

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

06.07. – МКР. 216 «С». 2023.11.01. 4 ПЗ

ЗЕЛЕНЯК ДМИТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ

2024

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

**ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри**

“ _____ ” _____ 2024 р.

**ЗАВДАННЯ
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ**

_____ **Зеленяк Дмитро Олександрович**
(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»
(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Мікрофлора закваски , біорізноманіття та метаболічна взаємодія компонентів кефірної закваски»

Затверджена наказом ректора НУБіП України від 01.11.2023 р. №216 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 1 листопада 2024 р.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Аналіз поліовидного складу кефірних заквасок
2. Дослідження антагоністичних властивостей кефірних заквасок
3. Дослідження взаємодія компонентів кефірних заквашувальних композицій

Перелік графічного матеріалу:

Дата видачі завдання 1 вересня 2023 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання _____
(підпис) (прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
Введення.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1 Характеристика кефіру.....	9
1.2 Характеристика кефірної закваски.....	11
1.3 Характеристика основних компонентів мікрофлори кефірної закваски.....	16
1.3.1 Молочнокислі бактерії.....	16
1.3.2 Пропіонокислі бактерії.....	19
1.3.3 Оцтовокислі бактерії.....	21
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	25
2.1 Біохімічні перетворення , під впливом біологічних агентів	25
2.2 Мікрофлора кефірної закваски	29
2.3 Взаємодія компонентів закваски.....	30
2.4 Вплив продукту ферментації кефірних грибків на організм.....	31
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ РОБОТИ.....	37
3.1 Характеристика антагоністичних властивостей кефірної закваски	37
3.2. Мета дослідження.....	38
3.3. Матеріали та методи	38
3.4 Нормативні вимоги	
3.5. Результати дослідження	38
Список використаної літератури.....	45

ВСТУП

Бактерії є самими давніми організмами, що з'явилися близько 3,5 млрд. років тому в архей. Близько 2,5 млрд. років тому вони домінували на Землі, формуючи біосферу, брали участь в утворенні кисневої атмосфери.

З давніх-давен людство почало використовувати діяльність мікроорганізмів, навіть не підозрюючи про їх існування, та емпірично удосконалювати технологію використання цих організмів в різноманітних галузях господарства. Важко точно встановити де і в яких саме галузях вперше почали використовувати життєдіяльність мікроорганізмів. Напевно, це залежало від багатьох факторів та йшло паралельними шляхами в різних народів [1, 2]. В пірамідах Єгипту, побудованих біля 6000 років тому, знаходили хліб. Єгиптяни для його приготування використовували осадки бродячого пивного суслу. У Біблії декілька разів згадується про необхідність вживання людьми кислого молока. Використання багатьох продуктів з молочнокислими бактеріями для профілактики і лікування зустрічається вже в «Каноні лікарської науки» Абу Ібн Сіна. З розвитком тваринництва і землеробства та появою в зв'язку з цим деякого надлишку харчів, які необхідно було зберігати, виникає потреба розробки методів попередження псування продуктів. З цією метою використовували сушку, соління, квашення [3].

За оцінками фахівців, приблизно 80% харчових виробництв так чи інакше пов'язані з використанням мікробіологічних процесів. Найдавнішими біотехнологічними процесами є хлібовипічка, виноробство, пивоваріння, виготовлення квасу, оцту, соління та квашення плодів, овочів, м'яса та риби, виробництво сирів та кисломолочних продуктів [4].

Метою даної курсової роботи було вивчення біології молочнокислих,

пропіоновокислих та оцтовокислих бактерій і їх ролі у бродильних процесах, що використовуються при виготовленні харчового продукту на основі кефірних заквасок.

Бактерії належать до найдавніших організмів, що виникли приблизно 3,5 мільярда років тому в архейський період. Близько 2,5 мільярда років тому вони почали домінувати на Землі, відіграючи ключову роль у формуванні біосфери та створенні кисневої атмосфери.

З давніх часів люди використовували активність мікроорганізмів, навіть не здогадуючись про їх існування, поступово вдосконалюючи методи їх застосування в різних галузях господарства. Точне визначення місць і сфер, де вперше використовувалися життєдіяльність мікроорганізмів, ускладнене, адже це залежало від багатьох обставин і розвивалося незалежно в різних культурах. Наприклад, у єгипетських пірамідах, збудованих близько 6000 років тому, були знайдені залишки хліба, приготованого з використанням осаду пивного суслу. У Біблії згадується про споживання кислого молока, а в «Каноні лікарської науки» Ібн Сіні описані лікувальні властивості продуктів, виготовлених за участю молочнокислих бактерій.[1,2]

З розвитком землеробства та тваринництва, коли з'явився надлишок продуктів харчування, постала необхідність у методах їх збереження. Для цього використовували сушіння, соління та квашення.[3]

Сучасні дослідження вказують, що близько 80% харчових технологій тією чи іншою мірою залежать від мікробіологічних процесів. До найбільш давніх біотехнологічних методів належать випікання хліба, виноробство, пивоваріння, виробництво квасу, оцту, соління, квашення овочів, фруктів, м'яса та риби, а також виготовлення сирів і кисломолочних продуктів.

Метою цієї курсової роботи є аналіз біології молочнокислих, пропіоновокислих і оцтовокислих бактерій, а також дріжджів, дослідження їх взаємодії та значення в процесах ферментації, що застосовуються при виготовленні продуктів на основі кефірних заквасок.[4]

Введення

Кисломолочні напої з використанням закваски

Поліпшення структури харчування і здоров'я населення є основною концепцією державної політики України і провідних країн світу. При цьому харчування має не тільки задовольняти фізіологічні потреби організму в харчових речовинах і енергії, але володіти профілактичними і лікувальними властивостями. На всіх міжнародних ринках харчових продуктів простежується наступна тенденція: споживач готовий купувати більш дорогі якісні та натуральні продукти [5]. При цьому продукти харчування повинні бути повноцінними за складом, не містити хімічних добавок, мати невелику енергетичну цінність і високі споживчі властивості [6]. Кисломолочними називаються продукти, що виробляються з пастеризованого молока шляхом сквашування його заквасками, приготованими на чистих культурах молочнокислих бактерій. До кисломолочних напоїв відносяться: кисле молоко різних видів, кефір, ацидофільні та інші напої, в тому числі і лікувально - профілактичного значення [7]. Дієтичні властивості кисломолочних продуктів зростають в порівнянні з вихідним молоком і обумовлені сприятливим впливом на організм людини молочнокислих бактерій і ряду речовин, що утворюються в результаті різних 17 біохімічних процесів. Кисломолочні продукти збуджують апетит, посилюють секреторну і моторну діяльність шлунка і кишечника, ніж поліпшують загальний стан організму, зміцнюють нервову систему. Молочнокислі бактерії, що вводяться в організм з кисломолочними напоями, здатні приживатися в кишечнику; під впливом продукту їх життєдіяльності - молочної кислоти в товстих кишках пригнічується розвиток гнильних бактерій і цим усувається джерело отруєння організму отрутами, які виділяються гнильними бактеріями. В результаті розвитку молочнокислих бактерій кількість основних вітамінів підвищується. Молочнокислі бактерії утворюють ряд антибіотиків (лізин, лактонін і інші) [8]. Накопиченням

антибіотиків в кисломолочних продуктах обумовлені лікувальні властивості останніх: кефіру - для лікування ряду хвороб шлунково - кишкового тракту, ацидофільного молока і кумису - при лікуванні туберкульозу та інших захворювань. Кисле молоко виробляють з пастеризованого незбираного або знежиреного молока, застосовуючи різні види кисломолочних бактерій. В технології кислого молока передбачається використання біфідогенний харчової добавки - лактулози; стабілізаторів структури. Ряжанка виробляється з топленого молока шляхом сквашування чистими культурами молочного стрептокока з використанням або без болгарської палички. Йогурт виробляється з нормалізованої молочної суміші шляхом сквашування його чистими культурами термофільного стрептокока і болгарської палички. Кефір - кисломолочний напій, що виробляється шляхом сквашування закваскою, приготовленою на кефірних грибках.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Характеристика кефіру

Першу офіційну згадку про кефір як цілющий напій відносять до 1867 року, і це відкриття зацікавило вчених як у Росії, так і за кордоном. Промисловий випуск кефіру було розпочато у 1909 році і першим споживачем його була Боткінська лікарня Москви. Нині виробництво кефіру регулюється міжнародними та державними нормативними документами.

Згідно з Codex Standard 243-2003, до нормальної мікрофлори кефірної закваски відносять такі основні групи бактерій:

дріжджі (лактозоброджувальні *Kluuveromyces marxianus* та ті, що не ферментують лактозу, - *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* і *Saccharomyces exiguus*); гомо- і гетероферментативні молочнокислі коки родів *Lactococcus*, *Leuconostoc*, молочнокислі палички *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus casei*, оцтовокислі бактерії *Acetobacter aceti*.

Роль цих мікроорганізмів є важливою, оскільки саме вони, розвиваючись у тісному симбіозі під час ферментування молока, забезпечують специфічні органолептичні показники та функціональну активність готового продукту. Відповідно до чинного ДСТУ 4417:2005, «кефір є продуктом змішаного молочнокислого та спиртового бродіння, який виробляють сквашуванням молока симбіотичною кефірною закваскою на кефірних грибках або концентратом грибкової кефірної закваски». Він характеризується однорідною, в'язкою консистенцією, з порушеним або непорушеним згустком (залежно від технології виробництва), допускається незначне відокремлення сироватки. Особливістю цього кисломолочного напою є наявність газу, який утворюється внаслідок життєдіяльності мікрофлори кефірної закваски.

Таблиця 1. Мікробіологічні показники кефіру згідно з ДСТУ 4417:2005

Поживна цінність кефіру значною мірою залежить від таких факторів, як склад сировини, умови ферментування тощо. Вміст молочної кислоти у готовому продукті знаходиться на рівні 0,8-1,5%, етанолу - 0,05-2,00%, вуглекислого газу - до 0,2%. Кефір також містить широкий спектр й інших метаболітів кефірної мікрофлори, а саме: органічні кислоти (оцтова, пропіонова і мурашина), специфічні смако-ароматичні сполуки, в'язкі екзополімери тощо. Істотний рівень протеолітичної активності лактобацил призводить до накопичення у продукті вільних амінокислот, в тому числі й незамінних, а в результаті життєдіяльності дріжджів кефір збагачується вітамінами В1, В2, К, фолієвою кислотою, біотином.[7,10]

Добре відомі функціональні властивості кефіру: антагоністична активність щодо широкого кола грампозитивних і грамнегативних бактерій, сприяння травленню, посилення імунітету. Основні метаболіти дріжджів та молочнокислих бактерій кефірних грибків та заквасок спирт та молочна кислота поряд зі специфічними антибактеріальними сполуками запобігають розвитку сторонніх мікроорганізмів. Сполучення цих двох та інших продуктів бродіння значно підсилює функціональні властивості кисломолочного напою, а утворення деякими 4 мікроорганізмами бактеріоцинів та біологічно активних полісахаридів дає змогу віднести кефір до комплексних пробіотиків.[9]

1.2 Характеристика кефірної закваски

Унікальність даного напою обумовлена застосуванням кефірних грибків— живого природного сполученням активних та лізованих мікроорганізмів і дріжджів, полісахаридів, скоагульованих білків і продуктів метаболізму бактерій. З точки зору біології кефірні грибки – це живі тіла, здатні до самостійного розвитку та відтворення. За формою схожі на суцвіття цвітної капусти, розміром від 0,3 до 3,5 см у діаметрі, від білого до світло-жовтого кольору (рис. 1).

Більшість сучасних мікробіологів сходяться на думці, що формування строми (тіла) грибка відбувається внаслідок розмноження мікроорганізмів, зокрема, лактобацил, які продукують специфічні полісахариди (кефірани). Кислотне коагулювання білків навколо грибка, залучення в утворений білково-кальцієвий комплекс кефіранів та біомаси мікрофлори є початковим етапом зародження нових кефірних зерен. Приблизний хімічний склад кефірних грибків наступний: 89-90% води, 0,3% жирів, 3,2% білків, 6,0% вуглеводів та 0,7% мінеральних компонентів. Одна у лабораторних умовах штучно створити кефірний грибок із окремих його складників ще не вдалося нікому.[9,7]



Рис. 1 - Кефірні грибки

Дослідженню мікробіологічного складу кефірних грибків та грибкової закваски приділялося багато уваги провідними мікробіологами світу упродовж останніх десятиліть. Достеменно відомо, що вони містять молочнокислі бактерії, а саме лактококи та лактобацили, дріжджі й оцтовокислі бактерії. Співвідношення між мікроорганізмами кефірних грибків є динамічним та істотно залежить від багатьох факторів, як-то походження кефірних грибків, складу молока та способу його оброблення, умов культивування та зберігання. Відомий російський дієтолог А.А. Дружиніна так писала: «Кефирные грибки представляют собой яркий пример биологического симбиоза (сожительства) сразу нескольких видов микроорганизмов, и этот симбиоз настолько сложный и неделимый, что до сих пор

не удалось до конца его проанализировать и выделить в чистых культурах входящие в него элементы, чтобы снова составить из них эти грибки». Мікрофлора кефірних грибків представлена гомо- та гетеро ферментативними лактококами, термофільними і мезофільними лактобацилами, дріжджами та оцтовокислими бактеріями (таблиця 2). Ці основні групи мікроорганізмів спостерігають і в грибковій заквасці та кефірі, хоча чисельність деяких родів бактерій різниться. 6 У кефірних грибках домінуючими видами є лактококи *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (до 30%), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (до 20%) та лактобацили *Lactobacillus* sp. (до 20%). Серед мезофільних лактобактерій також було виділено *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (~7%) та *Leuconostoc* sp. (~7%). Видовий склад домінуючих лактобацил наступний: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus brevis*. Слід зазначити, що ці лактобацили характеризуються вираженою антагоністичною дією щодо бактерій групи кишкової палички.[9,7,6]

Таблиця 2. Основна мікрофлора кефірних грибків та грибкової кефірної закваски

Гомоферментативні лактококи	<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Гетероферментативні лактококи та лейконостоки	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
Термофільні стрептококи	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Лактобацили (мезофільні та термофільні)	<i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i>

Дріжджі	<i>Kluveromyces marxianus (Candida kefir), Brettanomyces anomalus, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces exiguus Saccharomyces unisporus, Debaryomyces hansenii, Pichia fermentans</i>
Оцтовокислі бактерії	<i>Acetobacter aceti</i>

Обов'язковою мікрофлорою кефірного грибка є оцтовокислі бактерії *Acetobacter aceti* – їхня частка складає до 3% від загальної кількості мікрофлори кефірного грибка – та дріжджі – 10%. Дріжджі у кефірі представлені двома групами. До першої належать види, що здатні зброджувати лактозу – переважно це *Kluveromyces marxianus var. marxianus*, *Kluveromyces marxianus var. lactis*, а також *Brettanomyces anomalus*, *Debaryomyces hansenii*. Вони засвоюють лактозу за схемою спиртового бродіння, кінцевими продуктами якого є спирт та вуглекислий газ.

Другу групу складають дріжджі родів *Saccharomyces* та *Pichia*, які асимілюють лактозу, не спричиняючи газоутворення та накопичення значних кількостей продуктів метаболізму. Такі дріжджі у кефірних грибках та заквасці знаходяться у більшій кількості. За нашими даними видовий склад мікрофлори грибкової закваски (рис.2) – аналогічний до такого кефірних грибків, причому значну частку – близько 45% та 35% – становили, відповідно, ароматоутворювальні лактококи *L. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* та гомоферментативні *L. lactis subsp. lactis*.

Відносний вміст інших представників істотно менший ніж у кефірних грибків: частка лактобацил не перевершувала 12%, а інших бактерій – лейконостоків та термофільних стрептококів – менше 1%. Дріжджі у грибковій заквасці склали лише 0,5% від загальної чисельності мікроорганізмів.[9,7]

Lactococcus lactis ssp. cremoris; 7%	Leuconostoc ssp.;	Streptococcus thermophilus; 0,1%
дріжджі; 0,5%	0,5%	Acetobacter ; 0,1%
Lactobacillus ssp.;		
12%		

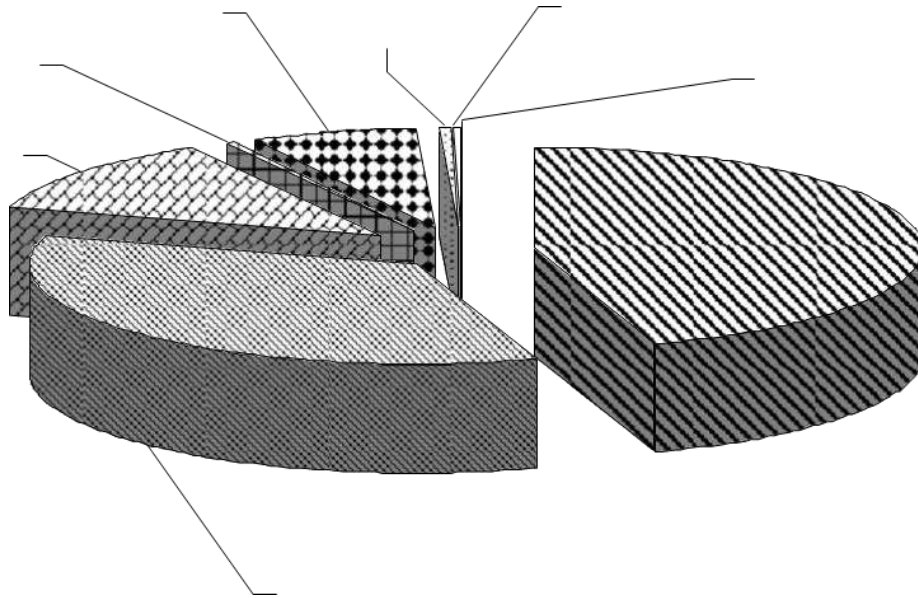


Рис. 2 - Розподілення мікрофлори грибової кефірної закваски

У чисельному вираженні кількість лактококів у заквасці та кефірі – 10^8 - 10^9 КУО/см³, що на 0,5-1,0 порядок вище, ніж у грибку. Чисельність дріжджів і оцтовокислих бактерій у кефірі, навпаки, є істотно меншою, ніж у грибовій заквасці що, пов'язано з повільною швидкістю росту цих мікроорганізмів у молоці. Збалансованість росту дріжджів, молочнокислих та оцтовокислих бактерій обумовлена симбіотичним характером взаємовідносин цих груп мікроорганізмів. Під час росту дріжджі збагачують середовище специфічними метаболітами, які стимулюють розвиток молочнокислих бактерій. Окрім того, утворений спирт гальмує швидкість поділу клітин молочнокислих мікроорганізмів, тим самим сповільнює старіння популяції, тобто лактобактерії довше знаходяться у активному стані. Зі свого боку дріжджі, розвиваючись у асоціації з молочнокислими бактеріями, отримують певні переваги. Володіючи потужнішою системою протеолітичних ферментів, лактобактерії розщеплюють білки молока та у такий спосіб постачають дріжджам легкодоступні джерела азоту. Підкислення середовища, спричинене зброджуванням лактози молочнокислими бактеріями з утворенням значної кількості молочної кислоти, створює оптимальну для росту дріжджів кислотність. Також варто відзначити, що

під час виробництва кефіру збалансований розвиток всіх груп мікроорганізмів гарантує одержання продукту з характерними органолептичними властивостями. Так, мікроорганізми роду *Lactobacillus* продукують молочну кислоту, специфічні екзополісахариди та проявляють високу антагоністичну активність щодо сторонньої мікрофлори; *Leuconostoc* ssp. та *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* утворюють ряд смакоароматичних сполук (діацетил, леткі кислоти, ефіри) та вуглекислий газ; види *L. lactis* subsp. *cremoris* та *S. thermophilus* надають продукту сметаноподібної консистенції; лактозоброджувальні дріжджі – ініціатори спиртового бродіння з утворенням етанолу та CO₂, а оцтовокислі бактерії – продуценти оцтової кислоти, що надає кефіру гострого освіжаючого смаку.

Для розвитку кожної групи мікроорганізмів необхідні певні умови: температура, кислотність, ступінь аерації, тощо. В результаті спостережень за зміною мікрофлори молока під дією кефірних грибків, встановлено, що спочатку розвиваються лактококи. Зі зниженням рН середовища інтенсифікується ріст молочнокислих паличок та дріжджів, які згодом пригнічують розвиток лактококів. За постійного перекидання грибкової закваски домінуючими її складовими будуть лактобацили, дріжджі та оцтовокислі бактерії внаслідок вищої кислотостійкості; в разі частої зміни молока створюються сприятливіші умови для розвитку лактококів. Отож, необхідною умовою одержання високоякісного кефіру є підтримання структури кефірної мікрофлори на певному рівні, який забезпечує необхідний перебіг ферментаційного процесу.[9]

1.3 Характеристика основних компонентів мікрофлори кефірної закваски

Найбільш поширеними мікроорганізмами, які використовуються в заквасці є молочнокислі, пропіоновокислі та оцтовокислі бактерії.

1.3.1 Молочнокислі бактерії

Молочнокислі бактерії - специфічна група мікроорганізмів, що здійснюють молочнокисле бродіння, тобто розпад вуглеводів молока до молочної кислоти. Поряд з основним продуктом бродіння - молочною кислотою - утворюються й

побічні продукти: оцтова кислота, вуглекислий газ, ароматичні речовини, етиловий спирт та ін.

Відповідно до класифікації бактерій Бергі, молочнокислі бактерії належать до прокаріот (Procaryotae), відділу бактерії (Bacteria), класу власне бактерії (Eubacteriales), до родини Streptococcaceae (молочнокислі стрептококи та лейконостоки) та Lactobacillaceae (молочнокислі палички).

До родини Streptococcaceae належать три роди: Lactococcus (*L. lactis* з підвидами *L.l. lactis*, *L.l. cremoris*, *L.l. lactis biovar diacetylactis*), Streptococcus (*S. salivarius* з підвидом *S. salivarius subsp. thermophilus*) та Leuconostoc (*Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* з підвидом *Leuc. pseudomesenteroides* та *Leuconostoc mesenteroides* з підвидами *Leuc. mesenteroides subsp. mesenteroides*, *Leuc. mesenteroides subsp. cremoris* і *Leuc. mesenteroides subsp. dextranicum*). До родини Lactobacillaceae належить рід Lactobacillus з видами Thermobacterium (з підвидами *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis*), Streptobacterium (з підвидами *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus (casei)*) та Vetabacterium (з підвидами *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*).

За температурним режимом культивування молочнокислі бактерії поділяються на мезофільні, для яких оптимальна температура росту становить від 20 до 30°C, і термофільні - оптимальна температура росту яких 40 - 45°C .

Залежно від продуктів, які накопичуються в процесі бродіння, усі молочнокислі бактерії поділяють на дві групи:

1)гомоферментативні - при зброджуванні вуглеводів молока утворюють як основний продукт розпаду молочну кислоту та незначну кількість інших продуктів;

2)гетероферментативні - крім молочної кислоти, утворюють значну кількість інших речовин: кислоти, спирти, вуглекислий газ тощо .

Крім того, деякі гетероферментативні бактерії можуть продукувати чотириуглецеві сполуки - ацетоїн і діацетил. Останній має приємний запах, а тому продуктам, у яких розвиваються ці бактерії, притаманний характерний аромат.[9,8]

Ще одна ознака молочнокислих бактерій - це їх потреба в ростових речовинах. Жодний з представників цієї групи не може рости на середовищі з глюкозою і солями амонію. Більшість потребує ряду вітамінів (лактофлавін, тіамін, пантотенову, нікотинову та фолієву кислоти, біотин) і амінокислот, а також пуринів і піримідинів. Культивують ці бактерії переважно на складних середовищах, які мають відносно велику кількість дріжджового екстракту, томатного соку, молочної сироватки і навіть крові. Несподіваним видалось те, що деякі молочнокислі бактерії (та інші організми, здійснюючі бродіння) при рості на середовищах, що містять кров, утворюють цитохроми та навіть здатні здійснювати фосфорилування в дихальному ланцюзі. Молочнокислі бактерії не можуть, відповідно, синтезувати порфірини; якщо ж порфірини додані в живильне середовище, то деякі з цих бактерій здатні утворювати відповідні гемінові пігменти.

Для культивування штамів МКБ підходить низка поживних середовищ. Класичним елективним живильним середовищем для вирощування термофільних лактобацил, включаючи *L.acidophilus*, є середовище МРС а селективним середовищем для виділення та обліку оральних і фекальних лактобацил - лактобакагар. Для визначення потреби в окремих компонентах поживного середовища під час культивування продуцентів використовували глюкозо-пептодне середовище. В якому змінювали джерела, та кількісний склад компонентів. Середовище МРС для культивування *Lactobacillus acidophilus* Середовище МРС виглядає як гомогенний сипучий порошок жовтого забарвлення. Готове поживне середовище бурштинового кольору, прозоре чи слабо опалесціуюче. Якщо до рідкого середовища додати агар, утворюється гель. Спосіб приготування: 65,15 г середовища розмішати в 1000 мл дистильованої води. Прокип'ятити до повного розчинення крупинок. Стерилізувати

автоклавуванням при 1,1 атм (121 °С) впродовж 15 хв. Охолодити до 45-50°С. Перемішати і розлити в стерильні чашки Петрі, пробірки або флакони.

Склад МРС поживного середовища, г/л

Дріжджовий екстракт 5,0

М'ясний екстракт 10,0

Пептон 0,0

Глюкоза 20,0

Твин 80 1,0

K₂HPO₄ 2,0 38

Ацетат натрію 5,0

Діамоній Цитрат 2,0

MgSO₄·7H₂O 0,2

MnSO₄·H₂O 0,05

Вода дистильована до 1000,0 мл

pH 6,2 – 6,5

Середовище ГПС для культивування *Lactobacillus acidophilus* Якісний склад глюкозо-пептонного живильного середовища (ГПС) є поживною основою для росту бактерій, забезпечуючи їх всіма необхідними речовинами, глюкоза включена як джерело вуглецю, що дозволяє накопичувати широкий спектр мікроорганізмів. Пептон містить жири, метали, солі, вітаміни та багато інших органічних речовин необхідних для росту. Спосіб приготування: змішати всі компоненти, кип'ятити протягом 1-2 хв до повного розчинення часточок. Фільтрувати через ватно-марлевий фільтр, розлити по 5 мл у стерильні пробірки з поплавцями. Стерилізувати автоклавуванням при 1,1 атм (121 °С) впродовж 15 хв. Охолодити до 45-50°С. Перемішати і розлити в стерильні чашки Петрі, пробірки або флакони.

За основу було взято такий склад г/л.

Глюкоза 10,0

Пептон 5,0

NaCl 5,0

Вода дистильована до 1000,0 мл

Узагальнюючи, молочнокислі бактерії - це свого роду «метаболічні інваліди» які, напевно, в результаті своєї спеціалізації (ріст в молоці та інших середовищах, збагачених живильними та ростовими речовинами), втратили здатність до синтезу багатьох метаболітів. З іншої сторони, багато з них не мають здатності такої, якої не було б у більшості інших мікроорганізмів; вони можуть використовувати молочний цукор (лактозу). В цьому вони подібні з багатьма кишковими бактеріями (наприклад, *Escherichia coli*). Лактоза в рослинному царстві, напевно не зустрічається. Вона утворюється у ссавців, виділяється з молоком і відповідно з ним же поглинається. Таким чином, здатність використовувати лактозу можна вважати пристосуванням до середовища, характерного для кишечника ссавців. Лактоза - дисахарид, який, перш ніж вступити на шлях катаболізму гексоз, повинен бути розщепленим. Галактоза після фосфорилювання перетворюється в глюкозофосфат [7,8]

В зв'язку з утворенням великої кількості молочної кислоти живильне середовище для молочнокислих бактерій має бути достатньо буферним. Частіше за все з цією метою додають карбонат кальцію. На агаризованному середовищі з CaCO_3 («меловому агарі») утворення кислоти визначається по прозорим ореолам навколо колоній.

Розповсюдження молочнокислих бактерій в природі визначається їх складними потребами в живильних речовинах та способом отримання енергії (тільки бродіння). Ці бактерії майже ніколи не знаходяться в ґрунті або водоймах. В природних умовах вони зустрічаються:

- а) в молоці, місцях його переробки та молочних продуктах (*Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. brevis*; *Streptococcus lactis*, *S. diacetylactis*);
- б) на рослинах і на розкладених рослинних рештках (*Lactobacillus plantarum*, *L.*

delbriickii, *L. fermentum*, *L. brevis*; *Streptococcus lactis*; *Leuconostoc mesenteroides*);

в) в кишечнику та на слизових оболонках людини та тварин (*Lactobacillus acidophilus*; *Bifidobacterium*; *Streptococcus faecalis*, *S. salivarius*, *S. bovis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*).

Streptococcus faecalis - звичайний житель кишечника людини; *S. bovis* розповсюджений в травному тракті жувальних. Багато стрептококів являються сапрофітами слизових рота, дихальних та сечових шляхів, статевих органів; однак серед стрептококів є і паразити крові - вірулентні збудники хвороб.

Завдяки утворенню великої кількості молочно кислоти, до якої самі вони в значній мірі толерантні, молочнокислі бактерії за підходящих умов можуть доволі швидко розмножуватись, витісняючи інші мікроорганізми. По цій причині їх легко культивувати на елективних середовищах і легко виділяти. «Природні накопичувальні культури» цих бактерій знаходяться в кислому молоці та молочних продуктах, кислому тісті, квашеній капусті, силосі і т.д.

Загальною рисою всіх молочнокислих бактерій є висока цукролітична здатність. Вони грампозитивні, неспороутворюючі, переважно нерухливі факультативні анаероби [8].

1.3.2 Пропіоновокислі бактерії

Пропіонобактерії належать до родини *Propionibacteriaceae*, роду *Propionibacterium*, який налічує 8 видів, але в молочній промисловості і, зокрема, у сировиробництві здебільшого використовують *Propionibacterium shermanii*.

Пропіоновокислі бактерії при розщепленні молочного цукру (а в сирах - солей молочної кислоти) утворюють пропіонову, оцтову кислоти та їх солі, а також вуглекислий газ. Пропіоновокисле бродіння, викликане пропіоновокислими бактеріями, має велике значення при виробництві сирів із тривалим періодом дозрівання .

Ці бактерії існують у рубці та кишечнику жуйних тварин (корови, вівці), де вони

беруть участь в утворенні жирних кислот, головним чином, пропіонової та оцтової. Завдяки цим бактеріям молочна кислота, яка утворюється в результаті різних видів бродіння, перетворюється на пропіонову. Пропіоновокислі бактерії не зустрічаються в молоці, у ґрунті, у водоймах. Рід *Propionibacterium* складається з грампозитивних нерухомих палички, які не утворюють спор. Ці бактерії не переносять присутності кисню, ростуть в анаеробних умовах, регенерують АТФ за рахунок бродіння. На основі таких ознак їх довго вважали організмами, які облігатно здійснюють бродіння. Проте у них були виявлені такі ферменти, як каталаза та цитохроми. Пізніше було встановлено, що представники роду *Propionibacterium* здатні рости і в аеробних умовах (за слабкої аерації), але при цьому треба мати на увазі, що кисень все-таки є для них токсичним. Таким чином, щодо кисню пропіоновокислі бактерії є мікроаеротолерантними організмами. Крім роду *Propionibacterium*, до пропіоновокислих бактерій відносять *Veillonella alcalescens*, *Clostridium propionicum*, представників родів *Selenomonas*, *Microthospora*. В анаеробних умовах ці бактерії зброджують сахарозу, глюкозу, лактозу, пентози, а також малат, лактат, гліцерин та інші субстрати з утворенням пропіонової кислоти. Розщеплення гексоз здійснюється гліколітичним шляхом .

Пропіоновокислі бактерії нерухливі, короткі чи дрібні палички різної форми, розташовуються поодинокі, парами, короткими ланцюжками, у вигляді букв V або Y чи групами й у вигляді китайських ієрогліфів[7,8]

Пропіоновокислі бактерії краще розвиваються без доступу кисню (анаероби), проте є види, що розмножуються за незначного доступу кисню. Оптимальна температура росту пропіоновокислих бактерій становить 30 - 35 °C при рН близько 7. Для свого росту потребують наявності в середовищі білків, амінокислот, але можуть розвиватися і на простих джерелах азоту (наприклад, амонійних солях) за наявності вітамінів (пантотенової кислоти, тіаміну і біотину). Бактерії добре ростуть у бульйоні з пептоном, дріжджовим екстрактом і глюкозою в глибоких пробірках при вільному доступі повітря. Більшість штамів росте в глюкозному бульйоні з 20% жовчі і 6,5% NaCl .

На щільному середовищі пропіоновокислі бактерії утворюють дрібні колонії, що можуть набувати білого, сірого, рожевого, червоного, жовтого або жовтогарячого забарвлення.

У молоці вони розвиваються повільно та згортають його через 5 - 7 діб. Незважаючи на слабе кислотоутворення, гранична кислотність молока може досягати 160 - 170°Т .[8]

Пропіоновокислі бактерії використовують у виробництві сирів з тривалим терміном дозрівання, оскільки при розщепленні молочного цукру утворюють пропіонову і оцтову кислоти, які збагачують смак та запах сирів, а газ, що повільно накопичується, зумовлює утворення в сирі крупних вічок правильної округлої форми.

У процесі розмноження пропіоновокислі бактерії здатні синтезувати вітамін В12. Ураховуючи ці особливості (повільний розвиток, високу чутливість до умов середовища), пропіоновокислі бактерії широко використовують у сировиробництві (у складі заквасок для твердих сирів із тривалим терміном дозрівання) [8]

1.3.3. Оцтовокислі бактерії

Оцтовокислі бактерії належать до родини Acetobacteraceae, роду Acetobacter, який налічує 11 видів, але в молочній промисловості найчастіше використовують Acetobacter aceti.

Оцтовокислі бактерії викликають оцтовокисле бродіння, яке характеризується окисненням спирту спочатку в оцтовий альдегід, а потім в оцтову кислоту. Природу цього явища вперше вивчив Луї Пастер, який дослідив плівку на поверхні старого вина і виділив з неї мікроорганізми.

Усім оцтовокислим бактеріям притаманна здатність утворювати кислоти неповним окисненням цукрів або спиртів. Більшість оцтовокислих бактерій потребує для росту складних поживних середовищ. Оцтовокислі бактерії здатні рости на середовищі з етанолом. Етанол окиснюється НАД⁺ - залежними алкоголь та

ацетальдегіддегідрогеназами з утворенням ацетату та двох молекул НАДН. Утворений НАДН використовується для одержання АТФ у дихальному ланцюгу. Крім етанолу, оцтовокислі бактерії окиснюють велику кількість інших спиртів до відповідних кислот і кетонів: пропанол > пропіонат; ізопропанол > ацетон; гліцерин > діоксиацетон; глюкоза > глюконат; глюконат > 5-оксоглюконат.

Ці організми не здатні до синтезу катаболічних ферментів, необхідних для високоактивного розщеплення цих субстратів. У результаті кислоти й спирти виділяються до середовища. Оцтовокислі бактерії характеризуються наявністю ПХХ-залежної глюкозодегідрогенази .

Особливий інтерес викликає здатність оцтовокислих бактерій окиснювати D-сорбітол до L-сорбози. Сорбоза потрібна у великих кількостях для синтезу вітаміну С [8,9].

Оцтовокислі бактерії досить поширені в природі. Містяться на фруктах і овочах, у скислих фруктових соках, оцеті, алкогольних напоях. Входять до складу природної симбіотичної закваски для кефіру.

Acetobacter aceti мають вигляд дрібних, прямих або дещо вигнутих паличок. Іноді трапляються еліптичні, подовжені, ниткоподібні, розгалужені форми або форми, що мають здуття. Рухливі, проте бувають нерухомі штами. За Грамом, фарбуються негативно. Спор і капсул не утворюють. Клітини розташовуються хаотично - по одній, у парах (диплококи), часто в ланцюжках.

Оптимальна температура розвитку становить 30°C. Температурні межі розвитку 5 - 42°C, оптимум рН 5,4 - 6,3, можуть рости при рН 4,0 - 4,5, при рН 7,0 - 8,0 майже не ростуть. Ростуть на простих і складних живильних середовищах, більшість штамів не має потреби у вітамінах. Чітко виражені анаероби.

Чисті культури оцтовокислих бактерій погано розвиваються в молоці, але їхній ріст покращується при спільному культивуванні з молочнокислими бактеріями.

Характерними ознаками для оцтовокислих бактерій є утворення ними оцтової кислоти, помаранчевого кільця на поверхні згорнутого молока, наявність плівки на поверхні рідких підкислених середовищ, наявність у мікроскопічних препаратах рухливих форм бактерій .

У виробництві кефіру вони відіграють позитивну роль при помірному розвитку, але в разі їх розвитку в сметані, сирі та кисляку вони можуть викликати небажаний запах і присмак оцтової кислоти, ослизнення продукту. Крім того, оцтовокислі бактерії використовують для отримання харчового оцту з вина.[8]

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Біохімічні перетворення, які здійснюються під впливом біологічних агентів

Основним продуктом що розглядається є бактеріальна закваска, сформована з біомаси мікроорганізмів. Тому до біохімічних перетворень у даному випадку прийнято відносити весь метаболізм мікроорганізмів, важливий для напрацювання окремих сполук, що входять до складу біомаси.

Переважаючу більшість закваски становлять молочнокислі бактерії (МКБ), які використовують вуглеводи як джерело свого катаболізму. Спрощена схема метаболічних шляхів МКБ представлена на рисунку(2.1)[13]

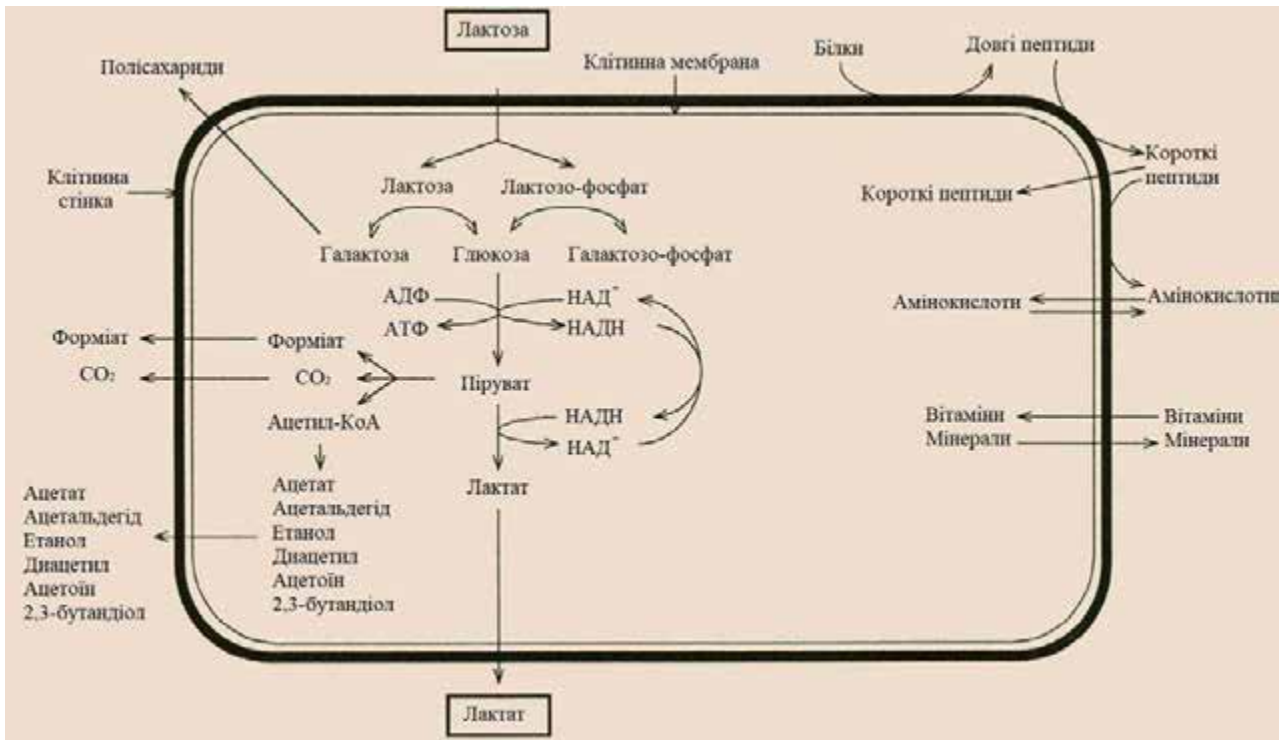


Рис. 2.1. Спрощена схема метаболічних шляхів молочнокислих бактерій [13]

Виокремлюють два типи метаболізму вуглеводів у МКБ: гомо- та гетероферментативне бродіння .

Гомоферментативні МКБ катаболізують глюкозу за допомогою шляху Ембдена-Меєргофа-Парнаса з лактатом як основним кінцевим продуктом (принаймні 85 % лактату зі 100 % глюкози).[14]

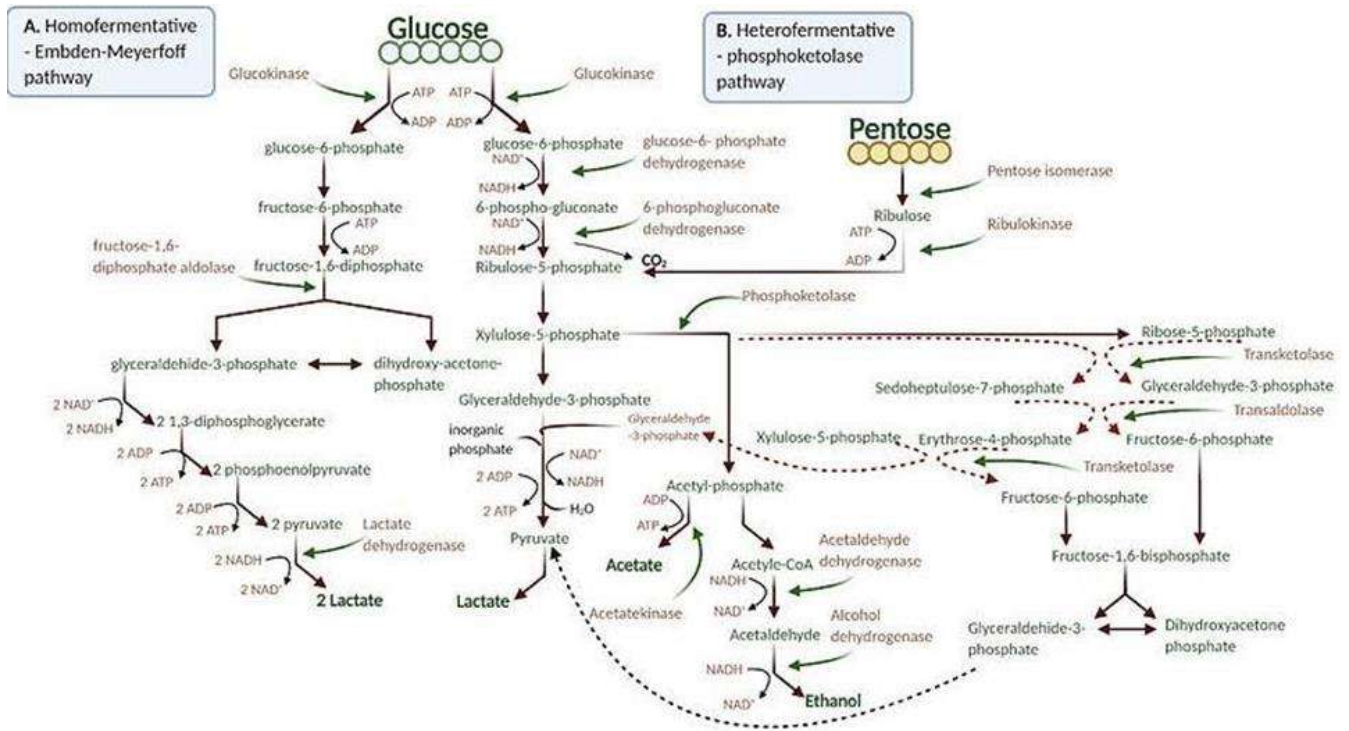


Рис. 2.2. Схема гомо- та гетероферментативного бродіння у МКБ

Через відсутність альдолази та тріозофосфатізомерази гетероферментативні МКБ метаболізують глюкозу шляхом утворення еквімолярних кількостей лактату, етанолу та вуглекислого газу через пентозофосфатний шлях. Під час цих реакцій з одного моля глюкози утворюється лише один моль АТФ, тоді як під час гомоферментативного бродіння утворюється 2 моль АТФ.

У присутності електронно-акцепторних речовин, таких як фруктоза, цитрат, малат, fumarat, кисень або ненасичені жирні кислоти і при наявності ацетаткінази може формуватися ацетат та ще одна молекула АТФ. За цих умов гетероферментативне бродіння також призводить до утворення 2 моль АТФ [15].

Один цікавий механізм взаємодії між дріжджами та МКБ реалізується в присутності дріжджів, що засвоюють молочну кислоту. Накопичення лактату пригнічує ріст МКБ, навіть якщо рН підтримується додаванням лужних розчинів до середовища. Проте дріжджі, які не використовують лактозу, наприклад *S. unisporus*, можуть використовувати лактат у якості джерела вуглецю, що призводить до підвищення рН і довгострокового росту МКБ.

Спиртове бродіння дріжджів р. *Saccharomyces*, що входять до складу закваски для

кефіру, відбуваються за шляхом Ембдена-Меєргофа-Парнаса (аналогічним для гомоферментативних МКБ, рис. 3.2) до утворення пірувату. За відсутності кисню НАДН повторно окислюється при спиртовому бродінні: Піруват під дією піруватдекарбоксилази формує CO₂ та ацетальдегід, який у свою чергу відновлюється до етанолу під дією алкогольдегідрогенази [16].

Утворення оцтової кислоти відбувається двома шляхами:

1. Зворотня реакція формування ацетальдегіду з етанолу під дією алкогольдегідрогенази (з відновленням НАД); формування оцтової кислоти від впливом дегідрогенази (зі ще одним відновленням НАД).
2. Біотрансформація пірувату – утворення ацетил-КоА окисненням пірувату під дією піруватдегідрогенази, подальша фосфотрансацетилазна реакція формування ацетилфосфату і кінцева реакція формування ацетату під дією ацетаткінази із відновленням однієї моль АТФ [17].

Хоча переважаючим метаболітом є молочна кислота, очевидно, що другорядні метаболіти важливі для якості та ідентичності кінцевого продукту. Ці другорядні метаболіти часто є леткими і сприяють формуванню специфічного смаку та аромату кінцевого продукту.

Мікроорганізми *Lactococcus diacetylactis* є найважливішими ароматоутворюючими бактеріями у заквасці для кефіру. Вони єдині здатні використовувати цитрат як джерело енергії та метаболізувати його до ацетону, діацетилу та CO₂ [17]. Метаболізм *Lactococcus diacetylactis* наведений на рисунку 3.3 (реакції, що генерують НАДН, показані синіми стрілками, тоді як реакції, що споживають НАДН, показані червоними стрілками).

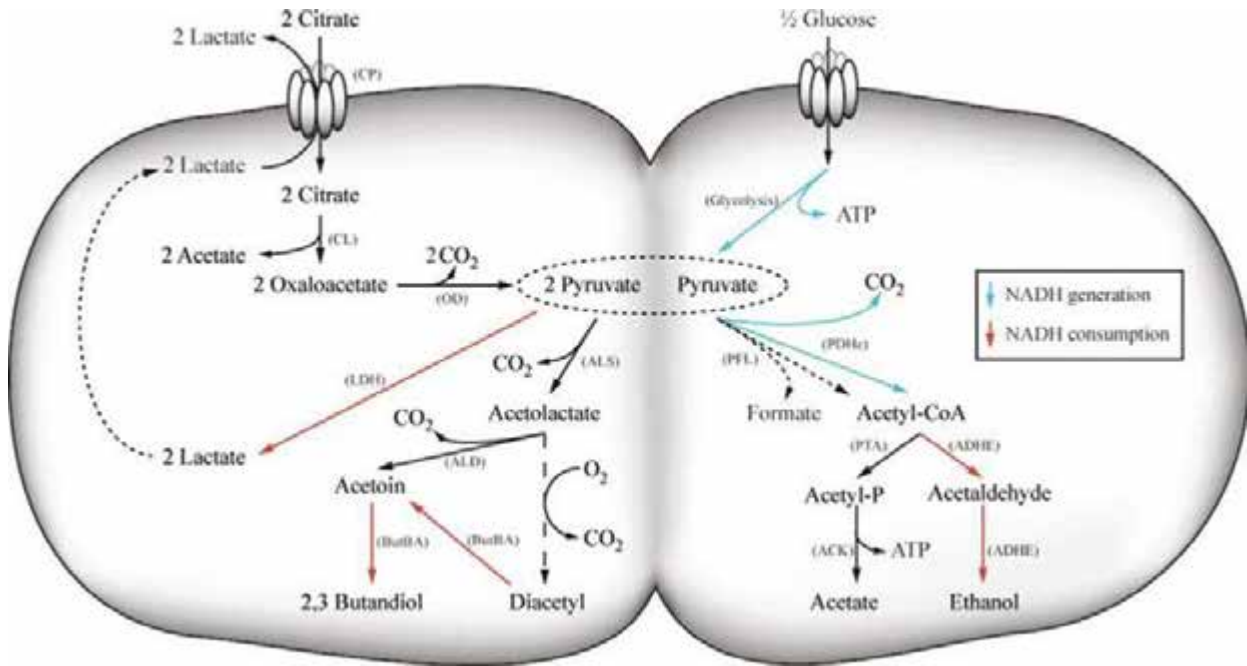


Рис. 2.3. Центральний метаболізм *Lactococcus diacetylactis*.

Абревіатури для ферментів: CP - цитратпермеаза; CL - цитратліаза; OD - оксалоацетатдекарбоксилаза; ALS - α -ацетолактатсинтаза; ALD - α -ацетолактатдекарбоксилаза; ButBA - бутандіолдегідрогеназа; ЛДГ - лактатдегідрогеназа; PFL - піруватформіатліаза; PDHc - піруватдегідрогеназний комплекс; PTA - фосфотрансацетилаза; ACK - ацетаткіназа; ADHE – алкогольдегідрогеназа

Як видно із рисунку 2.3, у *Lactococcus diacetylactis* цитрати транспортуються в клітину через цитратпермеазу (CP) і розщеплюються цитратліазою (CL) на ацетат і оксалоацетат. Останній декарбоксилюється оксалоацетатдекарбоксилазою (OD) у піруват. Таким чином, споживання цитрату збільшує пул пірувату, не збільшуючи напрацювання НАДН у клітині.[18]

2.2. Мікрофлора кефірної закваски

Ферментація кефіру є складною взаємодією різних мікробних штамів, сполук субстрату, співвідношення кефірних зерна до субстрату та умов навколишнього середовища, які можуть суттєво вплинути на кінцеві властивості кефірних напоїв.

Інгредієнти, які використовуються для виготовлення кефіру, - це молоко та кефірні зерна, які містять суміш дріжджів, оцтовокислих молочнокислих бактерій.

Під час бродіння кефіру дріжджі відповідають за перетворення лактози в етанол і вуглекислий газ. Лактоза також гідролізується через систему пермеату лактози або фосфоенолпіруватзалежну фосфотрансферазну систему, в свою чергу перша гідролізує лактозу до глюкози та галактози, тоді фосфотрансферазна система гідролізує лактозу до глюкози та галактозо-6-фосфату під дією ферменту β -галактозидази.

Молочнокислі бактерії використовують два основні шляхи для метаболізму лактози: гомоферментативний шлях, що призводить до виробництва молочної кислоти, і гетероферментативний шлях, що продукує комбінацію кінцевих продуктів, включаючи вуглекислий газ, етанол, оцтову кислоту та молочну кислоту.

Оцтова кислота також виробляється оцтовикослими бактеріями. Накопичення органічних кислот з цих шляхів дозволяє кефіру значно затримати розвиток патогенних мікроорганізмів. Окрім утворення органічних кислот, молочнокислі бактерії також виробляють ароматичні сполуки, такі як ацетальдегід, діацетил та ацетоїн. У той же час бродіння кефіру також призводить до виробництва інших метаболітів, включаючи амінокислоти, пептиди та вітаміни. Хоча концентрація деяких вітамінів, наприклад, вітамін B₁, вітамін B₁₂, фолієва кислота, вітамін K і рибофлавоноїди, збільшуються в концентрації під час бродіння, інші використовуються мікробіотою закваски.

Загалом, кефір — це ферментований напій, який готується за допомогою закваски на основі кефірних грибків, що містить дріжджі та бактерії, для забезпечення

молочнокислого та оцтовокислого бродіння . Цукор що знаходиться в субстраті перетворюється на метаболітів, включаючи органічні кислоти, спирти та газу. [7,9]

2.3 Взаємодія компонентів закваски

Точна мікробіота вихідного продукту не є чітко визначеною, оскільки вона залежить від джерела закваски, умов росту, технологій обробки та типів субстратів. Походження закваски відіграє одну з найважливіших ролей у визначенні мікроорганізмів, присутніх в кефірному продукті , оскільки на нього можуть впливати кліматичні та екологічні умови в конкретному регіоні, що призводить до домінування певних штамів мікроорганізмів. організмів і еволюцію різних типів бродіння в цій області. Крім того, тип субстрату має значний вплив на різновид на співвідношення компонентів закваски, оскільки він забезпечує джерела поживних речовин та енергії для росту та розмноження мікроорганізмів.

Відносини між бактеріями та дріжджами в обох консорціумах є складними. Між ними можуть одночасно виникати як коменсальні, так і аменсальні процеси. Основна мікробіота кефірних зерен містить групи молочнокислих бактерій , що представлені родами: *Lactococcus* , *Leuconostoc* і *Streptococcus* , як гомоферментативні, так і гетероферментативні види *Lactobacillus* , дріжджами з родів *Kluveromyces* і *Saccharomyces*, а також оцтовокислими бактеріями [19]. На частку молочнокислих бактерій припадає приблизно 83-90% кількості мікробів в складі кефірних зерен, тоді як дріжджі становлять 10-17% [20].

Мікроорганізми сприяють користі кефіру для здоров'я та організму людини , або безпосередньо як пробіотики, або опосередковано, внаслідок вивільнення метаболітів.

Пробіотики можна визначити як мікроорганізми, які є живими, непатогенними та корисними для господаря у відповідній дозі. Відповідно до визначення Продовольчої та сільськогосподарської організації та Всесвітньої організації охорони здоров'я. Деякими прикладами пробіотиків, виділених із кефіру, є бактерії,

включаючи *Lb. acidophilus* , *Lc. casei* , *Lc. rhamnosus* , *Bifidobacterium lactis* і *Bacillus coagulans* і дріжджі, включаючи *Km. marxianus* , *S. cerevisiae* і *S. boulardii*. Крім того, метаболіти, що виробляються мікробами під час бродіння, включаючи протеолітичні ферменти, органічні кислоти (наприклад, глюкуронову кислоту) і екзополісахариди.[20]

2.4 Вплив продукту ферментації кефірними грибами на організм

Антиоксидантні

Надмірно накопичені вільні радикали, такі як активні форми азоту і активні форми кисню які утворюються в нашому тілі можуть становити велику загрозу. Вони уражають біологічні структури, включаючи генетичні матеріали, білки, ліпіди та вуглеводи локалізованих клітин тіла. Щоб запобігти цьому окислювальному пошкодженню, споживання кефіру є ефективним, оскільки він має антиоксидантну дію, що виникає внаслідок взаємозалежних зв'язків між мікроорганізмами що містяться в та їх сполуками.

Поліфеноли, які є групою природних антиоксидантів у їжі, захищають .У молочному кефірі антиоксиданти включають пептиди (з гідролізату молочного казеїну), амінокислоти (особливо тирозин, триптофан, цистеїн і таурин), вітаміни А і Е, каротиноїди та ферментні системи (супероксиддисмутаза, каталаза та глутатіонпероксидаза). Кефіран, тип екзополісахариду, який виділяється культурою в кефірних зернах, також був визнаний одним із ефективних антиоксидантів у кефірі. Для прикладу антиоксиданти в виготовленому напої допомагають запобігати перекисному окисленню ліпідів , автоокисленню аскорбату і окисленню білка .

Також було виявлено, що ферментація кефірних зерен підвищує антиоксидантну здатність вихідної сполуки , в даному випадку молока. Молочний кефір продемонстрував сильнішу здатність поглинати вільні радикали, ніж молоко, ймовірно, через вивільнення молочних пептидів із кефірних зерен. Антиоксидантні властивості кефіру також зберігалися принаймні 21 день під час його зберігання.[20,21]

Загалом, бродіння підвищує антиоксидантний потенціал напою порівняно з неферментованими аналогами. Антиоксиданти в кефірі захищають ендотеліальні клітини, зменшуючи окислювальний стрес, таким чином знижуючи ризики атеросклерозу та серцевого нападу, в свою чергу запобігти цим серцево-судинним захворюванням, зупиняючи окислення ліпопротеїнів низької щільності регулюючи метаболізм холестерину та сприяючи розслабленню гладкої мускулатури.

Зниження артеріального тиску та холестерину

У зв'язку з антиоксидантними здібностями, пацієнти, які страждають від серцево-судинних захворювань, які в основному викликані гіпертонією та гіперхолестеринемією, отримують користь від споживання чайного гриба та кефіру, який, як вважається, знижує артеріальний тиск і рівень холестерину Кефір, особливо пептиди, потенційно знижує артеріальний тиск через пригнічення дії ангіотензин-перетворюючого ферменту (АПФ).

АПФ викликає гіпертензію, оскільки він розщеплює брадикінін, який сприяє вазодилатації та каталізує утворення гормону ангіотензину II, що призводить до вазоконстрикції та підвищення артеріального тиску Інгібування АПФ було збільшено до 82% і 93% завдяки біоактивним пептидам, які вивільнялися відповідними *Lc. casei* через ферментативний протеоліз під час 72-годинної ферментації молока.

Щури, яких годували кефіраном виробництва *Lb. kefiranoferens* також значно знизили активність АПФ у сироватці крові до 19,8 одиниць/л і в грудній аорті до 19,9 міліодиниць/мг білка порівняно з контролем на 21,7 одиниць/л і 23,2 міліодиниць/мг.[21]

Гіпертонія та накопичення холестерину можуть призвести до закупорки кровоносних судин, збільшуючи ризик серцевого нападу та інсульту. На щастя, поліфеноли в чайному грибі блокують панкреатичну ліпазу холестерину та поглинання триацилгліцерину.

Катехіни (поліфеноли) знижують рівень холестерину, зменшуючи розчинність і заохочуючи фекальну екскрецію холестерину і тригліцеридів. Споживання кефіру, на основі молока, кефіру з соєвого молока, та кефірану на основі ліофілізованого концентрату *Lp. plantarum*, який був витягнутий із зерен тибетського кефіру, знижував рівень холестерину у вигляді вільного холестерину та загального рівня тригліцеридів у щурів. У дослідженнях Лю та ін., Маеда та ін. і Wang et al., зниження рівня холестерину спостерігалось не тільки в сироватці крові, але й в інших частинах тіла (печінці та грудній частині аорти), що вказує на загальне зниження, а не на перерозподіл в організмі. Пробиотичні МО виконують наступні ролі: (а) запобігаючи всмоктуванню холестерину з тонкої кишки, так як вони зв'язують, та асимілюють холестерин; (б) припинення дії синтезуючої холестерину ГМГ-КоА-редуктази з деякими їх метаболітами (такими як пропіонова кислота); і (с) декон'югація (активність гідролази бактеріальної солі жовчних кислот) жовчних кислот, які дренують пул холестерину. Виділяючи ферменти, що руйнують холестерин, культури, виділені з кефірних зерен, засвоювали холестерин до 62,5% і 84,2% протягом 24 годин інкубації при 20 °С і 48 годин зберігання при 10 °С. Було доведено, що така поведінка бактерій залежить від штаму, і деякі приклади бактерій, що асимілюють холестерин, є *Lb. acidophilus*, *Lp. plantarum* і *Lc. paracasei* та деякі штами *Bifidobacterium*.

Протизапальний і модулюючий імунітет

Наприклад, було продемонстровано, що кефір сприяє проліферації клітин, які виробляють інтерлейкін 10 (IL-10), добре відомий протизапальний цитокін. Цікаво, що дослідження Vinderola et al. припустили, що цей ефект був більш вираженим у біогенності мікробіоти кефіру (пептиди та поліпептиди, протеолізовані з казеїну молока), а не в самій мікробіоті кефіру.

Зазвичай оксид азоту (NO) вивільняється індукцибельною синтазою оксиду азоту в макрофагах як імунна відповідь, але його накопичення може викликати запалення. Окрім імуносупресивної дії у випадках запалення, компоненти кефіру також модулюють імунну систему, підвищуючи імунітет. Вітамін С і В2, сильні

антиоксиданти потенційно допомагають і підтримують імунну систему.

Серед щурів, яким перорально вводили кефір, була посилена специфічна імунна відповідь слизової оболонки кишечника проти холерного токсину, що супроводжувалося більшою кількістю загальних клітин IgA на 281 мг/л з 206 мг/л і загальних клітин IgG на рівні 12 551 мг/л з 5578 мг/л у молодих дорослих щурів. Секреторний IgA здійснює імунне виключення, блокуючи проникнення мікробних патогенів і антигенів, тісно співпрацюючи з неспецифічними захисними механізмами.

Подібні висновки були отримані в дослідженні Vinderola et al. разом зі збільшенням кількості клітин IL-4+, IL-10+ та IL-6+ у тонкій кишці. Для перорального кефіру з відповідним співвідношенням розведення 1/100 і 1/200 більша кількість клітин IgA+ при 99,5 і 86,7 N° клітин IgA+/10 полів і клітин IgG+ при 38,6 і 35,6 N° клітин IgG+/10 полів, відповідно, відносно контролю з 81,2 N° клітин IgA+/10 полів і 35,0 N° клітин IgG+/10 полів, також спостерігалось на рівні слизової оболонки кишечника мишей через два дні. Крім того, Vinderola та ін. підкреслив, що споживання кефіру збільшило активність перитонеальних і легеневих макрофагів щодо поглинання патогенів

Протимікробний

Мікробіота кефіру виділяє органічні кислоти як побічні продукти під час процесу бродіння. Органічні кислоти важливі для надання цим напоям антимікробних властивостей, оскільки середовище з низьким рН є несприятливим для патогенних бактерій.

Кефір містить органічні кислоти разом з різними антимікробними метаболітами, включаючи перекис водню, ацетальдегід, вуглекислий газ і бактеріоцини, які виділяються бактеріями, присутніми в кефірних зернах, зокрема *Lp. plantarum* ST8KF *acidophilus* і *Lb. kefirianofaciens*, також показали значний антимікробний потенціал, інгібуючи всі перевірені бактерії *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri* та *Yersinia enterocolitica*. За допомогою скануючої електронної мікроскопії було доведено, що клітинні

структури клітин Сасо-2 (культивованих ентероцитів) були добре захищені від атаки штаму *B. cereus* B10502 у присутності кефірану, також в дослідженні припустили, що антимікробний потенціал кефірану проти *B. cereus* залежить від дози, оскільки 1% кефірану не було достатньо ефективним для інгібування патогену, але 5% кефірану пригнічував утворення спор і знижував концентрацію спор. Це пов'язано з кількістю органічних кислот, вивільнених мікробіотою під час бродіння, що відображається на змінах рН.

Загалом, усі наведені антимікробні можливості кефіру означають, що вживання даного напою може зменшити або запобігти мікробній контомінації організму, оскільки їхній антимікробний потенціал був подібний до деяких антибіотиків, наприклад, гентаміцину та ампіциліну. Кефірні зерна, що містять *Leuconostoc* spp., *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis*, *Acetobacter* spp., *S.cerevisiae*, *Km. marxianus* і *Km. lactis* також дослідили щоб підтвердити антимікробну дію на діарейні захворювання, інфекції сечовивідних шляхів, сальмонельозні та стрептококові інфекції та інфекції *Helicobacter pylori*. Ці напої також можна використовувати як природні консерванти в інших харчових продуктах.[21]

Антидіабетичний

Діабет часто асоціюється з гіперглікемією (високий рівень цукру в крові). Діабет 2 типу, що виникає внаслідок недостатньої дії або секреції інсуліну, є загальновизнаною глобальною проблемою охорони здоров'я.

Гіперглікемічний стан завдає шкоди організму через сильний окислювальний стрес і довготривале пошкодження тканин і ускладнення, наприклад, дисфункції печінки та нирок. Пацієнти з діабетом, яким не вистачає інсуліну, також можуть зіткнутися з раптовою втратою ваги через надходження глюкози з організму через глюконеогенез замість асиміляції в тонкому кишечнику, що призводить до зменшення та втрати м'язової тканини та адипоцитів.

Кефір демонструє антидіабетичні властивості, оскільки містить оцтову кислоту в 1,78-2,71 г/л і пропіонову кислоту в 0,57-0,59 г/л. Спровоковані пробіотиками в кефірі, включаючи *Lactobacillus* і *Bifidobacteria*, кишкові мікроби сприяли

вивільненню інсулінотропних поліпептидів і глюкагоноподібного пептиду-1, які підвищують поглинання глюкози м'язами, таким чином знижуючи рівень глюкози в крові. Споживання кефіру, що містить *Sc.термофіли*, *Lb.acidophilus*, *Lc. casei* та *Bifidobacterium lactis* протягом 8 тижнів серед хворих на цукровий діабет значно знизили резистентність до інсуліну про що свідчить НОМА-IR(індекс інсулінорезистентності), з 7,05 до 4,93, тоді як в іншому дослідженні з використанням кефіру з ідентичною основною мікробіотою різке зниження параметрів для діагностики цукрового діабету, включаючи рівень глюкози в крові, від 161,63 до 139,22 мг/дл, і глікованого гемоглобіну (HbA1C) пацієнтів, від 7,61 до 6,40, був значно вищим, ніж у тих пацієнтів, які споживали звичайне кисломолочне молоко, тобто від 183,42 до 182,16 мг. /дл і від 6,98 до 7,00 відповідно.

Детоксикація та захист печінки та крові

Проблеми з печінкою, що виникають через діабет, гепатотоксини або канцерогени, є хронічними, оскільки печінка має важливе значення в організмі як модулятор фізіологічних процесів. Кабірі та ін. провели дослідження, щоб визначити вплив споживання чайного гриба на захист печінки шляхом індукції пошкодження печінки у щурів за допомогою тіоацетаміду, токсину, що викликає фіброз печінки.

Кефір у дозі 140 мг/кг мав помітно нижчу активність біохімічних маркерів уражень печінки, особливо для НАЖХП(Неалкогольна жирова хвороба печінки), тобто сироваткової глутамат-оксалоацетат-трансамінази та глутамат-піруват-трансамінази, на 636,4 та 492,7 одиниць/л відповідно, порівняно з необробленими препаратами на 1433,4 та 1183,8 одиниць/л, а також зниження рівня тригліцеридів на 26% і загального холестерину на 27% у печінці, що також потенційно пов'язане зі здатністю кефіру знижувати вміст холестерину. Тяжкість ураження печінки, викликаного токсичним азоксиметаном, також зменшилася при прийомі кефіру .[18,20,21]

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНОЇ РОБОТИ

3.1 Характеристика антаганістичних властивостей кефірної закваски

Як було сказано кефір – продукт молочнокислого та спиртового бродіння, що виробляють сквашуванням молока симбіотичною кефірною грибковою закваскою. У результаті ферментування у цьому кисломолочному напої накопичується значна кількість молочної кислоти, етанолу, вуглекислого газу, а також смакоароматичних сполук. Завдяки їм формуються специфічні ознаки продукту та посилюються функціональні властивості, а утворення деякими мікроорганізмами бактеріоцинів, специфічних біологічно активних полісахаридів зумовлює пригнічення росту патогенної мікрофлори.[1].

Антагоністичні взаємовідносини обумовлені високим ступенем конкурентності мікрофлори, що залежить від енергії кислотоутворення, стійкості до кінцевих продуктів бродіння (молочної, оцтової та інших кислот), потреб у поживних речовинах, низького рівня окисно-відновного потенціалу (неспецифічний антагонізм) та спричинені дією специфічних факторів (утворення перекису водню, метаболітів антибіотикоподібної природи, бактеріоцинів). Зокрема відомо, що потенціал антагоністичної активності мікробної асоціації кефірного грибка зростає за рахунок вироблення нейтральних ліпідів, амінокислот, коротколанцюгових жирних кислот ферментів, лізоциму, які руйнують стінки бактеріальних клітин.[2,3]

Оскільки відомо, що молочнокислі бактерії та дріжджі пригнічують життєдіяльність патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів і здатні до їхнього конкурентного витіснення, науковий та практичний інтерес становить вивчення антагоністичних властивостей кефірних заквасок.

Розглянемо це на прикладі кефірної заквашувальної композиції на основі природного симбіозу грибкової кефірної закваски у кількості 25% з додатковим залученням виділених виключно з кефірних грибків лактобактерій :видів *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* та лактозонегативних дріжджів *Saccharomyces*

unisporus.[3,4,5]

3.2 Мета дослідження

Аналіз антагоністичної активності грибової кефірної закваски та бактеріальної композиції для виробництва кефіру щодо основних небезпечних контамінантів. Об'єктами досліджень були грибово-кефірна закваска (ГКЗ), заквашувальна композиція (ЗК), дріжджі виду *Saccharomyces unisporus*, 15 штамів тест-культур видів *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morganii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus rettgeri*.

3.3 Матеріали та методи дослідження

Антагоністичну активність заквасок щодо тест-культур визначали методом «лунок» за величиною зон затримки росту [5], а також за приростом чисельності відповідної тест-культури порівняно з її початковим вмістом під час спільного культивування у молоці упродовж 5 діб за кількості інокуляту 1%.

Добові тест-культури змивали з поверхні м'ясо-пептонного агару (МПА) фізіологічним розчином та доводили густину бактеріальної суспензії за стандартом мутності Мак-Ферлана до 10^8 КУО/см³. Для одержання грибової кефірної закваски у пастеризоване знежирене молоко вносили кефірні грибки за співвідношення «грибки : молоко» 1:30 та здійснювали культивування за температури (20 ± 2) °C упродовж 16-20 годин до утворення згустку. Кількість життєздатних клітин бактерій визначали стандартними методами: молочнокислої мікрофлори – згідно з ГОСТ 10444.11-89, дріжджів – згідно з ГОСТ 10444.12-88, *Staphylococcus aureus* – згідно з ГОСТ 10444.2-94. Чисельність мікроорганізмів роду *Escherichia* sp. аналізували методом висіву серійних розведень на селективне хромогенне середовище (Coliform-agar), *Bacillus subtilis* – на середовище МПА. Рівень активної кислотності визначали потенціометрично.[4]

3.4 Нормативні вимоги до продукту та сировини

Смак щипкий, без сторонніх присмаків і запахів, запах – чистий, кисломолочний. У кефірі контролюють кількість життєздатних молочнокислих бактерій, яка має бути не меншою ніж $1 \cdot 10^7$ КУО/см³ та дріжджів – не менше ніж $1 \cdot 10^3$ КУО/см³ (таблиця 1). Слід зауважити, що показник вмісту дріжджів на останній день зберігання продукту у країнах ЄС розрізняється, зокрема, відповідно до 3 стандарту IDF кількість дріжджів повинна бути не меншою ніж 104 КУО/см³, тоді як за національними стандартами різних країн цей показник варіює: у Польщі - 102 КУО/см³, Литві – 103 КУО/см³, Росії - 104 КУО/см³. [9,10]

Таблиця 1. Мікробіологічні показники кефіру згідно з ДСТУ 4417:2005

Показник Норма	Показник Норма
Кількість життєздатних молочнокислих бактерій, КУО в 1 см	Кількість життєздатних молочнокислих бактерій, КУО в 1 см
3	3
,	,
не менше ніж	не менше ніж
$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$
Кількість дріжджів, КУО в 1 см	Кількість дріжджів, КУО в 1 см

Якість кисломолочних напоїв та їх стійкість за тривалого зберігання значною мірою залежить від якості молока-сировини та біфідобактерій, які використовуються в якості закваски. Молоко, що надходить на переробку, повинно відповідати вимогам, які ставляться до нього як до сировини для молочної галузі. Отримане від здорових тварин молоко має солодкуватий смак з легким запахом. Такий смак молока надають лактоза, білки, жир та мінеральні речовини [5]. Молоко має білий чи злегка жовтуватий колір, інтенсивність забарвлення залежить від кількості каротину в жирі молока. Консистенція молока однорідна, без пластівців та згустків. Основний показник якості молока – кислотність. Розрізняють активну і загальну кислотність. Активна кислотність молока виражається величиною рН і характеризує

концентрацію вільних іонів водню. Вона становить 6,3 – 6,9. Титрована кислотність натурального молока коливається в межах 16 – 18 о Т. Густина коров'ячого молока складає від 1,027 до 1,032 г/см³. Чим менший вміст в молоці бактерій і механічних домішок, тим воно краще. Зазвичай молоко містить 100 – 300 бактерій в 1 мл. Молоко вважається бактеріально чистим, якщо вмісті бактерій в 1 мл становить не більше 200 – 300 тис. При вмісті в 1 мл більше 500 тис бактерій – молоко вважається забрудненим. При вмісті мікроорганізмів в 1 мл менше 200 тис бактерій, молоко відноситься до виключно чистого. Вимоги до якості молока регламентуються Державним Стандартом України: ДСТУ 3662 – 97 «Молоко коров'яче незбиране. Вимоги при закупівлі» [6]. Вимоги до якості молока коров'ячого незбираного наведені у таблиці

Таблиця 1 Вимоги до якості молока відповідно до ДСТУ 3662 – 97

№ п/п	Показник	Норми для гатунків		
		вищий	I	II
1.	Кислотність, Т	16 - 17	Не вище 19	Не вище 20
2.	Загальне бактеріальне обсіменіння в 1 см ³ , не більше тис.	< 300	< 500	<3000
3	Ступінь чистоти за еталоном, група	I	I	II
3.	Масова частка сухої речовини, %, не менше	11,8	11,5	10,6
5.	Температура, °С, не вище	8	10	10
6.	Кількість соматичних клітин в 1 см ³ , не більше, тис	400	600	800

3.5 Результати дослідження.

Результати з визначення антагоністичної активності ГКЗ, заквашувальної композиції ЗК та дріжджів виду *Saccharomyces unisporus*, що входять до складу заквашувальної композиції, показали їхню високу здатність до пригнічення росту патогенної та умовно-патогенної мікрофлори (табл. 3.1).

Тест-культура	Кількість штамів в тест-культурі	Величина зон затримки росту тест-культур, мм		
		ГКЗ	ЗК	<i>Saccharomyces unisporus</i> 5502
<i>Escherichia coli</i>	3	14±4	15±2	19±10
<i>Escherichia blattae</i>	1	21±3	15±1	25±2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	18±2	15±1	29±4
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	15±3	16±4	14±5
<i>Staphylococcus epidermis</i>	1	19±2	13±3	29±2
<i>Bacillus subtilis</i>	2	32±3	30±2	32±4
<i>Proteus sp.</i>	3	14±4	12±1	12±3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	8±1	8±1	12±1

Таблиця 4.1

Антагоністична активність грибової кефірної закваски, заквашувальної композиції для виробництва кефіру та дріжджів

У дослідженні було виявлено, що більшість проаналізованих патогенних і умовно патогенних бактерій продемонстрували чутливість до впливу заквашувальних культур. Таким чином, зони пригнічення росту спороутворювальних мікроорганізмів *Bacillus subtilis* варіювали від 28 до 36 мм, бактеріальної групи кишкової палички *Escherichia blattae* – від 14 до 27 мм, а стрептококів у вигляді *Streptococcus epidermis* – від 10 до 31 мм. Як показали експериментальні дані, кефірні грибові закваски (КГЗ) та дріжджі виявляють більш виражену антагоністичну активність проти тест-культури, особливо мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, порівняно з традиційними заквашувальними культурами (ЗК). Це пояснюється дією лактобацилів і компонентів грибової мікробіоти, які у процесі метаболізму людських органічних кислот, включно з молочною кислотою та коротколанцюговими жирними кислотами.

Менш виражений антагоністичний ефект ЗК пов'язаний з тим, що вони містять лише твердість мікробного симбіозу кефірних грибків. Разом із тим, кефірні закваски та дріжджі показали слабе інгібування псевдомонад (7–13 мм) і бактерій роду *Proteus* (10–18 мм). Варто зазначити, що результати, отримані на твердих середовищах, не завжди відображають взаємодію між мікроорганізмами за умов виробництва. У поганому середовищі, зокрема молоці, кількість життєздатних клітин і антимікробних речовин, які вони виділяють, може зменшуватися.

Отже, оцінка впливу заквашувальної мікрофлори на ріст мікроорганізмів, а також виживання патогенів під час виробництва кефіру є аспектом, який має ключове значення для забезпечення безпеки й якості кінцевого продукту. Спільний ріст тест-культурних і заквашувальних культурних у молоці продемонстрував, що мікрофлора ефірних заквасок має згубний вплив на контамінантні бактерії.[3-4]

(рис. 3.1).

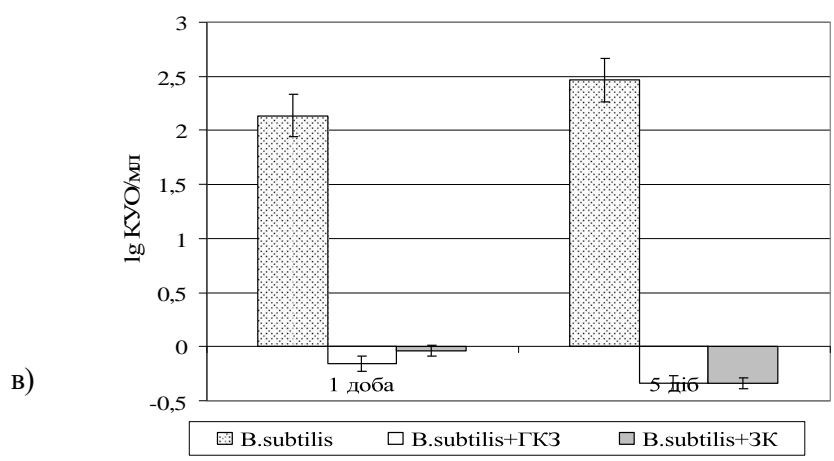
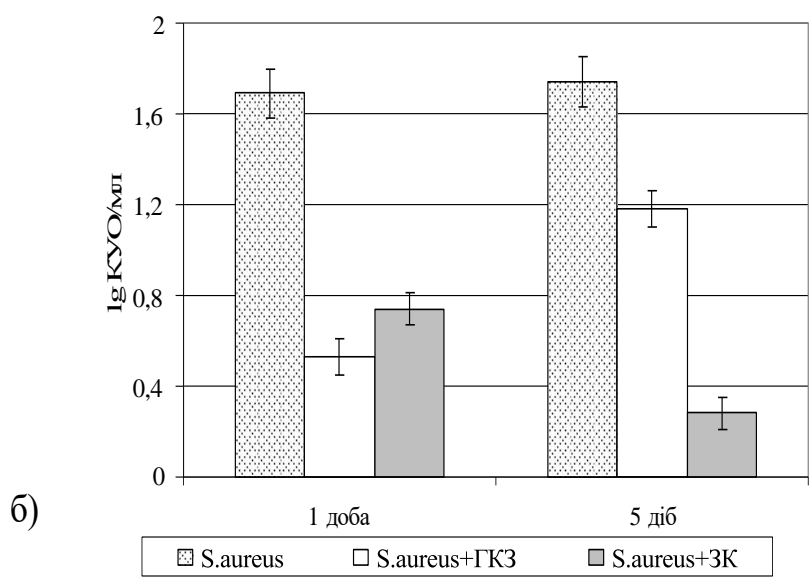
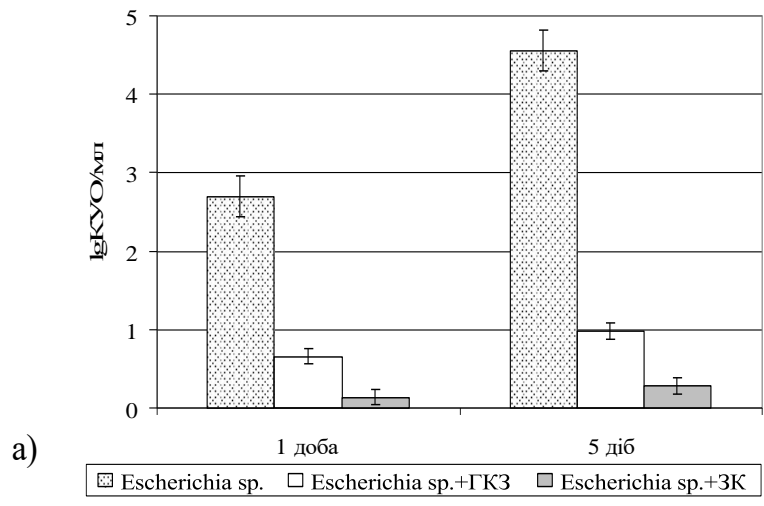


Рис. 4.1. Індекс антагоністичної активності ГК3 та ЗК щодо тесткультур під час спільного культивування з упродовж 5 діб: а) - *Escherichia sp.*, б) - *S.aureus*, в) *B.subtilis*.

Дослідження показали, що чисельність усіх тест-культур значно зменшилася в продуктах, вироблених із використанням як симбіотичної грибової закваски (ГКЗ), так і новоствореної заквасної культури (ЗК). Найбільш чутливими ви розвиваєте клітини *Bacillus subtilis* : їх чисельність при спільному культивуванні з ГКЗ та ЗК знижувалася з 0,16 lg КУО/см³ на перший добу до 0,35 lg КУО/см³ через п'ять днів зберігання, збільшившись з початковим рівнем у 4,34 lg КУО/см³. Натомість у пробах молока, інокульованого тільки *B. subtilis* , їх чисельність досягала 6,48 lg КУО/см³ до кінця зберігання.[1]

Спільне вирощування заквашуваної мікрофлори з бактеріями роду *Escherichia* також демонструвало значне зниження росту кишкової палички в порівнянні з її чистою культурою. Проте впродовж п'яти днів накопичення цих бактерій збільшилося на 0,28–0,98 lg КУО/см³. У нововиготовлених ефірах спостерігалася тенденція до посилення росту кишкової палички за рахунок підвищення кислотності, яка становила 3,92–4,02 рН. Водночас бактерій роду *Escherichia* продовжували виживати навіть за низьких показників кислотності, що підкреслює їх безпеку для молочної промисловості. Його активне розмноження може викликати дефекти продукту, такі як їх посилене газоутворення, зміни текстури, смаку і запаху, а також призвести до харчових отруень.[2]

Подібна динаміка спостерігалася під час спільного культивування ГКЗ і ЗК із *Staphylococcus aureus* . Заквашувальна мікрофлора пригнічувала ріст *S. aureus* на 56–68%, причому у зразках із застосуванням ЗК протягом п'яти днів чисельність бактерій зменшилася ще на 28%. Водночас кислотність продукту змінювалася незначно (від 4,29 до 4,17 рН). Це відомо про те, що антагоністична активність ЗК зумовлена не тільки утворенням молочної кислоти, але й іншими біологічно активними сполуками.

У молочному середовищі заквашувальна мікрофлора більш ефективно пригнічувала ріст тест-культур, знижуючи їх кількість на 1,5–2,0 порядки. Це пояснюється не лише кислотною реакцією продукту чи зниженням температури під час зберігання, але й антагоністичною дією засмічувальної мікрофлори. Однак, наприклад, *Escherichia* і *S. aureus* здатні виживати та розмножуватися в умовах виробництва, а їх вміст може зрости в 2,0–2,2 рази до кінця терміну зберігання. Крім того, забруднення цими мікроорганізмами можливо на всіх етапах виробничого процесу, що потребує посиленої уваги до якості сировини.

Контамінування молока сторонньою мікрофлорою вплинуло на розвиток заквашувальних культур. У всіх досліджуваних зразках, незважаючи на контрольні (кефіри без інфікування патогенними чи умовно-патогенними бактеріями), спостерігається зниження чисельності складових мікроорганізмів засік. таким чином, через добу спільного культивування з тест-культурами чисельність мезофільних лактобактерій зменшилася на 8,5–11,5%, ароматотворних

молочнокислих бактерій – на 4,5–18,0%, а дріжджів – на 4,0–13,5% . протягом п'яти днів ця тенденція зберігалася. Найменший вплив на заквашувальну мікрофлору мав *B. subtilis* . Використання ЗК, що включає дріжджі *Saccharomyces unisporus* , сприяло кращому розвитку молочнокислих бактерій за рахунок видалення незамінних метаболітів, які служать факторами росту для лактобактерій.[5-6]

Таблиця 3.2.

Розвиток мікрофлори кефірної грибкової закваски та заквашувальної композиції за спільного культивування з тест-культурами

Об'єкти досліджень	Чисельність, lg КУО/см ³					
	ММКБ		АМКБ		дріжджів	
	1 доба	5 діб	1 доба	5 діб	1 доба	5 діб
ГКЗ	8,90±0,25	8,45±0,21	7,35±0,18	6,90±0,22	5,77±0,31	5,95±0,26
<i>Escherichia</i> sp.+ ГКЗ	7,86±0,23	7,62±0,18	7,11±0,17	6,46±0,15	5,00±0,11	4,38±0,10
<i>S. aureus</i> +ГКЗ	8,16±0,24	7,20±0,16	6,00±0,27	6,78±0,17	5,65±0,20	4,15±0,13
<i>B.subtilis</i> +ГКЗ	8,15±0,21	6,90±0,17	6,60±1,21	6,49±0,18	5,04±0,15	4,90±0,15
ЗК	8,95±0,17	8,75±0,21	8,85±0,21	8,41±0,20	4,78±0,21	4,88±0,17
<i>Escherichia</i> sp.+ ЗК	8,04±0,26	7,90±0,22	8,50±0,18	8,34±0,23	4,70±0,22	4,15±0,21
<i>S. aureus</i> +ЗК	8,26±0,14	8,23±0,15	8,08±0,22	8,00±0,20	4,78±0,21	4,26±0,25
<i>B.subtilis</i> +ЗК	8,80±0,19	8,72±0,12	8,43±0,09	8,39±0,21	4,35±0,16	4,30±0,24

Примітка. МКБ – мезофільні молочнокислі бактерії, АМКБ – ароматоутворювальні молочнокислі бактерії

З отриманих в ході дослідів результатів можна зробити висновок що мікрофлора ГКЗ та ЗК для виробництва кефіру володіє антагоністичною активністю щодо бактерій родини Enterobacteriaceae, золотистого стафілококу *S. aureus* та спороутворювальних бацил *B. subtilis*, спричиняючи зони затримки росту на твердому середовищі. від У результаті досліджень особливостей спільного культивування заквашувальної мікрофлори кефіру та означених тест-культур показано здатність композиції пригнічувати розвиток патогенних та умовно-патогенних бактерій упродовж 5 діб[3,4,5,6]

Додаток до опису дослідження

- 1.Симова Є.; Бешкова Д.; Ангелов, А.; Христозова, Т.; Френгова Г.; Спасов З. Молочнокислі бактерії та дріжджі в кефірних зернах і кефірі з них. *J. Ind. Microbiol. Біотехнологія*. 2002 , 28 , 1–6.
- 2.Енн Ці Чонг,Сью Вен Лау,Нюк Лінг Чін,Росніта А. Таліб , іРозеліза Кадір Баша. Переваги ферментованого напою: комплексний огляд і порівняння мікробіому чайного гриба та кефіру/
- 3.Farnworth E.R. Kefir – a complex probiotic // *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. – 2004 . – Vol. 2. – P. 1–17.
- 4.Karagozlu N., Karagozlu C., Ergonul B. Survival characteristics of E. Coli O157:H7, S. thyimurium and S. aureus during kefir fermentation // *Czech. J. Food Sci.* – 2007. – Vol. 25, № 4. – P. 202-207.
- 5.Gulmez M., Guven A. Survival Characteristics of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes 4b and Yersinia enterocolitica O3 in ayran and modified kefir as pre- and post fermentation contaminant // *Vet. Med. Czech.* – 2003. – Vol.48, № 5. – P. 126-132.
- 6.Ulusoy B.H., Colac H., Hampicyan H., Erkan M. E. An in vitro study on th antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens // *Turk Microbi Cem Derg.* – 2007. – Vol. 37, № 2. – P. 103-107.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Димова М.И. 9 - й симпозиум по молочнокислым бактериям - здоровье, эволюция и системная биология (Эгмон - эн - Зи, Нидерланды, 31 авг. - 4 сент. 2008) / М. И Димова // Мікробіологічний журнал. - 2008. - Т. 70, № 6. - С. 93 - 94.
2. Мікробіологія / М.Г. Сергійчук, В.К. Позур, А.І. Вінніков [та ін.]. - К: Видавничо - поліграфічний центр « Київський університет», 2005. - С. 235 - 237 (375с.).
3. Россихин В.В. Биотехнология введение в науку будущего / В.В. Россихин - Х: Колорит, 2005. - С. 52 - 53, 148 (288с.).
4. Литвинова Т.О. Гігієна з основами екології / Т.О. Литвинова. - К: Здоров'я, 1999. - С. 207 (368с.).
5. Малова, В.В. Вплив захисних середовищ на збереження життєздатності та ферментативної активності заквашувальних культур для простокваші [Текст] / В.В. Малова, Н.Ф. Кігель // Вісник аграрної науки. – 2006. – № 8. – С. 65-68.
6. Машкін, М. І. Технологія виробництва молока і молочних продуктів: підруч. / М.І. Машкін, Н.М. Париш;/ М-во аграрної політики України. – К.: Вища школа, 2006. – 351 с..
7. Микроорганизмы. Технология производства молочных продуктов [Текст] // Молокопереработка. – 2007. – № 2. – С. 46-56.
8. Малова, В.В. Підбір заквашувальних культур для простокваші [Текст] / В.В. Малова, Н.М. Шульга, Н.Ф. Кігель // Вісник аграрної науки. – 2005. – № 11. – С. 65-69.
9. КЕФІР: СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА МІКРОФЛОРУ ТА ТЕХНОЛОГІЮ Кігель Наталя Федорівна, д.т.н., зав. відділом біотехнології ТІММ НААНУ, Шульга Наталія Михайлівна, к.т.н., старший науковий співробітник ТІММ НААНУ.
10. CODEX STANDARD FOR FERMENTED MILKS[електронний ресурс]: https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/marco/Codex_Alimentarius/normativa/codex/stan/CODEX_STAN_243.asp
11. Калінчик М.В. Ринкова еволюція розвитку молокопродуктового підкомплексу України [Текст] / М.В. Калінчик, О.М. Одінцов // АгроІнКом. – 2005. – № 9/10. – С. 6-10.
12. Дмитровська, Г.П. Перспективні напрямки удосконалення традиційних і сучасних технологій молочних продуктів [Текст] / Г.П. Дмитровська // Молочное дело. – 2006. – № 5. – С. 36-38.
13. Schoevers A. Mass cultivation and activity of kefir grains : thesis M. Sc. in Food Science / Anine Schoevers. – Stellenbosch, 1999. – 122 p.
14. Teleky B.-E. Physicochemical Effects of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus casei Cocultures on Soy–Wheat Flour Dough Fermentation / B.- E. Teleky, G. A. Martau, D. C. Vodnar // Foods. – 2020. – Vol. 12, № 12. – 13 p.
15. Stadie J. Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and yeasts in water kefir : diss. Dr. rer. nat. / Jasmin Stadie. - Munich, 2013. – 139 p.

16. Fan D. Microbiome and Metabiotic Properties of Kefir Grains and Kefirs Based on Them / D. Fan, L. G. Stoyanova, A. I. Netrusov // *Microbiology*. – 2022. – Vol. 91, № 4. – P. 339-355.
17. Arai H. Metabolic Features of *Acetobacter aceti* / H. Arai, K. Sakurai, M. Ishii // *Acetic Acid Bacteria. Ecology and Physiology* / ed. by K. Matsushita, H. Toyama, N. Tonouchi, A. Okamoto-Kainuma. – Tokyo, 2016. - P. 255-271.
18. Doray R. Efficient production of α -acetolactate by whole cell catalytic transformation of fermentation-derived pyruvate / R. Doray, L. Chen, J. Liu, P. R. Jensen, C. Solem // *Microbial Cell Factories*. – 2019. – Vol. 18. – 11 p.
19. Роза, Д.Д.; Діас, ММС; Grześkowiak, Ł.М.; Reis, SA; Conceição, LL; Марія до Кармо, ГР Молочний кефір: харчові, мікробіологічні переваги та користь для здоров'я. *Nutr. рез.* 2017, 30, 82–96.