

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) _____ біотехнології та екологічного контролю _____
Кафедра _____ біотехнології і мікробіології _____

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
_____ Грегірчак Н.М. _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
_____ Пирог _____
Т.П. _____ (підпис)
(прізвище та ініціали)

« ____ » _____ 2021 р.

« ____ » _____ 2021 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності _____ 162 _____ «Біотехнології _____ та
біоінженерія» _____

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної _____ програми «Фармацевтична
біотехнологія» _____

на тему: _____ Пробиотичні властивості каротинсинтезувального штаму
Vacillus sp. П.2 _____

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 2

Гриненко Віталій
Олександрович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Скроцька Оксана Ігорівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти Хархота М.А.

(прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Рецензент

Литюга О.В.

(прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній
роботі немає запозичень із праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Здобувач _____

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	5

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ПРОБІОТИЧНІ КУЛЬТУРИ НА ОСНОВІ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>BACILLUS</i>	9
--	---

1.1. Пробіотичні культури, що застосовуються для людей.....	9
1.2. Пробіотичні мікроорганізми, що застосовується як основа для пробіотиків у ветеринарній медицині для тварин.....	14
1.3. Пробіотики для аквакультур.....	18

РОЗДІЛ 2. СИНТЕЗ КАРОТИНОЇДІВ ТА ПРЕБІОТИЧНИХ РЕЧОВИН	
---	--

2.1. Синтез каротиноїдів та пребіотичних речовин у представників роду <i>Bacillus</i>	21
2.2. Синтез каротиноїдів та пребіотичних речовин у представників інших родів бактерій.....	28

РОЗДІЛ 3. ПРОБІОТИЧНІ КУЛЬТУРИ МІКРООРГАНІЗМІВ, ЯКІ ЗДАТНІ СИНТЕЗУВАТИ КАРОТИНОЇДИ ТА ПРЕБІОТИЧНІ РЕЧОВИНИ.....	32
---	----

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 4. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	37
---	----

4.1. Об'єкти дослідження.....	37
4.2. Поживні середовища.....	38
4.3. Допоміжні матеріали, реагенти, розчини та розчинення.....	41
4.4. Методики дослідження.....	42
4.4.1 Вплив складу суміші екстрагентів на ефективність екстракції пігменту каротиноїдної природи.....	42
4.4.2 Дослідження пігменту каротиноїдної природи <i>Bacillus I 1₂</i> за спектрами поглинання.....	43
4.4.3 Дослідження впливу рН на накопчення біомаси <i>Bacillus I 1₂</i>	45

4.4.4	Визначення моносахаридного складу полісахариду <i>Bacillus I 1₂</i> при підвищених концентраціях калію у середовищі культивування.....	45
4.4.5	Дослідження антагоністичної активності штаму <i>Bacillus I 1₂</i>	46.
4.5	Статистична обробка даних.....	47
РОЗДІЛ 5. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....		49
5.1	Вплив складу суміші екстрагентів на ефективність екстракції пігменту каротиноїдної природи.....	49
5.2	Дослідження пігменту каротиноїдної природи <i>Bacillus I 1₂</i> за спектрами поглинання.....	51
5.3	Дослідження впливу рН на накопчення біомаси <i>Bacillus I 1₂</i>	55
5.4	Визначення моносахаридного складу полісахариду <i>Bacillus I 1₂</i> при підвищених концентраціях калію у середовищі культивування.....	56
5.5	Дослідження антагоністичної активності штаму <i>Bacillus I 1₂</i>	58
ВИСНОВКИ.....		62
ДОДАТОК 1.....		63
ДОДАТОК 2.....		64
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....		65

РЕФЕРАТ

Дипломна робота присвячена дослідженню пробіотичних властивостей каротинсинтезувального штаму *Bacillus* sp I 1₂. У літературному огляді наведені дані, що стосуються дослідження можливості генетичної модифікації продуцентів каротиноїдів з потенційними пробіотичними властивостями, які мають перспективу або застосовуються у якості пробіотиків для тварин, аквакультур чи людини; оптимізації умов культивування як пробіотичних культур мікроорганізмів так і культур які володіють пробіотичними та пребіотичними властивостями, тобто здатні синтезувати речовини, що сприятливо впливають на конститутивну мікрофлору людини та тварин. Було описано рід досліджень проведених з метою аналізу властивостей штамів мікроорганізмів, у тому числі і представників роду *Bacillus* які за результатами дослідження або до нього описувалися, як перспективні пробіотичні штами, що володіють специфічними властивостями.

Експериментальна частина містить інформацію щодо досліджень штаму *Bacillus* sp I 1₂ на антагоністичну активність щодо десяти найбільш розповсюджених умовно-патогенних мікроорганізмів, що можуть стати причиною захворювань чи хворобливих станів органів шлунково-кишкового тракту(ШКТ) вплив рН на накопичення біомаси, підбір композицій розчинників для найбільш ефективної екстракції синтезованого *Bacillus* sp I 1₂ пігменту з клітин продуцента, аналіз спектрів поглинання та хроматографічне дослідження синтезованого штамом *Bacillus* sp I 1₂ пігменту на мінеральному середовищі на основі глюкози та дослідження моносахаридного складу синтезованого штамом *Bacillus* sp I 1₂ полісахариду при високих концентраціях іонів калію у середовищі культивування. За результатами наведених вище досліджень були одержані та опрацьовані результати, що свідчили наступне: найвищий рівень антагоністичної активності був проявлений штамом *Bacillus* sp I 1₂ щодо таких мікроорганізмів як *Staphylococcus aureus* та *Candida albicans*(розмір зон затримок росту 22-26 ±

2 мм). Менш агресивно штам пригнічував ріст таких тест-культур як *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae* (розмір зон затримки росту коливався від 7 до 9 ± 2 мм). Штам *Bacillus* sp I 1₂ майже не пригнічував наступних представників тест-культур взятих у дослідження: *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli* (розмір зон затримок росту менше або дорівнює 3 ± 2 мм). Полісахарид синтезований штамом *Bacillus* sp I 1₂ мав наступний склад: глюкоза = 90,22 %. маноза = 6,68 %, галактоза = 2,47 %. Найбільш ефективною для екстракції композицією розчинників виявилася композиція ацетон : метанол у співвідношенні 2:1. Одержані спектри поглинання екстрагованого пігменту та хроматограма виходу досліджуваного зразку екстракту пігменту, що синтезує *Bacillus* sp I 1₂ на мінеральному середовищі з глюкозою говорять про те, що досліджуваний пігмент складається мінімум з двох каротиноїдів досить схожої структури, та було зроблене припущення, що дані каротиноїди можуть бути близькими похідними криптоксантину. Найбільш сприятливим значенням рН для накопичення біомаси штамом *Bacillus* sp I 1₂ на мінеральному поживному середовищі було значення у проміжку від 6 до 7.

Робота складається з 2 частин: огляду літератури, що містить 3 розділи в яких описано ступінь дослідженості тематики використання мікроорганізмів, що володіють пробіотичними та пребіотичними властивостями, зокрема найбільший акцент зроблено на рід *Bacillus*. Та експериментальної частини, яка складається з 2 розділів, у яких вказані матеріали та методики використані у даній роботі та результати і обговорення. Також включені загальні висновки зі списком використаних джерел літератури. Робота включає в себе 63 сторінки друкованого тексту, 9 рисунків, 2 таблиці та 79 літературних джерел, з яких 71 джерело є іноземним.

Ключові слова: *Bacillus*, пігмент, антагоністична активність, екстрагенти, спектри, рН.

ВСТУП

Дисбактеріози на сьогоднішній день, в умовах частого навантаження на шлунково-кишковий тракт, що є причиною надмірного вживання нездорової їжі (типу fast-food), небалансованого харчування, інтенсивного вживання антибіотиків (як з м'ясними продуктами так і при лікуванні інфекційних захворювань), погіршення екологічного стану довкілля та великого психологічного навантаження. Також дисбактеріозні стани можуть бути викликані певними захворюваннями шлунково-кишкового тракту (ШКТ). На сьогоднішній день корекція дисбактеріозних станів постає серйозною проблемою, як для світової медицини так і для України [1].

За статистикою останніх років було показано, що кількість зареєстрованих випадків дисбактеріозних станів (зокрема діареї) та інших шлунково-кишкових розладів зростає з кожним роком. Близько 15-20 % від населення України постійно перебувають у стані при якому порушується баланс мікрофлори ШКТ і зникає можливість вживання звичайних продуктів, та сильно знижує імунітет в цілому, тож такі люди більш сприятливі для розвитку серйозних захворювань. Близько 60 % населення України кожен рік мінімум 2-3 рази страждають на різні види шлунково-кишкових розладів які викликані з причин незбалансованого харчування чи харчового отруєння різного ступеня важкості. При цих захворюваннях основними препаратами для корекції цих станів виступають пребіотики та пробіотики. Прийом антибіотиків теж пов'язаний з цими розладами, тож для зменшення побічних дій антибіотиків паралельно призначаються відповідно та пребіотичні препарати [2].

Проблема лікування дисбактеріозів у тому, що самі по собі дисбактеріози – це не група хвороб, а скоріше стани викликані як наслідки деяких хвороб (як правило шлунково кишкових інфекцій) та як пост ефект антибіотикотерапії. А оскільки це стани їх неможливо лікувати як класичні

захворювання хімічними діючими речовинами які мають фармакологічний чи терапевтичний ефект. Дисбактеріози найчастіше викликані порушенням балансу між нормальною(молочнокислі бактерії: лакто-, біфідо-, та інші) та умовно патогенною (ентеробактерії, стафілококи, протеї та інші) [3].

Найбільш ефективними методами корекції дисбактеріозів є вживання упродовж певного курсу пребіотичних, пробіотичних та комбінованих (симбіотичних препаратів.

Пребіотики – речовини, що стимулюють ріст здорової(класичної мікрофлори) людини, а саме лакто- та біфідобактерій(вітаміни, олігосахариди) [5].

Пробіотики- живі чи спорові форми мікроорганізмів, що є представниками класичної або транзиторної мікрофлори людини, що можуть її відновлювати завдяки пригніченню умовно патогенної мікрофлори (ентеробактерій, протеїв та інших) утворенням бактерицидних речовин, синтезу антиадгезивних речовин, що зменшують адгезію умовно патогенної мікрофлори до стінок кишечника та синтезом речовин необхідних для класичної мікрофлори [5].

В залежності від механізму дії пробіотики поділяють на групи: підтримуючого та лікувального спрямування.

Пробіотики підтримуючого спрямування в основному є на основі молочнокислих бактерій родів *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* вони в основному займають місце існування мікрофлори людини, понижують рН та синтезують антиадгезини і таким чином пригнічують умовно патогенну мікрофлору та сприяють корекції дисбіозного стану[1,4].

Пробіотики на основі *Bacillus* є лікувального спрямування. Оскільки стимулюють відновлення мікрофлори прямим антагонізмом патогенів та умовних патогенів у ШКТ за рахунок виділення антибіотиків. І до того ж є транзиторними на відміну від молочнокислих бактерій і тому мають швидкий ефект[4].

95 % препаратів, які застосовують для корекції дисбактеріозів є або чисто пробіотичними(на основі мікроорганізмів) або пребіотичними. Однак не завжди застосування одного з цих типів препаратів є ефективним, в такому разі їх комбінують. Це відповідно також не завжди ефективно, оскільки досить часто пребіотичні речовини споживаються чи руйнуються самими пробіотичними мікроорганізмами з якими паралельно застосовують, тож підбір співвідношення і якісного складу таких комбінованих препаратів досить складний процес, який потребує великих фінансових затрат як на розробку так і на виробництво. Особливо це стосується пробіотиків на основі бактерій *Bacillus*[5,6].

Існують мікроорганізми які мають класичні пробіотичні властивості такі як антагоністична активність(зумовлена синтезом антимікробних речовин та антиадгезинів, стійкість до умов ШКТ та синтезують пребіотичні речовини здатні стимулювати ріст класичної мікрофлори (на основі молочнокислих бактерій)наприклад вітаміни, особливо каротиноїди. До таких мікроорганізмів відносяться деякі представники роду *Bacillus*, оскільки вони часто застосовуються як пробіотичні та здатні до синтезу каротиноїдів[7].

Необхідність у підвищенні ефективності дії пробіотичних препаратів зараз дуже висока. Одним з методів вирішення цієї проблеми є комбінування пробіотичних та пребіотичних властивостей у одному мікроорганізмі(застосування як основи мікроорганізму який поєднує ці дві властивості). А оскільки один із найбільш підходящих родів бактерій з досить гнучким метаболізмом –це *Bacillus*, що може володіти як пробіотичними так і пребіотичними властивостями то напрямок дослідження у області пошуку штамів даного роду з такими властивостями, дослідження речовин синтезованих даними мікроорганізмами, що здатні позитивно впливати на ріст і відновлення конститутивної мікрофлори кишечника людини і тварин у комбінації з дослідженням пробіотичних властивостей (зокрема антагоністичної активності) є перспективним та актуальним і перспективним напрямком дослідження, що буде сприяти підвищенню ступеня розробленості

та дослідженості даної сфери у науковій практиці з можливим подальшим застосуванням[1,2,7,8].

Мета роботи: Метою даної роботи є дослідження специфічних властивостей штаму *Bacillus* I 1₂ зокрема пробіотичних властивостей.

Завдання на дослідження: дослідити антагоністичну активність штаму *Bacillus* I 1₂ щодо найбільш розповсюджених представників патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, дослідити моносахаридний склад полісахариду синтезованого даним штамом при певних умовах культивування та складі поживного середовища, дослідити вплив рН на накопичення біомаси штаму *Bacillus* I 1₂, підібрати найбільш ефективний розчинник чи суміш розчинників для екстракції пігменту синтезованого даним штамом та дослідити спектри поглинання екстрагованого пігменту та провезти його хроматографічний аналіз.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1.

ПРОБІОТИЧНІ КУЛЬТУРИ НА ОСНОВІ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*

1.1. Пробиотичні культури, що застосовуються для людей

Ajay K. Manhar, зі співавторами досліджувала штам *Bacillus subtilis* AMS6, виділений з ферментованої сої, на пробиотичні властивості, зокрема на антагоністичну активність та безпечність щодо людини. За результатами дослідження *In vitro* штам показав високу антагоністичну активність щодо представників *Listeria*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* (зони затримки росту не менше 12 мм), у проведених дослідження на клітинах епітелію людини (Caco-2 cells), що характеризують здатність до антиадгезивної активності, показали, що штам знижує адгезію патогенних та умовно-патогенних культур на них, відповідно може запобігати збільшенню кількості мікроорганізмів що спричиняють дисбактеріозні стани. Штам є стійким до низьких рН(витримує (рН 2,5-3,0) та високих концентрації жовчних кислот(витримує концентрацію до 0,6 %) [9].

Оптимізації процесу культивування з метою збільшення концентрації біомаси та спор пробиотичного штаму *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 присвячена робота Tamar Khardziani зі співавторами. Метою роботи була діяльність спрямована на підбір оптимального середовища по складу солей та субстрату (експериментальними субстратами виступали: ксилоза, глюкоза,

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Пробиотичні культури на основі бактерій роду <i>Bacillus</i>.		Літ.	Маса	Масштаб
Розроб.	Гриненко В.О.								
Перевір.	Скороцька О.І.								
Консультант	Хархота М.А.								
Реценз.							Арк.	9	Аркушів
Н. Контр.					Кафедра БТМ				
Затверд.	Пидог Т.П.								

сахароза, та гліцерин), для одержання максимальної концентрації КУО на одиницю об'єму культуральної рідини.

Середовище з підібраним складом солей, яке виступало як експериментальне мало наступний склад (г/л): KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; дріжджовий екстракт – 3,0; пептон – 3,0; та субстрат у кількості 0,5 % (5 г/л). Параметри для вирощування були наступні: 48 годин при 37 °С, рН – 7,0; аерація. За результатами дослідження було визначено, що максимальну концентрацію живих клітин $3,5 \times 10^9$ КУО/мл штам *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895 давав на поживному середовищі з субстратом – глюкозою, отже цей субстрат виявився найбільш ефективний [10].

G. Sreekumar, та S Krishnan присвятили роботу оптимізації складу поживного середовища та умов культивування для одержання оптимальних значень концентрацій та параметрів культивування для інтенсифікації процесу накопичення біомаси пробіотичного штаму *Bacillus subtilis* SK09. В ході роботи оптимізувалося поживне середовище складу: лактоза, пептон, глюкоза, амоній цитрат, м'ясний екстракт, ацетат натрію методом підбору концентрацій у грамах на літр, в результаті було одержано 12 варіантів комбінацій значень концентрацій цих компонентів. Такі параметри як температура, рН та температура теж підбиралися подібним методом і теж було одержано 12 комбінацій значень цих параметрів. За тривалість культивування приймали 24 години ферментації при u 160 об/хв. За результатами оптимізації з 12 комбінацій була виділена 1. При якій була найвища концентрація біомаси у $10,051 \times 10^9$ КУО/мл. Це наступна комбінація: поживне середовище (%): лактоза – 2; пептон – 0,85; глюкоза – 10; амоній цитрат – 0,16; м'ясний екстракт – 0,5; ацетат натрію – 0,2; та параметри культивування: рН = 6,5; температура = 37°C [11].

Нуе-Lin Jeon, з колегами досліджували пробіотичні властивості нового перспективного штаму *Bacillus subtilis* P223 Штам проявляв високу стійкість при обробкою імітації шлункового соку(пепсин 0,3%, рН 2,5), жовчних кислот(обробка упродовж 24 годин 0,3 % дезоксихолевою кислотою).

У штаму спостерігалось інгібування росту *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 та *Escherichia coli* ATCC 25922 опосередковано при адгезії. Штам не продукував канцерогенний фермент β -глюкуронідазу, натомість маючи високу амілолітичну та протеолітичну активність. Серед восьми типів антибіотиків, які включали у дослідження стійкості до них штаму P223 лише стрептоміцин мав дію пробіотичний штам[12].

Ralf Jäger з колегами досліджував властивості пробіотичного штаму *Bacillus coagulans* GBI-30, що завдяки своїй високій протеолітичній активності покращує гідроліз складних білків та сприяє їх засвоєнню. Штам пропонується використовувати як біологічно активну дієтну добавку для кращого засвоєння складних білків. За результатами дослідження було встановлено, що штам збільшував концентрацію вільних амінокислот тим самим підвищував ефективність засвоєння білку(на прикладі казеїну) до 40 % порівняно з контролем. Оптимальне співвідношення для найбільш ефективної дії 20 г білку та 5×10^8 КУО[13].

Masanori Horie, Taisuke Koike з колегами дослідним шляхом оцінювали пробіотичні та пребіотичні властивості *Bacillus subtilis* BN. Було встановлено, що штам витримує низькі значення рН(максимально до значень 3-2 залишаються дієздатними 60 % клітин). При сумісному культивуванні з *L. crispatus* JCM 8778 та *L. casei* JCM 1134T при низьких значеннях рН не пригнічується ними та не чинить антагонізму, щодо них. Концентрація клітин молочнокислих бактерій при сумісному культивуванні з *Bacillus subtilis* BN збільшується порівняно з контролем у середньому на 80 % порівняно з контролем. Проявляє високу антагоністичну активність щодо *S. enterica* JCM 1652, при сумісному культивуванні. Що виражається зменшенні концентрації клітин *S. enterica* JCM 1652 за 6 годин у 9 разів[14].

S. M. S. Monteiro з колегами присвятив роботу масштабуванню процесу культивування *B. subtilis* 210 з колб до пробної пілотної ферментації у біореакторі. Робота перш за все була створена з метою підбору поживного

середовища по складу та концентрації певних ключових компонентів: глюкоза (джерело вуглецю) та джерело азоту(амоній фосфат та амоній нітрат. За основу брали поживне середовище наступного складу: Бакто-бульйон – 8 г/л , $\text{KCl} - 1$, $\text{MgSO}_4 - 0.25$. Склад середовища модифікували додаванням вітамінів, розчину солей з макро- та мікро- елементами, а також змінювали вихідний субстрат на глюкозу гліцерин або пептон. В результаті було створено 7 комбінацій компонентів, що давало 7 варіантів поживного середовища, найбільшу концентрацію біомаси культура продуцента давала на середовищі(г/л): глюкоза – 20; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O} - 3.21$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 5.95$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 2.72$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 1.07$; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 1.34$; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 - 2.95$; 10 мл розчину солей: 2 мл $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} 0.03 \text{ M}$; 20 мл тіаміну гідрохлориду 1.5 M та $1.45 \text{ мл Ca(NO}_3)_2 1 \text{ M}$.

У процесі пілотного культивування оптимізували наступні параметри: кількість субстрату(г/л): глюкози – 20; джерела азоту $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 12$; $\text{Ca(NO}_3)_2 - 1$. На поживному середовищі наведеного складу при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ за 12 годин досягався максимальний вихід біомаси у $1.3 \times 10^{10} \text{ КУО/мл}$ [15].

Rong Fan зі співавторами досліджував можливість використання пробіотичних штамів *Bacillus coagulans* DSM1, *B. coagulans* DSM2312, *B.coagulans* PS5, *B. coagulans* Thorn для очищення фруктоолігосахариду від низькомолекулярних домішок(моноцукрів) за допомогою ферментації вище зазначених штамів на середовищі з додаванням сирого фруктоолігосахариду(ФОС) до поживного середовища як основного або додаткового субстрату. Очищувальну ферментацію проводили у пілотному біореакторі при $40 \text{ }^\circ\text{C}$ від 24 до 48 годин. За результатами ферментації, а в основному за концентрацією біомаси, швидкістю росту і зменшенню концентрації моноцукрових домішок у середовищі з ФОС. Було визначено, що найбільш ефективним є штам *B. coagulans* Thorn та *B. coagulans* DSM1, оскільки мають найбільшу швидкість росту та споживають більше моноцукрів ніж інші за 48 годин. Концентарція біомаси збільшується до значень $7,06 \times 10^8$ та $5 \times 10^8 \text{ КУО/мл}$ відповідно до штаму Thorn та DSM1. Активне зниження концентрації моноцукрів при

культивуванні триває 2-2,5 години. Весь процес очищення від моноцукрів без урахування часу адаптації культури до поживного середовища триває 6-7 годин. Найбільш ефективна концентрація біомаси для очищення фруктоолігосахариду сягає $7-6 \times 10^8$ КУО/мл [16].

Ізольовані штами *B. subtilis* KATMIRA1933, *B. amyloliquefaciens* B-1895 досліджувалися *Ammar AlGhuri*, зі співавторами на пробіотичні, антагоністичні властивості. Дослідження показали, що штами проявляють антагоністичну активність щодо тест-культур *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus intermedius*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*. Розмір зон затримки росту сягають від 12 до 15 мм. Дані тест-культури є небезпечними для людини патогеначи (деякі умовні-патогени). Наряду з іншими класичними пробіотичними властивостями штами володіють стійкістю до таких антибіотиків: бацитрацин та стрептоміцин(зони затримки росту до 2 мм спори штамів стійкі до низьких значень рН(зберігають життєздатність при рН 2,0). При цьому не спричиняють гемолізу та не є патогенні. Тож пропонуються як компонент комбінованих препаратів пробіотичного спрямування для людей у перспективі [17].

Marie Lefevre зі співавторами досліджувала властивості нового пробіотичного штаму *B.subtilis* CU1, а саме стійкість до антибіотиків, антагоністична активність, гемолітичну активність. За результатами дослідження було визначено, що штам стійкий до еритроміцину, гентаміцину, тетрацикліну, ванкоміцину(зони затримки росту менше 0,5 мм. Штам продукує сурфактанти, що впливають на зменшення адгезії патогенів та умовних патогенів у кишечнику. Штам не проявляє гемолітичну активність, не синтезує токсинів, антагоністична активність щодо штамів *Staphylococcus* проявляється у зонах затримки росту у розмірі 20-25 мм [18].

1.2. Пробиотичні мікроорганізми , що застосовуються як основа для пробиотиків у ветеринарній практиці(для тварин)

Антагоністичні властивості ізоляту *Bacillus subtilis* KКУ213 досліджувала Nalisa Khochamit зі співавторами. Штам пропонується як потенційно пробиотичний для застосування у птахівництві. За результатами досліджень на антагоністичну активність, та пробиотичні властивості було встановлено, що штам синтезує бактеріоцин, здатний гальмувати ріст грам-позитивних бактерій, зокрема: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis*, зони затримки росту (10-20 мм). Було досліджено, що оптимальна температура росту становить 37 °С, максимальна концентрація біомаси досягалася на 30 годину культивування. Штам проявляє стійкість до низьких значень рН(витримує рН 2 упродовж 48 годин) [19].

Інтенсифікації біосинтезу біомаси пробиотичного штаму *Bacillus coagulans* присвячена робота Kavita R. Pandey та Babu V. Vakil , для інтенсифікації біомаси були створені 4 пробні процеси культивування основане на поживному середовищі(г/л): CSL – 15; декстроза – 3; пептон – 0.5; CaCl₂.2H₂O – 0.37; MnSO₄.7H₂O – 0.27; при температурі 37 °С , рН – 6.5; 150 об/хв. 4 варіативні процеси культивування відрізнялися концентраціями джерел азоту та вуглецю: декстрази та пептону. 4 варіанти поживних середовищ для процесів володіли наступним співвідношенням вуглецю та азоту C/N + тривалість культивування : В1 = 40:1 , 44 години, В2 = 35:1; 38 годин, В3 = 35:1; 30 годин, В4 = 30:1, 30 годин. За результатами ферментацій найбільш ефективним варіантом поживного середовища є середовище з співвідношенням C/N та тривалістю культивування є середовище з варіантом В4. За культивування при цьому варіанті концентрація КУО становила 3.8 × 10¹¹ КУО/мл, концентрація вологої біомаси становила 30 г/л [20].

Neungnut Chaiyawan з співавторами виділив і описав штам *Bacillus sp.* ТЗ–1 , який має виражені пробиотичні властивості і може бути використаний як компонент пробиотичного препарату для профілактики курей від шлунково-

кишечних розладів. Штам був виділений з травного тракту курчат-бройлерів. Авторами було проведено ряд досліджень, що описують антагоністичні властивості ізоляту, його стійкість до концентрату шлункового соку на прикладі обробки 0.4 % пепсином, стійкість до антибіотиків, а також термостійкість. За результатами дослідження було встановлено, що штам навіть у споровій формі не володіє високою стійкістю до антибіотиків, з 5 видів антибіотиків: пеніцилін, рифампіцин, амоксицилін, тетрациклін, ванкоміцин штам найбільш стійкий до пеніциліну (діаметр зон затримки росту 15-37 мм), зони затримки росту у інших антибіотиків становлять від 20 до 50 мм. Вегетативні клітини штаму витримують температур 80 °C до 100 хв, а температуру 100 °C до 20 хв. Натомість спори можуть витримувати температуру 100 °C більше 100 хв. Штам проявляє найвищу антагоністичну активність щодо патогенних штамів курей, таких родів як, *Clostridium* (зона затримки росту при сумісному культивуванні на агаризованому середовищі у 10-20 мм). До інших родів патогенів: *Salmonella Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *Escherichia*, *Clostridium*, та *Campylobacter* активність низька, зони затримки росту 5-8 мм. При обробці культуральної суспензії 0,4 % розчином пепсину вегетативні форми штаму витримують 120 хвилин при 37 °C[21].

Sonia Tabasum Ahmed з колегами досліджували властивості та можливість використання пробіотичного штаму *Bacillus amyloliquefaciens* ВАР як кормової добавки до харчування курей-бройлерів. Було показано, що штам володіє антагоністичною активністю відносно *Escherichia coli* (зони затримки росту до 15 мм) Також штам володіє підтримуючою здатністю, що виявляється у покращенні набору маси дослідних курей при вживанні $7 \cdot 7.22 \cdot 10^7$ КУО/г корму на 20-30 %[22].

Z.F.Zhang та J.H.ChoI досліджували антагоністичні властивості *Bacillus subtilis* UBT-MO₂. Штам пропонується як пробіотичний для застосування як кормової підтримуючої добавки до раціону курей. Дослідження показали, що концентрація умовно патогенного штаму *E. coli* у виділеннях курей

зменшується при додаванні до кормового раціону біомаси *Bacillus subtilis* UBT-MO₂ на 28-32 % [23].

М Thirabunyanon з співавтором проводили дослідження антагоністичних властивостей 10 ізолятів *Bacillus subtilis*, що пропонуються як пробіотичні щодо патогенів на прикладі наступних представників *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*. Результати дослідження показали, що штами нерівномірно активні, щодо окремих патогенів, однак найбільш активні з них проявляють антагонізм до всіх представлених тест-культур патогенів. Найбільш активний виявився штам *Bacillus subtilis* NC111, що проявляв активність у розмірах зон затримки росту, величина яких сягала в середньому 15-20 мм[24].

Дослідженню антагоністичних властивостей галостійкого штаму *Bacillus sp.* Mk22 присвячена робота авторів Sekar Ashokkumar та Packyam Mayavu. Дослідження показали, що штам проявляє високу антагоністичну активність до специфічного патогенна: *V. paraheamolyticus*, яка проявляється у зонах затримки росту розміром від 9 до 16 мм. Бактерія витримує високу солоність води або середовища культивування на рівні 7-15 % хлориду натрію[25].

Nadja Larsen та співавтори досліджували специфічні властивості штамів *Bacillus sp.*, штами пропонуються застосовувати як компонент пробіотику для підтримуючого раціону свиней. Властивості оцінювали за 3 експериментами: стійкість до антибіотиків, стійкість до рН нижче 4.0 та антагоністична активність. Загальна кількість штамів становила більше 120. З них найбільш активних і перспективних менше 10. Один з найбільш перспективних за результатами дослідження виявився штам *Bacillus amyloliquefaciens* 15536. Штам не володіє резистентністю до 7 антибіотиків пептидної, бета-лактамної, стрептоміцинової природи. Антагоністична активність щодо 3 штамів *E. coli* та 1 штаму *C. perfringens* становила від 2 до 8 мм. Штам володіє стійкістю до 0,3 % розчину жовчі при 37 °C упродовж

24 годин(кількість живих клітин перевищує 80 %). При витримуванні суспензійної культури при рН 4.0 спостерігається зменшення кількості клітин до 10 % від початкового[26].

Santi Devi Upadhaya зі співавторами досліджували властивості потенційно пробіотичних штамів *B. subtilis* RX7 та *B. methylophilus* C14, які пропонують застосовувати як добавку до раціону свиней.

Було встановлено, що обидва штами виявляють пригнічувальну активність щодо *Salmonella enterica* та *Escherichia coli*. За результатами дослідження концентрація живих клітин *Salmonella enterica* *Escherichia coli* у виділеннях заражених ними свиней зменшувалися на 90 % при додаванні до кормів суспензійної культури з суміші 2 штамів(1:1) *Bacillus subtilis* RX7 (1×10^9 КУО/г) та *Bacillus methylophilus* C14 (1×10^9 КУО/г) [27].

Дослідження М.А. Хархоти, А.И. Осадчої та інш. показують, що сумісне культивування двох штамів *B. subtilis* УКМ 5139 та *B. subtilis* УКМ 5140 при певних умовах культивування (рН 7,1 та температурі 37 °С), на оптимізованому складі поживного середовища(г/л): глюкоза – 1,5 %; натрію цитрат – 1,29; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,75; KH_2PO_4 – 9,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,18; за 24 години культивування у комплексі дає в результаті вищий приріст біомаси 1×10^{10} , значення зон затримки росту не змінювалися порівняно з окремим культивуванням штамів, а в деяких тест-культур були більшими[12]. Було визначено, що оптимальне співвідношення культур на початку культивування становить 1:2 (*B. subtilis* УКМ 5139 та УКМ 5140 відповідно). Тож у роботі доведено, що сумісне культивування даних штамів збільшує вихід біомаси та відносно деяких тест-культур антагоністичну активність при певних умовах на синтетичному поживному середовищі порівняно з окремим культивуванням, що дає змогу у майбутньому підвищити ефективність пробіотичних препаратів застосуванням синергічних штамів *Bacillus subtilis*[28].

Як перспективний пробіотичний штам пропонується *Bacillus amyloliquefaciens* УКМ В-5113, штам описано у статті авторства . В. О. Мілян,

М. А. Хархота, О. О. Нечипуренко, як перспективний, оскільки він володіє високою антагоністичною активністю щодо *S. aureus* та представників роду *Streptococcus*, помірну до *E. coli* та *Proteus sp* та низьку до *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*. Штам досить стійкий при низьких значеннях рН (зберігає життєздатність при рН 2,5-3). Витримує концентрації 0,2-0,4 % холевої кислоти, та 0,6-0,8 % дезоксихолевої кислоти, які являються основними жовчними кислотами які виділяються у людини[29].

1.3. Пробіотики для аквакультур

Anushree Das зі співавторами досліджувала властивості штаму *B. amyloliquefaciens* FPTB16 . Штам використовується як пробіотична добавка до кормових концентратів у технології вирощування тигрових креветок роду *Calta*. Авторами було досліджено стійкість штаму до низьких температур, антагоністичну активність щодо спец-патогенів: *E. tarda*, *A. hydrophila*, *V. harveyi* та *V. parahaemolyticus*, середнє значення зон затримки росту становило відповідно: 8,9 мм, 9,1 мм, 9,3 мм та 6,6 мм, також дослідження проводили на визначення концентрації аніонного супероксиду, що оцінює активність синтезованої штамом пероксидази. За наступними результатами було показано, що штам володіє стійкістю до низьких температур(за 28 °С упродовж 4 тижнів виживає 44 % вегетативних клітин, натомість за температури 4 °С за такий же період виживає 18 % вегетативних форм). Концентрація супероксиду порівняно з контролем зменшується на 20 %[30].

Xue-Fei Li зі співавторами досліджували 249 штамів на можливість використання, як пробіотику культури на основі найбільш антагоністично активних. Антагоністичну активність визначали за допомогою тест-культури досить розповсюдженого патогену аквакультур. *V. parahaemolyticus*. З 249 досліджуваних ізолятів 24 проявляли пряму активність, щодо вище зазначеного патогену, 16 з них було відібрано для подальших досліджень на антагоністичну активність. З них були виділені 2 штами : *B. pumilus* B16 та *B. mojavensis* J7 які проявляли найвищу активність, яка становила наступні

значення: *B. pumilus* B16: зона затримки росту 20 мм , *B. mojavensis* J7: зона затримки росту 23,5 мм[31].

Ratchanu Meidong зі співавторами досліджували можливість нового пробіотичного штаму *Bacillus siamensis* B44 для використання як компонента пробіотичного препарату для аквакультури гібридного каналного сома. За результатом дослідження властивостей штаму було встановлено, що *Bacillus siamensis* B44 проявляє антагоністичну активність до специфічних патогенів риби: *Aeromonas hydrophila* (зона затримки росту 18 мм), *Streptococcus agalactiae* (зона затримки росту 20 мм), *V. parahaemolyticus* (зона затримки росту 11 мм). До представників родів *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* активність становила на рівні розмірів зон затримки росту у діапазоні 12-20 мм. Штам володіє стійкістю до концентрату шлункового соку. (При витримуванні культури у 0,1 % розчині шлункового соку при 37 °C за 3-4 годин кількість клітин зменшується всього на 10-11 %. Штам не проявляв стійкості до 8 найбільш розповсюджених антибіотиків[32].

Yanglei Yip зі співавторами досліджували властивості пробіотичного штаму, що застосовується для пробіотичних культур *Bacillus velezensis* JW. Результати дослідження на антагоністичну активність та стійкість до умов з високим вмістом кислот та шлункового соку показали наступне: антагоністична активність проявлена до *L. garvieae* *S. agalactiae* у формі розмірів зон затримки росту величина яких становила 15-20 мм. Стійкість до низьких значень рН 2..3 визначалась відсотком виживання бактерій, яка становила 90%. Відсоток виживання у розчині шлункового соку становила 78-60 %[33].

Jianguang Li та Yongping Xu проводили дослідження направлені на визначення антагоністичної активності *Bacillus subtilis* YB-1 *Bacillus cereus* YB-2 які використовуються у складі пробіотичного препарату для аквакультури морського огірка *Apostichopus japonicus*. Антагоністичну активність визначали на тест-культурі *Vibrio alginolyticus* , зони затримки

росту становили відповідно: *Bacillus subtilis* YB-1 – 14 мм *Bacillus cereus* YB – 18 мм [34].

Висновок

Отже, можна зробити висновок, про те, що більшість перспективних пробіотичних культур які плануються для застосування або просто досліджують на перспективу мають досить високу антагоністичну активність за рахунок синтезу антибіотичних речовин широкого спектру та синтезу додаткових речовин, що сприяють антагонізму, зокрема ПАР(наприклад сурфактин) які можуть як руйнувати цитоплазматичну мембрану так і порушувати адгезію мікроорганізмів, щодо який проявляється антагонізм. А адгезія мікроорганізмів на поверхні місця існування одна з найбільш вагомих причин стрімкого розмноження деяких умовно-патогенних мікроорганізмів

РОЗДІЛ 2.

СИНТЕЗ КАРОТИНОЇДІВ ТА ПРЕБІОТИЧНИХ РЕЧОВИН

2.1 Синтез каротиноїдів та пребіотичних речовин у представників роду *Bacillus*

Практичному культивуванню і збільшенню накопичення каротиноїдів присвячена робота авторства *О.О. Нечипуренко зі співавторами*. В ній розроблено склад поживного середовища з наступною концентрацією компонентів (г/л) м'яса (ДСТУ 3696-98) – 23; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,6; K_2HPO_4 – 2,0; FeSO_4 – 0,035. Та наступні технологічні особливості культивування: інокулянт для засіву становив 5 % об, з концентрацією клітин 10^6 – 10^7 КУО/мл, рН від 6,3 до 7,5(оптимальне 7,1) температура 37 °С , тривалість культивування 36 годин. У результаті було встановлено, що на даному поживному середовищі *Bacillus subtilis* 1.1 синтезує 4,5 г/л біомаси, що у 2,5-3 рази більше ніж на середовищі з такою ж концентрацією солей та з глюкозою у якості субстрату, концентрація каротиноїдів досягала 965 ± 45 мг/л, що у 5 разів більше ніж на відповідному синтетичному середовищі. Максимальний синтез біомаси і каротиноїдів спостерігався у проміжку між 18 та 24 год культивування[35].

Л.В. Авдєєва та К.Є. Борецька досліджували здатність до синтезу та вплив на синтез, додавання певних солей або джерел органічних елементів, пігментів пульверимінової, меланінової та каротиноїдної природи у представників різних видів та ізолятів роду *Bacillus* на поживному мінеральному середовищі визначеного складу з субстратом глюкозою,

					НУХТ БТЕК 05.02.04 ДР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Синтез каротиноїдів та пребіотичних речовин			Літ.	Маса	Масштаб
Розроб.		Гриненко В.О.								
Перевір.		Скороцька О.І.								
Консультант		Хархота М.А.								
Реценз.										
Н. Контр.					Арк. 21 Аркшів 11					
Затверд.		Пидог Т.П.			Кафедра БТМ					

Гаузе-2 та МПА. Особливості культивування наступні: рН 7,1, температура 37 °С, тривалість 72 години. Було встановлено, що найкраще пігментсинтезувальна здатність проявляється у більшості штамів на середовищі Гаузе-2 та глюкозо-мінеральному середовищі, виявлено, що з понад 20 факторів(додавання певних мінеральних та органічних речовин), вплив на посилення синтезу пігментів мають лише: 1) концентрації дріжджового автолізату, 2)MnSO₄; 3)MgSO₄; 4)ZnSO₄; 5)FeSO₄. Штам *B.subtilis* 5127 синтезував на мінеральному середовищі позаклітинний каротиноїдний пігмент, що не потребувало важкого екстрагування при його виділенні оскільки водорозчинний[36].

Zheng Guan з співавторами проводили генетичну модифікацію біосинтетичного апарату ізопреноїдів(а конкретно каротиноїдів С₃₀) у *Bacillus subtilis* з метою досягнення надсинтезу каротиноїдів . Ними були модифіковані гени crtM та crtN у мевалоненовому шляху біосинтезу(МЕР-шлях) додаванням до їх послідовностей на певних ділянках додаткових промоторів. Це призвело до незалежної експерсії генів і збільшення виходу каротиноїдів.: Вихід каротиноїдів С₃₀ збільшився у 8 разів порівняно до модифікації[37].

Tarangini Korumilli та Susmita Mishra присвятили роботу оптимізації ключових параметрів при біосинтезі каротиноїдного пігменту у *Bacillus clausii*. Як субстрат використовувався рисовий порошок. Ключові параметри культивування, які підлягали оптимізації- рН та температура. В результаті було встановлено, що максимальна концентрація С₃₀ каротиноїдного пігменту у 90 мг/г сухої біомаси, що у 2 рази вище відносно початкового результату спостерігається при рН 7,0 та температурі культивування у 35 °С[38].

Інтенсифікації синтезу С₃₀ каротиноїдів присвячена робота Dan Xue та співавторів у якій поставляється вирішення проблеми інтенсифікації біосинтезу каротиноїдів на поживному середовищі наступного складу(г/л) триптон - 17, соєвий триптон- 3; декстроза – 2,5; NaCl– 5,0; K₂HPO₄ -2,5; у *B. subtilis* 168 методом модифікації оперонів синтезу каротиноїдів по МЕР – шляху біосинтезу. Модифіковані оперони разом з генами синтезу були

заключені у плазмідні вектори на пересаджені клітинам *B. subtilis* 168. Рекombінантним штамам відповідно давали назви і проводили пробні культивування з метою визначення рівня експресії генів, що відповідають, за синтез каротиноїдів та вимірювали концентрацію наступних. Із 9 сконструйованих плазмідних рекombінантних штамів найбільшу концентрацію каротиноїдів у біомасі дав штам *B. subtilis* 168 p04GCEGA відповідно з плазмідною «p04GCEGA». Концентрація каротиноїдів становила 10.65 мг/г сухої біомаси[39].

Kazuuyuki Yoshida зі співавторами проводили генетичну модифікацію штаму *Bacillus subtilis* з метою покращення синтезу та переведення у більш легку для екстракції ацетоном форму каротиноїдів синтезованих даним штамом. Генетичну модифікацію проводили введенням рекombінантної плазмиди pHYcrtMN у клітини каротинсинтезуючого штаму *Bacillus subtilis*. В результаті модифікації посилювався синтез каротиноїдів C₃₀, що збільшувало стійкість штаму до певної концентрації перекису водню, порівняно з штамом до модифікації (*B. subtilis*(pHY300PLK), стійкість зростала до 60 %, що свідчить про збільшення концентрації каротиноїдів, також процес екстракції був полегшений завдяки кращому виходу каротиноїдів з клітини в результаті модифікації плазмідною pHYcrtMN, сумарна кількість каротиноїдів C₃₀ у екстракті біомаси досліджуваного штаму C₃₀ була вищою на 30% відносно екстракту біомаси штаму до модифікації. Основними детермінованими каротиноїдами були: 4,4-диаполікопін та 4,4-диапонеуропорин [40].

Laura Pres Fonce зі співавторами досліджувала якісний склад суміші каротиноїдних пігментів синтезованих штамом *Bacillus indicus* HU36 на різних поживних середовищах, досліджувала вплив складу середовища на синтез деяких пігментів каротиноїдної природи, яких переважна більшість у складі біомаси продуцента. За результатами дослідження було встановлено, що всі синтезовані каротиноїди- похідні лікопіну, на двох із експериментальних середовищ накопичуються сумарно у кількості 130-180 мг

на г біомаси за період 24-48 годин, при подальшому культивуванні вміст зменшується. Основні пігменти, які синтезуються на 2 середовищах та видимі неозброєним оком жовтого та помаранчевого кольору більше ніж на 90 % складаються з : жовтий: 1-глікозил-3,4-дигідроаполікопін, помаранчевий : 1-глікозил-3,4-дигідроаполікопінат [41].

Hideaki Takano, Kou Mise з колегами досліджували вплив на функціонування біосинтетичного апарату каротиноїдів LitR, регуляторного аденозин –В₁₂ залежного білку. Для можливості інтенсифікації біосинтезу каротиноїдів у *Bacillus megaterium* QM B1551. Було встановлено, що білок LitR є промотором- регуляторним для генів синтезу каротиноїдів та терпеноїдних сполук. Виявилося, що даний білок активніше синтезується при освітленні середовища культивування бактеріями світлом у червоному, зеленому та білому світлі видимого спектру. За різницею площі піків хроматограми при аналізі екстракту біомаси на концентрацію каротиноїдів було показано, що концентрація каротиноїдів при освітленні середовища культивування збільшується на 35-45 %. Також було встановлено, що при додаванні у середовище аденозин-похідного вітаміну В₁₂ (аденозин-В-12) у комбінації з освітленням збільшує концентрацію каротиноїдів на 50-60% [42].

Le H. Duc зі співавторами досліджували якісний та кількісний склад пігментів виявлених у 6 ізолятів *Bacillus* sp. Склад пігментів був як правило каротиноїдної природи. У подальшому пігменти з 6 ізолятів екстрагували хлороформом та піддавали аналізу за допомогою ВЕРХ-хроматографії. Найбільш схожі спектри поглинання до каротиноїдів мали пігменти ізолятів HU19 та HU36, їх піддавали детальному подальшому аналізу. Було визначено, що у спорових формах ізолятів HU19 та HU36 концентрація пігментів підвищувалася у 2..3 рази порівняно з вегетативними формами. Вегетативні форми штаму HU19 містили наступні пігменти у наступній кількості(мг/г біомаси): фітоїн – 4; гідроксидеметилспероїден – 10; деметилспероїден – 5. Відповідно штам HU36 мав наступні співвідношення:

фітоїн – 2 , гідроксидеметилспероїден – 8 , деметилспероїден – 3. У спорових формах співвідношення зберігаються однак кількість зростає у 2-3 рази[43].

S. Steiger зі співавторами досліджували властивості нового C₃₀ який синтезується ізолятом *B.firmus* SF241. За результатами дослідження було встановлено, що синтез нового каротиноїду збільшує стійкість штаму до окисників у середовищі культивування. При дослідженні спектрів поглинання каротиноїда виділеного екстракцією було встановлено, що максимум поглинання спостерігається при 492 нм. При порівнянні з спектрами відомих каротиноїдів спостерігалось 90 % співпадіння з спектром поглинання діацилглікозил-4,4'-діаполікопен 4,4'-діацид, головний каротиноїд, виділений з *M. rhodium*[44].

Nicola Manzo з співавторами досліджували властивості пігменту синтезованого морським штамом *Bacillus pumilus* SF214. За результатами дослідження було встановлено, що пігмент синтезується лише у кінці стаціонарної фази росту. Найбільша концентрація пігменту виражена у спектрі поглинання при 410 нм досягається у проміжку з 14 по 18 годину культивування. Максимуми поглинання пігменту характерні для каротиноїдів(на проміжку від 360 до 480 нм), Пігмент флюорисцує при освітленні УФ-променями з випромінюванням зеленого світла. При досягненні певного рівня концентрації пігменту у біомасі при культивуванні бактерій спостерігається підвищення стійкості до активних окисників(наприклад до перекису водню), що виражається у концентрації клітин яка більша відносно контролю на 40-50%[45].

Ayako Osawa зі співавторами досліджували властивості та синтез пігменту виділеного з *Bacillus firmus* GB1. За результатами дослідження Який представлений 4,4-діаполікопіном. Дослідженню підлягали такі об'єкти як молекулярна маса та структура, антиоксидантна активність. За результатами досліджень було встановлено, що хімічна формула пігменту на 95-99 % відповідає 4,4-діаполікопіну, що відноситься до апокаротиноїдів(каротиноїдів з відсутністю бета-іононового кільця) Антиоксидантна

активність виражалася у співвідношенні початкової концентрації антаксантину(тест-речовини) до обробки перекисом водню та додаванням досліджуваного пігменту та концентрації після обробки та витримки. Співвідношення переведене у відсотки становило середнє значення: 66 %. Тобто при додаванні пігменту 66 % антаксантину не окислюється після обробки його перекисом водню[46].

P.V. Silva зі співавторами досліджували властивості фруктоолігосахаридів(пребіотичних речовин) синтезованих *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. Пребіотичні властивості даних олігосахаридів зумовлені інтенсифікацією росту молочнокислих бактерій – представників постійної мікрофлори людини. За результатами дослідження було проаналізовано дію олігосахаридів на трьох представниках молочнокислих бактерій виміряну у збільшенні концентрації біомаси наступних при споживанні олігосахаридів: *L. casei* (LC-1), *L. paracasei* ATCC 27092 та *L. plantarum* ATCC 14917. Приріст концентрації біомаси за 48 годин становив(Log_{10} (КУО/мл): *L. casei* - 7,6; *L. paracasei*–7,54 та *L. plantarum* – 8,88 відповідно. Утилізація фруктоолігосахаридів характеризувалася через збільшення концентрації біомаси у г/л за 48 годин культивування і мала наступні значення: для *L. casei* – 0,54 *L. paracasei* – 1,45 та *L. plantarum* – 0,98, відповідно з підвищенням концентрації біомаси збільшувалося виділення молочної кислоти. У середньому для штамів молочнокислих бактерій її концентрація при додаванні у середовище фруктоолігосахаридів становила 54-58 мМ [47].

Phanwira Pangsi з співробітниками присвятили свою роботу дослідженню пребіотичної активності маноолігосахаридів утворених в результаті секреції ферменту маннази штамом *Bacillus circulans* NT 6.7. Маноолігосахариди є олігомерами манану творені гідролізом під дією маннази. При додаванні маннази та манану у середовище культивування з молочнокислими бактеріями спостерігається збільшення концентрації біомаси у середньому на 40%. Інгібувальна активність лактобактерій при цьому збільшується, що проявляється у зменшенні концентрації клітин

представників родів *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* на 30-40 % відносно контролю та *Staphylococcus aureus* на 90 % відносно контролю [48].

Muhammed Majeed разом з співавторами досліджував дію ферментного комплексу синтезованого *Bacillus coagulans* MTCC 5856, що гідролізує галактоманан до олігосахаридів, які володіють пребіотичною активністю. Основний досліджуваний ефект культивування *Bacillus coagulans* MTCC 5856 з додаванням галактоманану – синтез ферментів, які його розкладають до олігосахаридів, які підвищують концентрацію клітин деяких видів лактобактерій, що чинить інгібуючу дію на концентрацію клітин *E. coli*. За результатами дослідження, було встановлено, що оброблення суспензії клітин *E. coli* культуральною рідиною на основі поживного середовища з галактомананом та *Bacillus coagulans* MTCC 58569 (при сумісному культивуванні) чинить інгібуючу дію на клітини *E. coli*, що виражається у зменшенні концентрації клітин *E. coli* на 30 % завдяки підвищенню вмісту молочної, оцтової, пропіонової кислот, внаслідок збільшення кількості клітин молочнокислих бактерій та *Bacillus coagulans* [49].

С.-Н. Liu з колегами присвятив роботу дослідженню можливості застосування *Bacillus subtilis* E20 як продуцента біопрепарату на основі синтезованого цією бактерією комплексу протеаз, який чинить пребіотичну дію щодо *Litopenaeus vannamei* (тигрових креветок). Основною метою роботи була оптимізація параметрів культивування *Bacillus subtilis* E20 з метою одержання максимальної активності протеазного комплексу. За результатами досліджень було оптимізовано такі параметри культивування у заздалегідь взятих діапазонах: температура (10-50 °C), рН (5-10), концентрація хлориду натрію (0 - 5%). Оптимальні значення становили: температура 40 °C, рН 6 - 8, концентрація хлориду натрію = 0 %. Максимальна активність ферменту становила 162 од/ мг білка (протеазного комплексу). Концентрація клітин при цьому становила 1×10^8 КУО/мл [50].

Висновок

Представники роду *Bacillus* володіють досить широким спектром генів для синтезу специфічних речовин, зокрема вони випростовуються для захисту самих клітин від несприятливих факторів середовища так і від конкурентних видів, однак синтезовані таким чином метаболіти можуть володіти пребіотичними властивостями, зокрема каротиноїди які синтезують представники роду *Bacillus* можуть мати пребіотичні властивості, зокрема провітамінну активність, чинити загальний антиоксидантний ефект, тощо. Також прикладом подібних пребіотичних метаболітів можуть бути полісахариди, які можуть виступати як джерело субстратів для конститутивної мікрофлори тварин чи людини (молочнокислих бактерій) так і перешкоджати доступ до поглинання субстрату певних видів патогенних мікроорганізмів. Тож при аналізі літературних джерел було знайдено досить багато робіт, присвячених вивченню пробіотичних мікроорганізмів роду *Bacillus*, здатних синтезувати певні пробіотичні речовини, що тільки підвищує перспективу їх подальшого дослідження та застосування.

2.2 Синтез каротиноїдів та пребіотичних речовин у представників інших родів бактерій

Masoud Namidi та колеги описали оптимізацію біосинтезу каротиноїду у продуцента *Halorubrum* Sp. TBZ126. Метою роботи була оптимізація умов культивування таких як температура, вміст NaCl, pH, кількість інокуляту, оберти перемішування, В результаті були оптимізовані параметри культивування до наступних значень: температура: 31-32⁰C; pH: 7,5-7,9; вміст натрію хлориду: 18,3 % масових, кількість інокуляту для засіву: 10 %, оберти мішалки: 120 об/хв. Після оптимізації концентрація каротиноїда була підвищена на 40 % відносно контролю, у масовому значенні 10 мг/л, концентрація біомаси відповідно становила 0,84 г/л[51].

Qin Zhou та співавтори досліджували можливість використання ізоляту бактерії фототрофу для очищенні стічних вод та паралельного синтезу біомаси та каротиноїдів. В основному проводили дослідження, які

стосувалися оптимізації інтенсивності опромінення світла для інтенсифікації синтезу каротиноїдів та біомаси. За результатами досліджень було встановлено, що найбільша концентрація біомаси накопичується при інтенсивності освітлення у 2000 люкс, у кількості 2.64 г/л. Однак для максимального синтезу каротиноїдів даної інтенсивності світла недостатньо, максимальна концентрація каротиноїдів досягається при освітленні у 8000 люку (1,45 мг/л) [52].

Оптимізації кількісного складу поживного середовища для виробничого культивування *Rhodobacter sphaeroides*, з метою виробництва каротиноїдних сполук присвячена робота Deming Chen та співавторів. Як об'єкт оптимізації було взяте поживне середовище початкового складу з прийнятим діапазоном концентрацій (г/л): $MgSO_4$ – 0,1...0,3; Na_2HPO_4 – 0,4...4; $FeSO_4$ – 0.01...0.03; Na_2CO_3 – 0...4; лимонна кислота – 8.1; , NH_4Cl – 3.5; CSL – 1.8. В результаті роботи ,при використанні математичної моделі з врахуванням критеріїв важливості факторів(концентрацій компонентів) для оптимізації концентрації компонентів у прийнятому діапазоні концентрацій були оптимізовані концентрації наступних компонентів: $MgSO_4$ – 0,12; Na_2HPO_4 – 2,05; $FeSO_4$ – 0.03; Na_2CO_3 – 2,22. При одержаних оптимальних концентраціях компонентів одержували найбільший вихід каротиноїдів у 17.245 мг/л. Концентрації субстрату та CSL не підлягали оптимізації [53].

Liqing Tian з співавторами досліджували можливість використання *Deinococcus xibeiensis* R13, виділеного з Китаю , який володіє стійкістю до гама-випромінювання, як продуцента каротиноїдів та досліджували фактори, які впливають на продуктивність штаму у біосинтезі каротиноїда з метою їх оптимізації. Ключовими параметрами, які впливають на біосинтез каротиноїда були визначені рН, температура, та співвідношення С: N та концентрація іонів феруму. У ході дослідження було максимально оптимізовано ці параметри до наступних значень: температура 30 ° С, рН 7,0 С / N 1: 5 (фруктоза: триптон) та концентрація Fe^{2+} = 10 мкМ/л. При культивуванні за таких умов протягом 48 годин накопичується максимальна концентрація каротиноїда у

6,64 мг / л та біомаси 7,22 г/л, що у 2,2 рази вище ніж на неоптимізованих умовах[54].

Chewapat Saejung та Warangkanang Ampornpat оптимізували умови культивування фототрофної бактерії з метою інтенсифікації синтезу каротиноїдів у її біомасі, використовуючи як субстрат стічні побутові відходи. Оптимізації підлягали такі параметри як швидкість перемішування та освітленість фотобіореактора для культивування продуцента. В результаті дослідження було оптимізовано освітленість до значення 4000 лк, інтенсивність обертів перемішуючого пристрою була оптимізована до 150 об /хв. Час культивування становив 72 години. Технологія культивування включала підживлення біореактора та культури в ньому розчином джерела азоту. За оптимізованих вище умов культивування максимальна концентрація каротиноїда досягалася у значенні 74,3 мг/л [55].

Робота Braz. J. Chem присвячена оптимізації ключових параметрів культивування *Sporidiobolus pararoseus* IN з використанням середовища на основі цукрової патоки у пілотному біореакторі. Оптимізації підлягали наступні параметри: температура, рН та частота перемішування. Як основну методику оптимізації використовували методику з використанням математичної моделі. Значення температури та швидкості перемішування були оптимізовані до наступних значень: температура 27,5 °С, перемішування 150 об/хв. Оптимальне рН було встановлено на рівні 6...6,5. Загальний максимальний вихід каротиноїдів становив 18,0 мг/л[56].

Anna Aronsson зі співавторами досліджували можливість 7 ізолятів *Rhodothermus marinus* синтезувати ксиланазу, яка сприяє утворенню арабіноксилоолігосахаридів, що чинять сприятливий вплив на молочнокислі бактерії, які представляють конститутивну мікрофлору людини. У ході дослідження було встановлено структуру даного ферменту та його активність у різних ізолятів *Rhodothermus marinus*. За результатами дослідження активність ферменту ксиланазу синтезованої ізолятами *Rhodothermus marinus* в середньому досягала активності 50-60 од мл. Максимальну активність

проявив ізолят G720N у значенні 115 од/мл , що у 5-7 разів вище ніж у більшості інших ізолятів[57].

Farjana Islam та Narayan Roy досліджували можливість використання ізоляту *Aeromonas* sp 1. Для біосинтезу целюлази, яка може використовуватися як пребіотичний компонент раціону рослинної тварин. За результатами дослідження було встановлено, що оптимальними параметрами для біосинтезу целюлази з високою активністю є температура культивування у 40 °С, рН на рівні 7,0, при тривалості культивування 24 години. Очищений висолуванням сульфатом амонію фермент-целюлаза мала максимальну активність у 2655 од/мг. При дослідженні молекулярної маси встановлено величину маси ферменту яка дорівнює 67 кДа. За висновками роботи можна передбачити що даний продуцент дає досить високу активність ферменту, що дає можливість розглядати продуцента *Aeromonas* sp 1 як перспективного[58].

Висновок Деякі представники мікроорганізмів-екстремалів, зокрема представники *Halorubrum* здатні до синтезу пігментів, що можуть чинити загальний антиоксидантний ефект, при тому є досить велика кількість мікроорганізмів, яка синтезує каротиноїди при певному виді освітлення, будь то видимий спектр, УФ-промені чи радіація створена штучно. Деякі представники виду *Rhodococcus* синтезують каротиноїдні пігменти у декілька разів ефективніше ніж представники роду *Bacillus*. Деякі види бактерій досить успішно синтезують полісахариди досить специфічної природи, які не споживаються ніким окрім молочнокислих бактерій, що може чинити пряму пребіотичну дію. Однак зазвичай більшість родів бактерій які не відносяться до представників нормальної мікрофлори людини чи тварин, та не є представниками *Bacillus* не володіють пробіотичними властивостями, такими як стійкість до рН шлункового соку та антагоністична активність до умовно-патогенної мікрофлори, тому ймовірно не зможуть адаптуватися до умов ШТК і стати потенційними пробіотичними культурами.

РОЗДІЛ 3.

ПРОБІОТИЧНІ КУЛЬТУРИ МІКРООРГАНІЗМІВ ЯКІ ЗДАТНІ СИНТЕЗУВАТИ КАРОТИНОЇДИ ТА ПРЕБІОТИЧНІ РЕЧОВИНИ

Sekar Jinendiran зі співавторами досліджували пробіотично потенційні ізоляти S01, V03, V04, здатні до синтезу каротиноїдів, що проявляється у здатності до пігментації. Ізолят, з найбільшим потенціалом пропонується застосовувати як добавка до кормового препарату для аквакультур *A. veronii* і *C. joostei*. Найбільш антагоністично активний ізолят з трьох досліджених виявився S01 (розмір зон затримки росту 15-19 мм) до таких тест-культур *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*. При дослідженні на стійкість до низьких значень рН(3-4) та стійкості до розчинів жовчних кислот дослід показав, що більше 90% клітин ізоляту S01 виживають при рН 3 упродовж 72 годин, при концентрації жовчних кислоти в 0,1 % кількість живих клітин за 72 години становила більше 80 % [59].

Fifi M. Reda зі співавторами досліджувала ізолят пігментсинтезувальний ізолят *Pediococcus pentosaceus* N33 на потенційні пробіотичні властивості (антагоністичну активність та стійкість до низьких рН), а також виділяли та досліджували структуру основного антимікробного компоненту, що виділяв ізолят у середовище для інгібування тест-культур мікроорганізмів, на яких перевіряли антагоністичну активність.

					НУХТ БТЕК 05.02.04 ДППЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3 Пробиотичні культури мікроорганізмів які здатні синтезувати каротиноїди та пребіотичні речовини	Літ.	Маса	Масштаб
Розроб.		Гриненко В.О.						
Перевір.		Скροцька О.І.						
Консультант		Хархота М.А.						
Реценз.						Арк. 32	Аркушів 4	
Н. Контр.					Кафедра БТМ			
Затверд.		Пирог Т.П.						

За результатами було встановлено, що ізолят проявляв високу антагоністичну активність щодо тест-культур родів *Lysinibacillus*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, що проявлялось у розмірах зон затримки росту 31-33 мм. Було встановлено, що основний антимікробний компонент. Що зумовлює антагонізм являє собою низькомолекулярний білок молекулярною масою менше 10 кДа. Дана антимікробна сполука вкрай стабільна, оскільки було досліджено, що вона витримує температурну обробку при 121 °С упродовж 15 хв, та витримує перепади рН в районі від 2 до 11. До того ж штам синтезував каротиноїдний пігмент, хімічну формулу з'ясували уданому дослідженні методом порівняння спектрів поглинання екстрагованого пігменту у області УФ-світла. Виявилось, що спектри поглинання пігменту на 95 % співпадають з спектрами педіоксантину [60].

Chung-ChihTseng та колеги займалися генетичною модифікацією пробіотичних дріжджів *Kluveromyces marxianus* з метою створення ними вбудованого шляху біосинтезу астаксантину- найсильнішого антиоксиданту серед каротиноїдів для створення додаткових властивостей у пробіотичної культури *Kluveromyces marxianus*, що дало б можливість підвищити антиоксидантний ефект при застосуванні даних дріжджів як пробіотичного компоненту для аквакультур. В результаті модифікації введенням вектору *bkt* який містив послідовність синтезу астаксантину (*Hrchyb*) одержану з клітин *H. Pluvialis*, був одержаний штам *Kluveromyces marxianus* S 3-2, що синтезував три стереоізомери астаксантину у сумарній кількості 9,972 мг/г біомаси. Співвідношення кількостей ізомерів наступне: 3S, 3'S-астаксантин: 3R, 3S-астаксантин: 3R, 3R-астаксантин: 1:2:1[61].

N. Kotowicz зі співавторами досліджували можливість використання двох пігментованих штамів *Bacillus pumilus* (червона пігментація) та *Bacillus megaterium* (жовта пігментація) як пробіотичних компонентів та можливість біосинтезу ними вітамінних речовин. Було досліджено стійкість клітин культур до низьких значень рН номіналом 2,3,4, а також досліджували стійкість до жовчних кислот при витримці у 0,2 % розчині жовчного соку.

Результати показали, що *Bacillus pumilus* SG43 та *Bacillus megaterium* SG385 стійкі до таких випробувань, оскільки % живих клітин при рН становила 79-91%. Оцінювали антиоксидантну активність культуральної рідини, яка містить не менше ніж $1 \cdot 10^9$ КУО/мл *Bacillus pumilus* та *Bacillus megaterium* (окремо кожен вид). Результати показали, що антиоксидантна активність збільшується зі збільшенням концентрації клітин у культуральній суспензії. Активність штаму SG43 у середньому на 10-15 одиниць активності вища ніж у SG385, що виражається у відносній концентрації перекису водню у середовищі після додавання H_2O_2 , відносно початкової концентрації. У ході досліджень було розглянуто можливість синтезу рибофлавіну штамом SG43 та оцінено кількісні показники синтезу даного вітаміну на різних поживних середовищах: LB – середовище та ВНІВ – середовище. Було встановлено, що більша концентрація рибофлавіну утворюється на середовищі ВНІВ у кількості 27,2 мг/л порівняно з 22,3 мг/л, на середовищі LB, що доводить більшу ефективність ВНІВ – середовища над LB у утворенні рибофлавіну [62].

Huong Thi Nguyen з співавторами досліджували пігментсинтезувальні властивості пробіотичного пігментованого штаму *Bacillus aquimaris* SH6, який використовують для аквакультури креветок *L. vannamei*. Штам характеризується окрім пробіотичних властивостей високою здатністю до синтезу астаксантину, що підвищує вміст пігментів необхідних для життєдіяльності креветок. Досліджено, що висока концентрація каротиноїда астаксантину у біомасі 5-6 мг/г продуцента підвищує концентрацію пігменту у креветках у 2-3 рази зі збільшенням кількості біомаси у кормових препаратах для креветок [63].

Tran Thi Luong з колегами досліджували пігментсинтезувальну та антиоксидантну здатність пробіотичного ізоляту *Bacillus aquimaris* CH9 виділеного з шлунково-кишкового тракту курей. Штам пропонується як компонент кормового-пробіотичного препарату. За результатами дослідження встановлено, що синтезований пігмент *Bacillus aquimaris* CH9 по спектрам

поглинання на 80-90 близький до каротиноїдів. За допомогою хроматографічного аналізу очищеного екстракту пігменту було встановлено, що пігментацію зумовлюють більше 11 видів каротиноїдних пігментів. З'ясовано, що вміст пігменту у біомасі становить 439 мкг/г сухої біомаси. Антиоксидантна активність пігменту проявляється у зменшенні концентрації вільних радикалів до 78 % відносно початкової концентрації[64].

Biao Chen та колеги інтенсифікували біосинтез еумеланінових пігментів з вираженою протираковою активністю у *Bacillus licheniformis* шляхом посиленої активації ферменту тирозинази з підбором параметрів культивування продуцента меланіну та додаванням у середовище активаторів синтезу та активності ферменту. В результаті були підібрані оптимальні умови культивування для одержання високої концентрації еумеланіну, температура на рівні 60 °C, рН 9.0, аерація на рівні підтримки концентрації кисню у 20 %. Середовище культивування містило за основу субстрат-мальтозу, обов'язковими компонентами для активного біосинтезу тирозинази та меланінів були присутність іонів Cu^{2+} у кількості 0,01 г/л, та екстракту печінки у кількості 1 г/л. При таких умовах біосинтез тирозинази посилювався у 6 разів. Концентрація меланіну теж збільшувалася відповідно. Максимальна концентрація доходила до 7.9 мг/л[65].

L V Avdeeva та M A Kharkhota пропонують використовувати каротинсинтезувальний штам *Bacillus amyloliquefaciens* IMV B-7513 у якості компоненту пробіотично-пребіотичного препарату з провітамінною активністю на його основі. Дослідження цих авторів полягають у встановленні провітамінної активності синтезованих штамом *Bacillus amyloliquefaciens* IMV B-7513 каротиноїдів та їх ідентифікацію, а також якісний та кількісний склад.

Встановлено, що основними каротиноїдами, які синтезує штам являються апо-8-гама-каротин, апо-8-неоспорин, глікозил-апо-8-бета-каротин, апо-8-фітоїн. Основним каротиноїдом що синтезується штамом є апо-8-гама-каротин(є апо C_{30} каротиноїдом). Апо-8-гама-каротин проявляє провітамінну активність, перетворюючись на ретинол. Підібрана найбільш

ефективна система розчинників для екстракції каротиноїдів з біомаси : хлороформ-метанол-етилацетат 1:1:2[66].

Alejandra de Moreno de LeBlanc з колегами досліджували можливість синтезу пробіотичним штамом *L. Plantarum* CRL 2130 вітаміну B2 (рибофлавіну) За результатами дослідження було встановлено, що штам синтезує рибофлавін на поживному середовищі « Лурія Бернарді» рибофлавін у кількості 14-20 мг/л. Даний штам можна ефективно використовувати як перспективний компонент пробіотичного препарату з комбінованим ефектом [67].

Yousef Mohammed та співавтори наводять оптимізовану технологію одержання ціанкобаламіну штамом *Bacillus megaterium* на середовищі наступного складу (г/л): глюкоза – 30; гліцерин – 5; дріжджовий екстракт – 24; триптон, – 12; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 3; $CaCO_3$, – 3; KH_2PO_4 , – 17mM; K_2HPO_4 , – 17mM; $CoCl_2 \times 6H_2O$, – 100 мг; ALA – 100 мг; DMВ – 100 мг. рН 6.8. Оптимізації підлягав час культивування та температура. В результаті оптимізації параметрів: температура 30 °С, тривалість культивування оптимізована до 24 годин. Максимальну концентрацію ціанкобаламіну одержували у кількості 204,46 мг/л при концентрації біомаси у 13,3 г/л, що у 3 рази більше відносно контролю[68].

Висновок:

Мікроорганізмів, які можуть поєднувати у собі як пробіотичні так і пребіотичні властивості досить небагато і навіть більшість з тих які вже відомі сильніше володіють одними властивостями ніж інші оскільки це зумовлено їх фізіолого-біохімічними особливостями. Серед таких мікроорганізмів є представники деяких родів дріжджів , молочнокислих бактерій та роду *Bacillus*. Найбільша кількість мікроорганізмів з комбінацією потенційних пробіотичних властивостей з пребіотичними(синтезом спец. сполук пов`язана в першу чергу з гнучкістю метаболізму бацил та можливістю пристосовуватися до специфічних умов середовища, що і дає проявитися їх специфічним властивостям, які можуть бути використані .

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 4.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1 Об'єкти досліджень

Основний об'єкт дослідження

Об'єктом досліджень даної роботи є штам мікроорганізму *Bacillus* sp I₁₂, що був отриманий з робочої колекції мікроорганізмів відділу антибіотиків Інституту мікробіології та вірусології ім. Заболотного. За родовою належністю штам ідентифіковано до назви роду, а саме роду *Bacillus*. Штам здатен до синтезу пігментів, на деяких поживних середовищах. Штам ймовірно може проявляти антагоністичну активність до деяких груп мікроорганізмів відповідно до того, як проявляють дану активність інші поріднені представники роду *Bacillus*. Відомо, що даний штам може метаболізувати як вуглеводневі субстрати, зокрема фруктозу, глюкозу, манозу, тощо та субстрати білкової природи, зокрема казеїн, пептон, триптон та деякі амінокислоти. Культура досліджуваного штаму *Bacillus* sp I₁₂ зберігалася у вигляді культури на агаризованому скошеному поживному середовищі у холодильнику при температурі 4 °С з частотою пересіву 2-3 місяці.

					НУХТ БТЕК 05.02.04 ДП ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Матеріали та методи дослідження.	Літ.	Маса	Масштаб
Розроб.		Гриненко В.О.						
Перевір.		Скроцька О.І.						
Консультант		Хархота М.А.						
Реценз.						Арк. 37	Аркушів 10	
Н. Контр.					Кафедра БТМ			
Затверд.		Пирог Т.П.						

Інші мікроорганізми, що були використані у роботі

Для визначення антагоністичної активності штаму *Bacillus* sp П1₂ необхідно було використовувати тест-культури аби оцінити активність штаму (та оцінити здатність) пригнічувати розвиток і ріст патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. У дослідженнях використовувалися наступні тест-культури: *Proteus vulgaris* B-905, *Pseudomonas aeruginosa* B-900, *Pseudomonas aeruginosa* B-329, *Salmonella enterica* B-921, *Staphylococcus aureus* B-904, *Staphylococcus aureus* B-4001, *Klebsiella pneumoniae* B-920, *Escherichia coli* -3, *Escherichia coli* B-906, *Candida albicans* Y-268;

Тест-культури зберігаються при тих же умовах на тому ж поживному середовищі що і ізоляти *Bacillus* sp. Дані штами не володіють патогенними властивостями оскільки втратили їх при постійному довготривалому зберіганні у стабільних умовах які відрізняються від диких умов їх зберігання тому не мають небезпеки для людини.

4.2 Поживні середовища

Для зберігання, відновлення культур мікроорганізмів досліджуваних у даній роботі, дослідження впливу рН, накопичення каротиноїдного пігменту та дослідження антагоністичної активності використовувалися наступні поживні середовища:

Середовище ГРМ-агар (для зберігання та відновлення культур мікроорганізмів)

Склад середовища ГРМ (г/л): гідролізат рибного борошна – 8,0; пептон – 8,0; хлорид натрію – 5,0; агар-агар – 14,0; рН : 7-7,4[66].

Особливості приготування середовища: У мірну колбу на 1 л вноситься наважка готового середовища ГРМ-бульйон у кількості 21 г, в колбу додається 500 мл води та ретельно перемішується до повного розчинення. Потім зважується 14 г агар-агару і вноситься у туж колбу, далі розчин у колбі доводиться до мітки і ставиться на водяну бані на 10 хвилин до повного розчинення агару. При потребі точного значення рН його встановлюються за

допомогою додавання розчину гідроксиду натрію чи соляної кислоти під контролем рН-метра. Стерилізація відбувається у автоклаві за температури 112 °С протягом 20 хвилин, у пробірках попередньо розливши середовище у кількості однієї з частини пробірки, після стерилізації пробірки розташовують на спеціальній підставці під кутом для створення скошеного агаризованого середовища.

Дане середовище у агаризованому стані використовується для зберігання культур мікроорганізмів як тест-культур так і ізолятів. А також для відновлення культур перед визначенням антагоністичної активності після довготривалого зберігання.

Середовище Гаузе-2(для визначення антагоністичної активності та для зберігання культури у робочому стані)

Середовище складу (г/л)

Триптон – 2,5; бульйон Хоттінгера – 30 мл або пептон – 5; глюкоза – 10; хлорид натрію – 5; агар-агар – 14; рН : 7-7,4[58,59]. Дане середовище використовується для визначення антагоністичної активності у даному випадку методом відстроченого антагонізму з використанням ізолятів *Bacillus* sp I₁₂ та штамів тест-культур наведених вище.

Особливості приготування: на вагах зважують 2,5 г триптону, відміряють 30 мл бульйону Хоттінгера або замість нього зважують 5 г пептону. Переносять у мірну колбу на 500 мл, додають 200-300 мл води, перемішують до повного розчинення і доводять до мітки і перемішують ще раз. Зважують 10 г глюкози і 5 г хлориду натрію та 1 г агар-агару, переносять у колбу на 1 л додають 500 мл води і перемішують, потім ставлять на водяну баню до повного розчинення агару. Стерилізують обидва розчини в різних колбах в автоклаві за температури 112 °С протягом 20 хвилин. Після стерилізації розчини змішують в одній колбі і в асептичних умовах. Закривши колбу ватно-марлевою пробкою колбу ставлять на водяну баню, якщо агар не повністю розчинився, до його повного розчинення. Далі середовище

розливають в асептичних умовах на чашки Петрі по 30-35 мл поки воно не застигло. Після застигання середовища можна приступати до роботи.

Середовище №15 (для накопичення каротиноїдів)

Середовище складу (г/ л): глюкоза – 10; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,9; KH_2PO_4 – 9,6; цитрат натрія – 1,3; MgSO_4 – 0.120; FeSO_4 – 0.150; MnSO_4 – 0.150; рН – 7.0[58]. Середовище представляє собою готову суміш для розведення водою, в ній відсутній лише агар-агар, який додається за необхідності.

Особливості приготування (1 літру середовища) : Середовище готують у кінцевому варіанті наступним чином : 1) спершу готують та стерилізують розчини композицій:

Приготування композиції А На вагах зважують 10 г глюкози, 4,9 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 9,6 г KH_2PO_4 ; 1,3 цитрату натрію, наважки готують окремо одна від одної у окремих пластикових ємностях для зважування. Потім у колбу місткістю 1 л додають 350 мл води, нагрівають на водяній бані до 60-70 °С, далі вносять наважки послідовно у такій послідовності: глюкоза, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, цитрат натрію. Після внесення кожної наважки перемішують розчин до повного розчинення компонента наважки до повного розчинення. Так роблять з кожною наважкою. Після приготування композиційного розчину колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують при 112 °С 20 хвилин при тиску у 0,5 мПа.

Приготування композиції Б. На аналітичних вагах зважують 120 мг MgSO_4 , 150 мг FeSO_4 та 150 мг MnSO_4 . Наважки готують окремо одна від одної у окремих пластикових ємностях для зважування. Потім у колбу місткістю 2 л додають 650 мл води дистильованої, нагрівають на водяній бані до 70 - 80 °С, далі вносять спочатку 150 мг MnSO_4 , перемішують до повного розчинення. Потім додають 120 мг MgSO_4 , перемішують до повного розчинення 150 мг FeSO_4 перемішують до повного розчинення. Після внесення кожної наважки перемішують розчин ще раз. За допомогою розчину 0,1н HCl та рН-метру доводять рН розчину до 5,0 по краплям. Після приготування композиційного розчину та підведення до рН колбу закривають

ватно-марлевою пробкою та стерилізують при 130 °C 20 хвилин при тиску у 1,5 мПа.

2) Після стерилізації розчинів їх охолоджують до 30-40 °C та приливають розчин композиції А з колби на 1 л до композиції Б у колбу на 2 л. Операцію проводять у асептичних умовах. Одержаний розчин перемішують. Доводять рН одержаного поживного середовища до 7,0 з точністю до 0,2. В асептичних умовах за допомогою рН- метра та стерилізованого при 130 °C упродовж 20 хв розчину 0,1 н NaOH. рН доводять наступним чином: стерильно відбирають пробу поживного середовища у кількості 3 мл у кювету рН метра, доводять рН нестерильним розчином 0,1 н NaOH до 7,0 та фіксують кількість розчину. Після цього розраховують еквівалентну кількість розчину для 997 мл поживного середовища. Потім у стерильних умовах переносять розраховану кількість уже стерильного розчину у колбу з поживним середовищем. Перемішують.

4.3. Допоміжні матеріали, реагенти, розчини та розчинники

Допоміжні розчини:

Титрувальний розчин 0,1N NaOH

Для приготування 1 л 0,1 Н розчину гідроксиду натрію необхідно 2,3 г NaOH, решта -вода дистильована.

Особливість приготування: у мірну колбу заданої місткості (наприклад 1 л) вносять наважку гідроксиду натрію(NaOH) у потрібній кількості (2,3 г), перед цим у колбу наливають половину дистильованої води від розрахованого потрібного об`єму(500 мл). Перемішують збовтуванням колби. Після цього водою дистильованою доводять до мітки колби та ще раз перемішують. Зберігають розчин у скляних віалах чи флаконах з кришкою.

Титрувальний розчин 0,1N HCL

Соляна кислота у звичайному агрегатному стані- газ, тому її застосовують у вигляді концентрованого 36 % розчину. Для приготування розчину 0.1 Н HCl необхідно 3,6 г(2,45 мл) 36 % розчину HCl, решта -вода дистильована.

Особливість приготування: у мірну колбу заданої місткості (наприклад 1 л) вносять певну кількість води дистильованої (500 мл) та відміряну кількість 36 % розчину соляної кислоти (HCL) у потрібній кількості (2,45 мл), Перемішують збовтуванням колби. Після цього водою дистильованою доводять до мітки колби та ще раз перемішують. Зберігають у скляних віалах чи флаконах з кришкою.

Розчин для обробки біомаси 1 М NaOH

Для одержання 1 Н розчину гідроксиду натрію необхідно: 23 г NaOH; решта -вода дистильована.

Особливість приготування: у мірну колбу заданої місткості (наприклад 1 л) вносять наважку гідроксиду натрію(NaOH) у потрібній кількості (23 г), перед цим у колбу наливають половину дистильованої води від розрахованого потрібного об'єму(500 мл). Перемішують збовтуванням колби. Після цього водою дистильованою доводять до мітки колби та ще раз перемішують.. Зберігають у скляних віалах чи флаконах з кришкою.

Екстрагенти:

Метанол, хлороформ, етанол, ацетон

Рухомі фази:

Ацетонітрил

Допоміжні агенти:

Трифтороцтова кислота, дериватизуючий агент, 10% лужний розчин боргідриду натрію.

4.4 Методики дослідження.

4.4.1 Вплив складу суміші екстрагентів на ефективність екстракції пігменту каротиноїдної природи

Наважку біомаси 24 добової культури штаму *Bacillus* sp I 1₂ вирощеної на середовищі № 15 яку одержували після центрифугування культуральної рідини при 6000 об/хв 8 хвилин піддавали обробкою розчином 0,2 н гідроксидом натрію у співвідношенні 1:10 для відділення каротиноїдів зв'язаних з ліпідами мембрани клітин бактерій. Процес проводили при

кімнатній температурі 5 хвилин. Після біомасу промивали, та екстрагували розчинниками.

Як відомо каротиноїди у бацил дуже важко екстрагуються звичайними розчинниками такими як хлороформ, ацетон та інші, тож як правило застосовують суміші розчинників у поєднанні з УЗ-дезінтеграцією клітин. Для екстракції каротиноїдів було відібрано 3 найбільш розповсюджені комбінації розчинників: 1- метанол : дихлорметан(1:1), 2- ацетон :метанол(2:1), метанол :хлороформ(1:1).

Композиції екстрагентів додавали до біомаси після промивання метанолом у співвідношенні біомаса комбінація розчинників 1:10. Суміш перемішували та піддавала УЗ-дезінтеграції клітин при температурі 45 °С 30 хвилин. Після екстракції суспензію розділяли на центрифугу при 3000 об/хв упродовж 6 хвилин. Надосадову рідину фільтрували на мембранному фільтрі та піддавали аналізу на спектрофотометрі в УФ-області при довжинах хвиль від 250 до 400 нм. Ефективність дії суміші розчинників оцінювали по величині піку спектру поглинання у області від 250 до 400 нм.

4.4.2. Дослідження пігменту каротиноїдної природи *Bacillus sp* I 12 за спектрами поглинання

Одержують культуральну рідину для аналізу на середовищі № 15 для біосинтезу каротиноїдів культивуванням упродовж 24 годин при 37 °С у колбі Ейлеймеєра місткістю 750 мл у кількості 100 мл . Посівний матеріал культури одержують культивуванням на агаризованому середовищі ГРМ-агар у пробірках зі скошеним агаризованим середовищем упродовж 24 годин при 37 °С. Після чого ним засівали колбу Ейлеймеєра на 750 мл з розрахунку: 1 пробірка= 1 колба. Після культивування культуральну рідину відбирають у кількості 40 мл та центрифугували при 6000 об/хв упродовж 8 хв. Надосадову рідину зливають та заливають біомасу 1 н розчином гідроксиду натрію у кількості 10-15 мл. Перемішують та витримують 5 хв при кімнатній температурі. Потім дану суспензію центрифугують при 6000 об/хв упродовж 8 хв. Потім 2 рази промивають водою та центрифугують при тому ж режимі.

Після цього 1 раз біомасу промивали метанолом та переносять у скляні віали місткістю 10 мл. Біомасу заливають сумішшю розчинників ацетон : метанол у співвідношенні 2:1. Кількість суміші розчинників відносно кількості біомаси(по об'єму становила 10:1. Після додавання розчинників до біомаси одержану суспензію перемішували та піддавали дезінтеграції на УЗ-дезінтеграторі при температурі 45 °С упродовж 30 хв. Після дезінтеграції до суспензії додавали 1 мл 99% ДМСО (диметилсульфоксиду) для кращого виходу каротиноїдів з клітини. Після цього ще дезінтегрують на тій же установці упродовж 10 хвилин. Дезінтегровану суспензію фільтрують через фільтр з порами до 0,1 мкм та аналізують на рідинному ВЕРХ хроматографі «Agilent» , використовуючи колонку з сорбентом С18 та у якості рухомої фази використовували ацетонітрил.

Детектор використовують спектрофотометричний у діапазоні хвиль від 300 до 500 нм. Вихід продукту фіксують при 460 нм. Режим аналізу: тиск -90 бар, кількість проби -250 мкл, швидкість потоку рідкої фази 1 мл/хв.

4.4.3. Дослідження впливу рН на накопичення біомаси *Bacillus sp I 1₂*

Для дослідження впливу рН на накопичення біомаси було обрано наступний набір значень рН для дослідження : 4, 5,6,7,8,9. Для цього відновлювали культуру штаму *Bacillus sp I 1₂* спочатку на агаризованому ГРМ-середовищі у пробірках при 37 °С упродовж 24 годин , потім стерильно пересівали у колбу з 100 мл середовища №15 та культивували 24 години на качалці при 37 °С для накопичення біомаси. Паралельно з цим готують 6 колб заповнених поживним середовищем № 15 з різним значенням рН від 4 до 9 з кроком 1 та точністю 0,2 одиниці. Після доведення рН колби засівали культурою з першої колби по 10 мл суспензії у кожену колбу. Після цього культивували 24 години при 37 °С. Концентрацію біомаси визначали за допомогою градувального графіка виходячи зі значень оптичної густини одержаних у ході дослідження у кожному зразку з певним значенням рН.

4.4.4. Визначення моносахаридного складу полісахариду *Bacillus sp* I 12 при підвищених концентраціях калію у середовищі культивування

Одержують культуральну рідину для аналізу на середовищі № 15 для біосинтезу каротиноїдів зі збільшеною у 2 рази концентрацією іноів калію порівняно з стандартним складом середовища № 15 (компонент KH_2PO_4 замінюється компонентом K_2HPO_4 у такій же концентрації - 4,9 г/л культивуванням упродовж 24 годин при 37°C у колбі Ейлеймеєра місткістю 750 мл у кількості 100 мл.

Посівний матеріал одержували культивуванням на агаризованому середовищі ГРМ-агар у пробірках зі скошеним агаризованим середовищем упродовж 24 годин 37°C . Після чого ним засівали колбу Ейлеймеєра на 750 мл з розрахунку: 1 пробірка = 1 колба.

Після культивування готують пробу для аналізу. Пробу готували наступним чином: культуральну рідину у кількості 40 мл після 24 годин культивування центрифугували у режимі 9000 об/хв упродовж 10 хвилин. Надосадову рідину зливали в окрему пробірку і осаджували полісахарид додаванням 96 % етанолу у кількості 1:10 надосадова рідина : етанол відповідно. Після додавання етанолу вистоявали 12 годин при кімнатній температурі до повного осадження полісахариду. Потім центрифугували з режимом 3000 об/хв 5 хвилин. Після чого надосадову рідину зливали, а осад полісахариду аналізували далі. Одержаний осад полісахариду розчиняли у концентрованій трифтороцтовій кислоті у співвідношенні 1:2 (полісахарид : кислота). Витримували даний розчин 24 години при 120°C для проведення гідролізу. Гідролізат випарюють на роторному вакуум-випарному апараті у круглodonній колбі до сухого залишку при 45°C та 180 об/хв. Концентрат, який одержали випарюванням промивали 99 % метанолом та випарювали знову до сухого залишку два рази. Після промивання та випарювання концентрат розчиняють у лужному розчині боргідриду натрія у співвідношенні 1:1, а потім витримували 30 хв при 100°C (2 етап гідролізу). Після цього випарювали гідролізований розчин на роторному вакуум-

випарному апараті у круглодонній колбі при 40 °С при 200 об/хв. Після випарювання концентрат піддавали дериватизації за допомогою обробки піримідином та дериватизуючим агентом у співвідношенні 1:1. Сумарна кількість суміші піримідину з дериватизуючим агентом становить 300 мкл. Після додавання витримували 5 хв при кімнатній температурі та аналізували на газовому хроматографі «Agilent» з використанням колонки VF-1301ms 10m x 0.1mm x 1um та рухомої фази 99,5 % аргон. Якісний склад та кількісне співвідношення моносахаридів визначали відносно стандартного зразка суміші моносахаридів,

4.4.5. Визначення антагоністичної активності штаму *Bacillus* sp I 1₂

У пробірки зі скошеним агаризованим середовищем ГРМ-бульйон відсівають досліджуваний штам для «реанімації». Операція проводиться в асептичних умовах. Таким же чином відсівають тест-культури таким самим способом. Обидва типи відсіяних культур культивують у термостаті 24 години при 37 °С.

Після доби культивування досліджуваний штам *Bacillus* sp II₂ зі скошеного ГРМ- агару пересівають в центр чашки Петрі з агаризованим середовищем Гаузе-2.). Операцію проводять в асептичних умовах. Після відсіву штам культивують упродовж 48 годин при 37 °С.

З відсіяних раніше тест-культур роблять 5 мл суспензії клітин додаючи в асептичних умовах до стерильної пробірки 5 мл 0.9% стерильного фіз-розчину і в таких же умовах переносять частину культури яку відбираючи її мікробіологічною петлею і суспендують у даному фіз-розчині. Після приготування суспензії чашку Петрі розбивають на сектори від центра до країв в залежності від кількості-тест-культур. По одному сектору на тест-культуру. Далі суспендовану тест-культуру відсівають на агаризоване середовище з 1 ізолятом так, щоб штрих посіву тест-культури не виходив за межі сектору, проте від краю колонії бацил слід відступити на 1-2 мм. Такими відцентровими штрихами відсівають всі тест-культури для досліджуваного ізоляту. Перед

цим підписавши сектори відповідно до засіяних тест-культур. Культивують посіви протягом 24 годин при температурі 37 °С.

Аналіз результатів проводять виміром зон затримки росту тест-культур за допомогою лінійки. Оскільки досліджуваний штам робилася кількість повторів дослідження у розмірі 3 разів то зону затримки росту визначають як середнє арифметичне значення з 3 повторів. Результати вимірів обробляють та представляють або у вигляді діаграми розподілу або у вигляді таблиці..

Набір тест-культур, які застосовувалися у дослідженні представлений у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Набір тест-культур

Порядковий номер	Тест-культури
1	<i>Proteus vulgaris</i> B-905
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-900
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-329
4	<i>Salmonella enterica</i> B-921
5	<i>Staphylococcus aureus</i> B-904
6	<i>Staphylococcus aureus</i> B-4001
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-920
8	<i>Escherichia coli</i> -3
9	<i>Escherichsa coli</i> B-906
10	<i>Candida ablicans</i> Y-268

4.5. Статистична обробка даних

Оскільки у ході роботи не було необхідності в обробці широкого масиву даних через відсутність широкого спектру вибірки та кількості дослідних тестів для обробки даних не було використано програмне забезпечення специфічного напрямлення для обробки даних на окремих комп'ютеризованих системах. Натомість для обробки та представлення даних при проведених експериментальних роботах були використані програми широкого спектру застосування, зокрема: табличний процесор «Office Exel», текстовий редактор «Office Word». Для обробки та представлення масив даних по процесу хроматографічного та спектрофотометричного дослідження було використано

програми внутрішньої обробки даних у відповідному обладнанні, зокрема для обробки даних по хроматограмі виходу продукту та дані по спектрам поглинання було використано програмне забезпечення «OpenLab».

РОЗДІЛ 5.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

5.1. Вплив складу суміші екстрагентів на ефективність екстракції пігменту каротиноїдної природи синтезованого штамом *Bacillus* sp П12

За результатами дослідження було побудовано 3 спектри поглинання одержаного екстракту пігменту та порівняно їх між собою в одній системі координат (рис. 5.1).

За спектрами на рис. 5.1 можна встановити, що найбільшу відносну площу має спектр поглинання у зразка зразок, який екстрагували сумішню ацетон : метанол (2:1), що свідчить про вищу ефективність екстракції каротиноїду з біомаси при обробці даною сумішню розчинників порівняно з іншими комбінаціями метанолу з дихлорметаном та хлороформом, оскільки найбільша площа спектру поглинання у області довжин хвилі при якій спостерігається максимальне поглинання характерна для більшості каротиноїдів належить зразку який було проекстраговано сумішню ацетон : метанол (2:1). Отже дана суміш з понад трьох досліджуваних має найбільшу ефективність екстракції.

Як відомо пігменти зокрема каротиноїдної природи у представників роду *Bacillus* дуже важко екстрагуються звичайними розчинниками широкого спектру застосування, наприклад хлороформ, ацетон, етанол, метанол та інші, тож як правило застосовують суміші розчинників у поєднанні з УЗ-дезінтеграцією клітин чи обробкою додатковими агентами, що збільшують проникність клітинної стінки що полегшує екстракцію, наприклад ДМСО[69].

					НУХТ БТЕК 05.02.04 ДР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Результати та їх обговорення	Літ.	Маса	Масштаб
Розроб.		Гриненко В.О.						
Перевір.		Скροцька О.І.						
Консультант		Хархота М.А.						
Реценз.						Арк. 49	Аркушів 14	
Н. Контр.					Кафедра БТМ			
Затверд.		Пирог Т.П.						

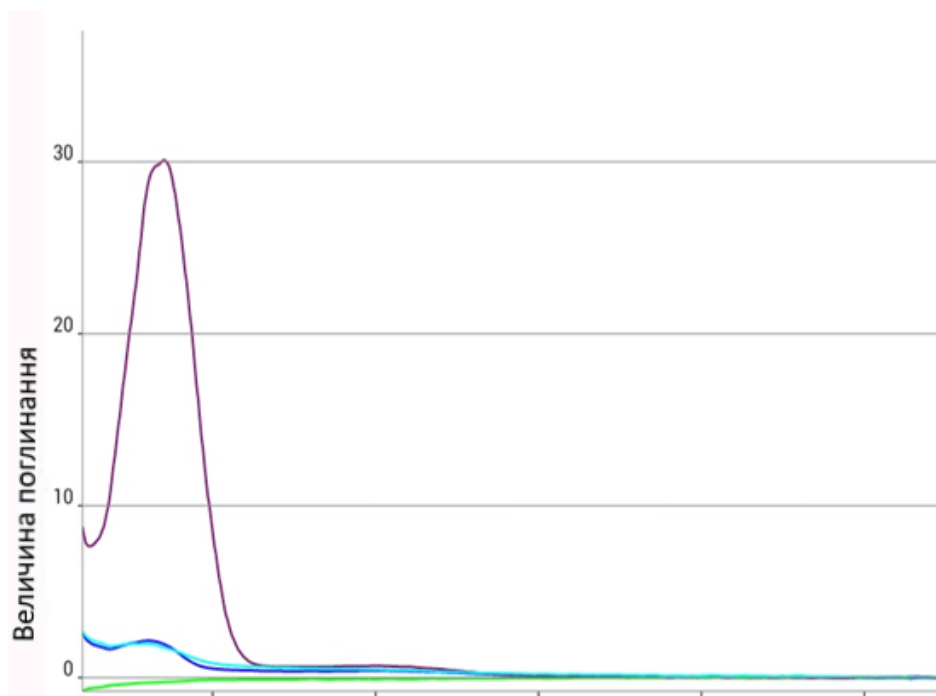






Рисунок. 5.1. Спектри поглинання екстрактів пігментів *Bacillus* sp I 1₂

Умовні ліній графіків спектрів поглинання:

-  Розчинники: метанол-дилхорметан(1:1)
-  Розчинники: метанол-хлороформ (1:1)
-  Розчинники: метанол-ацетон (1:2):
-  Розчинники: метанол(контроль)

У більшості випадків при дослідженні синтезованих бацилами пігментів, які до цього не досліджувалися пов'язані з підбором розчинників для екстракції зокрема як правило на основі чистого метанолу чи сумішей метанолу з іншими розчинниками, рідше використовують чисті розчинники окрім метанолу, наприклад петролейний ефір Turki M.Dawoud зі співавторами зазначає, що при дослідженні пігменту каротиноїдної природи синтезованого штамом *Bacillus* sp. DBS4 було здійснено підбір розчинника для найбільш ефективної екстракції, з поміж наступних : ацетон, метанол, етанол та петролейний ефір. Найбільш ефективним виявився метанол. Однак у даній

роботі не розглядався варіант комбінування розчинників та тестування сумішей розчинників на ефективність екстракції [70].

5.2 Дослідження спектрів поглинання та хроматографічний аналіз пігменту каротиноїдної природи *Bacillus* sp I 1₂

У даному експерименті був проведений хроматографічний аналіз екстрагованого пігменту синтезованого штамом *Bacillus* sp I 1₂ та проведений первинний аналіз результатів, що включає аналіз хроматограми, що дає можливість зробити припущення, до якої групи каротиноїдів належить синтезований досліджуваний штам каротиноїд чи може він теоретично може володіти провітамінною активністю. За результатами ВЕРХ-хроматографії були одержані: хроматограма виходу каротиноїдів (рис 5.2) та спектри поглинання певних фракцій виходу (рис 5.3).

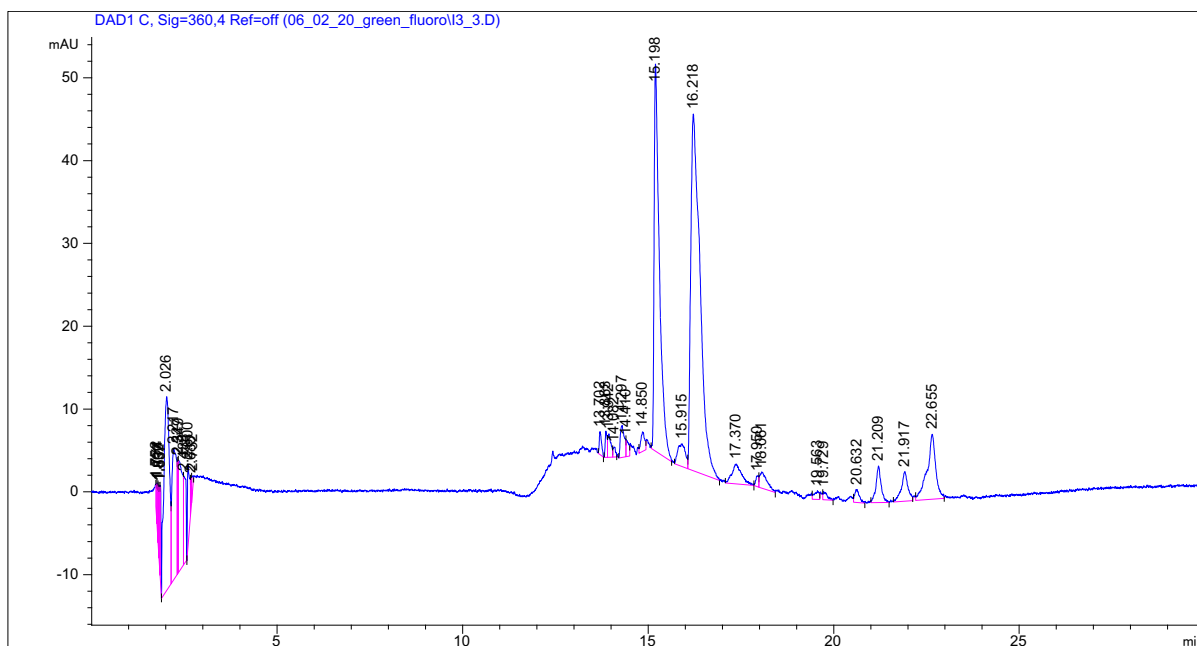


Рисунок 5.2 .Хроматограма аналізу екстракту пігменту.

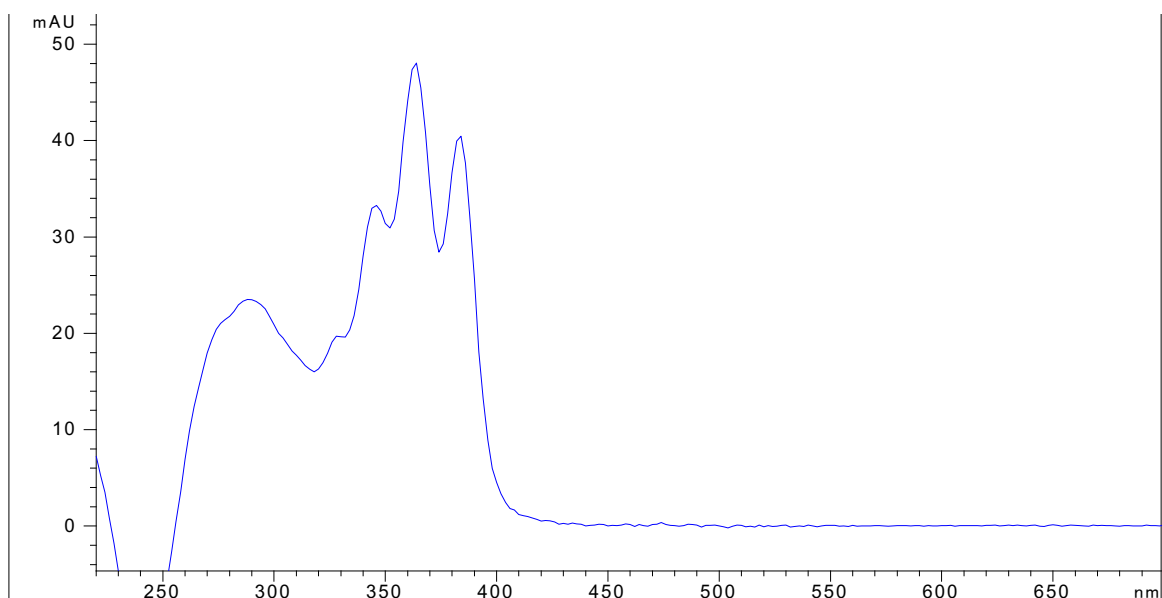
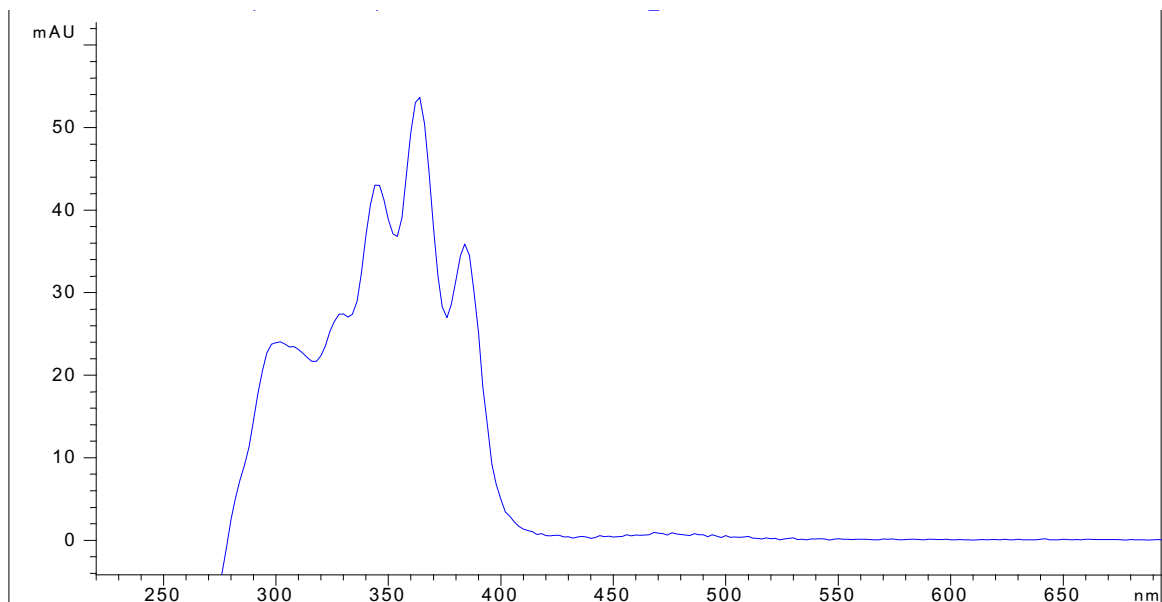


Рисунок .5.3. Спектри поглинання екстракту синтезованого пігменту , що мають час виходу (RT) на 15 та 16 хв відповідно.

*Примітка 1. . Позначенням RT називають певне значення часу виходу речовини у вигляді найвищої точки піку на хроматограмі , простіше кажучи час виходу піку

Більшість бактерій зокрема представники роду *Bacillus* синтезують широкий спектр каротиноїдів, однак більшість з них не володіють провітамінною активністю (не є попередниками вітаміну А) однак деякі види бацил при певних умовах здатні синтезувати каротиноїди, що при потраплянні і у організм тварин та людини можуть перетворюватися у вітамін-А або у

бетакаротин, тим самим чинити провітамінну активність. Або зокрема може чинити загальну антиоксидантну дію, що може бути досить ефективним пребіотичним ефектом. За спектрами поглинання на рисунку видно, що найбільше поглинання спостерігається у проміжку від 360 до 460 нм, що свідчить про те, що виділена екстрагована речовина є каротиноїдом.

Більшості представників роду *Bacillus* каротиноїди представлені у так званій модифікованій формі, зокрема бета іононові кільця містять радикали кисню, гідроксид групи тощо, бувають каротиноїди і без бета-іононових кілець (без одного або двох. Такі каротиноїди називаються відповідно апо і діапокаротиноїди. Прикладами є бета-8-апокаротель та бактеріоруберин[71].

При аналізі суміші різних каротиноїдів або екстракту з бактеріальної чи рослинної біомаси для визначення групи підгрупи чи наявності у пробі конкретного каротиноїда можна скористатися методом порівняння хроматограм з часом виходу при однакових методиках екстракції та хроматографування. Даний метод дозволяє накласти одержану експериментальну хроматограму з вже готовою хроматограмою суміші визначених каротиноїдів та по часу виходу детермінувати групу до якої належить досліджуваній каротиноїд та можливо його самого.

Використовуючи дослідну хроматограму виходу суміші різних каротиноїдних пігментів (наведеної у додатку 2) описану авторами *Siti Machmudah* та *Motonobu Goto* у своїй роботі «Methods for Extraction and Analysis of Carotenoids», порівнявши її з одержаною у ході експерименту хроматограмою можна зробити наступні припущення [71]:

- ✓ синтезований *Bacillus* sp I 1₂ пігмент являє собою 2 каротиноїда оскільки на хроматограмі розділення(відносний час виходу RT) (рис. 3.2.1) видно 2 піки на 15,19 хв та 16.21 хв. Величина піків дуже подібна, що дає припущення про те, що їх кількість майже однакова. За спектрами поглинання (рис. 5.3) можна визначити, що дані речовини мають високий рівень схожості з каротиноїдами, оскільки мають

досить схожі форми графіку спектрів поглинання при 350-450 нм [72,73].

- ✓ каротиноїдні пігменти *Bacillus* sp I 1₂ синтезовані належать до групи ксантинових каротиноїдів, оскільки час виходу каротиноїдів на експериментальній хроматограмі майже співпадає з часом виходу астаксантинових каротиноїдів на зразковій хроматограмі (додаток 2) у діапазоні від 15 до 20 хв. Ксантинові каротиноїди у своїй більшості досить схожі за структурною формулою на бета-каротин, за винятком наявності додаткових оксо- та гідроксогруп на бета-іононових кільцях.

Якщо порівнювати одержану експериментальну хроматограму з зразковою(наведена у додатку 1) то можна зробити припущення, що обидва каротиноїда синтезовані штамом *Bacillus* sp I 1₂ є модифікованими альфа-криптоксантинами з схожою структурною формулою яка наведена на рисунку 5.4.

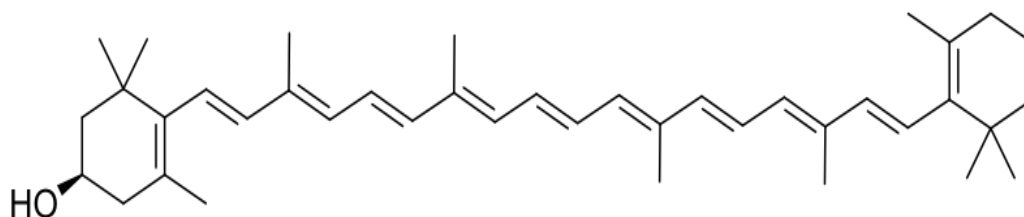


Рисунок 5.4. Структурна формула криптоксантину[74].

Оскільки по структурній формулі синтезовані підслідним штамом каротиноїди близькі до криптоксантину, формула якого дуже нагадує бета-каротин, за винятком гідроксильної групи на бета-іононовому кільці то можна зробити припущення, що синтезовані штамом *Bacillus* sp I 1₂ каротиноїди володіють провітамінною активністю та можуть перетворюватися на попередник вітаміну А.

Схожі дослідження проводили Аяко Осава зі співавторами з каротиноїдом який утворював штам *Bacillus firmus* GB1. За результатами дослідження було встановлено, що хімічна формула пігменту каротиноїдної природи на 95-99 % відповідає 4,4-диаполікопіну, що відноситься до

апокаротиноїдів(каротиноїдів з відсутністю бета іононового кільця). Досліджуваний диапокаротиноїд мав досить високу Антиоксидантну активність, що виражалася у співвідношенні початкової концентрації антаксантину(тест-речовини) до обробки перекисом водню та додаванням досліджуваного пігменту та концентрації після обробки та витримки. Співвідношення переведене у відсотки становило середнє значення: 66 %. Тобто при додаванні пігменту 66 % антаксантину не окиснюється після обробки його перекисом водню за певний проміжок часу [75].

5.3. Дослідження впливу рН на накопичення біомаси штаму *Bacillus* sp I 12

Опрацювавши одержаний масив інформації щодо проведеного дослідження було одержано 6 результатів значень оптичної густини, яка характеризувала рівень концентрації біомаси. Задля економії часу у експериментальному дослідженні не було проведено переведення значень оптичної густини у значення концентрації біомаси у г/л оскільки це не вплинуло б на представлення результату та основну залежність концентрації біомаси (оптичної густини) які відображають концентрацію біомаси при 6 різних значеннях рН . Результати були оформлені у вигляді діаграми (рис 5.5).

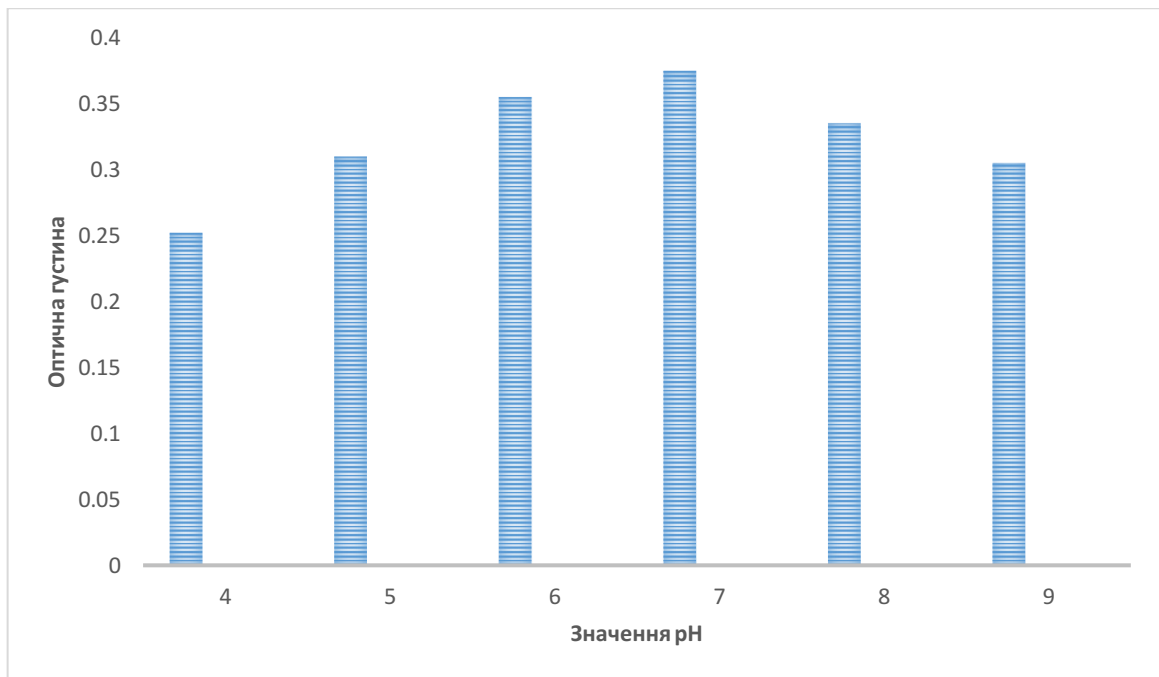


Рисунок .5.5 Вплив рН на накопичення біомаси.

При аналізі результатів візуалізованих значень рН на рисунку 5.5 можна сказати, що загалом концентрація біомаси яку відображають значення оптичної густини не сильно відрізняється якщо вирахувати відсоток різниці між показниками значення концентарції біомаси від рН 4 до рН 9. Однак у межах відносної різниці показники досить чітко дають знати, що найбільш оптимальне значення для накопичення біомаси лежить у проміжку від рН 6 до рН 7 відносно штаму *Bacillus* sp I 1₂ на синетичному поживному середовищі № 15 (див розд 2.2.). Показники впливу рН на концентрацію біомаси у даного штаму співставні (близькі) до показників впливу рН на більшість відомих представників роду *Bacillus*. Значення концентарції біомаси виражене у значенні оптичної густини при рН від 8 до 9 має дещо нижчі значення ніж для рН від 4 до 5, що може свідчити про те, що штам є більш стійким до кислих середовищ ніж до лужних.

5.4. Моносахаридний склад полісахариду *Bacillus* sp I 1₂ при його культивуванні за підвищених концентрацій іонів калію

Однією унікальних властивостей штаму виявлених у ході дослідження була спроможність синтезувати полісахарид при певних умовах культивування (а конкретніше при високих концентраціях іонів калію у

середовищі) даний полісахарид може мати потенційні пребіотичні властивості, зокрема сприяти захисту чи стимулювати ріст конститутивної мікрофлори кишечника у людини. Тому було прийнято рішення дослідити його якісний та кількісний склад.

Після проведення аналізу складу полісахариду за допомогою газової хроматографії була одержана експериментальна хроматограма (Рис 5.6) утвореного *Bacillus* sp I 1₂. За її даними були визначені кількісні та якісні показники, що відобразили кількісний та якісний склад полісахариду.

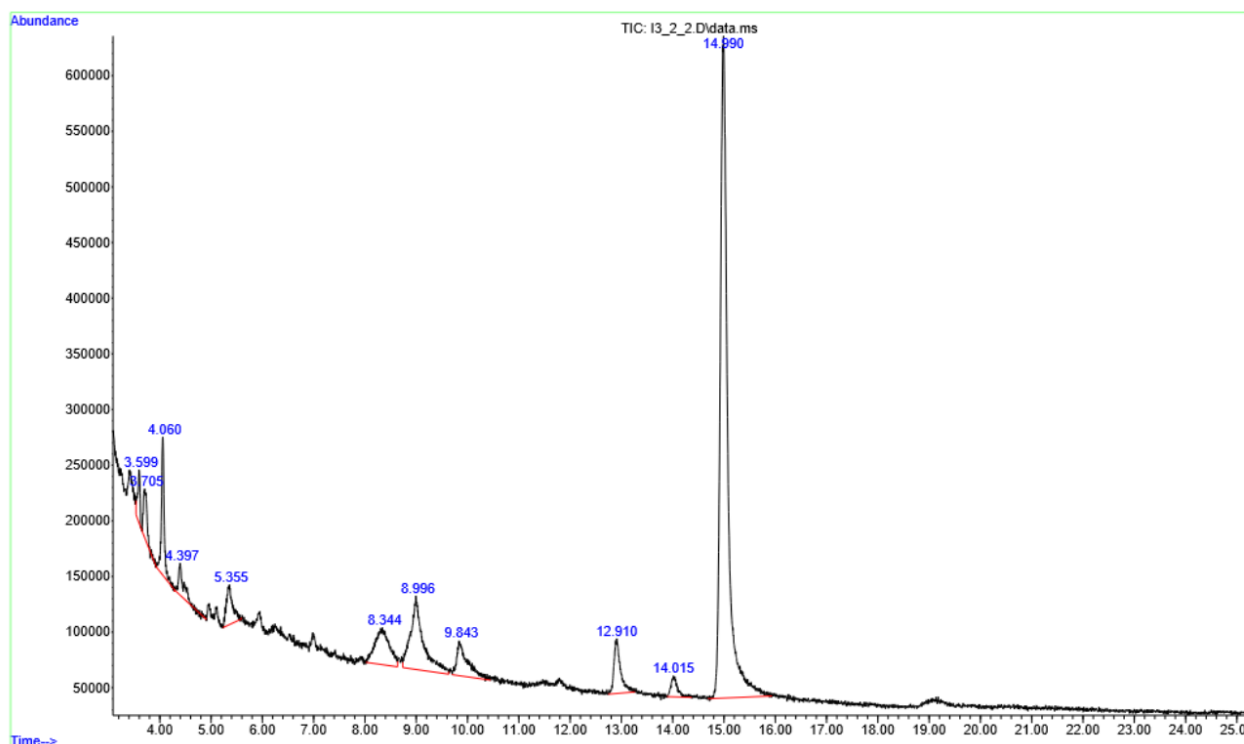


Рисунок 5.6 . Хроматограма аналізу полісахариду.

Після одержання хроматограми та її опрацювання було виділено 3 піки, типово схожі на піки виходів моносахаридів, які одержують при стандартній методиці хроматографічного аналізу суміші окремих моносахаридів: піки з часом виходу 12,910; 14,015; 14,990.. Для точної ідентифікації моносахаридів по часу виходу порівнювали зі стандартною хроматограмою аналізу окремих моносахаридів(додаток 1).

Після порівняння обох хроматограм було ідентифіковано, що полісахарид, синтезований досліджуваним штамом складається з трьох

моносахаридів: глюкоза(час виходу:14,990...14,829); галактоза(час виходу: 14.015....13,860); маноза(час виходу: 12,910....12,755). Відповідно до розмірів площ піків було розраховано відсоткове співвідношення моносахаридів у наступних значеннях:

Глюкоза = 90,22 %.

Маноза = 6,68 %.

Галактоза=2,47 %.

Дані розрахункові результати були одержані при відсутності сумарного врахування площ піків, які відображають шуми, похибки та речовини, які не відносяться до моносахаридів.

Можна припустити, що досліджуваний полісахарид теоретично може споживатися молочнокислими бактеріями кишечника(конститутивною мікрофлорою), що буде чинити підтримку даних культур при різкому зниженні її кількості внаслідок специфічних розладних станів)

5.5 Дослідження антагоністичної активності *Bacillus sp I 1₂*

Після проведення дослідження було одержано дані щодо ступені антагоністичної активності щодо певних тест-культур або до груп мікроорганізмів. Дані були переформатовані та представлені у вигляді таблиці (табл 5.1) та гістограми розподілу зображену на рисунку(рис5.7)

Антагоністична активність *Bacillus* sp I₂

Досліджувані тест-культури	<i>Proteus vulgaris</i> B-905	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-900	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-329	<i>Salmonella enterica</i> B-921	<i>Staphylococcus aureus</i> B-904	<i>Staphylococcus aureus</i> B-4001	<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-920	<i>Escherichia coli</i> -3	<i>Escherichia coli</i> B-906	<i>Candida albicans</i> Y-268
Розмір зон затримки росту у мм з точністю до 2 мм	7	2	2.5	8.3	22	24	9.1	3	2.6	26

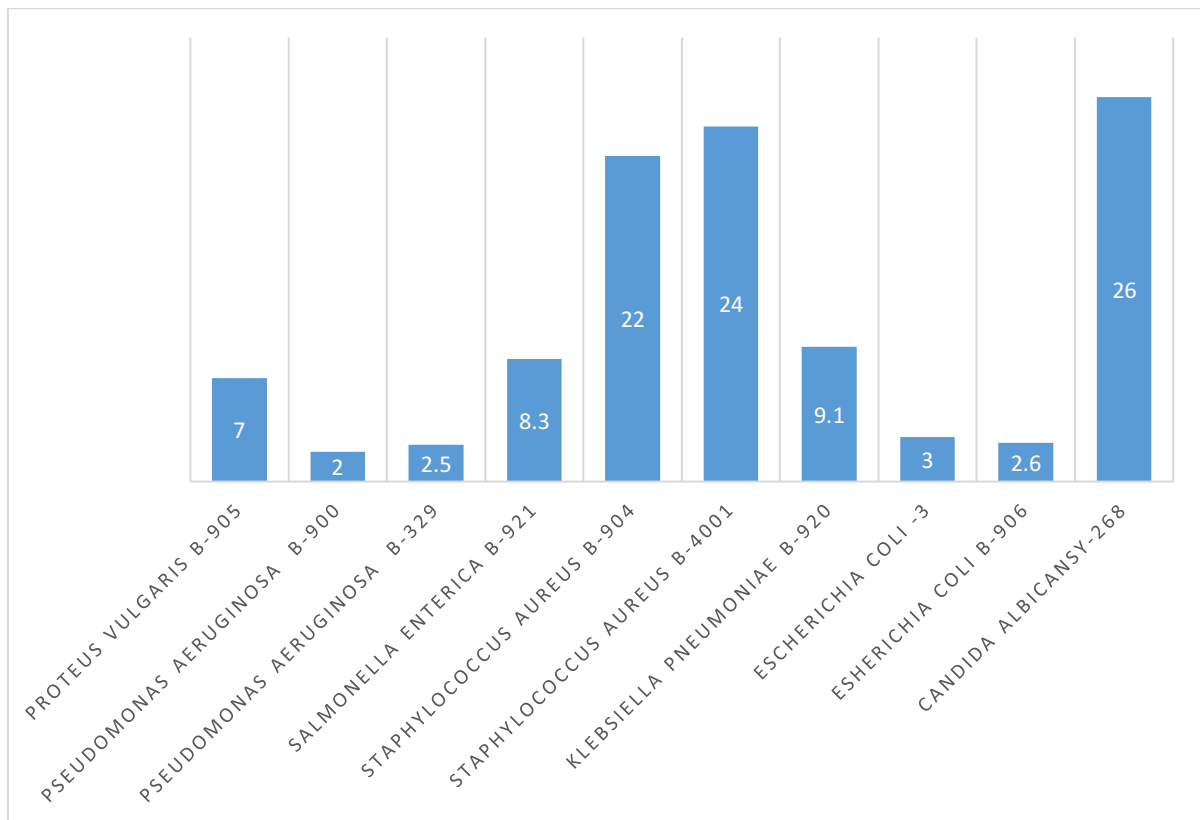


Рисунок 5.7. Величина антагоністичної активності штаму *Bacillus* sp I 12

Як відомо більшість представників роду *Bacillus* мають відносно схожий спектр антагоністичної активності, хоча деякі види можуть проявляти високу антагоністичну активність щодо грамнегативних бактерій, зокрема до *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* та інших більшість таким похизуватися не може, як зазначає *Hye-Lin Jeon*, з колегами штаму *Bacillus subtilis* P223 має аномально високу активність проти *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* та *Escherichia coli*, що аномально для більшості ізолятів цього виду бацил, як зазначає сам *Hye-Lin Jeon* це може бути зумовлено умовами існування штаму, зокрема конкуренція за субстрат з вище сказаними представниками [76,77].

Авторами *Masanori Horie*, та *Taisuke Koike* було описано, що штаму *Bacillus subtilis* BN проявляє високу антагоністичну активність щодо певних видів сальмонел при сумісному культивуванні з *L. crispatus* та *L. casei*, що може бути зумовлено як окремими властивостями штаму так і комбінаційними

властивостями змішаної культури молочнокислих бактерій та бацил. Зони затримки росту до сальмонели спостерігалися у розмірі 10-15 мм [78].

Однак досліджуваний штам *Bacillus* sp I 1₂ не виявляв специфічного для себе антагонізму, про що свідчать розміри зон затримки росту відносно псевдомонад, протеїв, та кишкової палички(*Escherichia* , *Pseudomonas*, *Proteus*) , розмір яких не перевищує 10 мм. Найбільш активний штам щодо *Staphylococcus aureus* *Candida albicans* у розмірах більше 20 мм зон затримки росту, також штам має перспективу пригнічення росту одного зі збудників пневмонії, а саме *Klebsiella pneumoniae* , що проявляється у розмірі зон затримки росту у 9-10 мм.

Отже після проведених досліджень можна віднести штам *Bacillus* sp I 1₂ до антагоністично активного виду, щодо стафілококів та умовно-патогенних видів дріжджів. Аномальної антагоністичної активності щодо грамнегативних бактерій штам не проявляє[79].

ВИСНОВКИ:

1. Найбільш сприятливий для накопичення біомаси *Bacillus* sp II₂ діапазон рН від 6 до 7. Штам є більш стійким до кислих значень рН ніж до лужних.

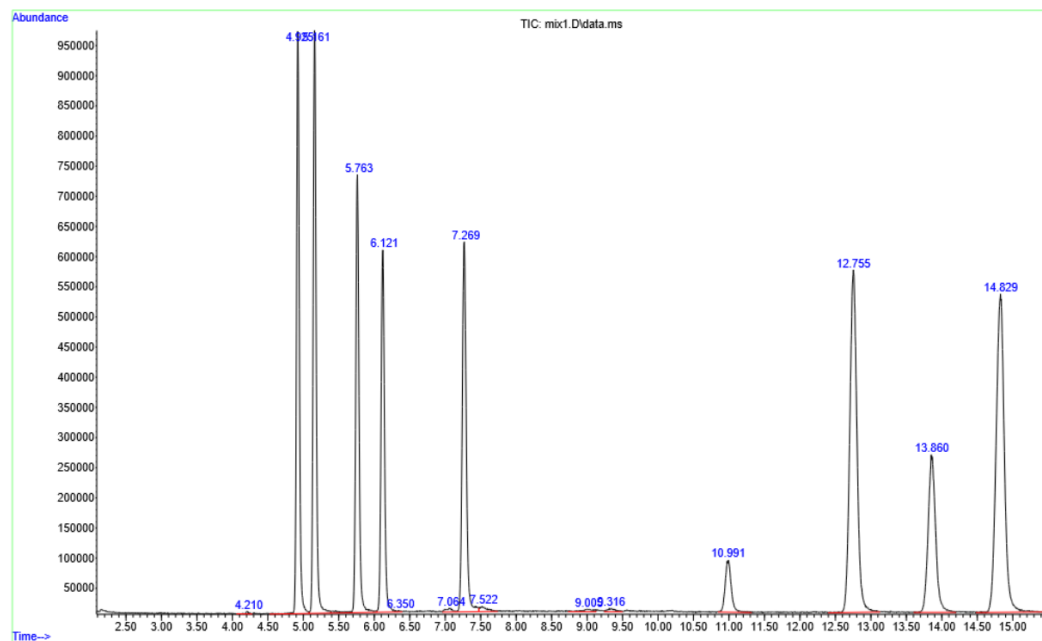
2. *Bacillus* sp I 1₂ проявляє найвищу антагоністичну активність до таких представників тест-культур як *Staphylococcus aureus* та *Candida albicans* у розмірі зон затримки росту у 22-26 мм, до *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica* та *Klebsiella pneumoniae* антагоністична активність дещо менша, що виражається у розмірах затримки росту від 7 до 9 мм. До *Pseudomonas aeruginosa* та *Escherichia coli* антагоністична активність майже не проявляється оскільки зони затримки росту дуже малі (2-2,5 мм).

3. Пігмент, утворений *Bacillus* sp II₂ ймовірно має каротиноїдну природу. Оскільки спектри поглинання в певних діапазонах довжин хвиль дуже схожі на характерні спектри для каротиноїдів.

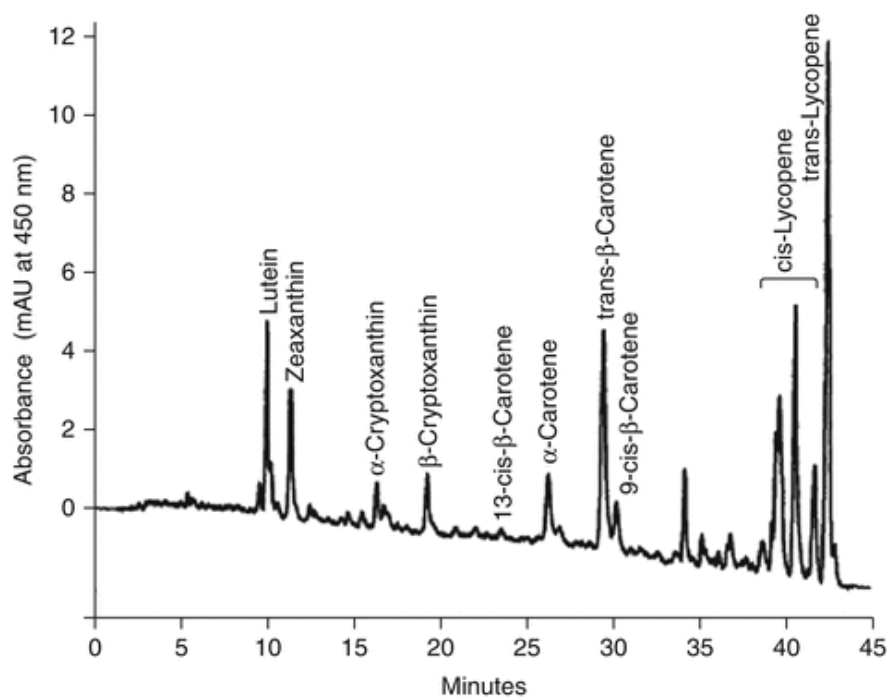
4. Синтезовані *Bacillus* sp I 1₂ ймовірно можна віднести до групи ксантинових каротиноїдів (криптоксантину) оскільки на хроматограмі аналізованого зразка та порівняльній хроматограмі у додатку 1 відносні часи виходу продукту(RT) співпадають у досить вузькому діапазоні.

5. Досліджуваний полісахарид, утворений штамом *Bacillus* sp II₂ складається з 3 моносахаридів: глюкози (90,22 %), манози (6,68 %), галактози (2,47 %).

File :C:\Users\OpenLabUser\Documents\22_10_mono\mix1.D
Operator :
Acquired : 22 Oct 2019 19:23 using AcqMethod BROVARSKA_MONASACH.M
Instrument : GCMS
Sample Name :
Misc Info :
Vial Number: 1



Хроматограма стандартного зразку суміші моносахаридів



Хроматограма суміші стандартних зразків деяких каротиноїдів

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Статистика ШКІ Електронний ресурс: [Режим доступу]: <http://www.ukrstat.gov.ua/>
2. Електронний ресурс: [Режим доступу]: <http://kh.ukrstat.gov.ua/index.php/zakhvoriuvanist-naseleattia>
3. Mélanie G. Gareau, P. Sherman M.. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *The AAPS Journal* . 2010. 7(9): 503-514. doi: 10.1038/nrgastro.2010.117.
4. Авдєєва Л.В , Діденко Д.О. Вплив джерел вуглецевого і азотного живлення на синтез меланінових пігментів *Bacillus subtilis* var. *aterrimus* ВКМ-761 та *Bacillus subtilis* var. *aterrimus* ССМ877 .*Наукові праці НУХТ.*- 2014. 2 (10): 597.
5. Авдєєва Л.В , Борецька, К. Є. Хархота М.А, . Нечипуренко. О.О Синтез пігментів бактеріями роду *Bacillus* на середовищах різного складу . *Мікробіологічний журнал.* 2015 . 1(77): 14-18.
6. Simon M. Cutting. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* 2010 . 28(1): 214-220.
7. Лях Р.В, Червецова В.Г, Кричковська А. М.. Пробіотики як сучасні превентивні препарати захворювань шлунково-кишкового тракту. *Національний університет “Львівська політехніка”.* 2018, 1(2): 72-77.
8. Maria Kechagia,¹ Dimitrios Basoulis, Stavroula Konstantopoulou,¹ Dimitra Dimitriadi,¹ Konstantina Gyftopoulou, Nikoletta Skarmoutsou, and Eleni Maria Fakiri . Health Benefits of Probiotics. *ISRNNutrition.* 2013 . 3(7): 107–113.
9. Ajay K. M, Yasir B., Devabrata Saikia, Dhruvajyoti Nath,. Cellulolytic potential of probiotic *Bacillus Subtilis* AMS6 isolated from traditional fermented soybean (Churpi): An in-vitro study with regards to application as an animal feed additive. 2016. 186(5): 62-70. doi: 10.1007/s10068-017-0148-5

10. Khardziani T, Sokhadze T, Kachlishvili E, Chistyakov V, Elisashvili V. Optimization of enhanced probiotic spores production in submerged cultivation of *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 2017; 26 (6): 1641. doi: 10.15414/jmbfs.2017.7.2.132-136
11. G. Sreekumar, S Krishnan. . Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology //– *African Journal of Biotechnology*. - 2010. –, N 9 . Vol 45, Doi: 10.5897/AJB10.1283– . P . 8078-8084.
12. Hye-Lin Jeon, Na-Kyoung Lee, Seo-Jin Yang, Won-Suck Kim, Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi. *Advances in Microbiolog*.2016. 6(1): 145-148. doi: 10.1007/s10068-017-0148-5
13. Ralf Jäger, Martin Purpura, Sean Farmer, Howard A. Cash & David Keller, Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 Improves Protein Absorption and Utilization. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.2018. 10(1): 611-615. doi: <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9354-y>
14. Masanori Horie, Taisuke Koike, Sakiko Sugino, Aya Umeno, Yasukazu Yoshida. Evaluation of probiotic and prebiotic-like effects of *Bacillus subtilis* BN on growth of lactobacilli. *J. Gen. Appl. Microbiol* .2016. 64(1): 26-33. Doi: <https://doi.org/10.2323/jgam.2017.03.002>
15. S. M. S. Monteiro, J. J. Clemente¹, M. J. T. Carrondo, A. E. Cunha¹,. Enhanced Spore Production of *Bacillus subtilis* Grown in a Chemically Defined Medium. *Advances in Microbiology*- 2014. 50 (20) : 240–247. doi: 10.4236/aim.2014.48049
16. Rong Fan, Jan P. Burghardt , Tao Xiong, Peter Czermak. Removal of Small-Molecular Byproducts from Crude Fructo-Oligosaccharide Preparations by Fermentation Using the Endospore-Forming Probiotic *Bacillus coagulans*. *Fermentation* - 2020. 6 (6) : 1–6. doi: 10.3390/fermentation6010006
17. Ammar Al, Volski A , Cugini C., Emily M. Walsh, Vladimir A. Chistyakov⁶, Mazanko M. Safety Properties and Probiotic Potential of *Bacillus*

subtilis KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Food Sci Biotechnol.* 2017; 26 (6): 432-452. doi: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.66043>

18. Marie Lefevrea Silvia M. Racedob Muriel Denayrollesb Gabrielle Ripertb Thomas Desfougèresa Alexandra R. Lobachc Ryan Simonc Fanny Pélerina Peter Jüstena Maria C. Urdaci. Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans - 2017. 83 (1) : 54-56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.11.010>

19. Nalisa Khochamita, Surasak Siripornadulsila, Peerapol Sukonb, Wilailak Siripornadulsil. Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: Potential as a probiotic strain. *Microbiological Research-* 2015; 170(1): 36-50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.004>

20. Kavita R. Pandey Babu V. Vakil. Development of bioprocess for high density cultivation yield the probiotic *Bacillus coagulans* and its spores. *J. BioSci. Biotechnol.* - 2016. 5 (2) : 173-181. doi: 10.3390/fermentation6010006

21. Neungnut Chaiyawan Punnathorn Taveeteptaikul Bhusita Wannissorn Supatjaree Ruengsomwong Prapaipat Klungsupya Wannaluk Buaban Pariyaporn Itsaranuwat . Characterization and Probiotic Properties of *Bacillus* Strains Isolated from Broiler . Original Article - 2010. 40 (2) : 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.micteg.2010.09.009>

22. Sonia Tabasum Ahmed Md. Manirul Islam Hong-Seok Mun Hyeon-Ju Sim Ye-Jin Kim Chul-Ju Yang. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. Original Article. -2014. 93(8):1963-1971. doi: <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03718>

23. Z.F. ZhangJ, H. ChoI , H. Kim. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO₂ on growth performance, relative immune organ weight, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens. *Livestock Science.* - 2013. 155 (2) : 343-347. doi: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.05.021>

24. M Thirabunyanon, N Thongwittaya. Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella Enteritidis* infection. *Research in veterinary science*. - 2012. 93 (1):74-81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.08.008>

25. Sekar Ashokkumar, Packyam Mayavu. Screening, identification and antagonistic activity of halo stable *Bacillus* sp. Mk22 used as probiotic in *Penaeus monodon* Fabricius, 179. *Afr. J. Food Sci.* - 2014. 8 (1) : 48-53. doi: [10.5897/AJFS2013.1048](https://doi.org/10.5897/AJFS2013.1048)

26. Nadja Larsen, Line Thorsen, Elmer Nayra Kpikpi, Birgitte Stuer-Lauridsen, Mette Dines Cantor, Bea Nielsen, Elke Brockmann, Patrick M.F. Derkx, Lene Jespersen¹. Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed . *J. BioSci. Biotechnol.* - 2014. 98 (1) : 1105–1118 . doi: [10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x)

27. Santi Devi Upadhaya, Suresh Kumar Shanmugam, Dae Kyung Kang, In Ho Kim. Preliminary assessment on potentials of probiotic *B. subtilis* RX7 and *B. methylotrophicus* C14 strains as an immune modulator in *Salmonella*-challenged weaned pigs. *Trop Anim Health Prod.* - 2017. 49 (1) : 1065–1070. doi: [10.1007/s11250-017-1278-8](https://doi.org/10.1007/s11250-017-1278-8)

28. Хархота М.А, Осадчая, И. А, Авдеева Л.В. Особливості росту пробіотичних штамів *Bacillus subtilis*. При спільному глибинному культивуванні. *Мікробіол. журнал.* 2013. 73(6): 25-29. doi: [10.3390/6819086](https://doi.org/10.3390/6819086)

29. Мілян В. О, М. А. Хархота М. А, Нечипуренко. О. О. Дослідження пробіотичних властивостей штамів . *Bacillus* sp. 1.1. та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 *Scientific Journal. ScienceRise.* 2014 . 5(5): 19-21. doi: [10.15587/2313-8416.2014.32023](https://doi.org/10.15587/2313-8416.2014.32023)

30. Anushree Das, Khriezhato Nakhro , Supratim Chowdhury , Dibyendu Kamilya. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* [corrected] FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). *Fish Shellfish Immunol.* 2015 . 41(1): 1547-1549. doi: [10.1016/j.fsi.2013.08.022](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.08.022) 23.

31. Xue-Fei Liu, Ya Li, Jian-Rong Li, Lu-Yun Cai, Xiu-Xia Li, Jin-Ru Chen, Shu-Xia Lyu. Isolation and characterisation of *Bacillus* spp. antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015 . 31(2): 795–803. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1833-2>

32. Ratchanu Meidong, Sompong Doolgindachbaporn, Winai Jamjan, Kenji Sakai, Yukihiko Tashiro, Yuki Okugawa, Saowanit Tongpim. A novel probiotic *Bacillus siamensis* B44v isolated from Thai pickled vegetables (Phak-dong) for potential use as a feed supplement in aquaculture. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2017 . 63(1): 246–253 . doi: 10.2323/jgam.2016.12.002.

33. Yanglei Yiab, Zhenhua Zhangb, Fan Zhaoc, Huan Liuc, Lijun Yuc, Jiwei Zhaa, Gaoxue Wang. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: Antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus* . *Fish & Shellfish Immunology*. 2018 . 78(2): 322-330. doi: 10.1016/j.fsi.2018.04.055

34. Jianguang Li, Yongping Xu¹, Liji Jin, Xiaoyu Li. Effects of a probiotic mixture (*Bacillus subtilis* YB-1 and *Bacillus cereus* YB-2) on disease resistance and non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). *ScienceRise*. 2014ю . 5(5): 19-21. doi: 10.15587/2313-8416.2014.32023

35. Нечипуренко О.О, Хархота, М.А. Бордунос К.С. Ріст і утворення каротинів штамами *Bacillus* sp. 1.1. та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 в умовах глибинного культивування .*Мікробіологія та біотехнологія*. 2015. 14(2): 41-48.

36. Авдеева Л.В, Борецька К.Є, Хархота М.А. Синтез пігментів бактеріями роду *Bacillus* при культивуванні на різних поживних середовищах. *Мікробіол. журнал*. 2015. 77(1): 14-18.

37. Jing Zhaoabc, Qingyan Liab, Tao Sun, Xinna Zhu, Hongtao Xuab, Jinlei Tang, Xueli Zhangab, Yanhe Maa. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for terpenoid production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(22): 9395–9406.. doi: 10.1007/s00253-015-6950-1

38. Korumilli T, Susmita .M. Carotenoid Production by *Bacillus clausii* Using Rice Powder as the Sole Substrate: Pigment Analyses and Optimization of Key Production Parameters. *Metabolic Engineering*. 2014; 5(4): 788-794-.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2016.01.005>

39. Dan Xue, Ingy I. Abdallah, Ilse E. M. de Haan, Mark J. J. B. Sibbald,. Enhanced C30 carotenoid production in *Bacillus subtilis* by systematic overexpression of MEP pathway genes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99(14): 5907–5915.. doi: 10.1007/s00253-015-6531-3

40. Kazuyuki Yoshida Æ Shunsaku Ueda Æ Isamu Maeda, Carotenoid production in *Bacillus subtilis* achieved by metabolic engineering. *Biotechnol Lett*. 2009; 31(1): 1789–1793. doi: 10.1007/s10529-009-0082-6

41. L Perez-Fons, S Steiger, R Khaneja. Sibbald Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers. *Biophysica Acta*. 2011; 3(1): 177-185 . doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.12.009>

42. Hideaki Takano, Kou Mise, Kenta Hagiwara, Naoya Hirata, Shoko Watanabe, Minami Toriyabe, Hatsumi Shiratori-Takano, Kenji Ueda, Role and Function of LitR, an Adenosyl B12-Bound Light-Sensitive Regulator of *Bacillus megaterium* QM B1551, in Regulation of Carotenoid Production. *J of Bacter*. 2015; 197(14): 2301–2306.. doi: 10.1128/JB.02528-14

43. Le H. Duc, Paul D. Fraser, Nguyen K. M. Tam, Simon M. Cutting, Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* spore formers. *FEMS Microbiology Letters*. 2016; 255(2): 215-224.. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00091.x>

44. S. Steiger¹, L. Perez-Fons, P.D. Fraser and G. Sandmann. Sibbald, Biosynthesis of a novel C30 carotenoid in *Bacillus firmus* isolates. *Journal of Applied Microbiology*. 2013; 113(1): 888--895. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05377.

45. Nicola Manzo., Blanda Di Luccia., Rachele Isticato, Enrica D'Apuzzo, Maurilio De Felice, Ezio Ricca, Pigmentation and Sporulation Are Alternative Cell

Fates in *Bacillus pumilus* SF214. Journal of Applied Microbiology. 2013; 8(4): 26093--26096. doi: 10.1371/journal.pone.0062093

46. Ayako Osawa, Kanoko Iki, Gerhard Sandmann, Kazutoshi Shindo, Isolation and Identification of 4, 4'-Diapolycopene-4,4'-dioic Acid Produced by *Bacillus firmus* GB1 and its Singlet Oxygen Quenching Activity. Chemistry and Organic Synthesis. 2013; 62(11): 955--960. doi: <https://doi.org/10.5650/jos.62.955>

47. Silva P.B. Garcia S. Baldo C. Celligoi M.A.P.C, Prebiotic activity of fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. Acta Alimentaria. 2017; 46(2): 145--151. doi: 10.1556/066.2016.0004

48. Phanwipa Pangsri, Yotthachai Piwpankaew, Arunee Ingkakul, Sunee Nitisinprasert & Suttipun Keawsompong, Characterization of mannanase from *Bacillus circulans* NT 6.7 and its application in mannooligosaccharides preparation as prebiotic. Springer Plus. 2015; 4(771): 955--960. doi: <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1565-7>

49. Muhammed Majeed, Shaheen Majeed, Kalyanam Nagabhushanam Sivakumar Arumugam, Sankaran Natarajan, Kirankumar Beede, Furqan Ali1. Galactomannan from *Trigonella foenum-graecum* L. seed: Prebiotic application and its fermentation by the probiotic *Bacillus coagulans* strain MTCC 5856. Food Sci Nutr. 2018; 6 (1): 666-673. doi: 10.1002/fsn3.606

50. C.-H. Liu C.-S. Chiu P.-L. Ho S.-W. Wang, Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. Journal of Applied Microbiology. 2009; 107(1): 1031–1041 . doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04284.x>

51. Masoud Hamidi, Malik Zainul Abdin, Hossein Nazemyieh1, Mohammad Amin Hejazi, Mohammad Saeid Hejazi. Optimization of Total Carotenoid Production by *Halorubrum* Sp. TBZ126 Using Response Surface Methodology. J Microb Biochem 2014; 6(5): 286-294. doi: : 10.4172/1948-5948.1000158

52. Qin Zhoua Panyue Zhangb Guangming Zhanga, Biomass and carotenoid production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of light

intensity. *Bioresource Technology*. 2014; 171(1): 330-335. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.088>

53. Deming Chen Yonbin Han Zhenxin Gu, Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Bioresource Technology*. 2010; 41(8): 1773-1778. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.023>

54. Liqing Tian, Xian Xu, Ling Jiang, Zhidong Zhang & He Huang. Optimization of fermentation conditions for carotenoid production in the radiation-resistant strain *Deinococcus xibeiensis* R13. *Bioresource Technology*. 2019; 42(1): 631–642. doi: <https://doi.org/10.1007/s00449-018-02069-3>

55. Chewapat Saejung, Warangkanang Ampornpat, Production and Nutritional Performance of Carotenoid-Producing Photosynthetic Bacterium *Rhodospseudomonas faecalis* PA2 Grown in Domestic Wastewater Intended for Animal Feed Production. *Bioresource Technology*. 2017; 1(10): 299–310. doi: 10.1007/s12649-017-0070-3

56. Carina Molins Borba, Millene das Neves Tavares, Caroline Costa Moraes . Carotenoid production by *Sporidiobolus pararoseus* in agroindustrial medium: optimization of culture conditions in shake flasks and scale-up in a stirred tank:. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2018; 24(30): 679-682. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20180352s20160545>

57. Anna Aronssona Fatma Gülerabc Maxim V.Petoukhovdef Susan J. Crennellg Dmitri I. Svergund Javier A. Linares-Pasténa Eva Nordberg Karlssona, Structural insights of *RmXyn10A* – A prebiotic-producing GH10 xylanase with a non-conserved aglycone binding region. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2018; 1866(2): 292-306. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.11.006>

58. Farjana Islam, Narayan Roy. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. *BMC Research Notes*, 2018; 11(445): 567-570. doi: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3558-4>

59. Sekar Jinendiran, Boopathi Seenivasan, Sivakumar Natesan, Functional Characterization of Probiotic Potential of Novel Pigmented Bacterial Strains for Aquaculture Applications. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2017; 11(4): 567-570. doi: 10.1007/s12602-017-9353-z

60. Sekar Jinendiran, Boopathi Seenivasan, , Sivakumar Natesan, Purification and characterization of pedioxanthin (carotenoid pigment) produced by *Pediococcus pentosaceus* N33 strain isolated from pickles. Fifi M. Reda & Azza Z. Refaie. 2019; 33(3): 217-236. doi: 10.1080/08905436.2019.1617166

61. Chung-Chih Tsengab Yu-Ju Linc Wangta Liud Hao-Yeh Line Hsin-Yu Choufg Caroline Thiae Jou Hsien Wuh Jo-Shu Changi Zhi-Hong Wena Jui-Jen Changj Hui-Min David Wang. Metabolic engineering probiotic yeast produces 3S, 3'S-astaxanthin to inhibit B16F10 metastasis. *Food and Chemical Toxicology*, 2020; 135(1): 1-5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110993>

62. N. Kotowicz, R.K. Bhardwaj, W.T. Ferreira, H.A. Hong, A. Olender, J. Ramirez , S.M. Cutting. Safety and probiotic evaluation of two *Bacillus* strains producing antioxidant compounds, *Beneficial Microbes*. 2019; 10(7): 759-767. doi: 10.3920/BM2019.0040

63. Huong Thi Nguyen, Tham Thi Nguyen, Huong Thi Thu Pham, Que Thi Ngoc Nguyen, My Thi Tran, Anh Hoa Nguyen . Fate of carotenoid-producing *Bacillus aquimaris* SH6 colour spores in shrimp gut and their dose-dependent probiotic activities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018; 13(12): 550-557. doi: 10.1371/journal.pone.0209341

64. Tran Thi Luong, Ngo Thi Huong, Bui Thi Viet Ha, Pham Thi Thu Huong, Nguyen Hoa Anh, Do Thi Viet Huong, Quach Thi Ha Van, Phan Tuan Nghia, Nguyen Thi Van Anh. Carotenoid producing *Bacillus aquimaris* found in chicken gastrointestinal tracts. *Journal of Biotechnology* , 2015; 14(4): 761-768. doi: 10.1007/s12602-017-9353-z

65. Al Shimaa Gamal Shalaby Tamer I.M. Ragab Mohamed M.I.Helal Mona A.Esawy, Optimization of *Bacillus licheniformis* MAL tyrosinase: *in vitro*

anticancer activity for brown and black eumelanin. *Heliyon*, 2019; 5(5): 1-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01657>

66. L.V. Avdeeva, M.A. Kharkhota, O.O. Nechypurenko, Fundamental Basis of Creation of Probiotic with Provitamin Activity Based on Strains *Bacillus amyloliquefaciens* IMV B-7513 and IMV B-7525. *Mikrobiol Z*, 2016; 78(6): 84-91. doi: 10.1007/s12602-017-9353-z

67. Alejandra de Moreno de LeBlanc, Romina Levit, Graciela Savoy de Gioril, Jean Guy LeBlanc. Vitamin Producing Lactic Acid Bacteria as Complementary Treatments for Intestinal Inflammation. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 2018; 17(1): 51-54. doi: <https://doi.org/10.2174/1871523017666180502170659>

68. Yousef Mohammed, Byong Lee, Zhen Kang & Guocheng Du, Development of a two-step cultivation strategy for the production of vitamin B12 by *Bacillus megaterium*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2014; 13(120): 651-658. doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0102-7>

69. Ramesh K. S, Young-Soo K (2018), , Carotenoid extraction methods: A review of recent developments *Food Chemistry*, P 94-97.

70. Turki M.Dawouda Naiyf S.Alharbia Aswan , M.Theruvinthalakalb Aswani Thekkangilb Shine Kadaikunnana Jamal M.Khaleda Taghreed N.Almanaaa Karthikumar Sankarb Ganesh Moorthy Innasimuthub Khaled AlanziaShyam KumarRajaram, Characterization and antifungal activity of the yellow pigment produced by a *Bacillus* sp. DBS4 isolated from the lichen *Dirinaria agealita* . *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2020; 27(5): 1403-1411.

71. Neungnut Chaiyawan Punnathorn Taveeteptaikul Bhusita Wannissorn Supatjaree Ruengsomwong Prapaipat Klungsupya Wannaluk Buaban Pariyaporn Itsaranuwat . Characterization and Probiotic Properties of *Bacillus* Strains Isolated from Broiler . Original Article - 2010. 40 (2) : 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.micteg.2010.09.009>

72. Siti Machmudah, Motonobu Goto. Methods for Extraction and Analysis of Carotenoids. *Natural Products*. 2013. 12(3): 3367-3411.

73. Авдєєва Л.В, Борецька К.Є, Хархота М.А. Синтез пігментів бактеріями роду *Bacillus* при культивуванні на різних поживних середовищах. Мікробіол. журнал. 2015. 77(1): 14-18.

74. Структурна формула криптоксантину Електронний ресурс [Режим доступу] <https://ru.wikipedia.org/wiki/Файл:Cryptoxanthin.svg>

75. Ayako Osawa, Kanoko Iki, Gerhard Sandmann, Kazutoshi Shindo, Isolation and Identification of 4, 4'-Diapolyycopene-4,4'-dioic Acid Produced by *Bacillus firmus* GB1 and its Singlet Oxygen Quenching Activity. Chemistry and Organic Synthesis. 2013; 62(11): 955--960. doi: <https://doi.org/10.5650/jos.62.955>

76. Хархота М.А, Осадчая, И. А, Авдеева Л.В. Особливості росту пробіотичних штамів *Bacillus subtilis*. При спільному глибинному культивуванні. Мікробіол. журнал. 2013. 73(6): 25-29. doi: 10.3390/6819086

77. Hye-Lin Jeon, Na-Kyoung Lee, Seo-Jin Yang, Won-Suck Kim, Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi. Advances in Microbiolog.2016. 6(1): 145-148. doi: 10.1007/s10068-017-0148-5

78. Masanori Horie, Taisuke Koike, Sakiko Sugino, Aya Umeno, Yasukazu Yoshida. Evaluation of probiotic and prebiotic-like effects of *Bacillus subtilis* BN on growth of lactobacilli. J. Gen. Appl. Microbiol .2016. 64(1): 26-33. Doi: <https://doi.org/10.2323/jgam.2017.03.002>

79. Santi Devi Upadhaya, Suresh Kumar Shanmugam, Dae Kyung Kang, In Ho Kim. Preliminary assessment on potentials of probiotic *B. subtilis* RX7 and *B. methylotrophicus* C14 strains as an immune modulator in *Salmonella*-challenged weaned pigs. Trop Anim Health Prod. - 2017. 49 (1) : 1065–1070. doi: 10.1007/s11250-017-1278-8