може призвести до недоліків смаку.

Багато штамів *Leu. mesenteroides* утворюють слиз із декстранів і сахароз. Слиз інтенсивніше утворюється при 20-25 °С. Не створюючі слиз, штами не витримують нагрівання в бульйоні з глюкозою при 55 °С протягом 30 хв. Слизоутворюючі штами зберігають життєздатність у слизистих цукрових розчинах, що нагріваються до 80-85 °С. Лейконостоки поширені на рослинах, у молочних та інших харчових продуктах.

Особливий науковий інтерес представляють молочнокислі стрептококи серологічної групи N, які за систематичним положенням відносно недавно виділені з групи мікроорганізмів роду *Streptococcus*, що включає патогенні форми, і під новою назвою *Lactococcus* віднесені до категорії «GRAS» (Generally Recognized As Safe), тобто признаний Європейським парламентом як безпечний [10].

Лактококи є факультативними анаеробами, тобто ростуть не тільки в аеробних умовах, але і без доступу молекулярного кисню.

Лактококи – це переважно гомоферментативні мікроорганізми, виняток становить *biovar diacetylactis*. Він утворює ароматичні речовини – діацетіл і ацетоін, здатний засвоювати солі лимонної кислоти (цитрати) і у зв'язку з цим належить до групи так званих цитроворусів. У цю групу також входять два основних представники роду *Leuconostoc* – *Leu. cremoris* і *Leu. dextranicum*.

В присутності кисню у лактококів не змінюється тип дихання, тому що не проявляється аеробне дихання, а продовжується процес бродіння, тобто проходить анаеробне дегідроденірування. По відношенню до температури лактококи мезофідні, їх оптимальна температура росту 30 °С, розвиваються при 10 °С, але не при 45 °С. Лактококам, як і більшості молочнокислих бактерій, необхідні вітаміни: рибофлавін, тіамін, пантотенова, нікотинова, фолієва кислоти, піридоксин (В<sub>6</sub>) та ін. Цим

пояснюється позитивний вплив на ріст мікроорганізмів добавок у поживні середовища картопляного та кукурудзяного борошна.

Лактококи ростуть на середовищах із низьким значенням рН – від 5,5 до 8,8, деякі при рН 2,9-3,2, також характерними властивостями молочнокислих стрептококів і паличок є висока спиртостійкість. Вони можуть розвиватися на поживних середовищах, які містять 15-18% етилового спирту.

Біохімічні властивості лактококів вивчають за енергією кислотоутворення, граничною кислотністю, здатністю ферментувати солі лимонної кислоти, за якістю згустку, можливою протеолітичною активністю бактерій.

Енергію (інтенсивність) кислотоутворення визначають за період утворення згустку молока (кислотність біля 58-60 °Т) при внесенні 0,5 см<sup>3</sup> молоді (12-20 годинної) культури в 10 см<sup>3</sup> стерильного знежиреного молока і вирощуванні посівів при оптимальній температурі [11].

*Lac. cremoris* не зброджує мальтозу і декстрин, не росте при температурі 39-40 °С. При понижених температурах культивування (15-20 °С) деякі штами утворюють значну кількість летучих кислот, відновлюють і згортають лакмусове молоко. Енергія кислотоутворення складає 6-8 год, гранична кислотність 110-115 °Т. Окремі штами синтезують антибіотик діпнокцин, який являє собою розчинений у воді протеїн, стійкий до високих температур у кислому середовищі.

*Lac. cremoris* використовують там, де необхідно досягти в'язкої консистенції, помірного кислотоутворення. Він входить до складу заквасок для сметани, кисломолочного сиру, масла і твердих сирів. *Lac. cremoris* зустрічається в сирому молоці та молочних продуктах у невеликій кількості.

Ароматизуючий лактокок *Lac. diacetylactis* відновлює і згортає лакмусове молоко, стійкий до вмісту в середовищі 4% NaCl, деякі штами розкладають аргінін із виділенням аміаку. *Lac. diacetylactis* – слабкий кислотоутворювач, має слабку енергію кислотоутворення (більше 16 год), гранична кислотність у молоці 70-100 °Т. Згусток молока містить бульбашки газу (CO<sub>2</sub>). Утворення діоксиду вуглецю може бути необхідним або небажаним. Для отримання малюнка в багатьох видах сиру

утворення CO<sub>2</sub> необхідне. З іншого боку, воно не повинно бути настільки сильним, щоб обумовлювати види малюнка сиру.

В кисломолочних напоях наявність діоксиду вуглецю покращує смак (легкий пікантний присмак). Небажана наявність діоксиду вуглецю у всіх ферментуючих молочних продуктах, які запаковані в газонепроникну упаковку.

Оптимальною температурою ароматоутворення для *Lac. diacetylactis* є 25 °С. *Lac. diacetylactis* як заквасочний мікроорганізм використовують при виробництві тих молочних продуктів, у яких сильне кислото- і ароматоутворення, наприклад, при виготовленні масла, сиру, сметани, простокваші та різних сортів свіжого сиру.

Негативний вплив під час розвитку ароматоутворюючого лактокока може проявитись у тому, що в багатштамових заквасках при високих температурах він пригнічує розвиток інших видів через сильне утворення діоксиду вуглецю [11].

Враховуючи значення молочнокислих бактерій і зокрема молочнокислого стрептокока для харчової промисловості, важливим є вивчення особливостей його життєдіяльності.

### **1.5. Особливості морфології та фізіології *Lactococcus lactis***

Молоді культури бактерій *Lactococcus lactis* являють собою типові стрептококи, які утворюють ланцюжки різної довжини з овальних клітин діаметром 0,5-1,0 мкм (рис.1.3, а). У старих культурах після згортання молока переважають поєднання у вигляді диплококів. Зустрічається він і в вигляді коротких безспорних паличок, які позитивно забарвлюються за Грамом.

Колонії молочного стрептокока на поверхні щільного живильного середовища дрібні, опуклі, злегка білуваті, що нагадують краплі води або жиру (див. рис.1.3, б).

Представники виду *Lac. lactis* (за винятком підвиду *Lac. lactis subsp. hordniae*) широко використовуються в молочній промисловості. Вони дуже схожі між собою, продукують молочнокислі дегідрогенази, які ідентичні за вмістом моль % Г+Ц (гуаніна + цитозіна) в ДНК (38,6), гомологія ДНК/ДНК складає не менше 50 %.

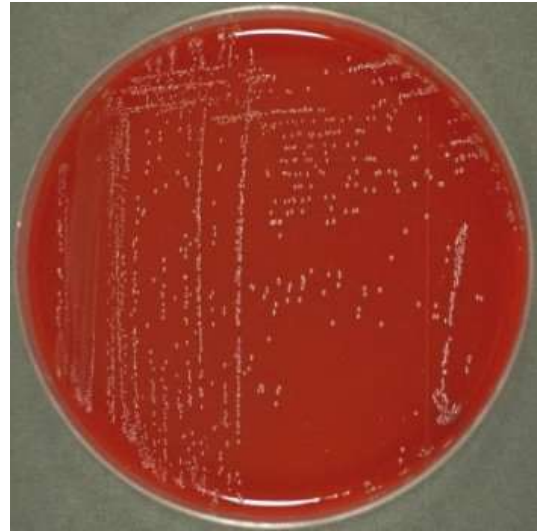
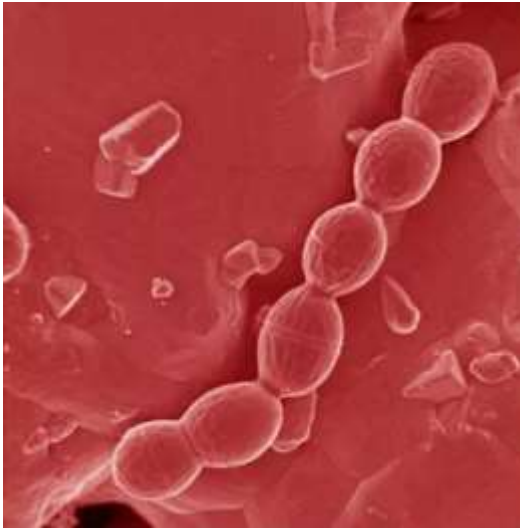


Рис.1.3 – Зовнішній вигляд *Lactococcus lactis*: а – клітин, б – колоній

Більшість із штамів *Lac. lactis* мають широкий діапазон температури росту: від 8 до 41 °С.

*Lac. lactis* є активним кислотоутворювачем. Його штами згортають молоко за 4-7 год, гранична кислотність досягає 120 °Т. Не розвивається в щільному середовищі при рН 9,5, кінцева рН у рідких середовищах із глюкозою складає 4,0-4,5. При культивуванні на штучних середовищах деякі штами втрачають здатність до швидкої ферментації лактози і до протеолізу молока. Ці усунені властивості можуть відновлюватися при культивуванні лактококів у молоці.

*Lac. lactis* використовують у заквасках разом із *Lac. cremoris*, *Lac. diacetylactis* і видами роду *Leuconostoc*. У молочній промисловості його широко використовують при виробництві кисломолочних продуктів, кисломолочного масла, сирів.

Окремі штами *Lac. lactis*, особливо при температурі біля 30 °С, здатні утворювати гіркоту і тому непридатні для використання як бактеріальні закваски при виробництві сиру.

## 1.6. Висновки до розділу

В результаті проведеного літературного огляду було визначено місце та роль бактерій, зокрема молочнокислих, у біосфері та біотехнологічних виробництвах. Наведена коротка класифікація молочнокислих бактерій; розглянуто їх загальну морфологію та фізіологію. Коротко охарактеризовано хімізм процесів гомоферментативного та гетероферментативного бродіння. Для окремих видів молочнокислих бактерій вказано сфери їхнього застосування у промисловості. Особливу увагу приділено морфологічним та фізіологічним особливостям *Lac.lactis*.

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Основним об'єктом дослідження є молочнокислі бактерії *Lactococcus lactis*. Основними методами дослідження є мікробіологічні.

#### 2.1. Культивування молочнокислих бактерій

Для культивування молочнокислих бактерій використовується таке поживне середовище, як гідролізоване молоко. Воно готується наступним чином. Натуральне або відновлене знежирене молоко кип'ятять або обробляють текучою парою протягом 20 хв і охолоджують до температури  $(45 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Доводять активну кислотність до рН  $(7,7 \pm 0,1)$ , додаючи водний розчин з масовою часткою NaOH 40 %. До 1000 см<sup>3</sup> молока додають від 0,5 до 1,0 г порошку панкреатину. Потім до молока додають від 5 до 6 см<sup>3</sup> хлороформу. Колбу закривають корковою пробкою і витримують при температурі  $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$  протягом 18-24 год. Протягом перших 3-5 годин молоко 2-3 рази перемішують (пробку після перемішування відкривають для видалення хлороформу).

Потім гідролізоване молоко фільтрують через паперовий фільтр, розводять дистильованою водою у співвідношенні 1:1, встановлюють активну кислотність рН  $(7,1 \pm 0,1)$ , додаючи водний розчин з масовою часткою NaOH 40 % і використовують для приготування агару з гідролізованим молоком. У разі зберігання гідролізоване молоко стерилізують в автоклаві при температурі  $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$  протягом 15 хв.

Для приготування агару з гідролізованим молоком беруть гідролізоване молоко у кількості 1000 см<sup>3</sup> та 15 г агару. До гідролізованого молока додають агар, середовище нагрівають до повного розплавлення агару і фільтрують через вату, розливають у пробірки або колби і стерилізують в автоклаві при температурі  $(121 \pm 1) ^\circ\text{C}$  протягом  $(10 \pm 1)$  хв.



## 2.2. Культивування *Lactococcus lactis*

Для культивування власне *Lactococcus lactis* застосовується поживне середовище Редді, яке готують наступним чином. Спочатку готують основу середовища Редді. В колбу, що містить 500 см<sup>3</sup> дистильованої води, додають 15,0 г агару і нагрівають на водяній бані до розчинення агару. В іншу колбу, що містить 500 см<sup>3</sup> дистильованої води, додають 10,0 г цитрату калію і 15,0 г карбоксилметілцеллюлози і розчиняють при нагріванні. Вміст обох колб змішують і додають 3,0 г пептону, 25 см<sup>3</sup> дріжджового екстракту, 1,25 г калію фосфорнокислого двузаміщеного, 5,0 г L-аргінін гідрохлориду, нагрівають на водяній бані до повного розчинення компонентів, охолоджують до температури 45-55 °С і встановлюють рН таким чином, щоб після стерилізації він становив при 25 °С ( $6,3 \pm 0,2$ ). Основу середовища стерилізують при температурі ( $121 \pm 1$ ) °С протягом 15 хв і зберігають при температурі ( $4 \pm 1$ ) °С не більше 30 діб.

Для приготування поживного середовища до 1 дм<sup>3</sup> розплавленої та охолодженої до 45-55 °С основи додають 5,0 см<sup>3</sup> стерильного знежиреного молока, 100 см<sup>3</sup> суспензії вуглекислого кальцію масовою концентрацією 30 г / дм<sup>3</sup> і 2 см<sup>3</sup> розчину бромкрезолового пурпурного масовою концентрацією 1 г / дм<sup>3</sup>.

## 2.3. Приготування розведення матеріалів, що містять МКБ

Досліджуваний матеріал можна поділити на дві великі групи. До першої відносяться кисломолочні продукти, закваски, бактеріальні концентрати і бактеріальні препарати молочнокислих бактерій; до другої – інші харчові продукти.

При дослідженні матеріалів першої групи необхідно підготувати їх розведення. Приготування розведень кисломолочних продуктів (сухих і рідких) здійснюється за вимогами по ГОСТ 9225.

Для приготування розведень заквасок, бактеріальних концентратів і бактеріальних препаратів молочнокислих бактерій краю флакона і пакета протирають спиртом, край флакона обпалюють і виймають пробку, край пакета

надрізають профламованими ножицями, відважують 1 г випробуваного матеріалу в стерильну або профламовану ступку, прикриту кришкою від чашки Петрі або стерильним папером, ретельно розтирають, додаючи невелику кількість розчину хлористого натрію або фосфатного буфера з колби, що містить 99 см<sup>3</sup> розчину або буфера. Суспендований матеріал переливають в колбу з розчином хлористого натрію або фосфатного буфера, що залишився, і здобувають друге розведення 1:100.

З других розведень кисломолочних продуктів, заквасок, бактеріальних концентратів і бактеріальних препаратів молочнокислих бактерій готують такі розведення відповідно до кількості молочнокислих бактерій, зазначеним в нормативно-технічній документації, користуючись табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Розведення матеріалів, що містять молочнокислі бактерії, для проведення мікробіологічних досліджень

Найменування продукту	Розведення, що використовуються для посіву
Кисломолочні напої, закваски рідкі та сухі, сир кисломолочний, сметана	$10^{-6}$ ; $10^{-7}$ ; $10^{-8}$ ; $10^{-9}$
Бактеріальні концентрати, бактеріальні препарати молочнокислих бактерій	$10^{-9}$ ; $10^{-10}$ ; $10^{-11}$
Сухі кисломолочні продукти	$10^{-6}$ ; $10^{-7}$ ; $10^{-8}$

#### 2.4. Посів молочнокислих бактерій для підрахунку

Посів для підрахунку кількості молочнокислих стрептококів проводять на агарі з гідролізованим молоком або стерильне знежирене молоко.

Для посіву на щільне поживне середовище вибирають ті розведення, при посіві яких на чашках виростає від 15 до 150 колоній. З кожної проби роблять посів

1 см<sup>3</sup> відповідних розведень продукту (див. табл. 2) на чашки Петрі згідно ГОСТ 9225.

При посіві в рідке поживне середовище з трьох-чотирьох останніх розведень вносять по 1 см<sup>3</sup> кожного розведення в дві паралельні пробірки зі стерильним знежиреним молоком.

Пробірки або чашки Петрі з посівами поміщають в термостат та інкубують при температурі  $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$  для підрахунку мезофільних молочнокислих бактерій, при температурі  $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$  для підрахунку термофільних молочнокислих бактерій і при  $(32 \pm 1) ^\circ\text{C}$  для спільного підрахунку мезофільних і термофільних молочнокислих бактерій. Посіви інкубують протягом 72 год.

Для визначення мікроорганізмів в інших харчових продуктах використовують підготовлену пробу продукту або його вихідне розведення.

Для визначення присутності і підрахунку кількості мікроорганізмів на чашках Петрі з проби харчового продукту або з вихідного розведення готують ряд розведень відповідно до допустимої кількості мікроорганізмів, зазначених у нормативно-технічній документації на конкретний вид харчового продукту.

## **2.5. Метод визначення найбільш вірогідної кількості бактерій**

Для підрахунку найбільш вірогідної кількості бактерій (НВК) з проби харчового продукту готують вихідне і ряд десятикратних розведень таким чином, щоб в посівах найбільшого розведення мікроорганізми не були виявлені. Для посіву вибирають не менше трьох послідовних розведень. З кожного розведення засівають три паралельні пробірки.

Для посіву в рідкі середовища за методом НВК і на чашки Петрі глибинним методом відбирають по 1,0 см<sup>3</sup> підготовленої проби продукту і (або) його розведення, для посіву на чашки Петрі поверхневим методом – по 0,1-0,2 см<sup>3</sup>.

Посіви для визначення присутності або підрахунку кількості молочнокислих мікроорганізмів, бактерій родів *Lactobacillus* та *Streptococcus* інкубують не більше 5 діб при температурі  $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$  або не більше 3 діб при температурі  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ;

посіви для визначення присутності або підрахунку кількості бактерій роду *Leuconostoc* інкубують не більше 5 діб при температурі  $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Посіви для визначення присутності або підрахунку кількості *S.thermophilus* інкубують  $(48 \pm 3)$  год при температурі  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Посіви на чашках Петрі для визначення присутності або підрахунку кількості бактерій роду *Leuconostoc* інкубують дном вниз.

Інкубування посівів на рідких середовищах припиняють при появі видимих ознак росту.

Попередній підрахунок колоній на щільних середовищах проводять через 48 годин.

У посівах на щільних середовищах для визначення присутності або підрахунку кількості молочнокислих мікроорганізмів, бактерій роду *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *S.thermophilus*, обмеження доступу здійснюють згідно з ГОСТ 30425 або одним із зазначених нижче способів:

- на застигле поживне середовище в чашках Петрі наливають другий шар розплавленого та охолодженого до  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$  агаризованого середовища в кількості  $5,0 \text{ см}^3$  і залишають до затвердіння;
- чашки Петрі поміщають в газове середовище, що складається з 95 %  $\text{N}_2$  та 5 %  $\text{CO}_2$ ;
- чашки Петрі поміщають в анаеростатах. Апарат закривають, за допомогою вакуумного насоса створюють вакуум 86,6-93,3 кПа;
- в кожен пробірку з рідким середовищем додають стерильний рідкий парафін в кількості, необхідній для отримання стовпа висотою близько 2 см.

Посіви на рідких середовищах щодня переглядають і відбирають пробірки з видимими ознаками росту. Характер зростання на рідких середовищах наведено у ДСТУ 7999:2015. З пробірок, в яких спостерігаються ознаки росту, проводять пересів на щільні середовища бактеріологічною петлею так, щоб отримати зростання ізольованих колоній. Посіви інкубують за правилами, які були зазначені раніше.

Посіви на щільних середовищах після інкубування переглядають і для підрахунку відбирають чашки Петрі, на яких виросло від 15 до 150 характерних колоній.

При визначенні кількості мікроорганізмів методом мембранних фільтрів допускається проводити відбір чашок Петрі для підрахунку, якщо на фільтрах виросло менше 15 характерних колоній.

## 2.6. Ідентифікація молочнокислих бактерій

Для підтвердження належності характерних колоній до молочнокислих мікроорганізмів або бактерій одного з родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *S.thermophilus*, відбирають з посівів не менше 5 характерних колоній. Належність кожної відібраної колонії до певних мікроорганізмів встановлюють по відношенню до фарбування за Грамом, рухливості, наявності каталази, додатково при ідентифікації бактерій роду *Leuconostoc* визначають наявність капсул, при ідентифікації стрептококів виду *S.thermophilus* і стрептококів групи N роду *Streptococcus* – наявність зростання в м'ясо-пептонному бульйоні з рН 9,6 і в м'ясо-пептонном бульйоні з 6,5 % NaCl.

При ідентифікації стрептококів групи N роду *Streptococcus*, стрептококів виду *S.thermophilus* визначають відсутність зростання на м'ясо-пептонном бульйоні з рН 9,6 і на м'ясо-пептонному бульйоні з вмістом хлористого натрію 6,5%. Посіви інкубують при температурі  $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$  протягом 3 діб, а при ідентифікації *S.thermophilus* посіви інкубують при  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$  протягом 3 діб.

Після інкубування посівів проводять обробку результатів аналізу. Якщо при вивченні культуральних, морфологічних і біохімічних властивостей при визначенні:

– молочнокислих мікроорганізмів виявлені грампозитивні, нерухомі, каталазонегативні палички або неспоротворні, грампозитивні, нерухомі, каталазонегативні або коки, що утворюють псевдокаталазу, то дають висновок про те, що виявлені мікроорганізми відносяться до молочнокислих;

– бактерій роду *Lactobacillus* виявлені неспоротворні, грампозитивні, нерухомі, каталазонегативні палички, то дають висновок про те, що виявлені мікроорганізми відносяться до роду *Lactobacillus*;

– бактерій роду *Leuconostoc* виявлені неспоротворні, грампозитивні, нерухомі, каталазонегативні коки, що оточені капсулою, то дають висновок про те, що виявлені мікроорганізми відносяться до роду *Leuconostoc*;

– бактерій роду *Streptococcus* групи N виявлені неспоротворні, грампозитивні,

нерухомі, каталазонегативні коки, що не дають зростання в поживних середовищах з рН 9,6 і 6,5 % NaCl, то дають висновок про те, що виявлені мікроорганізми відносяться до роду *Streptococcus* групи N.

Обробка результатів аналізу кисломолочних продуктів, заквасок, бактеріальних концентратів і бактеріальних препаратів молочнокислих бактерій відбувається наступним чином.

При розвитку молочнокислих бактерій на рідкому середовищі-молоці – молоко згортається. Для підрахунку загальної кількості молочнокислих бактерій (стрептококів і паличок) відзначають три останніх розведення, в яких молоко згорнулося.

Складають числову характеристику. Вона складається з трьох цифр, що вказують число пробірок зі молоком, що згорнулось, в трьох останніх розведеннях. Перша цифра числової характеристики відповідає тому розведенню, при якому в двох пробірках молоко згорнулося. Наступні цифри позначають число пробірок зі молоком, що згорнулось, в двох наступних розведеннях [12].

За числовою характеристикою по табл. 3 знаходять найбільш ймовірне число молочнокислих мікроорганізмів, яке множать на те розведення, з якого починається перша цифра числової характеристики. Отримане число відповідає кількості клітин молочнокислих бактерій в 1 г або 1 см<sup>3</sup> продукту.

Відповідність числової характеристики та найбільш вірогідної кількості мікроорганізмів при зараженні двох паралельних пробірок\* [13]

Числова характеристика	НБК мікроорганізмів	Числова характеристика	НБК мікроорганізмів
001	0,5	200	2,5
010	0,5	201	5,0
011	0,9	210	6,0
020	0,9	211	13,0
101	1,2	212	20,0
110	1,3	220	25,0
120	2,0	221	70,0
121	3,0	222	110,0
* В таблицю не включено неприйнятні комбінації			

Підрахунок колоній, що вирости на поживному середовищі в чашках Петрі та визначення мікробного числа

Колонії бактерій підраховують зазвичай через 2 доби, колонії грибів і дріжджів – через 5-7 діб. Колонії, як правило, підраховують з невеликим збільшенням, не відкриваючи чашок Петрі. Для зручності відзначають прораховану колонію крапкою на зовнішній стороні дна чашки, користуючись маркером. Колонії підраховують такими способами: якщо вони ізольовані один від одного, великі і в невеликій кількості, то зазвичай їх рахують по всій поверхні чашки. Якщо розвинулась велика кількість колоній, дно чашки Петрі ділять на сектори, підраховують в 2-3 секторах, знаходять, середнє арифметичне на один сектор, а потім множать на кількість секторів (або підраховують кількість колоній в кожному секторі і результати підсумовують).

## 2.7. Виділення чистої культури

Вивчення культуральних властивостей колоній мікроорганізмів, які вирости в чашках Петрі на щільних поживних середовищах відбувається наступним чином. Для вивчення якісного складу мікрофлори досліджуваних об'єктів, перш за все, ізолюють окремі види мікробів і вирощують їх у вигляді так званих чистих культур, а потім, вивчають їх властивості (культуральні, морфологічні і біохімічні).

Велике значення для ідентифікації бактерій мають культуральні ознаки – це характер зростання бактерій на щільному та рідкому середовищі.

Для вивчення культуральних властивостей бактерій необхідно вибрати на чашках Петрі окремі найбільш типові колонії. Потім, не відкриваючи чашок, приступити до опису зовнішніх властивостей колоній, звернувши увагу на наступні ознаки (рис. 2.1):

- а) форма (округла, неправильної форми, різодна і т. д.);
- б) забарвлення (безбарвна (брудно-білі колонії відносяться до безбарвних), або пігментована – біла, жовта, золотиста, червона, чорна);
- в) поверхня колоній (гладка, шорстка, борозниста, складчаста, зморшкувата, концентрично або радіально-покреслена і т. д.);
- г) профіль колонії (плоский, опуклий, кратероподібний, конусовидний тощо);
- д) блиск і прозорість (колонія блискуча, матова, тьмяна, борошниста, прозора);
- е) діаметр колонії вимірюють за допомогою звичайної лінійки і указують її величину в міліметрах. Точковими називають колонії менше 1 мм в діаметрі; дрібні мають 1-2 мм, середні – 2-4 мм і великі – більше 4 мм в діаметрі;
- ж) край колонії (рівний, хвилястий, зубчастий, бахромчастий і т. д.) визначають при малому збільшенні мікроскопа. Чашку поміщають на предметний столик мікроскопа;
- з) структура колонії (однорідна, дрібнозерниста, грубозерниста, струмениста і т. д.) визначається при малому збільшенні мікроскопа або за допомогою лупи;



и) консистенцію колонії визначають, торкаючись до її поверхні бактеріальною петлею. Колонія може легко зніматися з агару, бути твердою, м'якою або вrostати в агар; слизькою (прилипати до петлі), тягучою, крихкою (легко ламатися при дотику петлею).

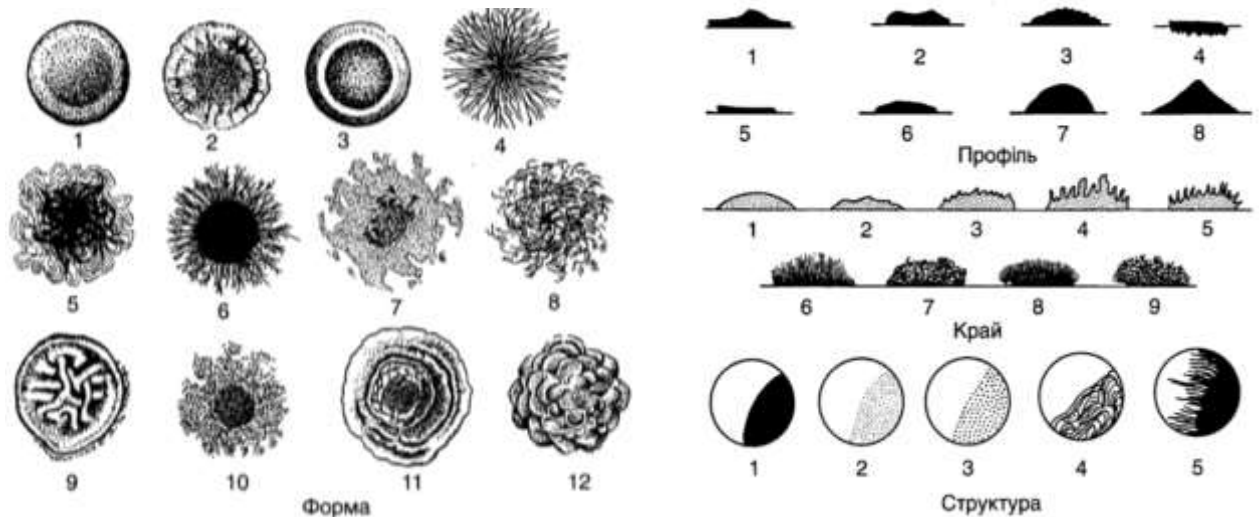


Рис. 2.1. Характеристика колоній мікроорганізмів:

Форма: 1 – округла; 2 – округла з фестончастим краєм; 3 – округла з валиком; 4, 5 – ризоїдна; 6 – з ризоїдним краєм; 7 – амебоподібна; 8 – ниткоподібна; 9 – складчаста; 10 – неправильна; 11 – концентрична; 12 – складна.

Профіль: 1 – зігнутий; 2 – кратероподібний; 3 – горбкуватий; 4 – врослий у субстрат; 5 – плескатий; 6 – опуклий; 7 – краплеподібний; 8 – конусоподібний.

Край: 1 – гладенький; 2 – хвилястий; 3 – зубчастий; 4 – лопатевий; 5 – неправильний; 6 – війчастий; 7 – нитчастий; 8 – ворсинчастий; 9 – галузистий.

Структура: 1 – однорідна; 2 – дрібнозерниста; 3 – крупнозерниста; 4 – струминчаста; 5 – волокниста

Колонії, що відрізняються хоча б за однією з вказаних ознак, слід розглядати як різні типи. Для кожного виду бактерій є притаманним певний характер колоній. За числом типів колоній в чашках можна мати уявлення про різноманітність видового складу бактерій досліджуваного об'єкту.

Основним методом виділення чистих культур мікроорганізмів є метод, запропонований Кохом. Принцип методу полягає в отриманні чистої культури з окремої колонії, яку вважають за результат розвитку однієї клітини.

Щоб виділити чисту культуру з досліджуваного об'єкту, необхідно з описаних колоній вибрати одну, зростаючу найбільш ізольовано і переважаючу в посіві. Потім за допомогою стерильної бактеріологічної петлі взяти невелику кількість бактерійної маси з вибраної колонії, злегка до неї торкаючись. Необхідно уважно стежити, щоб не зачепити голкою сусідні колонії. Петлю з бактеріями ввести в пробірку з «косим» м'ясопептонним агаром, торкнутися поверхні в його нижній частині та провести петлю вгору, ковзаючи по поверхні агару у вигляді штриха. При посіві необхідно дотримуватись правил асептики. Пробірку підписують і інкубують [14].

Далі визначають чистоту і морфологічні властивості бактерій, переважаючих в досліджуваному об'єкті.

Морфологічна характеристика бактерій включає форму клітин, їх поєднання і розмір, рухливість, споруутворення.

## **2.8. Дослідження та ідентифікація клітин**

Вивчення морфологічних властивостей проводять, використовуючи методи мікроскопії. Для цього готують препарати живих і фіксованих забарвлених клітин.

Фіксований забарвлений препарат готують за способом «простого забарвлення». Готовий забарвлений препарат мікроскопіюють з імерсійним об'єктивом.

У правильно забарвленому і добре промитому препараті поле зору залишається абсолютно світлим і чистим, а забарвленими виявляються тільки клітини мікроорганізмів. При мікроскопуванні забарвлених препаратів спори бактерій не фарбуються.

Про чистоту культури судять за однорідністю клітин. При мікроскопуванні різних ділянок препарату необхідно порівняти клітини бактерій. Схожість форми і розміру клітин і спор (при їх наявності) служить доказом чистоти культури.

Для визначення ставлення мікроорганізмів до фарбування за Грамом з колоній готують мазки, фарбують їх і проводять мікроскопію. Цей метод фарбування має важливе діагностичне значення. По відношенню до фарбування за Грамом всі мікроорганізми діляться на дві групи: грампозитивні ( $G^+$ , фірмакутні) та грамнегативні ( $G^-$ , грацилікутні). Існує також група грамваріабельних мікроорганізмів, у яких відношення до фарбування за Грамом змінюється впродовж росту та розвитку клітин (наприклад, коринеподібні бактерії).

Цей метод фарбування вперше був запропонований у 1884 р. датським вченим Х. Грамом для виявлення бактерій у гістологічних зрізах. Сутність цього методу полягає в тому, що барвники трифенілметанового ряду (генціан фіолетолвий, кристалічний фіолетовий та метиловий фіолетовий) у комплексі з йодом затримуються клітинними стінками  $G^+$  бактерій навіть при знебарвлюванні спиртом. Такі бактерії залишаються забарвленими у синьо-фіолетовий колір.  $G^-$  ж бактерії при дії спирту знебарвлюються і їх виявляють додатково забарвлюючи контрастним барвником (водним фуксином). Тобто,  $G^-$  бактерії стають червоно-рожевими.

Таким чином, в основі методу фарбування за Грамом лежать особливості хімічного складу та структури клітинних стінок бактерій. При обробці бактерій спиртом відбувається набухання пептидоглікану та зменшення діаметру пор клітинної стінки, що в цілому веде до зменшення проникності клітинної стінки. Так як  $G^+$  бактерії характеризуються високим вмістом пептидоглікану муреїну (50-80%, а іноді – до 95% усієї маси клітинної стінки), то в результаті обробки спиртом, стінки їх стають майже непроникними для барвників і вони не вимиваються.

У  $G^-$  бактерій вміст пептидоглікану малий (5-10% загальної маси клітинної стінки), тому під дією спирту її проникність тільки збільшується за рахунок розчинення та вимивання ліпідного шару клітинної стінки (який досягає 22 % від її загальної маси).

Так як основну роль у фарбуванні за Грамом відіграє клітинна стінка, то протопласти  $\Gamma^+$  бактерій стають  $\Gamma^-$ . Сферопласти (клітини, у яких частково відсутня або порушена клітинна стінка) усі  $\Gamma^-$ .

$\Gamma^+$  та  $\Gamma^-$  бактерії відрізняють за рядом ознак: структурними (товщиною та макромолекулярною будовою клітинної стінки, структурними елементами клітини); хімічними (вмістом та складом пептидогліканів, полісахаридів, білків, ліпополісахаридів клітинних стінок); фізіологічними (відношенню до барвників, поверхневого натягу, тиску, ультразвуку, ізоелектричної точкою, кислото- та лугостійкістю і т.і.).

Як правило, більшість коків, споротворних паличок є  $\Gamma^+$ , а звивисті форми та неспоротворні палички –  $\Gamma^-$ . Але серед них є певні виключення. Наприклад, серед коків  $\Gamma^-$  є бактерії родів *Neisseria* (збудники менінгіту та гонореї), *Methylococcus* (які як єдине джерело вуглецю та енергії використовують метан та метанол). Серед неспоротворних паличок  $\Gamma^+$  є бактерії роду *Lactobacillus* (молочнокислі бактерії) та інші.

Потрібно підкреслити, що фарбування за Грамом є діагностичною ознакою лише по відношенню до прокаріот, які мають клітинну стінку. Існує багато модифікацій методу фарбування за Грамом, але однією з найбільш розповсюджених є модифікація Синьова [14].

## 2.9. Висновки до розділу

У другому розділі розглянуто загальновідомі методики, які застосовуються для дослідження молочнокислих бактерій. Коротко охарактеризовано поживні середовища, що використовуються для культивування молочнокислих бактерій (гідролізоване молоко та агар з гідролізованим молоком) та зокрема *L. lactis* (середовище Редді). Описано методику визначення найбільш вірогідної кількості бактерій (НВК), а також вказано метод виділення чистої культури бактерій.

Зазначено ознаки, за якими характеризують та ідентифікують колонії мікроорганізмів.

## РОЗДІЛ 3

### ВПЛИВ МАКРОЕЛЕМЕНТІВ НА РОЗВИТОК *LACTOCOCCUS LACTIS*

#### 3.1. Вплив складу поживних середовищ на розвиток мікроорганізмів

Сировина для процесів ферментації, перш за все, вирішує проблему формування поживних середовищ, в яких повинні міститися необхідні елементи для побудови біомаси мікроорганізмів; середовище також є місцем існування мікроорганізмів.

Елементний склад біомаси мікроорганізмів визначається головним чином основними елементами, які складають до 95-96 % сухої маси клітин. Цими елементами є вуглець (50 %), водень (8 %), кисень (20 %), азот (14 %) і сірка (1 %).

Крім того, в клітинах міститься 3-4 % макроелементів – таких, як калій (до 1 %), натрій (до 1 %), кальцій (до 0,5 %), магній (до 0,5 %) і залізо (до 0,2 %). Їх вміст в біомасі порівняно великий.

Як джерела макроелементів використовуються в основному неорганічні солі, наприклад, карбонат або хлорид калію.

Всі необхідні метали – K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Co, Cu – і інші елементи мікроорганізми отримують у формі катіонів або аніонів неорганічних солей. Наприклад, джерелом магнію служить  $MgSO_4$ , джерелом натрію і хлора – NaCl, кальцію –  $CaCO_3$  або  $CaCl_2$  [13].

Іони калію, магнію, кальцію та заліза є кофакторами ферментів і компонентами металокомплексів. Залізо входить до складу дихальних ферментів та каталізує окиснювальні процеси. Магній активізує реакції, які пов'язані з перенесенням фосфорної кислоти від одних органічних сполук до інших, входить до складу пігментів, більшість біологічно активних фосфорних ефірів міститься у клітинах у вигляді комплексів із магнієм. Солі натрію та калію відіграють значну роль у регуляції внутрішньоклітинного осмотичного тиску. Багато з мікроелементів беруть участь у синтезі ферментів, а також активізують їх [14].

Щоб уникнути випадання осаду нерозчинних комплексів фосфатів з деякими катіонами, особливо із залізом і кальцієм, до середовища рекомендується додавати від 0,001 до 1 г/л етилендіамінтетраацетату (ЕДТА) або гексаметафосфату натрію в концентрації 4 г/л. Комплекси, які утворюють ці сполуки з катіонами, є резервом, із якого в результаті дисоціації в розчин надходять вільні катіони.

Калій, магній, кальцій і залізо потрібні у відносно великих кількостях, тому їх солі, як правило, включають до складу поживного середовища [14].

### **3.2. Вплив кальцію на розвиток *L. lactis***

За даними Fred A. Exterkate та Arno C. Alting, а також Egon Bech Hansen і Paolo Marcatili, наявність кальцію зокрема впливає на активність та стабільність протеази клітинної оболонки *Lactococcus lactis*. Протеаза клітинної оболонки (ПКО) *Lactococcus lactis* – велика позаклітинна протеаза, ковалентно пов'язана з пептидогліканом клітинної стінки. Штами *L. lactis*, як правило, ауксотрофні для кількох амінокислот, і для зростання до високої щільності клітин у молоці їм потрібна позаклітинна протеаза. Структуру всього ферменту ПКО важко визначити експериментально через великі розміри та через прикріплення до клітинної поверхні [16, 17].

ПКО від різних штамів *L. lactis*, ідентичність яких перевищує 98%, дуже мало відрізняються, однак ферменти різняться щодо розвитку смаку та специфічності субстрату [18, 19, 16, 20]

Від присутності в середовищі іонів кальцію в хімічно визначеному середовищі залежить виробництво каталітично активної ПКО у *Lactococcus lactis* під час росту. Кальцій не можна замінити іншими двовалентними катіонами, присутніми в середовищі, для отримання стабільної, активної клітинної оболонки протеази.

У субтилазах розпізнано чотири сайти, що зв'язують Ca. Відомо, що асоціація іонів Ca<sup>2+</sup> з цими ділянками впливає на активність та термостабільність ферментів та захищає ферменти від автопротеолітичної деградації. Було передбачено, що в ПКО є три відповідні сайти, що зв'язують Ca<sup>2+</sup>. З огляду на роль Ca<sup>2+</sup> у субтилазах,

спостережувана залежність продукування активного ПКО від іонів  $\text{Ca}^{2+}$  під час росту може тлумачитися або як активна конформація, яка може бути прийнята лише за умови участі іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у процесі згортання або з точки зору вимоги до іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , необхідних для стабілізації активної конформації.

Повне вивільнення протеїнази з клітин відбувається лише після багаторазового ресуспендування клітин у свіжому буфері, що не містить  $\text{Ca}$ . Насправді це свідчить про те, що кожна наступна обробка в буфері, що не містить кальцій, призводить до встановлення рівноваги між вільним  $\text{Ca}^{2+}$  і зв'язаним  $\text{Ca}^{2+}$ , що призводить до того, що процес вивільнення сповільнюється і з часом зупиняється. Тільки ресуспендування у свіжому буфері, що не містить  $\text{Ca}$ , призводить до продовження цього процесу.

Для кращого розуміння ролі іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у захисті та функціонуванні клітинно-зв'язаного ПКО використовували розведені суспензії клітин штамів SK11 та Wg2, які ретельно промивали холодним безкислим буфером та досліджували вплив температури та концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  на пов'язаний з клітинами ПКО.

Коли вирощені в молоці клітини *L. lactis* SK11, що містять ПКО, збирали, а потім ресуспендували (без промивання) і двічі промивали крижаним буфером імідазолу без кальцію (рН 6,5) (стандартна процедура), майже повна втрата клітинного зв'язку. Спостерігалась активність ПКО при 25 °C із субстратом S-Glu, що не супроводжувалося появою активності в надосадовій рідині.

Штами вирощували у відновленому знежиреному молоці (100 мл) при 25 °C до ранньої стаціонарної фази. У випадку рекомбінантних штамів MG 1363 молоко додавали 1% (мас./об.) глюкози та хлорамфеніколу (10 мкг/мл) або еритроміцину (5 мкг/мл) як додатковий фактор відбору.

Клітини збирали після очищення молочної культури 1% (мас. / об.) Тринатрію цитрату при рН 6,5 (7); потім їх регулярно двічі промивали 40 мл крижаного 50 мМ імідазольного буфера (рН 6,5), приготовленого з подвійною дистильованою водою, і остаточно ресуспендували в 40 мл цього ж буфера (оптична щільність при 650 нм після 10-кратного розведення, 0,5 до 0,6) і тримали на льоду. Ця стандартна

процедура повністю видалила слабо зв'язаний  $\text{Ca}^{2+}$  із клітинно-зв'язаного ПКО (ПКО “без Ca”).

### 3.3. Вплив натрію на розвиток *L. lactis*

Нездатність більшості мікроорганізмів розвиватись на середовищах з високими концентраціями солі й цукру використовують для зберігання товарів і під час переробки сировини. Цей метод консервування базується на їхній властивості створювати високий осмотичний тиск. Так, 1 %-й розчин солі створює осмотичний тиск 6,1 атм, глюкози – 1,2 атм, цукрової тростини – 0,7 атм.

Розмноження багатьох мікроорганізмів сповільнюється за концентрації солі у середовищі 1-3 %, а за 20-25 % – майже повністю припиняється. Осмофільні мікроорганізми, які ростуть на середовищах з високою концентрацією солі, називають галофілами (солелюбними). Помірні галофіли ростуть за концентрації солі від 2 до 20 %, а екстремальні – від 12 до 36 % [15].

Відомо, що молочнокислі бактерії, зокрема *Lactococcus lactis* – це культури, які широко використовуються в солевмісних молочних продуктах. Сіль перешкоджає росту бактерій, але вплив стресу навколишнього середовища може захистити клітини від подальшого стресу, включаючи сіль [21].

Проведено чимало досліджень, що присвячені вивченню впливу солі натрію на різні аспекти життєдіяльності молочнокислих бактерій. Одне з них розглядає розвиток штамів *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* та *Lactobacillus plantarum* з залежності від концентрації повареної солі (табл. 3.1).

Ріст за різних концентрацій NaCl. 0,5 мл інокульованого бактеріями бульйону MRS вносили в пробірки із 5 мл спеціально приготовленого бульйону. Ріст бактерій визначали за концентрацій NaCl 2 %, 4 % і 6,5 %. Інкубування здійснювали за температури 30 °C протягом 7 днів. Зміна забарвлення бульйону в пробірці від фіолетового до жовтого вказувала на здатність бактерій розвиватись при певних концентраціях NaCl.



Культивування мікроорганізмів проводили протягом 24 год на спеціальних живильних середовищах (MRS та M17) Культивували кожен культуру окремо протягом 24 год за температури 30 °С. Після закінчення процесу вирощування культуральну рідину нейтралізували до рН (6,5–6,6) та відокремлювали біомасу шляхом центрифугування на суперцентрифузі при 15000 об/хв фірми Thermo Scientific, після чого змішували із захисним середовищем.

Таблиця 3.1

Порівняння ростових характеристик штамів в залежності від концентрації NaCl

Вид МКБ	Ріст за концентрації NaCl		
	2 %	4 %	6,5 %
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (n = 24)	97%	89%	43%
<i>Lactococcus garvieae</i> (n = 13)	96%	84%	-
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> (n = 13)	95%	83%	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> (n = 31)	98%	87%	59%

Досліджувані штами по різному проявляли ріст за концентрації NaCl від 2 до 6,5% у середовищі. Відзначено, що 2 і 4% NaCl здебільшого не впливали на життєдіяльність досліджуваних лактобактерій [22].

Метою іншого дослідження було оцінити витривалість солі *L. lactis* R-604 після впливу різних факторів. Культуру піддавали дії 10 % (об./об.) етанолу протягом 30 хв, слабкого нагрівання при 52 °С протягом 30 хв, 15 мМ перекису водню протягом 30 хв або УФ світла (254 нм) протягом 5 хв і порівнювали з контролем. Починаючи з 5 log cfu /мл для всіх обробок, ріст визначали у поживному середовищі M17 з п'ятьма концентраціями NaCl (0, 1, 3, 5 та 7 % мас./об.). Посів проводили щодня протягом 5 днів. Толерантність до солі підвищувалася при м'якому тепловому впливі перед зростанням у поживному

середовищі M17 з 5 % (мас. / об.) NaCl на 3, 4 та 5 день, а також під впливом пероксиду водню та етанолу перед зростанням у поживному середовищі M17 з 5% (мас. / об.) NaCl на 4 і 5 день. Вплив слабого нагрівання, перекису водню або етанолу на цю культуру перед її зростанням у поживному середовищі M17, що містить 5% (мас. / об.) солі, може покращити її виживання. Це може бути корисним при використанні *L. lactis* в молочних продуктах, що містять сіль.

Оскільки в цьому дослідженні в якості контролю застосовувалась обробка культури *L. lactis* лише розчином NaCl з п'ятьма концентраціями, то результати цього контролю можна використати для визначення ступеню впливу саме натрію на розвиток *L. lactis* [21].

### **3.4. Вплив калію на розвиток *L. lactis***

Калій є важливим іоном у кожній живій клітині. Хоча калій є найпоширенішим катіоном у клітинах, його накопичення може бути токсичним.

Іонний гомеостаз є ключовим фактором для кожної живої клітини, а калій (K<sup>+</sup>) є одним найбільш поширеним катіоном в цитозолі всіх клітин. З хімічного погляду цитозоль є складною сумішшю речовин, розчинених у рідині. Концентрації катіонів калію відрізняється в цитозолі та внутрішньоклітинній речовині. Ця різниця концентрацій є суттєвою для таких процесів, як осморегуляція, передача сигналу та створення потенціалу дії в ендокринних, нервових та м'язових клітинах.

Ця різниця в концентрації іонів необхідно для осморегуляції. Якби концентрації іонів всередині клітини і поза нею були однакові, за законами осмосу вода б безперервно надходила в клітину через те, що клітина містить більше макромолекул, ніж їх є зовні. Іони натрію викачуються з клітки, а іони калію, навпаки, закачуються ферментом Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>-аденозинтрифосфатазою. Далі іони калію рухаються за градієнтом концентрації назовні через калієві канали, і вихід катіонів викликає негативний мембранний потенціал. Балансування різниці в потенціалах здійснюється за рахунок виходу з клітини негативно заряджених іонів

хлору через спеціальні хлоридні канали. Втрата іонів натрію і хлору компенсує осмотичний ефект високої концентрації макромолекул всередині клітини [23].

Таблиця 3.2

Типові концентрації іонів в цитоплазмі і крові ссавців, мМ [21]

Іон	Концентрація в цитозолі	Концентрація в крові
Калій	139	4
Натрій	12	145
Хлор	4	116
Бікарбонат	12	29
Магній	0,8	1,5
Кальцій	<0,0002	1,8

Для калію поглинання є важливим та жорстко регульованим. Бактерії розвинули різні системи для накопичення калію всередині клітини для досягнення стабільних концентрацій, щоб задовольнити їхню потребу в калії в таких процесах, як рН-гомеостаз, генерація рушійної сили протонів, тургор клітин та синтез білка, серед багатьох інших [24]. Якщо бактерії ростуть у середовищах із низькою або високою концентрацією калію, залучені різні системи поглинання з високою та низькою спорідненістю.

Циклічний діаденозин-монофосфат (ц-ді-АМФ) – вторинний месенджер, який бере участь у різноманітних метаболічних процесах, включаючи поглинання осмолітів, гомеостаз клітинної стінки та стійкість до антибіотиків та тепла. У *Lactococcus lactis* єдиними визнаними партнерами по взаємодії ц-ді-АМФ є піруват-карбоксилаза та ген BusR, регулятор транскрипції оперону busAB для поглинання гліцину бетаїну. Однак дослідження виявили основну роль ц-ді-АМФ у контролі гомеостазу калію, і те, що калій є сигналом, який запускає синтез ц-ді-АМФ. Визначено, що KipA та KipB, які належать до сімейства Kip /

НАК / КТ, є новими білками, що зв'язують ц-ді-АМФ. Обидва білки є високоафінними транспортерами калію, і їх транспортна активність пригнічується зв'язуванням ц-ді-АМФ. Таким чином, на додаток до добре вивчених калієвих каналів Ktr / Trk, KupA та KupB представляють другий клас транспортерів калію, які підлягають інгібуванню зі сторони ц-ді-АМФ [25].

### 3.5. Висновки до розділу

В даному розділі розглядаються дослідження, присвячені вивченню впливу різних складових поживних середовищ на окремі аспекти розвитку *L. lactis*. Зокрема, показано, що наявність іонів  $Ca^{2+}$  впливає на активність та стабільність протеази клітинної оболонки.

При вивченні впливу натрію на молочнокислі бактерії було визначено, що порівняно з іншими видами, які було взято у цьому дослідженні, *L. lactis* є доволі чутливим до концентрації NaCl.

Показано, що численними дослідженнями визначено роль калію як ключового компоненту живої клітини та участь його у осморегуляції, але саме експерименти Ingrid M. Quintana з використанням *Lactococcus lactis* виявили роль ц-ді-АМФ у контролі гомеостазу калію, і те, що калій є сигналом, який запускає синтез ц-ді-АМФ.

## ВИСНОВКИ

В результаті проведеного літературного огляду було показано розмаїття мікроорганізмів у біосфері, визначено місце та роль бактерій, зокрема молочнокислих, у біотехнологічних виробництвах.

Наведена коротка класифікація молочнокислих бактерій; розглянуто загальну морфологію та фізіологію паличкоподібних та кокових мікроорганізмів, особливу увагу приділено найбільш поширеним та корисним у промисловому значенні бактеріям – представникам роду *Lactobacillus*, *Leuconostoc* та *Lactococcus*. Коротко охарактеризовано хімізм процесів гомоферментативного та гетероферментативного бродіння. Для окремих видів молочнокислих бактерій вказано сфери їхнього застосування у промисловості. Особливу увагу приділено морфологічним та фізіологічним особливостям *Lac. lactis*.

У другому розділі розглянуто загальновідомі методики, які застосовуються для дослідження молочнокислих бактерій. Коротко охарактеризовано поживні середовища, що використовуються для культивування молочнокислих бактерій (гідролізоване молоко та агар з гідролізованим молоком) та зокрема *L. lactis* (середовище Редді); описано методику визначення найбільш вірогідної кількості бактерій (НВК), а також вказано метод виділення чистої культури бактерій. Також подано послідовність дій однієї з найважливіших методик фарбування – фарбування по Граму, пояснено сутність цього методу та зазначено ознаки, за якими характеризують та ідентифікують колонії мікроорганізмів.

В третьому розділі розглянуто дослідження, які присвячені вивченню впливу різних складових поживних середовищ на окремі аспекти розвитку *L. lactis*. Зокрема, показано, яким чином наявність іонів  $\text{Ca}^{2+}$  впливає на активність та стабільність протеази клітинної оболонки.

При вивченні впливу натрію на молочнокислі бактерії було визначено, що порівняно з іншими видами, які було взято у цьому дослідженні, *L. lactis* є доволі чутливим до концентрації NaCl.

Роль калію як ключового компонента живої клітини та його участь у осморегуляції визначено численними дослідженнями, але саме експерименти з використанням *Lactococcus lactis* виявили роль ц-ді-АМФ у контролі гомеостазу калію, і те, що калій є сигналом, який запускає синтез ц-ді-АМФ.

Таким чином, здійснивши аналіз доступних літературних джерел, можна сказати, що *Lactococcus lactis* є важливим мікроорганізмом як у промисловому плані, так і в якості об'єкту вивчення фундаментальних основ внутрішньоклітинних процесів.

## СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Технічна мікробіологія підручник / Л. В Капрельянц [та ін.]; [Під ред. Л.В. Капрельянца]. – Херсон ОЛДІ-ПЛЮС: 2017 – 432 с.
2. Мосієнко В.С. Молочнокислі бактерії, їх властивості та використання в медичній практиці. Режим доступу: <http://www.ifp.kiev.ua/doc/journals/uhj/02/pdf02-1/18.pdf>.
3. Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals / Rajni Hatti-Kaul et al. // FEMS Microbiology Letters. – 2018. – Vol. 365, Is. 20. – <https://doi.org/10.1093/femsle/fny213>.
4. Inhibition of *Listeria monocytogenes* biofilms by bacteriocin-producing bacteria isolated from mushroom substrate / Bolocan A. S. et al. // Journal of applied microbiology. – 2017. – Vol. 122,1. – P. 279-293.
5. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Hot Dogs by Surface Application of Freeze-Dried Bacteriocin-Containing Powders from Lactic Acid Bacteria / Ünlü Gülhan et al. // Probiotics and antimicrobial proteins. – 2016. – Vol. 8,2. – P. 102-110.
6. Licheniocin 50.2 and Bacteriocins from *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* BGBU1-4 Inhibit Biofilms of Coagulase Negative *Staphylococci* and *Listeria monocytogenes* Clinical Isolates / Cirkovic Ivana et al. // PloS. – 2016. – Vol. 11,12 e0167995.– doi:10.1371/journal.pone.0167995.
7. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings / Schnell N. et al. // Nature. – 1988. – Vol. 333,6170. – P. 276-8.
8. A novel cell factory for efficient production of ethanol from dairy waste / Liu Jianming et al. // Biotechnology for biofuels. – 2016. – Vol. 9 33.– doi:10.1186/s13068-016-0448-7.
9. Бабенюк Ю. Д. Мікробіологія : навч. посіб. / Ю. Д. Бабенюк, А. Ф. Антипчук. – К. : Університет «Україна», 2010. – 149 с.

10. Стоянова Л.Г. Новые бактериоцины лактококков и их практическое использование : автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07 – микробиология; 03.00.23 – Биотехнология. – МГУ имени М.В. Ломоносова. – Москва, 2008. – 46 с.

11. Соломон А.М. Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник для студентів напряму підготовки «Харчові технології». / А.М. Соломон, Н.М. Казмірук, С.Д. Тузова. – Вінниця: РВВ ВНАУ, 2020. – 312 с.

12. Ветеринарно-санітарна та технологічна експертиза молока: навчальний посібник / Н. А. Ткаченко, О. П. Чагаровський, Н. О. Дец та ін. – Рівне: «Овід», 2018. – 235 с.

13. ДСТУ 7999:2015 Продукти харчові. Методи визначання молочнокислих бактерій. Дата початку дії 01.01.2017.

14. Методичні вказівки до лабораторних робіт з технічної мікробіології для студентів напрямку підготовки 6091501 «Харчові технології та інженерія» / уклад. О.В. Ващенко. – Харків: НТУ “ХПІ”, 2008. – 72 с.

15. Чорна Т. М. Мікробіологія : навчальний посібник / Т. М. Чорна. – Ірпінь : УДФСУ, 2020. – 412 с.

16. Exterkate F. A. Diversity of cell envelope proteinase specificity among strains of *Lactococcus lactis* and its relationship to charge characteristics of the substrate-binding region / F. A. Exterkate, A. C. Alting, P. G. Bruinenberg // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – Vol. 59. P. 3640–3647.

17. Hansen E. B. Modeled Structure of the Cell Envelope Proteinase of *Lactococcus lactis* / E. B. Hansen, P. Marcatili // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – Vol.8. – <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.613986>.

18. Classification of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase based on gene sequencing, peptides formed after hydrolysis of milk, and computer modeling / Børsting M.W. et al. // Journal of dairy science. – 2015. – Vol. 98,1. – P. 68-77.

19. Peptide accumulation and bitterness in cheddar cheese made using single-strain *Lactococcus lactis* starters with distinct proteinase specificities / Broadbent J. R. et al. // J. Dairy Sci. – 1981. – Vol. 81. – Is. 2. – P. 327–337.



20. Action of a cell-envelope proteinase (CEPIII-type) from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM1 on bovine kappa-casein / Visser S. et al. // Applied microbiology and biotechnology. – 1994. – Vol. 41,6.– P. 644-51.

21. Ernesto E. Gonzalez. Short communication: Salt tolerance of *Lactococcus lactis* R-604 as influenced by mild stresses from ethanol, heat, hydrogen peroxide, and UV light / Ernesto E. Gonzalez, Douglas Olson, Kayanush Aryana // Research short communication. – 2017. – Vol. 100. – Is. 6. – P 4290-4293.

22. Цісарик О.Й. Скринінг технологічних властивостей природних штамів молочнокислих бактерій / О.Й. Цісарик, І.М. Сливка, Л.Я. Мусій // Науковий вісник ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. – Львів, 2017. – Т. 19. – № 80. – С. 65-70.

23. Lodish Harvey F. Molecular cell biology. New York: Scientific American Books, 1999. – 1084 p.

24. Epstein W. The roles and regulation of potassium in bacteria / W. Epstein // Prog Nucleic Acids Res Mol Biol. – 2003. – Vol. 4. – P. 293–320.

25. The KupA and KupB Proteins of *Lactococcus lactis* IL1403 Are Novel c-di-AMP Receptor Proteins Responsible for Potassium Uptake / Ingrid M. Quintana, Johannes Gibhardt, Asan Turdiev et al. // J Bacteriol. – 2019. – Vol. 201(10): e00028-19. – doi: 10.1128/JB.00028-19.

26. Exterkate F. A. Role of calcium in activity and stability of the *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase / F. A.Exterkate, A. C. Alting // Applied and environmental microbiology. – 1999. – Vol. 65(4) – P. 1390–1396.

27. Balamurugan K. Pocket Guide to Bacterial Infections / K. Balamurugan, Prithika Udayakumar CRC Press, 2019. – 414 p.

28. Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation / F. Lang // Journal of the American College of Nutrition. – 2007. – Vol. 26 – No. 5 Suppl. – P. 613-623.

29. Власенко В.В. Мікробіологія молока та молокопродуктів: навчальний посібник. / В.В. Власенко, І.Г. Власенко, А.М. Соломон. Вінниця: ВНАУ, 2006. – 600 с.

30. Грегірчак Н.М. Мікробіологія харчових виробництв: навч.посіб. К.: НУХТ, 2009. – 302 с.
31. Квасников Е. И. Биология молочнокислых бактерий / Е. И. Квасников. Ташкент, 2000. – 235 с.
32. Нестеренко О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования / О. А. Нестеренко. М., 1995. – 384 с.
33. Концевая И. И. Микробиология: физиологические группы бактерий. Практическое руководство для студ. биологич. спец. вузов / И. И. Концевая; М-во образования РБ, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Чернигов: Десна Полиграф, 2017. – 40 с.
34. Коваленко В.О., Євлаш В.В, Чернова Л.О. Мікробіологія молока і молочних продуктів: [Текст] навчальний посібник. Х.: ХДУХТ, 2011. – 136 с.
35. Лысак В. В. Физиология микроорганизмов : учеб.-метод. пособие / В.В.Лысак, Е.И.Игнатенко. Минск: БГУ, 2016. – 80 с.
36. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т.1: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
37. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т.2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 359 с.
38. Современная микробиология / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – 288 с.

Перелік промислових ферментів та сполук, отриманих з різних штамів *Lactococcus lactis*

Промисловий тип та продукти	Застосування / функції
Сполуки	
Молочна кислота	Консервант, ароматизатор, полімолочна кислота, пластик, емульгатор, зволожувач
Ацетоїн / діацетил, ліналоол	Ароматизатор
L-аланін	Підсолоджувач
Germacone D	Антимікробні, інсектицидні, феромони
$\beta$ -сесквіфелландрен	Протимікробний, протираковий засіб, антиоксидант
Гіалуронова кислота	Косметика, медична
Вітаміни	
Фолат (B11), рибофлавін (B12)	Харчова добавки
Біопаливо	
Етанол	Джерело енергії
Пептиди	
Бактеріоцин	Антимікробний, консервант
Бразеїн, мабінлін II	Підсолоджувач
Нізін Z	Харчовий консервант
Ферменти	
$\beta$ -циклодекстрин глюканотрансфераза	Розщеплення крохмалю
Кумарат СоА-лігаза, алкогольна ацилтрансфераза, ліналоол / неролідолсинтаза та інші	Метаболічна інженерія
Гідролаза жовчної солі (BSH)	Кишковий метаболізм, пробіотики
Уреаза	Гідроліз сечовини

Вплив різних факторів на середнє значення кількості клітин (log КУО / мл)  
*Lactococcus lactis* у поживному середовищі М1 з різною концентрацією солі

Фактор впливу	Концентрація солі, %	Дні					
		0	1	2	3	4	5
Контроль	0	5,17	9,46	9,06	8,07	6,90	6,26
	1	5,13	9,48	9,01	7,90	7,09	6,45
	3	5,14	9,40	9,06	7,76	6,24	6,04
	5	5,10	8,48	9,16	8,10	6,75	5,02
	7	5,11	4,83	5,15	6,38	7,27	6,93
Етанол	0	5,19	9,31	9,23	8,51	7,32	7,32
	1	5,19	9,37	9,09	8,03	6,87	6,86
	3	5,15	9,36	9,34	7,81	6,12	6,10
	5	5,15	6,72	9,14	9,14	8,45	7,06
	7	5,17	4,65	4,31	3,56	3,18	2,73
Помірне нагрівання	0	4,82	9,49	9,13	8,19	7,04	6,74
	1	4,82	9,54	9,05	7,55	6,71	6,62
	3	4,83	9,39	9,26	7,53	5,96	6,04
	5	4,81	6,41	9,11	9,47	8,38	6,10
	7	4,82	3,60	4,49	5,09	5,83	6,60
Пероксид водню	0	5,25	9,39	9,31	8,43	7,31	7,18
	1	5,33	9,42	9,18	8,23	6,95	6,74
	3	5,33	8,53	9,43	8,46	6,45	5,88
	5	5,30	6,17	6,61	7,70	7,93	7,77
	7	5,33	5,08	4,39	3,20	2,09	1,14
УФ світло	0	5,19	9,41	9,09	7,53	6,99	6,79
	1	5,24	9,48	8,99	7,35	6,80	6,63
	3	5,20	9,42	9,16	7,56	6,32	5,77
	5	5,19	8,20	9,21	9,17	7,83	5,42
	7	5,15	5,14	5,38	6,05	6,62	6,86