

МІНІСТЕСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач випускової кафедри

_____ М.М. Барановський

«___» _____ 2021 р.

**ДИПЛОМНА РОБОТА
(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)**

ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ «БАКАЛАВР»
СПЕЦІАЛЬНІСТЬ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»
ОСВІТНЬО-ПРОФЕСІЙНА ПРОГРАМА «ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

Тема: «Антибіотикостійкість закваски в біотехнології виробництва кефіру»

Виконавець: студентка групи ФЕБІТ- 402

Полончук Л. Ю.

Керівник: к.т.н., доцент кафедри біотехнології

Корнієнко І.М.

Нормоконтролер:

Дражнікова А.В.

КИЇВ 2021
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій
Кафедра біотехнології
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
Освітньо - професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач випускової кафедри

_____ М.М. Барановський

«__» _____ 2021 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Полончук Людмили Юріївни

1. Тема дипломної роботи: «Антибіотикостійкість закваски в біотехнології виробництва кефіру» затверджена наказом ректора від «11» травня 2021 р. № 715/ст.
2. Термін виконання роботи: з 10 травня 2021 р. по 20 червня 2021 р.
3. Вихідні дані роботи: власні експериментальні дані зроблені на базі Національного авіаційного університету, літературні джерела.
4. Зміст пояснювальної записки: Перелік умовних позначень, скорочень, термінів. Вступ. Літературний огляд. Об'єкти і методи досліджень. Аналіз та узагальнення результатів дослідження. Висновки. Список бібліографічних посилань використаних джерел.
5. Перелік обов'язкового ілюстративного матеріалу: таблиць 14, рисунків 19, графіків 4.
6. Календарний план-графік

№ з/п	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Літературний огляд та збір інформації за темою дипломної роботи	10.05.21 – 16.05.21	
2	Виконання експериментальної частини	16.11.20 – 20.11.20	
3	Написання основної частини	16.05.21 – 22.05.21	
4	Формулювання висновків та рекомендацій	22.05.21 – 23.05.21	
5	Перевірка дипломної роботи керівником	23.05.21 – 25.05.21	
6	Кінцеве оформлення роботи	26.05.21 – 30.05.21	
7	Захист дипломної роботи	16.06.2021	

7. Дата видачі завдання «10» травня 2021 р.

Керівник дипломної роботи:

(підпис керівника)

Корнієнко І.М.

(П.І.Б.)

Завдання прийняв до виконання:

(підпис випускника)

Полончук Л.Ю.

(П.І.Б.)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Антибіотикостійкість закваски в біотехнології виробництва кефіру»: 101 сторінка, 19 рисунків, 4 графіки, 14 таблиць,

100 використаних джерел.

Мета дипломної роботи — дослідження антибіотикочутливості консорціуму молочнокислих бактерій та удосконалення технології виробництва кефіру.

Об'єкт дослідження — культивування кефірних зерен біопрепарату «Vivo кефір» на середовищі з антибіотиком.

Предмет дослідження — науково-практичні засади процесу ферментації молока біопрепаратом «Vivo кефір».

Методи дослідження — мікробіологічні, фізико-хімічні, статистичні.

Наукова новизна дослідної роботи полягає в наступному:

1. Встановлено високу біологічну активність симбіозу чистих культур закваски «Vivo кефір» по відношенню до антибіотиків різних груп: бензилпеніцилін, лінкоміцин, азитроміцин, гентаміцину сульфат, цефтріаксон, ніфуроксазид, норфлуксацин, амоксил.

2. Результатами експериментів підтверджено антибіотикостійкість консорціуму МКБ та молочних грибів кефірних зерен закваски «Vivo кефір» при взаємодії з антибіотиками концентрацією 500 та 250 мг/мл.

3. Експериментами доведено можливість одночасного вживання антибіотиків та кисломолочного напою, виготовленого на заквасці «Vivo кефір» для профілактики дисбактеріозів під час лікування.

КИСЛОМОЛОЧНІ ПРОДУКТИ, КЕФІР, ПРОБІОТИКИ, МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ, КЕФІРНІ ГРИБИ, АНТИБІОТИКОСТІЙКІСТЬ, ЗАКВАСКА «VIVO КЕФІР».

ЗМІСТ

ВСТУП.....

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	11
1.1. Сучасні біотехнології виробництва кефіру	11
1.2. Патентний огляд в області біотехнології виробництва кефіру.....	14
1.3. Наукові положення процесу молочнокислого бродіння.....	18
1.4. Класифікація пробіотичних препаратів.....	20
1.5. Біотехнології приготування кефіру.....	22
1.5.1. Класична технологія виробництва кефіру.....	22
1.5.2. Оцінка якості кефіру за технічними вимогами.....	24
1.5.3. Характеристика комплексів устаткування та принцип дії лінії.....	27
1.6. Принцип дії антибіотиків на бактеріальні та дріжджові клітини.....	29
1.7. Стійкість молочнокислих бактерій, молочних дріжджів та сахароміцетів пекарських до антибіотиків.....	34
1.8. Висновки до розділу.....	37
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	39
2.1. Морфологічні та культуральні особливості молочнокислих бактерій та молочних дріжджових кефірних грибів.....	39

2.2. Методи дослідження	45
2.2.1. Фізико-хімічні методи дослідження.....	45
2.2.2. Мікробіологічні методи дослідження.....	48
2.3. Висновки до розділу.....	52
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	53
3.1. Технологія приготування лабораторного кефіру.....	53
3.2. Результати фізико-хімічних досліджень якості кефіру.....	54
3.2.1. Визначення якості кефіру за показниками активної та титрованої кислотності, ОВП.....	55
3.2.2. Визначення якості кефіру за органолептичними показниками.....	56
3.3. Результати мікробіологічних досліджень якості кефіру та антибіотикостійкості закваски «Vivo кефір».....	61
3.3.1. Визначення якості кефіру за мікробіологічними показниками.....	61
3.3.2. Визначення антибіотикостійкості МКБ закваски «Vivo кефір» за мікробіологічними показниками.....	63
3.4. Рекомендації щодо вживання функціонального кефіру власного виробництва.....	86

3.5. Висновки до розділу.....	86
ВИСНОВКИ.....	88
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	89
Додаток А Принципова технологічна схема виробництва кефіру резервуарним способом.....	100
Додаток Б Апаратурна схема виробництва кефіру резервуарним способом.....	101

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

МО – мікроорганізми

МКБ – молочнокислі бактерії

ОВП – окисно-відновний потенціал

ВСТУП

В останні роки в зв'язку з глобальним забрудненням навколишнього середовища, несприятливої екологічної ситуації, широким застосуванням хіміотерапевтичних препаратів, відзначаються значні зрушення в мікроекології, що призводять до патології травної та імунної систем організму. Тому, боротьба з дисбактеріозом стає все більш актуальною, а розробка ефективних біопродуктів для відновлення нормальної мікрофлори розглядається як один із шляхів підвищення здоров'я населення [1].

На сьогоднішній день є актуальним вживання кисломолочних продуктів, що містять мікроорганізми-пробіотики, які є апатогенними для людини і володіють антагоністичною активністю відносно патогенних і умовно-патогенних МО, що сприяє збереженню і відновленню нормальної мікрофлори кишківника [2]. До кисломолочних продуктів відносять кефір, йогурти, біойогурти, ряжанку, тощо.

В Україні найбільш вживаним та популярним продуктом серед користувачів залишається класичний кефір. За даними Державної служби статистики України в період за січень– лютий 2019р. до січня – лютого 2018р було вироблено 99,5 % кисломолочної продукції [3].

Найнадійнішим джерелом корисних МО є кефір. Він містить кефірні зерна (біфідобактерії, ацидофільні молочнокислі палички, лактобактерії, стрептококи, молочні дріжджі), які допомагають при захворюваннях шлунково-кишкового тракту, покращують травлення, стимулюють роботу імунної системи організму. Корисні бактерії знищують шкідливі речовини, які накопичуються в організмі і негативно впливають на загальне самопочуття, викликаючи втому і головний біль. Також вченими було досліджено, що молочнокислі бактерії, які входять до складу кефіру, запобігають розвитку раку. Вони спонукають імунну систему боротися з раковими клітинами.

Завдяки лікувально-профілактичним властивостям кефіру, лікарі рекомендують вживати його для запобігання порушень мікробіоти кишківника особливо під час антибіотикотерапії. Адже, прийом антибіотиків не тільки позбавляє людину від хвороботворних бактерій, а й завдає шкоди її здоров'ю. Антибіотики здатні порушувати екосистему організмів, які присутні в травній

системі людини, що призводить до дисбалансу бактерій і викликає діарею, запальні процеси в кишківнику.

Актуальністю на сьогоднішній день є часті захворювання населення. Зокрема в 2019 році стрімко розповсюдилась по світу нова діагностована коронавірусна інфекція – COVID-19, яка переходить у запалення легень – пневмонію. Спеціалісти ВОЗ були вимушені терміново розробляти протокол лікування нової хвороби. І в даному протоколі прописано застосування антибіотичних препаратів при тяжкому перебігу хвороби. Тому, дієтологи радять паралельно із прийманням антибіотиків вводити в свій раціон функціональні продукти харчування, а саме кисломолочні продукти для підтримання нормальної мікрофлори кишківника. Наразі за рекомендацією ЮНІСЕФ, Наказом МОЗ України №2205 від 1 січня 2021 року було введено новий санітарний регламент для закладів загальної та середньої освіти, а також Постанова КМУ «Про затвердження Норм та Порядку організації харчування у закладах освіти та дитячих закладах оздоровлення та відпочинку», де рекомендовано щоденне вживання 125 мл кефіру або йогурту. Тому це питання є неабияк актуальним.

Виходячи з цього, **метою роботи** є вдосконалення технології виробництва класичного кефіру із додаванням закваски «Vivo кефір»; експериментальне доведення антибіотикостійкості закваски «Vivo кефір» (кефірні зерна) по відношенню до антибіотиків (бензилпеніцилін, лінкоміцин, азитроміцин, гентаміцину сульфат, цефтріаксон, ніфуроксазид, норфлоксацин, амоксил).

Для досягнення мети даної роботи були поставлені наступні **завдання**:

1. Встановити оптимальні технологічні параметри біотехнології виробництва кефіру.
2. Дослідити антибіотистійкість симбіотичної закваски «Vivo кефір».
3. Визначити критичні концентрації антибіотиків щодо інактивації заквасочної культури.
4. Довести функціональну роль кефіру у профілактиці дисбактеріозу, що викликано вживанням антибіотиків.

Об'єкт дослідження — культивування кефірних зерен біопрепарату «Vivo

кефір» на середовищі з антибіотиком.

Предмет дослідження — науково-практичні засади процесу ферментації молока біопрепаратом «Vivo кефір».

Методи дослідження — мікробіологічні, фізико-хімічні, статистичні.

Наукова новизна дослідної роботи полягає в наступному:

1. Встановлено високу біологічну активність симбіозу чистих культур закваски «Vivo кефір» по відношенню до антибіотиків різних груп: бензилпеніцилін, лінкоміцин, азитроміцин, гентаміцину сульфат, цефтріаксон, ніфуроксазид, норфлуксацин, амоксил.

2. Результатами експериментів підтверджено антибіотикостійкість консорціуму МКБ та молочних грибів кефірних зерен закваски «Vivo кефір» при взаємодії з антибіотиками концентрацією 500 та 250 мг/мл.

3. Експериментами доведено можливість одночасного вживання антибіотиків та кисломолочного напою, виготовленого на заквасці «Vivo кефір» для профілактики дисбактеріозів під час лікування.

Практична значимість. Практична цінність отриманих результатів досліджень свідчить про необхідність щоденого вживання якісних кисломолочних продуктів, виготовлених на основі чистих культур молочнокислих бактерій задля підвищення імунітету, покращення процесів травлення, для профілактики і ефективного лікування дисбактеріозів.

Особистий внесок випускника. Проведено аналітичний огляд літератури, складено процесуальну схему виробництва, власноруч виконано мікробіологічні та фізико-хімічні дослідження готового продукту.

Публікації. Результати дипломної роботи опубліковано у науковому журналі.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Сучасні біотехнології виробництва кефіру

Вважається, що кисломолочні продукти корисніше, ніж молоко. Так, молоко засвоюється організмом людини за годину на 32%, а кисломолочні напої, такі як кефір, за той же час засвоюються майже повністю. При цьому в кисломолочних продуктах зберігають не тільки кількісно, але і в оптимальному співвідношенні необхідні організму людини кальцій, фосфор і інші мікроелементи. Але основною перевагою кисломолочних продуктів є вміст у них МКБ - антагоністів гнильних і хвороботворних МО. Завдяки їх великому видовому розмаїттю кисломолочні продукти відрізняються по смаку, кольору, запаху, консистенції, біологічному і хімічному складу [4].

Кефір є найбільш поширеним кисломолочним напоєм, який виробляється з коров'ячого пастеризованого молока. Особливість складу кефіру, яка відрізняє його від інших кисломолочних продуктів - це унікальний набір бактерій і грибів [5]. Своїми корисними властивостями кефір має велику перевагу серед інших кисломолочних продуктів, так як відноситься до продуктів змішаного бродіння. Тобто в кефірі протікають одночасно два процеси бродіння: молочнокисле бродіння (викликане молочнокислими бактеріями) та спиртове бродіння (викликане молочними дріжджами) [6]. В кефірі міститься не тільки молочна кислота, але також спирт і вуглекислий газ. Отриманий продукт має сильну сокогінну дію, тому що в ньому містяться молочна кислота, спирт, вуглекислоти і казеїн. Молочна кислота надає напою не тільки певні смакові якості, а й визначає його дієтичні та профілактичні властивості [5, 7].

При виробництві кефіру використовується складна мікробіологічна система, що складається з симбіотичної закваски, тобто з кефірних грибів (зерен). В склад кефірних грибів входять близько 22 видів МО. До нормальної мікрофлори кефіру закваски відносять такі основні групи бактерій: дріжджі (лактозброджувальні *Kluveromyces marxianus* і ті, що ні 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 МО дуже важлива, адже саме вони, розвиваючись в тісному симбіозі між собою під час ферментації молока, забезпечують специфічні органолептичні показники і функціональну активність готового продукту та його живильні властивості [5, 8].

Також головною перевагою кефіру є те, що він є пробіотичним продуктом, тобто продуктом, що містить в достатній кількості необхідні для людського організму МО. Пригнічує ріст хвороботворних МО, таким чином, він сприяє запобіганню розвитку кишкових інфекцій і допомагає при наявності чи профілактиці дисбактеріозу. Споживання кефіру покращує засвоєння білків і зменшує глікемічний індекс [9], покращує травлення [10, 11], має протизапальну та протиалергічну дію [12, 13].

На сьогоднішній день в Україні кефір займає найбільшу питому вагу серед загального обсягу виробництва кисломолочної продукції - приблизно 40%.

Найпопулярніші виробники кефіру, який на даний час випускають приблизно третину цієї кисломолочної продукції є ОАО «Юнімілк», ОАО «Вім-Біль-Дан», ЗАО «Галичина», ВАТ «Галактон» , ВАТ «Харківський молкомбінат», тощо. Статистика виготовлення кефіру у відсотковому співвідношенні цих виробників на вітчизняному ринку України представлені на рис. 1.1 [14].

Наразі в біотехнології є актуальним виробництво кисломолочної продукції, а особливо кефіру. Тому існують різні сучасні підходи щодо його виробництва.

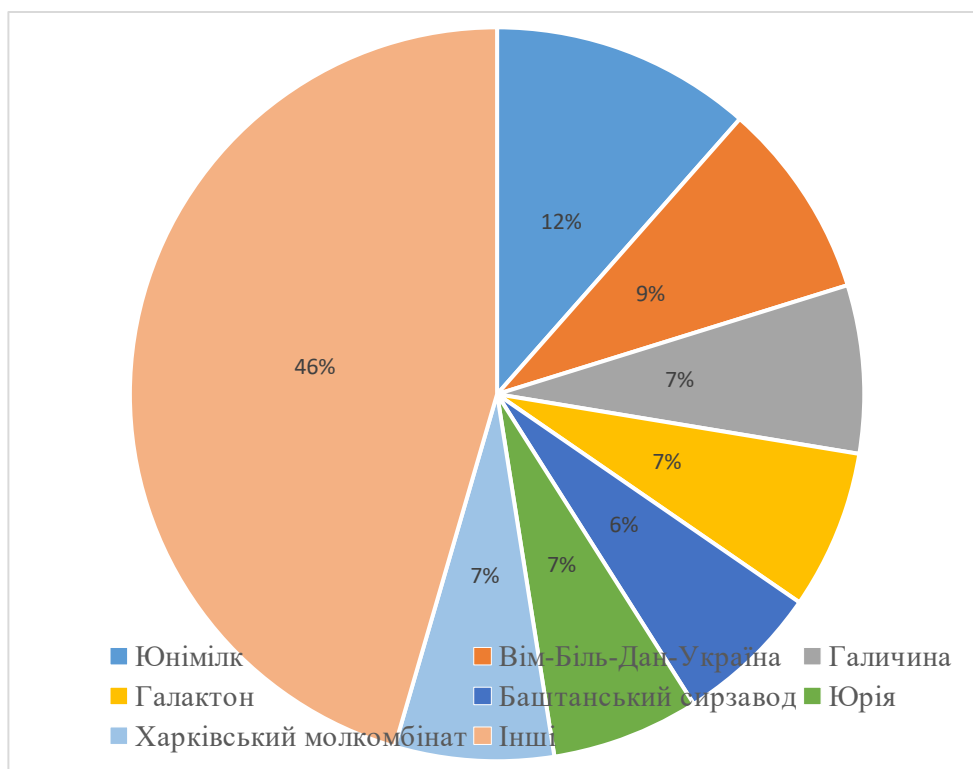


Рис.1.1. Найпопулярніші виробники кефіру в Україні [14]

Автором Мідуніца Ю.С. [5] розкрито основні етапи технології виробництва кефіру, а також проведено удосконалення технології кефіру, а саме визначення особливостей технологічних процесів виробництва кефіру з використанням мікробіологічної закваски, попередньо обробленої мікрохвилями з частотою 2,45 ГГц. В ході даної роботи було визначено вплив опроміненної і неопроміненної закваски на процес вироблення кефіру. Було встановлено, що тривалість технологічного циклу виробництва кефіру з використанням опроміненної закваски скорочується на 12%; збільшення тривалості зберігання кефіру на 24 години та доведено поліпшення органолептичних показників при використанні опроміненної закваски.

Авторами Пономарьов А.Н., Шуваєва Г.П., Мерзликіна А.А., Пономарьова Н.В. [15] було проведено удосконалення технології виробництва кефіру з метою виключення недоліків існуючої технології і отримання продукту з новими біологічними властивостями. А саме була поставлена задача на стадії внесення виробничої закваски, одночасно з нею вносити фермент трансглютаміназа (Saprona TG II виробник -TFI, Німеччина), яка використовується для виробництва сиру,

йогуртів та свіжого сиру з метою поліпшення якості і структури готового продукту.

Авторами Н.А. Шавиркіна, М.В. Обрезкова, М.Г. Малиновська [16] було проведено дослідження вивчення фізико-хімічних і мікробіологічних показників кисломолочного продукту (кефіру), отриманого на основі ацидофільно-дріжджової закваски. Було описано характерні особливості культивування на знежиреному молоці композиції культур лактозброджувальних дріжджів з ацидофільними лактобациллами.

Вченим Антипенко А.В. із Державного університету ім. Шакаріма, Республіка Казахстан [17] було проведено розробку нового способу виробництва кисломолочного напою з функціональної добавки для додання продукту загальнозміцнюючих, профілактичних властивостей і безпосереднього розширення асортименту кисломолочних напоїв. Формула винаходу: спосіб виробництва кисломолочного напою, що включає пастеризацію молочної сироватки, охолодження її до температури заквашування, внесення кефіру закваски, сквашування, охолодження і розлив напою, який відрізняється тим, що пастеризацію молочної сироватки проводять при температурі 74-76°C, а закваска - при температурі 23- 25°C, причому кількість кефіру закваски становить 15-30% від маси суміші, сквашування проводять до досягнення кислотності суміші 85-90°Т, після сквашування додають лимонну кислоту в кількості менше 0,1% до досягнення кислотності суміші 90-130°Т і сорбінову кислоту в кількості 0,05% до маси напою, так само в суміш після сквашування додатково вводять смакові наповнювачі: фруктові або овочеві соки або сиропи, або рослинні добавки або барвники, або ароматизатори, або цукор або його замінники.

1.2. Патентний огляд в області біотехнології виробництва кефіру

На сьогоднішній день кефір є затребуваним кисломолочним продуктом, адже він має високу харчову цінність, так як до його складу входить унікальний набір МО: дріжджі, молочнокислі мезофільні і ароматоутворюючі стрептококи, молочнокислі мезофільні і термофільні палички, оцтовокислі бактерії.

Зараз є актуальним питання виробництва кефіру і ведуться постійні пошуки удосконалення технології виробництва і оцінці його якості. Тому розглянемо патентні дослідження, які проводилися з метою відстеження тенденцій розвитку даної галузі і визначення досягнутих показників розробок для використання їх при виробництві кисломолочних продуктів, а саме кефіру [18].

1. Патент № 2510999 від 16.01.2013 «Спосіб отримання кефіру» (автори: Пономарьов А. Н., Мерзликина А. А.). Спосіб виробництва кефіру включає нормалізацію, пастеризацію, гомогенізацію, охолодження до температури заквашування, внесення виробничої закваски на кефірних грибах, сквашування, охолодження до температури дозрівання, розлив, що відрізняється тим, що після охолодження до температури заквашування, одночасно з виробничою закваскою на кефірних грибах, кількість якої становить 2%, вносять фермент трансглютаміназа в кількості 0,2 кг на 1000 кг нормалізованої суміші при температурі 23-25°C, при цьому зміст лактоферину в готовому продукті становить 500-1100 мг / л [19].

2. Патент № 2482689 від 01.12.2011 «Спосіб виробництва кефіру з функціональними властивостями» (автори: Полянська І. С., Топал О. І.). Для виробництва кефіру з функціональними властивостями молочну сировину нормалізують, очищають, гомогенізують, пастеризують, охолоджують до температури заквашування, вносять закваску і спільно з закваскою вносять порошок мелатоніну в кількості 5-25 г на 1000 кг суміші, квасять, охолоджують, піддають дозріванню і розливають. Винахід дозволяє отримати продукт, що володіє функціональними властивостями, і підвищити його профілактичні властивості [20].

3. Патент № 2155488 від 12.10.1998 «Спосіб отримання кефіру з цілющою добавкою» (автори: Лебедько В. І., Ричкова Т. П., Чанишева М. С., Євгенова С. А.). Пастеризоване і охоложене до температури заквашування молоко квасять. Отриманий згусток охолоджують до 12-16 ° С і вносять рідку 40% біологічно активну добавку до їжі «ераконда». Спосіб дозволяє підвищити біологічну цінність кефіру і запобігти наростанню кислотності, підтримуючи її в межах 85-100°Т [21].

4. Патент № 2453125 від 09.12.2010 «Спосіб отримання кефіру» (автори: Рожкова І. В., Семеніхіна В. Ф., Харитонов В. Д.). Спосіб включає нормалізацію,

подвійну пастеризацію молока: спочатку при температурі 87°C з витримкою 15 хв, потім при 105°C, гомогенізацію, охолодження до температури заквашування, внесення кефіру грибкової закваски або виробничої закваски, при отриманні якої перемішування проводять при внесенні грибків в молоко і перед відділенням грибків від закваски, сквашування. Після сквашування при досягненні рН згустку 4,7-4,75 здійснюють охолодження до температури дозрівання 14-16°C в два етапи: спочатку протягом 1-2 ч в стані спокою, а потім 6-8 год при періодичному перемішуванні через 1 год протягом 2-5 хв. Винахід дозволяє подовжити термін зберігання готового продукту до 28 днів, а також поліпшити його смак і консистенцію [22].

5. Патент № 2477313 від 25.08.2011 «Штам *Enterococcus hirae*, який використовується при виробництві кисломолочних продуктів» (автори: Цугкієв Б. Г., Рамонова Е.В, Козирєва І. І.). Винахід відноситься до біотехнології і молочної промисловості. Штам *Enterococcus hirae* БК-37, що володіє високою антагоністичною активністю, депонований у Всеросійській Колекції Промислових Мікроорганізмів (ВКПМ) під реєстраційним номером ВКПМ В-10090 і може бути використаний при виробництві, наприклад, таких кисломолочних продуктів, як кефір, сир або ряжанка. Винахід дозволяє отримувати штам, що володіє високою антагоністичною активністю і високою швидкістю сквашування молока [23].

6. Патент № 2529360 від 23.05.2013 «Спосіб отримання кефіру» (автори: Потороко І. Ю., Попова Н. В., Ботвіннікова В. В., Красуля О. Н.). Спосіб включає відновлення сухого молока шляхом змішування його з водою, яку попередньо активують методом ультразвукової кавітації. Потім суміш сухого молока і активованої води обробляють ультразвуковою кавітацією, витримують протягом 1-2 год і проводять нормалізацію, пастеризацію, охолодження, заквашування внесенням закваски кефірного грибка в кількості 5%, охолодження до 14-16°C, дозрівання і розлив. Винахід дозволяє скоротити тривалість процесу виробництва кефіру, підвищити його смакові властивості та харчову цінність [24].

7. Патент № 2477312 від 13.09.2011 «Штам *Lactobacillus gallinarum*, який використовується для приготування кисломолочних продуктів» (автори: Цугкієв Б.

Г., Козирева І. І., Рамонова Е. В.). Штам *Lactobacillus gallinarum* I-12, що володіє високою антагоністичною активністю, депонований у Всеросійській Колекції Промислових мікроорганізмів (ВКПМ) під реєстраційним номером ВКПМ В-10134 і може бути використаний при виробництві, наприклад, таких кисломолочних продуктів, як кефір, ацидофільне молоко, ацидофільне-дріжджове молоко. Винахід дозволяє отримати штам, що володіє високою антагоністичною активністю і високою швидкістю сквашування молока [25].

8. Патент № 2437092 від 23.03.2010 «Спосіб кількісного аналізу полісахариду, виробленого молочнокислими бактеріями» (автори: Єнікеев Р. Р., Бобошко Д. Н., Руденко Є. Ю., Зімічев А. В.). Спосіб включає отримання аналізованого розчину шляхом витримування наважки продукту на киплячій водній бані при перемішуванні протягом не менше 10 хвилин, охолодження і розведення розчину з подальшим відстоюванням осаду і відбором порції розчину, витримку відібраного розчину в кислому середовищі при температурі 70-75°C протягом 5 хвилин, охолодження і нейтралізацію розчину гідроксидом натрію з подальшим осадженням полісахариду спиртом або ацетоном при центрифугуванні, промивання осаду холодним 50%-вим розчином осаджувача, повний гідроліз полісахариду в 1 М розчині сірчаної кислоти протягом 2 годин при 100°C з наступною нейтралізацією гідроксидом натрію і визначення змісту полісахариду за градувальним графіком для глюкози. Досягається спрощення і прискорення аналізу [26].

9. Патент № 2105485 від 08.09.1994 «Спосіб виробництва кефіру для дитячого і дієтичного харчування» (автори: Орлов А. С., Тімакова Г. А.). Область використання: в молочній промисловості, зокрема, при виробництві кефіру. Суть винаходу: після нормалізації молока проводять деаерацію, потім гомогенізують, стерилізують, охолоджують до температури заквашування, вносять кефірну закваску і біомасу біфідобактерій, яку попередньо відмивають з використанням фільтраційної установки протягом 2-4 годин з безперервною заміною 0,8-1,2 обсягу відфільтрованого середовища 0,8%-вим розчином хлористого натрію 0,02 М фосфатним буфером рН 6,8-7,2 до прозорості фільтрату більше 80% від вихідного середовища [27].

10. Патент № 2460307 від 28.04.2010 «Спосіб прискореного виробництва кефіру» (автори: Кирієва Т. В., Броннікова В.В, Снурніціна М. К.). Спосіб виробництва кефіру включає наступні стадії: внесення в пастеризоване охолоджене до температури сквашування молоко омагніченної протягом 15-20 с в різноспрямованого магнітному полі напруженістю 300 мТл суспензії, що складається з пастеризованого молока в кількості 30% від загальної маси і кефіру закваски в кількості 0,3 % до маси молока, квашення отриманої суміші до кислотності 75-85 ° Т і її дозрівання при температурі 4-5 ° С до кислотності 110 ° Т. Винахід дозволяє подовжити термін зберігання продукту і поліпшити його органолептичні показники [28].

1.3. Наукові положення процесу молочнокислого бродіння

Бродіння з біологічної точки зору це спосіб отримання енергії, при якому АТФ утворюється в результаті анаеробного окислення органічних субстратів в реакціях субстратного фосфорилування.

Енергетичне визначення бродіння - це сукупність анаеробних окислювально-відновних реакцій, при яких органічні сполуки служать як донорами, так і акцепторами електронів. Як правило, донори і акцептори електронів утворюються з одного і того ж субстрату, що піддається бродінню.

Зброджуванню можуть піддаватися різні субстрати, але краще інших використовуються вуглеводи. При зброджуванні вуглеводів і ряду інших речовин утворюються (окремо або в суміші) такі продукти, як етанол, молочна, мурашина, бурштинова кислоти, ацетон, вуглекислий газ, водень та інші [29].

Основним процесом при виробництві кисломолочних продуктів є молочнокисле бродіння. Молчнокисле бродіння - перетворення цукру молочнокислими бактеріями в молочну кислоту та з утворенням інших побічних продуктів в анаеробних умовах. Процес протікає за рівнянням:



Відмінна ознака МКБ – це їх потреба в ростових речовинах. Вони є

ауксотрофами, більшість з них потребує низки вітамінів і амінокислот, а також пуринів та піримідинів. З іншого боку, багато хто з них мають здатність, якої немає у більшості МО: вони можуть утилізувати молочний цукор (лактозу) [31].

МКБ за характером зброджування гексоз (глюкоза, фруктоза, маноза, галактоза), дисахаридів (лактоза, мальтоза, сахароза) і полісахаридів (декстрин, крохмаль), згідно з термінологією А.І. Ключівера та Г.Л. Донкера (1925 рік) відносяться до гомоферментативних і гетероферментативних [30].

Гомоферментативне молочнокисле бродіння. Послідовність біохімічних перетворень здійснюється по гліколітичному шляху згідно зі схемою Ембдена-Мейергофа-Парнаса: вуглевод спочатку окислюється до пірватату, а потім пірватат відновлюється до молочної кислоти (рис. 1.2). Основний енергетичний субстрат для МКБ при даному типі бродіння - моносахари (переважно, глюкоза) і дисахари (лактоза, мальтоза) [30].

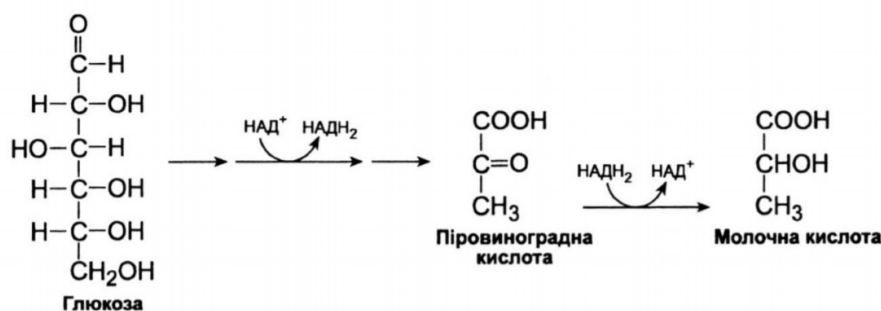


Рис. 1.2. Схема гомоферментативного бродіння [32]

Викликають бактерії роду *Lactobacillus*, *Lactococcus* і стрептококи (*Streptococcus cremoris*, *S. lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, тощо). Ці МКБ утворюють в основному молочну кислоту (понад 90 %) і дуже мало побічних продуктів [29,30].

Гетероферментативне молочнокисле бродіння. Процес більш складний, ніж гомоферментативний тип бродіння: зброджування вуглеводів призводить до утворення ряду сполук, які накопичуються в залежності від умов процесу бродіння. Під час цього типу молочнокислого бродіння крім молочної кислоти, утворюються CO₂, етанол, оцтова кислота та інші побічні продукти. При цьому типі бродіння

розщеплення вуглеводів відбувається по пентозофосфатному шляху. Кінцевими акцепторами водню є пірвіноградна кислота і ацетальдегід. З пірвату утворюється молочна кислота і етанол, а ацетилфосфат перетворюється в оцтову кислоту (рис. 1.3) [29, 30].

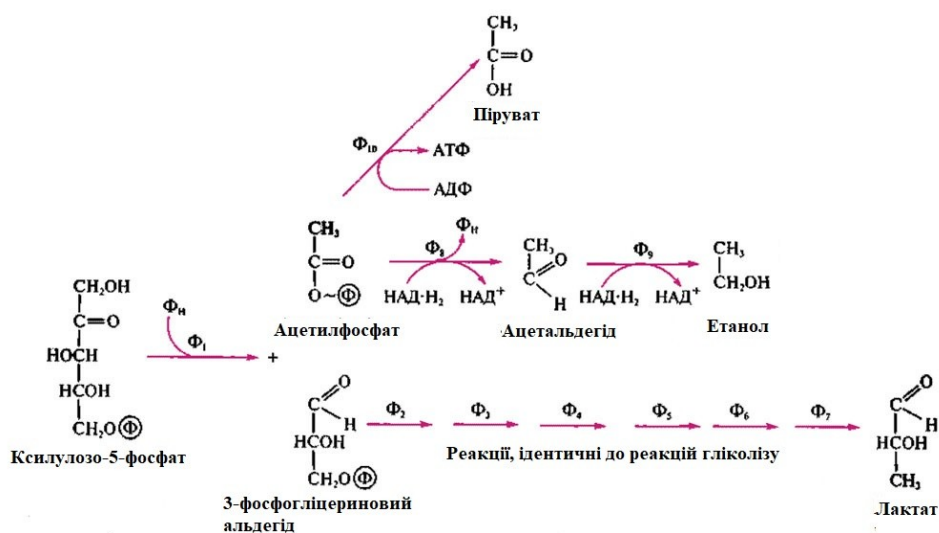


Рис. 1.3. Схема гетероферментативного бродіння [33]

Φ_1 - пентозофосфокетолаза; Φ_2 - 3-ФГА-дегідрогеназа; Φ_3 - фосфогліцераткіназа; Φ_4 - фосфогліцеромутаза; Φ_5 - енолаза; Φ_6 - пірваткіназа; Φ_7 - лактатдегідрогеназа; Φ_8 - ацетальдегіддегідрогеназа; Φ_9 - алкогольдегідрогеназа; Φ_{10} - ацетаткіназа

Збудниками гетероферментативного молочнокислого бродіння є паличкоподібні лактобацили з родів *Lactobacillus* (*Lactobacillus brevis*) і *Streptobacterium*, варіабельні за формою *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum*) і коки роду *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides*) та інші [29].

1.4. Класифікація пробіотичних препаратів

Пробіотики (або еубіотики) - це живі МО, які при нормальному стані кишечника формують його мікрофлору. Це так звані непатогенні, тобто корисні бактерії і дріжджі, які можуть протидіяти патогенним або умовно-патогенним МО [34].

Пробіотики є біологічними препаратами, які мають в своєму складі живі

культури МО або продукти їх метаболізму, які володіють різносторонніми фармакологічними властивостями. Найбільш часто застосовуються в пробіотичних препаратах мікроорганізми - це різні штами лакто- і біфідобактерій: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, та інші, штами *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. adolescentis* і такі МО, як *Escherichia coli*, *Saccharomyces boulardii*, *Sacch. cerevisiae*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus subtilis* [35].

Відомо кілька поколінь пробіотичних препаратів. У 1996 році була прийнята класифікація препаратів-пробіотиків, що нормалізують кишкову мікрофлору. Ця класифікація постійно змінюється в зв'язку з появою нових класів пробіотиків. Залежно від компонентів та їх комбінацій, в складі сучасних пробіотиків розрізняють п'ять видів препаратів (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Сучасна класифікація пробіотичних препаратів [34]

№	Групи пробіотиків	Характеристика пробіотичного препарату	Приклади препаратів
1	Монокомпонентні	Містять один штаб бактерій: <ul style="list-style-type: none"> • лактомісткі; • біфідомісткі; • колімісткі; 	Ацилакт Біфідумбактерин Лактобактерин Колібактерин
2	Полікомпонентні (симбіотики)	Складаються з декількох штамів бактерій одного чи різних видів, які посилюють дію один одного	Лінекс Біфікол
3	Комбіновані (синбіотики)	Комбінація пробіотиків та пребіотиків (добавки, які сприяють виживанню та посилюють дію пробіотиків)	Полібактерин Біфідумбактерин форте
4	Рекомбінантні (генно-інженерні)	Створені на основі генно-інженерних штамів МО	Субалін
5	Самоелімінуючі антагоністи (спороутворюючі)	Містять не властиві біотипу людини самоелімінуючі МО роду <i>Bacillus</i>	Біоспорин Бактисубтил

6	Сорбуючі	Імобілізовані на сорбенті живі бактерії	Флорін форте Профібор
7	Метаболічні	Продукти життєдіяльності пробіотичних штамів	Хілак форте
8	Мультипробіотики	Складаються із 7 та більше симбіотичних штамів бактерій	Сімбітер – 2 Пробізі Феміна

Враховуючи представлену класифікацію, закваска «Vivo кефір» відноситься до мультипробіотиків, так як складається із 10 симбіотичних штамів бактерій.

1.5. Біотехнології приготування кефіру

Кефір виготовляють сквашуванням молока кефірними грибами, або симбіотичною кефірною закваскою.

Виробництво кефіру в молочній промисловості здійснюється двома способами: резервуарним і термостатним. При резервуарному способі сквашування пастеризованого молока і утворення згустку відбувається у великих резервуарах, при термостатному - сквашування молока і утворення згустку здійснюється безпосередньо в пляшках, поміщених в спеціальні термостати [36].

1.5.1. Класична технологія виробництва кефіру

Технологічний процес представлений у блок-схемі (Додаток А).

Підготовка сировини. Кефір резервуарним способом виробляють з цільного натурального нормалізованого молока не нижче другого сорту, кислотністю не більше 19 Т, щільністю не менше 1,0278 кг/м³, з різною масовою часткою жиру, тому вихідне молоко нормалізують до необхідної масової частки жиру.

Нормалізація. Молоко нормалізують за масовим часткам жиру і білка з таким розрахунком, щоб масові частки жиру і білка в готовому продукті були не менш передбачених стандартом.

Нормалізація відбувається шляхом змішування в ємності при розрахованих

кількостях нормалізованого молока і нормалізованого компонента (вершків або знежиреного молока) при ретельному перемішуванні суміші.

Гомогенізація і пастеризація. Гомогенізація - це роздроблення жирових кульок шляхом впливу на молоко значних зовнішніх зусиль. Відбувається перерозподіл оболонкової речовини жирової кульки, стабілізується жирова емульсія, і гомогенізоване молоко не відстоюється. Гомогенізація проводиться при температурі 60-65⁰С і тиску 15-17,5 МПа (125-175 атм.).

Пастеризація молока проводиться з метою знищення вегетативних форм мікрофлори, в тому числі патогенних. При виробництві кефіру найбільш поширений спосіб - короткочасна пастеризація при температурі 85-87⁰С з витримкою протягом 5-10 хвилин або при 90-92⁰С з витримкою 2-3 хвилини з подальшим охолодженням до температури заквашування. Режим пастеризації повинен забезпечити отримання заданих властивостей готового продукту, зокрема органолептичних показників (смак, в'язкість, тощо). Високі температури пастеризації викликають денатурацію сироваткових білків, при цьому підвищуються гідратаційні властивості казеїну. Це сприяє утворенню більш щільного згустку, який добре утримує вологу, що перешкоджає відділенню сироватки при зберіганні.

Після гомогенізації і пастеризації суміш охолоджується до температури заквашування.

Заквашування і сквашування молока. При виробництві кефіру зазвичай застосовують закваску, яку готують на основі кефірних грибів.

Для приготування кефірної закваски сухі кефірні зерна витримують у теплій воді (25-30⁰С) протягом доби, змінюючи її за цей час 2-3 рази. Після цього воду зливають, і набряклі зерна заливають теплим молоком, яке беруть у десятикратній кількості по відношенню до обсягу грибів.

Закваску вносять в суміш, охолоджену до температури заквашування. Суміш квасять при температурі 23-25⁰С до утворення молочно-білкового згустку кислотністю 80-100 Т (рН 4,5-4,65). Під час сквашування відбувається розмноження мікрофлори закваски, наростає кислотність, коагулюється казеїн і утворюється згусток. Продукт негайно охолоджують після закінчення сквашування.

Після сквашування кефір перемішують і охолоджують до температури дозрівання. Перемішування продукту починають через 60-90 хвилин після початку часу його охолодження і проводять протягом 10-30 хвилин. Перемішаний і охолоджений до температури 20⁰С згусток залишають у спокої.

Дозрівання кефіру. Тривалість дозрівання кефіру становить 6-10 годин. Під час дозрівання дріжджі активізуються, відбувається спиртове бродіння, в результаті чого в продукті утворюються спирт, діоксид вуглецю, тощо.

Перемішування і розлив. Після закінчення часу дозрівання, перед початком розливу кефір в резервуарі перемішують 2-10 хвилин. Перемішування має забезпечити однорідну консистенцію молочного згустку. При зберіганні кефіру з неоднорідною з грудочками консистенцією може відділятися сироватка.

Пакування та маркування. Проводять відповідно до вимог стандарту (ДСТУ 4417:2005. Кефір. Технічні умови.). З метою поліпшення консистенції готового продукту, упакований кефір рекомендується витримувати в холодильній камері перед реалізацією. При досягненні кефіром необхідного показника умовної в'язкості і температури 6⁰С технологічний процес вважається закінченим і продукт готовий до реалізації [37, 38].

1.5.2. Оцінка якості кефіру за технічними вимогами

Кефір повинен відповідати технічним вимогам згідно ДСТУ 4417:2005. Національний стандарт України. Кефір. Технічні умови [39].

За органолептичними показниками кефір повинен відповідати вимогам, які вказані в таблиці 1.2.

Органолептичні показники визначення якості кефіру [39]

Назва показника	Характеристика
Зовнішній вигляд і консистенція	Однорідна, в'язка, з порушеним або непорушеним згустком (залежно від технології виробництва). Дозволено: газоутворення, яке спричинено нормальною життєдіяльністю мікрофлори кефірної закваски; незначне відокремлення сироватки
Смак і запах	Чистий, кисломолочний. Смак щипкий, без сторонніх присмаків і запахів
Колір	Молочно-білий, рівномірний за всією масою

За фізико-хімічними показниками кефір повинен відповідати вимогам, що наведені в таблиці 1.3.

Таблиця 1.3

Фізико-хімічні показники визначення якості кефіру [39]

Назва показника	Допустима норма	Метод контролювання
Масова частка жиру, %: — кефір нежирний; — кефір;	Від 1,0 до 5,0	Згідно з ГОСТ 5867 «Молоко и молочные продукты. Методы определения жира»
Масова частка білка, %, не менше ніж	2,7	Згідно з ГОСТ 23327 «Молоко и молочные продукты. Метод измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю и определение массовой доли белка»

Продовження табл. 1.3

Кислотність:		Згідно з ГОСТ 3624 «Молоко и
--------------	--	------------------------------

— титрована, °Т; — активна, рН;	Від 85 до 130 Від 4,8 до 4,0	молочные продукты. Титрометрические методы определения кислотности» Згідно з ГОСТ 26781 «Молоко. Метод измерения рН»
Фосфатаза	Відсутня	Згідно з ГОСТ 3623 «Молоко и молочные продукты. Методы определения пастеризации»
Температура під час випуску з підприємства, °С	4 ± 2	Згідно з ГОСТ 3622 «Молоко и молочные продукты. Отбор проб и подготовка их к испытанию»

За мікробіологічними показниками кефір повинен відповідати вимогам, що наведені в таблиці 1.4.

Таблиця 1.4

Мікробіологічні показники визначення якості кефіру [39]

Назва показника	Допустима норма	Метод контролювання
Кількість життєздатних МКБ, КУО в 1 см ³ , не менше ніж	1·10 ⁷	Згідно з ГОСТ 10444.11
Кількість дріжджів, КУО в 1 см ³ , не менше ніж	1·10 ³	Згідно з ГОСТ 10444.12
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0;Гсм ³ кефіру	Не дозволено	Згідно з ГОСТ 9225 або ДСТУ IDF 73А
Патогенні МО, в тому числі бактерії роду <i>Salmonella</i> , в 25 см ³	Не дозволено	Згідно з ДСТУ IDF 93А
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 1,0 см ³	Не дозволено	Згідно з ГОСТ 30347

Плісняві гриби, КУО в 1 см ³ , не більше ніж	50	Згідно з ГОСТ 10444.12
---	----	------------------------

1.5.3. Характеристика комплексів устаткування та принцип дії лінії

Машинно-апаратна схема лінії виробництва кефіру резервуарним способом наведена в Додатку Б.

Після перевірки якості молока за допомогою відцентрових самовсмоктувальних електронасосів (1) відбирається через трубопровід з встановленим на ньому лічильником - витратоміром (2) і фільтром (3). Очищене сире молоко охолоджують у пластинчастому теплообміннику (4) і завантажують в резервуар (5).

Для отримання нормалізованої молочної суміші сире молоко перекачують відцентровим насосом (6) на теплову і механічну обробку.

У лініях продуктивністю 2,5 і 5 т / год проводять нормалізацію періодичним (резервуарним) способом. Для цього сире молоко в пластинчастому теплообміннику (7) нагрівається до температури 41-45°C і подають у сепаратор для відділення вершків (8). У ньому молоко розділяється на вершки і знежирене молоко.

Молочну суміш нормалізують шляхом змішування компонентів в резервуарі (10). Для цього за допомогою дозаторів (9) до певної кількості натурального молока при ретельному перемішуванні додають потрібну кількість знежиреного молока або вершків, розрахованих за матеріальним балансом.

З резервуара (10) нормалізовану молочну суміш перекачують насосом (6) в виробничий резервуар (11). Для виготовлення кефіру молочну суміш насосами-дозаторами (12) через зрівняльний бачок (13) подають в першу секцію рекуперації пластинчастої пастеризаційно-охолоджувальної установки (14) і після нагрівання до температури 35-45°C очищають в сепараторі-молокоочиснику (16).

Нормалізовану молочну суміш після очищення обробляють в гомогенізаторі (17) при тиску в клапані 12,5-17,5 МПа і температурі 43-85°C. Потім цю суміш пастеризують в установці (14) (при $t = 90-94^\circ\text{C}$ з витримкою 2-8 хвилини або при 85-

89°C з витримкою 10-15 хвилин). Допускається витримка молока при цих температурах від 30 до 40 хвилин. Установка (14) забезпечена пультом управління (15) зі стабілізатором потоку, що забезпечує рівномірність подачі молочної суміші в пластинчастий апарат. Після пастеризації молочну суміш завантажують в резервуар (18) для витримки.

Далі молочну суміш з резервуара (18) подають насосом-дозатором (12) в установку (14), де підігрівають до температури заквашування (23-25°C). Заквашування і сквашування молочної суміші проводять в апараті (19). Він забезпечений водяною сорочкою і спеціальними мішалками, що забезпечують рівномірне і ретельне перемішування молочної суміші із закваскою і молочним згустком.

Щоб уникнути піноутворення, що впливає на відділення сироватки при зберіганні кефіру, суміш в апарат (19) подають через нижній штуцер.

Виробничу кефірну закваску в масі 3-5% від маси нормалізованої суміші вносять або в потоці з використанням насосу-дозатора одночасно з нормалізованою сумішшю, або перед подачею її в апарат (19). Для кращого перемішування суміші з закваскою заповнення резервуара сумішшю виробляють при включеній мішалці. Перемішування закінчують через 15 хвилин після заповнення апарату (19).

Суміш квасять (при $t = 23-25^{\circ}\text{C}$) до утворення молочно-білкового згустку кислотністю 85-100°Т (рН 4,65 ... 4,50).

Після закінчення сквашування включають подачу крижаної води в сорочку апарату (19). Через проміжок часу 60-90 хвилин. Після початку охолодження включають мішалку. Молочний згусток перемішують 10-30 хвилин. Перемішування має забезпечити однорідну консистенцію молочного згустку. При зберіганні кефіру з неоднорідною, з грудочками консистенцією може відокремитися сироватка.

Перемішаний і охолоджений до температури 18-22°C згусток залишають у спокої до дозрівання на 6 годин, не вимикаючи подачу води в сорочку апарату (19). Після першого перемішування мішалку зупиняють на час 1-1,5 години. Подальше перемішування ведуть періодично, включаючи мішалку на 2-10 хвилин через кожну годину, поки температура не досягне 12-16°C. Потім згусток залишають у спокої

для дозрівання на проміжок часу 9-13 годин, попередньо вимкнувши подачу води в сорочку.

Залежно від продуктивності лінії завершення процесу утворення кефіру здійснюють двома способами. При продуктивності лінії 2,5 і 5,0 т/год готовий кефір з апарату (19) насосом (12) завантажують в приймальну воронку фасувальної машини (23) для пакування в споживчу тару.

При продуктивності лінії 10 і 15 т/год готовий кефір перед подачею на фасування попередньо охолоджують до 4-8°C в пластинчастому теплообміннику (20) завантажують в проміжний резервуар (21). З останнього насосу (22) кефір завантажують в приймальну воронку фасувальної машини (23) для пакування в споживчу тару.

З метою поліпшення консистенції готового продукту упакований кефір перед реалізацією рекомендується витримувати в холодильній камері при температурі 4-8°C [40].

1.6. Принцип дії антибіотиків на бактеріальні та дріжджові клітини

Антибіотики (греч. *Αντι* - проти, греч. *Βιοτικός* - життєвий) - це хіміотерапевтичні речовини, що виробляються МО або отримані з інших джерел (водорості), а також шляхом хімічного синтезу. Вони володіють здатністю пригнічувати збудника в організмі [41].

У 1928 році англійський мікробіолог А. Флемінг відкрив перший антибіотичний препарат. Він відзначив здатність нитчатого гриба зеленої плісняви (*Penicillium notatum*) викликати гибель стафілококів. Подальша спільна робота з Х. Флорі, Е. Чейном і Е. Абрахом привела до виділення в чистому вигляді пеніциліну, який відкрив еру антибіотиків.

За пеніциліном послідовно було отримано стрептоміцин, тетрацикліни, еритроміцин та інші антибіотики [42].

Нині виробництво антибіотиків є потужною, добре розвиненою галуззю, що входить в фармацевтичну промисловість, зокрема і в біотехнологію [41].

В даний час у медицині використовують кілька десятків антибіотиків різних груп: β-лактами (пеніциліни, цефалоспорини), макроліди (еритроміцин, азитроміцин), аміноглікозиди (гентаміцин, амікацин), тетрацикліни, лінкозамісні препарати (лінкоміцин), амфеніколи (левоміцетин), рифаміцини (рифампіцин), протигрибкові (ністатин, леворин, амфотерицин В). Окремий клас складають протиопухолеві антибіотики [42].

Особливо є актуальним використання антибіотиків у спалах пандемії COVID-19. З метою лікування спеціалісти ВОЗ та лікарі призначають антибіотики у випадку клінічної підозри на бактеріальну інфекцію.

Нижче наведена статистика захворюваності на COVID-19 за 2020-21 рік в Україні (рис. 1.4).

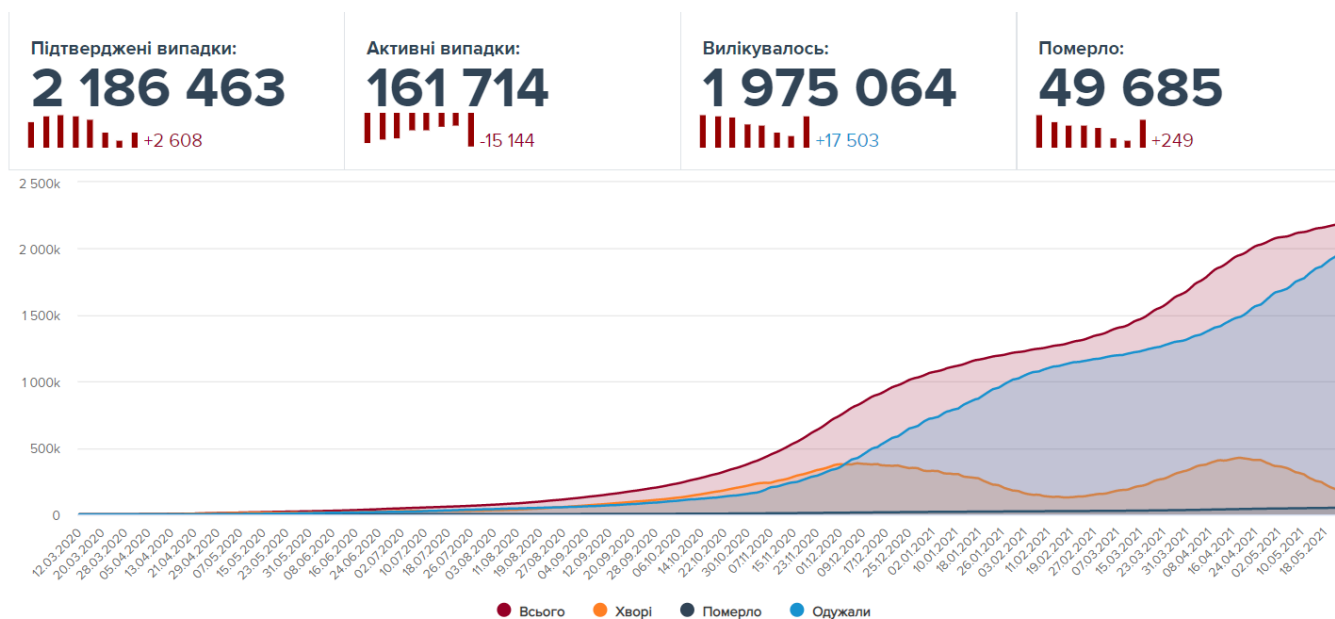


Рис. 1.4. Динаміка COVID-19 в Україні за 2020 рік [43]

Антибіотики вважаються в основному бактеріостатичними агентами, хоча деякі з них мають виражену бактерицидну або навіть бактеріолітичну дію.

Бактеріостатичні антибіотики інгібують ріст бактерій, вони залишаються живі, але не в змозі розмножуватися. Бактерицидні – вбивають бактеріальну клітину, бактерії гинуть, а потім виводяться з організму [44, 45].

Антибіотики відрізняються один від одного не тільки за хімічною структурою,

але і за принципом дії на мікробну клітину. Дія антибіотиків, що застосовується в низьких концентраціях, звичайно направлена на специфічні особливості життєдіяльності патогенних мікроорганізмів.

Клітинні стінки бактерій і цвілевих грибів сильно відрізняються від клітинної оболонки тварин клітин, і багато нетоксичних антибіотиків блокують утворення саме клітинних стінок. Так діють пеніцилін, бацитрацин і цефалоспорини, що застосовуються в клініці при бактеріальних інфекціях, а також гризеофульвін, який використовується при шкірних грибкових захворюваннях.

Найважливішим компонентом клітинної стінки є пептидоглікани – складні структури, де подібні з глюкозою цукри зв'язані між собою поперечними пептидними містками, утворені амінокислотами. Зазвичай пептидоглікан надає стінкам бактерій механічну міцність і стійкість. Пеніцилін так змінює їх біосинтез, що клітинна стінка втрачає цю необхідну міцність. Тому вміст бактеріальної клітини витікає, і клітина гине. Оскільки клітини ссавців мають зовсім іншу оболонку, що не містить пептидогліканів, пеніцилін практично не діє на них.

Важливу роль в життєдіяльності бактеріальної клітини грає її плазматична мембрана, розташована під клітинною стінкою (рис. 1.5).

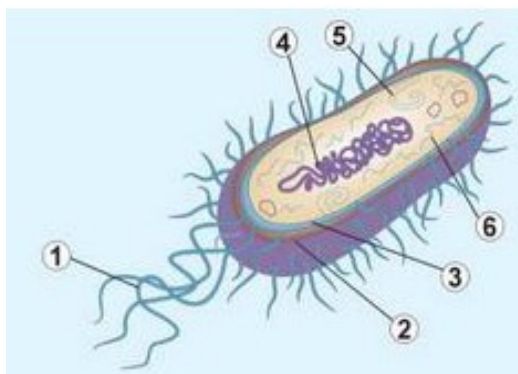


Рис. 1.5. Будова бактеріальної клітини: 1 – джгутики; 2 – клітинна стінка; 3 – плазматична мембрана; 4 – нуклеоїд; 5 – мезосома; 6 – рибосома [46]

Плазматична мембрана регулює проходження в клітину поживних речовин і вихід продуктів виділення, в ній протікають багато ферментативних процесів.

Антибіотики, які пошкоджують плазматичну мембрану. Наприклад, антибіотик поліміксин зв'язується з мембраною багатьох грамнегативних бактерій і порушує її функцію. Тироцидин володіє хімічними властивостями детергенту і руйнує мембрану. На неї впливає і стрептоміцин: знову синтезована мембрана виявляється дефектною, і клітина втрачає життєво важливі для себе компоненти.

Ністатин, зв'язуючись з стеролами в клітинній мембрані різних дріжджових і цвілевих грибів, порушує її проникність, що призводить до втрати їх клітинами необхідного елемента – калію. Цей антибіотик активний відносно дріжджоподібних грибів роду *Candida*.

Існують антибіотики, які порушують синтез білка у бактерій. Одним із таких є хлорамфенікол, який специфічно блокує цей процес у багатьох бактерій. Тетрацикліни теж блокують білковий синтез, але не менш важливою стороною їх ефекту є утворення комплексів з металами і вплив на зв'язування кальцію, магнію і марганцю в клітині. Також на синтез білка впливає і еритроміцин [45].

Також існують антибіотики, які порушують синтез нуклеїнових кислот (рифаміцин, протипухлинні антибіотики).

Розглянемо детальніше принцип дії антибіотиків, що використовувались для дослідження:

Бензилпеніцилін – антибіотик, що має високу антибіотичну активність щодо деяких грампозитивних бактерій, в дуже малому ступені впливає на окремі грамнегативні бактерії і не проявляє помітної дії на клітини тварин, вищих рослин, грибів, тощо. Пригнічує синтез клітинної стінки бактерій [47].

Азитроміцин - напівсинтетичний антибіотик широкого спектру дії (групи макролідів-азолідів), активний відносно грампозитивних, грамнегативних і деяких анаеробних бактерій. Зв'язується з 50S-субодиницею рибосом, пригнічує пептидтранслоказу на стадії трансляції, пригнічує синтез білка, сповільнює ріст і розмноження бактерій, при високих концентраціях виявляє бактерицидний ефект. Діє на поза-і внутрішньоклітинних збудників [48].

Лінкоміцин – антибіотик групи лінкозамідів, що продукується *Streptomyces lincolniensis*, надає бактериостатичну дію. Пригнічує білковий синтез бактерій

внаслідок оборотного зв'язування з 508-субодиницею рибосом, порушує утворення пептидних зв'язків. Активний відносно грампозитивних бактерій, не діє на грамнегативні МО [47].

Гентаміцину сульфат є антибіотиком групи аміноглікозидів з широким спектром дії. Механізм дії пов'язаний з інгібуванням рибосомальних субодиниць 30S. Активний відносно різних видів грампозитивних та грамнегативних МО [49].

Цефтріаксон – цефалоспориновий антибіотик III покоління широкого спектру дії для парентерального введення. Бактерицидна активність обумовлена пригніченням синтезу клітинної стінки бактерій (порушує синтез муреїну). Відрізняється стійкістю до дії більшості бета-лактамаз грамнегативних і грампозитивних МО [50].

Ніфуроксазид - протимікробний препарат групи 5-нітрофуранів, відноситься до кишкових антисептиків. Блокує активність дегідрогеназ, пригнічує процеси клітинного дихання, цикл трикарбонових кислот, а також порушує синтез білка в мікробній клітині. У середньотерапевтичних дозах проявляє бактериостатичну активність, а в більш високих - діє бактерицидно. Препарат проявляє активність щодо грампозитивних мікроорганізмів сімейства *Staphylococcus* і грамнегативних мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*). Неактивний щодо бактерій роду *Pseudomonas* і роду *Proteus* (вид *Proteus inconstans*), а також штамів підгрупи А виду *Providentia alcalifaciens* [51].

Норфлоксацин – протимікробний синтетичний засіб групи фторхінолонів широкого спектру дії. Виявляє бактерицидну дію. Пригнічуючи ДНК-гіразу, порушує процес суперспіралізації ДНК. Має високу активність відносно більшості грамнегативних бактерій: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella morganii*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, тощо [52].

Амоксил – напівсинтетичний антибіотик широкого спектра дії групи пеніцилінів для лікування бактеріальних інфекцій. Інгібує транспептидазу, порушує синтез пептидоглікану в період ділення і росту, викликає лізис бактерій. Активний відносно аеробних грампозитивних бактерій: *Staphylococcus spp.* (за винятком штамів, які продукують пеніциліназу), *Streptococcus spp.*; і аеробних

грамнегативних бактерій: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.* [53].

1.7. Стійкість молочнокислих бактерій, молочних дріжджів та сахароміцетів пекарських до антибіотиків

Молочнокислі бактерії відіграють ключову роль в технології пробіотичних продуктів харчування: здійснюють біомодифікації рослинної і тваринної сировини, змінюючи фізико-хімічні показники вихідних компонентів і формуючи органолептичні показники продуктів; підвищують харчову, в тому числі і біологічну цінність; інгібують розвиток сторонньої технічно шкідливої і патогенної мікрофлори [54, 55].

Великий вплив на розвиток МКБ надають антибіотики.

При лікуванні людини антибіотиками спостерігається придушення діяльності корисної мікрофлори, викликаючи збільшення в кишківнику числа патогенних і потенційно небезпечних для людини мікроорганізмів.

Тому, важливе значення при підборі культур МО до складу пробіотиків і продуктів харчування на їх основі надається такій властивості, як стійкість до антибіотиків.

Природна стійкість до антибіотиків - один з важливих чинників, що визначають пробіотичні властивості лакто- та біфідобактерій особливо при антибіотикотерапії. Це питання є надзвичайно актуальним, адже лакто- та біфідобактерії входять до складу пробіотичних продуктів, призначених для лікування кишкових інфекцій і дисбактеріозів. Тому використання цих штамів у складі пробіотиків для комплексної терапії різних захворювань спільно з антибіотиками дозволила б запобігти розвитку дисбактеріозів кишківника, що виникають після лікування антибіотиками, та могло б скоротити терміни лікування [1].

МКБ володіють хромосомною стійкістю до ряду антибіотиків, які варіюються в залежності від виду та штаму [56, 57].

У науково-технічній літературі існують відомості, що МКБ не містять плазмової ДНК, небезпечної для поширення антибіотикостійкості серед інших бактерій, у них наявні плазміди з малою молекулярною масою, які не здатні до самостійного переносу, що робить можливим їх широке лікувально-профілактичне використання [47].

У зв'язку з актуальністю даної теми проводяться дослідження по вивченню резистентності до антибіотиків чистих культур МКБ, біфідобактерій та їх консорціумів, а також дослідження по вивченню морфологічних особливостей колоній МО. Дослідженнями вчених встановлено гарною антибіотикостійкістю володіє *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L.acidophilum*, *Streptococcus thermophilus* та бактерії роду *Bifidobacterium*. Виходячи з даних досліджень всі ізоляти біфідобактерій, крім *B.longum* стійкі до тетрацикліну, к аміноглікозидним антибіотикам [1].

Вченими Казахського національного університету ім. аль-Фарабі [58] було проведено дослідження природної стійкості штамів роду *Lactobacillus* до антибактеріальних препаратів. Вони визначали спектр їх лікарської стійкості за допомогою методу серійних розведень для визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) (табл. 1.5).

Таблиця 1.5

Рівень антибіотикорезистентності штамів роду *Lactobacillus* [58]

Штам	МІК (мкг/мл) антибіотиків у відношенні до різноманітних штамів роду <i>Lactobacillus</i>				
	Фтор-хінолони	Цефалоспорици	Аміноглікозиди	β-лактами	Макроліди
	Ofl	Cef	Gm	Ap	Ery
<i>L.acidophilus</i>	20	30	10	5	5
Продовження табл. 1.5					
<i>L.plantarum</i>	20	20	20	5	5

<i>L.fermentum</i>	20	10	20	10	2,5
Примітка: Gm-гентаміцин, Ap-ампіцилін, OfI – офлоксацин, Cef-цефазолін, Ery-еритроміцин.					

Зокрема, автор статті «Резистентность пробиотических штаммов молочнокислых бактерий к антибиотикам» [47] Китаєвська С.В. – кандидат технічних наук кафедри технології харчових виробництв Казанського технологічного університету, провела дослідження щодо вивчення чутливості виділених з природних джерел (квашеної капусти, кислого коров'ячого молока, житнього борошна) штамів роду *Lactobacterium* і промислових культур МКБ до ряду антибіотиків широкого спектру дії. Автор робить висновок, що в цілому всі вивчені культури володіють або стійкістю, або малою чутливістю до більшості антибіотиків різного спектру дії. Особливу стійкість виявили три «диких» штами МКБ *L. casei* 5 (Д), *L. fermentum* 4 (Д) и *L. bavaricus* (Д).

В роботі А.С. Багдарасяна, Э.С. Токаєва, Е.А. Некрасова, Е.А. Олейника [59] було проведено дослідження щодо вивчення антибіотикостійкості пробіотичних культур: біфідобактерій та лактобактерій, а також їх консорціумів для включення в подальший склад синбіотиків. В результаті досліджень вчені прийшли до висновку, що більшість досліджених штамів пробіотиків не мають стійкої антибіотикостійкості, тому ефект від їх застосування може спостерігатися лише тоді, коли препарати з досліджуваними культурами застосовуватимуться після завершення курсу антибіотикотерапії.

Білоруськими вченими Д.Т. Плотниковою, А. В. Сидоренко, Г. І. Новиком [60] був проведений аналіз антибіотикорезистентності колекційних та виділених з самоквасних молочних продуктів штамів МКБ родів *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*. Ними було встановлено, що колекційний штам *L. lactis* стійкий до більш широкого спектру антибіотиків з порівнянням із штаммами, виділеними з самоквасних молочних продуктів.

Автор статті К. ДЖ. Карапетян з Вірменії [35] провів дослідження

властивостей нових штамів МКБ (виділені з національного продукту мацуна і ропних сирів (отриманих як з коров'ячого, так і овечого молока)) та дав оцінку їх перспективності для використання в якості основи пробіотичних препаратів. Отримані дані показали, що супернатант відібраних МКБ має різну чутливість до антибіотиків, пригнічує ріст антибіотикостійких штамів *E. coli*, зберігає антимікробну активність при рН 3,0-6,0 і пригнічує ріст патогенної мікрофлори.

Отже, результати досліджень науковців з різних країн служать підставою для подальшого вивчення виділених нових штамів МКБ в якості основи пробіотичних препаратів при антибіотикотерапії та профілактиці дисбактеріозів.

1.8. Висновки до розділу

Отже, одним із найпопулярніших та найзатребуваніших кисломолочних продуктів є кефір, адже він є джерелом найкорисніших МО та має високу харчову цінність. Згідно патентного огляду проаналізовано, що у біотехнології питанням виробництва кефіру займаються науковці з різних країн Європи, і ведуться постійні пошуки удосконалення його технології виробництва.

Було описано наукові положення молочнокислого бродіння, наведено класифікацію пробіотичних препаратів, де вияснили, що закваска «Vivo кефір» є мультипробіотиком, адже складається із 10 симбіотичних штамів МКБ.

Представлено основні етапи технологічного процесу виробництва класичного кефіру резервуарним способом, наведено технологічну та машинно-апаратурну схему.

З'ясували, що кефір є пробіотичним продуктом при профілактиці дисбактеріозів та при антибіотикотерапії. У біотехнології важливе значення надається такій властивості як антибіотикостійкість. Адже ця властивість враховується при підборі культур лакто- та біфідобактерій, що відбираються до складу заквасок для виробництва кисломолочних продуктів, а саме кефіру. Завдяки літературним джерелам розглянуто, що спільне застосування антибіотиків і резистентних штамів МКБ сприяє ефективному відновленню нормальної

мікрофлори кишківника під час антибіотикотерапії. Тому, резистентність МКБ до антибіотиків є важливим фактором, що визначає їх пробіотичні властивості. Отже, в даному розділі було розглянуто принцип дії антибіотиків, взятих для дослідження на бактеріальні та дріжджові клітини, а також стійкість МКБ, молочних дріжджів, які входять до складу кефіру, та сахароміцетів пекарських до антибіотиків.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження є вплив антибіотичних речовин на активність МКБ, виділених із закваски «Vivo кефір», на основі якої був виготовлений кефір власноруч.

2.1. Морфологічні та культуральні особливості молочнокислих бактерій та молочних дріжджових кефірних грибів

Кисломолочні продукти містять мікроорганізми-пробіотики (біфідобактерії, ацидофільні молочнокислі палички та ін.), є апатогеними для людини і мають антагоністичну активність відносно до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, що сприяє збереженню і відновленню нормальної мікрофлори [61].

Згідно офіційній номенклатурі бактерій, наведеної в визначнику бактерій Берджи [62], молочнокислі бактерії об'єднані в сімейства *Lactobacillaceae* (рід *Lactobacillus*) та *Streptococcaceae* (Роди *Streptococcus*, *Pediococcus* і *Leuconostoc*) [63].

Несприятливі екологічні умови, антибіотики, тощо, є причинами порушення балансу мікрофлори кишечника (дисбіозу). Тому пробіотичні продукти молочного походження стають препаратами вибору, так як їх профілактична та клінічна ефективність у відновленні цих порушень доведена цілим рядом експериментальних досліджень [64].

Найнадійнішим джерелом корисних мікроорганізмів вважається кефір. Своїми корисними властивостями він помітно перевершує інші кисломолочні продукти, так як відноситься до продуктів змішаного бродіння [65].

При виробництві кефіру використовують закваску, яка являє собою кефірні гриби.

Кефірні гриби (зерна) - міцне симбіотичне утворення. Мікробіологічний склад кефірного гриба є складним. Він включає МО трьох фізіологічних груп: молочнокислі бактерії, які здійснюють гомо- і гетероферментативне бродіння, дріжджі, які здійснюють спиртове бродіння та оцтовокислі бактерії [66].

У кефірних грибах були виявлені МКБ видів *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* і лактобацили *Lactobacillus sp.*. Серед мезофільних лактобактерій також були виділені *Lactococcus lactis subsp. cremoris* і *Leuconostoc sp.*. 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*. Серед оцтовокислих бактерій є *Acetobacter aceti* [67].

Культурально-морфологічні ознаки кефірних грибів (зерен). Кефірні гриби мають неправильну, овальну форму. Їх поверхня є складчастою або горбистою, за формою нагадує цвітну капусту, консистенція пружна, м'яко-хрящувата, колір білий з жовтуватим відтінком, смак кислий, специфічний. Їх розміри від 1-2 мм до 3-6 см і більше (рис. 2.1). Матриця кефірного зерна, що складається з білків та полісахаридів, містить бактерії і дріжджі [68-71].

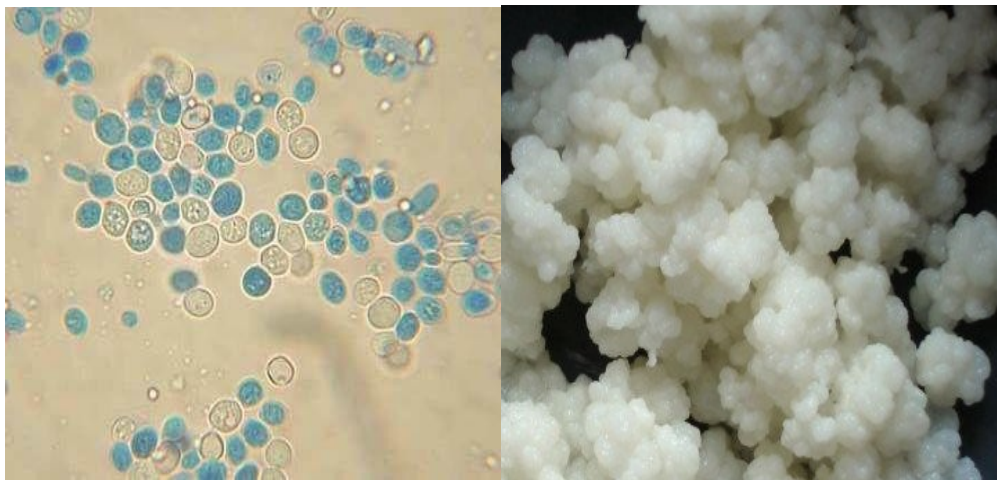


Рис. 2.1. Морфологія кефірних грибів [72, 73]

При мікроскопіюванні зрізів кефірного гриба виявляються тісні переплетіння паличковидних ниток, які утворюють строму гриба, яка утримує інші МО [74].

Дріжджі - мікроорганізми, які найбільш міцно пов'язані зі стромою кефірного гриба. Дріжджі, що зустрічаються в кефірі, можна розділити на три групи.

Перша група - це дріжджі, що зброджують лактозу (молочні дріжджі).

Розташовуються в периферичних шарах гриба і мають найвищу антибіотичну активність по відношенню до *E. coli*, що визначає їх важливу роль у формуванні якості продукту. Найбільш часто зустрічаються такі види дріжджів цієї групи: *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces fragilis*, *Torulopsis kefir*, *Torulopsis sphaerica*, *Candida pseudotropicalis* та інші. Вони засвоюють лактозу за схемою спиртового бродіння, кінцевими продуктами якого є спирт і вуглекислий газ [63, 67].

Культурально-морфологічні ознаки штаму *Kluuyveromyces lactis* (раніше *Saccharomyces lactis*). Клітини дріжджових грибів овальної форми. Розмножуються при температурі 28-30 ° С на пивному суслі, сусло-агарі і середовищі Сабуро.

Друга група - дріжджі, які не зброджують лактозу, але зброджують інші цукри. Розташовуються в глибинних шарах гриба. Такими дріжджами є більшість видів дріжджів роду *Saccharomyces* та *Pichia*. Вони асимілюють лактозу, не провокуючи газоутворення і накопичення значної кількості продуктів життєдіяльності. Такі дріжджі в кефірних грибах і заквасці знаходяться в більшій кількості.

Третя група дріжджів – не здатні до спиртового бродіння, але споживають лактозу шляхом безпосереднього окислення (в молоці зростають, але лактозу НЕ зброджують). До таких дріжджів відносяться дріжджі родів *Mycoderma*, *Torula* [67, 74-75].

Кулясті МКБ. Відносяться до сімейства *Streptococcaceae*, об'єднуючого роди *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* і *Leuconostoc* [76].

Молочнокислі стрептококи. *Streptococcus thermophilus* – термофільний стрептокок, в порівнянні з мезофільними бактеріями вони краще розвиваються при підвищеній температурі (40-45 ° С, максимальна 45-50 ° С) і зброджують сахарозу [75].

Культурально-морфологічні ознаки штаму *Streptococcus thermophilus*. Грампозитивні факультативно анаеробні коки, діаметром 0,5 – 0,6 мкм, нерухомі, не утворюють спори, розташовані переважно у вигляді звивистих ланцюжків різної довжини (рис. 2.2). Є збудником гомоферментативного молочнокислого бродіння.

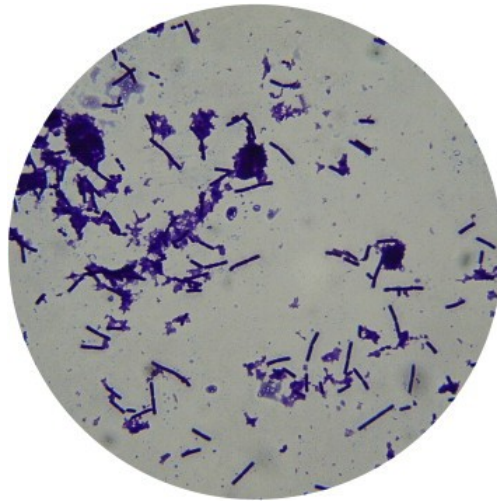


Рис. 2.2. Морфологія клітин *Streptococcus thermophilus*, x 1000 [77]

Даний штам утворює колонії білого кольору діаметром 1,2 – 1,5 мм у вигляді "човників" в агарі з гідролізованим молоком, а на поверхні щільного середовища - краплеподібні білуваті блискучі колонії діаметром 1,0 – 1,5 мм. Ростуть з утворенням рівномірної каламуті та дрібнодисперсного осаду на дні пробірки в гідролізованому бульйоні та на рідкому середовищі [78].

Культурально-морфологічні ознаки штаму *Lactococcus lactis subspecies lactis*. Клітини сферичні або овальні розміром (0,5-1,2)x(0,5-1,5) мкм, з'єднані попарно (диплококи) або у вигляді коротких ланцюжків. Оптимальна температура росту становить 28-32°C [76].

При підборі культур для продуктів лікувально-профілактичного профілю велика увага приділяється в основному біфідобактеріям і лактобацилам як основним представникам нормальної мікрофлори кишківника. Широке застосування у виробництві пробіотичних продуктів отримали біфідобактерії видів: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis* і лактобацили видів *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* [79].

Термофільні молочнокислі палички. До цієї групи входять *L.helveticum*, *L.acidophilus*, *L.lactis*. Ця група молочнокислих паличок - енергійні

кислотоутворювачі. При оптимальній температурі (40-45 ° С) вони згортають молоко за 12 годин. Зброджують більшість вуглеводів [63].

Культурально-морфологічні ознаки штаму *Lactobacillus acidophilus*. Грампозитивні анаеробні палички з закругленими кінцями, розміром зазвичай 0,6-0,9 x 1,5-6 мкм, розташовуються поодинці, парами або у вигляді коротких ланцюжків. Нерухомі. Джгутиків не утворюють (рис. 2.3).

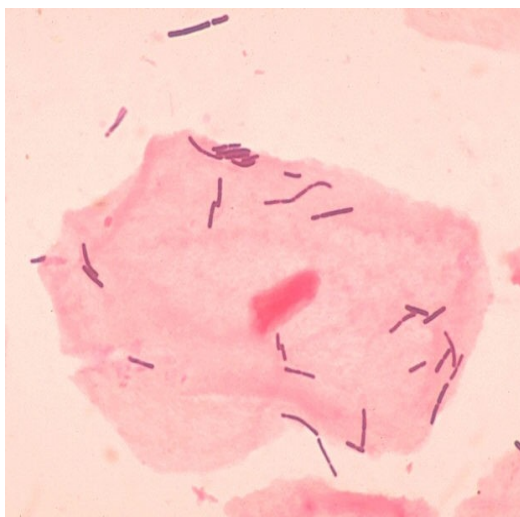


Рис. 2.3. Морфологія клітин *Lactobacillus acidophilus*, x 1000 [80]

На відміну від *L. bulgaricus* і *L. lactis* не містять гранул метакроматину. Спор не утворюють. Колонії зазвичай шорсткі (R-форма). Мікроскопічне дослідження зазвичай виявляє скорочення або пухнасті волокнисті виступи з темної волокнистої масою в центрі колонії. Глибинні колонії мають неправильну форму з радіальними або розгалуженими виступами. Не мають характерного забарвлення. Ферментує лактозу до молочної кислоти, є гомоферментативним МО [81].

Мезофільні молочнокислі палички (стрептобактерії). Їх представниками є *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, бета-бактерії, мікробактерії. *Lactobacillus casei* - нормальний резидент ротової порожнини, кишечника. Постійний компонент кефірних грибів і готового кефіру [63].

Культурально-морфологічні ознаки штаму *Lactobacillus casei*. Це вид грампозитивних паличкоподібних анаеробних неспорують бактерій. Є гомоферментативною і зброджує лактозу з переважним утворенням молочної

кислоти. У молоці розвиваються повільно, гранична титрована кислотність 80-180 °Т.

Lactobacillus rhamnosus – вид грампозитивних анаеробних неспороутворюючих бактерій. Гомоферментативний МО. Раніше *L. rhamnosus* як підвид віносився до виду *Lactobacillus casei*, однак за сучасною систематики *L. rhamnosus* вважається окремим видом роду Лактобактерії [81].

Біфідобактерії (*Bifidobacterium*) – рід грампозитивних анаеробних бактерій, що являють собою злегка вигнуті палички розміром 0,5-1,3 x 1,5-8 мкм, мають розгалуження у вигляді Y- або V-форми, з булавовидними здуттями на кінцях (іноді зустрічаються у вигляді коків), спор і капсул не утворюють (рис. 2.4). В мазках клітини розташовуються поодинокі, парами, іноді ланцюжками, живоплотом або розетками. Оптимальна температура розвитку 37-41°C, оптимальне значення рН 6-7.

Морфологія біфідобактерій залежить від умов культивування. При вирощуванні біфідобактерій на печінковому агарі або в молоці розгалуження зникає, з'являється багато гранульованих форм, які іноді можна прийняти за коки, клітини стають грамваріабельні. Розгалуження частіше відбувається в середовищі, неповноцінного щодо джерел живлення. На ранніх стадіях розвитку у біфідобактерій переважають паличкоподібні форми, а при подальшому культивуванні утворюються розгалужені нитки з численними перегорodkaми в основному стволі і відгалуженнях [82].

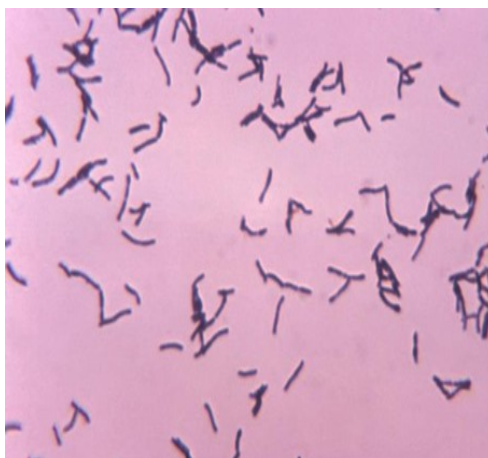


Рис. 2.4. Морфологія клітин роду *Bifidobacterium*, x 1000 [83]

Рід *Bifidobacterium* містить наступні види МО: *B. actinocoloniiforme*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. lemurum*, *B. longum*, тощо. Раніше окремими видами вважалися також *B. infantis*, *B. suis*, *B. lactis*.

Культурально-морфологічні ознаки штаму *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*. Є однією з найбільш поширених бактерій, що входять до складу пробіотиків. Грампозитивні нерухомі анаероби, продукують молочну кислоту (гетероферментативний МО) і не мають каталазної активності. Мають нерегулярну паличкоподібну форму, не утворюють спор [76].

2.2. Методи дослідження

В представленій науковій роботі для оцінки технологічних параметрів та процесу впливу факторів на МКБ використано фізико-хімічні та мікробіологічні методи дослідження. Результати дослідження оброблено застосуванням математичних підходів, програми Excel та методом статистичної обробки даних.

2.2.1. Фізико-хімічні методи дослідження

Для дослідження та оцінки якості кефіру було використано такі фізико-хімічні показники як титрована та активна кислотність, окисно-відновний потенціал.

Визначення титрованої кислотності. Методологія визначення титрованої кислотності полягає у титруванні гідроксидом натрія (NaOH) у присутності індикатора фенолфталеїну з утворенням сполуки, що надає розчину малинового забарвлення. Проводять згідно з ГОСТ 3624-92 "Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности" [84].

У колбу місткістю 100 або 250 см³ відмірюють 10 мл дистильованої води, 10 мл кефіру і додають три краплі фенолфталеїну (рис. 2.5). Суміш ретельно перемішують і титрують розчином гідроксиду натрію до появи слабо-рожевого забарвлення [84].



Рис. 2.5. Визначення титрованої кислотності

Визначення активної кислотності, рН. Методологія визначення активної кислотності полягає у визначенні активності іонів водню за допомогою потенціометричного аналізатора (рН-метру). Проводять відповідно до ГОСТ 26781 "Молоко. Метод измерения рН" [85].

Аналіз проводився за допомогою спеціального приладу – рН-метру (рН-150МА), який має скляні електроди, потенціал яких залежить від концентрації іонів водню в навколишньому середовищі (рис. 2.6).

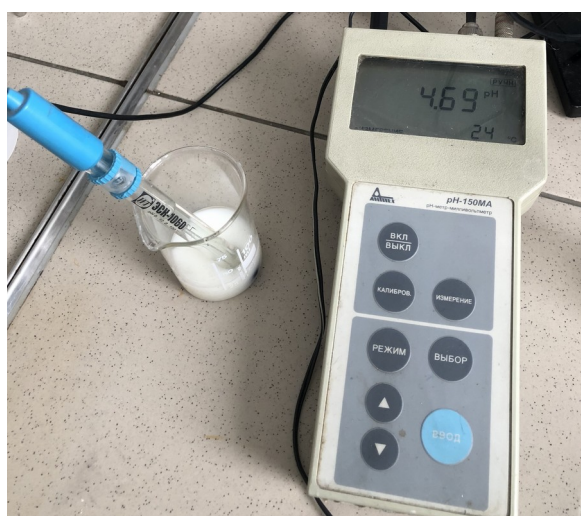


Рис. 2.6. Визначення активної кислотності

Визначення окисно-відновного потенціалу (ОВП). ОВП – це здатність складових речовин кисломолочного продукту приєднувати або втрачати електрони. Являє собою вимір, який вказує ступінь, в якій речовина здатна окислювати або відновлювати іншу речовину. Окислювально-відновний потенціал позначається E і дорівнює $0,25 \div 0,35$ В. ОВП визначають потенціометричним методом, який полягає у вимірюванні потенціалів електродів, занурених у досліджуваний розчин [86]. Аналіз проводився за допомогою спеціального приладу – рН-метра (рН-150МА) (рис. 2.7).

ОВП є важливим показником оцінки протікання повноти бродіння кефіру. ОВП визначається кількістю електронів, які можуть нейтралізувати вільні радикали в організмі людини. Якщо в середовищі багато вільних електронів, тоді ОВП має негативний заряд. Чим нижчий ОВП, тим більша кількість електронів та енергетичний стан системи. Електрометр визначає рН та ОВП, який характеризує енергію водню та рівень його активності. Вивільнені електрони надають системі антиоксидантних властивостей, нейтралізують вільні радикали – причину захворюваності та старіння організму людини.

Тому, позитивний ОВП означає, що рідина має підвищену здатність приймати електрони ззовні (окислювальний потенціал), а негативний - віддавати (відновний потенціал) [87].

Продукт з негативним ОВП за рахунок своїх відновлювальних властивостей нормалізує окислювально-відновний баланс в організмі і тим самим:

- нормалізує мікрофлору шлунково-кишкового тракту шляхом стимулювання зростання власної нормальної мікрофлори (біфідобактерій і лактобактерій) і придушення патогенної і умовно-патогенної мікрофлори;
- відновлює і активізує імунну систему у людей з ослабленим імунітетом і після імунодепресивної терапії, в тому числі, після впливу променевої і хіміотерапії;
- володіє потужними антиоксидантними властивостями;
- володіє антимутагенними, гепатопротекторними та протизапальними властивості; [88].

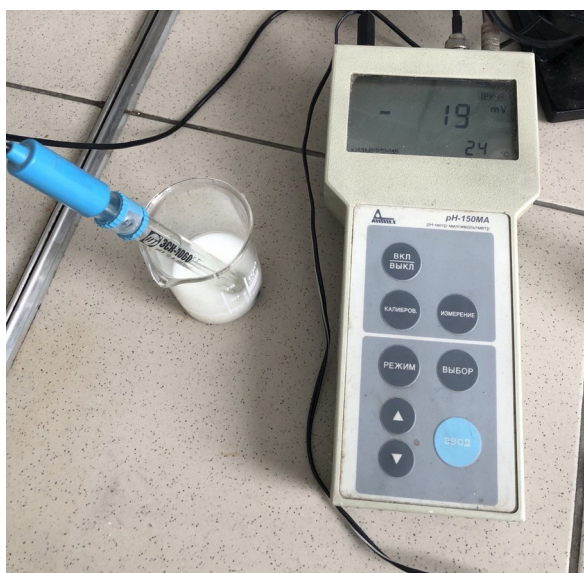


Рис. 2.7. Визначення ОВП

Визначення органолептичних показників. Методологія визначення базується на визначенні якості кисломолочного продукту деякими експертами, за такими показниками як зовнішній вигляд та консистенція, смак і запах, колір продукту [89].

Органолептична оцінка якості кефіру проводиться згідно з ДСТУ 4417:2005 «Кефір. Технічні умови» та Технічного регламенту на молоко та молочну продукцію [90, 91].

2.2.2. Мікробіологічні методи дослідження

Визначення якості кефіру за показником кількості життєздатних молочнокислих бактерій, КУО в 1 см³. Методологія цього визначення полягає у висіві певної кількості продукту і (або) його розведень в рідкі або щільні селективні поживні середовища (лактоагар та біфідоагар), у культивуванні посівів при оптимальних умовах і, при необхідності, визначенні морфологічних і біохімічних властивостей виявлених МО та їх підрахунку.

Аналіз проводиться згідно ГОСТ 10444.11-89 "Продукты пищевые. Метод определения молочнокислых микроорганизмов" [92].

Визначення якості кефіру за показником кількості дріжджів та молочних дріжджів, КУО в 1 см³. Методологія цього визначення заснована на здатності

дріжджів та молочних дріжджів, що містяться в молочній продукції, при посіві продукту або його розведень на щільне живильне середовище (молочний агар) утворювати видимі характерні колонії через 3-5 діб при температурі $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ або $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$. Визначають згідно з ГОСТ 10444.12 [93, 94].

Визначення антибіотикостійкості МКБ методом серійних розведень. Даний метод є кількісним і дозволяє визначити мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) в рідкому або щільному поживному середовищі. Цей метод серійних розведень антибіотика в рідкому поживному середовищі дає характеристику активності антибіотика по відношенню до МКБ.

Для постановки даного експерименту необхідно:

1. Приготувати поживне селективне середовище – Біфідоагар.

Склад поживного напіврідкого середовища Біфідоагар (на 1 л): 2,3 г пептону ферментативного, 7,5 г глюкози, 5,25 дріжджового екстракту, 5 г натрій хлориду, 2,5 г лактози, 0,75 г мікробіологічного агару, 0,5 г натрій ацетату, 0,5 г цистеїн гідрохлориду, 0,5 г аскорбінової кислоти, 0,5 г магній хлориду.

2. Приготувати розчини антибіотиків – бензилпеніциліну, азитроміцину, лінкоміцину, гентаміцину сульфат та цефтріаксону.

3. Культури мікроорганізмів, які досліджуються на чутливість до антибіотиків.

Спочатку готуємо розчини антибіотиків. Для цього в ряд стерильних пробірок наливають по 1 мл рідкого поживного середовища – біфідоагар. В першу пробірку вносять 1 мл розчину антибіотику (концентрацією 500 мкг/мл) і перемішують суміш. Далі 1 мл рідини з першої пробірки переносять у другу, повторюючи перемішування. Дані операції повторюють з кожним розчином антибіотику. При такому способі розведення ми отримуємо у другій пробірці концентрацію антибіотика в два рази менше, ніж в попередній.

Після приготування розведень в усі пробірки вносять по 0,1 мл культуральної рідини (рис. 2.8).

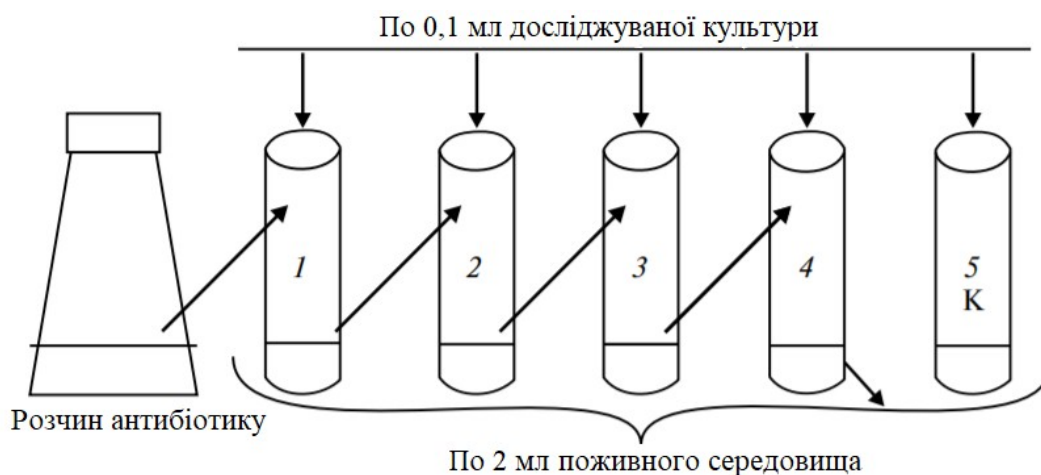


Рис. 2.8. Принцип методу серійних розведень [95]

Пробірки енергійно перемішують та поміщають на 18-20 годин для вирощування при оптимальній температурі.

Далі проводять аналіз результатів за мутністю середовища щоб визначити наявність росту МО [95].

Визначення антибіотикостійкості МКБ диско-дифузним методом. Чутливість до антибіотиків досліджували ще одним методом – диско-дифузним. Методологія цього визначення заснована на здатності антибіотика дифундувати з просочених ними паперових дисків в поживне середовище, пригнічуючи ріст МО, посіяних на поверхні агару.

Спочатку готується елективне поживне середовище Лактоагар. Склад поживного середовища Лактоагар (на 1 л): 15 г пептону ферментативного 15 г, 15 г глюкози, 10 г агару мікробіологічного, 4 г натрій ацетату, 2,8 г дріжджового екстракту, 1,5 г дегідрофосфату калію, 1,5 г амоній цитрату, 0,1 г магній хлориду, 0,04 г аскорбінової кислоти, 0,04 г манган сульфату.

Далі бактерії, що досліджуються (0,1 мл суспензії) висівають на поверхню агаризованого поживного середовища (Лактоагар) в чашках Петрі і рівномірно розподіляють шпателем. Далі стерильним пінцетом на засіяну поверхню розміщують на рівній відстані один від одного, від країв та центру чашки стандартні паперові диски, просочені розчинами таких антибіотиків: бензилпеніцилін, азитроміцин, лінкоміцин, гентаміцину сульфат, цефтріаксон, ніфуроксазид,

норфлуксацин, амоксил.

Чашки з дисками інкубують протягом 24 годин в анаеробних умовах при температурі 37 ° С. Оцінка результатів проводять за діаметром зон затримки росту МО. Діаметр зон затримки росту відповідає ступеню чутливості досліджуваного МО до даних антибіотиків [95] (рис. 2.9).

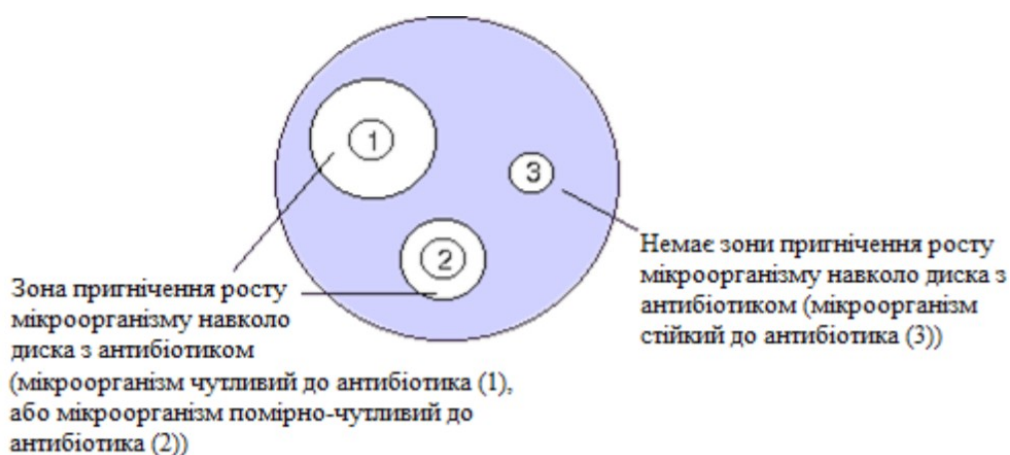


Рис. 2.9. Інтерпретація результатів при використанні диско-диффузного методу [96]

Визначення мутності досліджуваних розчинів (біфідоагар). Методологія полягає у визначенні концентрації клітин біфідобактерій у напіврідкому середовищі біфідоагар у складі бактеріальних і мікробіологічних суспензій в межах діапазону 0,0-6,0 одиниць МакФарланд (McF) (0 - 180×10^7 клітин / мл). Визначення проводять за допомогою приладу денситометру (рис. 2.10). Денситометр ефективний в ході досліджень процесів ферментації, при визначенні чутливості мікроорганізмів до антибіотиків.

Принцип дії цього методу полягає в отриманні даних за оптичною щільністю того чи іншого розчину з подальшим їх переведенням у одиниці МакФарланда [97].

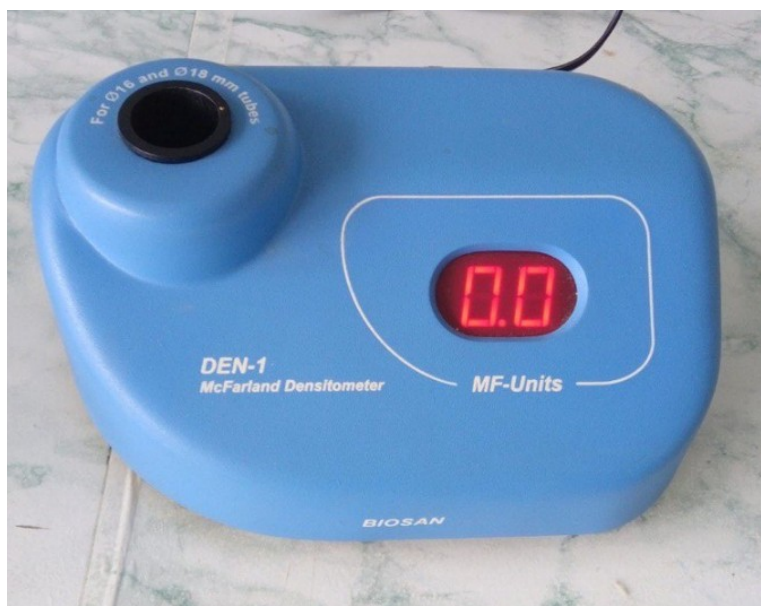


Рис. 2.10. Прилад для вимірювання концентрації клітин – денситометр

2.3. Висновки до розділу

Отже, об'єктом дослідження є вплив антибіотичних речовин на активність МКБ, виділених із закваски «Vivo кефір». Розглянуто морфологічні та культуральні особливості МКБ та молочних дріжджових кефірних грибів. Описані фізико-хімічні методи для дослідження та оцінки якості кефіру, а саме титрована та активна кислотність, окисно-відновний потенціал. Також описані мікробіологічні методи дослідження визначення якості кефіру та антибіотикостійкості МКБ (диско-дифузний та метод серійних розведень).

РОЗДІЛ 3

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Технологія приготування лабораторного кефіру

Для приготування кефіру власного виробництва було використано закваску «Vivo кефір» (виробник: Інститут продовольчих ресурсів Національної академії аграрних наук України) (рис. 3.1), яка має такий склад: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium infantis*, *Saccharomyces lactis*, *Torulopsis kefir*.



Рис. 3.1. Закваска «Vivo кефір»

Оптимальна температура для сквашування кефіру: 22-30°C. Кефір готували в йогуртниці (рис. 3.2).

Приготування кефіру в лабораторних умовах здійснюється за такими етапами:

Підготовка молока. Було взяте домашнє (сире) молоко (можна взяти пастеризоване). Перед застосуванням молоко слід прокип'ятити і дати охолонути до кімнатної температури.

Внесення закваски «Vivo кефір». Перед внесенням закваски потрібно переконатися, щоб молоко було не гаряче (не більше +32°C). Далі необхідно

наповнити флакон з закваскою молоком приблизно на половину, закрити його ковпачком та збовтати до повного розчинення закваски. Цю розчинену закваску влити в молоко та ретельно перемішати.



Рис. 3.2. Йогуртниця для приготування власного кефіру

Сквашування. Для сквашування необхідно перелити суміш молока з закваскою в йогуртницю. Далі потрібно обрати температурний режим в йогуртниці (22 - 30°C). Час ферментації кефіру 20-24 години.

Перевірка результатів. Після закінчення часу ферментації необхідно переконатися, що продукт став густим. Якщо ні – необхідно почекати ще 1-2 години і потім знову перевірити.

Охолодження, дозрівання, зберігання. Наш продукт, який загустів, потрібно ретельно перемішати (збовтати) і поставити в холодильник для охолодження і дозрівання. Повний смак розкривається в процесі дозрівання в холодильнику протягом доби, але можна вживати продукт відразу ж після охолодження. Термін зберігання готового кефіру – до 5 діб.

3.2. Результати фізико-хімічних досліджень

Для оцінки якості магазинних зразків кефіру за допомогою фізико-хімічних методів дослідження, а також для їх порівняння із кефіром власного виробництва,

було взято такі зразки:

- Зразок №1 - 2,5 % жирності; Україна, м.Черкаси;
- Зразок №2 - 2,5 % жирності; Україна, м.Львів;
- Зразок №3 - 2,5 % жирності; Україна, м.Яготин;
- Зразок №4 - 2,5 % жирності; Україна, м. Кременчук;
- Зразок №5 - кефір власного виробництва;

3.2.1. Визначення якості кефіру за показниками активної та титрованої кислотності, ОВП

Результати фізико-хімічних досліджень наведені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Результати фізико-хімічних досліджень визначення якості кефіру

№	Назва зразка	Активна кислотність, рН	Титрована кислотність, °Т	Окислювально-відновлюваний потенціал (ОВП), mV
1	Зразок №1	4,69	–	-19
2	Зразок №2	4,52	–	-17
3	Зразок №3	4,76	99 ⁰	-27
4	Зразок №4	4,80	114 ⁰	-36
5	Зразок №5	4,47	128 ⁰	-41

Дослідивши фізико-хімічні показники якості кефіру можна зробити висновок:

1. Усі дослідні зразки кефіру відповідають вимогам згідно з ДСТУ 4417:2005 «Кефір. Технічні умови.» за показником активної кислотності (рН), (норма 4,0 – 4,8).

2. Не вдалося визначити показник титрованої кислотності за стандартною методикою згідно з ГОСТ 3624-92 "Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности" у зразках №1 та №2 із-за наявних у складі даних зразків консервантів, стабілізаторів, загущувачів та інших

домішок, які додають вітчизняні виробники задля пролонгації терміну реалізації готового продукту по закінченню процесу ферментації (зброджування молока).

Чим вище показник титрованої кислотності, тим є якіснішим кефір, що свідчить про процес повного бродіння. Тому, зразки №3, №4 та №5 (кефір власного виробництва) відповідають вимогам ДСТУ 4417:2005 (норма 85-130⁰T), отже вони є продуктами повного бродіння.

3. Негативне значення показника ОВП дослідних зразків кефіру свідчить про те, що кефір має відновні властивості, тобто нормалізує окислювально-відновний баланс в організмі і тим самим нормалізує мікрофлору шлунково-кишкового тракту, а також свідчить про його антиоксидантну активність. Отже, із усіх зразків найнижчий показник ОВП має кефір власного виробництва (зразок №5), що свідчить про активність МКБ та повний процес ферментації (скашування молока). Тобто даний продукт є функціональним та корисним до вживання. Найгірший за повнотою бродіння є зразок №2, що підтверджується найвищим показником ОВП.

3.2.2. Визначення якості кефіру за органолептичними показниками

Для визначення оцінки якості кефіру був проведений метод визначення органолептичних показників (зовнішній вигляд та консистенція, смак і запах, колір продукту) дослідних зразків кефіру магазинної продукції та кефіру власного виробництва.

Результати визначення органолептичних показників наведені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Результати визначення органолептичних показників якості кефіру

№	Назва зразку	Назва органолептичного показника		
		Зовнішній вигляд та консистенція	Смак і запах	Колір
1	Зразок №1	Однорідна не густа рідина, без пластівців, без газотворень	Кисломолочний, без сторонніх присмаків та запахів	Молочно-білий, рівномірний за всією масою

Продовження табл. 3.2

2	Зразок №2	Однорідна рідина, без пластівців, з невеликою кількістю газоутворення	Слабо кислий, без сторонніх присмаків та запахів	Білий, рівномірний за всією масою
3	Зразок №3	Однорідна рідина, без пластівців, в міру густа, без газоутворень	Кисломолочний, щипкий, без сторонніх присмаків та запахів	Молочно-білий, рівномірний за всією масою
4	Зразок №4	Однорідна рідина, із порушеними згустками та з невеликою кількістю газоутворення	Кисломолочний, без сторонніх присмаків та запахів, злегка гострий	Молочно-білий, рівномірний за всією масою
5	Зразок №5	Однорідна рідина, більш густий, з непорушеними згустками	Не кислий, без сторонніх присмаків та запахів	Молочно-білий, рівномірний за всією масою

Для визначення загальної оцінки якості кефіру різних виробників та кефіру власного виробництва було проведено експертний метод органолептичної оцінки.

В дегустації приймали участь 3 студенти групи ФБ-402 Національного авіаційного університету та мої батьки: 1) Шевчук А.О., 2) Дорошенко Є.О., 3)Вернигора А.В, 4) Полончук Н.М., та 5) Полончук Ю. О.

Відповідно до ДСТУ 4417:2005 «Кефір. Технічні умови» та Технічного регламенту на молоко та молочну продукцію була проведена органолептична оцінка дослідних зразків кефіру.

Експертний метод органолептичної оцінки полягає у визначенні якості продукту незалежними експертами. При цьому враховується вагомість кожного одиничного показника якості продукту.

Кожний одиничний показник якості кефіру оцінюється по 5-ти бальній системі: 5 - відмінно; 4 - добре; 3 - задовільно; 2 - незадовільно; 1 - дуже погано [98].

Згідно ДСТУ 4417:2005 «Кефір. Технічні умови» одиничними зразками якості кефіру є смак та запах; зовнішній вигляд та консистенція; колір.

Для формування більш точних результатів визначили коефіцієнти вагомості кожного окремого органолептичного показника. Вони виражають частку значущості

показника в загальній оцінці якості кефіру.

Отже, для визначення якості дослідних зразків кефіру за органолептичними показниками було обрано 5-ти балову шкалу та, відповідно, коефіцієнти вагомості: 0,6 - смак та запах; 0,2 - консистенція та зовнішній вигляд; 0,2 - колір продукту.

Також, для аналізу результатів та підведення підсумків визначення ступеня якості дослідних зразків кефіру, розроблено градуйована шкала за 5-ти бальною шкалою: 4,5 - 5 - відмінно; 4,0 - 4,5 - добре; 3,5 - 3,9 - задовільно; нижче 3,5 - незадовільно.

Отже, за кожним зразком кефіру обрані експерти проставили бали за кожним одиничним показником якості кефіру. Результат отриманих оцінок від дегустаторів представлена в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Статистична обробка результатів дегустації дослідних проб кефіру

Зразок №1						Середній бал
Назва органолептичного показника	Балові оцінки дегустаторів					
	1	2	3	4	5	
Зовнішній вигляд і консистенція	4	4	4	4	4	4
Смак і запах	4	4	5	4	5	4,4
Колір	5	5	5	4	5	5
Зразок №2						Середній бал
Назва органолептичного показника	Балові оцінки дегустаторів					
	1	2	3	4	5	
Зовнішній вигляд і консистенція	4	4	4	4	4	4
Смак і запах	3	4	3	3	4	3,4
Колір	5	5	5	4	4	4,6

Продовження табл. 3.3

Зразок №3		Середній бал
Назва органолептичного	Балові оцінки дегустаторів	

показника	1	2	3	4	5	
Зовнішній вигляд і консистенція	4	5	4	4	5	4,4
Смак і запах	4	4	4	4	4	4
Колір	5	5	5	4	5	4,8
Зразок №4						Середній бал
Назва органолептичного показника	Балові оцінки дегустаторів					
	1	2	3	4	5	
Зовнішній вигляд і консистенція	4	4	4	3	4	3,8
Смак і запах	5	5	4	4	5	4,6
Колір	4	5	5	5	5	4,8
Зразок №5						Середній бал
Назва органолептичного показника	Балові оцінки дегустаторів					
	1	2	3	4	5	
Зовнішній вигляд і консистенція	4	5	4	5	5	4,6
Смак і запах	5	5	5	4	5	4,8
Колір	5	5	5	5	5	5

Отже, проведено визначення якості кефіру за органолептичними показниками експертним методом. В результаті дослідні проби кефірів отримали такі оцінки:

- Зразок №1 - 4,44 балів;
- Зразок №2 – 3,76 балів;
- Зразок №3 - 4,24 балів;
- Зразок №4 - 4,48 балів;
- Зразок №5 - 4,8 балів.

Відповідно до градуйованої 5-ти бальної шкали визначення ступеня якості, зразки отримали такі відмітки:

- Зразок №1 - добре;
- Зразок №2 - задовільно;

- Зразок №3 – добре;
- Зразок №4 - добре;
- Зразок №5 - відмінно.

Зразок №2 отримав найнижчу оцінку серед інших дослідних проб із-за рідкої консистенції та надто кислого смаку продукту.

Після проведення визначення органолептичних показників якості кефіру, а саме: зовнішній вигляд та консистенція, смак і запах, колір, можна зробити висновки:

Зразки кефіру №1, №3, №4 та №5 відповідають вимогам ДСТУ 4417:2005 «Кефір. Технічні умови» та Технічного регламенту на молоко та молочну продукцію.

Зразок №2 має деякі недоліки: слабо кислий смак, що свідчить про тривале сквашування продукту або порушення термінів зберігання готової продукції на підприємстві. Тому, враховуючи ці зауваження зразок №2 не відповідає вимогам ДСТУ 4417:2005 «Кефір. Технічні умови».

У зразка №2 та №4 виявлено незначне газоутворення, але цей показник дозволений нормативною документацією, внаслідок дії мікрофлори кефірної закваски.

У порівнянні з іншими зразками, зразок №5 – кефір власного виробництва за органолептичними показниками є більш якісним, тому рекомендується до вживання у якості пробіотичного препарату.

3.3. Результати мікробіологічних досліджень якості кефіру та антибіотикостійкості закваски «Vivo кефір»

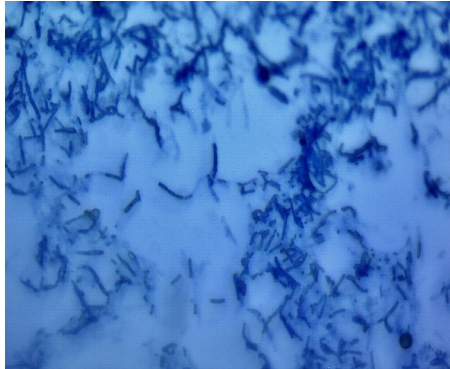
3.3.1. Визначення якості кефіру за мікробіологічними показниками

Для аналізу зразків кефіру магазинної продукції та кефіру власного виробництва було обрано такі мікробіологічні показники як кількість життєздатних молочнокислих бактерій, КУО в 1 см³ та кількість дріжджів, молочних дріжджів КУО в 1 см³. Адже саме ці показники визначають ступінь оздоровчого впливу на організм людини, так як кефір є пробіотичним продуктом профілактичного призначення.

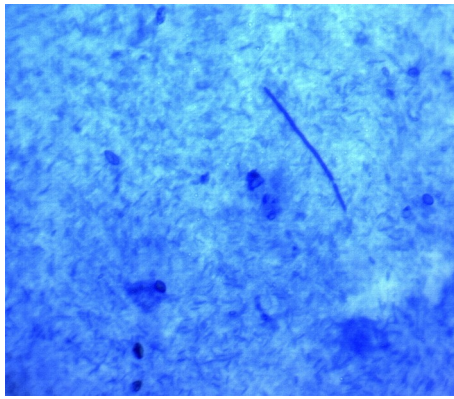
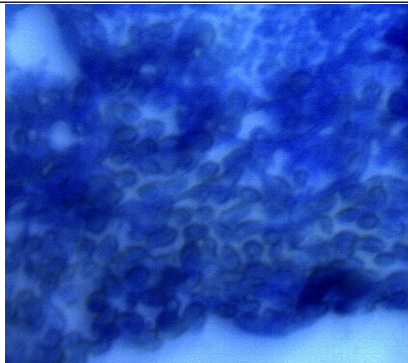
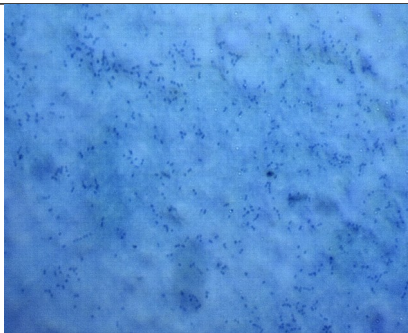
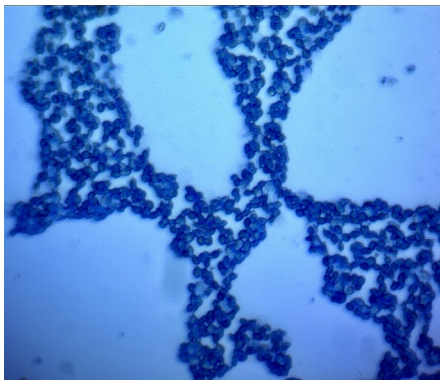
Результати визначення якості кефіру за мікробіологічними показниками наведені у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Результати досліджень визначення якості кефіру за мікробіологічними показниками

Назва показника				Морфологія клітин МКБ, x1000
Кількість життєздатних МКБ, КУО в 1 см ³		Кількість молочних дріжджів, КУО в 1 см ³		
К-сть, виявлена дослідженням	К-сть, заявлена виробником	К-сть, виявлена дослідженням	К-сть, заявлена виробником	
Зразок №1				
990	не менше 1·10 ⁷ КУО в 1 см ³	відсутність молочних дріжджів	-	
Зразок №2				

Продовження табл. 3.4

$1,2 \cdot 10^3$	не менше $1 \cdot 10^7$ КУО в 1 см^3	4 колонії	не менше $1 \cdot 10^3$ КУО в 1 см^3	
Зразок №3				
$2,0 \cdot 10^3$	не менше $1 \cdot 10^7$ КУО в 1 см^3	3 колонії	не менше $1 \cdot 10^3$ КУО в 1 см^3	
Зразок №4				
580	не менше $1 \cdot 10^7$ КУО в 1 см^3	відсутність молочних дріжджів	не менше $1 \cdot 10^4$ КУО в 1 см^3	
Зразок №5				
$1,1 \cdot 10^7$	-	13	-	

Провівши мікробіологічний аналіз якості даних зразків кефіру, можна зробити такі висновки:

Усі зразки кефіру магазинної продукції (№1-4), які було досліджено на визначення кількісної оцінки МКБ та молочних дріжджів не відповідають заявленій

кількості (ДСТУ 4417:2005. Кефір. Технічні умови).

Зразок №1 та №4 характеризуються відсутністю молочних дріжджів у порівнянні із зразками №2 та №3, що говорить про зниження їх біологічної цінності для здоров'я людини в лікувально-профілактичних цілях.

Зокрема, кефір, виготовлений на основі симбіотичної закваски, відповідає заявленим вимогам стандарту, так як у ньому присутня достатня кількість бродильної мікрофлори, а саме МКБ та молочних дріжджів, що входять до складу кефірних зерен.

Згідно проведених мікробіологічних досліджень, можна зробити висновок, що найгіршим із представлених виробників є зразок №4 із-за відсутності молочних дріжджів та найменшої кількості лактобактерій у порівнянні з іншими зразками. Тому даний продукт не слід вважати функціональним.

Отже, в ході фізико-хімічних досліджень, доведено високу якість та життєздатність симбіозу культур у кефірних зернах закваски «Vivo кефір», що дозволило отримати продукт високої якості за органолептичними показниками та показниками біологічної активності, що дає можливість його рекомендувати для щоденного вживання у якості функціонального продукту харчування для покращення стану здоров'я людини в несприятливих екологічних умовах сьогодення.

3.3.2. Визначення антибіотикостійкості закваски «Vivo кефір» за мікробіологічними показниками

Об'єктом дослідження є закваска «Vivo кефір», який має такий склад: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium infantis*, *Saccharomyces lactis*, *Torulopsis kefir*.

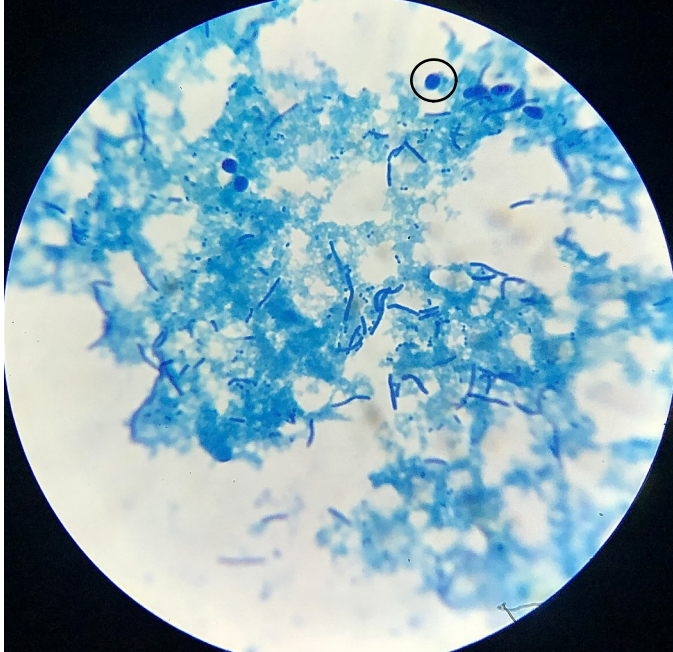
В даній заквасці було досліджено її якісний та кількісний склад, а також було доведено морфологічні особливості МКБ (табл. 3.5).

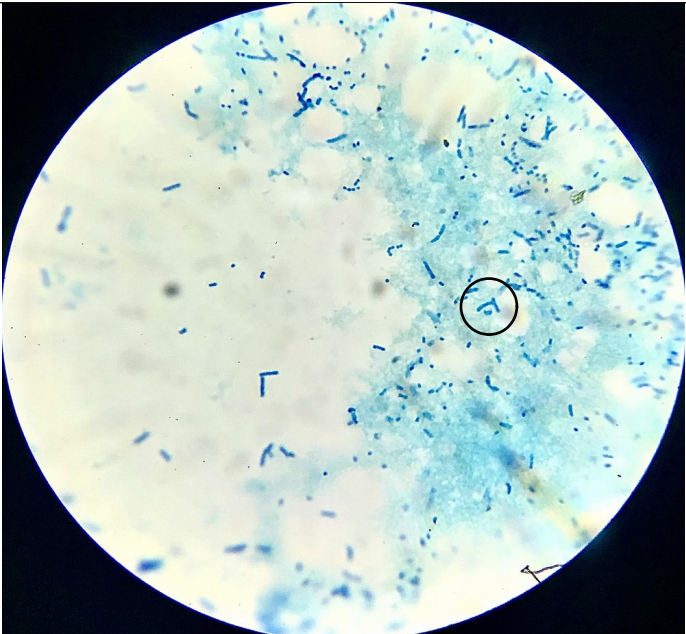
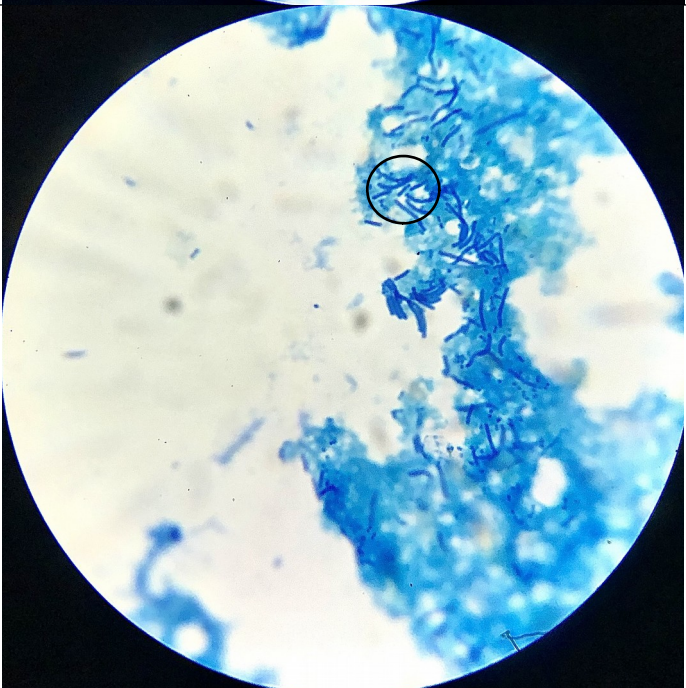
Згідно отриманих результатів можна спостерігати, що в даній заквасці переважає більша кількість лактобактерій, аніж біфідобактерій.

Метод мікроскопіювання був здійсненим мікроскопом Microscope Digital Eyepiece DCM-800 (8.0M pixels, CMOS) при збільшеннях об'єктива x1000. Ним було підтверджено морфологічні особливості лакто- та біфідобактерій, а саме лактобактерії є паличкоподібними бактеріями у вигляді коротких ланцюжків, які розташовуються поодинокі або парами. Біфідобактерії у вигляді паличок, які мають розгалуження у вигляді Y- або V-форми. У заквасці «Vivo кефір» спостерігається наявність молочних дріжджів, лакто- та біфідобактерій, що говорить про те що, дана закваска є симбіотичною та якісною у приготуванні функціональних продуктів.

Таблиця 3.5

Кількісний вміст МКБ в заквасці «Vivo кефір»

Об'єкт дослідження	Титр МКБ, кліт/мл	Морфологія клітин, x 1000
Закваска «Vivo кефір»	174,0·10 ⁷	

Біфідобактерії	57,0·10 ⁷	
Лактобактерії	117,0·10 ⁷	

Для дослідження та аналізу антибіотикостійкості закваски «Vivo кефір» було використано наступні антибіотичні препарати:

- Зразок №1 – бензилпеніцилін (Пен) (виробник: ПАТ Київмедпрепарат (Україна, м.Київ); концентрація: 500 мг/мл (1000 мг порошку (1флаконт)/2 мл Н₂О_{дист}));
- Зразок №2 – азитроміцин (Аз) (виробник: ПАТ ХІМЗАВОД «Червона зірка» (Україна, м.Харків); концентрація: 500 мг/мл);
- Зразок №3 – лінкоміцин (Лін) (виробник: ПАТ «Київмедпрепарат»

(Україна, м. Київ); концентрація: 500 мг/мл);

- Зразок №4 – гентаміцин сульфат (Ген) (виробник: Галичфарм (Україна, м. Львів) концентрація: 500 мг/мл (1 ампула 0,4 мг/0,9 мл H₂O_{дист}));

- Зразок №5 – цефтріаксон (Цеф) (виробник: ПАТ «Київмедпрепарат» (Україна, м. Київ); концентрація: 500 мг/мл (1000 мг порошку (1 флакон)/2 мл H₂O_{дист}));

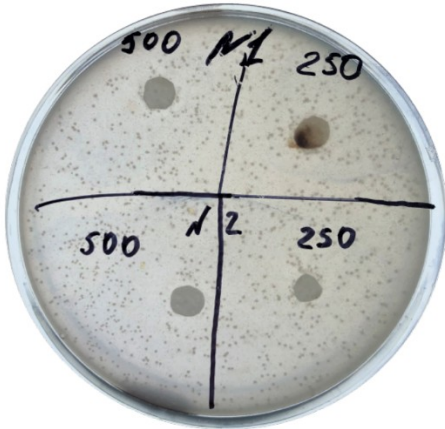

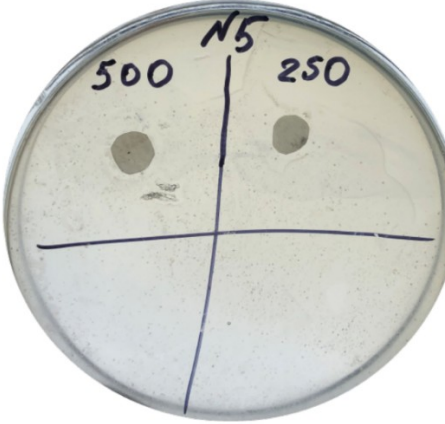
- Зразок №6 – ніфуроксазид (Ніф) (виробник: ПАТ «Київмедпрепарат» (Україна, м. Київ) концентрація: 400 мг/мл, 200 мг/мл);

- Зразок №7 – норфлоксацин (Нор) (виробник: ТОВ «Здоров'я» (Україна, м. Харків); концентрація: 400 мг/мл, 200 мг/мл);

- Зразок №8 – амоксил (Ам) (виробник: ПАТ «Київмедпрепарат» (Україна, м. Київ); концентрація: 400 мг/мл, 200 мг/мл);

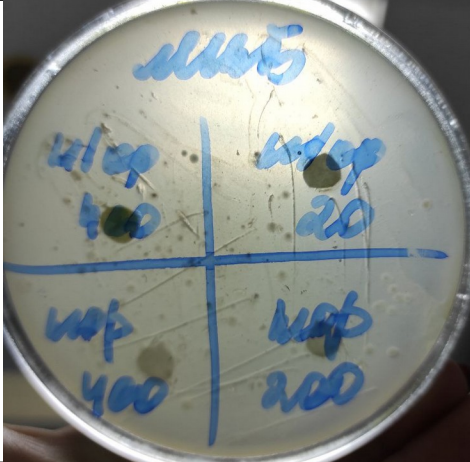
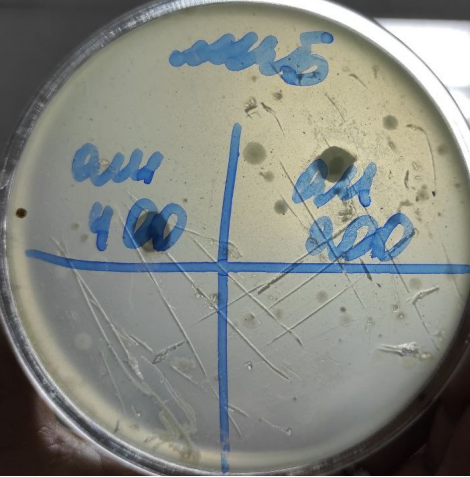
Було проведено дослідження визначення антибіотикостійкості консорціуму мікроорганізмів на елективному поживному середовищі Лактоагар (для виділення лактобактерій) диско-дифузним методом та методом серійних розведень для підтвердження достовірності отриманих результатів. Результати дослідження визначення антибіотикостійкості диско-дифузним методом наведені в табл. 3.6.

Визначення зони інгібування росту лактобактерій (поживне елективне середовище – Лактоагар)

№	Назва антибіотику	Розведення антибіотику, мг/мл		Фото результату
		500 мг/мл	250 мг/мл	
		Зона інгібування, мм		
1	Пен	0	0	
2	Аз	0	0	
3	Лін	0,1	0,1	
4	Ген	0,45	0,23	
5	Цеф	0	0	

Продовження табл. 3.6

№	Назва	Розведення антибіотику,	Фото результату
---	-------	-------------------------	-----------------

	антибіотику	МГ/МЛ		
		400 МГ/МЛ	200 МГ/МЛ	
		Зона інгібування, мм		
6	Ніф	0	0	
7	Нор	0	0	
8	Ам	0	0	

Аналіз отриманих результатів дозволяє зробити висновок, що лактобактерії, які використано у консорціумі закваски «Vivo кефір» у виробництві домашнього кефіру, не є чутливими до ряду досліджених, найчастіше використовуваних в лікувальній практиці антибіотичних препаратів. Тобто, вони є антибіотикостійкими. Але, по відношенню до деяких антибіотиків ця антибіотикостійкість більш виражена (Пен, Аз, Цеф, Нор, Ніф, Ам), а по відношенню до таких антибіотиків як лінкоміцин (Лін) та гентаміцину сульфат (Ген) антибіотикостійкість лактобактерій є менш вираженою, що підтверджено присутністю незначної зони інгібування при диско-дифузному методі дослідження (рис. 3.3).

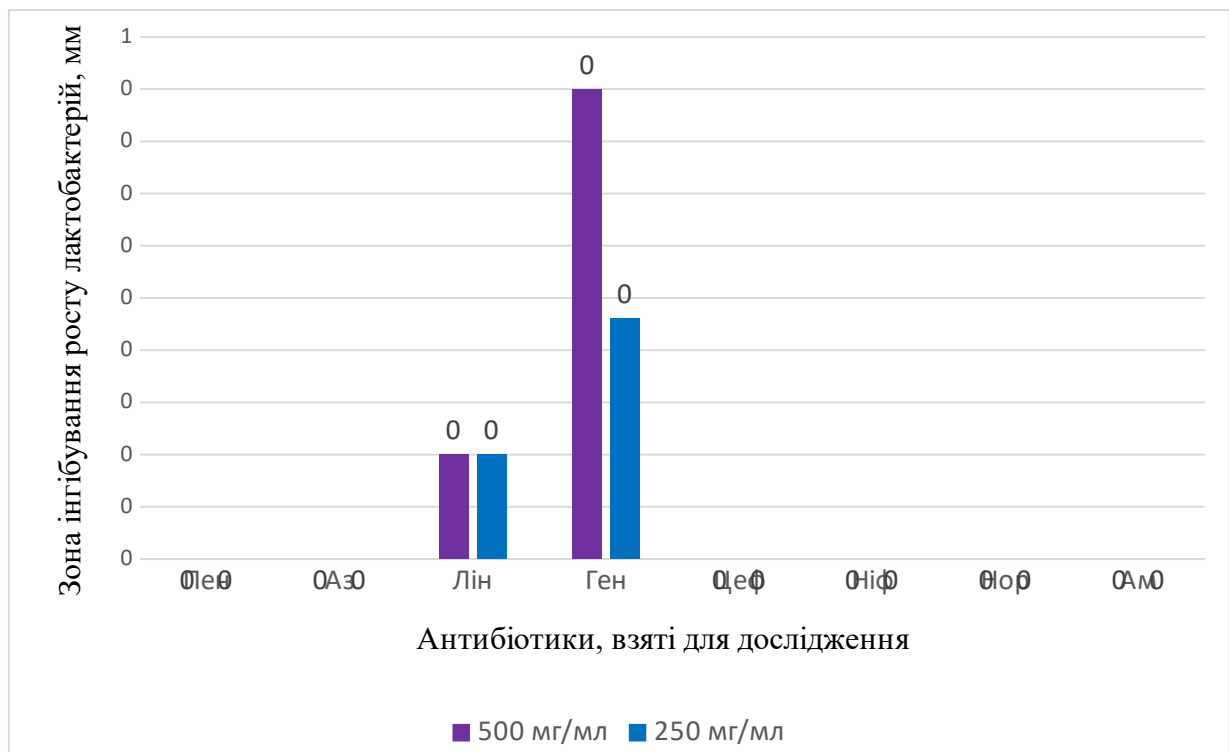


Рис. 3.3. Визначення зони інгібування росту лактобактерій (поживне елективне середовище – Лактоагар) при концентрації антибіотиків 500 та 250 мг/мл

Для визначення співвідношення отриманих результатів досліджень із результатами вчених, які опубліковані у фахових наукових виданнях, наведено порівняльну характеристику визначених зон інгібування власних досліджень та результатів вчених, які зазначені в літературних джерелах.

При виконанні даних досліджень були використані такі антибіотичні препарати: бензилпеніцилін (Пен), лінкоміцин (Лін), азитроміцин (Аз), гентаміцину сульфат (Ген), цефтріаксон (Цеф), ніфуроксазид (Ніф), норфлораксацин (Нор) та амоксицилін (Ам). На кафедрі технології харчових виробництв Казанського технологічного університету на чолі з доцентом С. В. Китаєвською була проведена подібна робота [47] в ході якої використовували наступні антибіотики: бензилпеніцилін (Пен), лінкоміцин (Лін), канаміцин (Кан), неоміцин (Нео), рифаміцин (Риф), доксицилін (Док), карбацилін (Кар), ристоміцин (Рис). У цих двох дослідженнях збігається застосування двох антибіотиків – бензилпеніцилін (Пен) та лінкоміцин (Лін).

Але, порівнюючи власні результати дослідження із дослідженнями автора

головною відмінністю є те що, у роботі автора Китаєвської С.В. для дослідження антибіотикостійкості МКБ були використано моно культури лактобактерій, в той час як у нашій роботі було досліджено ефективність закваски і антибіотикостійкість чистих культур, але які знаходяться в симбіозі між собою і які входять до складу кефірних зерен. Тому це дозволяє отримати більш широкий спектр результатів.

Також, С. В. Китаєвською було досліджено, що чисті культури лактобактерій (*L. casei*, *L. fermentum*, *L. acidophilum*, *L. brevis*, тощо), за винятком *L. fermentum*, проявляють високу чутливість до бензилпенициліну (зона інгібування 24 мм - *L. casei*). І три штами *L. casei*, *L. plantarum*, і *L. brevis* є чутливими до лінкоміцину (зона інгібування 3 мм - *L. casei*). В ході досліджень автор робить висновок, що в цілому всі вивчені культури (лактобактерії) володіють або стійкістю, або малою чутливістю до більшості антибіотиків. Особливу стійкість до перевірених антибіотиків проявляють три штами МКБ - *L. casei*, *L. fermentum* і *L. bavaricus*. У нашій роботі було визначено, що лактобактерії є антибіотикостійкими до бензилпенициліну (зона інгібування – 0 мм), але є дещо чутливими до лінкоміцину (зона інгібування – 0,1 мм).

Отже, аналізуючи наведені дані, можна підсумувати, що лактобактерії, які входять до складу кефірних зерен власноруч виготовленого кефіру на основі закваски «Vivo кефір», є значно стійкішими до дії досліджуваних антибіотиків ніж чисті монокультури лактобактерій, використаних у роботі С. В. Китаєвської.

Також було проведено подібне дослідження вченими із Московського державного університету прикладної біотехнології – А.С. Багдарсян, Е.С.Токаєв, Е.А. Некрасов, Е.А. Олійник. [59] Вони визначали антибіотикостійкість пробіотичних культур: біфідобактерій і лактобактерій, а також їх консорціумів диско-дифузним методом. У дослідженнях використовували диски з такими антибіотиками: оксацилін, ампіцилін, ампіцилін/сульбактам, амоксацилін з різною активністю, амоксацилін/клавуланова кислота, азлоцилін, цефотаксим, цефтріаксон, цефамандол, цефазолін, цефоперазон, ертрапенем, канаміцин, гентаміцин з різною активністю, неоміцин, олеандоміцин, амікацин, офлоксацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин, хлорамфенікол, тетрациклін з різною активністю, доксициклін,

міноциклін, азитроміцин, кларитроміцин, еритроміцин, рокітаміцин, фосфоміцин + глюкозо-6-фосфат, пристиноміцин. У цих двох дослідження збігається застосування антибіотиків – цефтріаксон (Цеф), гентаміцин (Ген), норфлоксацин (Нор) та азитроміцин (Аз).

Згідно результатів дослідження вченими було виявлено, що консорціум біфідо- та лактобактерій проявив стійкість до гентаміцину, неоміцину, норфлоксацину, канаміцину, офлоксацину, де що є чутливими до азитроміцину. В нашому випадку, консорціум МКБ є антибіотикостійким по відношенню до азитроміцину, норфлоксацину, але є де що чутливим до гентаміцину.


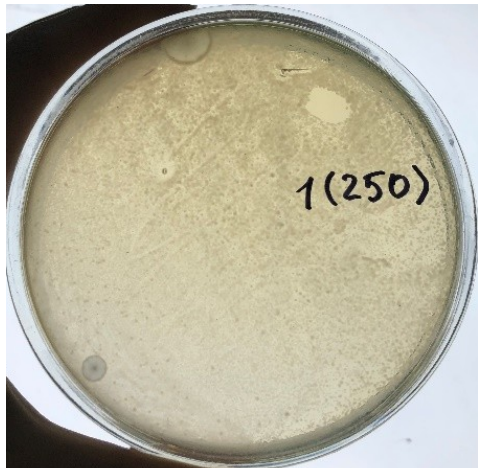

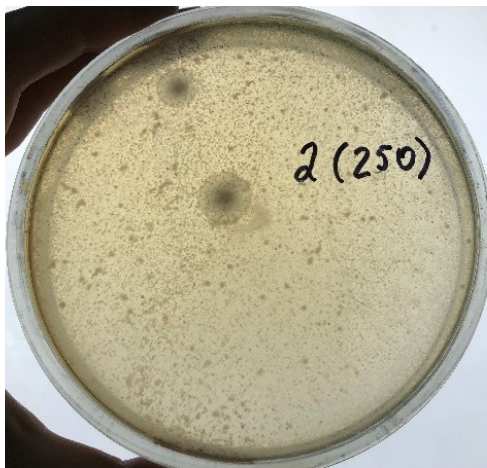
Але вчені приходять до висновку, що більшість досліджуваних штамів лакто- та біфідобактерій, які входять до складу синбіотиків, не володіли характерною стійкістю до антибіотиків, тому вони рекомендують приймати дані препарати після завершення курсу антибіотикотерапії. В той час як консорціуми володіли більшою стійкістю до антибіотиків, ніж чисті культури. Тому, аналізуючи ці дані, можна підсумувати, що результати московських вчених є підтвердженням наших досліджень, що саме консорціум МКБ (лакто- та біфідобактерій) є більш ефективним пробіотичним препаратом при антибіотикотерапії ніж окремі чисті культури.

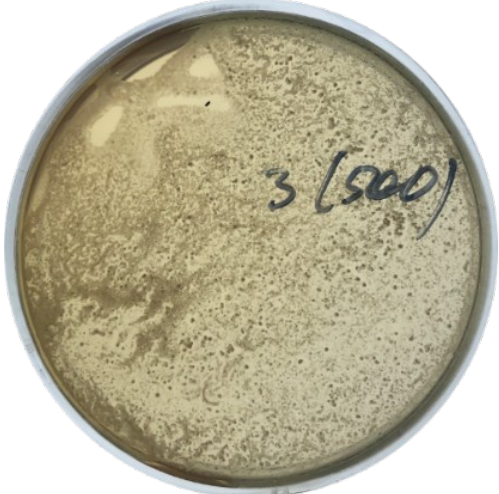
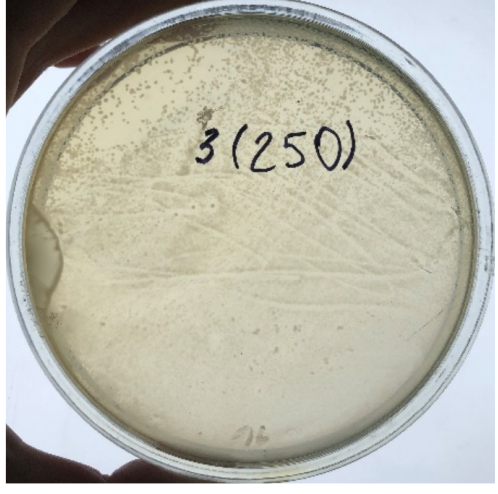
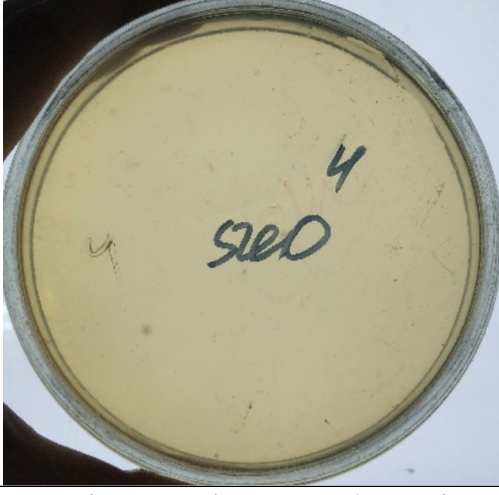
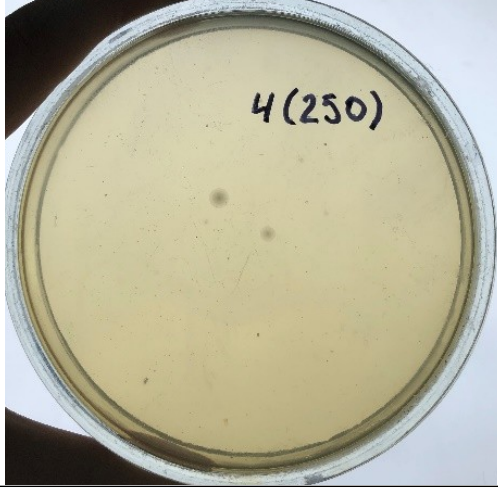
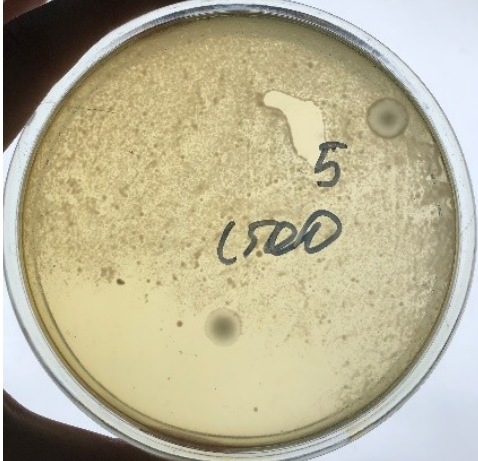
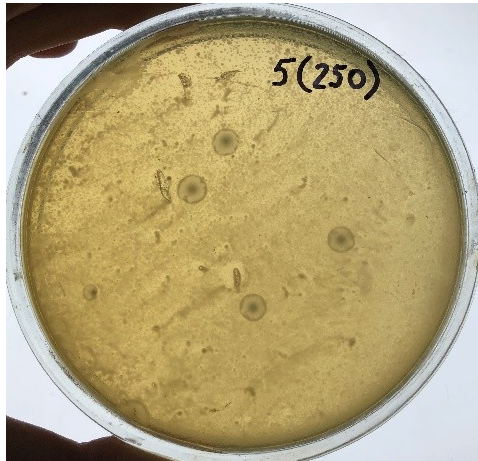
З метою уточнення результатів досліджень та підтвердження правильності їх виконання було здійснено паралельне дослідження антибіотикостійкості консорціуму кефірних зерен методом серійних розведень на елективному поживному середовищі Лактоагар з концентраціями антибіотиків 500, 250 мг/мл (зразок №1 – 5).

Результати проведених досліджень визначення антибіотикостійкості лактобактерій на середовищі Лактоагар методом серійних розведень наведені в табл. 3.7.

Таблиця 3.7

Визначення антибіотикостійкості лактобактерій (поживне елективне середовище – Лактоагар)

№	Назва антибіотику	КУО /см ³	
		Концентрація антибіотиків	
		500 мг/мл	250 мг/мл
1	Пен	$1,2 \cdot 10^{10}$ $\ln(1,2 \cdot 10^{10}) = 23,21$ 	$6,0 \cdot 10^{10}$ $\ln(6,0 \cdot 10^{10}) = 24,82$ 
2	Аз	$3,0 \cdot 10^{10}$ $\ln(3,0 \cdot 10^{10}) = 24,12$ 	$9,0 \cdot 10^{10}$ $\ln(9,0 \cdot 10^{10}) = 25,22$ 
3	Лін	$8,0 \cdot 10^{10}$ $\ln(8,0 \cdot 10^{11}) = 25,11$	$1,5 \cdot 10^{11}$ $\ln(1,5 \cdot 10^{11}) = 25,73$

			
		1 КУО/см ³ ln (1) = 0	2 КУО/см ³ ln (2) = 0,69
4	Ген		
		суцільний ріст лактобактерій $6,0 \cdot 10^{10}$ ln ($6,0 \cdot 10^{10}$) = 24,82 2 КУО/см ³ молочних дріжджів	суцільний ріст лактобактерій $16,0 \cdot 10^{10}$ ln ($16,0 \cdot 10^{10}$) = 25,80 4 КУО/см ³ молочних дріжджів
5	Цеф		

Визначення кількості лактобактерій на поживному елективному середовищі Лактоагар – контрольна проба (без додавання антибіотиків) (рис. 3.4):

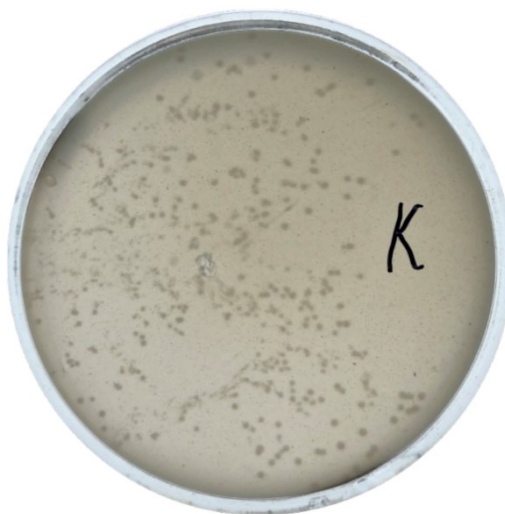
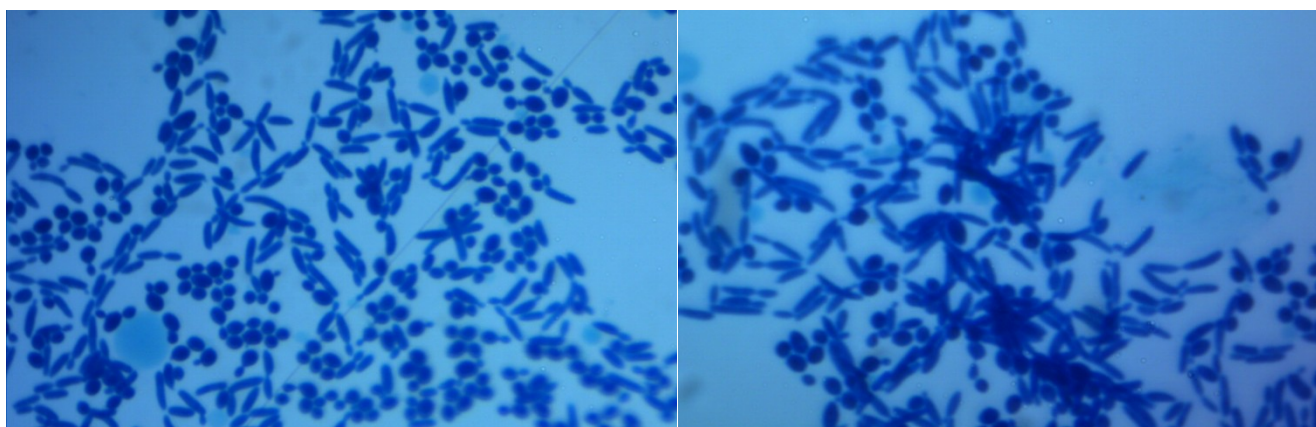


Рис. 3.4. Контрольна проба визначення кількості лактобактерій (середовище – Лактоагар), $35 \cdot 10^{10}$ КУО/см³ ($\ln = 26,58$)

Контрольна проба свідчить про суцільний ріст лактобактерій.

Морфологія кефірних зерен зображена на рис. 3.5.



a

б

Рис. 3.5. Мікроскопія клітин кефірних зерен:

a – при 500 мг/мл; *б* – при 250 мг/мл

На підставі проведеного дослідження слід сказати, що лактобактерії є антибіотикостійкими, але до антибіотику гентаміцин сульфат (Ген) виявилися чутливими. Суцільний ріст лактобактерій спостерігається у дослідних зразках з лінкоміцином (Лін) та цефтріаксоном (Цеф) (рис. 3.6).

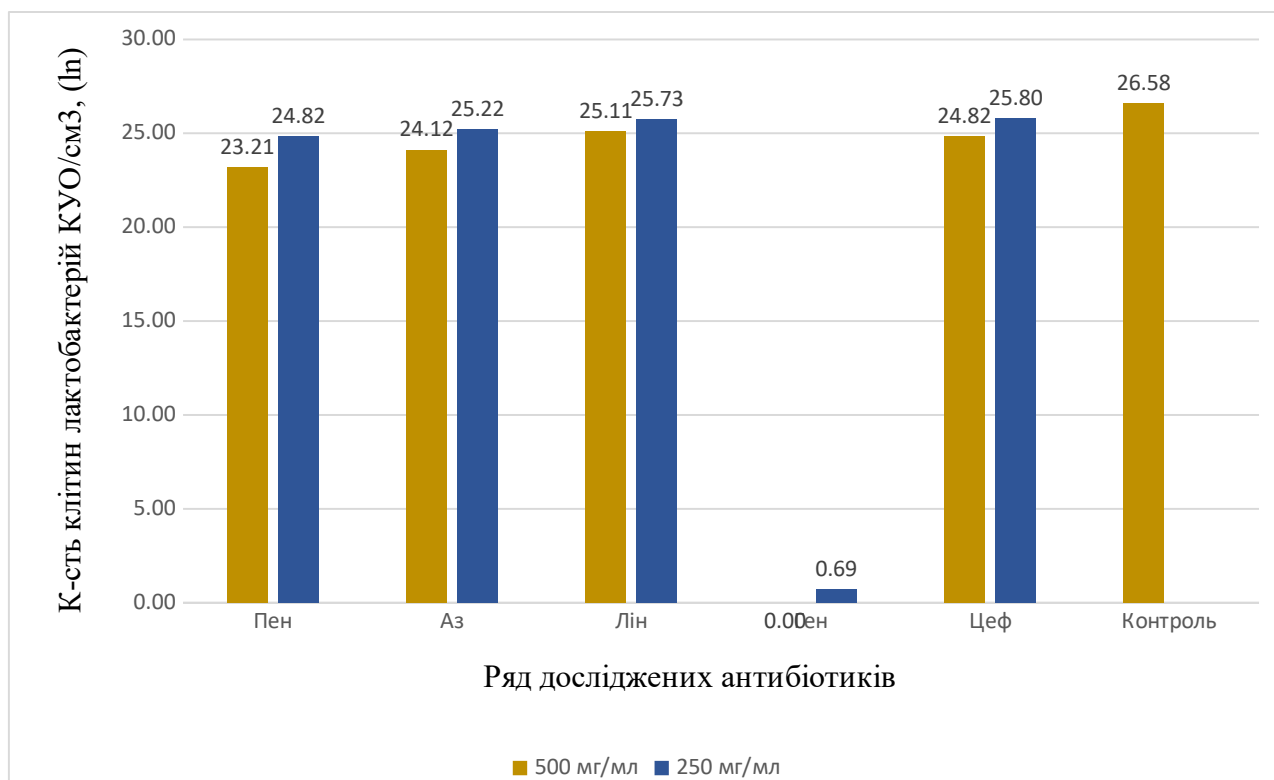


Рис. 3.6. Визначення антибіотикостійкості лактобактерій (поживне елективне середовище – Лактоагар) методом серійних розведень

Кількість клітин лактобактерій порівняно з контролем зменшилась на :

- (Пен) при 500 мг/ мл на 12,7 %; при 250 мг/мл на 6,6 %;
- (Аз) при 500 мг/мл на 9,3 %; при 250 мг/мл на 5 %;
- (Лін) при 500 мг/мл на 5,5 %; при 250 мг/мл на 3 %
- (Ген) при 500 мг/мл на 99,9 %, при 250 мг/мл на 97,4 %;
- (Цеф) при 500 мг/мл на 6,6 %; при 250 мг/мл на 2,9 %;

Дослідниками із Казахського національного університету ім. аль-Фарабі було проведено схоже дослідження. І.С. Савицька, А.А. Жубанова, А.С. Кистаубаєва, А.Б. Болекбаєва досліджували антибіотикорезистентність лактобацил методом серійних розведень [58]. Ними були використані такі антибіотичні препарати: канаміцин, гентаміцин, ампіцилін, амоксицилін, ципрофлоксацин, офлоксацин, тетрациклін, цефазолін, еритроміцин. А в ході наших досліджень були взяті інші антибіотики, але тих самих фармакологічних груп (ампіцилін-бензилпеніцилін; цефазолін-цефтріаксон; еритроміцин-азитроміцин).

У результаті дослідники визначили, що досліджені штами лактобактерій володіли різним рівнем стійкості до антибіотиків. Більшість штамів виявилися стійкими до канаміцину, офлоксацину, ципрофлоксацину, тетрацикліну, гентаміцину, еритроміцину. І тільки штам *L.acidophilus* був резистентним до цефазоліну. А у ході наших досліджень було визначено, що лактобактерії не володіють стійкістю до гентаміцину сульфат, але є резистентними до цефтріаксону, азитроміцину, бензилпеніциліну та лінкоміцину.





Порівнюючи власні результати із результатами казахських дослідників можна сказати, що знову ж таки головною відмінністю цих двох досліджень є те, що нами було використано консорціум МКБ та молочних дріжджів, а не чисті монокультури лактобактерій.





Отже, порівнюючи 2 методи, які були використані для дослідження: диско-дифузний та метод серійних розведень, встановили: при використанні дисків лактобактерії виявилися антибіотикостійкими, і це було підтверджено методом серійних розведень, так як спостерігалась присутність суцільного росту лактобактерій. Але вони виявилися чутливими до гентаміцину сульфату (Ген) в обох методах дослідження. Це пов'язано із тим, що даний антибіотик інгібує рибосомальні субодиниці 30S лактобактерій.



Так як крім лактобактерій у заквасці кефіру містяться ще біфідобактерії, які входять до складу кефірних зерен, для доповнення результатів було здійснено дослідження антибіотикостійкості біфідобактерій.

Результати проведених досліджень визначення антибіотикостійкості біфідобактерій у напіврідкому середовищі Біфідоагар методом серійних розведень наведені в табл. 3.8. Визначення кількості життєздатних клітин біфідобактерій здійснювалося за допомогою приладу – денситометру.

Визначення антибіотикостійкості біфідобактерій (поживне середовище – Біфідоагар)

№	Назва антибіотику	Розведення антибіотику		Титр (кількість життєздатних клітин біфідобактерій), кліт/см ³	
		500 мг/мл	250 мг/мл	500 мг/мл	250 мг/мл
1	Бен			$86,0 \cdot 10^7$ $\ln (86,0 \cdot 10^7) =$ $20,57$	$159,0 \cdot 10^7$ $\ln (159,0 \cdot 10^7) =$ $21,19$
2	Аз			$105,0 \cdot 10^7$ $\ln (105,0 \cdot 10^7) =$ $20,77$	$249,0 \cdot 10^7$ $\ln (249,0 \cdot 10^7) =$ $21,64$

3	Лін			$93,0 \cdot 10^7$ $\ln (93,0 \cdot 10^7) = 20,65$	$216,0 \cdot 10^7$ $\ln (216,0 \cdot 10^7) = 21,49$
4	Ген			$93,0 \cdot 10^7$ $\ln (93,0 \cdot 10^7) = 20,65$	$33,0 \cdot 10^8$ $\ln (33,0 \cdot 10^8) = 21,92$

5	Цеф			$165,0 \cdot 10^7$ $\ln(165,0 \cdot 10^7) =$ $21,22$	$39,0 \cdot 10^8$ $\ln(39,0 \cdot 10^8) =$ $21,94$
---	-----	---	---	--	--

Визначення титру у контрольній пробі (без додавання антибіотику): $55 \cdot 10^8$ кліт/см³ (ln = 22,43).

Згідно отриманих результатів можна зробити такі висновки:

1. У двох пробах №1(500) та №1(250) спостерігається високий ступінь опалесценції, спостерігається антибіотикостійкість біфідобактерій.

2. Проби №2(500) та №2(250) практично без ознак опалесценції, спостерігається менш виражена антибіотикостійкість, ніж у попередньому зразку, що говорить про чутливість біфідобактерій до даного антибіотику.

3. У пробах №3(500) та №3(250) спостерігається антибіотикостійкість біфідобактерій (менш виражена ніж у пробі №1). При зниженні концентрації антибіотика до 250 мг/мл спостерігається краща антибіотикостійкість біфідобактерій ніж при його концентрації 500 мг/мл.

4. У пробах №4(500) та №4(250) теж спостерігається антибіотикостійкість біфідобактерій (так само виражена як у пробі №3).

5. У пробах №5(500) та №5(250) спостерігається сильна опалесценція, трохи менше ніж у пробах №1.

Аналізуючи результати досліджень методом серійних розведень у напіврідкому середовищі Біфідоагар можна зробити висновок, що біфідобактерії є

антибіотикостійкими. Спостерігається прямопропорційна залежність ступеню резистентності біфідобактерій від концентрації антибіотиків та їх розведень, взятих для дослідження. При розведенні антибіотика концентрацією 500 мг/мл біфідобактерії є більш чутливими до дії антибіотиків, ніж при 250 мг/мл.

Спираючись на результати визначення титру життєздатних клітин видно, що найвища антибіотикорезистентність біфідобактерій проявилася до гентаміцину сульфат (Ген) та цефтріаксону (Цеф). Найнища антибіотикорезистентність проявилась до бензилпеніциліну (Пен), азитроміцину (Аз) та лінкоміцину (Лін), тобто ці антибіотики є сильнішими по відношенню до біфідобактерій (рис. 3.7).

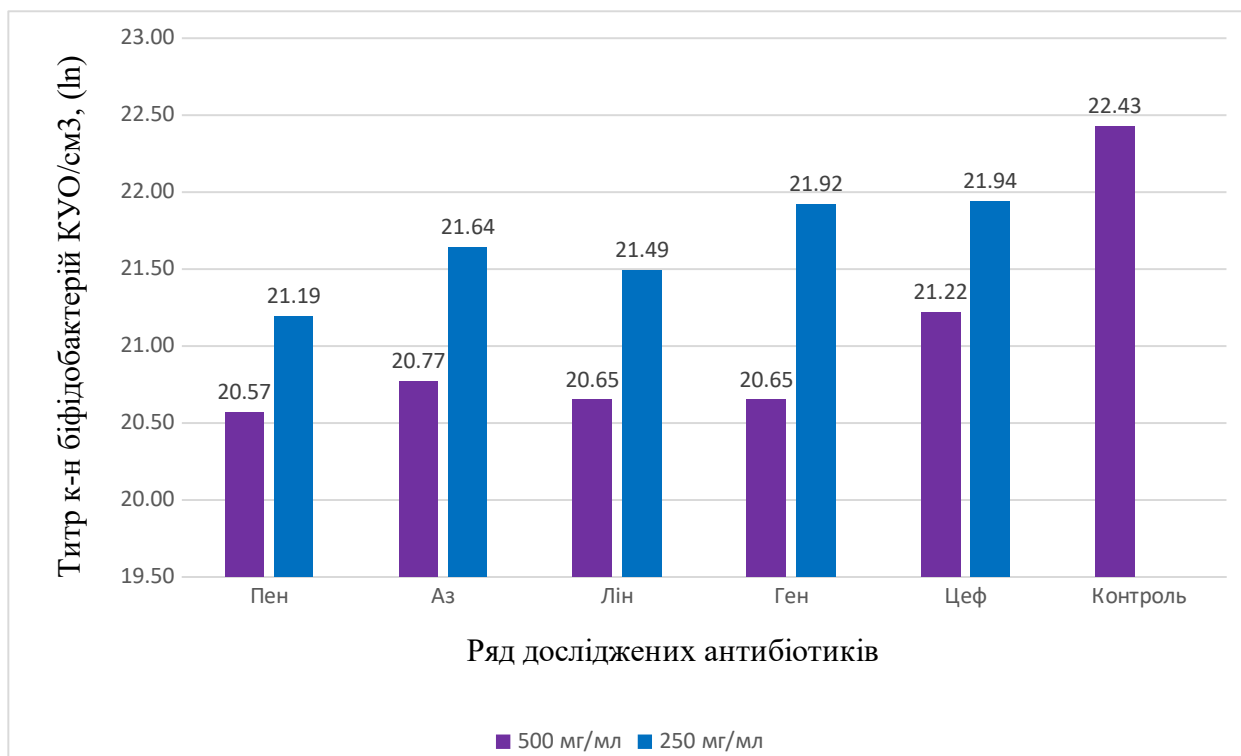


Рис. 3.7. Визначення антибіотикостійкості біфідобактерій (поживне елективне середовище – Біфідоагар) методом серійних розведень (500, 250 мг/мл)

Кількість клітин біфідобактерій порівняно з контролем зменшилась на :

- (Пен) при 500 мг/мл на 8,3 %; при 250 мг/мл на 5,5 %;
- (Аз) при 500 мг/мл на 7,4 %; при 250 мг/мл на 3,5 %;
- (Лін) при 500 мг/мл на 7,9 %; при 250 мг/мл на 4,2 %;
- (Ген) при 500 мг/мл на 7,9 %, при 250 мг/мл на 2,3 %;

- (Цеф) при 500 мг/мл на 5,4 %; при 250 мг/мл на 2,2 %;

Отже, порівнюючи результати визначення антибіотикостійкості лакто- та біфідобактерій можна сказати, що лактобактерії є більш стійкими до ряду досліджених антибіотиків ніж біфідобактерії. Але по відношенню до гентаміцину сульфату лактобактерії є чутливими, а біфідобактерії є резистентними.

Також, для більш точних результатів було проведено дослідження впливу різних водних екстрактів, виготовлених із сухих речовин лікарських рослин (розторопша, льон, реп'ях) та антиоксиданту вітаміну С на антибіотикостійкість лакто- та біфідобактерій.

Приготування водних екстрактів здійснювалося наступним чином: подрібнену сировину досліджуваних ЛР (25 г) поміщали в емальовану каструлю і заливали водою (100 мл). Дану посудину нагрівали на водяній бані (при 60⁰С) протягом 60 хвилин. Далі охолоджували до кімнатної температури і фільтрували.

Далі було здійснено посів кефірних зерен (0,1 мл суспензії) з концентрацією антибіотиків 250 мг/мл (1 мл) на так звані захисні середовища (ЗС) (внесення на чашки Петрі 1 мл отриманого водного екстракту).

В даних екстрактах було виконано розведення антибіотичних компонентів:

№1 – водний екстракт розторопші (екстракт містить БАР: флавоноїд силімарин та силібін) концентрація – 25%;

№2 – водний екстракт реп'яху (екстракт містить інулін; бардановое масло; вітаміни груп А, В, С, Р, Е; саліцилову і стеаринову кислоти; тощо), концентрація екстракту – 25 %;

№3 – водний екстракт льону (екстракт містить ненасичені жирні кислоти: 44-61% альфа-ліноленової (Омега-3), 15-30% лінолевої (Омега-6), 13-29% олеїнової (Омега-9), а також значну кількість токоферолів (вітамін Е), фолієвої кислоти і естрогеноподібних фітогормонів (лігнанів)), концентрація екстракту – 25 %;


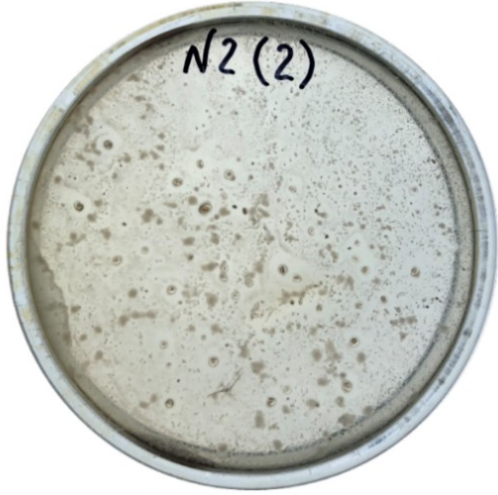
№4 – антиоксидант і окислювач, розчин вітаміну С - аскорбінова кислота: розведення наважки 0,2 мг на 1 мл Н₂О_{дист} (концентрація 0,2мг/мл).




5 – водний екстракт розторопші + водний екстракт льону, концентрація екстрактів – 25 %;

Результати досліджень представлені у таблиці 3.9.

Таблиця 3.9

Дослідження впливу водних екстрактів на антибіотикостійкість лакто- та біфідобактерій

№	Назва антибіотику	Водні екстракти із ЛР, 25% / вітамін С концентрацією 0,2 мг/мл	Ріст колоній на чашках Петрі при додаванні антибіотиків у концентрації 250мг/мл
1	Пен	Водний екстракт розторопші	$8,0 \cdot 10^{10}$ $\ln(8,0 \cdot 10^{10}) = 25,11$ 
2	Аз	Водний екстракт реп'яху	$1 \cdot 10^{11}$ $\ln(1 \cdot 10^{11}) = 25,33$ 
3	Лін	Водний екстракт	$2,3 \cdot 10^{11}$

		льону	$\ln(2,3 \cdot 10^{11}) = 26,16$ 
4	Ген	Антиоксидант і окислювач – розчин вітаміну С	$5 \cdot 10^1$ $\ln(5 \cdot 10^1) = 3,91$ 
5	Цеф	Водний екстракт розторопші + водний екстракт льону	$16,5 \cdot 10^{11}$ $\ln(16,5 \cdot 10^{11}) = 28,13$ 

Отже, аналізуючи отримані дані ми бачимо, що при додаванні водних

екстрактів та антиоксиданту вітаміну С спостерігається збільшення біомаси лакто- та біфідобактерій у порівнянні з контролем - без додавання цих захисних речовин, які володіють рухомими в'язкими рідинами (екстракти містять вітаміни, амінокислоти та слизи) та підвищеною антиоксидантною властивістю аскорбінової кислоти, яка сприяє прискоренню окисно-відновлювальних реакцій (рис. 3.8).

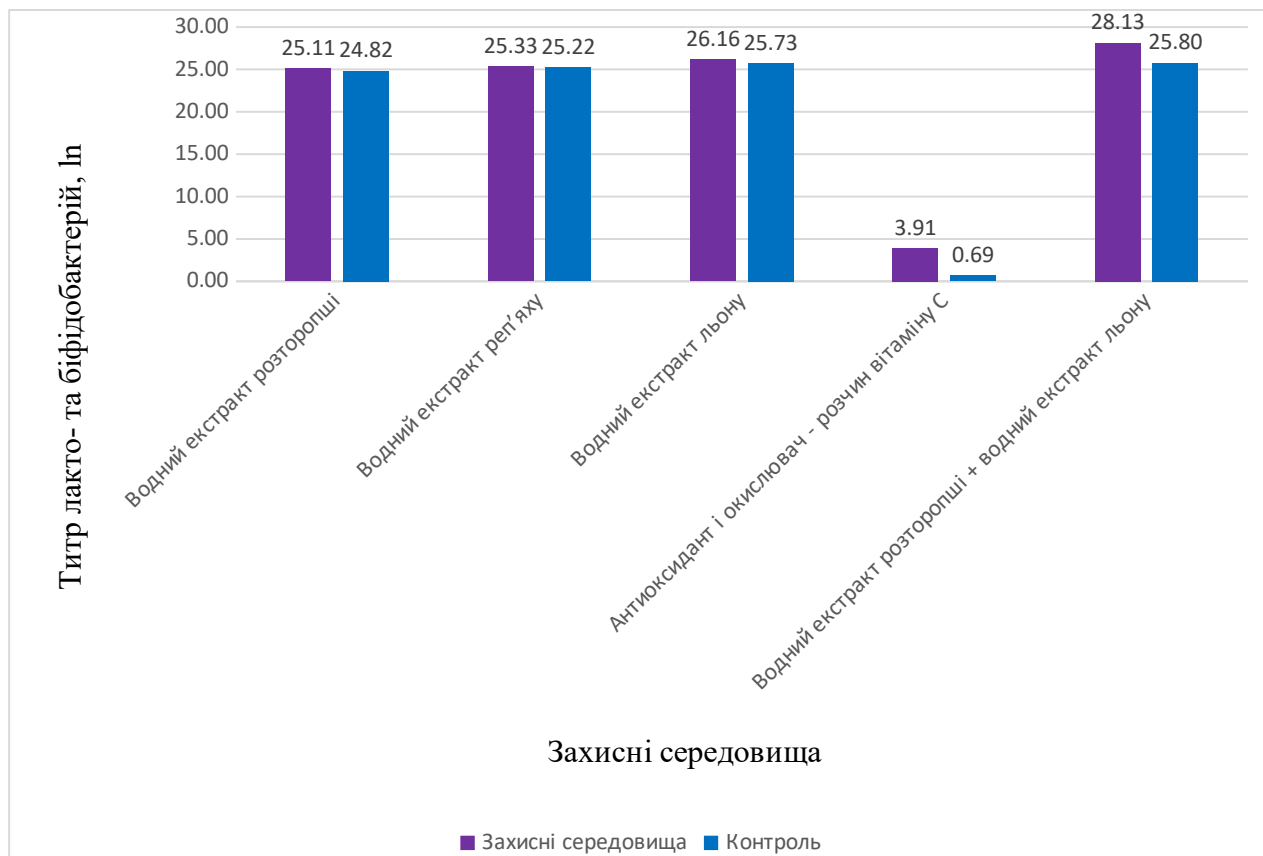


Рис. 3.8. Дослідження впливу захисних середовищ на антибіотикостійкість лакто- та біфідобактерій

При додаванні вітаміну С, збільшення біомаси зросло на 460 %, при водному екстракті розторопші на 1,2 %, при водному екстракті реп'ячу на 0,4 %, при водному екстракті льону на 1,7 % та на 9 % зросла біомаса при додаванні двох водних екстрактів (розторопші та льону).

Ці дані нашої роботи на думку, що за рахунок цих захисних речовин можна розширити асортимент продукції кефіру не тільки по органолептичним показникам, але це може посилити продукт у якості пробіотика, наприклад додаванням у кефір насіння льону, або антиоксидант вітамін С.

Додавання аскорбінової кислоти в даній концентрації не призведе до вітамінізації готових препаратів (невелика концентрація вітаміну С), але підвищить інтенсивність збродження молока за рахунок інтенсифікації окислювально-відновлювальних процесів. Аскорбінова кислота (Е300) належить до групи водорозчинних вітамінів. Бере участь в окисно-відновних реакціях, регуляції обмінних процесів у клітинах бродильної мікрофлори, що сприяє збереженню їх активності під впливом антибіотиків. Аскорбінова кислота виконує роль антиоксиданту, синергіста антиокислювачів, сприяє поліпшенню якісних характеристик та стабілізації готових препаратів. Завдяки ферментам бродильної мікрофлори (ферментам цитоплазматичної мембрани) вивільняється енергія із субстрату в реакціях ступінчатого окислення, яке підсилюється аскорбіновою кислотою, збільшується швидкість та повнота протікання окислювально-відновлювальних реакцій, яка підтверджена показником ОВП, який відповідає максимально негативному значенню. Запропоновано у якості поліпшувача використовувати аскорбінову кислоту, тому що вона є каталізатором окислювально-відновлювальних процесів, приймає активну участь в процесах переносу водню від окисленого субстрату до молекули кисню. При окисленні вона втрачає 2 атоми водню, при цьому трансформується в дегідроаскорбінову кислоту. Згідно наукових положень, аскорбінова кислота є регулятором ферментативних реакцій в клітині. Даний антиоксидант відноситься до поліфункціональних з'єднань, які володіють властивістю зворотно окислюватися та відновлюватися. Завдяки даним особливостям, аскорбінова кислота приймає участь у багатьох важливих енергетичних процесах живої клітини, стимулює реакції метаболізму, які пов'язані із обміном НК та синтезом білка.

Також спостерігається найбільше нарощування біомаси в присутності водного екстракту льону за рахунок вмісту ненасичених жирних кислот, вітаміну Е та В₁, що є стимуляторами росту МКБ.

Наші результати можна підтвердити аналізом інших наукових досліджень. Зокрема, авторами Хамагаєва І.С., Буянтуєва Л.В., Замбалова Н.А [99] було вивчено дію лляної олії на біохімічну активність різних штамів біфідобактерій. Ними

встановлено, що ненасичені жирні кислоти лляного масла (альфа-ліноленова кислота Омега-3; лінолева Омега-6; олеїнова Омега-9) підвищують плинність мембран і гідрофобність клітин біфідобактерій, що сприяє їх більш активному росту. А також, що лляне масло володіє біфідогенними властивостями і впливає на метаболізм біфідобактерій. Тому вчені прийшли висновку, що лляне масло є чудовим лікарським засобом при захворюваннях шлунково-кишкового тракту. Це підтверджується дослідженнями японських учених, які з'ясували, що дієта на основі лляної олії стимулює зростання лактобацил в шлунково-кишковому тракті [100].

В результаті можна зробити висновок, що захисним фактором для росту МКБ є ненасичені жирні кислоти (омега-3, омега-6, омега-9), що містяться у екстракті льону, а також комплекс вітамінів груп А, В, С, Р, Е, які присутні у екстракті реп'яху. Тому дані екстракти не тільки захищають, але і містять інші для організму поживні р-ни.

3.4. Рекомендації щодо вживання функціонального кефіру власного виробництва

Отже, кефір власного виробництва, виготовлений на симбіотичній заквасці «Vivo» можна рекомендувати для використання у профілактиці дисбактеріозу. Адже даний продукт повністю відповідає вимогам ДСТУ 4417:2005. Кефір. Технічні умови. [40] за органолептичними, фізико-хімічними та мікробіологічними показниками, що не можна сказати про комерційні продукти кисломолочної продукції. А також даний продукт є ефективним при щоденному вживанні під час антибіотикотерапії, так як було досліджено антибіотикостійкість МКБ, які входять до складу закваски «Vivo кефір», за рахунок якої і був виготовлений наш кефір.

3.5. Висновки до розділу

Отже, згідно фізико-хімічних та мікробіологічних методів дослідження, встановлено, що кефір власного виробництва на основі симбіотичної закваски «Vivo

кефір» рекомендований до вживання у якості пробіотичного препарату при профілактиці дисбактеріозів та при антибіотикотерапії.

Досліджено, що лакто- та біфідобактерії, які входять до складу кефірних зерен симбіотичної закваски «Vivo кефір», є антибіотикостійкими до ряду досліджених антибіотиків (бензилпеніцилін, лінкоміцин, азитроміцин, гентаміцину сульфат, цефтріаксон, норфлоксацин, ніфуроксазид, амоксил), і це було підтверджено результатами інших вчених. З'ясовано, що лактобактерії є більш стійкими до ряду досліджених антибіотиків ніж біфідобактерії (окрім гентаміцину сульфат).

Виявлена прямопропорційна залежність ступеню резистентності лакто- та біфідобактерій від концентрації антибіотиків та їх розведень, взятих для дослідження. При розведенні антибіотика концентрацією 500 мг/мл вони є більш чутливими до дії антибіотиків, ніж при 250 мг/мл.

Провівши порівняльну характеристику власних результатів досліджень із дослідженнями інших вчених доведено, що консорціум МКБ (лакто- та біфідобактерій) є більш ефективним пробіотичним препаратом при антибіотикотерапії ніж окремі чисті культури лакто- та біфідобактерій.

Визначено, що при додаванні водних упарених екстрактів (розторопші, реп'яху, льону) та антиоксиданту вітаміну С відбулося збільшення біомаси лакто- та біфідобактерій у порівнянні з контролем. Це свідчить про те, що захисним фактором та стимулятором росту для МКБ є ненасичені жирні кислоти (омега-3, омега-6, омега-9), вітаміни різних груп, амінокислоти та слизи, які містяться у даних екстрактах.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено оптимальні технологічні параметри біотехнології виробництва кефіру. Наведено технологічну та машинно-апаратну схему виробництва класичного кефіру резервуарним способом. Описано основні технічні вимоги щодо оцінки якості кефіру за органолептичними, фізико-хімічними та мікробіологічними показниками.

2. Досліджено антибіотикочутливість симбіотичної закваски «Vivo кефір», а саме лакто- та бфідобактерій, що входять до її складу, до ряду досліджених антибіотиків (бензилпеніцилін, лінкоміцин, азитроміцин, гентаміцину сульфат, цефтріаксон, норфлораксацин, ніфуроксазид, амоксил) диско-дифузним методом дослідження та методом серійних розведень.

3. Встановлено критичні концентрації антибіотиків щодо інактивації заквасочної культури. При розведенні антибіотика концентрацією 500 мг/мл лакто- та бфідобактерії є більш чутливими до дії антибіотиків, ніж при 250 мг/мл.

4. Доведено функціональну роль кефіру у профілактиці дисбактеріозу, що викликано вживанням антибіотиків на основі виготовленого домашнього кефіру, із симбіотичної закваски «Vivo кефір». Даний кефір відповідає вимогам ДСТУ 4417:2005 «Кефір. Технічні умови» за органолептичними, фізико-хімічними та мікробіологічними показниками, у порівнянні з комерційними продуктами кисломолочної продукції.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Артюхова С.И. Значение исследований природной устойчивости молочнокислых бактерий и бифидобактерий к антибиотикам при разработке новых видов биопродуктов / Артюхова С.И., Поночевная Г.С., Свешникова А.А. // Международный журнал экспериментального образования. – 2014. – №8–1. – С. 96–97.
2. Шевелева С.А. Влияние штаммов лактобактерий, используемых при производстве кисломолочных продуктов, на возбудителей пищевых токсикоинфекций / Шевелева С. А., Кузнецова Г. Г., Черкашин А. В. // Вопросы питания. – 2011. – № 3. – С. 37–40.
3. Про соціально-економічне становище України за січень-лютий 2019 : доповідь / Державна служба статистики України; За редакцією І.Є. Вернера. [О.А. Вишневська (відп. за вип.)]. – Київ : 2019. – 73 с. – Режим доступу до ресурсу: http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2019/dop/04/dop_022019.pdf
4. Характеристика кефира как ценного пробиотического продукта и его биологических свойств / Т.С. Колмакова [и др.] // Медицинский вестник Юга России. – 2014. – №3. – С. 35–42.
5. Мидуница Ю.С. Усовершенствование технологии производства кефира // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11 (часть 5). – С. 885–889.
6. Товароведение и экспертиза потребительских товаров / В. В. Шевченко, С. М. Малютенкова [и др.]; – М.: Инфра, – 2009. – 752 с.
7. Использование молочнокислых бактерий в биотехнологических процессах / Е.В. Светлакова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3.; Режим доступу: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=18140> (дата звернення: 03.06.2021).
8. Шульга Н. М. Кефир: современный взгляд на микрофлору и технологию / Н. М. Шульга // Продукты и ингредиенты. – 2011. – № 3 (78). – С. 52–54.

9. Urdaneta E. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats / E. Urdaneta, J. Barrenetxe, P. Aranguren, [et.al.] // Nutrition Research. – 2007. – V27, № 10. – P. 653–658.

10. Otes S. Kefir: Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects / S. Otes, O. Cagindi // Pakistan Journal of Nutrition. – 2003. – V2, № 2. – P. 54–59.

11. Farnworth E.R. Kefir – a complex probiotic / E.R. Farnworth // Food Science and Technology Bulletin. Functional Foods. – 2006. – V2. – P. 1–17.

12. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract / K.L. Rodrigues, L.R.G. Caputo, J.C.T. Carvalho, [et.al.] // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2005. – V25(5). – P. 404–408.

13. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model / M.-Y. Lee, K.-S. Ahn, O.-K. Kwon, [et.al.] // Immunobiology. – 2007. – V. 212, Issue 8. – P. 647–654.

14. Всеукраїнський науково-виробничий журнал: стан світового ринку молока і молочної продукції / І.Г. Власенко // електронне наукове видання "Інноваційна економіка". – 2013. – №39. – Режим доступу: <http://archive.nbu.gov.ua/portal/soc>.

15. Биотехнология кефира с новыми свойствами / А.Н. Пономарев [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2014. – Вып. 1(59). – С. 189–192.

16. Шавыркина Н.А. Получение кисломолочного напитка на основе ацидофильно-дрожжевой закваски / Шавыркина Н.А., Обрезкова М.В., Малиновская М.Г. // Ползуновский вестник. – 2017. – № 4. – С. 42–46.

17. Антипенко А. В. Разработка технологии производства кисломолочного напитка / А. В. Антипенко. // Наука и современность. – 2014. – №30. – С. 1–5.

18. Ребезов М. Б. Обзор патентных источников кисломолочной продукции / Ребезов М. Б., Нурымхан Г. Н., Канарейкина С. Г. // Молодой ученый. – 2015. – № 13(93). – С. 182–185.

19. Пат. 2510999 РФ, МПК А23С 9/127. Способ производства кефира / А. Н. Пономарев, А. А. Мерзликина; Открытое акционерное общество "Молочный

комбинат "Воронежский" (ОАО "МКВ"). – № 2013101836/10; заявл. 16.01.2013; опублик. 10.04.2014, Бюл. № 10. – 6 с.

20. Пат. 2482689 РФ, МПК А23С 9/127. Способ производства кефира с функциональными свойствами / И. С. Полянская, О. И. Топал; ФГБОУ ВПО ВГМХА имени Н.В. Верещагина". – № 2011149047/10; заявл. 01.12.2011; опублик. 27.05.2013, Бюл. № 15. – 12 с.

21. Пат. 2155488 РФ, МПК⁷А23С 9/127, 9/12. Способ получения кефира с целебной добавкой / В.И. Лебедьков, Т.П. Рычкова, М.С. Чанышева, С.А. Евгенова; Акционерное общество открытого типа «Уфамолагропром». – № 98118585/13; заявл. 12.10.1998; опублик. 10.09.2000. – 5 с.

22. Пат. 2453125 РФ, МПК А23С 9/127. Способ получения кефира / И. В. Рожкова, В. Ф. Семенихина, В. Д. Харитонов; ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии. – № 2010150280/10; заявл. 09.12.2010; опублик. 20.06.2012, Бюл. № 17. – 6 с.

23. Пат. 2477313 РФ, МПК: С12N 1/20, А23С 9/127, А61К 35/74, А23L 1/29, С12R 1/01. Штамм *Enterococcus hirae*, используемый при производстве кисломолочных продуктов / Б. Г. Цугкиев, И. И. Козырева, Э. В. Рамонова; ФГБОУ ВПО "Горский государственный аграрный университет". – № 2011135537/10; заявл. 25.08.2011; опублик. 10.03.2013, Бюл. № 7. – 6 с.

24. Пат. 2529360 РФ, МПК А23С 9/127. Способ получения кефира / И. Ю. Потороко, Н. В. Попова, В. В. Ботвинникова, О. Н. Красуля; ФГБОУ ВПО "ЮУрГУ" (НИУ). – № 2013123708/10; заявл. 23.05.2013; опублик. 27.09.2014, Бюл. № 27. – 6 с.

25. Пат. 2477312 РФ, МПК: С12N 1/20, А23С 9/123, А61К 35/74, А23L 1/29, С12R 1/225. Штамм *Lactobacillus gallinarum*, используемый для приготовления кисломолочных продуктов / Б. Г. Цугкиев, И. И. Козырева, Э. В. Рамонова; ФГБОУ ВПО "Горский государственный аграрный университет". – № 2011137768/10; заявл. 13.09.2011; опублик. 10.03.2013, Бюл. № 7. – 5 с.

26. Пат. 2437092 РФ, МПК G01N 33/04. Способ количественного анализа полисахарида, производимого молочнокислыми бактериями / Р. Р. Еникеев, Д. Н. Бобошко, Е. Ю. Руденко, А. В. Зимичев; Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования СамГТУ. – № 2010111119/15;

заявл. 23.03.2010; опублік. 20.12.2011, Бюл. № 35. – 1 с.

27. Пат. 2105485 РФ, МПК⁶ А23С 9/127. Способ производства кефира для детского и диетического питания / А. С. Орлов, Г. А. Тимакова; Акционерное общество открытого типа «Завод детских молочных продуктов». – № 94032016/13; заявл. 08.09.1994; опублік. 27.02.1998, Бюл. № 35. – 8 с.

28. Пат. 2460307 РФ, МПК: А23С 9/127, А23С 9/12. Способ ускоренного производства кефира / Т. В. Кириева, В.В. Бронникова, М. К. Снурнищина;. – № 2010116681/10; заявл. 28.04.2010; опублік. 10.09.2012, Бюл. № 25. – 3 с.

29. Типы брожения. Качественные реакции спиртового, молочнокислого, маслянокислого брожения: методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения / сост. А.П. Асташкина; – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, – 2015. – 18 с.

30. Манилова В. О. Молочнокислое брожение и его возбудители / В. О. Манилова, Н. В. Телятникова. // Молодежь и наука. – 2017. – №6. – 75 с.

31. Лабораторный практикум по микробиологии: пособие / Е. Р. Грицкевич [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – 35 с.

32. Гащишин В.Р. Прокопів Т.М. Способи отримання енергії мікроорганізмами: Лекція 5 з навчальної дисципліни «Мікробіологія» для студентів І курсу спеціальності 241 «Готельно-ресторанна справа» / Гащишин В.Р. Прокопів Т.М; Львівський державний університет фізичної культури. Кафедра біохімії та гігієни. – 23 с. – : режим доступу: <http://repository.ldufk.edu.ua/bitstream/34606048/21887/1/%D0%9B%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F%205.pdf> (дата звернення 18.05.2021 р).

33. Гетероферментативное молочнокислое брожение [Электронный ресурс] // Биология и медицина – Режим доступу до ресурсу: <http://medbiol.ru/medbiol/microbiol/000e9533.htm>.

34. Про всякие биотики. Что лучше, про-, пре- или метабиотики? [Электронный ресурс] // Женский Мир. – 2021. – Режим доступу до ресурсу:

<https://love-smart.ru/raznoe/biotiki-eto.html>.

35. Карапетян К. Дж. Сравнительная оценка ряда свойств новых штаммов молочнокислых бактерий / К. Дж. Карапетян // Биологический журнал Армении. – 2009. – №4(61). – С. 36–42.

36. Демченко Н.Т., Поважный С.Ф., Цыбровский Г.Г. Системы технологий: Учеб. пособие. – 2-е изд.; перераб. и доп. – Донецк: ДонГУУ, 2003. – 234 с.

37. Крусъ Г.Н. Технология молока и молочных продуктов / Г.Н. Крусъ, А.Г. Храмцов и др.; Под ред. А.М. Шалыгиной. – М.: Колос, 2006. – 455 с.

38. Технологическая схема производства кефира [Электронный ресурс] // Studwood.ru. – 2017. – Режим доступа до ресурсу: https://studwood.ru/1003487/tovarovedenie/tehnologicheskaya_shema_proizvodstva_kefir_a.

39. ДСТУ 4417:2005. Національний стандарт України. Кефір. Технічні умови. – Чинний від 2006–07–01. – 8 с.

40. Технологическая линия производства кисломолочных напитков [Электронный ресурс] // Пищевая Промышленность. Информационный портал. – 2016. – Режим доступа до ресурсу: <https://food-mechanics.ru/?p=280>.

41. Петенко А. И. Семинар 1. Биотехнология антибиотиков [Электронный ресурс] / А. И. Петенко, С. А. Волкова // Методические указания к семинарским занятиям по дисциплине "Основные направления биотехнологии сельскохозяйственной продукции" По направлениям подготовки 06.06.01–биологические науки – Режим доступа до ресурсу: <https://kubsau.ru/upload/iblock/913/913e690bda6e68c13be31880c7679b18.pdf>.

42. Алехин Е. К. Как действуют антибиотики / Е. К. Алехин. // Соросовский Образовательный журнал. – 2000. №4 – С. 19–23.

43. Пандемія COVID-19 в Україні [Электронный ресурс] // Українська правда. – 2021. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.pravda.com.ua/cdn/covid-19/cpa/>.

44. Антибактериальные препараты: классы, принципы действия и устойчивость. [Электронный ресурс] // Central Laboratory diagnosis of the head. – 2019. – Режим доступа до ресурсу: <https://tomograf.ua/antibakterialnye-preparaty->

klassy-principy-dejstviya-i-ustojchivost/.

45. Антибиотики. Механизм действия [Электронный ресурс] // Универсальная научно-популярная энциклопедия Кругосвет – Режим доступа до ресурсу: https://www.krugosvet.ru/enc/nauka_i_tehnika/biologiya/ANTIBIOTIKI.html.

46. Типи клітин [Электронный ресурс] // Storinka.click – Режим доступа до ресурсу: <https://storinka.click/17-tipi-kltin.html>.

47. Китаевская С. В. Резистентность пробиотических штаммов молочнокислых бактерий к антибиотикам / С. В. Китаевская. // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – №21(том 15). – С. 108–110.

48. Азитромицин [Электронный ресурс] // Википедия Свободная Энциклопедия – Режим доступа до ресурсу: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%B7%D0%B8%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%BD>.

49. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу Гентаміцину сульфат-Дарниця (Gentamicin sulfat-Darnitsa) [Электронный ресурс] // Ліки Контроль – Режим доступа до ресурсу: [http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[23303\]](http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[23303]).

50. Цефтриаксон [Электронный ресурс] // Википедия Свободная Энциклопедия – Режим доступа до ресурсу: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A6%D0%B5%D1%84%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%B0%D0%BA%D1%81%D0%BE%D0%BD>.

51. Нифуроксазид (Nifuroxazide) [Электронный ресурс] // Компендиум Лекарственные препараты Справочник ЛС №1 в Украине. – 1999. – Режим доступа до ресурсу: <https://compendium.com.ua/info/168129/>.

52. Норфлоксацин (Norfloxacin) [Электронный ресурс] // Vidal Справочник Лекарственных Средств – Режим доступа до ресурсу: https://www.vidal.ru/drugs/norfloxacin_43314.

53. Амоксициллин [Электронный ресурс] // Википедия Свободная Энциклопедия – Режим доступа до ресурсу: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BC%D0%BE%D0%BA>

[%D1%81%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%BB%D0%BB%D0%B8%D0%BD#%D0%A4%D0%B0%D1%80%D0%BC%D0%B0%D0%BA%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F.](#)

54. Ганина В.И. Пробиотики. Назначение, свойства и основы биотехнологии / В.И. Ганина. – М.: МГУПБ, 2001. – 169 с.

55. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т.3: Пробиотики и функциональное питание / Б.А. Шендеров. – Москва: Грантъ, – 2001. – 287 с.

56. Charteris W.P. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli / W.P. Charteris, [et. al] // J. Food Prot. – 2001. – V64. – P. 2007–2014.

57. Shah N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods / N. P. Shah // J. Dairy Sci. – 2000. – V83 – P. 894–907.

58. Савицкая И.С. Антибиотикорезистентность лактобацилл – пробиотиков / И. С.Савицкая, [и др.] // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2017. – Вып. 56, №4. – С. 222–227.

59. Багдасарян А.С. Антибиотикоустойчивость пробиотических культур, входящих в состав синбиотиков / А. С.Багдасарян, [и др.] // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2011. – №2–3. – С. 102–104.

60. Плотникова Д.Т. Изучение антибиотикоустойчивости бактерий родов *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* / Плотникова Д. Т., Сидоренко А. В., Новик Г. И. // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – 2016. – №3. – С. 94 –100.

61. Шевелева С.А. Влияние штаммов лактобактерий, используемых при производстве кисломолочных продуктов, на возбудителей пищевых токсикоинфекций / Шевелева С.А., Кузнецова Г.Г., Черкашин А.В. // Вопросы питания. – 2011. – № 3. – С. 37–40.

62. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса, пер. с англ. в 2 т. – М.: Мир, 1997. – 756 с.

63. Колмакова Т. С. Характеристика кефира как ценного пробиотического продукта и его биологических свойств / Т. С. Колмакова, [и др.]. // Медицинский

вестник Юга России. – 2014. – №3. – С. 35–42.

64. Hong Y.S. Metabonomic understanding of probiotic effects in humans with irritable bowel syndrome / Y.S. Hong, [et. al.] // *J. Clin Gastroenterol.* – 2011. Vol45, No5. – P. 415–425.

65. Товароведение и экспертиза потребительских товаров / [Шевченко В.В., Малютенкова С.М., Вытовтов А.А. и др.]. // М.: Инфра-М., – 2009. – 328 с.

66. Градова Н.Б. Исследование микробного профиля структурированной ассоциативной культуры микроорганизмов – кефирных грибков / Н.Б. Градова, А.А. Саранцева // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* – 2012. – Т.14, №5. – С. 705–710.

67. Шульга Н. М. Кефир: современный взгляд на микрофлору и технологию / Н. М. Шульга // *Продукты и ингредиенты.* – 2011. – № 3 (78). – С. 52–54.

68. Abraham A.G. Characterization of kefir grains in cows' milk and soya milk / A.G. Abraham, G.L. de Antoni // *Journal of Dairy Research.* – 1999. – V66. – P. 32–333.

69. Garrote G.L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains / Garrote G.L., Abrham A.G., de Antoni G.L. // *Journal of Dairy Research.* – 2001. – V. 68. – P. 639–652.

70. Otes S. Kefir: Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects / S. Otes, O. Cagindi // *Pakistan Journal of Nutrition.* – 2003. – V2, № 2. – P. 54–59.

71. Фильчакова С.А. Влияние режимов культивирования кефирной закваски на видовой состав микрофлоры / С.А. Фильчакова // *Сб. науч. тр. Научное обеспечение молочной промышленности (ВНИМИ-75 лет):* М, 2004. – С. 316–323.

72. Волкова Е. Д. Исследовательский проект по биологии. Изучение полезных свойств тибетского молочного гриба [Электронный ресурс] / Е. Д. Волкова // *Docplayer.* – 2017. – Режим доступа до ресурсу: <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/19678/1/kefir.pdf>.

73. Чистая культура здоровый тибетский молочный (кефирный) гриб [Электронный ресурс] // *Spanishfoods.com.ua* – Режим доступа до ресурсу: <https://spanishfoods.com.ua/shop/product/chistaia-kultura-zdorovyi-tibetskii-molochnyi->

[kefirnyi-grib/](#).

74. Карпеня М.М. Молочное дело: учебное пособие. / М.М. Карпеня // – Минск: Изд-во ИВЦ Минфина, 2011. – 254 с.

75. Лаптев С.В. Химия, микробиология и экспертиза молока и молочных продуктов / С.В. Лаптев, Н.И. Мезенцева, Е.П. Каменская // – Бийск: БТИ АлтГТУ, 2009. – 237 с.

76. Красникова Л.В. Микробиология молока и молочных продуктов: Лабораторный практикум: Учеб.-метод. пособие / Л.В. Красникова, П.И. Гунькова, В.В. Маркелова // – СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 85 с.

77. Mullan W. Starter cultures | Importance of Selected Genera / W.M.A. Mullan., 2014. – 515 p. – (Reference Module in Food Science). Режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/streptococcus-thermophilus>.

78. Пат. 91441 Україна, МПК: А23С 9/12, С12N 1/20. Штам бактерій *Streptococcus thermophilus*, що використовується у виробництві бактеріальних концентратів для кисломолочних продуктів функціональної дії / Н. Ф. Кігель, О.В. Науменко; Технологічний інститут молока та м'яса УААН. – № а200815252; заявл. 30.12.2008; опублік. 26.07.2010, Бюл. № 14. – с. 3–4.

79. *Bifidobacterium bifidum* - систематика и морфология [Електронний ресурс] // Біо-Х Биотехнологический портал. – 2012. – Режим доступа до ресурсу: <https://bio-x.ru/articles/bifidobacterium-bifidum-sistematika-i-morfologiya>.

80. *L. acidophilus* около клеток вагинального эпителия [Електронний ресурс] // Википедия Свободная Энциклопедия – Режим доступа до ресурсу: https://ru.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_acidophilus#/media/%D0%A4%D0%B0%D0%B9%D0%BB:Lactobacillus_sp_01.png

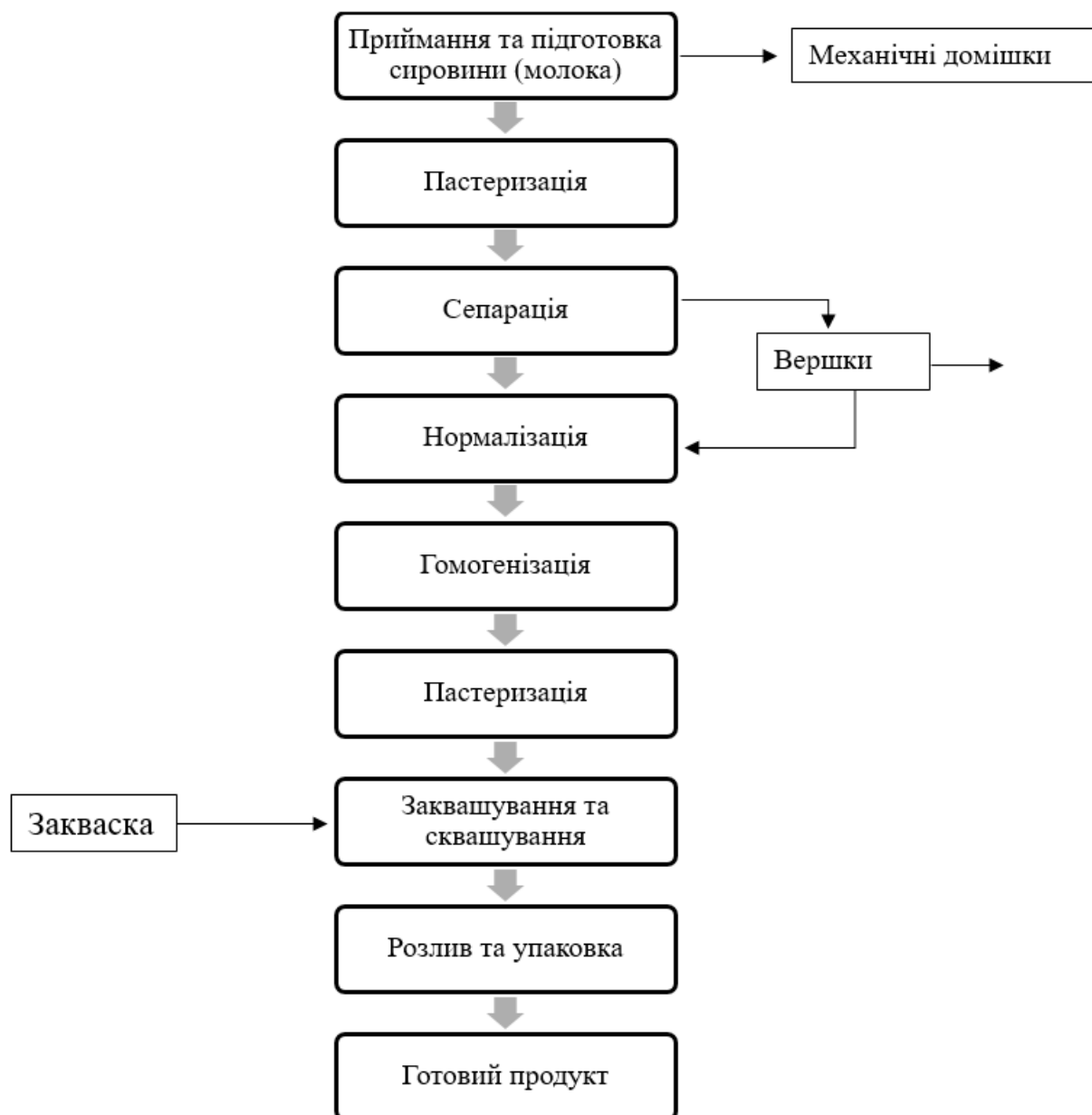
81. Иркитова А. Н. Эколого-биологическая оценка штаммов *Lactobacillus acidophilus*, используемых в производстве пробиотических продуктов : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.02.03 – микр "ВАК РФ" / Иркитова А. Н. // – Пермь, 2012. – 144 с.

82. Захарова Ю. В. Современные представления о таксономии, морфологических и функциональных свойствах бифидобактерий / Ю. В. Захарова,

- Л. А. Леванова // *Fundamental and clinical medicine*. – 2018. – Vol 3, №1. – С. 90–101.
83. Bifidobacterium (бифидобактерии, род бактерий) [Электронный ресурс] // ГастроСкан – Режим доступа до ресурсу: <https://www.gastroscan.ru/handbook/118/1822>.
84. ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титрометрические методы определения кислотности. – Введ. 08.07.1992. – М.: Госстандарт СССР, 1992. – 8 с.
85. ГОСТ 26781. Молоко. Метод определения pH. – Введ. 03.01.1992. – М.: Госстандарт СССР, 1992. – 5 с.
86. Физико-химические свойства молока коровьего [Электронный ресурс] // ООО Мед–пром ресурс Лабораторное Оборудование. – 2017. – Режим доступа до ресурсу: <https://mpr-lab.com/a289389-fiziko-himicheskie-svojstva.html>.
87. Что такое ОВП? [Электронный ресурс] // Naqwa — Drinking water recoverers – Режим доступа до ресурсу: <http://www.naqwa.com/rus/about/articles/ponimanie-ph-i-ovp/>.
88. Окислительно-восстановительный потенциал воды (Редокс-потенциал воды) [Электронный ресурс] // Multifilters – Режим доступа до ресурсу: <http://multifilters.ru/articles/redox-potential-water>.
89. Дослідження споживних властивостей кефіру [Электронный ресурс] // Refleader – Режим доступа до ресурсу: <http://refleader.ru/jgejgeujgatyotr.html>.
90. ДСТУ 4417:2005. Кефір. Технічні умови. – Чинний 2006–07–01. – К.: Держспоживстандарт України, 2006. – 10 с.
91. Технічний регламент «Вимоги щодо виробництва молока та молочних продуктів»: затверджено постановою Кабінету Міністрів України. – К., 2010. – 127 с.
92. ГОСТ 10444.11-89. Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. – Введ. 01.01.1991. М.: Госстандарт, 1989. – 14 с.
93. ГОСТ 10444.12-88. Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов. – Введ. 01.01.1990. М.: Стандартиформ, 2010. – 7 с.
94. ГОСТ 33566-2015. Молоко и молочная продукция. Определение дрожжей и плесневых грибов. Введ. 01.07.2016. М.: Стандартиформ, 2016. – 16 с.

95. Лысак, В. В. Микробиология. Практикум: пособие / Лысак В. В., Желдакова Р. А., Фомина О. В. // – Минск: БГУ, 2015. – 115 с.
96. Решедько Г. К. Определение чувствительности к антибиотикам: методы, результаты, оценка [Электронный ресурс] / Г. К. Решедько // НИИАХ СГМА – Режим доступа до ресурсу: <http://microbiology.ru/rus/all/articles/absens.shtml>.
97. DEN-1 Денситометр [Электронный ресурс] // Biosan Medical-Diological Research&Technologies – Режим доступа до ресурсу: <https://biosan.lv/ru/products/den-1/>.
98. Методичні вказівки до лабораторних занять з курсу "Сенсорний аналіз" / Уклад. О. В. Бочарова // – Одеса: ОНАХТ, 2007. – 29 с.
99. Пат. 2541778 РФ, МПК: С12N 1/20, А61К 35/74. Способ получения бактериального концентрата и его применение в качестве пробиотической биологически активной добавки к пище / И. С. Хамагаева, Л. В. Буянтуева, Н.А. Замбалова; ФГБОУ ВПО ВСГУТУ. – № 2013129139/10; заявл. 25.06.2013; опублік. 20.02.2015, Бюл. № 5. – 10 с.
100. Титов Е.И. Стартовые культуры, снижающие содержание холестерина в мясных продуктах / Е.И. Титов, [и др.] // Мясная индустрия. – 2012. – № 2, февр. – 2225 с.

Принципова технологічна схема виробництва кефіру резервуарним способом



Додаток Б

Апаратурна схема виробництва кефіру резервуарним способом

