

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему

**«Вплив нанометалів на накопичення екзополісахаридів
молочнокислими бактеріями»**

Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія

Виконав: студент групи ББТск-22

Башмат О. М.

Науковий керівник: к.т.н., доц. Охмат О. А.

Рецензент: к.т.н., доц. Волошина І. М.

Київ 2025

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти	<u>перший (бакалаврський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА
« ____ » _____ 2025 р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Башмат Ользі Миколаївні**

1. Тема кваліфікаційної роботи: **Вплив нанометалів на накопичення екзополісахаридів молочнокислими бактеріями**

науковий керівник роботи Охмат Олена Анатоліївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «05» березня 2025 року № 50-уч.

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо властивостей екзополісахаридів та галузей їх застосування; технологічні параметри культивування біологічних агентів для отримання екзополісахаридів; методики ідентифікації та кількісного визначення екзополісахаридів.

3. Зміст кваліфікаційної роботи: вступ; огляд літератури; об'єкт, мета та методи дослідження; експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки.

4. Дата видачі завдання 05.03.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ	06.06.2025	
2	Розділ 1 Огляд літератури	28.03.2023	
3	Розділ 2 Об'єкт, мета та методи дослідження	13.04.2023	
4	Розділ 3 Експериментальна частина	30.05.2025	
5	Висновки	06.06.2025	
6	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)	09.06.2025	
7	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку (за 14 днів до захисту)	11.06.2025	
8	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 12 днів до захисту)	13.06.2025	
9	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		Коефіцієнт подібності ____% Коефіцієнт цитування ____%
10	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студент _____ Ольга БАШМАТ

Науковий керівник _____ Олена ОХМАТ

АНОТАЦІЯ

Башмат О.М. Вплив нанометалів на накопичення екзополісахаридів молочнокислими бактеріями.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 «Біотехнології та інженерія». – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2025 рік. – Рукопис.

Кваліфікаційна робота присвячена дослідженню впливу наночасток металів на накопичення екзополісахаридів при культивуванні бактерій роду *Lactobacillus*. У роботі розглянуті основні властивості екзополісахаридів та описані основні галузі їх застосування.

Досліджено вплив наночасток срібла, міді та цинку на накопичення екзополісахаридів при культивуванні *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691. Виявлено, що збільшення накопичення екзополісахаридів пов'язане із фактором стресу, який вносять наночастки металів під час культивування молочнокислих бактерій.

Ключові слова: екзополісахариди, наночастки, бактерії роду Lactobacillus.

ABSTRACT

Bashmat O.M. Effect of Nanometals on Exopolysaccharide Accumulation by Lactic Acid Bacteria.

Qualification work on specialty 162 “Biotechnologies and bioengineering”. – Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, 2025. – Manuscript.

This qualifying work investigates the effect of metal nanoparticles on exopolysaccharide accumulation during the cultivation of *Lactobacillus bacteria*.

The study reviews the fundamental properties of exopolysaccharides and outlines their primary applications.

Specifically, the research examined the influence of silver, copper, and zinc nanoparticles on exopolysaccharide accumulation during the cultivation of *Lactobacillus acidophilus* UKM B-2691. It was determined that the increased exopolysaccharide accumulation is linked to the stress factor introduced by metal nanoparticles during the cultivation of lactic acid bacteria.

Keywords: exopolysaccharides, nanoparticles, Lactobacillus bacteria.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	4
ABSTRACT	5
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1	11
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1 Загальна характеристика полісахаридів та екзополісахаридів.....	11
1.2 Основні групи продуцентів екзополісахаридів	15
1.3 Перспективи застосування екзополісахаридів у різних галузях промисловості.....	16
1.4 Особливості культивування молочнокислих бактерій для отримання екзополісахаридів	19
Висновки до розділу 1	22
РОЗДІЛ 2	23
ОБ’ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	23
2.1 Мета, об’єкт та предмет дослідження	23
2.2 Характеристика досліджуваних біологічних агентів	23
2.3 Приготування глюкозо-пептонного середовища (ГПС)	25
2.4 Виділення та визначення екзополісахаридів з <i>L. acidophilus</i> УКМ В-2691	26
2.5 Отримання наночасток металів	27
2.6 Підготовка посівного матеріалу та проведення біосинтезу.....	27
Висновки до розділу 2	28
РОЗДІЛ 3	29
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	29
3.1 Вплив окремих нанометалів на утворення екзополісахаридів <i>L.acidophillus</i>	29
3.1.1 Вплив наносрібла на утворення екзополісахаридів <i>L.acidophillus</i>	29
3.1.2 Вплив наноміді на утворення екзополісахаридів <i>L.acidophillus</i>	29

.....	31
3.1.3 Вплив наночинку на утворення екзополісахаридів <i>L.acidophilus</i>	32
3.2 Вплив суміші наночасток на утворення екзополісахаридів <i>L.acidophilus</i>	33
3.2.1 Вплив суміші наносрібла та наноміді на утворення екзополісахаридів <i>L.acidophilus</i>	34
3.2.2 Вплив суміші наносрібла та наночинку на утворення екзополісахаридів <i>L.acidophilus</i>	35
3.2.3 Вплив суміші наноміді та наночинку на утворення екзополісахаридів <i>L.acidophilus</i>	37
Висновки до розділу 3	39
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41
ДОДАТОК	46

ВСТУП

Актуальність теми. Екзополісахариди (ЕПС) – це високомолекулярні полімери, що формуються живими організмами для захисту від факторів навколишнього середовища. Хімічна будова ЕПС є складними розгалуженими та/або лінійними ланцюгами, що складаються з повторюваних ланок моносахаридів та їх похідних. Комплекс фізико-хімічних властивостей ЕПС зумовлює їхнє застосування у багатьох галузях [1,2], включаючи галузі біофармацевтики та охорони здоров'я.

Потужні дослідження ЕПС сьогодні пов'язані з вивченням їх антимікробних [3], імуномодельюючих, противірусних, протипухлинних властивостей [4]. Біосумісність, нетоксичність, захисні властивості, підтримка водного балансу та біорозкладність створює підґрунтя для використання ЕПС у виробництві матеріалів для загоєння ранових поверхонь шляхом утворення плівок, матриць, гідрогелів [5-8]. З розвитком нанотехнологій ЕПС цікавить науковців у якості платформи для доставки активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ). Досліджується потенціал ЕПС у тканинній інженерії для створення тривимірних скаффолдів (scaffolds), вирощування та створення клітин та органів (3D bioprinting).

Застосування ЕПС у технологіях захисту навколишнього середовища базується на використанні біорозкладності, нетоксичності та високих сорбційних властивостей матеріалу. Досліджується використання ЕПС у якості сорбентів для біоремедіації ґрунтів та очищення води від важких металів, нафтопродуктів, пестицидів, радіонуклідів [9, 10]. ЕПС розглядають також як матеріали, що можуть сприяти процесам біодеградації пластиків. При цьому ЕПС безпосередньо ніяк не впливають на біодеградацію, але можуть утворювати на поверхні пластику біоплівки, які сприяють колонізації пластику іншими мікроорганізмами, здатними до вказаної деградації.

Екологічна безпечність ЕПС знайшла своє ефективне застосування і в сільському господарстві, що проявляється у виробництві біологічних добрив та біостимуляторів для стимулювання кореневої системи рослин, покращенні якості ґрунту та збереження його водного балансу, захисту рослин від факторів стресу, обробки насіння для захисту та покращення проростання [11].

Широке застосування ЕПС у харчовій промисловості обумовлене їх функціональними властивостями (наприклад, гелеутворення, загущення, стабілізація емульсій, утворення плівок тощо). В харчовій промисловості ЕПС знайшли своє використання у виробництві молочних продуктів, хлібобулочних виробів, напоїв, соусів тощо [12].

Вище перелічена інформація є не повним списком галузей застосування ЕПС. А отже, підсумовуючи вищесказане, можна зробити висновок, що ЕПС є універсальним компонентом, який знаходить широке застосування в різних галузях промисловості, фармації, охорони здоров'я.

Кваліфікаційна робота спрямована на дослідження накопичення екзополісахаридів при культивуванні молочнокислих бактерій у присутності наночасток різних металів. Для дослідження використано штам *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 з колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Об'єкт дослідження – концентрація та комбінація різних наночасток металів для впливу на накопичення екзополісахаридів під час культивування *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691.

Предмет дослідження – цілеспрямований вплив наночасток різних металів на процес накопичення екзополісахаридів під час культивування *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691.

Мета роботи – дослідження накопичення екзополісахаридів за умови культивування бактерій роду *Lactobacillus* в присутності наночасток різних металів.

Завдання роботи:

- проаналізувати можливі сфери застосування екзополісахаридів;
- вивчити особливості культивування молочнокислих бактерій з метою отримання екзополісахаридів;
- вивчити вплив наночасток різних металів та їх комбінацій на ефективність синтезу екзополісахаридів за умови культивування молочнокислих бактерій.

Наукова новизна роботи полягає у застосуванні наночасток металів для збільшення синтезу екзополісахаридів при культивуванні штаму *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691.

Методи дослідження. Для аналізу результатів дослідження використано комплекс традиційних аналітичних та інструментальних методів, методи статистичної обробки даних.

Практичне значення отриманих результатів полягає у збільшенні виходу екзополісахаридів, отриманих при культивуванні бактерій роду *Lactobacillus* в умовах стресу, спричиненого наночастками різних металів та їх комбінацією.

Апробація результатів наукового дослідження проведена на науково-практичній міжнародній дистанційній конференції «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині». Харків, НФаУ, 21 березня 2025 р.

Публікації. За темою наукового дослідження опубліковано тези доповіді у збірнику матеріалів конференції:

Юркевич А.І., Башмат О.М., Волошина І.М. Екзополісахариди *Lactobacillus*. Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині : Матер. наук.-практ. міжн. дист. конф. (21 березня 2025 р.). Харків : НФаУ, 2025. С. 153. (Додаток).

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Основна частина кваліфікаційної роботи викладена на 40 сторінках, містить вступ, три розділи, висновки та список використаної літератури з 46 джерел, додатка.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика полісахаридів та екзополісахаридів

Полісахариди (ПС) – високомолекулярні вуглеводні полімери, загальна характеристика та класифікація яких наведена у табл. 1.1–1.2.

Таблиця 1.1

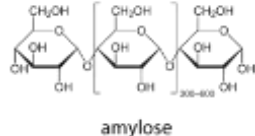
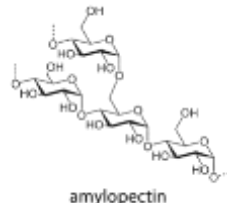
Загальна характеристика полісахаридів

Характеристика	Опис
Хімічна будова	Складні розгалужені або лінійні ланцюги. Складаються з повторюваних ланок моносахаридів та їхніх похідних. Можуть містити неуглеводневі замісники.
Фізико-хімічні властивості	Властивості ПС та їх розчинність залежать від їх складу та структури. Загальні властивості: здатність утворювати в'язкі розчини, гелі, емульсії, плівки.

Таблиця 1.2

Класифікація екзополісахаридів

Критерій	Класи	Опис	Приклади
За складом моносахаридів	Гомополісахариди (Гомоглікани)	Складаються з повторюваних одиниць лише одного типу моносахаридів	Крохмаль, глікоген, целюлоза, хітин, інουλін
	Гетерополісахариди (Гетероглікани)	Складаються з двох або більше різних типів моносахаридів	Гіалуронова кислота, пектин, камеді, мурен

Критерій	Класи	Опис	Приклади
За лінійністю структури	Лінійні  amylose	Моносахариди з'єднані послідовно в нерозгалужений ланцюг	Целюлоза, амілоза, інулін
	Розгалужені  amylopectin	Основний ланцюг має бічні відгалуження, що складаються з інших моносахаридів	Амілопектин, глікоген, камеді
За функцією	Структурні	Виконують структурну функцію, забезпечують міцність та підтримку клітин та тканин	Целюлоза, хітин, муреїн
	Запасні	Використовуються для зберігання енергії в клітинах	Крохмаль, глікоген
	Позаклітинні або Секретовані	Виділяються клітинами, виконують різні функції: захисні, адгезійні, біоплівкоутворювальні. Часто називають екзополісахаридами	Ксантанова камедь, декстран, альгінат, капсульні полісахариди бактерій
За походженням	Рослинні	Полісахариди, що синтезуються рослинами	Крохмаль, целюлоза, пектин, інулін, гуарова камедь, камедь річкового дерева

Критерій	Класи	Опис	Приклади
	Тваринні	Полісахариди, що синтезуються тваринами	Глікоген, хітин (у деяких тканинах), хондроїтин сульфат.
	Водоростеві	Полісахариди, що синтезуються водоростями	Агар-агар, карагінан, альгінат, ламінарин
	Мікробні (ЕПС)	Полісахариди внутрішньоклітинні і позаклітинні, що синтезуються бактеріями, дріжджами, грибами	Декстран, ксантанова камедь, курдулан, склероглюкан, пуллулан, муреїн, капсульні полісахариди

Джерелом для промислового отримання ЕПС є різноманітні біологічні агенти, вирощені в лабораторних або промислових умовах на відповідних поживних середовищах. Біологічні властивості ЕПС залежать від їх структури і можуть включати антимікробну, протівірусну, протипухлинну, імуномодулюючу, антиоксидантну активність, а також мати пребіотичні властивості.

Перевагою ЕПС над ПС є їх біорозкладність, нетоксичність, біосумісність. Але при цьому вартість виробництва ЕПС зазвичай вища через необхідність подальшого виділення (наприклад, осадження або ультрафільтрація) та очищення (наприклад, діаліз, іонобмінна хроматографія, гель-фільтрація тощо) цільового продукту, а властивості ЕПС залежать від умов культивування та штаму мікроорганізму. Загальні структурні особливості екзополісахаридів представлені у табл. 1.3.

Таблиця 1.3

Структурні особливості екзополісахаридів

Характеристика	Опис
Основні мономерні одиниці	Моносахариди (прості цукри): глюкоза, фруктоза, галактоза; Похідні моносахаридів: аміноцукри, уронові кислоти
Тип зв'язку	Ковалентні глікозидні зв'язки між мономерними одиницями. Зв'язки α - або β -конфігурації можуть з'єднувати різні вуглецеві атоми
Загальна структура	Лінійні (нерозгалужений основний ланцюг) Розгалужені (основний ланцюг з бічними ланцюгами)
Просторова структура	Залежить від складу, послідовності та типу зв'язків. Можуть утворювати різні конформації у розчині (наприклад, спіралі, клубки, впорядковані структури тощо). Просторова структура ЕПС впливає на їх функціональні властивості.
Склад та послідовність	Можуть складатися з одного типу моносахариду (гомополісахариди) або кількох різних типів (гетерополісахариди). Послідовність моносахаридів може бути регулярною або нерегулярною.
Невуглеводні замісники	Можуть містити невуглеводні групи (наприклад, сульфатні, фосфатні, піруватні групи). Невуглеводні групи можуть надавати ЕПС специфічних фізико-хімічних або біологічних властивостей
Молекулярна маса	Молекулярна маса складає від кількох тисяч до кількох мільйонів дальтон

1.2 Основні групи продуцентів екзополісахаридів

ЕПС за своєю природою є високомолекулярними біополімерами, що продукуються різними бактеріями, дріжджами та грибами. При цьому властивості ЕПС будуть залежати не тільки від умов культивування, але і від виду мікроорганізму.

Бактерії–продуценти ЕПС:

Xanthomonas campestris [13] продукує ксантанову камедь, широко використовувану як загусник та/або стабілізатор у харчовій промисловості.

Leuconostoc mesenteroides [14-16] продукує декстран, застосовуваний у фармацевтичній (протипухлинні препарати) та харчовій промисловості.

Azotobacter vinelandii [17-18] та *Pseudomonas aeruginosa* [19] продукують альгінати, застосовувані у біомедицині та харчовій промисловості.

Lactobacillus [20-22] та *Streptococcus* [23, 24] продукують ЕПС, застосовувані у харчовій промисловості для зміни текстури молочних продуктів. Певні синтезовані ЕПС можуть мати пробіотичні властивості.

Agrobacterium [25] та *Rhizobium* [26] продукують ЕПС, що застосовують зокрема для біоре mediaції.

Окремі штами дріжджів здатні продукувати ЕПС, що можуть мати широкий спектр біологічних властивостей.

Дріжджі–продуценти ЕПС:

Cryptococcus laurentii [27].

Rhodotorula [28].

Saccharomyces cerevisiae [29].

Pichia [30].

Гриби *Ganoderma lucidum*, *Aureobasidium pullulans*, *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* теж здатні продукувати ЕПС, що можуть мати широкий спектр біологічних властивостей, включаючи протипухлинну та імуномодельюючу; використовуватимуться у харчовій промисловості [31, 32].

1.3 Перспективи застосування екзополісахаридів у різних галузях промисловості

Зростаючі перспективи застосування ЕПС у різних галузях (табл. 1.4) підтверджуються великою кількістю розробок, які передбачають пошук нових біологічних агентів, оптимізацію умов продукування ЕПС біологічними агентами, створення нових штамів тощо [33].

Таблиця 1.4

ЕПС та основні галузі їх застосування

ЕПС	Основні продуценти	Основні галузі застосування
Xanthan Gum Ксантанова камедь	<i>Xanthomonas campestris</i>	Харчова промисловість (загусник, стабілізатор, емульгатор). Нафтогазова промисловість (розчини для буріння). Косметична промисловість (регулятор в'язкості). Фармацевтична промисловість (суспензії, емульсії).
Dextran Декстран	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Біомедицина (плазмозамінник, антикоагулянт, матеріали для доставки ліків). Фармацевтична промисловість (хроматографія).

ЕПС	Основні продуценти	Основні галузі застосування
		Харчова промисловість (стабілізатор, плівкоутворювач).
Alternan Альтернан	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> <i>ma Streptococcus salivarius</i>	Харчова промисловість (загусник, стабілізатор, емульгатор, пребіотик). Косметична промисловість (регулятор в'язкості). Біомедицина (перспективи - регенерації тканин та загоєння ран).
Alginate Альгінат	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (бактерії), бупі водорості	Харчова промисловість (гелеутворювач, загусник, стабілізатор). Біомедицина (інкапсуляція клітин, ранозагоювальні матеріали). Стоматологія (розхідні матеріали). Текстильна промисловість (загущення фарб).
Bacterial Cellulose Бактеріальна целюлоза	<i>Gluconacetobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Salmonella</i> <i>ma</i> <i>Sarcina</i>	Харчова промисловість (харчова добавка емульгатор, загусник, гелеутворювач). Біомедицина (тканинна інженерія, трансплантологія). Фармацевтична промисловість (препарати з контрольованим вивільненням АФІ). Охорона навколишнього середовища (біосенсиори для виявлення забруднень, сорбент для забруднень). Паперова промисловість (виробництво паперу).

ЕПС	Основні продуценти	Основні галузі застосування
Hyaluronic Acid Гіалуронова кислота	<i>Streptococcus</i>	Косметична промисловість (зволожувач, філер). Біомедицина (зволожувач, входить до складу препаратів для посилення адгезії клітин або загоєння ран).
Pullulan Пуллулан	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Харчова промисловість (їстівні плівки та покриття, загусник). Фармацевтична промисловість (капсули, матеріали для доставки ліків). Косметична промисловість (плівкоутворювач).
Curdlan Курдулан	<i>Agrobacterium biovar</i>	Охорона навколишнього середовища (сорбент для забруднень).
Kefiran Кефіран	<i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus parakefir</i> , <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Lactobacillus kefirgranum</i> та <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Харчова промисловість (загусник, стабілізатор, компонент для упаковки продуктів харчування). Біомедицина (матеріали для доставки ліків, протипухлинні препарати, препарати з антибактеріальними та антиоксидантними властивостями, тканинна інженерія, нановолокна).
Levan Леван	Різні бактерії (наприклад, <i>Bacillus subtilis</i>)	Харчова промисловість (пребіотик, компонент для покращення текстури продуктів, для упаковки продуктів харчування). Косметична промисловість (зволожувач,

ЕПС	Основні продуценти	Основні галузі застосування
		плівкоутворювач). Біомедицина (носій ліків).
Inulin Інулін	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Limosilactobacillus reuteri</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> та <i>Lactobacillus johnsonii</i>	Біомедицина (пригнічення утворення біоплівки, збільшення сорбції кальцію, антиоксидантна активність). Харчова промисловість (пребіотик, компонент для зменшення калорійності їжі). Біомедицина (носії для доставки ліків).
Reuteran Реутеран	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	Харчова промисловість (ефективна харчова добавка, компонент для покращення текстури хліба та збільшення тривалості зберігання продуктів).

1.4 Особливості культивування молочнокислих бактерій для отримання екзополісахаридів

Як вказувалось у п.1.2 певні штами молочнокислих бактерій (МКБ) придатні для отримання ЕПС. При культивуванні МКБ визначальним фактором для продукування ЕПС є склад поживного середовища [34].

Джерело вуглецю – основне джерело енергії для росту МКБ та матеріал для синтезу ЕПС. Сахароза є ефективним джерелом для виробництва гомо полісахаридів; глюкоза – гомо- і гетеро полісахаридів; лактоза, фруктоза, мальтоза, галактоза – мають обмежене використання для окремих промислових штамів МКБ. При цьому концентрація джерела вуглецю у поживному середовищі залежить від конкретного штаму МКБ та типу ЕПС, який синтезують.

Джерело азоту забезпечує ріст та метаболічну активність МКБ, включаючи синтез ЕПС [35]. Джерелом азоту при культивуванні МКБ для отримання ЕПС може бути пептон, триптон, дріжджовий екстракт, казеїн та м'ясний екстракт. Для збільшення виходу ЕПС часто комбінують різні джерела азоту в поживному середовищі.

Високе виробництво ЕПС може бути забезпечено високим співвідношенням вуглець/азот [36] та введенням у поживне середовище мінеральних речовин: цинку, фосфату, кальцію, магнію та заліза.

pH середовища при культивуванні впливає на ріст МКБ та активність ферментів, залучених у біосинтезі ЕПС. Оптимальним при цьому вважають слабо-кисле або нейтральне середовище (5,0-7,0). Але слід зауважити, що рівень pH теж залежить від використовуваного конкретного штаму МКБ як і температурний режим [37].

Тривалість культивування МКБ впливає на загальний вихід ЕПС. Причому, чим довший час культивування, тим більше накопичення ЕПС [38].

Слід зауважити, що ведуться дослідження по збільшенню обсягу продукування МКБ ЕПС шляхом реалізації складних метаболічних процесів. Наприклад, використання спільного культивування окремих штамів МКБ з *S. cerevisiae*. Дослідниками [39, 40] досягнуто збільшення виходу ЕПС на 49 %, при зменшенні при цьому виходу молочної кислоти під час культивування.

Збільшити ефективність отримання ЕПС під час культивування МКБ можна також за рахунок іммобілізації клітин МКБ. Іммобілізація передбачає включення клітин МКБ у матриці альгінату натрію, агару, желатин -глутаральдегіду [41].

Нетрадиційним для надсинтезу ЕПС є використання абіотичного стресу під час культивування МКБ. Підвищення температури або сольовий стрес призводить до посиленого синтезу ЕПС, як захисту від стресу [42, 43].

Отриманий при культивуванні МКБ ЕПС потребує подальшого виділення та очищення [44]. Спочатку за допомогою методів центрифугування або мікрофільтрації відокремлюють бактеріальні клітини від культуральної рідини.

Осадження ЕПС з супернатанту зазвичай проводять за низької температури з додаванням етанолу (2-3 кратна кількість від об'єму) або ацетону. Осаджений ЕПС збирають центрифугуванням, а осад ліофілізують або висушують. Подальше очищення за допомогою методів хроматографії та ультрафільтрації обумовлює цільове призначення синтезованого ЕПС.

Для визначення структури, складу, властивостей та характеристик синтезованого ЕПС застосовують ряд методів, які передбачають :

1. визначення загальної кількості вуглеводів (колориметричний метод);
2. визначення моносахаридного складу (газова хроматографія, мас-спектрометрія, рідинна хроматографія, йонна хроматографія)
3. визначення молекулярної маси та розподілу за розмірами (гель-проникаюча хроматографія);
4. визначення структури глікозидних зв'язків та послідовності моносахаридів (магнітний резонанс, спектроскопія, мас-спектрометрія);
5. визначення функціональних груп (спектроскопія);
6. визначення фізико-хімічних характеристик (реологія, термогравіметричний аналіз, скануюча калориметрія, метод рентгенівської дифракції; оцінка розчинності у воді та інших розчинниках, а також здатності до утримання води);
7. визначення біологічної та/або специфічної активності *in vitro* та *in vivo*;
8. визначення чистоти цільового продукту ЕПС для убезпечення від забруднення білками та нуклеїновими кислотами (спектроскопія);
9. аналіз морфологічних характеристик (скануюча електронна мікроскопія, атомно-силова мікроскопія);
10. аналіз дзета-потенціалу та розміру частинок ЕПС.

Висновки до розділу 1

У розділі проаналізовано галузі застосування екзополісахаридів. За результатами проведеного аналізу стає очевидним, що екзополісахариди є цінним продуктом для різних галузей. А постійно зростаючий інтерес до використання екзополісахаридів, у т.ч. мікробного походження, доводять актуальність досліджень, що проводяться за цим напрямом.

РОЗДІЛ 2

ОБ’ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Мета, об’єкт та предмет дослідження

Мета роботи полягає у дослідженні накопичення екзополісахаридів за умови культивування бактерій роду *Lactobacillus* в присутності наночасток різних металів.

Об’єктом наукового дослідження є концентрація та комбінація різних наночасток металів для впливу на накопичення екзополісахаридів під час культивування *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691.

Предмет наукового дослідження – цілеспрямований вплив наночасток різних металів на процес накопичення екзополісахаридів під час культивування *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691.

2.2 Характеристика досліджуваних біологічних агентів

Більшість *Lactobacillus acidophilus* – факультативні анаероби, малорухомі та неспороутворюючі; кислотостійкі навіть при рН нижчому за 5,0 [45].

Lactobacillus acidophilus основний біологічний агент у промисловому виробництві молочної кислоти.

Таксон	– <i>Lactobacillus</i>
Домен	– <i>Bacteria</i>
Тип	– <i>Firmicutes</i>
Клас	– <i>Bacilli</i>
Порядок	– <i>Lactobacillales</i>
Родина	– <i>Lactobacillaceae</i>
Рід	– <i>Lactobacillus</i>
Вид	– <i>Lactobacillus acidophilus</i>

Основні властивості *Lactobacillus acidophilus* наведені у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

**Морфолого-культурні та фізіолого-біохімічні
властивості *Lactobacillus acidophilus***

Властивість	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Характеристика	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Форма клітин	Паличкоподібна	Метаболізм	Головним чином гомо ферментативний (перетворює глюкозу переважно на молочну кислоту). Метаболізм амінокислот, білка, ліпідів
Розмір клітин	0,7-1,0 на 0,5-0,8 мкм	Ферментація вуглеводів	Лактоза, Глюкоза, Галактоза, інші цукри
Спори	Не утворюють	Толерантність до кислотності	Висока, виживає за рівня рН нижче 5
Рухливість	Нерухомі	Толерантність до солі	Досить висока, залежить від штаму
Грамові властивості	Грампозитивні		
Каталазна активність	Негативні		
Температурний оптимум росту	35-37 °C		
рН опт.росту	6,5		
Культуральні властивості на агарі	Білі, круглі, опуклі колонії		

Для дослідження використано штам *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 з колекції Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного Національної академії наук України.

2.3 Приготування глюкозо-пептонного середовища (ГПС)

Глюкозо-пептонне середовище (ГПС) – є універсальним, використовуваним для культивування багатьох видів бактерій, дріжджів тощо.

Основним джерелом легкозасвоюваного азоту, пептидів та ряду поживних речовин у ГПС є пептон.

Дріжджовий екстракт, що містить середовище ГПС, є складником з великою кількістю вітамінів групи В, мікроелементів.

Глюкоза у середовищі є основним джерелом енергії для мікроорганізмів, вона впливає на метаболізм та збільшення біомаси.

У роботі використане модифіковане середовище ГПС. Дослідний склад ГПС отриманий шляхом проведення досліджень біотехнологічного потенціалу *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691, здійснених в умовах навчально-наукової лабораторії «Перспективних біоматеріалів та технологій» кафедри біотехнології, шкіри та хутра КНУТД.

Склад модифікованого середовища ГПС, г/л:

пептон – 20,0,

дріжджовий екстракт – 20,0,

глюкоза – 30,0,

сульфат магнію – 0,05,

хлорид натрію – 2,0,

дистильована вода – до 1000 мл.

Зовнішній вигляд модифікованого поживного середовища ГПС: прозоре, має брунатний або темно-коричневий колір, не містить домішок та осаду.

Приготування модифікованого поживного середовища ГПС. Наважки компонентів зважують та розчиняють у дистильованій воді при перемішуванні. Стерилізацію здійснюють за допомогою автоклавування за температури 121°C упродовж 15 хвилин. Готове середовище після стерилізації охолоджують до температури 37°C. Готове поживне середовище ГПС зберігають у темному місці, дотримуючись температури 2–8°C для запобігання деградації компонентів. Тривалість використання приготованого модифікованого поживного середовища ГПС у лабораторній практиці складає 2 тижні за умови відсутності ознак контамінації.

2.4 Виділення та визначення екзополісахаридів з *L. acidophilus* УКМ В-2691

Для визначення синтезованих під впливом стресових факторів штамом *L.acidophilus* УКМ В-2691 екзополісахаридів використано стандартний метод осадження етанолом [46]. Метод дозволяє виділити екзополісахариди з водних розчинів, через те що ЕПС мають низьку розчинність у спиртах.

Для відділення біомаси клітин отриманої в процесі біосинтезу культуральну рідину центрифугують на швидкості 4000 об/хвилину упродовж 20 хвилин з використанням центрифуги MICROmed CM-3M.01.

Після центрифугування з кожного дослідного варіанта відбирають по 2 мл надосадової рідини та переносять у чистий зважений стерильний фалькон з трикратним об'ємом охолодженого до температури -5°C 96 % етанолу. Після додавання етанолу на вортексі MICROmed V-3 дослідні зразки перемішують для забезпечення рівномірного контакту культуральної рідини зі спиртом та ініціації процесу осадження ЕПС. після чого фалькони з дослідними зразками залишають на 24 години за температури 2°C. Витримування за вказаної температури необхідне для здійснення повного осадження екзополісахаридів.

Після охолодження візуально спостерігають утворення волокнистих ланцюгів, характерних для екзополісахаридів.

Дослідні зразки повторно перемішують за допомогою вортексу після чого центрифугують на швидкості 4000об/хвилину упродовж 15 хвилин. Надосад обережно зливають, намагаючись зберегти осаджений ЕПС. Отриманий осад залишають для повного просихання та випаровування залишків етанолу на 12 годин. Після повного висихання осад екзополісахаридів зважують на вагах, а отриманий результат перераховують для отримання показників концентрації ЕПС.

2.5 Отримання наночастинок металів

В дослідження використано наночастки (NPs) срібла, міді та цинку (AgNPs, CuNPs та ZnNPs), отримані шляхом «зеленого» синтезу за допомогою культуральної рідини молочнокислих бактерій штаму *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691.

Нанорозмірність синтезованих часток металів підтверджена за допомогою аналізатора розмірів частинок Zetasizer Nano ZS.

Розмір синтезованих для дослідження наночастинок складав, нм:

AgNPs – 18,75; CuNPs – 60,52; ZnNPs – 41,92.

2.6 Підготовка посівного матеріалу та проведення біосинтезу

Музейну культуру *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 перед культивуванням висівають на щільне середовище MRS, для здійснення мікробіологічного контролю чистоти. Музейну культуру культивують на качалочній установці Orbitec упродовж 24 год. за температури 37 °C з частотою перемішування 160 об/хв.

Стерильне модифіковане глюкозо-пептонне середовище (ГПС) розливають у віали, додають посівний матеріал культур у кількості 5 % від загального об'єму середовища та наночастки індивідуально або у дослідній комбінації у концентрації, мМ: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0. Культивування здійснюють на

качалочній установці Orbites за температури 37 °С упродовж 48 год., з частотою перемішування 160 об/хв.

Висновки до розділу 2

Для дослідження запропоноване використання штаму *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691. Для культивування *Lactobacillus acidophilus* УКМ В-2691 у присутності наночасток різних металів використано модифіковане глюкозо-пептонне середовище. Для обробки експериментальних даних застосовані: візуальний метод, методи кількісного визначення екзополісахаридів, методи статистики.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Вплив окремих нанометалів на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus*

3.1.1 Вплив наносрібла на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus*

Дослідження впливу наносрібла (AgNPs) на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus* проводили за допомогою періодичного культивування молочнокислих бактерій на середовищі ГПС.

Наносрібло вносили у поживне середовище у концентраціях, мМ: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 на початку культивування. Температуру, рН та час культивування залишали таким як і в контролі (температура 37 °С, тривалість 48 год., частота перемішування 160 об/хв). В контрольні зразки не додавали наночастки (рис. 3.1).

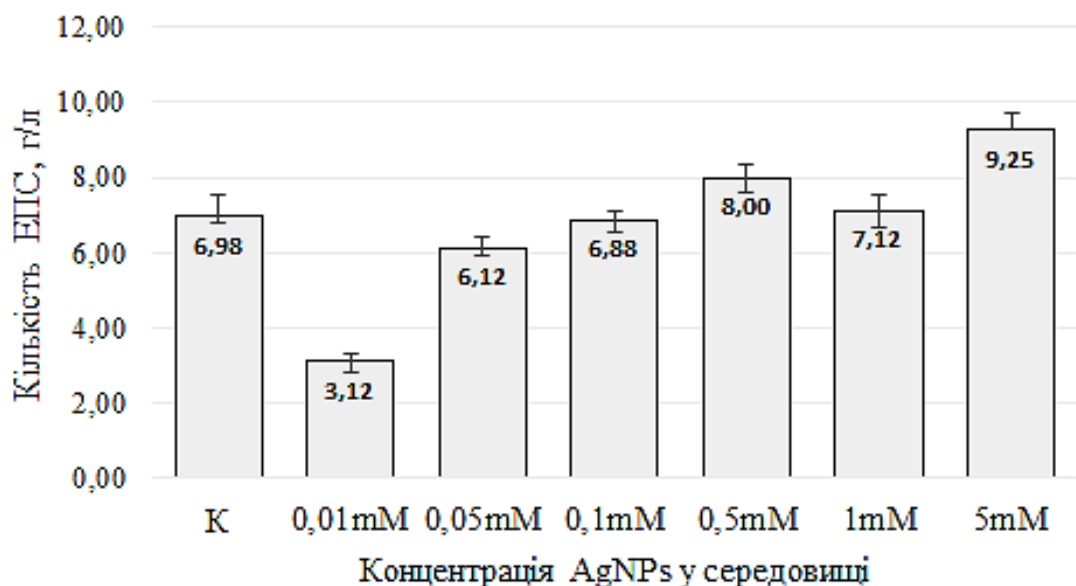


Рисунок 3.1 – Вплив концентрації AgNPs, які вносили у поживне середовище ГПС, на накопичення екзополісахаридів *L.acidophilus* на 96 годину культивування

Проаналізувавши отримані результати виявлено, що кількість екзополісахаридів, що утворилась після культивування контрольного зразку становила 6,98 г/л.

При внесенні у поживне середовище AgNPs у концентрації 0,01 мМ спостерігали зниження накопичення ЕПС у два рази у порівнянні з контролем (3,12 г/л). Це може бути пов'язано з пригніченням регуляторних білків або ферментів, що впливають на біосинтез екзополісахаридів.

Тоді як концентрації 0,05 мМ; 0,1 мМ та 1,0 мМ AgNPs не вплинули на утворення ЕПС і отримані результати були на рівні контрольного зразка, а саме 6,12 г/л, 6,88 г/л та 7,12 г/л відповідно. Це може бути пов'язано з тим, що клітини змогли адаптуватися до помірному стресу.

Однак слід зазначити, що внесення наносрібла у концентрації 0,5 мМ та 5 мМ призвело до збільшення концентрації екзополісахаридів до 8,0 г/л та 9,25 г/л відповідно, що на 15 % та 33 % більше ніж у контролі.

Враховуючи літературні дані та наші попередні дослідження можемо припустити, що концентрація AgNPs 5 мМ мала токсичний вплив на клітини молочнокислих бактерій, які почали активно захищатися полісахаридним матриксом від стресового фактору. Цей екзополісахаридний матрикс може забезпечувати фізико-хімічний бар'єр проти токсичної дії наносрібла.

Тож можна зробити висновки, що наносрібло залежно від концентрації, може мати подвійний ефект на здатність *L.acidophilus* синтезувати екзополісахариди. А саме: у низьких концентраціях пригнічення утворення ЕПС, а у великих – індукцію захисного бар'єру тим самим збільшення синтезу ЕПС. Однак слід зазначити, що чіткої лінійної залежності впливу різних концентрацій наносрібла на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus* не спостерігали.

3.1.2 Вплив наноміді на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus*

У дослідженні визначали вплив різних концентрацій наноміді (CuNPs) на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus*. Біосинтез екзополісахаридів молочнокислими бактеріями вважається індикатором захисної та метаболічної активності мікроорганізмів при впливі зовнішніх стресових факторів.

З рис. 3.2 видно, що при внесення наноміді в середовище у концентрації 0,01 мМ кількість ЕПС знижується на 29 % (4,94 г/л) у порівнянні з контролем, тоді як внесення концентрації 0,05 мМ CuNPs – знижує кількість ЕПС на 70% (2,12 г/л), що свідчить про нетоксичний вплив наноміді у цих концентраціях.

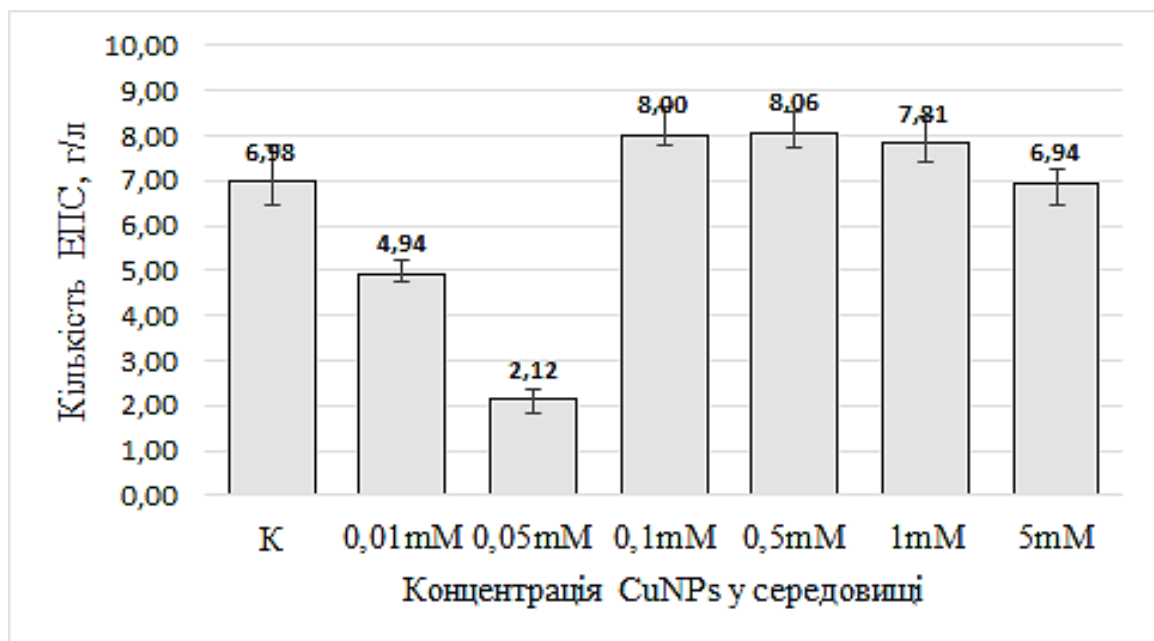


Рисунок 3.2 – Вплив концентрації CuNPs, які вносили у поживне середовище ГПС, на накопичення екзополісахаридів *L.acidophilus* на 96 годину культивування

Концентрації CuNPs 0,1 мМ, 0,5 мМ та 1 мМ впливають на утворення ЕПС молочнокислими бактеріями, про що свідчать результати також представлені на рис. 3.2. На гістограмі видно, що кількість синтезованого ЕПС у порівнянні з

контролем вища на 12-16 %. Це вже може свідчити про помірний токсичний вплив наноміді на клітини бактерій. Таким чином можна сказати, що бактерії захищаються від концентрацій наноміді 0,1 мМ, 0,5 мМ та 1,0 мМ, підвищуючи рівень позаклітинного екзополісахаридного матриксу до концентрації 8,0 г/л, 8,06 г/л та 7,81 г/л відповідно.

При подальшому збільшенні концентрації наноміді до 5 мМ спостерігаємо рівень накопичення ЕПС на рівні контролю, а саме 6,94 г/л. Це може свідчити про те, що наномідь у такій високій концентрації не має токсичного впливу на клітини *L.acidophilus* або досягається плато адаптаційної відповіді, коли клітини припиняють синтезувати ЕПС на стресовий чинник.

Тож можемо зробити висновок, що вплив наноміді на біосинтез екзополісахаридів *L.acidophilus* має нелінійний характер, що може свідчити про складний механізм стрес-індукованої регуляції метаболізму бактерій.

3.1.3 Вплив наноцинку на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus*

Дослідження також стосувалось виявлення впливу різних концентрацій наночасток цинку (ZnNPs) на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus*. З рис. 3.3 видно, що при внесенні наночасток цинку в середовище у концентрації 0,01 мМ кількість ЕПС збільшується на 36 % (9,5 г/л) у порівнянні з контролем, тоді як при внесенні ZnNPs у концентрації 0,05 мМ та 1 мМ синтез ЕПС знижується на 16,8 % (5,81 г/л) та 75,8 % (1,69 г/л) відповідно, що може свідчити про те, що наноцинк у концентраціях 0,05 мМ та 1 мМ не має токсичного впливу на клітини лактобактерій.

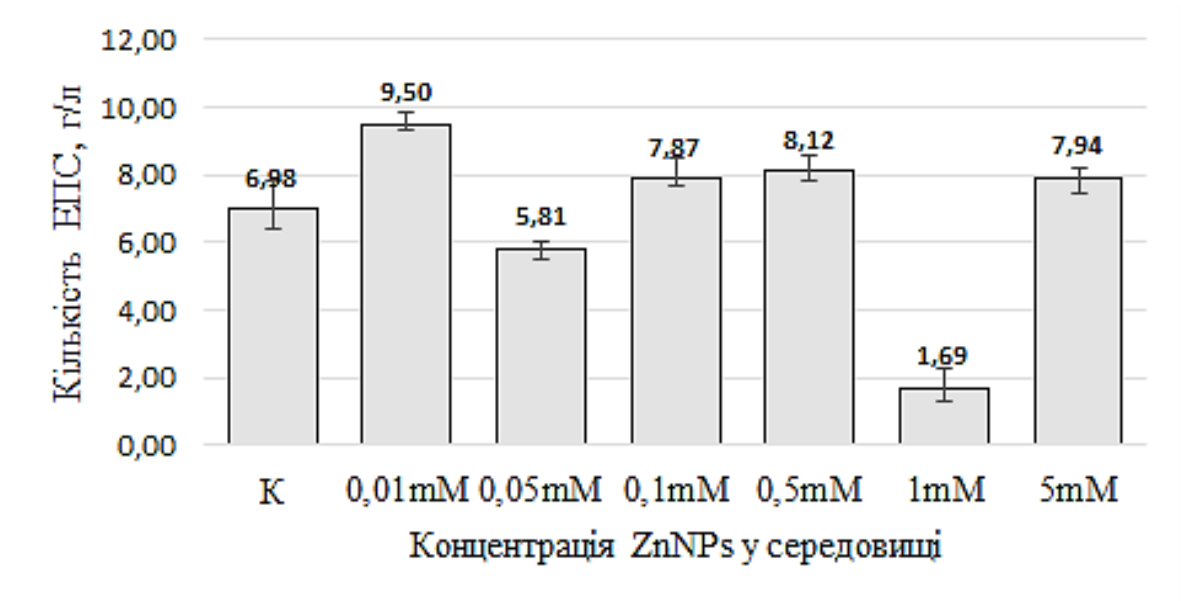


Рисунок 3.3 – Вплив концентрації ZnNPs ,
які вносили у поживне середовище ГПС,
на накопичення екзополісахаридів *L.acidophillus*
на 96 годину культивування

Також важливо зазначити, що наночинк у концентраціях 0,1 мМ, 0,5 мМ та 5 мМ може бути стресовим фактором для бактерій *L.acidophillus*, про що свідчить збільшення концентрації ЕПС, яку вони утворюють у середовищі, а саме 7,87 г/л, 8,12 г/л та 7,94 г/л відповідно. Тобто, підсумовуючи дослідження впливу наночинку на біосинтез екзополісахаридів молочнокислими бактеріями можемо рекомендувати вносити концентрацію ZnNPs у поживне середовище на рівні 0,01 мМ, тому що утворюється найбільша кількість ЕПС, а саме 9,5 г/л.

3.2 Вплив суміші наночасток на утворення екзополісахаридів *L.acidophillus*

Дослідження впливу суміші наносрібла та наноміді на утворення екзополісахаридів *L.acidophillus* проводили за допомогою періодичного культивування молочнокислих бактерій на середовищі ГПС.

3.2.1 Вплив суміші наносрібла та наноміді на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus*

Кожен з нанометалів (AgNPs та CuNPs) вносили у поживне середовище в однакових концентраціях, мМ: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 5,0 на початку культивування. Температуру, рН та час культивування залишали таким як і в контролі (температура 37 °С, тривалість 48 год., частота перемішування 160 об/хв). В контрольні зразки не додавали наночастки.

Спостерігали збільшений вихід ЕПС при сумісному культивуванні наночасток AgNPs та CuNPs в концентраціях 0,1 мМ і вище до 5 мМ (рис. 3.4).

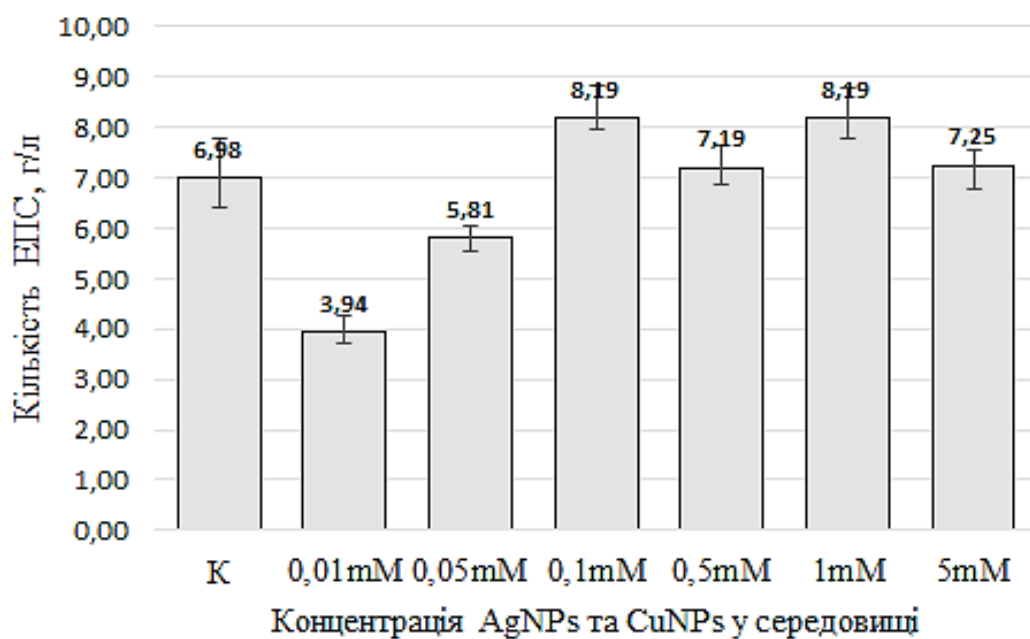


Рисунок 3.4 – Вплив концентрації AgNPs та CuNPs, які вносили у поживне середовище ГПС, на накопичення екзополісахаридів *L.acidophilus* на 96 годину культивування

При внесенні суміші нанометалів в концентраціях по 0,1 мМ та по 1 мМ спостерігали накопичення ЕПС на одному рівні (8,19 г/л), що на 17 % вище за

контроль. Концентрації 0,5 мМ та 5 мМ стимулювали накопичення ЕПС всього на 3-4 % вище за контрольний варіант.

Найменш стресові подвійні концентрації наносрібла та наноміді були при сумісному внесенні наночасток в концентраціях 0,0 1мМ та 0,05 мМ, оскільки накопичення ЕПС в середовищі фіксували на рівні 44 % та 17 % відповідно менш ніж в контролі. Слід згадати, що дані результати корелюють з результатами, окремого внесення AgNPs та CuNPs. Однак, як видно з рис. 3.1 та 3.2, сумісне внесення даних нанометалів посилює вплив один одного на клітини *L.acidophilus*. Але при цьому слід зауважити, що все ж таки у концентраціях вище 1 мМ подвійні концентрації наноміді і наносрібла менш токсичні ніж самостійно внесене наносрібло.

3.2.2 Вплив суміші наносрібла та наноцинку на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus*

При сумісному внесенні наносрібла та наноцинку (AgNPs та ZnNPs) спостерігали дещо інші результати, ніж окремо внесені згадані наночастки. Тільки внесення наносрібла та наноцинку в концентраціях кожного по 0,1 мМ або 1 мМ не виявило появу стресового фактору для клітин *L.acidophilus*, оскільки ЕПС накопичувався в культуральній рідині на рівні контролю, а саме 6,62 г/л та 6,37 г/л відповідно. Концентрації наносрібла та наноцинку 0,01 мМ та 0,05 мМ підсилювали дію один одного за рахунок чого концентрація ЕПС в середовищі збільшувалась на 3-10 % у порівнянні з контролем. Однак окремі внесення у цих концентраціях наносрібла (3,12 г/л та 6,12 г/л) та наноцинку (4,94 г/л та 2,12 г/л) знижувало вихід ЕПС у середовищі. Це свідчить про те, що сумісне внесення AgNPs та ZnNPs у досить невеликих концентраціях по 0,01 мМ та по 0,05 мМ підсилює дію один одного, що заставляє клітини лактобактерій захищатися і синтезувати більше ЕПС (рис. 3.5).

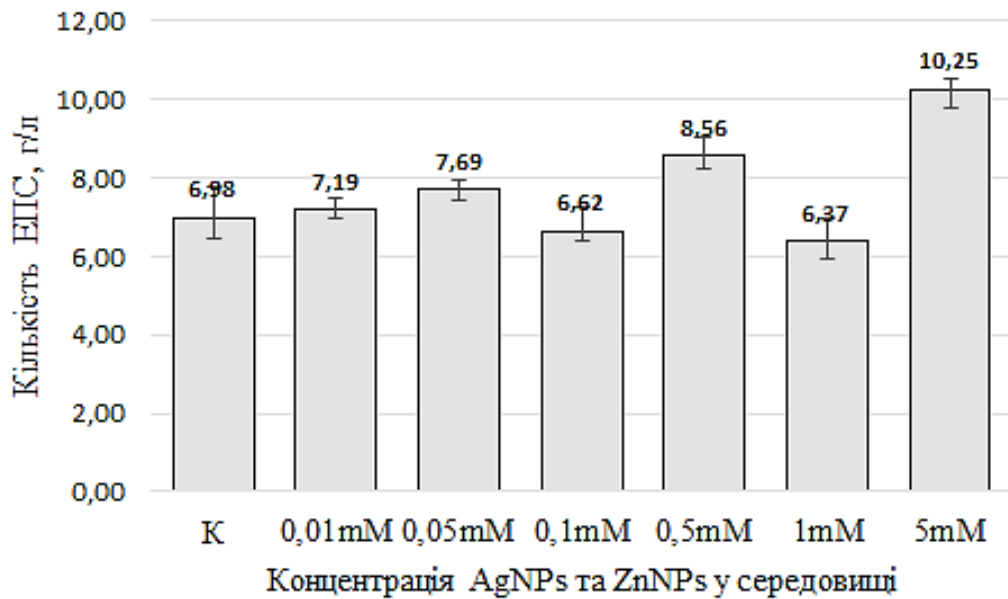


Рисунок 3.5 – Вплив концентрації AgNPs та ZnNPs, які вносили у поживне середовище ГПС, на накопичення екзополісахаридів *L.acidophilus* на 96 годину культивування

Найвищих результатів накопичення ЕПС досягнуто при сумісному культивуванні AgNPs та ZnNPs в концентраціях по 0,5 мМ та 5 мМ (концентрація синтезованого ЕПС складає 8,56 г/л та 10,25 г/л відповідно). Хоча самотійно ці нанометали проявляють також токсичний вплив на клітини МКБ, про що свідчить рівень накопичення ЕПС, однак при сумісному їх використанні показники виходу ЕПС вищі на 5-6 % ніж при внесенні окремо наноцинку та наноміді у концентрації 0,5 мМ та вищі на 10,0-22,5 % ніж при внесенні окремо цих нанометалів в концентрації 5 мМ.

Отже, підсумовуючи дослідження сумісного внесення наносрібла та наноцинку можемо зробити висновок, що найвищий вихід ЕПС *L.acidophilus* спостерігається при внесенні цих нанометалів у середовище культивування у концентраціях по 0,5мМ (8,56г/л) та по 5мМ (10,25 г/л).

3.2.3 Вплив суміші наноміді та наноцинку на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus*

Сумісне внесення наноміді та наноцинку (CuNPs та ZnNPs) також має стимулювальний ефект на накопичення ЕПС *L.acidophilus* (рис. 3.6).

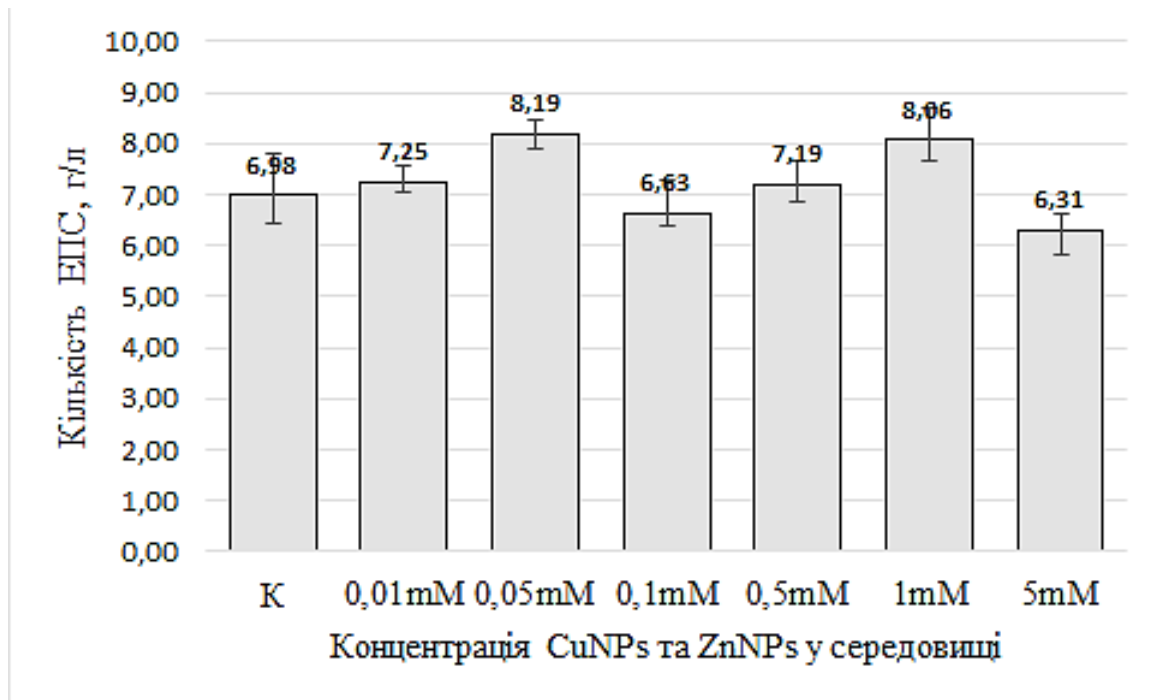


Рисунок 3.6 – Вплив концентрації CuNPs та ZnNPs, які вносили у поживне середовище ГПС, на накопичення екзополісахаридів *L.acidophilus* на 96 годину культивування

Із даних, представлених на рис. 3.6 видно, що при внесенні нанометалів CuNPs та ZnNPs у концентраціях по 0,1 мМ та по 5 мМ спостерігаємо найменший токсичний ефект на клітини лактобактерій, оскільки вони синтезують ЕПС на рівні контролю (6,63 г/л та 6,31 г/л відповідно). Тоді як самостійно внесена нано мідь у концентрації 0,1 мМ сприяє накопиченню ЕПС у концентрації 8,0 г/л, а наноцинк – 7,78 г/л. Це свідчить, що ці метали у поєднанні не проявляють токсичного ефекту і можуть стимулювати інші метаболічні механізми *L.acidophilus*.

Концентрації нанометалів 0,01 мМ та 0,5 мМ при окремому внесенні ЕПС синтезують у концентрації 4,94 г/л, 8,06 г/л (CuNPs) та 9,5 г/л, 8,12 г/л (ZnNPs), а при сумісному внесенні по 0,01 мМ та по 0,5 мМ утворюють 7,25 г/л та 7,19 г/л ЕПС. Тобто сумісне внесення наноцинку і наноміді не має такого токсичного впливу на клітини лактобактерій, як окремо.

Найтоксичніші концентрації наноцинку та наноміді при сумісному внесенні спостерігали при внесенні по 0,05 мМ та 1 мМ (концентрація ЕПС: 8,19 г/л та 8,06 г/л відповідно), тоді як самостійно нанометали у цих концентраціях не токсичні, оскільки ЕПС синтезується на рівні 5,81 г/л та 1,69 г/л (ZnNPs); 2,12 г/л та 7,81 г/л (CuNPs). Отже, стимулювання накопичення ЕПС *L.acidophilus* за рахунок сумісного внесення наноцинку та наноміді у середовище спостерігається тільки за концентрацій по 0,05 мМ та по 1 мМ, оскільки накопичується 8,19 г/л та 8,06 г/л екзополісахариду відповідно.

Висновки до розділу 3

Накопичення екзополісахаридів при культивуванні *L.acidophilus* у присутності наночасток різних металів залежить від виду наночасток та їх концентрації.

Наносрібло залежно від концентрації може у низьких концентраціях пригнічувати утворення ЕПС, а у великих – збільшувати його синтез.

Вплив концентрації наноміді на біосинтез екзополісахаридів *L.acidophilus* має нелінійний характер, що може свідчити про складний механізм стрес-індукованої регуляції метаболізму бактерій.

Оптимальною концентрацією наноцинку при біосинтезі екзополісахаридів молочнокислими бактеріями є 0,01 мМ, концентрація накопиченого ЕПС при цьому складає 9,5 г/л.

Однак слід зазначити, що чіткої лінійної залежності впливу різних концентрацій нанометалів та їх сумісного внесення на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus* не спостерігається.

ВИСНОВКИ

1. Наносрібло, залежно від концентрації, може мати подвійний ефект на здатність *L.acidophilus* синтезувати екзополісахариди. Низькі концентрації (0,01-0,1 мМ) пригнічують утворення ЕПС, а високі (0,5-5 мМ) – індукують захисний бар'єр, збільшуючи тим самим синтез ЕПС *L.acidophilus*.

2. Вплив наноміді на біосинтез екзополісахаридів *L.acidophilus* має нелінійний характер, що може свідчити про складний механізм стрес-індукованої регуляції метаболізму бактерій. Однак тільки концентрації CuNPs 0,1; 0,5 та 1 мМ збільшують синтез ЕПС молочнокислими бактеріями на 12-16 % у порівнянні з контролем.

3. Підсумовуючи дослідження впливу наноцинку на біосинтез екзополісахаридів молочнокислими бактеріями можемо рекомендувати внесення у поживне середовище ZnNPs у концентрації 0,01 мМ для синтезу найбільшої кількості ЕПС (9,5 г/л).

4. При внесенні суміші наносрібла та наноміді в концентраціях по 0,1 мМ або по 1 мМ спостерігали накопичення ЕПС на одному рівні (8,19 г/л), що на 17 % вище за контроль. Ці нанометали підсилюють дію один одного на клітини *L.acidophilus*, але все ж таки у концентраціях вище за 1 мМ подвійні концентрації наноміді і наносрібла менш токсичні ніж самостійно внесене наносрібло.

5. При сумісному внесенні наносрібла та наноцинку найвищий вихід ЕПС *L.acidophilus* спостерігається при внесенні цих нанометалів у середовище для культивування у концентраціях по 0,5 мМ (8,56 г/л) та по 5 мМ (10,25 г/л).

6. Стимулювання накопичення ЕПС *L.acidophilus* за рахунок сумісного внесення наноцинку та наноміді у середовище спостерігається тільки за концентрацій по 0,05 мМ або по 1мМ, оскільки накопичується 8,19 г/л та 8,06 г/л екзополісахариду відповідно.

7. У дослідженні не виявлено чіткої лінійної залежності між концентрацією нанометалів та їх сумісного внесення у різних комбінаціях на утворення екзополісахаридів *L.acidophilus*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ahuja, V., Sangeetha, J., Torvi, A., Thangadurai, D., Shettar, A. K., David, M., & Thimmappa, S. C. Microbes and agricultural waste: A safe resource for the production of bionanomaterials. *In Agri-Waste and Microbes for Production of Sustainable Nanomaterials*. 2022. Elsevier. pp. 301-322.
2. Yildiz, H., & Karatas, N. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*. 2018. № 72. P. 41-46.
3. Wao, A. A., Singh, S., Pandey, A., Kant, G., Choure, K., Amesho, K. T., & Srivastava, S. Microbial exopolysaccharides in the biomedical and pharmaceutical industries. *Heliyon*. 2023. № 9(8). e18613.
4. Paul, P., Nair, R., Mahajan, S., Gupta, U., Aalhat, M., Maji, I., & Singh, P. K. Traversing the diverse avenues of exopolysaccharides-based nanocarriers in the management of cancer. *Carbohydrate Polymers*. 2023. № 312. 120821.
5. Ageeli, A. A., & Mohamed, S. F. Extraction, Purification and Characterization of Exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus plantarum* B7 with Potential Antioxidant, Antitumor and Anti-Inflammatory Activities. *Processes*. 2025. № 13(4), 935.
6. Nadzir, M.M.; Nurhayati, R.W.; Idris, F.N.; Nguyen, M.H. Biomedical Applications of Bacterial Exopolysaccharides : A Review. *Polymers*. 2021. 13. 530.
7. Moscovici, M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*. 2015. № 6. P. 1012-1012.
8. Andrew, M., & Jayaraman, G. Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. *Carbohydrate research*. 2020. № 487. 107881.
9. Sengupta, S., & Dey, S. Microbial exo-polysaccharides (EPS): role in agriculture and environment. *Agric Food*. 2019. № 1(12). P. 4-8.
10. Sardar, U. R., Bhargavi, E., Devi, I., Bhunia, B., & Tiwari, O. N. Advances in exopolysaccharides based bioremediation of heavy metals in soil and water: a critical review. *Carbohydrate Polymers*. 2018. № 199. P. 353-364.
11. Andhare, P., Chauhan, K., Dave, M., & Pathak, H. Microbial

exopolysaccharides : advances in applications and future prospects. *Biotechnology*. 2014. № 3(July 2015), 25.

12. Mollakhalili Meybodi, N., & Mohammadifar, M. A. Microbial exopolysaccharides: a review of their function and application in food sciences. *Journal of food quality and hazards control*. 2015. № 2(4). P. 112-117.

13. Revin, V. V., Liyaskina, E. V., Parchaykina, M. V., Kurgaeva, I. V., Efremova, K. V., & Novokuptsev, N. V. Production of bacterial exopolysaccharides: xanthan and bacterial cellulose. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. № 24(19), 14608.

14. Jurášková, D., Ribeiro, S. C., Bastos, R., Coelho, E., Coimbra, M. A., & Silva, C. C. Exopolysaccharide (EPS) Produced by *Leuconostoc mesenteroides* SJC113: Characterization of Functional and Technological Properties and Application in Fat-Free Cheese. *Macromo*. 2024. № 4(3). P. 680-696.

15. Wu, J., Yan, D., Liu, Y., Luo, X., Li, Y., Cao, C., ... & Zhang, L. Purification, structural characteristics, and biological activities of exopolysaccharide isolated from *Leuconostoc mesenteroides* SN-8. *Frontiers in Microbiology*. 2021. № 12. 644226.

16. Yang, Y., Ye, G., Qi, X., Zhou, B., Yu, L., Song, G., & Du, R. Exploration of exopolysaccharide from *Leuconostoc mesenteroides* HDE-8: Unveiling structure, bioactivity, and food industry applications. *Polymers*. 2024. № 16(7). 954.

17. Núñez, C., León, R., Guzmán, J., Espín, G., & Soberón-Chávez, G. Role of *Azotobacter vinelandii* mucA and mucC gene products in alginate production. *Journal of Bacteriology*. 2024. № 182(23). P. 6550-6556.

18. Moreno, J., Vargas-García, C., Lopez, M. J., & Sánchez-Serrano, G. Growth and exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* in media containing phenolic acids. *Journal of Applied Microbiology*. 1999. № 86(3). P. 439-445.

19. Gheorghita, A. A., Wozniak, D. J., Parsek, M. R., & Howell, P. L. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm exopolysaccharides: assembly, function, and degradation. *FEMS Microbiology Reviews*. 2023. № 47(6). fuad060.

20. Jurášková, D., Ribeiro, S. C., & Silva, C. C. Exopolysaccharides produced

by lactic acid bacteria: from biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*. 2022. № 11(2). 156.

21. Liu, W., Wei, Y., Xiang, R., Dong, B., & Yang, X. Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides Unveiling Multifaceted Insights from Structure to Application in Foods and Health Promotion. *Foods*. 2025. № 14(5). 823.

22. Abarquero, D., Renes, E., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. Study of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their industrial applications: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 2022. № 57(1). P. 16-26.

23. Kanamarlapudi, S. L. R. K., & Muddada, S. Characterization of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. *BioMed research international*. 2017. № 2017(1). 4201809.

24. Nachtigall, C., Surber, G., Wefers, D., Vogel, C., Rohm, H., & Jaros, D. Capsular exopolysaccharides from two *Streptococcus thermophilus* strains differ in their moisture sorption behavior. *Foods*. 2023. № 12(3). 596.

25. Kaur, J., Mudgal, G., Chand, K., Singh, G. B., Perveen, K., Bukhari, N. A., ... & Singh, G. An exopolysaccharide-producing novel *Agrobacterium pusense* strain JAS1 isolated from snake plant enhances plant growth and soil water retention. *Scientific Reports*. 2022. № 12(1). 21330.

26. Huang, H., Wen, Y., Li, Z., Wang, B., & Li, S. Characterization and Rheological Properties of a New Exopolysaccharide Overproduced by *Rhizobium* sp. L01. *Polymers*. 2025. № 17(5). 592.

27. Kuncheva, M., Panchev, I., Pavlova, K., Russinova-Videva, S., Georgieva, K., & Dimitrova, S. Functional characteristics of an exopolysaccharide from antarctic yeast strain *Cryptococcus Laurentii* AL62. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2013. № 27(5). P. 4098-4102.

28. Grigorova, D., Pavlova, K., & Panchev, I. Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC. *Applied biochemistry and biotechnology*. 1999. № 81. P. 181-191.

29. Yang, R., Liu, L., Gao, D., & Zhao, D. Purification, structural characterization, and bioactive properties of exopolysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* HD-01. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2024. № 12.

1455708.

30. Parolis, L. A., Parolis, H., Kenne, L., Meldal, M., & Bock, K. The extracellular polysaccharide of *Pichia* (Hansenula) *holstii* NRRL Y-2448: the phosphorylated side chains. *Carbohydrate research*. 1998. № 309(1). P. 77-87.
31. Mahapatra, S., & Banerjee, D. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. *Microbiology insights*. 2013. № 6. MBI-S10957.
32. Stoica, R. M., Moscovici, M., Lakatos, E. S., & Cioca, L. I. Exopolysaccharides of fungal origin: properties and pharmaceutical applications. *Processes*. 2023. № 11(2). 335.
33. Mouro, C., Gomes, A. P., & Gouveia, I. C. Microbial exopolysaccharides: structure, diversity, applications, and future frontiers in sustainable functional materials. *Polysaccharides*. 2024. № 5(3). P. 241-287.
34. Nguyen, P. T., Nguyen, T. T., Bui, D. C., Hong, P. T., Hoang, Q. K., & Nguyen, H. T. Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: The manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS microbiology*. 2020. № 6(4). 451.
35. Liu, W., Wei, Y., Xiang, R., Dong, B., & Yang, X. Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides Unveiling Multifaceted Insights from Structure to Application in Foods and Health Promotion. *Foods*. 2025. № 14(5). 823.
36. Talbi, C., Elmarrkechy, S., Youssfi, M., Bouzroud, S., Belfquih, M., Sifou, A., ... & Bourais, I. Bacterial exopolysaccharides: From production to functional features. *Progress In Microbes & Molecular Biology*. 2023. № 6(1). a0000384
37. Kimmel, S. A., Roberts, R. F., & Ziegler, G. R. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. № 64(2). P. 659-664.
38. Lin, T. Y., & Chien, M. F. C. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*. 2007. № 100(4). P. 1419-1423.
39. Yamasaki-Yashiki, S., Sawada, H., Kino-Oka, M., & Katakura, Y. Analysis of gene expression profiles of *Lactobacillus paracasei* induced by direct contact with

Saccharomyces cerevisiae through recognition of yeast mannan. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 2017. № 36(1). P.17-25.

40. Bertsch, A., Roy, D., & LaPointe, G. Enhanced exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Sciences*. 2019. № 9(19). 4026.

41. Tao, J., Huang, X., Ling, F., Yu, B., Zhou, X., Shen, Q., & Sagratini, G. Immobilization of Lactic acid bacteria for production of extracellular polysaccharides. *Food Science and Technology*. 2022. № 42. e99021.

42. Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., Techapun, C., Chaiyaso, T., & Leksawasdi, N. Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid state fermentation under high salinity stress. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2012. № 76(5). P. 912-917.

43. Grosu-Tudor, Silvia-Simona, and Medana Zamfir. Exopolysaccharide production by selected lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables. 2014. P. 107-114.

44. Sorensen, H. M., Rochfort, K. D., Maye, S., MacLeod, G., Brabazon, D., Loscher, C., & Freeland, B. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: production, purification and health benefits towards functional food. *Nutrients*. 2022. № 14(14). 2938.

45. Pedersen M. B. et al. Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2012. Vol. 3, №. 1. P. 37–58.

46. Капрельянц Л. В., Пилипенко Л. М., Єгорова А. В., Кананихіна О. М., Велічко Т. О., Килименчук О. О., Шпирко Т. В. Технічна мікробіологія : лабор. практ. ; Частина II. Одеса : ОНАХТ, 2020. 86 с.

ДОДАТОК