

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Отримання екзометаболітів зооглії *Oryzomyces indicī* і
можливість створення космецевтичних засобів на їх основі.**

Допущена до захисту

«__»_____ 2024 р.

Кваліфікаційна робота

студентки кафедри

Молекулярної біології та біотехнології

Бондаренко Софії Віталіївни

Завідувач кафедри

Оцінка «_____»

Голова ЕК _____

«__»_____ 2023 р.

Науковий керівник:

Леухіна Л.В.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	3
ABSTRACT	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	10
1.1. Поняття та значення засобів гігієни	10
1.2. Загальна характеристика полікультури <i>Oryzomyces indicī</i>	15
1.3. Огляд симбіотичної спільноти <i>Oryzomyces indicī</i> та їх екзометаболітів.....	18
1.3.1. Склад <i>Oryzomyces indicī</i>	21
1.3.2. Властивості та застосування екзометаболітів <i>Tibicos</i>	23
1.4.4. Молочнокислі бактерії.....	24
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ І	26
РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	27
2.1. Культивування полікультури <i>Oryzomyces indicī</i>	27
2.3. Проблеми.....	33
2.4. Розробка ідентифікованих заквасок	35
2.5. Відокремлення та зберігання екзометаболітів <i>Oryzomyces indicī</i>	36
2.6. Включення екзометаболітів <i>Oryzomyces indicī</i> у космецевтичні засоби.....	37
2.6.1. Оцтова кислота.	38
2.6.2. Молочнокислі бактерії.	40
2.6.4. Вітаміни групи В.....	42
2.3.5. Вітамін С	43
2.6.7. α -глюкан.....	44
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ ІІ.....	45
РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	46
3.1. Вплив екзометаболітів <i>Oryzomyces indicī</i> на <i>Candida albicans</i>	46
3.2. Розробка гігієнічного засобу.....	49
3.3. Клінічні дослідження.	50
ВИСНОВКИ	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	53

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Отримання екзометаболітів зооглії *Oryzomyces indicī* і можливість створення космецевтичних засобів на їх основі».

Робота включає 63 сторінки, 1 таблицю, 6 рисунків, 44 використаних джерел.

Дипломна робота присвячена дослідженню отримання екзометаболітів *Oryzomyces indicī* та можливості створення космецевтичних засобів на їх основі. У роботі представлено огляд літератури щодо властивостей *Oryzomyces indicī*, методів отримання екзометаболітів та їх біологічної активності. Особлива увага приділена антимікробній активності екзометаболітів проти *Candida albicans*. Проведено експерименти з використанням методу «колодців» та клінічні дослідження, які підтвердили значне пригнічення росту *Candida albicans* і виявили потенційні пребіотичні властивості екзометаболітів.

Ключові слова: екзометаболіти, *Oryzomyces indicī*, космецевтичні засоби, антимікробна активність, *Candida albicans*, пребіотики, біологічна активність.

ABSTRACT

Qualification work on the topic: ‘Obtaining exometabolites of zooglyphs of *Oryzomyces indici* and the possibility of creating cosmeceuticals based on them’.

The work includes 62 pages, 1 table, 6 figures, 44 references.

This work is devoted to the study of the production of exometabolites of *Oryzomyces indici* and the possibility of creating cosmeceuticals based on them. The work presents a review of the literature on the properties of *Oryzomyces indici*, methods of obtaining exometabolites and their biological activity. Particular attention is paid to the antimicrobial activity of exometabolites against *Candida albicans*. Experiments using the ‘well’ method and clinical studies have been carried out, which have confirmed a significant inhibition of *Candida albicans* growth and revealed potential prebiotic properties of exometabolites.

Keywords: exometabolites, *Oryzomyces indici*, cosmeceuticals, antimicrobial activity, *Candida albicans*, prebiotics, biological activity.

ВСТУП

Наразі, в сучасному світі існує велика кількість сфер діяльності, в яких люди стикаються з умовами, що пред'являють підвищені вимоги до фізичного і психологічного стану. Екстремальні умови, такі як польові операції або походи в гори вимагають від людини високого рівня підготовленості та адаптації, саме через це дотримання найвищих стандартів гігієни є одним із головних факторів.

В першу чергу потрібно визначити що таке екстремальні умови. «Екстремальні умови – виняткові, особливі, надзвичайні обставини, що загрожують життю і здоров'ю людей, мають вплив стрес-факторів, сприймаються та оцінюються як небезпечні, складні, безвихідні ситуації, унаслідок чого підвищують тривожність, емоційну напруженість, створюють психотравмуючий вплив на психіку людини» [1].

Засоби для забезпечення особистої гігієни та обробки екіпіровки призначені для екстремальних ситуацій, у тому числі перебування у польових умовах, мають забезпечувати чистоту тіла, таким чином запобігаючи захворюванням, які нерозривно пов'язані з впливом шкідливих факторів. Варто пам'ятати, що якщо у людей, що не можуть повноцінно підтримувати належний рівень гігієнічного захисту, можуть розвинути важкі хвороби, у тому числі інфекційні чи психологічні, тобто це питання здоров'я, а не тільки комфорту.

Після початку збройної агресії росії проти України питання розробки нових засобів для обробки тіла та екіпіровки, що були розроблені спеціально адаптованими до екстремальних ситуацій. Не можна забувати, що ефективні засоби особистої гігієни мають якнайкраще підходити для обробки тіла та екіпірування, але й бути придатними для використання у різні погодні умови і, навіть, без води. На наш погляд, перспективним напрямком зараз є використання екзометаболітів зооглії «морський гриб», тому що ці біологічно активні компоненти синтезовані асоціацією

пробіотичних бактерій і здатні допомагати підтримувати здоров'я та гігієнічну безпеку в екстремальних умовах.

Дана дипломна робота присвячена розробленню та дослідженню засобів обробки тіла та екіпірування для екстремальних умов (польових) з застосуванням екзометаболітів *Oryzomyces indicis*, морського гриба. Аналіз та дослідження цих перспективних компонентів має розширити знання про можливості використання природних, натуральних ресурсів для того, щоб забезпечити найвищий рівень захисту в умовах, де немає можливості повноцінно піклуватися особистою гігієною.

Окремо виділяється проблема жіночої гігієни в польових умовах, бо досі вважається, що на війну ідуть лише чоловіки, використовуючи данні 2023 року, було отримано інформацію про те, що наразі у ЗСУ служить більше 62 тисяч жінок, звісно, в гарячих точках їх близько п'ятьох тисяч, тож варто зробити так, щоб засоби гігієни підходили і для інтимної гігієни жінок, тобто потрібно розробити засіб, який буде гарно очищувати, але зі збереженням необхідної мікрофлори [2].

У екстремальних умовах, таких як війна чи довгі піші походи, далекі від цивілізації, значення гігієни неможливо переоцінити, бо це є фундаментом для психічного та фізичного здоров'я людини, бо важкі антисанітарні умови є чудовим ґрунтом для різноманітних інфекційних та неінфекційних хвороб. Роздивимось детальніше навіщо треба розробляти нові засоби для підтримання базової гігієни.

По-перше, в умовах екстремальної ситуації, в якій обмежений або повністю відсутній доступ до повноцінної медичної допомоги, гігієнічні продукти є необхідним першочерговим засобом у запобіганні проблем. При регулярному митті рук, обробці поверхонь та екіпірування, ризик передачі бактерій, вірусів або інших патогенів значно знижується.

По-друге, без дотримання мінімальної гігієни можуть виникнути неприємні шкірні захворювання, що супроводжуються свербожом або

болем, треба постійно змивати зі шкіри бруд та пил, що досить важко зробити без доступу до чистої проточної води та мила.

Третім, але не менш важливим пунктом, можна виділити психологічний аспект, чистота тіла допомагає зберігати почуття самоповаги та гідності навіть в стресових умовах, також досить важко сконцентруватись на певних задачах коли тіло болить та чешеться.

Варто виділити факт, що різні, навіть найменші проблеми зі шкірою, значно знижують працездатність. Тому для підтримання нормального виконання поставлених задач, варто видаляти бруд та піт з тіла. Також це може запобігти поширенню епідемій, бо в подібних умовах люди завжди знаходяться поруч один з одним, тому є висока вірогідність того, що інфекція дуже швидко пошириться на всіх.

У даній роботі розглянуті хвороби, з якими стикаються в екстремальних умовах (воєнні та люди, що професійно займаються екстремальними видами спорту або виконують роботи с підвищеним ризиком для життя), існуючі та найпопулярніші засоби, наслідки їх використання, а також засоби на основі екзометаболітів *Oryzomyces indicī*.

Отже, враховуючи всю вищесказану інформацію, можна виділити **мету роботи**: розробка та дослідження ефективного засобу для обробки екіпірування та тіла для використання в екстремальних та польових умовах, з використанням екзометаболітів морського рису.

Актуальність роботи: в екстремальних умовах існує велика проблема з гігієною, виникає велика кількість хвороб через це, тому перед людством стоїть питання розробки найефективніших універсальних засобів, для цього можна використовувати екзометаболіти «морського рису». Умови, в яких немає можливості повноцінно піклуватись про своє тіло, одяг, екіпірування, взуття та інші предмети, тобто в військових польових операціях або експедиціях у віддалені райони, дотримання гігієни та санітарії допомагає підтримувати добробут та здоров'я.

Нині існуючі засоби гігієни такі як душі без води, сухі засоби для обробки ніг та взуття, антисептики та інші, мають склад, що не зовсім підходить для людей, хоч і виробник інформує, що ці засоби не потребують змивання, це не так, якщо їх використовувати на щоденній основі, то можуть статись такі неприємні наслідки як дерматит, подразнення шкіри, та інші.

В наш час, коли відбуваються бойові дії в Україні, багато воєнних страждають від різноманітних хвороб, наприклад пітниця, що виникає від закупорки пор, мікози стопи, траншейна стопа, грибок, дерматити, та інші проблеми, які стають наслідками довгого перебування без душу, в одному й тому ж одязі та взутті або в термобілизні. Тому перед нами постає задача розробити універсальний засіб для обробки тіла та екіпірування, що буде діяти довго та ефективно, сприяти загоєнню ран та знищенню шкідливої мікрофлори. Для цього, при розробці спецзасобів, необхідно врахувати властивості і дію компонентів як на шкіру так і на мікробну асоціацію та її продукти синтезу. Тому при розробці засобу ми виключили компоненти з агресивних поверхневоактивних речовин, спиртів, штучних ароматів і консервантів.

Кінцевий продукт має мати антимікробну дію, що значно знизить ризик інфекції в екстремальних умовах, де неможливо забезпечити постійний доступ до чистої води та медичних закладів. Також варто відзначити, що засіб буде цілком натуральний, він буде гарною відповіддю на зростаючий попит на екологічні та натуральні альтернативи вже відомим засобам, таким чином, ми маємо зменшити залежність від синтетичних неекологічних засобів.

Екзометаболіти *Oryzomyces indicī* мають великий потенціал для подальшого створення інших багатофункціональних продуктів, тобто ця робота має потенціал для подальшого розширення, можливо ми зможемо розробити продукт і для повсякденного життя. Включення властивостей екзометаболітів у гігієнічні засоби зможе забезпечити додаткові переваги,

такі як захист шкіри від запалень, дерматитів та шкоди навколишнього середовища.

Цілі: по-перше, перед нами стоїть задача проаналізувати сучасні засоби гігієни, що використовують безпосередньо в екстремальних умовах зараз, виявити всі плюси та мінуси їх застосування. По-друге, необхідно вивчити екзометаболіти «морського рису», детальний аналіз біологічних речовин сприятиме якнайшвидшому впровадженню продуктів з цим компонентом у складі в повсякденне життя. Далі ми роздивимось які засоби можливо розробити на основі екзометаболітів *Oryzomyces indicī*, після чого буде проведено детальне дослідження засобів, включаючи експериментальне використання в польових умовах. За результатами експерименту ми зможемо сформулювати рекомендації по використанню продукту для різних екстремальних ситуацій.

Наукова новизна дослідження, що було описано в даній роботі, полягає в комплексному та відповідальному підході до розробки та використання нових засобів гігієни для екстремальних умов з використанням екзометаболітів *Oryzomyces indicī*.

Гіпотеза: Використання екзометаболітів *Oryzomyces indicī* в розробці засобів гігієни для екстремальних умов сприятиме створенню ефективних продуктів, що забезпечують надійний захист від мікробіологічного забруднення і підтримання гігієнічних стандартів в умовах обмеженого доступу до ресурсів і медичної допомоги.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Поняття та значення засобів гігієни

Особиста гігієна є невід'ємним фактором здоров'я, для звичайних людей, зараз нормою є митися 1-2 рази на день, завжди використовувати чисту постіль та випрані речі, але в екстремальних умовах неможливо досягти того ж рівня чистоти, що і в повсякденності.

Дамо визначення особистій гігієні: це певний перелік правил, що пов'язані зі здоров'ям правила, які мають дотримуватись люди у звичайному житті, охоплюють індивідуальний догляд за шкірою, волоссям, ротом, нігтями, одягом, спідньою та постільною білизною та взуттям. Особиста гігієна, в першу чергу, це акт турботи про себе для покращення загального стану здоров'я та самопочуття. Гігієна є дуже особистим питанням, і заохочення до змін у гігієні вимагає навичок та обережності. Хороші знання з особистої гігієни значною мірою сприяють профілактиці захворювань.

Засоби гігієни, що масово використовуються є різними продуктами та матеріалами, що призначені для того, щоб підтримувати тіло в чистоті, тобто усувати забруднення зменшувати кількість шкідливих мікроорганізмів, а також запобігати їх поширенню, також продукти до яких ми звикли підтримують свіжість тіла та одягу чи білизни, що допомагає людині почувати себе краще ментально [3].

Для звичайних людей виготовляють мила, гелі для душу, шампуні, кондиціонери, пральні порошки, зубні порошки чи пасти, щітки, дезодоранти, дезінфікуючі засоби та інші. Роздивимось детальніше навіщо людям всі вище перелічені засоби:

1. Підтримка здоров'я є найочевиднішим фактором чому люди миються і використовують мила та шампуні, регулярне очищення тіла, поверхонь та одягу чи білизни допомагає якнайкраще позбутись бактерій, які можуть зашкодити, а зі знищенням патогенів значно знижується ризик захворювань і підвищується рівень особистого комфорту.

Під час пандемії Covid-19 людству необхідно було зрозуміти що треба робити, щоб мінімізувати смерті від хвороби, основними рекомендаціями були провітрювання, регулярне вологе прибирання з використанням спеціальних дезінфікуючих засобів, регулярне миття рук з милом та обробка антисептиком, також потрібно було очищувати волосся, тіло і одяг після кожного виходу на вулицю, це допомогло зменшити заражуваність. З цього ми можемо зробити висновок, що використання засобів гігієни сприяє запобіганню інфекцій в ситуаціях з підвищеним ризиком, наприклад в місцях де знаходиться велика кількість людей, в медичних закладах, в екстремальних або польових умовах під час війни [4].

Поліпшення благополуччя та особистий комфорт це другий фактор, чисте тіло, одяг і поверхні сприяють створенню комфортної атмосфери, а це в свою чергу допомагає підтримувати стабільний емоційний та психологічний стан. Також чистота тіла та одягу дає змогу бути більш соціально адаптованим, суспільні взаємодії і стосунки стають більш легкими.

Зниження ризику захворювань шкіри теж є основною задачею різних засобів. Роздивимось хворобу що розвиваються найбільше від ігнорування правил особистої гігієни: занедбаний дерматит - це шкірне захворювання, спричинене недостатнім очищенням шкіри. Він може нагадувати алергічні реакції та інші шкірні захворювання, але краще реагує на елементарні гігієнічні процедури, такі як прийняття душу, ніж інші шкірні проблеми. Найкращий спосіб запобігти цим захворюванням - надати пріоритет гігієнічним звичкам, таким як регулярне купання, належне миття рук та підтримання чистоти в особистому просторі [5].

Нинішня недостатня база знань перешкоджає розробці вдосконалених стратегій для покращення дотримання особистої гігієни, що має велике значення для зменшення тягаря інфекційних захворювань, особливо в умовах екстремальних ситуацій [3].

Засоби гігієни в екстремальних умовах. З 24 лютого 2022 року гостро встало питання гігієнічної обробки тіла та екіпірування, належне дотримання гігієни має надважливе значення для підтримки психологічного та фізичного здоров'я, а також працездатності.

В ідеальних умовах військовослужбовець має приймати душ кожен день, чистити зуби, ретельно мити ноги і взуття, а також постійно змінювати і прати одяг, термобілизну і спідню білизну, але в польових умовах такої можливості немає, з цього випливає, що військовослужбовці знаходяться в групі ризику різноманітних захворювань шкіри, статевих органів, нігтів та ніг, у тому числі інфекційних [6].

Наразі військовослужбовці збройних сил України активно використовують різноманітну продукцію, яка має полегшувати життя, але на жаль, це не завжди так.

Почнемо з відомого сухого одноразового душу, що не потребує змивання. В комплект входить одноразова пінна губка з гелем та одноразовий рушник. Згідно інструкції треба додати 25 мілілітри води, вспінити губку, протерти тіла та витерти рушником. Звісно, він вбиває бактерії, не залишає липкості та мильних слідів, видаляє забруднення, коштує мало, важить менше 50 грамів, займає дуже мало місця, це все дуже важливі параметри цього засобу. Виробник заявляє, що одноразовий душ підходить для щоденного використання, для інтимної гігієни та не сушить та не подразнює шкіру. Склад звичайної губки: вода, лауретсульфат натрію, кокамід ДЕА, динатрію кокоамфодіацетат, лимонна кислота, віддушка, молочна кислота, пропіленгліколь, яблучна кислота, екстракт розмарину лікарського, екстракт листя камелії китайської, екстракт квітки гіркої апельсину, CI 42090, CI 47005, CI 61570, хлорид натрію, сульфат натрію, гідроксид натрію, Бензофенон-4.

Роздивимось цей склад більш детально: почнемо з SLS — це аніонна поверхнево-активна речовина, яка зазвичай використовується в споживчих побутових миючих засобах. Дослідження показують, що якщо не змити SLS

зі шкіри великою кількістю води, то він може викликати подразнення і зробити шкіру більш вразливою для інфекцій [7], далі у складі вказаний кокамід ДЕА, який в малих дозах викликає алергічну реакцію або легкі форми дерматиту, має накопичувальний ефект і з часом може викликати рак. Лимонна кислота руйнує роговий шар шкіри і теж робить її вразливішою. Віддушки в складі викликають контактний дерматит [8]. Інші компоненти додаються в меншій концентрації. Звісно, в складі є кілька зволожувальних елементів, але вони не можуть допомогти шкірі після агресивних миючих засобів. Одноразові губки викликають дерматити, подразнення якщо їх не змивати, протерти мило рушником недостатньо, для інтимної гігієни застосовувати не можна, бо є великий ризик появи молочниці чи подразнення, що будуть заважати працездатності.

Роздивимось ще один популярний засіб для обробки взуття та ніг, він складається з аморфного адсорбенту (діоксиду кремнію), він дійсно якісно вбирає вологу і запобігає поширенню грибка та дозволяє військовослужбовцям знаходитись у взутті 16 годин на добу без запаху та надлишкової вологи, з мінусів можна виділити суху шкіру, бо використання адсорбентів пересушує шкіру ніг, а це у свою чергу призводить до появи тріщин, виразок та подразнень, через які під шкіру можуть потрапити патогенні мікроорганізми.

Використання жіночих гелів для інтимної гігієни без змивання може призвести до накопичення залишків на шкірі, що потенційно може викликати подразнення та дискомфорт [1]. Багато з цих засобів містять інгредієнти, які можуть залишати плівку або осад на шкірі, якщо їх не змити належним чином. Ці залишки можуть закупорювати пори, затримувати бактерії та подразнювати ніжну шкіру статевих органів. Якщо не змити ці гелі ретельно, це може призвести до: - Почервоніння - Свербіж - Відчуття печіння. Змивання засобу після використання має важливе значення для запобігання цим проблемам і підтримки здоров'я інтимної зони [2].

Одна з ключових причин, чому важливо змивати жіночі гелі для інтимної гігієни, полягає в тому, щоб уникнути порушення природного рН-балансу піхви [3]. Піхва має делікатний баланс корисних бактерій і злегка кислий рівень рН, який допомагає захиститися від інфекцій. Використання сильно ароматизованих гелів або мила, не змиваючи їх, може порушити цей рН-баланс, що робить піхву більш вразливою до інфекцій та подразнень[4]. Порушення рН-балансу піхви може призвести до: - Бактеріального вагінозу - Молочниці - ІСШ Правильне ополіскування після використання гелів для інтимної гігієни допомагає підтримувати природну кислотність піхви і знижує ризик цих ускладнень [5].

Роздивимось також жіночі гелі для інтимної гігієни, як відомо, їх необхідно змивати водою після використання. Дослідження показали, що засоби для інтимної гігієни та вагінального очищення пов'язані з підвищеним ризиком бактеріальних інфекцій та алергічних реакцій, що підкреслює потенційну шкоду цих продуктів, якщо їх не змивати належним чином. Деякі з поширених проблем, які можуть виникнути, якщо не змивати ці засоби, включають бактеріальні інфекції, алергічний дерматит, подразнення піхви. Щоб уникнути цих ризиків, важливо ретельно змивати будь-які гелі для інтимної гігієни, щоб забезпечити безпеку та здоров'я інтимної зони, але оскільки у польових умовах немає такої можливості, тому треба розробляти засоби придатні для використання в екстремальних умовах.

З урахуванням всього вищесказаного можна виділити такі основні проблеми існуючих засобів гігієни, що масово використовуються військовослужбовцями ЗСУ:

- 1) засоби очищення потребують змивання;
- 2) викликають подразнення і захворювання шкіри;
- 3) не підходять для інтимної гігієни жінок в екстремальних умовах.

1.2. Загальна характеристика полікультури *Oryzomyces indicī*.

На сьогоднішній день однією з ключових мет біотехнології є пошук нових речовин з антибіотичною та протимікробною дією. Це пов'язано зі зростаючим числом патогенних мікроорганізмів, які стали стійкими до відомих антибіотиків. Нові препарати повинні бути доступними та легкими у виробництві.

В останній час різноманітні засоби, які були виготовлені з корисних бактерій, активно використовуються в медицині та ветеринарії. Дія таких продуктів спрямована на пригнічення патогенної мікробіоти, зменшення патогенної адгезії, підвищення корисного ефекту, нейтралізацію токсинів та стимуляцію імунітету.

Перспективними є продукти метаболізму деяких мікроорганізмів, які проявляють антагоністичну активність проти патогенних мікроорганізмів. Об'єктом дослідження був обраний консорціум мікроорганізмів, що називається «рисовим грибом». Зерна рисового гриба широко використовуються в деяких сільських регіонах для виробництва корисного солодкого напою, який має злегка кислувату консистенцію і містить низький вміст алкоголю [9].

Було добре досліджено властивості пробіотиків з молочних продуктів, але наразі існує потреба в розробці нових засобів з кращими властивостями. Кисломолочні продукти викликають інтерес у науковому співтоваристві завдяки своїм передбачуваним корисним властивостям, включаючи поліпшення травлення і толерантності до лактози, антибактеріальну дію, гіпохолестеринемічну дію, контроль рівня глюкози в плазмі, антигіпертензивну дію, протизапальну дію, антиоксидантну активність, антиканцерогенну активність та антиалергенну активність. Саме через це ведуться активні дослідження можливих джерел пробіотиків, тому нещодавно було знайдено нову культуру мікроорганізмів *Oryzomyus indicī*, в українських джерелах згадуються як асоціація мікроорганізмів *Lactomyces tibeticus*, це молочні добавки на основі тибетських кефірних зерен.

Зерна «рисового гриба» – це багатовидова закваска, яка використовується для виробництва ферментованих напоїв на розчині сахарози з фруктовими екстрактами або без них. Зерна водного кефіру відомі в Мексиці як *Tibicos*, які в основному використовуються для виробництва тепаче - традиційного мексиканського напою, що виготовляється шляхом ферментації ананасової шкірки. Мікробіота в основному складається з молочнокислих бактерій (LAB), а оскільки більшість пробіотиків належать до цієї групи, тібікос може бути потенційним джерелом пробіотичних бактерій. Більше того, деякі бактерії, виділені зі зразків кефіру, були визнані пробіотиками. *Oryzomyces indicus* – це полікультура мікроорганізмів, що використовується у виробництві кисломолочних продуктів. Вперше була досліджена в Білорусі і пов'язана з технологією виробництва ферментованого напою [10]. Історичне походження водного кефіру достеменно невідоме, стверджується, що солдати Кримської війни 1855 року додавали зерна рисового гриба в імбирне пиво. Точно невідомо, де і коли з'явилися зерна водного кефіру, але припущення вказують на Мексику як на найбільш вірогідне місце походження. Деякі дослідження вказують на те, що культура *Tibicos* утворює тверді гранули, які можна відновити в цукровій воді на поверхні кактуса Опунція в Мексиці.

Існує документальне підтвердження використання зерен, які називаються «тібіко», у ферментованих напоях, виготовлених із цукристого соку опунції в Мексиці наприкінці 1800-х років. У Франції Vaussier у 1978 році вперше використав термін "зерна водного кефіру" і заявив, що ці зерна були відокремлені від зерен молочного кефіру [11].

Водний кефір виробляється під різними назвами в різних країнах. Водний кефір називається *Piltz* в Німеччині, *Kefir di Fruttai* в Італії та *Graines Vivantes* у Франції. Водний кефір, який у Мексиці називають *Tibicos* (або *tibi*), використовується для виробництва ферментованого напою *Terache*, який виготовляється з ананаса, коричневого цукру та кориці.

Крім використання назви «зерна водного кефіру» в Західній Європі також використовуються інші назви для цього ферментованого напою, залежно від географічного розташування, наприклад «росли імбирного пива», «Tibicos», «зерна Tibi», «морський гриб», «рисовий гриб», «Vèbées», «японське пивне насіння» та «цукристі кефірні зерна». Напій з рисового гриба називається Piltz в Німеччині, Kefir di Fruttai в Італії та Graines Vivantes у Франції. Водний кефір, який у Мексиці називають Tibicos (або tibi), використовується для виробництва ферментованого напою Terache, який виготовляється з ананаса, коричневого цукру та кориці [12].

Через широкий спектр біологічно активних сполук, простому методу культивування та можливості підтримання культури в стабільно активному стані тривалий час. Було проведено дослідження, зосереджені на його амілолітичній активності, тобто здатності розщеплювати крохмаль. Було виявлено, що *Oryzomyces indicis* демонструє високу амілолітичну активність, що робить їх перспективними джерелами амілазних ферментів для біотехнологічних застосувань [13].

Гранули морського рису складаються з суміші бактерій *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* та *Leuconostoc*, а також з дріжджів *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, а бактерії *Lactobacillus* відповідають за синтез декстрану, тобто полісахариду, що формує характерні зерна.

Звісно, в залежності від регіону, може змінюватись склад, але саме це мікробне різноманіття відповідає за фізико-хімічні особливості та біологічну активність. Тибетський рисовий гриб, який вирощують в Україні має вигляд білих грудочок розміром 3-6 мм, коли гриб молодий, і виростає до 3,5 см в діаметрі, не має специфічного запаху, якщо морський рис помістити у воду він осяде на дно. Вміст вологи у грибі 86-89%. Видовий склад морського гриба, що вирощують в Україні, має такий склад: дріжджові клітини *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, кефірні гриби *Candida* та бактерії: *Lactobacillus fermentum* (майже 90% мікробної асоціації), *Leuconostoc lactis* та оцтовокислі бактерії *Acetobacter* [10].

Oryzomyces indicī може синтезувати летючі ароматичні сполуки, ферменти, вітаміни, амінокислоти, а також низькомолекулярні та високомолекулярні жирні кислоти, які відіграють важливу роль у функціонуванні організму. З літературних джерел відомо, що деякі жирні кислоти, зокрема лауринова, проявляють антибактеріальні властивості. Це пояснює антагоністичну активність рисового гриба проти патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів [14].

1.3. Огляд симбіотичної спільноти *Oryzomyces indicī* та їх екзометаболітів.

У складному та запутаному світі мікробних взаємодій симбіотичні взаємозв'язки відіграють дуже важливу роль у формуванні екосистем і рушійних біологічних процесів. Чудовим прикладом є симбіотична спільнота, що утворює *Oryzomyces indicī*.

Tibicos – це газований, злегка кислуватий ферментований напій, який виробляється шляхом бродіння розчину сахарози, до якого додані сухофрукти, із зернами водного кефіру. Ці желатинові зерна є симбіотичною культурою бактерій і дріжджів, занурених у полісахаридну матрицю. Молочнокислі бактерії, дріжджі та оцтовокислі бактерії є основними мікроорганізмами, що входять до складу зерен цукрового кефіру. Зокрема, молочнокислі бактерії виробляють екзополісахаридну матрицю, з якої формується кефірне зерно, тоді як дріжджі допомагають бактеріям джерелом азоту, який може бути засвоєний.

Однак, які саме види переважають у мікробіоті зерна, залежить від географічного походження зерна, а також від субстрату та умов ферментації. Ці фактори в кінцевому підсумку впливають на характеристики виробленого напою, наприклад, на аромат, смак і кислотність, але їх також можна контролювати і використовувати для виробництва напою з бажаними характеристиками.

Виробництво Tibicos традиційно відбувається в невеликих масштабах, і використання певних заквасок зазвичай не практикується.

Однак зі зростанням популярності водного кефіру як напою - частково через тенденції способу життя споживачів, а частково через те, що водний кефір розглядається як оздоровчий напій з його передбачуваними перевагами для здоров'я - потреба в глибокому розумінні біології та динаміки водного кефіру, а також у визначених і контрольованих виробничих процесах, в кінцевому рахунку, зростатиме [15].

Зерна можуть бути повторно використані для наступних ферментацій шляхом зворотного відстоювання або видалення зерен з попередньої ферментації і поміщення їх у свіжий субстрат для нової ферментації. Технічно це можна робити до нескінченності, і традиційно зерна передаються або діляться з покоління в покоління.

Молочнокислі бактерії, особливо види *Lactobacillus*, є основними бактеріальними членами складної зернової спільноти, а оцтовокислі бактерії відіграють другорядну роль, залежно від наявності кисню. Дріжджі, як сахароміцети, так і несахароміцети, також є домінуючими членами. Окрім використання різних субстратів для цукрового кефіру та молочного кефіру, обидва продукти мають схожу бактеріальну спільноту (з домінуванням LAB), але дріжджова спільнота може суттєво відрізнятися (молочний кефір містить переважно несахароміцетні дріжджі).

Tibicos традиційно виробляється в домашніх умовах, і на сьогоднішній день не розроблено ні промислового процесу, ні певних штамів заквасок. Як і походження зернових, споживання кефіру традиційно високе в Південній Америці, Східній Європі та Росії.

Екзометаболіти – це низькомолекулярні біологічні речовини, що виділяються живими організмами у зовнішнє середовище в процесі їхнього метаболізму при житті та після їхньої смерті. Ці речовини відіграють важливу роль в обміні інформацією та інших функціях у міжклітинних та у міжорганізмових процесах та мають безліч різноманітних корисних властивостей для людини. Одним із джерел екзометаболітів є симбіотичні мікробні спільноти, що утворюють зооглеї. Існує велика кількість

екзометаболітів, вони різняться за хімічною структурою, функціональними властивостями та біологічними активностями. Екзометаболіти включають у себе різноманітні амінокислоти, ферменти, ліпіди, вуглеводи, фенольні сполуки та багато інших біохімічних речовин.

Симбіотичні спільноти, що формують *Oryzomyces indicis* або рисовий гриб, є особливо цінними джерелами екзометаболітів. Ці спільноти становлять складні системи, в яких мікроорганізми взаємодіють між собою та з довкіллям. Екзометаболіти можуть мати важливі функції в екологічних процесах, таких як циклізація елементів, регулювання популяцій та взаємодія з іншими організмами.

«Рисовий гриб» – це симбіотична культура бактерій і дріжджів, вбудована в матрицю з полісахаридної біоплівки, як правило, декстрану, що виробляється бактеріями. *Lactobacillus* і *Leuconostoc* є основними родами бактерій, що зустрічаються в Tіbicos, а також дріжджі *Candida*, *Rhodotorula*, *Brettanomyces* і *Saccharomyces*.

Дріжджі є частиною переважаючих мікроорганізмів у ферментованих продуктах харчування, що є безпечним історичним використанням людиною, і мають велике значення в шлунково-кишковому тракті, хоча і зустрічаються в невеликих кількостях.

Saccharomyces boulardii - єдині дріжджі, які визнані пробіотиками, і використовуються для нормалізації кишкової мікробіоти у пацієнтів із захворюваннями кишечника. Цей вид генетично дуже близький, але метаболічно відрізняється від *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* має пробіотичні характеристики, такі як антагоністична взаємодія з патогенами, на додаток до виживання в кишковому тракті.

Деякі штами *S. cerevisiae* також продаються як дієтичні добавки через їх високий вміст поживних речовин і мінералів. Ці характеристики вказують на те, що *S. cerevisiae* є хорошим кандидатом для використання в якості пробіотика. А Tіbicos може бути перспективним джерелом нових мікробних штамів, які можуть бути використані як пробіотики [16].

1.3.1. Склад *Oryzomyces indica*.

Молочнокислі бактерії родів *Lactobacillus*, оцтовокислі бактерії родів *Acetobacter* та дріжджі *Saccharomyces* є основними мікроорганізмами, що входять до складу цукрового рисового гриба. Крім того, деякі види часто зустрічаються в зерні, але те, які види домінують, залежить від географічного походження зерна та субстрату для ферментації. Розглянемо компоненти більш детально:

Saccharomyces boulardii: Серед досліджених пробіотичних дріжджів *Saccharomyces boulardii* є найбільш поширеним і широко вивченим видом, який має значні пробіотичні властивості. *S. boulardii* - мезофільні та непатогенні дріжджі, які також метаболічно та фізіологічно відрізняються від *S. cerevisiae* через свою стійкість до низького рН та толерантність до жовчних кислот. Ці пробіотичні дріжджі можуть рости в діапазоні рН від 2,0 до 7,0 [17]. Пробиотики повинні бути здатні виживати в несприятливих умовах. Оптимальна температура росту *S. boulardii* відповідає температурі тіла людини (37 °C), тоді як *S. cerevisiae* оптимально росте при 30 °C. *S. boulardii* також більш стійкий до дуже високих температур, зберігаючи 65% життєздатності через одну годину при 52 °C, тоді як *S. cerevisiae* втрачає життєздатність до 45%, що робить його дуже зручним компонентом [18].

Saccharomyces cerevisiae: Також широко відомі як пекарські або пивні дріжджі це вид дріжджів, які широко використовуються в різних галузях промисловості. Це еукаріотичний одноклітинний гриб, що належить до порядку *Saccharomycetales*, субфілуму *Ascomycetes* [19]. У випадку *Saccharomyces cerevisiae* екзометаболіти - це побічні продукти метаболізму, які дріжджі виробляють і виділяють за межі клітини під час процесів росту та ферментації. Ці екзометаболіти включають органічні кислоти, спирти, ефіри та інші сполуки, які впливають на смак, аромат та інші характеристики ферментованих продуктів. Крім того, *Saccharomyces cerevisiae* також використовується у виробництві біологічно активних

метаболітів, які мають потенційне застосування у фармацевтичній та медичній промисловості [20, 21].

Zygosaccharomyces fermentati: це вид дріжджів, який бере участь в утилізації цукру. Цей вид здатний виробляти позаклітинні ферменти, які можуть розщеплювати складні вуглеводи [22].

Candida: це вид дріжджів, які зазвичай мешкають в організмі. Ці дріжджі можуть розростатися і потенційно викликати інфекції, коли існує дисбаланс у здоровій популяції бактерій і дріжджів [23].

Lactobacillus fermentum: це грампозитивна бактерія, що належить до роду *Lactobacillus*, і, за багатьма даними, посилює імунологічну відповідь, а також запобігає позалікарняним шлунково-кишковим інфекціям та інфекціям верхніх дихальних шляхів. Крім того, штами *Lb. fermentum* виробляють різноманітні та потужні антимікробні пептиди, які можуть застосовуватися як харчові консерванти або як альтернатива антибіотикам [24]. *Leuconostoc lactis* — це стійкий до глікопептидів, але чутливий до ампіциліну грампозитивний факультативно-анаеробний кок, який міститься в продуктах харчування, включаючи молочні продукти, овочі та вино. *L. lactis* є дуже рідкісним збудником, пов'язаним з інфекціями кровотоку [25].

Acetobacter - це мати оцту, що живе на гідрогелі на основі целюлози, який зазвичай плаває на поверхні вина і перетворює етанол в оцтову кислоту за допомогою кисню [26].

Екзометаболіти *Oryzomyces indic*

Завдяки складному складу й унікальним умовам симбіотичного співіснування, «рисовий гриб» продукує широкий спектр екзометаболітів, що мають різноманітні корисні властивості [9].

До основних екзометаболітів, що виділяються *Tibicos*, належать:

- 1) органічні кислоти, такі як оцтова кислота, молочна кислота та глюконова кислота;
- 2) вітаміни: групи В (В1, В2, В3, В6, В12), С та фолієва кислота;

- 3) амінокислоти: глютамінова кислота, лізин, лейцин, ізолейцин;
- 4) поліфеноли: катехіни, епікатехіни, галова кислота;
- 5) ферменти: целюлази, ксиланази, протеази;
- 6) антибіотики: целлобіон-ліпіди, устілагінові глікозиди;
- 7) екзополісахариди, що продукуються *Lb. hilgardii* та *Lb. Nagelii*.

Склад екзометаболітів варіюється залежно від складу поживного середовища, умов ферментації та співвідношення різних мікроорганізмів у зооглеї.

1.3.2. Властивості та застосування екзометаболітів Tibicos.

Екзометаболіти, що продукуються Tibicos, мають багато корисних властивостей, що роблять їх цінними у різноманітних сферах застосування.

1. Антиоксидантна активність:

Поліфеноли, вітаміни та органічні кислоти, присутні в екзометаболітах Tibicos, виявляють потужну антиоксидантну дію, здатну нейтралізувати вільні радикали та захищати клітини від окисного стресу [27].

2. Антимікробна активність:

Деякі екзометаболіти, такі як органічні кислоти та антибіотики, пригнічують ріст патогенних мікроорганізмів, завдяки цьому вони стають перспективними для використання в харчовій промисловості та медицині.

3. Імуномодуюча дія:

Вітаміни, амінокислоти та інші сполуки в екзометаболітах Tibicos стимулюють імунну систему організму, підвищуючи опірність до інфекцій.

4. Протизапальна дія:

Поліфеноли та органічні кислоти, присутні в екзометаболітах, здатні знижувати запалення в організмі, це використовується для лікування різноманітних запальних захворювань.

5. Антидіабетична активність:

Деякі дослідження показують, що екзометаболіти *Tibicos* можуть регулювати рівень цукру в крові та сприяти зниженню ризику розвитку діабету.

6. Застосування в харчовій промисловості:

Екзометаболіти *Tibicos* можуть використовуватися як природні консерванти, підсолоджувачі, ароматизатори та збагачувачі харчових продуктів.

7. Косметичне застосування:

Антиоксидантні та протизапальні властивості екзометаболітів *Tibicos* роблять їх перспективними інгредієнтами для косметичних засобів, таких як креми, маски та тоніки. Проте, властивості та застосування екзометаболітів *Tibicos* потребують подальших досліджень, проте їхній потенціал у сфері біотехнології є досить вагомим.

1.4.4. Молочнокислі бактерії

Найчастіше ідентифіковані види молочнокислих бактерій в рисовому грибі включають *Lb. hilgardii* і *Lb. nagelii*, за ними йдуть *Lb. casei* і *Lb. Paracasei*, *Lb. hilgardii* та *Lb. nagelii* є ключовими видами лактобактерій у зернових спільнотах *Tibicos*, зокрема завдяки виробленню ними екзополісахаридів (ЕПС або EPS).

Розглянемо роль та різноманітність екзополісахаридів, що продукуються молочнокислими бактеріями, що показано на рисунку 1.1. Основним α -глюканом у водному кефірному зерні є декстран - полісахарид, який містить переважно α -(1 $\rightarrow$ 6) зв'язані глюкозильні одиниці. Декстран продукується низкою видів LAB, які зазвичай асоціюються із зернами рисового гриба, причому більшість (приблизно 81%) представників видів *Lb. hilgardii*, *Lb. nagelii*, *Lb. hordei*, *L. mesenteroides* і *L. citreum* продукують ЕПС. Цей екзополісахарид виробляється позаклітинно з сахарози під дією секретованого ферменту, відомого як глікансукраза. Ці глікансукрази можуть вільно вивільнятися в навколишнє середовище (наприклад,

розчинна глюкансукраза) або залишатися зв'язаними в клітині (наприклад, зв'язана глюкансукраза).

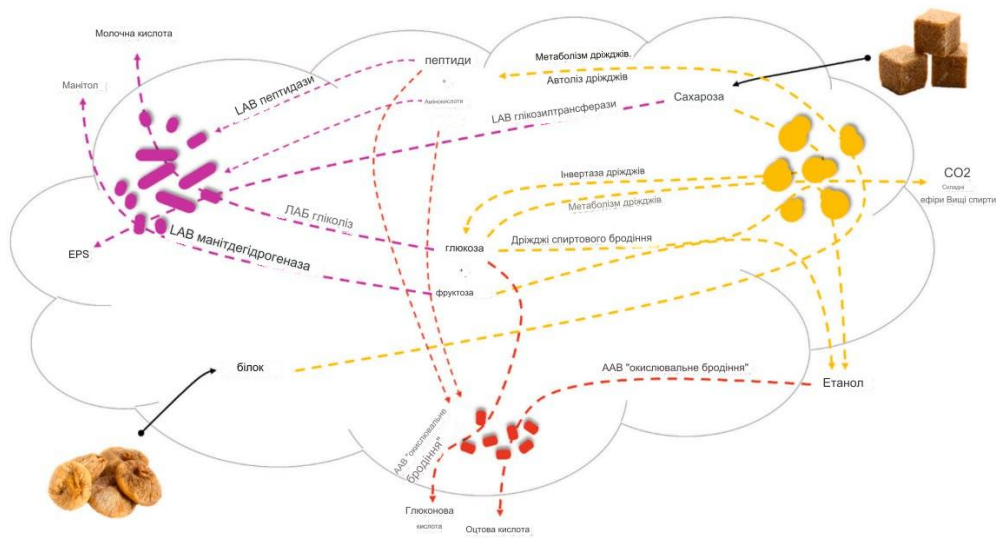


Рисунок 1.1. Первинні метаболіти та взаємодія мікробіоти водного кефіру.

Виробництво декстрану, ймовірно, є нішевою адаптацією до середовища з високим вмістом сахарози, характерним для рисового гриба. Ізолят *Lb. hordei* з водного кефіру кодує сахарозоспецифічну фосфотрансферазну систему (PTS) та позаклітинну глікозилтрансферазу (декстраназу) – дві системи, які забезпечують утилізацію сахарози, і обидві з яких були відсутні у штаму *L. hordei*, ізольованого з ячменю.

Відомо, що LAB продукують різні типи глюкану, які відрізняються за такими характеристиками, як конформація глікозидного зв'язку, відсоткове співвідношення різних зв'язків (наприклад, α -(1 $\rightarrow$ 6), α -(1 $\rightarrow$ 3)) та наявність або відсутність і розташування відгалужень.

Різні ізоляти водного кефіру LAB виробляють структурно різні декстриани, і цілком ймовірно, що навіть в межах одного зерна декстриани з різними характеристиками виробляються різними членами. У контексті «морського рису» розчинність декстрану у воді має важливе значення, і очевидно, що нерозчинний декстран є основним структуроутворюючим компонентом, на якому знаходиться біоплівка дріжджів і бактерій.

Інші α -глюкани, включаючи декстран, також відіграють важливу роль у формуванні біоплівки, наприклад, мутан, що виробляється *Streptococcus mutans* у зубному нальоті. Мутан називають нерозчинним у воді аналогом декстрану; ця нерозчинність пояснюється відносною більшою часткою α -(1 $\rightarrow$ 3) зв'язків у ньому порівняно з розчинним декстраном.

Однак нерозчинні α -глюкани, описані як декстран, також були виявлені у рисовому грибі, і, таким чином, різниця між декстраном і мутаном на основі розчинності чи нерозчинності не є такою чіткою.

Існує припущення, що умови культивування та компоненти середовища або мікросередовище кефірного зерна можуть впливати на активність декстрануклеази і, таким чином, на характеристики продукованого глюкану. Такі нішеві ефекти не були б присутні під час чистого культивування штаму і могли б по-різному впливати на активність декстрануклеази та характеристики або пропорції (співвідношення розчинних і нерозчинних) глюканів, що утворюються [15].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ I

Екзометаболіти *Oryzomyces indicis* доволі перспективне джерело різноманітних біологічно активних сполук. Завдяки симбіотичній взаємодії мікроорганізмів у складі зооглеї, *Tibicos* продукує широкий спектр екзометаболітів, таких як органічні кислоти, вітаміни, амінокислоти, поліфеноли, ферменти та антибіотики.

Ці екзометаболіти виявляють антиоксидантну, антимікробну, імуномодулюючу, протизапальну та антидіабетичну активність, що дозволяє їх застосування в різноманітних сферах, зокрема в харчовій промисловості, медицині та косметології.

Подальші дослідження екзометаболітів *Tibicos* дозволять краще зрозуміти їхні властивості та механізми дії, а також розробити ефективні способи їх отримання та застосування в біотехнологічних процесах [28].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Культивування полікультури *Oryzomyces indicī*

Зерна «рисового грибу» (Tibicos) зібрані різними штамами мікробів, прикріплених до полісахаридного каркасу, що складається з білих прозорих частинок. Ці мікроби включають бактерії та дріжджі, які генерують органічні кислоти та певний інтерградієнт, що може покращити стан здоров'я людей.

Тібікос є по всьому світу, але через кліматичні умови в різних регіонах знаходження відрізняється метод його культивування. «Рисовий Гриб» показав дуже високу можливість пристосовуватись до навколишнього середовища завдяки змішаному бактеріальному складу [29].

Зерна Tibicos – це желатинові структури діаметром від 5 до 20 мм і неправильної, схожої на цвітну капусту форми. На рисунку 2.1.1. показано зображення скануючої електронної мікроскопії типового зерна Tibicos.

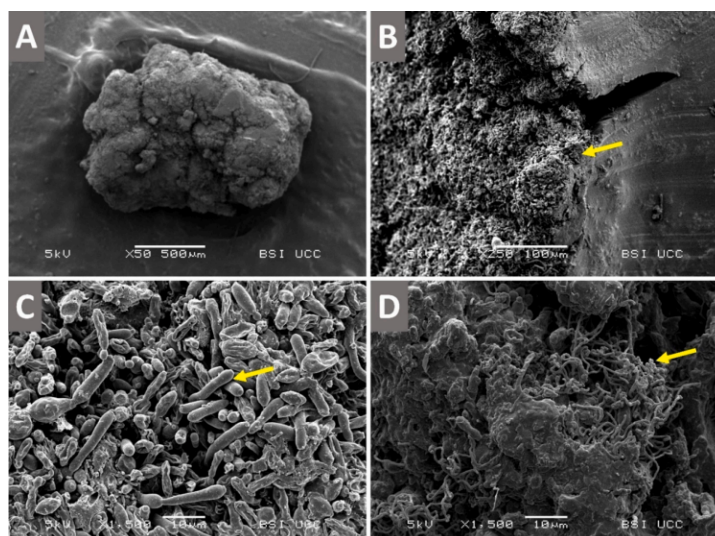


Рисунок 2.1.1. Електронної мікроскопії, де : А - зерно $\times 50$; В - зріз зерна з оголеною внутрішньою поверхнею (гладка ділянка) та мікроорганізмами на зовнішній поверхні $\times 250$; С - паличкоподібні та видовжені дріжджові клітини на поверхні $\times 1500$; D - бактерії палички на поверхні $\times 1500$

Приблизний вміст сухої речовини в зернах може варіюватися від 10 до 14% (мас.). Схему загального процесу виробництва водного кефірного

напою представлено на рисунку 2.1.2. Ферментація, як правило, відбувається спонтанно, коли закваску поміщають у сахарозне середовище з додаванням або без додавання сухофруктів або фруктових екстрактів. Ферментацію проводять при температурі від 21 до 30°C протягом 4-8 днів. Зерна рисового гриба можуть бути вилучені з ферментованої рідини і, по суті, повторно використані до нескінченності, якщо помістити їх у свіже цукрово-водне середовище.

Столовий цукор або коричневий цукор є найбільш поширеним джерелом вуглецю, тоді як свіжі або сушені фрукти додають як джерело азоту. Найчастіше з цією метою додають свіжий або сушений інжир, іноді з додаванням скибочок лимона.



Рисунок 2.1.2. Етапи виробництва традиційного «рисового гриба».

Приготування екстрактів фруктів замість додавання цілих фруктів може бути бажаним; такі екстракти можна приготувати стандартизованим способом, і їх можна пастеризувати. В іншому випадку, залежно від типу

фруктів, способу їх обробки (наприклад, сушіння), способу пакування (наприклад, з використанням консервантів або без них) та процесу виробництва Tibicos (наприклад, ошпарювання фруктів під час приготування), можливе потрапляння (потенційно небажаних) мікроорганізмів з фруктів до Tibicos, наприклад, ентеробактерій та/або синьогнійної палички. Екстракт інжиру використовувався в ряді наукових досліджень.

Для Tibicos, виготовленого в домашніх умовах, ферментація вважається завершеною після досягнення бажаного рівня кислотності. Під час експериментальних досліджень або в напівпромислових масштабах зазвичай вимірюють такі параметри, як рН, ТТА, концентрацію цукру (часто шляхом вимірювання густини) та спирту. Крім того, особливо в наукових дослідженнях, окремі органічні кислоти і цукор можуть бути виміряні за допомогою високоефективної рідинної хроматографії або високоефективної аніонообмінної хроматографії. Смакові та ароматичні сполуки можуть бути визначені за допомогою газової або рідинної хроматографії в поєднанні з мас-спектроскопією (GC-MS або LC-MS) [15].

2.2. Субстрати та фактори, що впливають на характеристики ферментації.

Існує багато інших потенційних джерел вуглецю та/або азоту, які можуть бути використані у виробництві водного кефіру, наприклад: цибуля, боби, імбир, фенхель, морква, кокос, томати, полуниця, диня, гранат, ківі, айва, яблука або мед; однак найчастіше використовується свіжий або сушений інжир. Інжир забезпечує найбільш оптимальне бродіння порівняно з іншими фруктами.

Було помічено, що відсутність інжиру значно сповільнює споживання глюкози і, таким чином, швидкість бродіння, в той час як заміна його іншими сухофруктами, а саме родзинками, фініками і сливами, змінює ферментацію і швидкість утворення молочної та оцтової кислоти. Крім того, приріст маси зерна за 18 днів значно зменшується (від 1 до 4% проти 70%)

у всіх середовищах, крім середовища, що містило інжир. Крім того, розмноження зерна було значним у присутності інжиру, але нижчим у присутності бананів, родзинок, слив, абрикосів, картоплі та моркви, і не відбувалося у присутності яблук, пастеризованого виноградного соку або молока.

Потенційним фактором, що стимулює ріст, є кальцій. Буферна здатність і вміст кальцію впливають на характеристики ферментації, зокрема на ріст зерен (збільшення маси). Вища буферна ємність і концентрація кальцію у воді, що використовується для ферментації, сприяють прискореному зростанню. Коли буферна ємність та/або вміст кальцію нижче певного рівня, значення рН стають значно нижчими, навіть на початку ферментації (приблизно 3,3 проти 3,6), а ріст закваски зменшувався через процес зворотного скочування.

Таблиця 2.2.1.
Вміст кальцію в різних потенційних субстратах

Продукт	Кількість кальцію (мг/100 г)
Інжир, сушений	162
Інжир	35
Кишмиш	50
Абрикос, сушений	55
Банан	5
Яблуко	6
Слива	6
Картопля, з шкіркою	30
Морква	33
Виноградний сік, 100%	11

Причиною низького росту зерен було припущено надмірний кислотний стрес через стабільно низький рН. Крім того, низький рівень рН пригнічує виробництво і, потенційно, активність глюкансукраз LAB, таким чином запобігаючи утворенню глюкану і пов'язаному з ним росту. Позитивний ефект кальцію може бути зумовлений його впливом на стимулювання активності глюкансукрази. Як видно з таблиці 1, сушений інжир має найвищий вміст кальцію; однак, що цікаво, сирий інжир не містить значно

вищого вмісту кальцію, ніж деякі альтернативні фрукти. Тому, враховуючи

позитивний вплив буферної здатності та вмісту кальцію на ферментацію та ріст зерна, необхідно враховувати характеристики води, що використовується для ферментації; таким чином, очікується, що жорстка вода, яка містить більший вміст іонів кальцію та магнію, є більш придатною для ферментації.

Хоча фрукти, такі як інжир та різні альтернативні продукти, зазвичай використовуються як субстрати для ферментації, були випробувані й інші субстрати, включаючи овочі, такі як морква, імбир, фенхель та цибуля, молочні субстрати, такі як коров'яче та козяче молоко, та замінники молока, такі як соя.

Наприклад, у південноамериканських країнах популярний напій «Тепаче», що складається з коричневого цукру, ананаса та кориці і ферментується «рисовим грибом». Важливо, і як вже обговорювалося, походження зерна і, як наслідок, використовуваний субстрат (джерела вуглецю та азоту) можуть суттєво впливати на різноманітність і домінуючі штами, що складають певну водно-кефірну ферментацію.

Оцтовокислі бактерії присутні як в анаеробних (використання повітряного затвору для виключення доступу кисню), так і в аеробних (муслінова тканина, що забезпечує повітрообмін) умовах; в аеробних умовах оцтовокислі бактерії були більш численними. Основними виявленими видами були *A. fabarum*, *G. roseus/oxydans* та *A. indonesiensis*. *G. roseus/oxydans* і *A. indonesiensis* були більш поширеними в анаеробних умовах ферментації, тоді як *A. fabarum* був більш поширеним в аеробних умовах.

Розмноження оцтовокислих бактерій призводило до високих концентрацій оцтової кислоти та низьких значень рН, що супроводжувалося поступовим зменшенням росту зерен протягом періоду зворотного спуску, що, ймовірно, пов'язано з надмірним кислотним стресом, як обговорювалося раніше. Крім того, поширення видів оцтовокислих бактерій

в аеробній ферментації корелювало з вищими концентраціями етилацетату та нижчими концентраціями фруктових ефірів.

Низькі концентрації поживних речовин (тобто без додавання сушеного інжиру) спричиняють повільну ферментацію та високі загальні концентрації залишкових вуглеводів, низькі концентрації метаболітів та високі значення рН. Крім того, спостерігається повільне і поступове зменшення росту зерна протягом циклів зворотного осадження. Низькі концентрації поживних речовин також супроводжуються високою кількістю життєздатних видів оцтовокислих бактерій, що, ймовірно, було спричинено обмеженням виділенням кисню через низьку метаболічну активність (і низьке виробництво CO₂) ферментативних мікроорганізмів.

На противагу цьому, високі концентрації поживних речовин (наприклад, додавання одного або двох сушених плодів інжиру) спричиняють швидку ферментацію і високу концентрацію метаболітів без зниження загальної концентрації залишкових вуглеводів або значень рН. Це, ймовірно, пов'язано з наявністю достатньої кількості вуглеводів і буферних сполук, які забезпечують високі концентрації метаболітів без значного падіння загального вмісту вуглеводів або рН, що спостерігалось для сушеного інжиру.

Концентрація поживних речовин впливає на різноманітність і домінуючі види у ферментації – високі концентрації поживних речовин сприяли росту дріжджів і збільшують відносну чисельність *Lb. nagelii* і *S. cerevisiae*; навпаки, низькі концентрації поживних речовин сприяли домінуванню *Lb. hilgardii* і *D. bruxellensis*.

Високі концентрації поживних речовин призвели до низького співвідношення концентрацій оцтової кислоти до етанолу та оцтової кислоти до молочної кислоти, що відображає зміну видового різноманіття. Що стосується конкретного джерела поживних речовин, сушений інжир, курага та родзинки призводять до стабільного водно-кефірного бродіння, але свіжий інжир або суміш дріжджового екстракту та пептону – ні.

Низькі значення рН спостерігаються з самого початку ферментації дріжджового екстракту з пептоном, але не через високу концентрацію кислоти, а через низьку буферну здатність. Таким чином, ріст зерна поступово зменшується протягом цих циклів зворотного осадження.

Ферментація із сушеними родзинками призводить до високих загальних концентрацій залишкових вуглеводів, низьких концентрацій метаболітів, таким чином, нагадуючи ферментацію з низькими концентраціями поживних речовин.

На відміну від цього, ферментація зі свіжим інжиром або дріжджовим екстрактом-пептоном призводить до низьких загальних залишкових концентрацій вуглеводів, але високих концентрацій метаболітів, що нагадує ферментацію з високими концентраціями поживних речовин.

Тому субстрат, що використовується, та умови ферментації слід ретельно розглядати з огляду на потенційний вплив на те, які види переважають, і, як наслідок, на кінцеві характеристики напою з точки зору вироблених метаболітів та їх концентрації; тим не менш, така пластичність може бути використана з позитивним ефектом для виробництва різноманітного асортименту напоїв з різноманітними смаковими та ароматичними властивостями.

2.3. Проблеми

Збільшення масштабів виробництва пов'язане з проблемами, які обмежують промислове виробництво «рисового гриба». До них відносяться нестабільні процеси ферментації, що призводять до отримання напою різної якості і часто низький ріст кефірного зерна, що перешкоджає збільшенню масштабів виробництва.

Було проведено одне з небагатьох досліджень так званого промислового процесу виробництва водного кефіру (періодична ферментація в 6-літрових ємностях). Ця ферментація страждала від нестабільності та незначного росту зерен, причому зерна були дрібними та

пошкодженими порівняно із зернами, що використовуються в типовому домашньому виробництві.

Компанія зберігала свої запаси зерна при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, і оскільки зерна «рисового грибу» на 86 - 90 % складаються з води, було припущено, що заморожування і розморожування незворотно пошкоджують структуру зерна та/або пов'язані з ним мікроорганізми, які не відновлюються навіть після послідовного зворотного відтавання.

Крім того, для виробництва водного кефіру використовували демінералізовану воду. Демінералізована вода не має буферної здатності через видалення іонів. Таким чином, незважаючи на зниження рН, рівень вироблених кислот був нижчим, ніж очікувалося. Низький ріст кефірної закваски пов'язаний з використанням води з низькою буферною здатністю (та/або низькою концентрацією кальцію).

Висока кількість життєздатних мікробів була пов'язана з повільно зростаючими зернами – існує гіпотеза, що менший розмір повільно зростаючих зерен призводить до більшої площі поверхні для мікробної колонізації, на додаток до більшої кількості загальної залишкової глюкози, оскільки вона не секвеструється у процесі виробництва глюкану (через зниження активності глюкансукрази).

Було висловлено припущення, що повільне протікання ферментації в цьому випадку є наслідком використання високої концентрації сахарози (приблизно 25% (мас.) порівняно з зазвичай 8-10% (мас.)) і пов'язаного з цим впливу осмотичного тиску на мікроорганізми. Крім того, ці промислові ферментації проводилися в основному аеробним способом, з мусліновою тканиною, що вкривала ферментаційні контейнери. Це знайшло своє відображення у високій поширеності оцтовокислих бактерій. Нарешті, було помічено, що період зберігання або відпочинку при низькій температурі ($8\text{ }^{\circ}\text{C}$), який використовувався як регулятор попиту на напої, призводить до тривалого часу затримки в подальшій виробничій ферментації [15].

2.4. Розробка ідентифікованих заквасок

Використання ідентифікованих заквасок для виробництва водного кефіру не було широко вивчено і, наскільки відомо, в даний час широко не застосовується у виробництві рисового гриба; таким чином, основним методом виробництва залишається зворотне перенесення зерен з однієї ферментації в іншу.

З цією метою багато досліджень були зосереджені на рекомбінації ізольованих, визначених штамів з метою відтворення гранул водного кефіру. Однак ці зусилля здебільшого не привели до відновлення гранул. Незважаючи на це, було запропоновано мінімальний та ефективний консорціум для ферментації, що складається з *Lb. hilgardii*, *S. cerevisiae* та *A. tropicalis*. Було запропоновано наступні метаболічні взаємодії: початкове продукування спирту *S. cerevisiae*, за яким слідувало продукування молочної та оцтової кислот через 24 години *Lb. hilgardii* та *A. tropicalis*, відповідно; в подальшому оцтова кислота накопичувалася за рахунок утилізації етанолу *A. tropicalis* (рис. 2.4.1.).

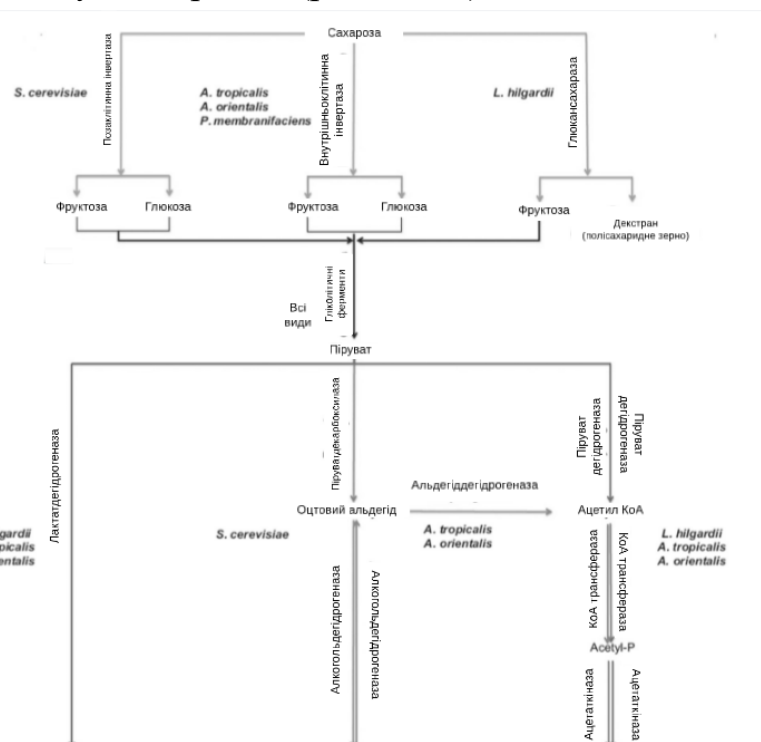


Рисунок 2.4.1. Гіпотетичний потік вуглецю під час ферментації «рисового грибу» з сахарози

2.5. Відокремлення та зберігання екзометаболітів *Oryzomyces indica*

Відокремлення дріжджових клітин від бактерій має вирішальне значення для ефективного виділення та зберігання екзометаболітів *Oryzomyces indica*. Дріжджі - це еукаріотичні одноклітинні мікроорганізми, які мають більший розмір порівняно з бактеріями, тому для забезпечення чистоти та життєздатності бактеріальної культури необхідні ефективні методи розділення. Перспективним методом для цього є фільтрація, яка дозволяє фізично відокремити частинки різного розміру, такі як дріжджові клітини та бактерії [30]. Використовуючи методи фільтрації, дослідники можуть досягти більш точного і контрольованого процесу розділення, що дозволяє виділити екзометаболіти *Oryzomyces indica*, зберігаючи при цьому життєздатність бактеріальної культури [31].

Методи фільтрації пропонують універсальний підхід до виділення екзометаболітів *Oryzomyces indica* шляхом ефективного видалення дріжджових клітин зі збереженням життєздатності бактерій. Цей метод передбачає застосування різниці тиску на фільтруючому матеріалі для розділення частинок на основі їхніх фізичних властивостей, таких як розмір і форма [32]. Підбираючи відповідні мембранні фільтри та оптимізуючи умови фільтрації, дослідники можуть вибірково відокремлювати дріжджові клітини від бактерій, забезпечуючи чистоту бактеріальної культури. Більше того, використання фільтрації в цьому контексті не тільки допомагає в процесі розділення, але й сприяє підтримці стерильності та запобіганню контамінації, що є важливими аспектами при роботі з культурами мікроорганізмів у дослідницьких або промислових цілях [33].

Щоб зберегти життєздатність бактерій і одночасно ефективно видалити дріжджові клітини в процесі сепарації, можна застосовувати різні стратегії фільтрації. Для досягнення бажаного результату можна використовувати такі методи, як розділення за допомогою відцентрової

сили, середовища з низьким рівнем рН або спеціальні фільтри, засновані на принципах виключення розмірів [34].

Ретельно підбираючи відповідний метод і параметри фільтрації, можна забезпечити успішне відокремлення дріжджових клітин від бактерій, тим самим підвищуючи якість і чистоту виділених екзометаболітів *Oryzomyces indicī*. Такий точний і контрольований підхід до розділення і зберігання має важливе значення для застосування в біотехнології, процесах ферментації і дослідженнях, де присутність дріжджових клітин може перешкоджати досягненню бажаних результатів.

Розробка ефективних методів виділення та зберігання екзометаболітів має вирішальне значення для поглиблення нашого розуміння мікробного метаболізму та використання їхнього потенціалу для майбутнього застосування [35, 36].

Після того, як екзометаболіти *Oryzomyces indicī* сконцентровані шляхом фільтрації, для збереження їхньої стабільності та цілісності для подальшого використання важливим є належне зберігання. Концентровані зразки екзометаболітів можна зберігати в герметичних контейнерах або флаконах, щоб запобігти забрудненню та деградації. Бажано зберігати зразки при відповідних температурах і умовах, щоб забезпечити їх довгострокову стабільність. Впроваджуючи відповідні практики зберігання, дослідники можуть ефективно зберігати концентровані екзометаболіти *O. indicī*, що дозволить проводити тривалі аналізи та експерименти.

2.6. Включення екзометаболітів *Oryzomyces indicī* у космецевтичні засоби.

Хоча ефективність космецевтичної продукції має першорядне значення для її сприйняття та комерційної життєздатності, це лише один з факторів, що визначають комерційний успіх. Опитування показують, що старіння сприймається споживачами як головна проблема, а догляд за шкірою є найпопулярнішим методом немедичного втручання.

Японія, зокрема, є великим споживачем косметики, оскільки як антивікова косметика, так і косметика, що претендує на протизапальні, антиоксидантні та відбілюючі властивості, дуже популярна серед споживачів цієї країни. Популярність цих продуктів, схоже, значною мірою зумовлена бажанням старіючого населення користуватися продуктами, здатними зберегти молодість шкіри.

Аналогічно, засоби для освітлення шкіри дуже популярні в Азії, і очікується, що світовий попит на них сягне 23 мільярдів доларів США на рік, що частково зумовлено чутливістю шкіри у жінок африканського та азійського походження. Таким чином, *Oryzamyces indicis* як наш попередній матеріал для тестування косметичних інгредієнтів та його потенціал як активного інгредієнта в засобах по догляду за шкірою може становити комерційний інтерес.

2.6.1. Оцтова кислота. Почнемо з оцтової кислоти, це одна з найпростіших карбонових кислот, що містить лише два атоми вуглецю. Вона має фундаментальне значення для метаболізму вуглеводів і жирів усіх живих клітин, беручи участь в утворенні ацетил-КоА - проміжної сполуки в циклі Кребса, куди вона транспортує ацетильні групи для виробництва енергії.

Використання оцту для лікування шкірних захворювань і ран сягає корінням у часи Гіппократа. Оцет є популярним домашнім засобом, а веб-сайти заохочують пацієнтів використовувати його для лікування різноманітних дерматологічних захворювань, таких як акне, екзема та грибок нігтів на ногах. Дерматологам важливо бути обізнаними з доказами, що підтверджують користь оцту, а також з потенційними побічними ефектами, щоб ефективно консультивати пацієнтів. Роздивимось докази застосування оцтової кислоти в лікуванні деяких шкірних захворювань, включаючи бактеріальні та грибкові інфекції, бородавки, дерматити та травми від опіків будь якого походження.

Антимікробні властивості оцтової кислоти були продемонстровані в численних дослідженнях *in vitro*. Вона має бактеріостатичну активність у концентрації 0,1% і бактерицидну активність у концентраціях від 2,5 до 10%, хоча механізм бактерицидної дії до кінця не вивчений. Недисоційований оцет може спричиняти накопичення жирних кислот і, як наслідок, руйнування клітинних мембран, зміну гомеостазу pH і пригнічення вуглеводного обміну в клітинах.

При застосуванні протягом 20-30 хвилин 5 і 10% концентрації оцтової кислоти призводили до значного зменшення життєздатних штамів *M. tuberculosis*, що свідчить про те, що засоби з оцтовою кислотою можна використовувати як недорогі і нетоксичні протимікробні засоби, особливо в районах, де немає доступу до дорожчих продуктів.

Антимікробна здатність оцтової кислоти проти *Escherichia coli* (5% кислотності), *Staphylococcus aureus* (2,5% кислотності) та *Candida albicans* (0,1% кислотності) обмежувала ріст і нагадувала антибіотикоподібний механізм дії, зменшуючи запалення та регулюючи фагоцитарну здатність моноцитів. Було показано, що оцтова кислота в концентрації 0,5% пригнічувала 100% досліджуваних ізолятів кишкової палички, синьогнійної палички, золотистого стафілокока і *Candida albicans*.

Ці дослідження вивчали антимікробну дію оцту *in vitro* і підкреслили його універсальність як засобу для лікування широкого спектру інфекцій. Подальші дослідження *in vivo* необхідні для підтвердження корисності оцту в клінічній практиці.

У 100 пацієнтів з діабетичними і недіабетичними постінфекційними ранами (включаючи рани, спричинені травмами, опіками, венозними виразками та інфікованими трансплантатами) щоденне використання засобу з оцтовою кислотою впродовж 7-21 дня запобігало розмноженню бактерій і грибків та призвело до зменшення розміру рани і запалення.

Аналогічно, застосування марлі, змоченої 1% оцтовою кислотою двічі на день, значно скоротило тривалість лікування, необхідного для усунення

Pseudomonas aeruginosa з ран 32 пацієнтів, в середньому на сім днів у порівнянні з контрольною групою, яка отримувала фізіологічний розчин [34].

2.6.2. Молочнокислі бактерії. Молочнокислі бактерії корисні для здоров'я людини. Вони мають широке застосування в харчовій, косметичній та медичній промисловості завдяки тому, що вони є загальноновизнано безпечними і мають безліч терапевтичних і функціональних властивостей.

Попередні дослідження повідомляли про позитивний вплив молочнокислих бактерій, їх екстрактів або ферментів на здоров'я шкіри, включаючи поліпшення стану шкіри та профілактику шкірних захворювань. Повідомлялося, що ліпотейхоева кислота, виділена з *Lactobacillus plantarum*, пригнічує меланогенез у клітинах меланоми B16F10. Зокрема, ліпотейхоева кислота також чинить антивікову дію на клітини шкіри людини, регулюючи експресію матриксної металопротеїнази-1.

Пероральне застосування *Lactobacillus delbrueckii* та інших молочнокислих бактерій пригнічує розвиток atopічних захворювань. Крім того, клінічні та гістологічні дані вказують на те, що місцеве застосування молочної кислоти ефективно для депігментації та покращення жорсткості поверхні і легкого зморщування шкіри, спричиненого фотопошкодженням навколишнього середовища.

Шкіра людини є першим захисним бар'єром від зовнішнього середовища, особливо від мікробних патогенів та фізичної стимуляції. Протягом багатьох років було опубліковано багато досліджень про здоров'я шкіри за допомогою молочнокислих бактерій, включаючи профілактику шкірних захворювань і поліпшення стану шкіри. Відомо, що LAB, основна група грампозитивних бактерій, є корисними для здоров'я людини, оскільки діють як пробіотики [37].

2.6.3. Глюконова кислота. Процедури догляду за шкірою не обходяться без ефективного відлущування для видалення відмерлих клітин і накопичень на поверхні шкіри. Однак багато людей відчують

подразнення і сухість шкіри при використанні традиційних хімічних ексfolіантів, таких як синтетичні АНА або ВНА, у своєму щоденному догляді. РНА можуть стати м'якою альтернативою для людей з більш чутливим типом шкіри. РНА, такі як лактобіонова кислота, зазвичай отримують з лактози/молока і не вважаються веганськими.

РНА - це органічні карбонові кислоти, які мають дві або більше гідроксильних груп у молекулі. Більшість РНА, біонових кислот, а також деякі АНА і ВНА з однією гідроксильною групою і двома або більше віцинальними карбоксильними групами були визнані антиоксидантами.

Глюконова кислота або РНА забезпечує веганське джерело глюконової кислоти з Tibicos, щоб покращити природну красу шкіри, сприяючи синтезу колагену та клітинному оновленню. У процесі утворюється ця органічна кислота, яка відіграє важливу роль у харчовій промисловості завдяки здатності стимулювати ріст корисних кишкових бактерій. У засобах особистої гігієни глюконова кислота пропонує властивості клітинного оновлення як більш м'яка форма хімічних ексfolіантів. Стандартизований на 18-24% глюконової кислоти, пропонує переваги натуральної, веганської полігідрокси кислоти для використання в різноманітних засобах по догляду за шкірою та волоссям голови.

РНА викликають менше подразнень у споживача, оскільки кислоти діють виключно на поверхні шкіри, не вступаючи у взаємодію з більш глибокими ділянками шкіри. Мертві клітини шкіри можуть закупорювати шкіру або пори, і в той час як шкіра природним чином проходить клітинний обмін, пілінг ефективно видаляє бар'єр з мертвих клітин, відкриваючи шлях до більш ефективного догляду за шкірою і більш яскравого кольору обличчя.

Як РНА, глюконова кислота взаємодіє з клітинами на поверхні шкіри, стимулюючи клітинне оновлення, розчиняючи зв'язки, що утримують мертві клітини шкіри разом. Таке розщеплення прискорює усунення відмерлих клітин шкіри, що дозволяє нижнім шарам епідермісу прискорити

процес оновлення тканин. Вибіркове використання зерен водного кефіру сприяє створенню веганських рослинних похідних, придатних для вирішення проблем сучасного споживача [38].

2.6.4. Вітаміни групи В. Вітаміни групи В - це група водорозчинних вітамінів, що містяться в багатьох натуральних продуктах харчування і беруть участь у клітинному метаболізмі: вітамін В₁ або тіамін, вітамін В₂ або рибофлавін, вітамін В₃ або ніацин чи нікотинамід, вітамін В₅ або пантотенова кислота, вітамін В₆ або піридоксин, вітамін В₈ або біотин, вітамін В₉ або фолат, вітамін В₁₂ або кобаламін.

Серед них найбільш важливим для шкіри є вітамін В₃, який бере участь у відновленні ДНК, клітинному енергетичному обміні та регуляції процесів транскрипції. Вітамін В₃, або вітамін РР, або ніацинамід є компонентом коферментів, що беруть участь у перенесенні водню, і має численні корисні ефекти для шкіри. Місцеве застосування ніацинамідів стабілізує шкірний бар'єр, зменшуючи трансепідермальну втрату води та стимулюючи синтез білків (філагрину, кератину, інволюкрину) і керамідів, що робить його корисним у лікуванні atopічного дерматиту.

Місцеве застосування ніацинамідів збільшує синтез керамідів, вільних жирних кислот та зменшує трансепідермальну втрату води в сухій шкірі, що є основними патогенетичними факторами, які лежать в основі бар'єрного дефекту при atopічному дерматиті. Також було продемонстровано протизапальний ефект і зменшення продукції різних запальних цитокінів (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF), що обґрунтовує його застосування в лікуванні вугрів, роацеа та інших патологічних станів шкіри.

Дослідження показали зменшення дрібних зморшок, гіперпігментованих плям, червоних плям і пожовтіння шкіри, а також покращення еластичності шкіри після місцевого лікування ніацинамідом, який виявився добре переносимим і перспективним у покращенні зовнішнього вигляду старіючої шкіри обличчя. Нікотинамід безпечний, має мало побічних ефектів і не має зареєстрованих випадків тератогенності [39].

2.3.5. Вітамін С. Вітамін С, також відомий як аскорбінова кислота або L-аскорбінова кислота, є водорозчинним вітаміном з антиоксидантними властивостями, що робить його необхідним для здоров'я шкіри. Шкіра містить високу концентрацію вітаміну С (в цілому в шкірі його вміст коливається від 0,4 до 1 мг/100 г ваги вологої тканини), сконцентрованого у внутрішньоклітинних компартментах, який транспортується кровоносними судинами дермального шару.

Ефективність місцевого застосування вітаміну С залежить від складу крему або сироватки, що наноситься на шкіру, оскільки це водорозчинна молекула, яка відштовхується фізичним бар'єром від клітин епідермісу. При місцевому застосуванні 5% L-аскорбінової кислоти на передпліччях і шиї 19 пацієнтів протягом 6-місячного періоду. Через 3 місяці було помічено покращення глобальної оцінки (на основі показників зволоженості, шорсткості, в'ялості, м'якості, тонких і грубих зморшок), і вона ще більше зросла через 6 місяців. Вітамін С знижує рівень матриксних металопротеїназ (ММР), зменшуючи пошкодження колагену. У клінічних дослідженнях було показано, що розчини, які містять вітамін С, зменшують зміни тимінових димерів, індуковані УФ-променями, та утворення апоптичних клітин внаслідок сонячних опіків, що потенційно знижує ризик фотоканцерогенезу. Кілька клінічних досліджень показали, що розчини, які містять вітамін С, зменшують індуковані УФ-променями мутації димерів тиміну та утворення апоптичних клітин внаслідок сонячних опіків, захищаючи шкіру від ризику фотоканцерогенезу [40].

2.6.6. Амінокислоти. Амінокислоти є будівельними блоками всіх білків, у тому числі найпоширеніших волокнистих білків шкіри - кератинів, колагену та еластину. Провисання і зморшки - це ознаки хронічної, пошкодженої сонцем і старіння недоглянутої шкіри, і вони в основному пов'язані з погіршенням стану колагенових і еластичних волокон. Таким чином, амінокислоти суттєво впливають на зовнішній вигляд шкіри.

Амінокислоти є важливими поживними речовинами, необхідними для загоєння ран і відновлення пошкодженої шкіри, підтримання кислотно-лужного балансу і утримання води в клітинних шарах, таких як роговий шар, захисту від пошкодження сонячним світлом, підтримки відповідного мікробіому шкіри.

Глутамінова кислота сприяє зменшенню ознак старіння, ефективно збільшуючи синтез колагену, відновлюючи природний тон шкіри і покращуючи її текстуру. Також, глутамін сприяє виробленню антиоксидантів в організмі.

2.6.7. α -глюкан .Олігосахарид альфа-глюкан є корисним пребіотичним інгредієнтом, що використовується у складі засобів для догляду за шкірою. Цей олігомер глюкози, отриманий з природних цукрів, таких як мальтоза і сахароза, зазвичай складається з 2-10 цукрових одиниць і виробляється за допомогою ферментативних процесів. Відомий своїми зволожуючими властивостями, олігосахарид α -глюкан відіграє життєво важливу роль у підтримці здоров'я шкіри, сприяючи росту корисних мікроорганізмів на поверхні шкіри. Діючи як біоселективний субстрат, він допомагає підтримувати здоровий баланс мікробіому шкіри, що має важливе значення для загального стану шкіри.

Екзоолігосахарид α -глюкан сприяє здоров'ю шкіри, зменшуючи втрату води з поверхні шкіри, підвищуючи рівень зволоження та покращуючи здатність шкіри утримувати вологу. Крім того, цей α -глюкан постачає енергію для підтримки корисних бактерій шкіри, ще більше посилюючи природні захисні механізми шкіри.

Застосування олігосахариду α -глюкану в засобах для догляду за шкірою має низку переваг, які сприяють покращенню здоров'я та зовнішнього вигляду шкіри [41].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ II.

У розділі II було проведено комплексне дослідження з культивування полікультури *Oryzomyces indicī* та використання її екзометаболітів у космецевтичних засобах. Було описано субстрати та фактори, які впливають на характеристики ферментації, а також виявлені проблеми, що можуть виникнути під час процесу. Подальше дослідження включало розробку ідентифікованих заквасок для полікультури.

У розділі про включення екзометаболітів *Oryzomyces indicī* у потенційні космецевтичні засоби були розглянуті різноманітні складові, такі як оцтова кислота, молочнокислі бактерії, глюконова кислота, вітаміни групи В та С, амінокислоти і α -глюкан. Кожна з цих компонентів має потенціал використання у косметичній промисловості через свої корисні властивості для шкіри.

Загалом, результати дослідження показують перспективність використання екзометаболітів *Oryzomyces indicī* у космецевтичних засобах для поліпшення стану шкіри та її зовнішнього вигляду. Дані результати можуть бути використані для подальших досліджень у цій області та розробки нових продуктів для догляду за шкірою.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив екзометаболітів *Oryzomyces indicis* на *Candida albicans*.

Пошук нових протигрибкових засобів став одним з найважливіших викликів у зв'язку зі зростаючою проблемою грибкових інфекцій. Вивчення природних сполук, отриманих, наприклад, з бактерій, рослин чи тварин, або дослідження їхніх похідних є цінною стратегією у пошуку нових протигрибкових засобів.

Candida albicans – поширений коменсальний гриб, який колонізує ротоглотку, шлунково-кишковий та вагінальний тракт, а також шкіру здорових людей. У 50% населення *C. albicans* є частиною нормальної флори мікробіоти. Різноманітні клінічні прояви грибів роду *Candida* варіюють від локалізованих, поверхневих захворювань слизових оболонок до інвазивних захворювань, які вражають різні системи органів і становлять загрозу для життя.

Різноманітні фактори, від системних і місцевих до спадкових і екологічних, призводять до порушення нормального гомеостазу *Candida*, в результаті чого відбувається перехід від нормальної флори до патогенних і умовно-патогенних інфекцій. На зміну патофізіології виникнення та прогресування інфекції також впливають риси вірулентності *Candida*, які призводять до розвитку кандидозу.

Кандидоз порожнини рота має широкий спектр клінічних проявів і поділяється на первинний і вторинний кандидоз. Основний запас *C. albicans* в організмі знаходиться в шлунково-кишковому тракті, а розвиток інфекцій відбувається внаслідок дисбіозу резидентної мікробіоти, імунної дисфункції та пошкодження слизового бар'єру. Присутність *C. albicans* у крові асоціюється з кандидозно-інвазивними інфекціями *Candida*. Цей взаємозв'язок існує доти, доки існує баланс між імунною системою хазяїна та факторами вірулентності *C. albicans*. У цій статті представлено ознаки вірулентності *Candida albicans* та клінічні прояви специфічного кандидозу.

Збудники грибкових інфекцій, такі як *Candida albicans*, широко розповсюджені і можуть вражати шкіру та слизові оболонки, а також викликати системну інфекцію. Види *Candida* присутні у понад 400 000 системних грибкових захворювань. З усіх видів *Candida albicans* є найпоширенішим збудником інфекцій слизових оболонок і системних інфекцій, на нього припадає близько 70% грибкових інфекцій у всьому світі, саме через це необхідно розробляти новітні засоби для людей, що не мають постійного доступу до води, наприклад для військових чи людей що ходять у походи.

Кандидоз слизових оболонок має широкий спектр клінічних проявів. Вони залежать від ураженої ділянки тіла, вікової групи пацієнта та різних сприятливих факторів. Об'єднуючими клінічно значущими ознаками кандидозу є еритема, ерозії та білі бляшки, що легко знімаються.

Найпоширенішими місцями ураження є інтертригінозні зони, наприклад, підгрудні, пахові складки, міжсідничні складки та складки підколінних ямок у пацієнтів з надмірною вагою. Кандидозні інфекції проявляються різко вираженими еритематозними, іноді ерозивними плямами з легким лущенням поверхні, а також папулами-супутниками і пустулами на периферії. Ці пустули, як правило, стерильні і називаються губчастими через скупчення нейтрофілів в епідермісі.

Геніталії у чоловіків і жінок є частим місцем ураження кандидозом. Приблизно 15-30% безсимптомних жінок є вагінальними носіями *Candida spp.* Вважається, що майже кожна жінка має принаймні один випадок вульвовагінального кандидозу протягом життя. В обох статей також можливе залучення перианальної ділянки. Навіть без клінічних проявів на шкірі, локалізований свербіж геніталій та перианальної ділянки сам по собі може бути ознакою кандидозу [42].

Визнаними факторами ризику гострого кандидозного вульвовагініту є прийом естрогенів, підвищений рівень ендогенних естрогенів (наприклад,

вагітність або ожиріння), цукровий діабет, а також прийом антибіотиків широкого спектру дії і погана гігієна [43].

Згідно з літературними даними, штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та інші можуть продукувати індолідин з антимікотичною активністю. Гриби з того ж середовища, наприклад, з Азії, також можуть мати інгібуючий вплив на ріст *C. albicans* [44]. Ці спостереження вказують на те, що співіснування організмів, які впливають на продукування вторинних метаболітів, має місце. Слід використовувати раціональний підбір штамів, які, можливо, пригнічують ріст *C. albicans*, ґрунтуючись на знанні їхніх природних середовищ існування. Також можливо, що ідентичні штами в одному середовищі, шляхом генних модифікацій і створення різних метаболітів з потенційним інгібуючим впливом на *C. albicans*, можуть виробляти різні антимікотичні метаболіти.

Під час ферментації «морського рису», можна помітити антимікробну активність, використовуючи зерна для ферментації різноманітних джерел цукру, наприклад меляси, цукру демарара та коричневого цукру. Коричневий цукор виявив найбільшу антимікробну активність щодо мікроорганізмів *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*. Також було продемонстровано пригнічення грибка *Aspergillus flavus* рисовим грибом.

Протизапальну активність морського рису досліджували в небагатьох роботах. Деякі вчені спостерігали значне пригнічення утворення гранульом та набряку лап у щурів, які отримували розчин «рисового гриба» та відповідні зерна.

ЕПС, що виробляються лактобактеріями із сахарози, такі як декстран і леван, можуть бути потенційно пребіотиками. Манніт, який може вироблятися деякими мікроорганізмами із асоціації «рисового гриба» (наприклад, видами *Leuconostoc*), має антиоксидантну активність.

Щоб вирішити проблему, з якою стикаються військовослужбовці та люди, які не мають постійного доступу до води, ми поставили собі за мету

розробити гель для інтимної гігієни, який можна було б змивати невеликою кількістю води або не змивати і при цьому він був би ефективним проти мікроорганізмів, таких як *Candida albicans*.

3.2. Розробка гігієнічного засобу.

В ході нашої роботи було розроблено гель для інтимної гігієни на основі екзометаболітів «рисового гриба». Всі інгредієнти ми добирали згідно їх доказаної безпеки і походженню з рослинної сировини.

До складу розробленої рецептури входили наступні інгредієнти:

- 1) екзометаболіти рисового гриба стабілізовані полісорбатом 80 і 0,1% сорбатом калія - 80%,
- 2) ПАР з амінокислот вівса Sodium Lauroyl Oat Aminoacids - 15%;
- 3) D-пантенол - 4%;
- 4) l-пролін;
- 5) гуарова камедь - 1%.

Кінцева рН готового до споживання гелю 4,2 ... 4,8, що не порушує фізіологічні показники кислотності сльозової оболонки статевих органів (норма рН 3,7 ... 4,5).

Такий склад гелю для інтимної гігієни цілком безпечний і може залишатися на шкірі довгий час. Крім того гель має гарні очищуючі властивості, здатен швидко загоювати мікротравми, ефективно прибирає подразнення і не порушує сльозову оболонку статевих органів.

Зразки гелю для інтимної гігієни були передані в лабораторію клінічних досліджень в лікарні де провели тестування на антагоністичні властивості гелю до найпоширенішого захворювання в екстремальних умовах при стресі та відсутності змоги провести гігієнічні процедури – кандидозу.

Під час досліджень використовували метод «колодязів», де вивчали вплив розробленого гелю на тест-культуру *Candida albicans*. Результати оцінювали візуально на третю добу культивування виходячи з розвитку тест-культури на поживному середовищі.

3.3. Клінічні дослідження.

Культуру гриба *Candida albicans*, культивували на діагностичному середовищі Sabouraud Agar with Gentamicin and Chloramphenicol + CHROM (China) впродовж 24 годин у чашках Петрі. На другу добу почали тестування гігієнічного засобу згідно загально прийнятим методам тестування медичних препаратів і медичних засобів ми використали метод «колодязів». Метод базується на культивуванні цільових тест-об'єктів у чашках Петрі на твердому поживному середовищі з подальшим додаванням тестуємого засобу у лунки. Тому на другу добу культивування тест культури ми зробили лунки у поживному середовищі діаметром 10 мм за допомогою стерильного мікробіологічного свердла. У контрольний зразок додавали лише стерильну дистильовану воду у кількості 1 мл, а у другий, дослідний зразок, додавали 1 мл розчиненого в 10 разів стерильною дистильованою водою гель для інтимної гігієни (рисунок 3.3.1.). Дослідження проводили у 3-х кратному повторенні.

Після внесення дистильованої води у контрольний зразок і розчину гелю у дослідний зразок спостерігали за ростом культури *C. Albicans*. На третю добу експерименту ми візуально спостерігали інтенсивний ріст колоній грибка у контрольному варіанті. У дослідному варіанті з розчином гелю розвиток колоній грибка припинився повністю, а також було відмічено ріст колоній пробіотичних бактерій із мікробної асоціації зооглії не зважаючи, що поживне середовище містить у своєму складі антибіотики (рис. 3.3.2.). Так як тест - культуру було висаджено на діагностичне поживне середовище, культура *C. Albicans* почала зеленіти, що і є підтвердженням видової належності колоній грибка.

Таким чином, розроблений гель має потенціал бути ефективним рішенням для підтримки жіночої гігієни в складних умовах з обмеженим доступом до води. Також за рахунок дії екзометаболітів *Oryzomyces indicis* та живих бактерій, гель здатний обмежувати розвиток патогенного грибка

C. Albicans, що дуже важливо при створенні засобу гігієни для підтримки виживання в екстремальних умовах.

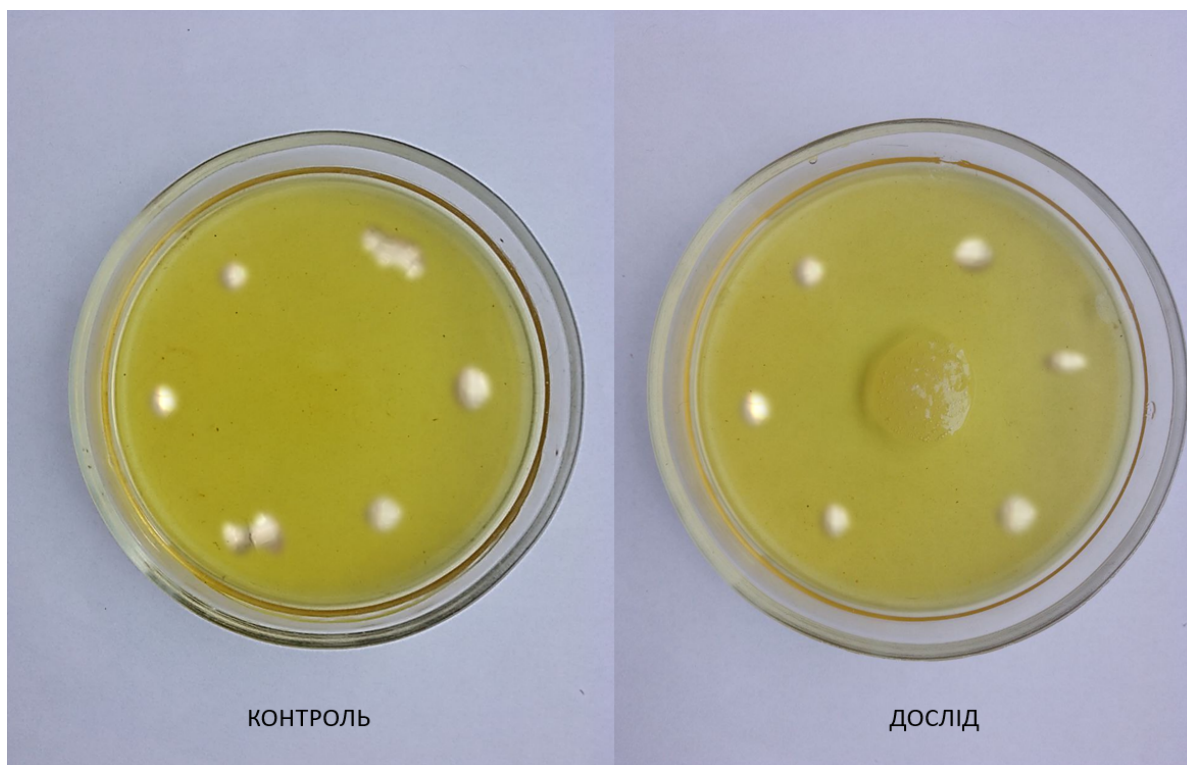


Рисунок 3.3.1. Дослідження впливу гелю для інтимної гігієни на культуру грибка *C. Albicans* (друга доба).

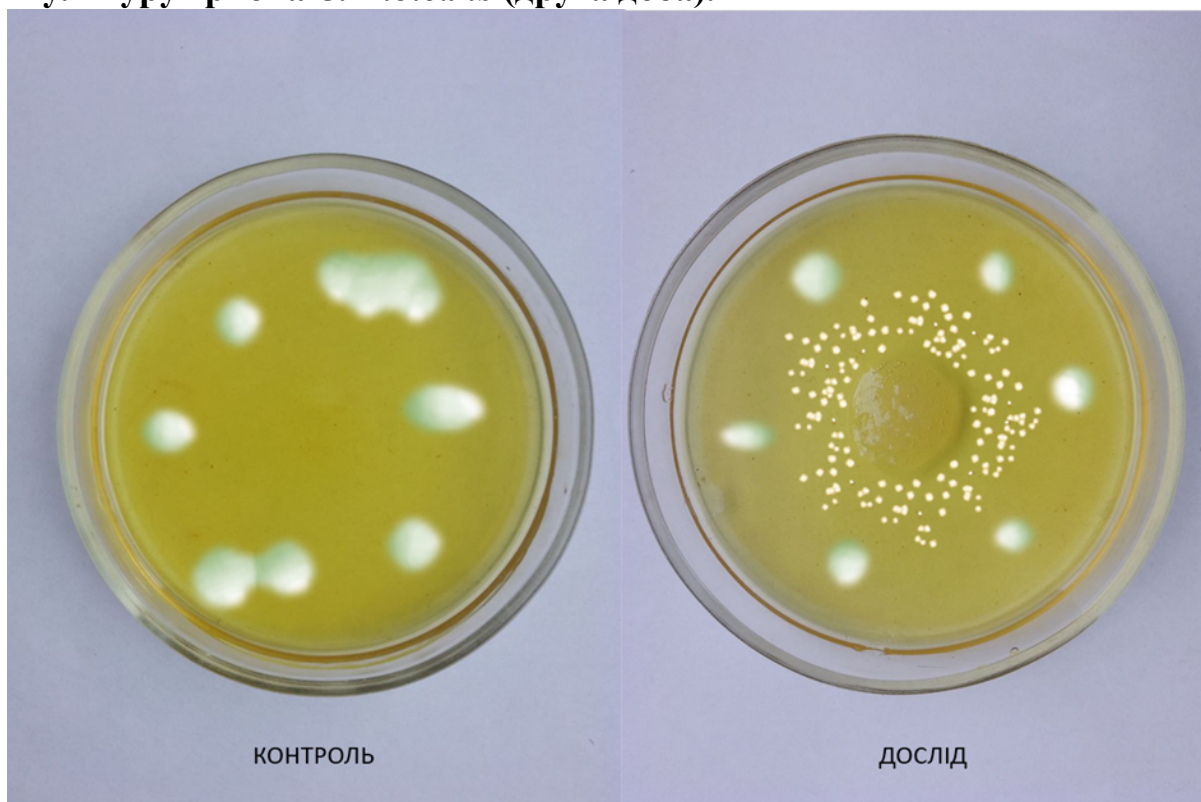


Рисунок 3.3.2. Дослідження впливу гелю для інтимної гігієни на культуру грибка *C. Albicans* (третя доба).

ВИСНОВКИ

1. Експериментально підтверджено, що екзометаболіти *Oryzomyces indicī* в складі розробленого гелю для інтимної гігієни ефективно пригнічують ріст патогенного грибка *Candida albicans*.

2. Гель, до складу якого входять екзометаболіти «морського рису» та активні інгредієнти, демонструє потенціал бути ефективним засобом для інтимної гігієни в екстремальних умовах де немає можливості використовувати воду для змивання і може ефективно сприяти підтримці гігієни та запобіганню розвитку інфекцій.

3. В порівнянні з сучасними засобами гігієни, які не потребують змивання і в більшості викликають дерматити та подразнення при тривалому використанні, запропонований гель є більш безпечним та ефективним рішенням для щоденного використання.

4. Висока ефективність та безпечність розробленого засобу для інтимної гігієни на основі екзометаболітів «морського рису» відкриває нові перспективи для створення універсальних засобів гігієни для використання в екстремальних та польових умовах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Про затвердження Порядку психологічного забезпечення в Державній службі України з надзвичайних ситуацій : Наказ М-ва внутр. справ України від 31.08.2017 р. № 747. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1390-17#Text>
2. Phillips A. K., Wilson C. Menstrual Practices in Operational Military Women. *Military Medicine*. 2021. Vol. 186, Supplement_1. P. 767–774. URL: <https://doi.org/10.1093/milmed/usaa345>
3. Nurudeen A. S. N., Toyin A. Knowledge of Personal Hygiene among Undergraduates. *Journal of Health Education*. 2020. Vol. 5, no. 2. P. 66–71. URL: <https://doi.org/10.15294/jhe.v5i2.38383>
4. Changes in Daily Life, Physical Activity, GAD, Depression, and Personal Hygiene of Adolescents in South Korea Due to the COVID-19 / E.-Y. Kim et al. *Healthcare*. 2022. Vol. 10, no. 10. P. 1881. URL: <https://doi.org/10.3390/healthcare10101881>
5. Dermatitis Neglecta / P. N. S. Kumar et al. *The Primary Care Companion For CNS Disorders*. 2021. Vol. 23, no. 4. URL: <https://doi.org/10.4088/pcc.20102806>
6. Військова гігієна : навчальний посібник / авт. кол.: М. Г. Щербань, Е. М. Хорошун, В. А. Капустник, В. В. М'ясоєдов, В. О. Коробчанський, М. П. Воронцов, Ю. К. Резуненко, О. Г. Мельник, Ю. О. Олійник. – Харків : ХНМУ, 2022. – 218 с.
7. Human and Environmental Toxicity of Sodium Lauryl Sulfate (SLS): Evidence for Safe Use in Household Cleaning Products / C. A. M. Bondi та ін. *Environmental Health Insights*. 2020. Т. 9. С. EHI.S31765. URL: <https://doi.org/10.4137/ehi.s31765>
8. Nassau S., Fonacier L. Allergic Contact Dermatitis. *Medical Clinics of North America*. 2020. Т. 104, № 1. С. 61–76. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.08.012>

9. Assessment of the microbial diversity of Chinese Tianshan tibicos by single molecule, real-time sequencing technology / C. Cao та ін. Food Science and Biotechnology. 2018. Т. 28, № 1. С. 139–145. URL: <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0460-8>
10. Some probiotic characteristics of a fermented milk product based on microbiota of “Tibetan kefir grains” cultivated in Ukrainian household / M. Kukhtyn et al. Journal of Food Science and Technology. 2017. Vol. 55, no. 1. P. 252–257. URL: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2931-y>
11. Yerlikaya O., Akan E., Kinik Ö. The metagenomic composition of water kefir microbiota. International Journal of Gastronomy and Food Science. 2022. P. 100621. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100621>
12. Laureys D., De Vuyst L. Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. Applied and Environmental Microbiology. 2014. Vol. 80, no. 8. P. 2564–2572. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.03978-13>
13. RESEARCH OF AMYLOLYTIC ACTIVITY OF CULTURAL LIQUIDS IN BIOTECHNOLOGY OF SYMBIOTIC CROPS MEDUSOMYCES GISEVII AND ORYZAMYCES INDICI / N. Masalitina та ін. Integrated Technologies and Energy Saving. 2021. № 3. С. 64–78. URL: <https://doi.org/10.20998/2078-5364.2021.3.07>
14. Масалітіна Н. Ю., Загребельний Д. Є. Дослідження лікувально-профілактичних властивостей культуральної рідини *Oryzomyces indicis* : thesis. 2019. URL: <http://repository.kpi.kharkov.ua/handle/KhPI-Press/44611>
15. An update on water kefir: Microbiology, composition and production / K. M. Lynch et al. International Journal of Food Microbiology. 2021. Vol. 345. P. 109128. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>
16. Evaluation of the Probiotic Potential of *Saccharomyces cerevisiae* Strain (C41) Isolated from Tibicos by In Vitro Studies / H. E. Romero-Luna та ін. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2018. Т. 11, № 3. С. 794–800. URL: <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9471-2>

17. On probiotic yeasts in food development: *Saccharomyces boulardii*, a trend / H. F. d. SOUZA та іН. Food Science and Technology. 2022. Т. 42. URL: <https://doi.org/10.1590/fst.92321>
18. *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? / P. Pais та іН. Journal of Fungi. 2020. Т. 6, № 2. С. 78. URL: <https://doi.org/10.3390/jof6020078>
19. State-of-the-art in analytical methods for metabolic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* / O. Perruchon та іН. Microchemical Journal. 2021. Т. 170. С. 106704. URL: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106704>
20. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications / M. Parapouli та іН. AIMS Microbiology. 2020. Т. 6, № 1. С. 1–32. URL: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
21. Chrzanowski G. *Saccharomyces Cerevisiae*—An Interesting Producer of Bioactive Plant Polyphenolic Metabolites. International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21, no. 19. P. 7343. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21197343>
22. Solieri, L. The revenge of *Zygosaccharomyces* yeasts in food biotechnology and applied microbiology. World J Microbiol Biotechnol 37, 96 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03066-7>
23. *Candida auris*: A Decade of Understanding of an Enigmatic Pathogenic Yeast / R. Kean та іН. Journal of Fungi. 2020. Т. 6, № 1. С. 30. URL: <https://doi.org/10.3390/jof6010030>
24. *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications / K. Naghmouchi та іН. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019. Т. 60, № 20. С. 3387–3399. URL: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.168825>
25. *Leuconostoc lactis* and *Staphylococcus nepalensis* Bacteremia, Japan / S. Hosoya et al. Emerging Infectious Diseases. 2020. Vol. 26, no. 9. P. 2283–2285. URL: <https://doi.org/10.3201/eid2609.191123>

26. Chiolerio A., Adamatzky A. Acetobacter Biofilm: Electronic Characterization and Reactive Transduction of Pressure. ACS Biomaterials Science & Engineering. 2021. T. 7, № 4. С. 1651–1662. URL: <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.0c01804>
27. Güler E. Polyphenols, organic acids, and their relationships in red grapes of *Vitis vinifera* and *Isabella* (*Vitis labrusca*) under arid conditions. European Food Research and Technology. 2022. URL: <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04183-9>
28. Національна академія наук України. (2023, 17 березня). Метаболіти цвілевого гриба *Oryzomyces indicis* здатні знижувати вміст глюкози в крові та стимулювати продукування інсуліну. <https://www.nas.gov.ua/UA/Messages/Pages/View.aspx?MessageID=8307>
29. Tu P.-S., 涂博翔. The study of Tibicos fermentation product as pilot model of healthy drinks : thesis. 2015. URL: <http://ndltd.ncl.edu.tw/handle/m2wzk6>
30. Fast Filtration of Bacterial or Mammalian Suspension Cell Cultures for Optimal Metabolomics Results / N. Bordag та ін. PLOS ONE. 2016. T. 11, № 7. С. e0159389. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159389>
31. Pérez-Armendáriz B., Cardoso-Ugarte G. A. Traditional fermented beverages in Mexico: Biotechnological, nutritional, and functional approaches. Food Research International. 2020. T. 136. С. 109307. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109307>
32. Semimartingales and shrinkage of filtration / T. R. Bielecki та ін. The Annals of Applied Probability. 2021. T. 31, № 3. URL: <https://doi.org/10.1214/20-aap1621>
33. Removal of Bacterial Contamination from Bioethanol Fermentation System Using Membrane Bioreactor / A. Mahboubi та ін. Fermentation. 2018. T. 4, № 4. С. 88. URL: <https://doi.org/10.3390/fermentation4040088>

34. Influence of bacteria on the maintenance of a yeast during *Drosophila melanogaster* metamorphosis / R. Guilhot та ін. *Animal Microbiome*. 2021. Т. 3, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00133-0>
35. Mansson M. A. M., Schmidt V. Kefir à base de leite caprino: uma revisão sistemática. *Revista foco*. 2023. Vol. 16, no. 9. P. e3173. URL: <https://doi.org/10.54751/revistafoco.v16n9-158>
36. Staniszewski A., Kordowska-Wiater M. Fermented food as source of yeasts with probiotic potential. 1st international phd student's conference at the university of life sciences in lublin, poland: ENVIRONMENT – PLANT – ANIMAL – PRODUCT. 2022. URL: <https://doi.org/10.24326/icdsup11.t033>
37. Elhage K. G., St. Claire K., Daveluy S. Acetic acid and the skin: a review of vinegar in dermatology. *International Journal of Dermatology*. 2021. URL: <https://doi.org/10.1111/ijd.15804>
38. Lactic Acid Bacteria and Lactic Acid for Skin Health and Melanogenesis Inhibition / H.-C. Huang та ін. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2020. Т. 21, № 7. С. 566–577. URL: <https://doi.org/10.2174/1389201021666200109104701>
39. Green, B. A., Van Scott, E. J., & Yu, R. J. (2022). Clinical uses of hydroxyacids. *Cosmetic dermatology: products and procedures*, 430-441.
40. Role of Vitamins in Skin Health: a Systematic Review / A. Dattola та ін. *Current Nutrition Reports*. 2020. Т. 9, № 3. С. 226–235. URL: <https://doi.org/10.1007/s13668-020-00322-4>
41. Bacterial α -Glucan and Branching Sucrases from GH70 Family: Discovery, Structure–Function Relationship Studies and Engineering / M. Molina та ін. *Microorganisms*. 2021. Т. 9, № 8. С. 1607. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081607>
42. *Candida albicans*–The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection / J. Talapko та ін. *Journal of Fungi*. 2021. Т. 7, № 2. С. 79. URL: <https://doi.org/10.3390/jof7020079>

43. Vaginal Candidiasis (Yeast Infection). *Journal of Midwifery & Women's Health*. 2021. T. 66, № 6. C. 825–826. URL: <https://doi.org/10.1111/jmwh.13326>
44. Anticandidal Activity of Omiganan and Its Retro Analog Alone and in Combination with Fluconazole / P. Czechowicz та ін. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2021. T. 13, № 4. C. 1173–1182. URL: <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09757-9>