

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

06.07 – МКР. 1998 «С». 2023.01.11 14 ПЗ

**ГУНЬКО ТЕТЯНА СЕРГІЇВНА**

**2024 р.**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології**

**УДК 606:637.146.33:664**

**ПОГОДЖЕНО**

**Декан факультету захисту  
рослин, біотехнологій та екології**

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**

**Завідувача кафедри  
екобіотехнології та біорізноманіття**

\_\_\_\_\_ **Коломієць Ю.В.**

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 р.

\_\_\_\_\_ **Кваско О.Ю.**

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 р.

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**на тему «Оптимізація молочно-кислих заквасок у біотехнології отримання хліба  
пшеничного»**

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)

**Гарант освітньої програми**

**Д. с.-г. наук, професор**

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

**Лісовий М.М.**

(ПІБ)

**Керівник кваліфікаційної магістерської роботи**

**Д. с.-г. наук, доцент**

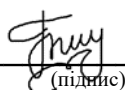
(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

**Бородай В.В.**

(ПІБ)

**Виконав**

  
(підпис)

**Гулько Т.С.**

(ПІБ студента)

**КИЇВ-2024**



5. Визначення якості отриманого хлібу

Перелік графічного матеріалу: таблиці, рисунки

Дата видачі завдання «1» вересня 2023 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

Завдання прийняв до виконання

\_\_\_\_\_

(підпис)

\_\_\_\_\_

(підпис)

**Бородай В.В.**

(ПІБ)

**Гулько Т.С.**

(ПІБ)

## Зміст

Перелік умовних позначень .....	8
Реферат .....	9
Вступ .....	11
Розділ 1. Огляд літератури .....	12
1.1 Природні джерела походження диких штамів молочно-кислих бактерій .....	12
1.2 Природні джерела походження заквасок .....	14
1.3 Роль заквасок у хлібопекарському виробництві .....	15
1.4 Роль МКБ у ферментаційних процесах хлібної закваски .....	17
2.1 Підготовка та отримання чистої культури з природніх штамів молочнокислих бактерій.....	20
2.1.1 Збір гілочок кизилу звичайного ( <i>Córnus mas</i> ) для ізолювання молочнокислих бактерій.....	20
2.1.2 Ізолювання молочнокислих бактерій з кизилу звичайного ( <i>Córnus mas</i> ).....	20
2.1.3 Серійне розведення та глибинний висів накопиченої біомаси .	21
2.1.4 Відбір колоній ізолятів та накопичення біомаси .....	22
2.1.5 Виділення чистої культури молочно кислих бактерій .....	22
2.1.6 Підготовка мікропрепаратів фарбованих метиленовим синім ..	23
2.1.7 Тест на сквашування молока при різних концентраціях бактеріальної культури .....	23
2.2 Ідентифікація та видове визначення виділених ізолятів молочнокислих бактерій.....	24
2.2.1 Реакція на утворення каталази.....	24
2.2.2 Швидкість сквашування або активність кислотоутворення .....	24

2.2.3	Визначення титрованої кислотності через 7 діб сквашування в молоці .....	25
2.2.4	Тест на зброджування вуглеводнів МКБ .....	26
2.2.5	Ріст в гідролізованому молоці із додаванням жовчі .....	27
2.2.6	Ріст у м'ясопептонному бульйоні з різними значеннями рН ....	28
2.2.7	Тест на резистентність до антибіотиків.....	28
2.3	Застосування виділених штамів молочнокислих бактерій для отримання хлібної закваски .....	30
2.3.1	Розроблення закваски із досліджуваних культур молочнокислих бактерій .....	30
2.3.2	Отримання хлібу пшеничного із використанням закваски.....	31
2.3.3	Визначення фізико-хімічних показників та органолептичних показників отриманого хліба пшеничного .....	31
	Розділ. III Результати Дослідження.....	33
3.1.	Виділення та дослідження морфолого-культуральних та біохімічних властивостей отриманих ізолятів .....	33
3.1.1	Виділення ізолятів бактерій з природних джерел .....	33
3.1.2	Морфологічні ознаки виділених ізолятів .....	34
3.1.3	Реакція на утворення каталази.....	35
3.1.4	Швидкість сквашування або активність кислоутворення.....	36
3.1.5	Вивчення титрованої кислотності .....	36
3.1.6	Зброджування вуглеводів .....	37
3.1.7	Ріст в гідролізованому молоці із додаванням жовчі та у м'ясопептонному бульйоні з різними значеннями рН.....	39
3.2.	Вивчення резистентності до антибіотиків та ідентифікація виділених штамів бактерій .....	40

3.2.1. Резистентність до антибіотиків .....	40
3.2.2. Ідентифікація виділених штамів бактерій .....	43
3.3 Дослідження впливу закваски з МКБ на якість хліба пшеничного .	43
ВИСНОВКИ .....	47
Список використаних джерел .....	48
Додаток А.....	53
Додаток Б .....	55
Апробація результатів магістерської роботи.....	55

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГА - гідролізоване молоком

КУО - колоніє утворюючі одиниці

МКБ – молочно-кислі бактерії

МРС – (de MAN, ROGOSA and SHARPE) – селективне середовище для виділення молочно-кислих бактерій

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

ХД – хлібопекарські дріжджі

ЗК – закваска

## РЕФЕРАТ

Робота на тему «Оптимізація молочно-кислих заквасок у біотехнології отримання хліба пшеничного» виконана у обсязі 55 сторінок формату А4, містить три розділи, 9 рисунків, 7 таблиць та 39 використаних джерел. Магістерська кваліфікаційна робота містить наступні розділи:

- Вступ
- Огляд літератури
- Об'єкти та методи дослідження
- Результати дослідження
- Висновки
- Список використаних джерел
- Додаток А
- Додаток Б

Робота проводилась на базі Інституту продовольчих ресурсів НААН України у відділі «Біотехнологій» під керівництвом д. техн. наук Даниленко С.Г.

Під час роботи було проведено аналіз літературних джерел про природні середовища молочнокислих бактерій. Базуючись на даних відомостях було обрано рослину кизил звичайний (*Cornus mas*) в якості джерела бактерій. Кизил звичайний довгий час використовувалась у регіонах Болгарії для виготовлення йогуртових заквасок [1].

Наступним кроком була ідентифікація виділених ізолятів із рослинного матеріалу. Ідентифікація відбувалась за Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009 р [2]. Було ідентифіковано 6 морфотипів бактерій кулеподібної форми, які в подальшому були ідентифіковані як *Enterococcus durans*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus raffinolactis* та *Lactococcus lactis*. Було проведено контроль на чистоту виділених культур.

Базуючись на фізико-хімічних особливостях було відібрано три види, а саме *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus raffinolactis* та *Lactococcus lactis*, котрі використали для приготування хлібної закваски. 10% отриманої стабільної

закваски було використано для приготування пшеничного хлібу. Рецептūra була обрана як для приготування паляниці безопарним методом [3]. Бродіння тіста склало 100 хвилин за температури 32 °С. Випікали хліб після відстоювання при 180-200 °С впродовж 32 хвилин. Через 4 години після випікання визначали фізико-хімічні та органолептичні показники хлібу.

Таким чином, як елемент оптимізації у біотехнології отримання хліба пшеничного було досліджено використання нових природніх видів молочнокислих бактерій в якості закваски.

## ВСТУП

Хліб був частиною раціону людей ще з давних часів зважаючи на свою харчову цінність та легкість виробництва. Нині кількість видів хліба та рецептура його виробництва різняться від країни до країни. Зазвичай для виробництва хліба використовують організми, котрі за допомогою ферментаційних процесів надають йому приємну текстуру, вигляд, приємний аромат та смак.

Актуальність: Питання вдосконалення рецептур, органо-лептичних властивостей та подовження терміну зберігання хлібних виробів все ще залишається відкритим. Саме тому використання нових штамів молочно-кислих бактерій та їх співвідношення у виготовленні хлібних заквасок є відкритим. Також, слід зазначити, що пошук нових диких штамів МКБ з бажаними властивостями є актуальним.

Об'єкт дослідження: виділення та ідентифікація природних видів молочнокислих бактерій з метою їх використання при розробці закваски для покращення органо-лептичних та фізико-хімічних показників хліба пшеничного.

Предмет дослідження: молочно-кислі бактерії *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus raffinolactis* та *Lactococcus lactis* та фізико-хімічні та органолептичні показники хлібу пшеничного, виготовленого з використанням закваски із МКБ.

Методи дослідження: мікробіологічні, фізико-хімічні, технологічні, та статистичні.

Метою даної магістерської роботи було виділити із природних джерел молочно-кислі бактерії та застосувати їх для виготовлення хлібної закваски з подальшим застосуванням у виробництві хліба пшеничного.

Для досягнення бажаної мети були поставлені наступні цілі:

1. Виділення природних видів молочно-кислих бактерій із рослинного матеріалу
2. Ідентифікація отриманих молочно-кислих бактерій
3. Виготовлення молочно-кислої закваски із отриманих видів
4. Випікання хлібу пшеничного із використанням молочно-кислої закваски
5. Визначення якості отриманого хлібу

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

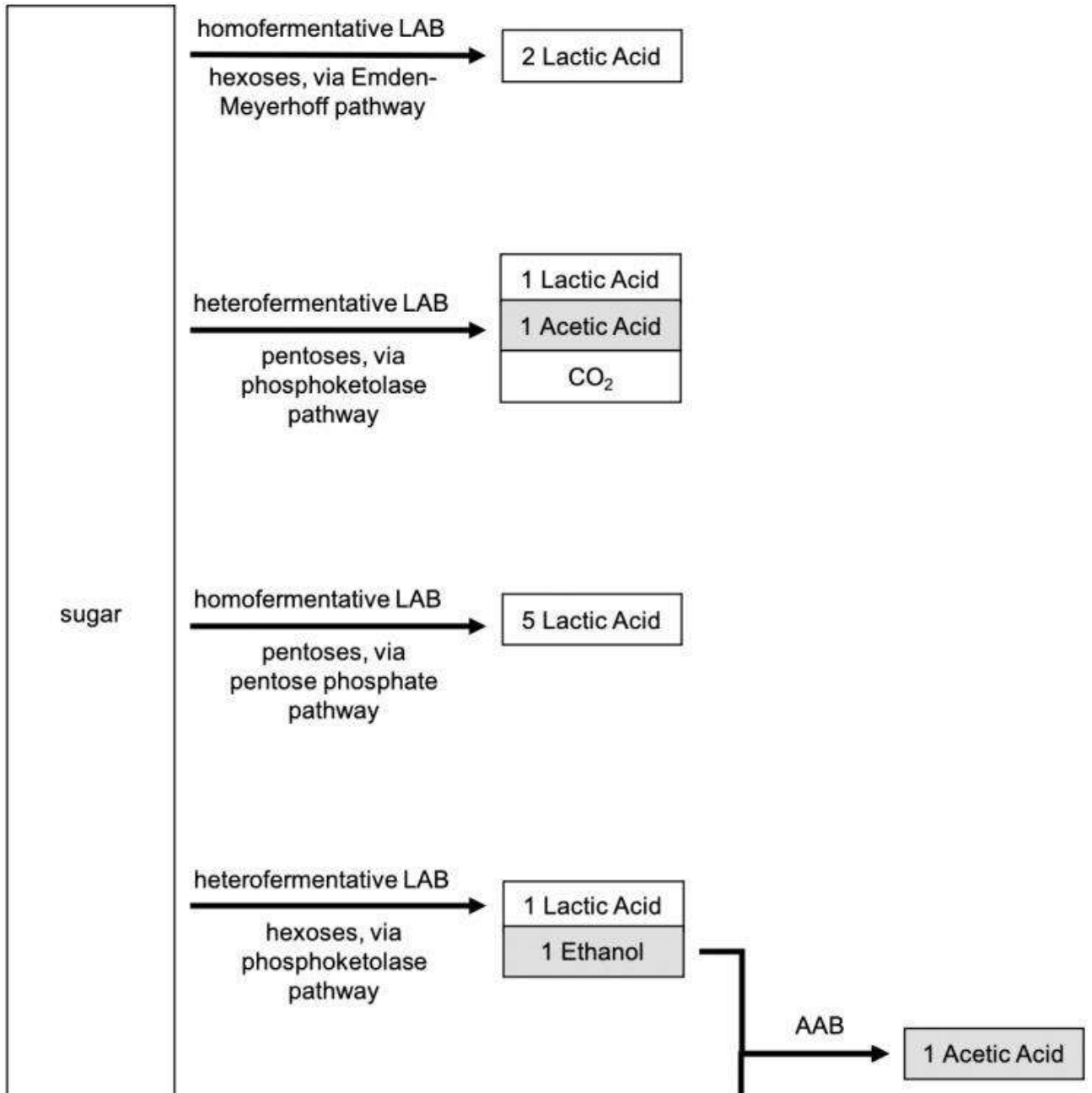
### 1.1 Природні джерела походження диких штамів молочно-кислих бактерій

Молочно-кислі бактерії (МКБ) є об'ємною групою бактерій, живучих у різних середовищах існування. Уважається, що більшість продуктів ферментації, як молочно-кислі продукти, квашені овочі, заквасковий хліб та м'ясо, овочі, кишковий тракт людини, ґрунт і вода є їхніми основними природними середовищами проживання [4]. Назва даних бактерій пов'язана із їх здатністю утворювати молочну кислоту, як кінцевим продуктом метаболізму. Ця фізіологічна здатність знайшла застосування у якості консервантів. Завдячуючи ферментації МКБ, продукти набувають більшу харчову цінність, змінюють органолептичні показники та технологічну цінність. Саме тому, МКБ використовують як закваску при виробництві хлібних виробів, йогуртів, сирів, чи інших молочнокислих продуктів, виноробстві, при розробці пробіотичних добавок та виробництві промислово важливих вторинних метаболітів. рис. 1 [5].

Значна кількість досліджень природніх джерел мікробного проживання призвело до відкриття нових видів бактерій з унікальними властивостями [6,7]. Найбільш недосліджені джерел молочно-кислих бактерій є фрукти, квіти і овочі, що є в щоденному контакті із людьми. Так дані джерела є стратегічно важливими для визначення нових видів МКБ, адже вони багаті різним вуглеводами, мають низький білковий склад та незначно кисле рН [8].

Близько від  $10^5$  до  $10^7$  КУО/г мікробної біомаси сконцентровано на фруктах та овочах, де МКБ становлять невелику частку  $10^2$  до  $10^4$  КУО/г [9]. На даний момент, існують дослідження де визначали присутність МКБ на поверхнях різних фруктів та рослин, але ця тема є ще мало дослідженою [10, 11, 12]. Бактерії ідентифіковані із даних джерел відносять до наступних родів *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* та *Enterococcus*. Такі види МКБ як *Lb. brevis*, *Lb. rossiae*, *Lb. plantarum*, *Leuc.*

*Pseudomesenteroides*, *Leuc. mesenteroides*, *Lc. lactis*, *Ec. faecalis* і *Ec. durans* були визначені домінуючими серед інших ідентифікованих видів МКБ [11, 13, 14].



**Рис. 1.1.** Кінцеві продукти ферментативного синтезу молочно-кислих бактерій (МКБ) [15]

## 1.2 Природні джерела походження заквасок

Різні ідеї щодо природи походження бактеріальних йогуртових заквасок існують. Було встановлено, що визнаним джерелом існування *L. bulgaricus* є йогурт [16], адже дані бактерії добре адаптовані до молока як середовища існування [17]. Хоча, крафтове приготування йогуртової домашньої закваски у болгарському регіоні базується на додаванні гілок певних рослин, зокрема *Cornus mas*, у молока зазвичай овече, яке прокип'ячують та охолоджують до 45 °С. Це призводить до утворення густого молочного згусток, котрий слугує у подальшому для виготовлення домашнього йогурту. Слід відмітити, що дана технологія не є популярною.

Достовірних даних про походження цієї традиційної технології немає. Але існують відомості що для приготування йогурту у районі Родоп, Болгарія в продовж 200 років використовували подрібнене коріння *Ononis spinosa* і змішували його сік з овечим молоком для виготовлення йогуртових заквасок [18]. Також види такі як *Matricaria chamomilla*, *Alfalfa* і *Prunus spinosa* вважаються можливими джерела для виділення закваскових бактерій [19].

Наявність різних вуглеводів з різною харчовою цінністю має прямий вплив на заселення рослини молочно-кислими бактеріями у епіфітному середовищі існування [20].

Вуглеводи як глюкоза, сахароза і фруктоза вважаються основними карбоновими сполуками на поверхнях рослини як листі чи стебла [21, 22]. Відмічалось, що поверхня рослин *Cornus mas* і *Prunus spinosa* містить вуглеводи як манозу та глюкозу, що підкріплює здогадки існування МКБ на них [23]. Це припущення знайшло підтвердження у незалежних дослідженнях проведених на території в Болгарії [1], Індії [24] та Японії [25], всі вони підтвердили дану теорію.

### 1.3 Роль заквасок у хлібопекарському виробництві

Хліб є стратегічно важливим продуктом, котрий визначається одним із основних стратегічно важливих продуктів для людства ще з давніх часів[26]. Для його приготування використовують прості інгредієнти як борошно, вода, сіль та розпушувач [27].

Використання природніх заквасок при випіканні хліба є однією із стандартних технік, особливо при крафтовому хлібопеченні. МКБ займають важливу роль мікрофлори, що знаходиться в заквасках. Таким чином молочнокисле бродіння сприяє покращенню взаємодії даних компонентів при випіканню хліба та покращує його органолептичні властивості [28]. На разі ферментаційні процеси є стандартизовані та мікробний склад заквасок (ЗК) контролюється. Дослідження в даній сфері сконцентровані на мікробному співвідношенні та дослідженню взаємозв'язках між мікроорганізмами для вдосконалення ЗК та подальший вплив на хлібобулочні вироби. Присутність МКБ у ЗК сприяє розчепленню непоживних речовин та перетворення в речовини засвоювані людським організмом. Так деякі види МКБ здатні розчіплювати глютен тим самим, зменшуючи токсичність даних виробів для людей із непереносимістю глютену.

Розрізняють чотири види ЗК рис. 2, кожна з яких розроблена відповідно до закваски та бажаних характеристик випічки: категорії I, II, III та IV [29].

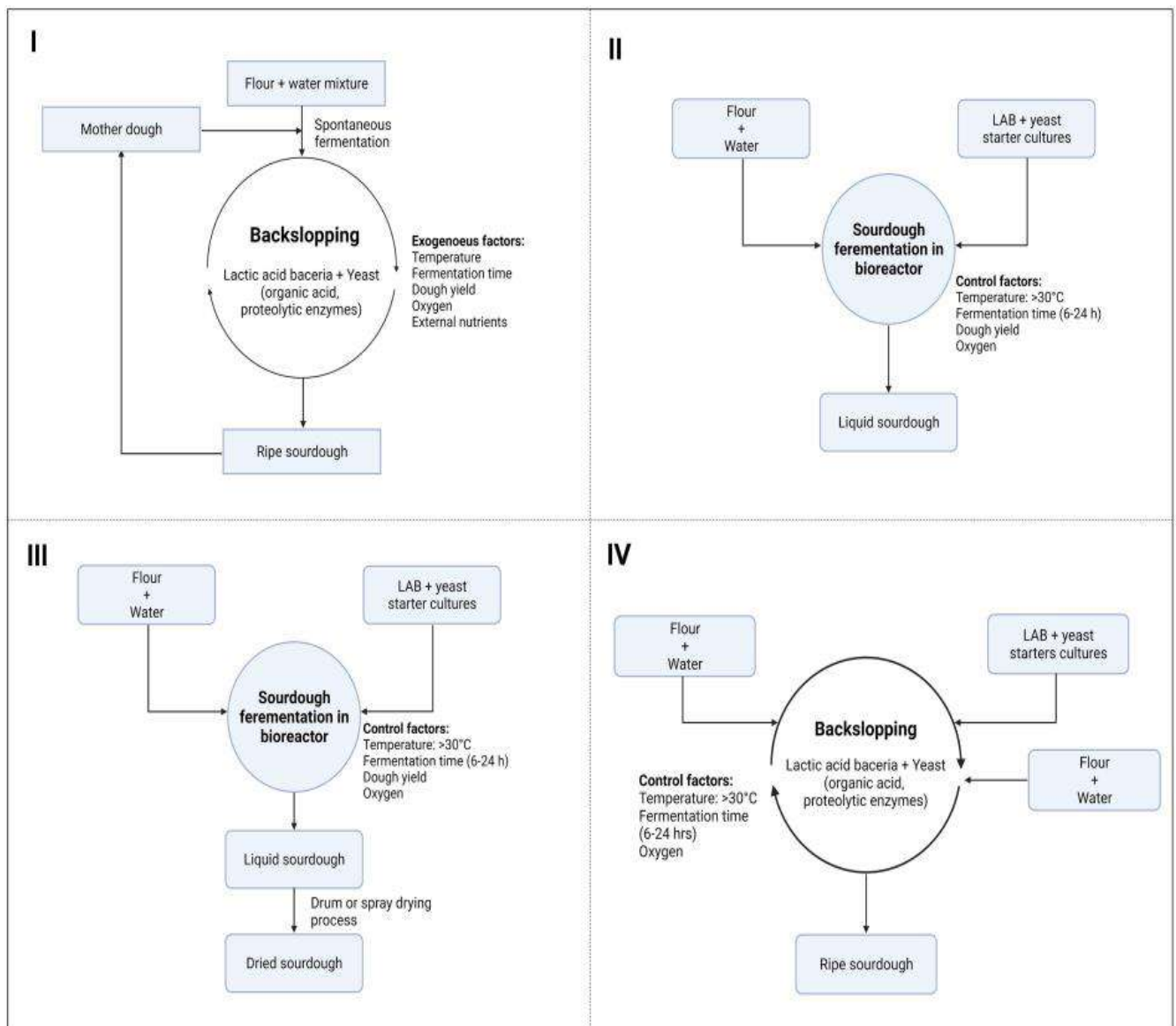
Вид I, передбачає звичайний підхід, адже при виробництві застосовують метод зворотного відкидання при низьких температурах. Тобто тісто безупинну інокують свіжою ЗК із однієї партії. Залежить від показників якості дріжджів і МКБ; їх сорту та виду. Цей вид має свої недоліки адже значної праці, вимагає багато часу і не адаптований для масштабного виробництва. Також важлива якість борошна адже це відбивається на стійкості тіста [29].

Вид II заквасок навпаки потребує виключно особливі штами МКБ для підтримання процесу ферментації. Цей метод є більш лагідним за вид I, і вимагає підкисленні. Вид II ЗК можна використовувати в промислових цілях та

культивувати біореакторах [30]. За даним методом лише кислотікі штами МКБ із високою кислоутворювальною здатністю, це збагачує смак виробу. Також ліофілізовані ЗК продають в комерційних цілях завдячуючи їх покращенню смакового профілю хлібу.

Вид III ЗК схожий на попередній вид, але вимагає дегідратацію рідкого стабілізатора. За даного виду закваски здатні витримувати екстремальні сушильні умови, що пролонгують їх термін придатності та облегшують управління пекарнями. Види МКБ котрі набули широкого використання за даного методу відносяться до гетероферментативних *L. brevis* і факультативних гетероферментативних штамів *Pediococcus pentosaceus* і *L. plantarum* [31].

Вид IV ЗК є подібним до першого виду, котрий має початок з культури МКБ, що згодом переходить до методу зворотного нахилу [32]. Даний метод може призвести до суперництва між інтегрованими МКБ і місцевими мікроорганізмами. Це може дати результат, що вихідні штами МКБ будуть домінувати над чим викличуть гіперрефективність вихідні культури МКБ. Хоча види II та III налагодити виробництво, вони не в змозі скопіювати риси виду I. Остання тенденція при виготовленні рідких заквасок дозволяє одночасне культивування МКБ та дріжджів, чим задовольняє промислові потреби для підвищення ефективності та контролюванню ферментації.



**Рис. 1.2.** Види хлібних заквасок у залежності від посівного матеріалу та бажаних властивостей кінцевого продукту [33]

#### 1.4 Роль МКБ у ферментаційних процесах хлібної закваски

Закваска – жива біомаса, де переважають гетероферментативні МКБ, які співіснують із дріжджами в кислому середовищі. Концентрація МКБ в заквасці може доходити до  $10^8$  КУО/г [34]. Облігатні та факультативні гетероферментативні та деякі гомоферментативні види були ізольовані із ЗК рис. 3 [34, 35].

МКБ сприяють смаку хліба на заквасці, виробляючи молочну кислоту, оцтову кислоту та амінокислоти, а також утворюючи ароматичні сполуки та

пептиди. Завдячуючи накопиченню пептидів як глутатіону і глутаміл дипептиди, надається повність смаку хлібу [36].

Метаболічні шляхи МКБ впливають на якість хліба, впливаючи на окисно-відновні реакції на основі наявності кофакторів. Гомоферментативні та гетероферментативні МКБ мають різні метаболічні вимоги, що призводить до відмінностей у кінцевій якості хліба за межами утворення ацетату [35].

Пшеничне борошно містить вуглеводи, такі як мальтоза, сахароза, глюкоза та фруктоза, при цьому вміст глюкози збільшується під час бродіння. МКБ ферментує мальтозу [35, 34], виробляючи молочну кислоту або додаткові сполуки, такі як CO<sub>2</sub>, оцтова кислота та етанол. Метаболізм вуглеводів МКБ і дріжджами створює антимікробні речовини, ароматичні сполуки та екзополісахариди.

Накопичення білкової кислоти в результаті гідролізу пептидів покращує смак закваски та вміст поживних речовин.

Види МКБ можуть вивільняти зв'язані фенольні сполуки за допомогою різних ферментів, що призводить до перетворення фенольних сполук і флавоноїдів у попередники смаку. Борошно з сорго та проса містить високий рівень поліфенолів. Так використання МКБ видів: як *L. brevis*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, та *P. Pentosaceus* здатне розкласти дані сполуку чим покращить смакові якості виробу [37].

Гідратази жирних кислот у МКБ можуть перетворювати олеїнову кислоту та лінолеву кислоту в ланцюги гідроксигирних кислот. Ферменти фітази, активовані підкисленням, вивільняють неорганічний фосфат із злаків під час бродіння, роблячи мінерали більш біодоступними [35].

Homofermentative LAB	Obligate heterofermentative LAB	Facultative heterofermentative LAB
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Levilactobacillus acidifarinae</i> , <i>Levilactobacillus brevis</i> , <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>Companilactobacillus alimentarius</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> , <i>Limosilactobacillus pontis</i> , <i>Furfurilactobacillus rossiae</i>	<i>Companilactobacillus paralimentarius</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Limosilactobacillus panis</i> , <i>Companilactobacillus crustorum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i> , <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> , <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Limosilactobacillus frumenti</i> , <i>Fructilactobacillus fructivorans</i>	<i>Levilactobacillus spicheri</i>
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Levilactobacillus hammesii</i>	<i>Lactiplantibacillus xiangfangensis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Levilactobacillus koreensis</i> , <i>Levilactobacillus namurensis</i>	<i>Limosilactobacillus coleohominis</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Companilactobacillus nodensis</i>	<i>Companilactobacillus kimchii</i>
<i>Companilactobacillus farciminis</i>	<i>Limosilactobacillus oris</i> , <i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Schleiferilactobacillus perolens</i>
<i>Companilactobacillus crustorum</i>	<i>Limosilactobacillus secaliphilus</i>	<i>Latilactobacillus sakei</i>
<i>Companilactobacillus heilongjiangensis</i>	<i>Furfurilactobacillus siliginis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Companilactobacillus mindensis</i>	<i>Lentilactobacillus buchneri</i> , <i>Fructilactobacillus fructivorans</i>	<i>Lapidilactobacillus dextrimicus</i>
<i>Companilactobacillus nantensis</i>	<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Companilactobacillus nodensis</i>	<i>Fructilactobacillus fructivorans</i>	
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lentilactobacillus kefirii</i> , <i>Apilactobacillus kumkeei</i> , <i>Fructilactobacillus lindneri</i>	
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Limosilactobacillus mucosae</i> , <i>Limosilactobacillus fermentum</i> , <i>Secundilactobacillus collinoides</i>	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Limosilactobacillus vaginalis</i> , <i>Levilactobacillus zymae</i> , <i>Leuconostoc citreum</i>	
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Leuconostoc gelidum</i>	
<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> , <i>Streptococcus constellatus</i>	<i>Weissella cibaria</i>	
<i>Streptococcus equinus</i>	<i>Weissella confusa</i>	
<i>Streptococcus suis</i>	<i>Weissella hellenica</i>	
	<i>Weissella kandleri</i>	

Рис. 1.3. Молочнокислі бактерії , що містяться в різних типах заквасок [33]

## **РОЗДІЛ. II МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ**

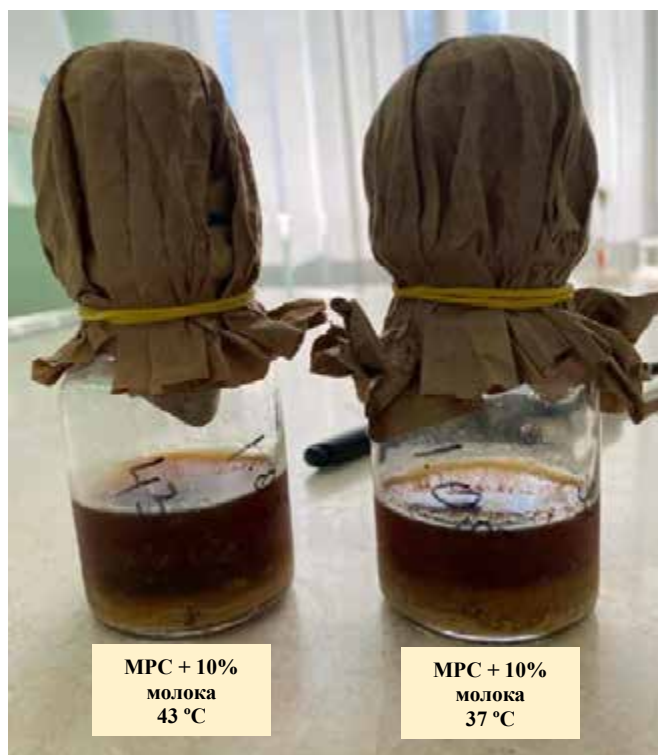
### **2.1 Підготовка та отримання чистої культури з природніх штамів молочнокислих бактерій**

#### **2.1.1 Збір гілочок кизилу звичайного (*Córnus mas*) для ізолювання молочнокислих бактерій**

Джерелом для ізоляції досліджуваних штамів слугував кизил звичайний, а саме його гілки. Гілки були зібрані у весняний період, а саме на початку квітня 2024 року. Зразки збирали зі приватного саду в м. Києві. При зрізанні використовувались стерильні ножиці, після зразки помістили в стерильні пакети для запобігання крос контамінації при транспортуванні до лабораторії.

#### **2.1.2 Ізолювання молочнокислих бактерій з кизилу звичайного (*Córnus mas*)**

Після збирання гілочки були поміщені на рідку МРС середовище з додаванням 10% сухого молока впродовж 12 годин після збирання. Культивування проводилось при 37 та 43 °С в термостаті впродовж 72 годин. Склад МРС середовища наведено в додатку А.



**Рис. 2.1.** Культивовані гілочки *Córnus mas* в MPC з 10% молока при 37 та 43 °С через три доби

### 2.1.3 Серійне розведення та глибинний висів накопиченої біомаси

Після 3 днів культивування на MPC, було проведено серію розведень до 7-го розведення.

1. Стерильною піпеткою відбирають 1 мл зразку та додають в пробірку до 9 мл стерильного фізіологічного розчину, отримуючи  $10^{-1}$  розведення.
2. Зразки перевішували ретельно та процедуру проводили до отримання  $10^{-7}$  розведення.
3. 1 мл розведення  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  та  $10^{-7}$  переносяться до окремої стерильної чашки Петрі. Кожне розведення мало два повторення.
4. 15-20 мл попередньо розтопленого агару з гідролізованим молоком (ГА) додоюють до кожної чашки Петрі і ретельно перемішати шляхом кругових рухів.

5. Чашки лишать поки агар не затвердіє після їх поміщають в термостат при 37°C та 43°C на 24-48 годин.

#### **2.1.4 Відбір колоній ізолятів та накопичення біомаси**

При виборі колонії звертали увагу на форму, колір колонії та рівність краю. Відбиралась колонії у формі «човників» («веретен») або «грудочок вати», блідо жовтого або бежево-молочного кольору адже саме така форма та колір притаманна видам МКБ.

8 колоній із  $10^{-7}$  розведення культивованих при 37°C було відібрано та поміщено в пробірки зі стерильним молоком, де далі культивувалась в термостаті при 37°C. Подібна процедура була проведена із колоніями отриманими із  $10^{-6}$  при 43°C, котрі й надалі культивувались при 43°C.

#### **2.1.5 Виділення чистої культури молочно кислих бактерій**

Ізоляти культивовані при 43°C були виключені із дослідження через низьку сквашувальну здатність при даній температурі.

Ізоляти культивовані 37°C було перевито від 10 разів в стерильно молоко для отримання чистої культури та подальшої ідентифікації. Під час перевивки стерильною піпеткою відбирали 1 мл культури та переносили в пробірку із 10 мл стерильного молока. процедура проводилась в стерильних умовах для запобігання зараження сторонньої мікрофлорою. Після перевивки пробірки поміщали в термостат при 37°C на ніч. Наступного дня процедура повторювалась. Кожні 5 перевивок підготовлювались мікропрепарати, котрі досліджувались під мікроскопом на наявність інших патогенних або супровідних видів культур. Зразки із ізолятами № 4 та 7 були виключені із дослідження через високу зараженість іншими паличкоподібними бактеріями.

## **2.1.6 Підготовка мікропрепаратів фарбованих метиленовим синім**

### 1. Підготовка мазка:

- Позначення маркером предметне скельце з тильної сторони.
- Фламбування мікробіологічної петлі, розжаренням її у верхній частині полум'я пальника
- Охолодженою петлею відбирається невелику кількість бактеріальної культури та помішається на скельце та рівномірно розподіляється на ньому
- Після зразок висушується на повітрі.

### 2. Фіксація мазка:

Зразок фіксується шляхом проведення через полум'я пальника кілька разів

### 3. Фарбування:

Скельце заливають розчином метиленового синього і залишають на 1 хвилину.

Після ретельно промивають дистильованою водою.

### 4. Сушіння:

Скельце промокають паперовими рушниками, щоб видалити надлишок води, уникаючи зон зі зразком та залишки висушити на повітрі.

### 5. Мікроскопівання:

Для дослідження використовують імерсійний об'єктив із збільшенням 100х, попередньо нанісши імерсійну олію.

## **2.1.7 Тест на сквашування молока при різних концентраціях бактеріальної культури**

Для сквашування використали різну концентрацію досліджуваної бактеріальної культури. 0,1 мл, 1 мл та 1,5 мл свіжо-сквашеної культури додали до пробірок із 10 мл стерильного молока. Пробірки помістили в термостат при 37 °С на ніч. Наступного дня аналізували наявність згустку та його текстуру.

## **2.2 Ідентифікація та видове визначення виділених ізолятів молочнокислих бактерій**

### **2.2.1 Реакція на утворення каталази**

#### Матеріали:

- Розчин перекису водню: 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (комерційний перекис водню).
- Стерильні предметні скельця
- Стерильна мікробіологічна петля

Досліджувані ізоляти культивували протягом 24-48 годин при 37°C на МРС середовищі в чашках Петрі, щоб забезпечити адекватний ріст бактерій.

Отримані колонії відбирали стерильними петлями та поміщали на стерильні мікробіологічні скельця. Після додавали краплю 3% перекису водню та змішували із досліджуваною колонією. Спостерігали за утворенням бульбашок кисню або їх відсутністю.

### **2.2.2 Швидкість сквашування або активність кислотоутворення**

#### Матеріали:

- 6 колб із 100 мл стерильного молока
- Піпетки
- Термостат на 37 °C
- Спиртівка або газова горілка

Даний метод визначає активність бактерій тобто час сквашування від моменту потрапляння в середовище (молоко).

3 мл бактеріальної культури після попереднього 24 год сквашування поміщають в колби із 100 мл простерилізованого молока. Процедуру проводять в стерильних умовах неподалік полум'я спиртівки. Після вміст колб перемішують та відправляють в термостат при 37 °C. Кожну годину перевіряють

наявність сквашеного згустку та відмічають час коли утвориться щільний згусток.

### 2.2.3 Визначення титрованої кислотності через 7 діб сквашування в молоці

#### Матеріали:

- 10 мл сквашеного молока
- 0,1 н розчин гідроксиду натрію (NaOH)
- Фенолфталеїн (індикатор)
- Піпетка або бюретка
- Колба або склянка для титрування
- Мішалка або скляна паличка

Зазвичай даний показник визначається на 7 день після внесенні культури до стерильного молока. Відбирають 3 мл культури та додають в колби зі 100 мл стерильного молока.

#### 1. Підготовка зразка:

Відберіть 10 мл сквашеного молока і перенесіть у колбу або склянку.

#### 2. Додавання індикатора:

Додайте 2-3 краплі фенолфталеїну до зразка сквашеного молока. Індикатор змінить колір при досягненні кінцевої точки титрування.

#### 3. Титрування:

Піпетку або бюретку попередньо наповнюють 0,1 н розчином гідроксиду натрію (NaOH).

Та починають додавати розчин NaOH повільно до сквашеного молока, постійно помішуючи.

Титрування продовжується до моменту утворення світло-рожевого кольору, котре зберігається впродовж 30 секунд. Відзначається об'єм NaOH витрачений на титрування зразка.

Титрована кислотність визначається за наступною формулою:

$$\text{Кислотність (}^{\circ}\text{T)} = \frac{\text{Об'єм NaOH (мл)} \times 10}{\text{Об'єм молока (мл)}}$$

де 10 - це коефіцієнт, що враховує нормальність розчину NaOH та об'єм зразка молока.

#### 2.2.4 Тест на зброджування вуглеводнів МКБ

##### Матеріали:

- 10% розчини вуглеводів:
  - I. Глюкози
  - II. Рамнози
  - III. Галактози
  - IV. Фруктози
  - V. Д-ксилози
  - VI. Рафінози
  - VII. Манози
  - VIII. Гліцерину
  - IX. Мальтози
  - X. Лактози
  - XI. Сорбіту
  - XII. Маніту
  - XIII. Сахарози
  - XIV. Рибози
  - XV. Глюканата-Na
  - XVI. Трегалози
- Середовище для зброджування вуглеводнів з бромфеноловим синім
- Піпетки
- Термостат на 37 °C
- Спиртівка або газова горілка

Метод базується на зміні кольору середовища відповідно до зміни рН, завдячуючи бромфеноловому синьому та активності споживання МКБ відповідного вуглеводу. Позитивним результатом вважається якщо колір змінився на жовтий або оранжевий.

Середовище для зброджування вуглеводнів змішується з відповідними розчинами вуглеводнів аби в кінцевому розчині середовища отримати 1% вуглеводу. Після середовище розливається у стерильні пробірки по 10 мл в кожен та маркується відповідно до свого номеру, зазначеного в матеріалах.

До кожної пробірки із середовищем додавали 1 мл досліджуваної культури, в нашому випадку шість неідентифікованих ізолятів. Кожна пробірка мала два повторення. Пробірки поміщають в термостат при 37 °С на ніч. Результат відмічають наступного дня, але у випадку спірного результату пробірки лишали ще на 24 год в термостаті і тоді вже відмічають остаточний результат. Позитивний результат визначали за наявності зміни кольору середовища з зелено-синього на жовтий або жовтогарячий колір.

### **2.2.5 Ріст в гідролізованому молоці із додаванням жовчі**

Під час дослідження використовували солі жовчі (підходящі для мікробіологічних досліджень) від виробника Sigma-Aldrich®. Концентрація жовчі в гідролізованому молоці складала 20 та 40%.

До колб зі стерильним середовищем додавали попередньо підготовлену суспензію культивовану в стерильному середовищі МРС із досліджуваних ізолятів, щоб концентрація бактеріальної суспензії відповідала 1%. ОД суспензій доводили 0.5 відповідно до McFarland стандарту, тобто  $\sim 1,5 \cdot 10^8$  КУО/мл. ОД визначали при використанні спектрофотометра при довжині хвиль 600 нм.

У якості негативного контролю використовували, стерильне МРС, у котре також додавали жовч та інкубували відповідно до вказаних вище умов.

Колби інкубували у термостатах при 37 °С впродовж 1-2 діб. Після даного періоду спостерігали наявність або відсутність активності росту бактерій.

### **2.2.6 Ріст у м'ясопептонному бульйоні з різними значеннями рН**

Для дослідження було обрано рН 9,3 та рН 9,6. Саме такі значення використовують відповідно до положень стандарту при ідентифікації молочнокислих бактерій.

Попередньо приготований МПБ розділили на три рівні порції. Спочатку визначили початкове рН МПБ, та доводили до значень рН ( $\pm 0,5$ ) вище вказаних використовуючи 1М NaOH та 0.1М HCl розчини. Після середовища розливали в пробірки та автоклаували при 121°C 15 хвилин.

рН визначали за допомогою портативного рН метра Mettler Toledo®.

До колб додавали 1% попередньо підготовленої суспензії досліджуваних бактерій. Суспензію доводили до 0,5 значення ОД відповідно до McFarland стандарту, тобто  $\sim 1,5 * 10^8$  КУО/мл. ОД визначали при використанні спектрофотометра при довжині хвиль 600 нм.

Колби інкубували у термостатах при 37 °С впродовж 1-2 діб. Після чого перевіряли ознаки бактеріальної активності.

### **2.2.7 Тест на резистентність до антибіотиків**

Для визначення резистентності досліджуваних ізолятів бактерій було відібрано 10 антибіотиків із різною концентрацією табл. 2.1. Диски з антибіотиками були комерційно доступні та виготовлені компанією Himedia®.

Ізоляти бактерій були попередньо підготовлені, шляхом розведення в МРС середовищі до отримання 0,5 ОД відповідно до McFarland стандарту, тобто  $\sim 1,5 * 10^8$  КУО/мл.

У чашки Петрі попередньо залиті гідролізатом агару, було нанесено 1 мл досліджуваної бактеріальної культури та розтерто тонким шаром по поверхні агару, використовуючи попередньо профламований шпатель Дригальського. Потім чашку було умовно розділено на 5- 6 частин та пронумерували відповідно до табл. 2.1. Та розмістили відповідний диск з антибіотиком. Чашки перевернувши догори вверх відправили в термостат при 37 °С на 2 доби. Після було відзначено та виміряно зону пригнічення росту.

**Таблиця 2.1**

**Диски з антибіотиками та їх концентрація, використані при аналізу резистентності досліджуваних ізолятів бактерій**

<i>№</i>	<i>Антибіотики</i>	<i>Концентрація [мкг/диск]</i>
1	Канаміцин	30
2	Амоксиклав	30
3	Левоміцитин	30
4	Тетрациклін	30
5	Стрептоміцин	15
6	Еритроміцин	15
7	Левоміцетин	15
8	Хлорамфенікол	30
9	Гентаміцин	10
10	Ампіцилін	10
11	Канаміцин	10
12	Ампіцилін	15
13	Азітроміцин	15

## **2.3 Застосування виділених штамів молочнокислих бактерій для отримання хлібної закваски**

### **2.3.1 Розроблення закваски із досліджуваних культур молочнокислих бактерій**

Додавання молочнокислих бактерій при виробництві хліба є доволі розповсюдженою практикою. Уважається, що МКБ надають характерного смаку та запаху хлібним виробам. Також відмічають їхній вплив на структуру – пружність та утворення скоринки при випіканні. МКБ також проявляють антигрибкові властивості чим подовжують термін зберігання хліба та знижують потребу додавання консервантів для подовження терміну придатності виробів.

З досліджуваних ізолятів бактерій були відібрані ізоляти № 3, 5 та 6 (попередньо ідентифіковані). На відбір бактерій впливали такі показники, як активність кислотоутворення та органолептичні показники (ароматичні та смакові якості).

Для приготування закваски було використано борошно пшеничне (ТМ Зернарі) та стерильна вода. Спочатку було підготовлено борошняно-водну суміш у співвідношенні 1:1. Суміш інокулювали чистими культурами досліджуваних бактерій аби відсоток МКБ культур складав від 1 до 2% від загальної маси. Процедура проводилась в асептичних умовах. Контейнер із сумішшю інкубували при 30 °С в термостаті впродовж 24 годин для запуску процесу ферментації. Після даного часу, половину закваскової суміші відділяли та додавали борошно та стерильну воду у співвідношенні 1:1, перемішували та знову інкубували за попередніх умов. Таких етапів було проведено 5 доки закваска набула ознак стабільного процесу бродіння.

Після отримання стабільної закваски було визначено показник кислотності шляхом титрування, як описано в розділі вище. До використання закваску

зберігали за кімнатної температури із додаванням борошна та води 1:1 кожні 24 години.

### **2.3.2 Отримання хлібу пшеничного із використанням закваски**

Для приготування хліба обрали рецептуру, котру використовують для приготування паляниці із невеликими змінами. Для приготування використовували борошно пшеничне (ТМ Зернарі), олія соняшникова (ТОВ Кама), сіль (ДП Артемсіль), цукор (ТОВ Саркара-Груп), вода та попередньо приготована закваска з МКБ. 10% отриманої закваски було використано для приготування тіста. Для приготування тіста обрали безопарний метод [38]. Бродіння тривало годину двадцять при температурі 32 °С (об'єм збільшився у півтора рази). Тісто замішували 15 хв. лабораторною тістомісильною машиною KVL4100S. У формах тісто відстоювалось 35±2 хв. при температурі 32 °С в шафі для розстоювання тіста XLT 133-UNOX. Випікання паляниць проводили при 180 °С впродовж 30-35 хвилин у печі Unox XFT133.

У якості контролю було виготовлено хліб за класичною рецепторною паляниці з використанням дріжджів (ТМ Криворізькі дріжджі). Приготування тіста проводилось в іншій лабораторію для зниження ризику кроскантамінації при підготуванні тіста.

### **2.3.3 Визначення фізико-хімічних показників та органолептичних показників отриманого хліба пшеничного**

Отримані паляниці хліба аналізували за 4 години після випікання. Органолептичні показники та фізико-хімічні показники якості хліба визначались відповідно з методиками [39].

Показники масової частки вологості, питомий об'єм, кислотність, формостійкість та пористість були визначені як фізико-хімічних показники

якості отриманого хліба. У сушильній шафі СЕШ-3М при 130 °С було визначено вологість хліба. Приладом Журавльова визначали досліджувану пористість.

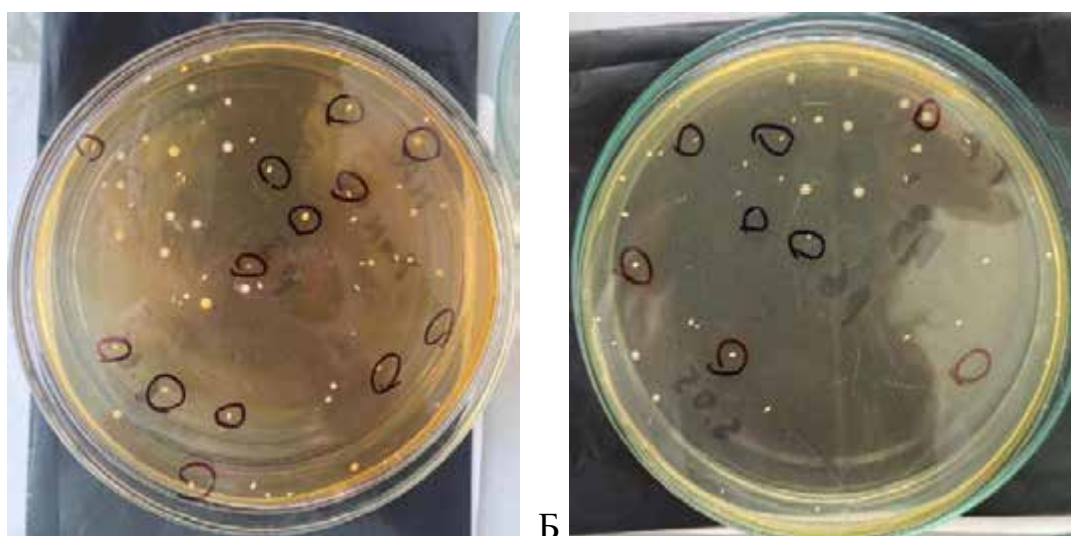
## РОЗДІЛ. ІІІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 3.1. Виділення та дослідження морфолого-культуральних та біохімічних властивостей отриманих ізолятів

#### 3.1.1 Виділення ізолятів бактерій з природних джерел

Бактеріальні ізоляти були отримані після збирання гілочок кизилу, витримування їх на рідкому МРС середовищі з додаванням 10% сухого молока впродовж 12 годин після збирання. Культивування проводилось при 37 та 43 °С в термостаті впродовж 72 годин

Відбирали колонії округлі, опуклої форми, з гладким краєм та блискучою поверхнею колонії. Форма нагадувала форму веретена або грудочки вати, що є характерним для колоній МКБ. Колір колоній різнився від біло-кремового до жовтуватого. Діаметр відібраних колоній варіювався від 1 до 2 мм та досягав максимально 5 мм.



**Рис. 3.1.** Колонії отримані після 24 год культивування у термостаті на ГА при 37 °С та 43 °С

А – зразок отриманий із  $10^{-7}$  розведенні та культивувався при 37°С

Б - зразок отриманий із  $10^{-6}$  розведенні та культивувався при 43°С

Кружечками обведено колонії, котрі були відібрані для ідентифікації.

### 3.1.2 Морфологічні ознаки виділених ізолятів

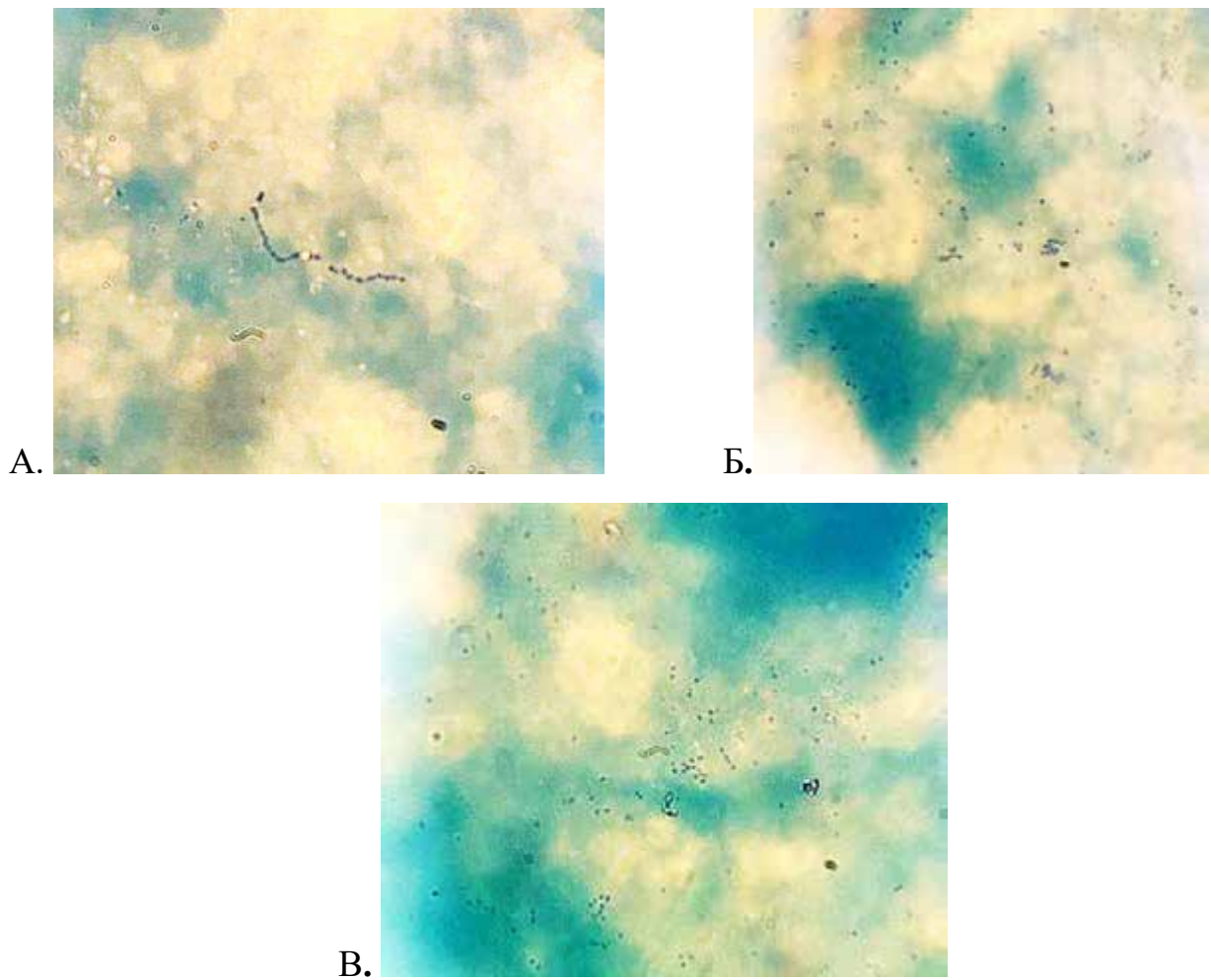
Морфологічні особливості досліджуваних ізолятів, форма бактерій представлені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

#### Морфологічні особливості мазків досліджуваних ізолятів

№ ізоляту	Форма клітин та їх кількість
1	Поодинокі коки, диплококи та поодинокі ланцюжки із 3 - 4 клітин
2	Велика кількість коків, диплококів, наявні ланцюжки із 3 та більше коків
3	Велика кількість диплококів та ланцюжків із 3 – 4 та більше
5	Поодинокі коки, диплококи
6	Поодинокі коки, диплококи
8	Велика кількість коків, диплококів, наявні ланцюжки із 3 та більше коків

Усі зразки містили бактерії кокоїдної форми без ознак сторонньої мікрофлори. Ізоляти № 2, 3 та 8 мали найбільшу кількість біомаси в зразках та скупчення коків різної кількості рис. 3.2.



**Рис. 3.2.** Мікрофотографія виділених бактерій після 5 пасажів, 100x  
Зразки були пофарбовані метиленовим синім.

А. – ізолят № 2, довгий ланцюжок бактерій кокоїдної форми

Б. - ізолят №3, поодинокі та диплококи, ланцюжки

В. - ізолят №8, поодинокі та диплококи, ланцюжки

### 3.1.3 Реакція на утворення каталази

Негативний каталазний тест є характерною ознакою молочнокислих бактерій і використовується як один з методів їхньої диференціації в мікробіологічних дослідженнях.

Усі досліджувані колонії мали негативний результат. При контакті із киснем не було виявлено кисне утворювальної реакції, тобто піни. Це є характерною видовою ознакою для більшості молочнокислих бактерій.

Молочнокислі бактерії переважно є анаеробами або факультативними анаеробами. Це означає, що вони живуть в умовах з низьким вмістом кисню і не стикаються з великою кількістю перекису водню, який утворюється при аеробному метаболізмі.

### **3.1.4 Швидкість сквашування або активність кислоутворення**

Швидкість сквашування перевірили спочатку до 8 годин кожну годину, після через 18 годин та 24 години ферментації.

Жоден із досліджуваних зразків не проявив ознак сквашування за перші 8 годин сквашування. Через 18 годин лише зразки ізолятів № 3 та 8 утворили в'язку текучий згусток по всьому об'єму колби. На 24 годуну сквашування зразок № 2 сквасив молоко лише на третину об'єму, а зразки № 1, 5 та 6 мали прояви життєдіяльності лише на дні колби.

### **3.1.5 Вивчення титрованої кислотності**

Результати кислоутворення досліджуваних штамів бактерій представлені в таблиці 3.2.

Найвищий показник сквашування присутній у зразку ізоляту №3 зі значенням 124°Т. Решта ізолятів – 1, 2, 5, 6 та 8 мають показники кислотності в межах від 71 до 76 °Т.

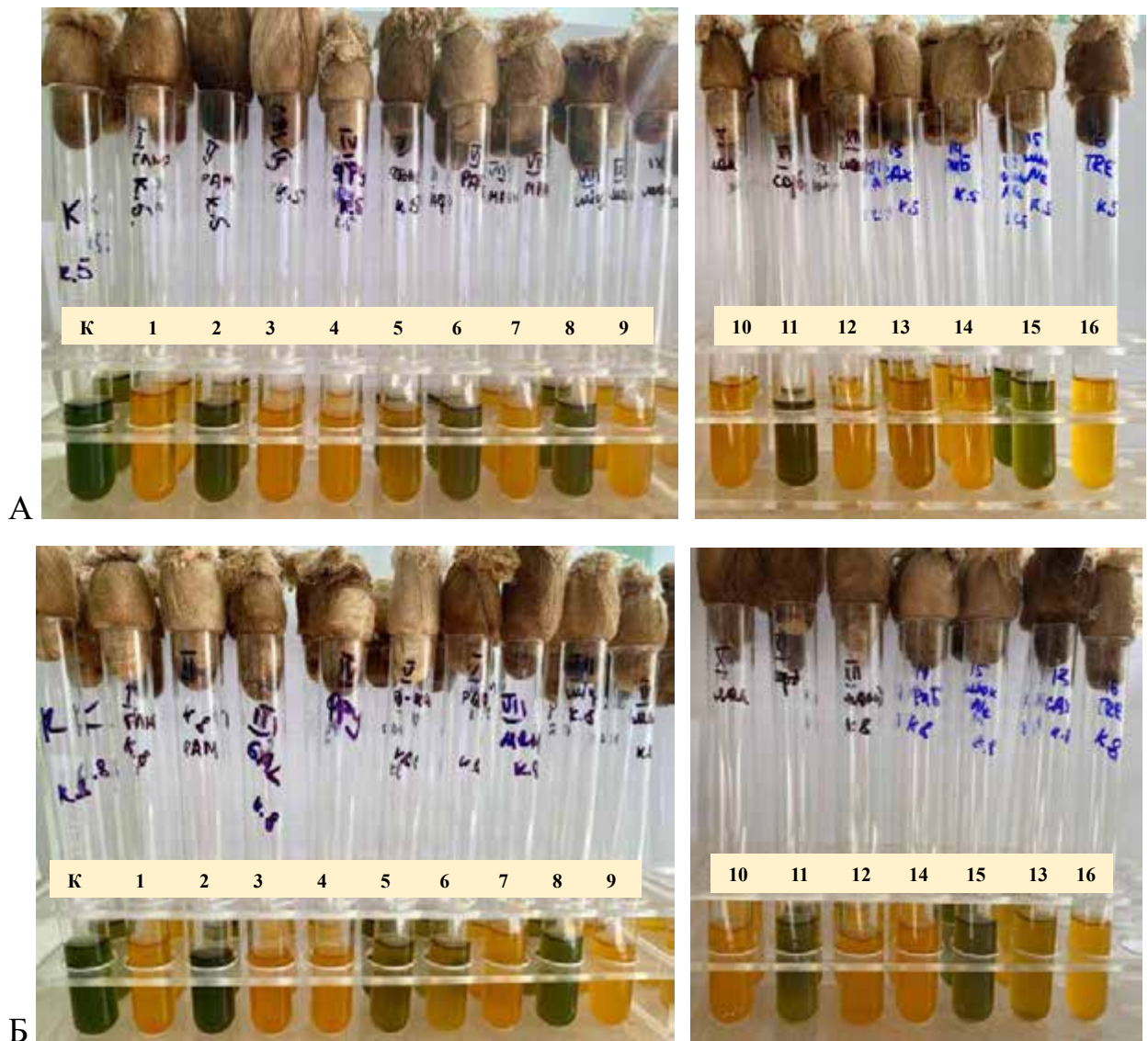
**Значення кислотності в градусах Тернера досліджуваних колоній  
МКБ**

<b>№ колонії</b>	<b>Повторення</b>	<b>Кислотність в °Т</b>	<b>Середнє значення кислотності в °Т</b>
1	1	78	75,5
	2	73	
2	1	76	75
	2	74	
3	1	124	124
	2	124	
5	1	74	74
	2	74	
6	1	75	76
	2	77	
8	1	68	71,5
	2	75	

### 3.1.6 Зброджування вуглеводів

Відповідно до отриманих результатів, можна стверджувати, що ізоляти № 5 та № 8 є подібними за показником споживання вуглеводів та можуть бути потенційно віднесені до одного виду.

Усі шість колоній дали позитивний результат при зброджуванні наступних вуглеводів: глюкоза, галактоза, фруктоза, манозу, мальтозу, лактозу, манітол, рибозу та трегалозу. Майже жодна колонія не здатні до споживання глюканат-Na, рамнози та гліцерину (за винятком колонії 1 та 3). Рафінозу та здатні повністю метаболізувати колонії 2, 3 та 8, та частково – колонії № 5. Сахарозу споживають майже усі колонії, окрім першої.



**Рис. 3.3.** Результати зброджування вуглеводнів досліджуваних ізолятів № 5 та № 8 після 48 годин культивування

А – пробірки із ізолятом № 5

Б – пробірки із ізолятом № 8

К – негативний контроль

Номери від 1 до 16 відповідають порядковим номерам вуглеводнів в таблиці 3.3.

**Результати збродження вуглеводнів досліджуваних  
ізолятів МКБ 1, 2, 3, 5, 6, 8**

№	Вуглевод	К. 1		К. 2		К. 3		К. 5		К. 6		К. 8	
		По-ння		По-ння		По-ння		По-ння		По-ння		По-ння	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
I	Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
II	Рамноза	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-
III	Галактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IV	Фруктоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V	Д-ксилоза	±	-	±	±	±	±	±	-	±	-	±	-
VI	Рафіноза	±	-	+	+	+	+	±	±	±	-	+	+
VII	Маноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VIII	Гліцерин	+	±	-	-	+	+	-	-	-	±	-	-
IX	Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
X	Лактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XI	Сорбіт	+	+	+	-	±	±	-	-	±	-	-	-
XII	Манітол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XIII	Сахароза	±	-	+	±	+	+	+	±	+	+	+	+
XIV	Рибоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XV	Глюканат-Na	±	-	±	-	-	-	-	-	±	-	-	-
XVI	Трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**Примітка.**

+ – позитивний результат, жовтий колір середовища;

- – негативний результат, зелено-голубий колір середовища;

± – частково позитивний результат, світло зелений або жовтуватий колір середовища.

Червоним кольором позначено позитивний результат характерний для всіх досліджуваних колоній бактерій.

### 3.1.7 Ріст в гідролізованому молоці із додаванням жовчі та у м'ясопептонному бульйоні з різними значеннями рН

Ріст у гідролізованому молоці з додаванням жовчі проводили для визначення здатності ізолятів до перетравлення білків та жовчної стійкості.

Відомо, що цей метод часто використовують для ізоляції і диференціації ентерококів та інших бактерій, які можуть рости в середовищах із вмістом жовчі. Деякі бактеріальні види, особливо ентерококи (наприклад, *Enterococcus faecalis*), здатні розмножуватися у присутності жовчі, тоді як інші мікроорганізми, менш стійкі до жовчі, будуть пригнічені.

Нами виявлено активність усіх досліджуваних бактерій при культивуванні на ГА із додаванням 20% та 40% жовчі. Це свідчить про здатність виживати у жовчному середовищі, що може бути показником їхнього адаптаційного механізму.

Через 24 години культивування зразків при рН 9,2 усі ізоляти дали позитивний результат на ріст. При культивуванні із рН 9,6 не було ідентифіковано жодної бактеріальної активності.

## **3.2. Вивчення резистентності до антибіотиків та ідентифікація виділених штамів бактерій**

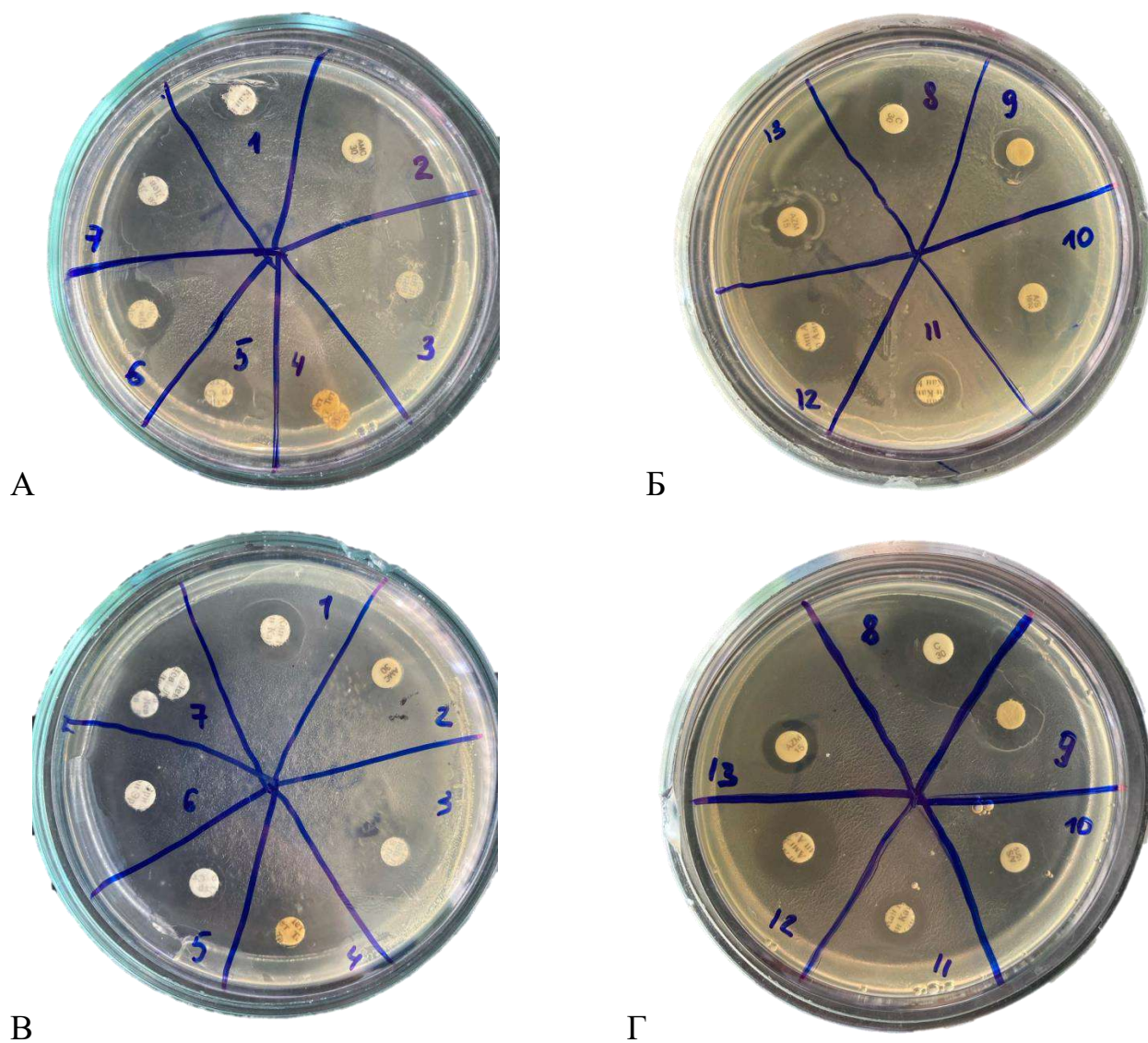
### **3.2.1. Резистентність до антибіотиків**

На 48 годину культивування ізоляти 1, 2, 3 та 6 проявили резистентність до антибіотику канаміцину в концентрації 15 мкг/диск. Хоча резистентність до цього антибіотику при концентрації 30 мкг/диск зберіг лише ізолят № 6, а ізоляти № 1, 2 та 3 проявили часткову резистентність.

Усі досліджуваних ізоляти були найбільш чутливими до тетрацикліну (30 мкг/д) та ампіциліну (10 мкг/д), до левоміцитину (30 мкг/д) та стрептоміцину (15 мкг/д) сприйнятливість була середня.

Ізоляти № 5 та 6 не проявили жодних ознак повної резистентності до жодного із використаних антибіотиків, але проявили часткову резистентність до канаміцину в концентрації 30 мкг/диск.

Ізолят № 1 також проявив резистентність до амоксиклаву (30 мкг/диск), та часткову резистентність до левоміцетину (15 мкг/д), хлорамфеніколу (30 мкг/д), гентаміцину (10 мкг/д) та азітроміцину (15 мкг/д). Лише ізолят № 2 був резистентною до левоміцетину (15 мкг/д) та частково резистентною до еритроміцину (15 мкг/д) та азітроміцину (15 мкг/д). До гентаміцину (10 мкг/д) резистентним був виключно ізолят № 3.



**Рис. 3.4.** Зони відсутності росту при тестуванні антибіотик резистентності досліджуваних ізолятів

А – чашка Петрі із ізолятом №8

Б – чашка Петрі із ізолятом №8

В – чашка Петрі із ізолятом №3

Г – чашка Петрі із ізолятом №2

Зони позначені від 1 до 13 відповідають номерам антибіотиків зазначених в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

**Резистентність досліджуваних ізолятів бактерій до антибіотиків різної природи та концентрації**

№	Антибіотики [мкг/диск]	К. 1	К. 2	К. 3	К. 5	К. 6	К. 8
1	Канаміцин 30	-	-	-	+ 0,5 см	-	+ 0,4 см
2	Амоксиклав 30	-	+ 1 см	+ 1,2 см	+ 0,3 см	+ 0,7 см	+ 1 см
3	Левоміцитин 30	+ 0,3 см	+ 0,6 см	+ 0,5 см	+ 0,8 см	+ 0,7 см	+ 0,7 см
4	Тетрациклін 30	+ 0,7 см	+ 0,7 см	+ 0,5 см	+ 0,8 см	+ 0,7 см	+ 1 см
5	Стрептоміцин 15	+ 0,5 см	+ 0,5 см	+ 0,5 см	+ 0,3 см	+ 0,5 см	+ 0,6 см
6	Еритроміцин 15	+ 0,6 см	+ 0,3 см	+ 0,7 см	+ 0,5 см	+ 0,3 см	+ 0,6 см
7	Левоміцетин 15	+ 0,4 см	-	+ 1 см	+ 0,4 см	+ 0,6 см	+ 0,4 см
8	Хлорамфенікол 30	+ 0,3 см	+ 0,7 см	+ 0,5 см	+ 1 см	+ 0,8 см	+ 0,8 см
9	Гентаміцин 10	+ 0,3 см	+ 0,5 см	-	+ 0,4 см	+ 0,5 см	+ 0,4 см
10	Ампіцилін 10	+ 0,7 см	+ 1 см	+ 0,5 см	+ 1,1 см	+ 1 см	+ 1,1 см
11	Канаміцин 10	+ 0,3 см	+ 0,7 см	+ 0,5 см	+ 0,1 см	-	+ 0,1 см
12	Ампіцилін 15	+ 0,8 см	+ 0,6 см	+ 0,7 см	+ 0,4 см	+ 0,4 см	+ 0,7 см
13	Азітроміцин 15	+ 0,4 см	+ 0,4 см	+ 0,3 см	+ 0,3 см	+ 0,3 см	+ 0,3 см

**Примітка.**

+ - наявність зони вільної від бактерій (чутливі до даного антибіотику)

- - відсутність зони вільної від бактерій (резистентні до даного антибіотику)

Жирним виділені зони чутливості до антибіотику котрі є більші за 0,5 мм.

### 3.2.2. Ідентифікація виділених штамів бактерій

Приналежність до виду досліджуваних бактерій спиралось на попередньо досліджувані морфологічні, метаболічні особливості виділених колоній бактерій. Таким чином було визначено, що усі виділені колонії відносяться до молочно-кислих бактерій. Усі ідентифікаційні ключі були порівняні із поданими у Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009 р [2].

Впливає Отже, ізолят № 1 було віднесено до виду *Enterococcus durans*, ізолят № 2 – *Pediococcus pentosaceus*, ізолят № 3 – *Pediococcus acidilactici*, ізоляти № 5 та № 8 – *Lactococcus raffinolactis* та ізолят № 6 – *Lactococcus lactis*.

Для подальшого використання у якості закваски було обрано бактерії *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus raffinolactis* та *Lactococcus lactis*. Вибір даних видів бактерій ґрунтувався на їх метаболічних особливостях. Так *Pediococcus acidilactici* впливає на перетворення глютену чим покращує текстуру, смакові якості та харчову цінність хлібу. *Lactococcus raffinolactis* має свої переваги, адже виробляє речовини котрі впливають на адгезію та зв'язування речовин також збагачує хліб вітамін В3. *Lactococcus lactis* впливає на органолептичні показники хлібу та пролонгує його термін зберігання (як і попередні види МКБ).

### 3.3 Дослідження впливу закваски з МКБ на якість хліба пшеничного

Порівняння проводились між контролем, котрий був виготовлений із додаванням хлібопекарських дріжджів (ХД). Дослідження 10% закваски з МКБ на основі *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus raffinolactis* та *Lactococcus lactis* проводили базуючись на результатах лабораторних випікань.

Паляниця виготовлені із 10% закваски мають більш привабливий зовнішній вигляд та смаковими якостями рис. 3.5.



**Рис. 3.5.** Готові паляниці хліба з додаванням 10% закваски в розрізі

- МКБ + 10% - паляниця виготовлена із додаванням 10% закваски
- Контроль з ХД – паляниця виготовлена із додаванням хлібопекарські дріжджі

Результати фізико-хімічних показників якості лабораторних випікань представлені в табл. 3.5.

**Таблиця 3.5**

**Фізико-хімічні показники якості пшеничного хліба виготовленого із додаванням 10% закваски ( $n=10$ ,  $p \leq 0,05$ )**

Показник	Контроль з ХД	Зразок з 10% МКБ
Питомий об'єм, см <sup>3</sup> / 100 г	2,4±0,1	2,5±0,1
Формостійкість подового хліба (h/d)	0,60±,05	0,67±,05
Пористість, %	70±2	74±2
Масова частка вологи, %	42,3±0,1	42,8 ±0,1
Кінцева титрована кислотність, °Т	3,5±0,1	3,9±0,1

Усі досліджувані показники мали вищі значення у зразку виготовленого із додаванням 10% закваски.

Питомий об'єм паляниць виготовлених із додаванням 10% закваски виріс на 4,0 % порівнюючи з контролем. Також, незначний ріст на 1,2 % був виявлений при визначенні масової частки вологи в паляниці із МКБ. Показник пористості збільшився на 5,7 %, а найбільше зростання на 11,7 % прослідковувалось при формостійкості подового хліба та 11,4% титрована кислотність хлібу із 10% вмістом закваски.

Органолептична оцінка властивостей випечених паляниць з додаванням 10% закваски та контролю з ХД подано в таблиці 3.6.

**Таблиця 3.6**

**Органолептичні показники якості хліба пшеничного з додаванням 10% закваски**

<b>Показник</b>	<b>Контроль з ХД</b>	<b>Зразок з 10% МКБ</b>
Зовнішній вигляд	Гладка поверхня без тріщин, правильної форми	
Колір скоринки	Світло-коричневий	Світло-коричневий
Смак і аромат	Притаманний пшеничному хлібу	Притаманний пшеничному хлібу із приємним легким кисломолочним присмаком та молочним ароматом
Стан м'якушки	Жовто-коричневого кольору, пружна та еластична структура з хорошою пористістю; пори розподілені рівномірно, дрібні за розміром та не заминаються	Світло жовто-коричневого кольору, пружна та еластична структура з хорошою пористістю; пори розподілені рівномірно, дрібні за розміром та не заминаються
Розжовуваність м'якушки	Добре розжовується та не утворює грудочок	Добре розжовується та не утворює грудочок

Хліб виготовлений із додаванням 10% закваски вирізнявся найкращими смаковими якостями та мав більш привабливий зовнішній вигляд рис. 3.5. Колір м'якуші світліший відтінок у зразку із 10% МКБ порівнюючи із контролем. Показник смаку досліджуваного зразка вирізнявся приємним кисломолочним присмаком та молочним ароматом.

## ВИСНОВКИ

1. Бактеріальні ізоляти молочно-кислих бактерій були отримані з епіфітної мікробіоти гілочок кизилу, після витримування їх на рідкому МРС середовищі з додаванням 10% сухого молока впродовж 12 годин після збирання та культивування при 37 в термостаті впродовж 72 годин. Було виділено шість ізолятів бактерій (К-1, К-2, К-3, К-5, К-6 та К-8), отримано їх у чистій культурі.

2. Досліджувані ізоляти вивчали за морфологічними ознаками, біохімічними показниками (реакція на утворення каталази, активність кислотоутворення, зброджування вуглеводів), ростом в гідролізованому молоці із додаванням жовчі та у м'ясопептонному бульйоні з різними значеннями рН, резистентністю до антибіотиків.

3. Перелічені характеристики ізолятів дозволили провести ідентифікація виділених штамів бактерій та визначити їх таксономічне положення, базуючись на ідентифікаційних ключах. Всі бактерії визначили як молочно-кислі коки та наступні види були ідентифіковані: К - 1 – *Enterococcus durans*, К - 2 – *Pediococcus pentosaceus*, К - 3 – *Pediococcus acidilactici*, К – 5 та К - 8 – *Lactococcus raffinolactis* та К - 6 – *Lactococcus lactis*.

4. На основі молочно-кислих бактерій *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus raffinolactis* та *Lactococcus lactis* було виготовлено хлібну закваску.

5. 10% відсоткова закваска було використано для приготування пшеничного хлібу за рецептурою паляниці та лабораторні випікання були проведені. Зразок був порівняний із контролем виготовленим за використання хлібопекарських дріжджів. Було встановлено, що об'єм випечених паляниць виріс на 4,0%, кислотність – 11,4 % у порівнянні із контролем. Зразок із 10% закваскою вирізнявся приємним кисломолочним присмаком та молочним ароматом.

6. Як елемент оптимізації у біотехнології отримання хліба пшеничного було досліджено використання нових природніх видів молочнокислих бактерій в якості закваски.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Michaylova, M., Minkova, S., Kimura, K., Sasaki, T., & Isawa, K. (2007). Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria. *FEMS microbiology letters*, 269(1), 160-169.
2. De Vos P. *Bergey's manual of systematic bacteriology* / De Vos P., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K-H. Schleifer, W. D. Whitman. - Second edition. Springer: New York, 2009. – Vol. 3. – 1422 p.
3. Дробот В.І., (Ed.) (2019). Довідник з технології хлібопекарського виробництва: навчальний посібник. Київ: ПрофКнуга, 580.
4. Liu, W., Pang, H., Zhang, H., and Cai, Y. (2014). “Biodiversity of lactic acid bacteria,” in *Lactic Acid Bacteria*, eds H. Zhang, and Y. Cai (Dordrecht: Springer), 103–203. doi: 10.1007/978-94-017-8841-0\_2
5. Naeem, M., Ilyas, M., Haider, S., Baig, S., and Saleem, M. (2012). Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from fruit juices and their efficacy against antibiotics. *Pakistan J. Bot.* 44, 323–328
6. Di Cagno, R., Surico, R.F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon, J.C., Buchin, S., et al. (2009). Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on healthpromoting and sensory properties of tomato juices. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 473–483. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.017
7. Olofsson, T.C., Butler, È., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., and Vásquez, A. (2014). Lactic acid bacterial symbionts in honeybees—an unknown key to honey’s antimicrobial and therapeutic activities. *Int. Wound J.* 13, 668–679. doi: 10.1111/iwj.12345
8. Naeem, M., Ilyas, M., Haider, S., Baig, S., and Saleem, M. (2012). Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from fruit juices and their efficacy against antibiotics. *Pakistan J. Bot.* 44, 323–328.
9. Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., and Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.* 33, 1–10. doi: 10.1016/j.fm.2012.09.003

10. Bae, S., Fleet, G., and Heard, G. (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J. Appl. Microbiol.* 100, 712–727. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02890.x
11. Chambel, L., Chelo, I.M., Zé-Zé, L., Pedro, L.G., Santos, M.A., and Tenreiro, R. (2006). *Leuconostoc pseudoficulneum* sp. nov., isolated from a ripe fig. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1375–1381. doi: 10.1099/ijs.0.64054-0
12. Neveling, D.P., Endo, A., and Dicks, L.M. (2012). Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* isolated from fresh flowers, bees and bee-hives. *Curr. Microbiol.* 65, 507–515. doi: 10.1007/s00284-012-0186-44
13. Endo, A., Futagawa-Endo, Y., and Dicks, L.M. (2009). Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 593–600. doi: 10.1016/j.syapm.2009.08.002
14. Leong, K.-h., Chen, Y.-S., Pan, S.-F., Chen, J.-J., Wu, H.-C., Chang, Y.-C., et al. (2014). Diversity of lactic acid bacteria associated with fresh coffee cherries in Taiwan. *Curr. Microbiol.* 68, 440–447. doi: 10.1007/s00284-013-0495-2
15. Calvert, M. D., Madden, A. A., Nichols, L. M., Haddad, N. M., Lahne, J., Dunn, R. R., & McKenney, E. A. (2021). A review of sourdough starters: Ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. *PeerJ*, 9, e11389.
16. Davis JG (1975) The microbiology of yogurt. *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food* (Carr JG, Cutting CV & Whiting GC, eds), pp. 245–263. Academic Press, London.
17. Norbert W, Shhillinger U & Kandler O (1983) *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus bulgaricus*, Subjective Synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and description of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* comb. nov. *Syst Appl Microbiol* 4: 552–557.
18. Markoff VL (1925) *Applied Microbiology*, PELIN, Sofia, Bulgaria (in Bulgarian).

19. Girginoff T (1959) *Microbiology of the Animal Products*. State Publishing House for Agriculture Literature, Sofia, Bulgaria, p. 52 (in Bulgarian).
20. Andrews JH & Harris RF (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surface. *Annu Rev Phytopathol* 38: 145–180.
21. Tukey H B (1970) Leaching of substrates from plants. *Annu Rev Plant Physiol* 21: 305–324.
22. Mercier J & Lindow SE (2000) Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl Environ Microbiol* 66: 369–374.
23. Michaylova M, Dimitrov Z, Isawa K & Minkova Sv (2005) Isolation and characterization of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* from plants and home-made yogurts. Abstract of International Symposium on Original Bulgarian Yogurt. Sofia, Bulgaria, 25–27 May, pp. 11–12, (in Bulgarian).
24. Thiyaamoorthy Umamaheswari, T. U., Kaliyaperumal Anbukkarasi, K. A., Prashant Singh, P. S., Tomar, S. K., & Rameshwar Singh, R. S. (2014). *Streptococcus thermophilus* strains of plant origin as dairy starters: Isolation and characterisation.
25. Saito, Y., Tonouchi, A., Harada, Y., Ogino, R., & Toba, T. (2020). Isolation of *Streptococcus thermophilus* strains from plants in Japan and their application to milk fermentation. *Food Science and Technology Research*, 26(1), 1-8.
26. Koistinen, V. M., Mattila, O., Katina, K., Poutanen, K., Aura, A. M., and Hanhineva, K. (2018). Metabolic profiling of sourdough fermented wheat and rye bread. *Sci. Rep.* 8, 5684–5611. doi: 10.1038/s41598-018-24149-w
27. Rizzello, C. G., Portincasa, P., Montemurro, M., di Palo, D. M., Lorusso, M. P., de Angelis, M., et al. (2019). Sourdough fermented breads are more digestible than Those started with Baker’s yeast alone: an in vivo challenge dissecting distinct gastrointestinal responses. *Nutrients* 11:2954. doi: 10.3390/NU11122954
28. Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Archetti, G., and Rizzello, C. G. (2019). Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 302, 103–113. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2018.05.018

29. Galli, V., Venturi, M., Pini, N., Guerrini, S., Granchi, L., and Vincenzini, M. (2019). Liquid and firm sourdough fermentation: microbial robustness and interactions during consecutive backsloppings. *LWT* 105, 9–15. doi: 10.1016/J.LWT.2019.02.004
30. Corsetti, A. (2013). Technology of sourdough fermentation and sourdough applications. *Handbook on Sourdough Biotechnology*, 85–103. doi: 10.1007/978-1-4614-5425-0\_4
31. Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Georgalaki, M., Alexandraki, V., Kazou, M., Anastasiou, R., et al. (2019). Sourdough Bread. *Innovations in Traditional Foods*, 127–158. doi: 10.1016/B978-0-12-814887-7.00006-X
32. Preedy, V. R., and Watson, R. R. (2019). Flour and breads and their fortification in health and disease prevention. Academic Press. doi: 10.1016/C2017-0-01593-8
33. Pérez-Alvarado, O., Zepeda-Hernández, A., Garcia-Amezquita, L. E., Requena, T., Vinderola, G., & García-Cayuela, T. (2022). Role of lactic acid bacteria and yeasts in sourdough fermentation during breadmaking: Evaluation of postbiotic-like components and health benefits. *Front Microbiol*, 13, 969460. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.969460>
34. De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H. M., and Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food Microbiol.* 37, 11–29. doi: 10.1016/J.FM.2013.06.002
35. Chavan, R. S., and Chavan, S. R. (2011). Sourdough technology—a traditional way for wholesome foods: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10, 169–182. doi: 10.1111/J.1541-4337.2011.00148.X
36. De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., and Leroy, F. (2017). Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 100, 49–160. doi: 10.1016/BS.AAMBS.2017.02.003
37. Gänzle, M. G. (2014). Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiol.* 37, 2–10. doi: 10.1016/J.FM.2013.04.007

38. Гетьман, І. А., Науменко, О. В. (2022). Перспективи збагачення хлібобулочних виробів борошном тефу. Інноваційний розвиток харчової індустрії: зб. наук. праць за матеріалами ІХ Міжнар. наук.-практ. конф., 24 листопада, 2022 р. Київ: ІПР НААН, 91–93.

39. Дробот, В. І. (2015). Технохімічний контроль сировини та хлібобулочних і макаронних виробів. Київ: Кондор-Видавництво, 958.

## ДОДАТОК А

*Селективне середовище для молочнокислих бактерій MPC (рідке) (De Man–Rogosa–Sharpe agar)*

- 10 г пептону
- 5 г м'ясного екстракту
- 5 г дріжджового екстракту
- 20 г D(+)-глюкози
- 1 г Tween 80
- 2 г -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 2 г триамонію цитрату
- 5 г ацетату натрію
- 0.2 г -  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
- 0.05 г -  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

Кінцева рН  $6.5 \pm 0.2$  при  $25^\circ\text{C}$

*Агар з гідролізованим молоком (ГА) на 1 л*

- 28 г знежиреного сухого молока
- 5 г гідролізат казеїну
- 2.5 г екстракту дріжджів від Condalab®
- 1 г декстрази
- 15 г агару

Кінцева рН  $7.0 \pm 0.2$  при  $25^\circ\text{C}$

*Середовище для зброджування вуглеводнів на 1 л*

- 10 г екстракту дріжджів від Condalab®
- 2 г -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 2 г -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 2 г -  $\text{MgSO}_4$
- 10 г пептону бактеріологічного від Condalab®

- 0.016-0.02 г/л бромфенолового синього
- Кінцева рН доводили 1М NaOH до  $7.6 \pm 0.2$

## ДОДАТОК Б

### АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ МАГІСТЕРСЬКОЇ РОБОТИ

1. Гунько Т.С. та Бородай В.В. ФАКТОРИ ВПЛИВУ НА В'ЯЗКІСТЬ МОЛОЧНО-КИСЛИХ ПРОДУКТІВ ЗА ВИКОРИСТАННЯ STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS. III Всеукраїнської науково-практичної конференції здобувачів вищої освіти, присвяченій 126-річчю НУБіП України «Досягнення і перспективи в захисті та карантині рослин». – Київ. – 2024, - 204 с.
2. Гунько Т.С. та Бородай В.В. ЗАСТОСУВАННЯ STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS У ХАРЧОВІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ. X Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Екологія – філософія існування людства». – Київ. – 2024, - 75 с.
3. Гунько Т.С. та Бородай В.В. ОПТИМІЗАЦІЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ ЗАКВАСОК У МОЛОЧНІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ. X Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії». – Київ. – 2024, - 23 с.