

МІНІСТЕРСТВО 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: «Вплив осмотичного тиску на ріст молочнокислих бактерій при їх
використанні у біотехнологіях»**

Виконавець: студентка ФБ 402

Шевчук А.О.

Керівник: к.с.-г.н., доцент кафедри біотехнології

Ястремська Л.С.

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

Шевчук Анастасії Олександрівни

1. Тема дипломної роботи: «Вплив осмотичного тиску на ріст молочнокислих бактерій при їх використанні у біотехнологіях» 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 кафедрі біотехнології ФЕБІТ НАУ, літературні джерела.
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ОСМОТИЧНОГО ТИСКУ НА РІСТ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ПРИ ЇХ ВИКОРИСТАННІ У БІОТЕХНОЛОГІЯХ; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 11 таблиць і 18 рисунків.

6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Вибір теми дипломної роботи, узгодження змісту з дипломним керівником.	10.05.2021	
2	Збір інформації за темою дипломної роботи: «Вплив осмотичного тиску на ріст молочнокислих бактерій при їх використанні у біотехнологіях».	10.05.2021-15.05.2021	
3	Ознайомлення з методикою постановки експерименту на кафедрі біотехнології ФЕБІТ НАУ.	17.05.2021	
4	Проведення експерименту на кафедрі біотехнології ФЕБІТ НАУ.	17.05.2021-21.05.2021	
5	Аналіз та обробка отриманих даних.	21.05.2021	
6	Оформлення практичної частини дипломної роботи на основі отриманих результатів.	24.05.2021-26.05.2021	
7	Формулювання висновків та рекомендацій.	27.05.2021-28.05.2021	
8	Перевірка дипломної роботи керівником.	31.05.2021	
9	Попередній захист дипломної роботи.	1.06.2021	
10	Захист дипломної роботи.	16.06.2021	

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

Керівник дипломної роботи _____ Ястремська Л. С

Завдання прийняв до виконання _____ Шевчук А.О.

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Вплив осмотичного тиску на ріст молочнокислих бактерій при їх використанні у біотехнологіях»: 69 сторінок, 18 рисунків, 11 таблиць, 40 використаних джерел.

Мета дипломної роботи — вивчення впливу осмотичного тиску на ріст молочнокислих бактерій при їх використанні у біотехнологіях.

Об'єкт дослідження — процес впливу осмотичного тиску на життєздатність молочнокислих мікроорганізмів.

Предмет дослідження — молочнокислі мікроорганізми.

Методи дослідження — мікробіологічні, фізико-хімічні, статистичні, аналітичні та математичні.

Досліджено вплив осмотичного тиску на молочнокислі бактерії зразків кисломолочного продукту типу «Айран». Виявлено, що зі збільшенням концентрації солі, яка перевищує 4% відбувається руйнування цілісності клітинної стінки, що призводить до загибелі культур. Оптимальною концентрацією, яка за мікробіологічними, фізико-хімічними показниками є 2%. Запропоновано удосконалену схему виробництва кисломолочного продукту типу «Айран» на стадії заквашування та фільтрування.

МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ, СІЛЬ, ОСМАТИЧНИЙ ТИСК, ОСМАТИЧНИЙ СТРЕС, КИСЛОМОЛОЧНИЙ ПРОДУКТ.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	11
1.1. Активність води розчинах кухонної солі.....	11
1.2. Наукові положення щодо впливу осмотичного тиску на молочнокислі мікроорганізми.....	13
1.3. Схема виробництва кисломолочного продукту типу «Айран».....	16
1.4. Загальна характеристика молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO».....	21
1.5. Висновки до розділу.....	28
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	29
2.1. Мікробіологічні методи дослідження при культивуванні молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO».....	29
2.1.1. Визначення кількості клітин закваски «Імуно VIVO» методом десятикратних розведень.....	31
2.1.2. Визначення кількості осмочутливих культур молочнокислих мікроорганізмів	33
2.1.3. Мікроскопічні методи дослідження клітин молочнокислих мікроорганізмів.....	34
2.2. Фізико-хімічні методи дослідження молочнокислих мікроорганізмів.....	35
2.2.1. Методика визначення титрованої кислотності кисломолочного продукту.....	35
2.2.2. Методика визначення рН та окисно-відновного потенціалу кисломолочного продукту типу «Айран».....	35
2.3. Органолептичний метод дослідження кисломолочного продукту.....	38
2.4. Висновки до розділу.....	39
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ОСМОТИЧНОГО ТИСКУ НА РІСТ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ПРИ ЇХ ВИКОРИСТАННІ У БІОТЕХНОЛОГІЯХ.....	40

3.1. Визначення кількості клітин закваски «Імуно VIVO».....	40
3.1.1 Підрахунок кількості клітин закваски «Імуно VIVO» методом десятикратних розведень.....	40
3.1.2. Морфолого-культуральні особливості молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO».....	42
3.1.3. Визначення осмочутливості культур молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO»	44
3.2. Порівняльна характеристика якості кисломолочних продуктів типу «Айран».....	48
3.2.1. Порівняння якості кисломолочних продуктів за титрованою кислотністю.....	49
3.2.2. . Порівняння якості кисломолочних продуктів за показниками рН та окисно-відновного потенціалу.....	50
3.3. Порівняння якості кисломолочних продуктів за органолептичними показниками.....	57
3.4. Удосконалена схема виробництва кисломолочного продукту типу «Айран».....	61
3.5. Висновки до розділу.....	63
ВИСНОВКИ.....	65
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	66

ВСТУП

Актуальність теми. Проблемою сьогодення є якісні молочнокислі продукти. Для їх приготування використовують молочнокислі мікроорганізми різних систематичних груп. У склад молочнокислих продуктів можуть входити крім мікроорганізмів згущувачі, стабілізатори, консерванти тощо.

Консерванти – це хімічні речовини, які використовуються для гальмування або запобігання небажаних змін харчових продуктів, вони збільшують термін зберігання готових продуктів і сировини, запобігають їй псуванню в процесі технологічної переробки.

У промислових процесах, під час зараження людини і в природі МКБ часто піддаються впливу несприятливих умов навколишнього середовища. Серед проблем, пов'язаних з постійно мінливим навколишнім середовищем, осмотичний стрес є помітним обмеженням, яке може привести до зниження швидкості росту або виживання і вплинути на метаболічну активність.

До найбільш поширеного хімічного консерванту, який використовуються в харчовій промисловості, відноситься кухонна сіль. Наприклад, при виробництві відомого кисломолочного продукту типу «Айран» використовуються заквасочні мікроорганізми – термофільні молочнокислі стрептококи, болгарська молочна паличка та інші, з подальшим додаванням солі.

Сіль є консервантом завдяки своїм незвичайним властивостям. Потрапляючи в їжу, сіль починає витягувати з мікроорганізмів рідину, в тому числі і з шкідливих мікроорганізмів, які є в їжі. Через мембрану рідина витягується в бік більш насиченого сольового розчину. Від зневоднення бактерія стає неактивною.

У промислових умовах осмотичне обмеження є одним з основних стресів, з якими стикається лабораторія під час виробництва і дозрівання сиру, ферментації м'яса і процесу приготування багатьох кисломолочних продуктів, м'ясної

консервації і багато чого іншого. Сіль, осмотично-активний агент, який може досягати більш високих концентрацій.

Стартові культури сьогодні все частіше використовуються в концентрованих формах для прямої інокуляції в харчову матрицю. Формулювання та збереження цих культур накладають певні обмеження, включаючи осмотичний дисбаланс, що виникає під час заморожування і зневоднення. Як наслідок, необхідність підвищення життєздатності і стабільності лабораторії в заморожених, сублімованих і висушених на повітрі формах призвела до значних досліджень як в молочній, так і в харчовій промисловості в останні роки.

Штами, які належать до певних видів *Lactobacillus* широко використовуються в йогуртах, харчових добавках та інших продуктах, пов'язаних зі здоров'ям. Пробіотики також включають штами роду *Bifidobacterium*. Але ці чутливі бактерії стикаються з величезними труднощами, щоб бути в дуже життєздатному стані не тільки під час обробки і зберігання, але і під час шлунково—кишкового транзиту до місця дії в кишечнику людини.

Щоб вижити і розмножитися в шлунково—кишковому тракті, пробіотики повинні переносити кілька перешкод навколишнього середовища, включаючи підвищену осмолярність у верхніх відділах тонкого кишечника. Осмотичний стрес також проявляється при зараженні людини патогенними мікроорганізмами і провокується виділенням поту при шкірних інфекціях.

Тому розробка адаптивних стратегій для боротьби з осмотичним стресом має важливе значення для лабораторії, щоб представити свої функціональні характеристики при ферментації харчових продуктів або мати справу з системами захисту людини.

Вивчення осморегуляції – адаптації клітин до змін зовнішнього осмотичного тиску є актуальним та важливим у біотехнології.

Мета роботи: вивчення впливу осмотичного тиску на ріст молочнокислих бактерій при їх використанні у біотехнологіях.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **завдання:**

1. Проаналізувати сучасні уявлення впливу осмотичного тиску на молочнокислі мікроорганізми, дослідити технологію виробництва кисломолочного продукту типу «Айран» та охарактеризувати молочнокислі бактерії, які використовують для його виробництва.

2. Охарактеризувати морфолого-культуральні особливості молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO» та визначити їх життєздатність.

3. Дослідити осмочутливість молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO».

4. Порівняти якість кисломолочних зразків типу «Айран» промислового виробництва та лабораторного приготування за мікробіологічними, фізико-хімічними, органолептичними показниками.

5. Запропонувати удосконалену технологію виробництва кисломолочного продукту типу «Айран».

Об'єкт дослідження — процес впливу осмотичного тиску на життєздатність молочнокислих мікроорганізмів.

Предмет дослідження — молочнокислі мікроорганізми, під дією осмотичного тиску.

Методи дослідження — мікробіологічні, фізико-хімічні, статистичні, аналітичні та математичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Досліджено вплив осмотичного тиску на молочнокислі мікроорганізми у зразках продукту типу «Айран». Виявлено, що оптимальною концентрацією NaCl є 0,5%, яка не руйнує клітини і не призводить до зменшення життєздатних клітин, при цьому не погіршуються і органолептичні, і мікробіологічні, і фізико-хімічні показники.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновано удосконалену схему виробництва кисломолочного продукту типу «Айран» на стадії сквашування та фільтрування.. Для збільшення терміну зберігання готових кисломолочних продуктів, та запобіганню псуванню сировини в процесі технологічної переробки. Матеріали дипломної роботи можуть бути використані при викладанні дисциплін за

освітньо-професійними програмами «Фармацевтична біотехнологія» та «Екологічна біотехнологія та біоенергетика».

Особистий внесок випускника. Весь обсяг експериментальних досліджень за темою дипломної роботи, аналіз літературних даних, статистична обробка результатів, їх опис, аналіз виконані випускником особисто під керівництвом к.с.-г.н., доцента кафедри біотехнології ФЕБІТ НАУ Ястремської Л.С. та на кафедрі біотехнології ФЕБІТ НАУ у мікробіологічній лабораторії. Особиста подяка Корнієнко І.М. за консультування під час підготовки диплому.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Активність води в розчинах кухонної солі

Незважаючи на велику історію досліджень і відпрацьованість методів, культивування молочнокислих бактерій не завжди протікає в оптимальних умовах. Клітини молочнокислих бактерій, які зазнали несприятливих впливів, знаходяться в стані стресу. Ці впливи визначають як стресорні.

Стресорні фактори — це фактори абіогенного і біогенного походження, здатні впливати на мікробіологічні структури і процеси. У літературі стосовно стресорних факторів, які впливають на живі об'єкти, використовують термін «стресори» [1].

В принципі, будь-яке відхилення від оптимальних умов можна охарактеризувати як стрес. Стосовно культивування молочнокислих мікроорганізмів стрес можна визначити, як фізіологічні зміни, обумовлені модифікацією оточення (фізичні, хімічні, умови харчування), які можуть мати безліч наслідків для молочнокислих мікроорганізмів, таких як затримка росту, зменшення активності і загибель клітин. Причини підвищеної уваги до вивчення стресового впливу на молочнокислі мікроорганізми обумовлені широким практичним використанням молочнокислих мікроорганізмів [2].

В даній науковій роботі розглядається сіль, як осмотичний стресовий агент для молочнокислих мікроорганізмів. Кухонна сіль знижує активність води (табл.1.1), погіршуючи тим самим умови існування молочнокислих мікроорганізмів.

Активність води - це відношення тиску водяної пари над даним матеріалом до тиску парів над чистою водою при одній і тій же температурі. Активність води характеризує стан води в харчових продуктах і її причетність до хімічних і біологічних змін (таким, як гідролитические хімічні реакції і зростання

мікроорганізмів). Це один із критеріїв, за якими можна судити про стійкість харчового продукту при зберіганні.

Дію солі можна порівняти з зневодненням, тому використання солі називають «хімічним висушуванням». Однією тільки сіллю неможливо надійно захистити харчовий продукт від всіх мікробних уражень, навіть перевищивши всі смакові обмеження.

Для консервування харчові продукти поміщають в більш—менш насичений соляний розчин (розсіл) або додають до них суху сіль. При цьому відбувається осмотичне зневоднення продукту і зниження активності води в ньому; ступінь зниження залежить від кількості доданої солі [3].

Таблиця 1.1

Активність води в розчинах кухонної солі

Концентрація солі, г на 100 г води	Активність води	Концентрація солі, г на 100 г води	Активність води
0,88	0,995	22,21	0,86
1,75	0,99	23,55	0,85
3,57	0,98	24,19	0,84
7,01	0,96	27,29	0,82
8,82	0,95	30,10	0,80
10,34	0,94	32,55	0,78
13,50	0,92	35,06	0,76
16,54	0,90	36,06	0,75
19,40	0,88	—	—

Антимікробну дію солі не можна пояснити тільки зниженням активності води. При зниженій активності води деякі молочнокислі мікроорганізми посилено накопичують деякі амінокислоти, внаслідок чого сповільнює їх зростання.

Кухонна сіль знижує розчинність кисню у воді, тому в сильносолених продуктах молочнокислим мікроорганізмам доступно менше кисню, ніж в слабосолених [4].

Велике практичне значення має використання кухонної солі в поєднанні з фізичними способами консервування, перш за все зі зберіганням на холоді і висушуванням. При засолюванні деяких харчових продуктів відбувається їх природне сквашування. В цьому випадку сіль пригнічує частину дикої мікрофлори, що сприяє розвитку молочнокислих мікроорганізмів.

Спектр дії кухонної солі пов'язано головним чином зі зменшенням активності води, спектр її дії визначається чутливістю різних молочнокислих мікроорганізмів до цього фактору [5].

1.2. Наукові положення щодо впливу осмотичного тиску на молочнокислі мікроорганізми

Всі біологічні мембрани являють собою напівпроникні мембрани, так як в силу своєї структури вони пропускають одні речовини (воду, гази), а інші (великі заряджені молекули, наприклад, глюкозу). Насправді, звичайно, в мембрані молочнокислих мікроорганізмів є переносники для глюкози, але вони строго регулюються і не дозволяють речовині проходити в клітину безконтрольно; те ж саме можна сказати про канали для іонів. Вибірковість транспорту речовин через мембрану вважається однією з ознак життя на клітинному рівні. Мертва клітина не контролює надходження і речовин всередину себе і виведення речовин назовні [6].

Вибірковість транспорту через проникну мембрану веде до виникнення в клітині осмотичних явищ. Осмотичними називають явища, що відбуваються в системі, що складається з двох розчинів, розділених напівпроникною мембраною.

Осмсом називають дифузію води через напівпроникну мембрану з розчину з низькою концентрацією розчиненої речовини в розчин з високою концентрацією розчиненої речовини. Явище осмосу може бути продемонстровано на класичному прикладі. Уявімо посудину, розділений на дві частини напівпроникною мембраною,

в одній половині судини знаходиться більш концентрований розчин солі (наприклад, 1M NaCl), в іншій — менш концентрований (0,01 M NaCl). На початку досвіду обсяг розчину в кожній з половин однаковий, а концентрація солі різниться (рис.1.1). Іони Na^+ і Cl^- на які сіль, будучи сильним електролітом, розпадається відразу після потрапляння в розчин, не можуть пройти через мембрану, на відміну від молекул води.

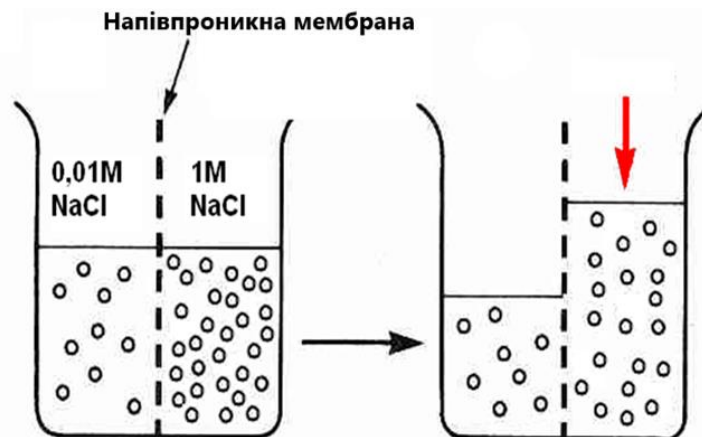


Рис. 1.1. Схема явища осмосу

Невірно думати, що вода з відсіку з більшою концентрацією солі не переходить у відсік з меншою концентрацією. Вода йде через мембрану в обидві сторони, але інтенсивність переходу різна. Відомо, що іони у воді гідратовані — покриті гідратною «шубою». Вода розпадається на іони H^+ і OH^- які електростатично зв'язуються з іонами хлору і натрію, відповідно. Так як в «правій» половині судини концентрація Na^+ і Cl^- більше, відповідно більше води потрібно для гідратування цих іонів. У зв'язку з цим вода інтенсивніше переходить з відсіку з малою концентрацією солі в відсік з великою концентрацією. Оскільки вода буде перетікати з розведеного розчину в концентрований швидше, ніж у зворотному напрямку, в цілому рух води між двома розчинами буде йти в одну сторону. В результаті рівень розчину в першому знижується, а в останньому підвищується; концентрація солі у відсіках вирівнюється. Зміна об'єму рідини і концентрації солі

пов'язано з перерозподілом тільки молекул води, але не солі, так як мембрана непроникна для іонів натрію і хлору [7].

Осмотичний тиск відіграє велику роль у забезпеченні життєздатності молочнокислих мікроорганізмів. Величина осмотичного тиску залежить від концентрації розчинених у воді сполук. При низькій концентрації і слідчо низькому осмотичному тиску — розчин є гіпотонічним розчином. При високій концентрації і високому осмотичному тиску — розчин називають гіпертонічним розчином.

Молочнокислі мікроорганізми можуть піддаватися осмотичному стресу, наприклад, при виробництві кисломолочної продукції і сирів — концентрація солі в деяких сирах досягає 2,8%, в інших продуктах вона може бути ще більше (*Tetragenococcus halophila*, використовувана при виробництві японських соусів, може стикатися з концентрацією солі до 18%). Також пробіотичні культури мікроорганізмів відчувають осмотичний стрес при проходженні по травному тракту людини.

Різде підвищення осмотичного тиску при осмотичному шоці веде до переміщення води з клітини молочнокислих мікроорганізмів назовні, результатом чого є зменшення тургору в клітинах, зміна їх обсягу і внутрішньоклітинної концентрації іонів. Під тургором розуміють явище повного розширення клітини при набуханні під тиском рідин. Через це явище клітини набрякають, поглинаючи воду, притискаючись до клітинних мембран, стягуючи їх [8].

У гіпотонічних розчинах клітина набухає і розривається, в гіпертонічних відбувається дегідратація клітини, результатом чого є зменшення тургору в клітині, зміна її обсягу і внутрішньоклітинної концентрації іонів, також відбувається плазмоліз. Під плазмолізом розуміють відділення протопласта клітини від оболонки під дією на клітину гіпертонічного розчину.

Всі ці явища можуть серйозно вплинути на життєздатність клітини, так як вважається, що саме підтримання постійного тургору є рушійною силою для розвитку і зростання клітини .

Важливу роль в регуляції осмотичних явищ грає клітинна оболонка, яка здатна підтримувати форму клітини і витримувати осмотичний тиск, що досягає 2 МПа в грампозитивних мікроорганізмів. У відповідь на осмотичний стрес молочнокислі мікроорганізми починають накопичувати осмопротектори — в основному це бетаїн, холін, карнітин. Накопичення даних речовин підвищує межу толерантності мікроорганізмів. Так як молочнокислі мікроорганізми не здатні синтезувати багато речовин, вони використовують вищезгадані сполуки з ферментаційного середовища [9].

У *L. plantarum* підвищення осмотостійкості досягається при наявності в середовищі L-карнітину, бетаїну і проліну. Бетаїн володіє найбільшою ефективністю.

Деякі амінокислоти (пролін, глутамінова кислота, іноді аланін) теж грають важливу роль при виникненні осмотичного стресу. Молочнокислі мікроорганізми можуть накопичувати деякі амінокислоти (пролін, глутамінову кислоту, іноді аланін), що зменшують вплив на них осмотичного стресу. Цей ефект спостерігався при додаванні в середовище проліну для росту *L. lactis* і *Pediococcus pentosaceus* і додаванні аспартату в середу зростання *Oenococcus oeni*. При додаванні в середовище ди- і трипептидів спостерігається схожий ефект. Дипептиди, що містять пролін (Pro-Leu і Leu-Pro), мають високу ефективність, навіть вище, ніж вільні амінокислоти. Вони допомагають відновити надспіралізацію ДНК, яка змінюється при знаходженні клітини в гіперосмотичному середовищі [10].

1.3. Схема виробництва кисломолочного продукту типу «Айран»

Тисячоліттями молоко і молочні продукти були постійною їжею людини, але промислове виробництво його машинами і механізмами, з безліччю робітників довго не вторглося в цю сферу — вже дуже делікатними продуктами були молоко і його похідні: вершки, сметана, творіг, сир.

Одним з чудових властивостей молока є його здатність до сквашування. Начебто зіпсований продукт через деякий час раптом набуває абсолютно новий смак і приємний аромат. Заслуженою популярністю користуються у мільйонів людей різних країн світу кисломолочний напій, тобто молоко, сквашене різними видами молочнокислих мікроорганізмів [11].

Включення молочних продуктів в харчовий раціон підвищує його повноцінність і сприяє кращому засвоєнню всіх компонентів.

Консистенція для кисломолочних продуктів — однорідна, в'язка, в міру густа, з порушеним або непорушеним згустком. Смак і запах чисті, кисломолочні, без сторонніх присмаків і запахів. Для «Айрану» – слабосолений смак. Колір молочно-білий або злегка кремуватий [12].

Виробництво кисломолочного напою типу «Айран» здійснюється резервуарним або термостатним способами. З метою скорочення виробничих площ і зниження витрат праці в даний час в основному застосовується резервуарний спосіб (рис. 1.2).

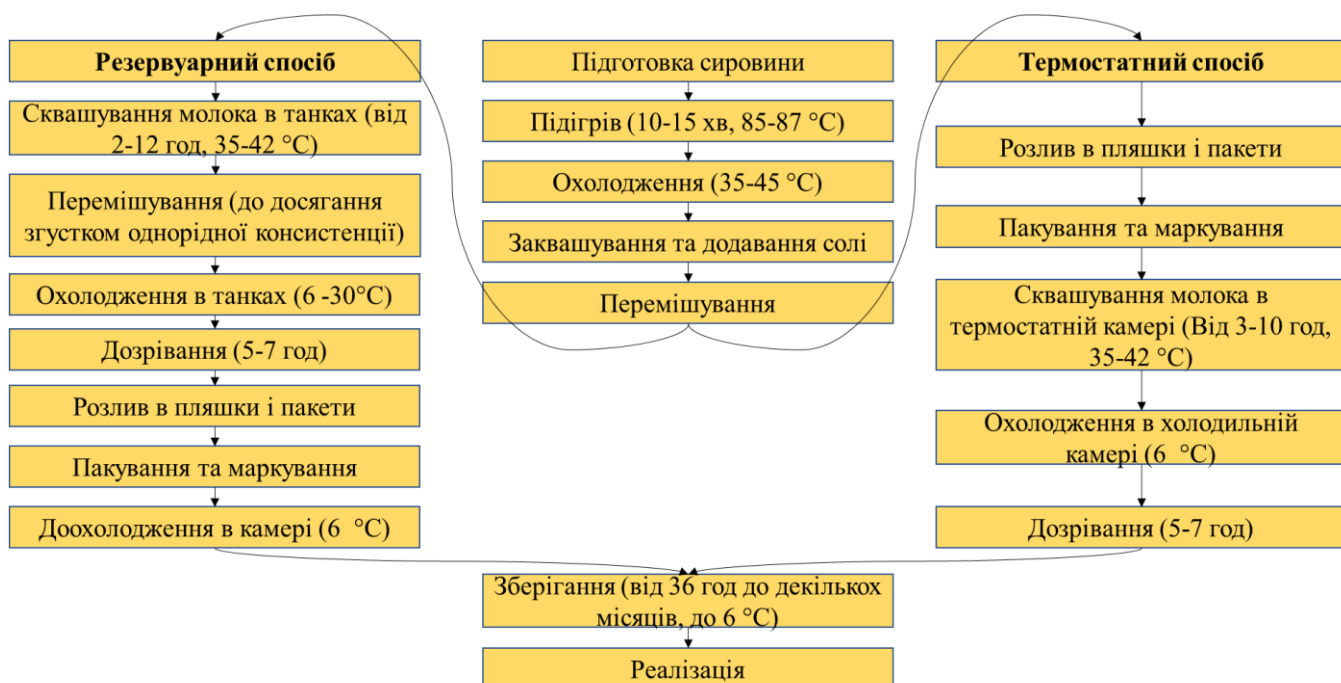


Рис. 1.2. Блок схема виробництва кисломолочного продукту типу «Айран»

Для вироблення кисломолочного напою придатне молоко не нижче 2 сорту з кислотністю не більше 19 °Т, щільність — не менше 1027 кг/м³; молоко знежирене з кислотністю не більше 20 °Т, щільність — не менше 1030 кг/м³, вершки з масовою часткою жиру не більше 30% і кислотністю не менше 16 °Т. Відібране за якістю молоко нормалізують по масовій частці жиру і сухих речовин. Якщо використовується закваска на знежиреному молоці, молоко нормалізують до більш високої жирності.

Режими пастеризації залежать від виду напою: температура 85-87 °С з витримкою 10-15 хв або при (92±2) °С з витримкою 2-8 хв, пастеризована суміш охолоджується до температури заквашування (35-45 °С), характерною для різних видів молочнокислих мікроорганізмів, на яких готують кисломолочний напій і заквашується спеціально підібраними заквасками.

Закваску, приготовлену на пастеризованому молоці, вносять в суміш в кількості 3-5% від обсягу суміші; закваску на стерилізованому молоці — в кількості 1-3%. Після заквашування суміш перемішується протягом 15 хв. Кількість закваски можна зменшити в залежності від її активності. Тривалість сквашування, яка обумовлюється видом продукту і застосовуваної закваски, становить від 2 до 12 годин. Закінчення сквашування визначають за утворенням досить міцного згустку, а також по кислотності, яка становить 190 °Т [14].

Після закінчення сквашування додають сіль, після чого охолоджують крижаною водою протягом 30-60 хвилин, а потім згусток перемішують. Тривалість перемішування залежить від консистенції згустку. Після досягнення згустком однорідної консистенції перемішування припиняють. Подальше перемішування здійснюють періодично з метою охолодження згустку до заданої температури напою.

При необхідності в частково (до 25-30 °С) або повністю (6 °С) охолоджений згусток перемішують і подають на розлив. Перед початком розливу кисломолочного напою знову перемішують протягом 3-5 хвилин. Напої розливають в скляну тару,

паперові пакети або пакети з поліетиленової плівки, пляшки з полімерних матеріалів [15].

Упаковані кисломолочні напої повинні випускатися з підприємства в дротяних або полімерних ящиках, а також в контейнерах або іншій транспортній тарі. Кисломолочні напої транспортують в авторефрижераторах або машинах з ізотермічним кузовом. Тривалість зберігання напоїв становить від 36 год до декількох місяців при температурі напою не більше 6 °С.

При термостатному способі виробництва такі процеси, як сквашування, охолодження і дозрівання, здійснюються в спожитковій тарі (в пляшках, стаканчиках тощо) в термостатних камерах за певних температурних режимів. Слово «термостат» означає камеру з фіксованою температурою, яка необхідна для підтримання життєдіяльності молочнокислої мікрофлори в межах заданного періоду сквашування. Саме в спожитковій тарі утворюється згусток, що містить характерну для продукту мікрофлору. Тривалість сквашування залежить від виду продукції, що виробляється і коливається приблизно від 3 до 10 годин за температури 35-42 °С.

Для виробників термостатний спосіб є більш трудомістким і витратним, бо потребує значних виробничих площ та капіталовкладень (наприклад, на перевезення продукту в термостатну камеру та з неї), спосіб характеризується меншою продуктивністю праці. При термостатному способі виробництва готовий кисломолочний продукт є більш привабливим за зовнішнім виглядом: завдяки щільному згустку має непорушену структуру та насичений смак, що є перевагою в порівнянні з резервуарним способом виробництва [15].

При резервуарному способі виробництва такі технологічні процеси, як заквашування і сквашування проходять в окремій ємності – резервуарі. Тобто виробництво кисломолочної продукції в такий спосіб передбачає заквашування, сквашування і перемішування згустку в резервуарі, в спожиткову тару розливають фактично готовий продукт, який додатково охолоджують. На фасування кисломолочний продукт подається по трубам, що остаточно руйнує згусток і його консистенція виявляється значно порушеною. Резервуарний спосіб виробництва є

більш поширеним в Україні в зв'язку з тим, що він є менш витратним (потребує незначних капіталовкладень), характеризується більшою продуктивністю праці, при цьому приблизно у 1,5 раза збільшується вихід продукції з 1м³ виробничої площі, крім цього, є можливість механізувати та автоматизувати процес повністю. При резервуарному способі виробництва кисломолочний продукт має порушену структуру згустку.

Готові кисломолочні продукти в кінці терміну придатності повинні містити життєздатні клітини мікроорганізмів у кількості не меншій ніж 10⁶ колонієутворюючих одиниць в 1 г продукту.

Перетворення цукру до молочної кислоти отримало назву молочнокисле бродіння. Яке викликається молочнокислими мікроорганізмами, об'єднаними в одну фізіологічну групу своєю здатністю накопичувати як основний продукт молочну кислоту [16].

«Айран» виробляється з пастеризованого нормалізованого молока, сквашеного чистими культурами термофільного стрептокока (*Streptococcus thermophiles*), болгарської палички (*Lactobacillus bulgaricus*), ацидофільної палички (*Lactobacillus acidophilus*) та біфідобактеріями (*Bifidobacterium lactis*), і також дріжджів з додаванням кухонної солі. Основними енергетичними ресурсами для молочнокислих мікроорганізмів, які здійснюють гомоферментативне молочнокисле бродіння, слугують моноцукри (перш за все глюкоза) і дисахариди (мальтоза і лактоза).

Гомоферментативне молочнокисле бродіння являє собою найдавнішим і примітивним метаболічний шляхом. Послідовність біохімічних перетворень здійснюється по гліколітичному шляху згідно зі схемою Ембдена-Мейергофа-Парнаса — по іменам дослідників, які зробили великий внесок у вивчення цього процесу (рис. 1.3) [17].

Утворюється пірвіноградна кислота під дією лактатдегідрогенази відновлюється до молочної кислоти (≈90 % всіх продуктів бродіння). Оптична активність, утвореного лактату різна у різних мікроорганізмів і залежить від

стереоспецифічності ферменту, а також від наявності в клітині лактатрацемази, що перетворює D-лактат в L-форму. Лише невелика частина пірувату піддається декарбоксілюванню з перетворенням в оцтову кислоту, етиловий спирт, вуглекислоту і сліди ацетону.

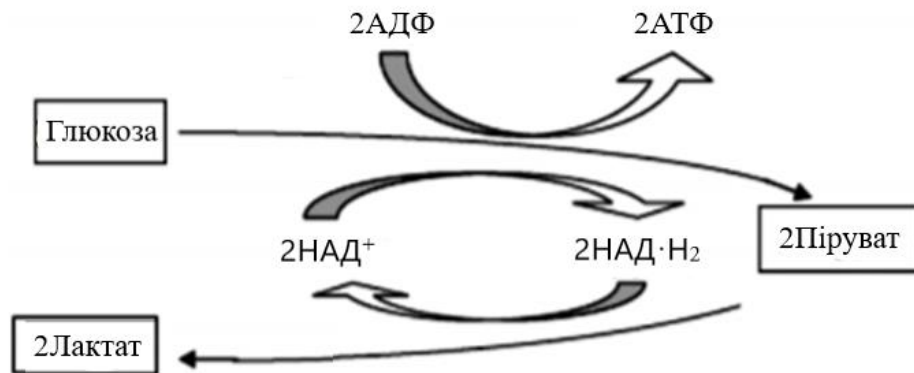


Рис. 1.3. Схема гомоферментативного молочнокислого бродіння

При внесенні у молоко з молочнокислою закваскою вносять дріжджі, в результаті чого відбувається спиртове бродіння. Поряд з цим також перебігають побічні процеси, в результаті яких утворюються ефіри та інші спирти. Кількість цих продуктів настільки незначна, що їх не беруть до уваги.

«Айран» — кисломолочний напій народів Північного Кавказу, нагадує кефір, але має свої особливості. Виробляється з цільного і знежиреного молока — коров'ячого, овечого або козячого. В готовому продукті виявляються лише сліди спирту, вуглекислого газу та леткі кислоти. Продукт являє собою слабосолений газований напій. Вміст солі в продукті 1,5-2,0% [18].

1.4. Загальна характеристика молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO»

Першим, хто побачив мікрофлору кисломолочних продуктів, був француз Луї Пастер. Досліджуючи під мікроскопом кисле молоко, Пастер виявив в ньому дуже маленькі "кульки" і "палички". Спостерігаючи за ними, Пастер переконався в тому,

що «кульки і палички» в кислому молоці ростуть, і кількість їх швидко збільшується.

Пастер викликав його сквашування, тобто молочнокисле бродіння. Ці дослідження викликали великий інтерес до цієї теми. Зусиллями вчених мікробіологів була вивчена систематика та культуральні особливості молочнокислих мікроорганізмів. Нормальними мешканцями навіть хорошого молока вважаються молочнокислі бактерії [19].

У теплому молоці мікроорганізми дуже швидко розмножуються: кожні півгодини може розділитися навпіл і дати дві нові. Таким чином, протягом короткого часу кількість мікроорганізмів в 1 мм теплового молока може досягти декількох мільйонів, що відіб'ється на його якості — воно скисне, якщо в ньому переважають молочнокислі мікроорганізми, або придбає неприємний смак в разі розвитку небажаних мікроорганізмів, наприклад пептонізуючих.

Молочнокислі мікроорганізми є представниками прокариотів. Вони як і всі прокариоти не мають ядра. Носієм спадкової інформації виступає спіральна нитка ДНК, локалізована в цитоплазмі. Від навколишнього середовища внутрішній вміст обмежений оболонкою і тонкої цитоплазматичної мембраною [20].

У визначнику Бергі молочнокислі мікроорганізми представлені як паличкоподібні та еліпсоподібні. Також ці бактерії віднесені до двох окремих родин, таких як *Lactobacillaceae* і *Streptococcaceae*. Але багато вчених на сьогоднішній день відносять ці бактерії до родини *Lactobacteriaceae*, не беручи до уваги те, що вони не утворюють спори [21].

Але якщо навіть не брати до уваги їх класифікацію, то вони мають загальні властивості:

- позитивно забарвлюються за Грамом (Гр+);
- не утворюють спори;
- не викликають розпад білків;
- є факультативними анаеробами;
- є не рухливими;

Лактобактерії належить до домену *Bacteria*, відділу *Firmicutes*, класу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, родини *Lactobacillaceae*, роду *Lactobacillus* який включає в себе ще три підроди: *Thermobacterium* (термобактерії), *Streptobacterium* (стрептобактерії) та *Betabacterium*.

В підрід *Thermobacterium* відносяться облігатні гомоферментативні лактобактерії. У "Визначнику бактерій Бергі" в цю групу увійшли 15 видів гомоферментативних молочнокислих паличок, які ферментують вуглеводи тільки до молочної кислоти. У більшості це термофіли. Найпопулярнішими представниками підроду є швейцарська паличка, болгарська паличка і молочна паличка [22].

В підрід *Streptobacterium* відносяться 11 видів факультативних гетероферментативних лактобактерій. Вони можуть ферментувати вуглеводи не тільки до молочної кислоти, але і з утворенням ряду інших побічних продуктів бродіння, таких як оцтової і мурашиної кислоти, етилового спирту. В основному представники цієї групи мезофіли.

В підрід *Betabacterium* відносяться 18 видів облігатних гетероферментативних лактобактерій. Вони ферментують вуглеводи до молочної та оцтової кислоти, також до етанолу і вуглекислого газу. Вони є мезофілами.

Лактобактерії зустрічаються з різною морфологією клітин. Більшість з них мають форму прямих паличок розміром $4-15 \times 0,5-0,6$ мкм, з округленими кінцями і також вони зібрані в ланцюжки з різною довжиною. Розташовуються поодинокі або попарно (рис.1 .4).

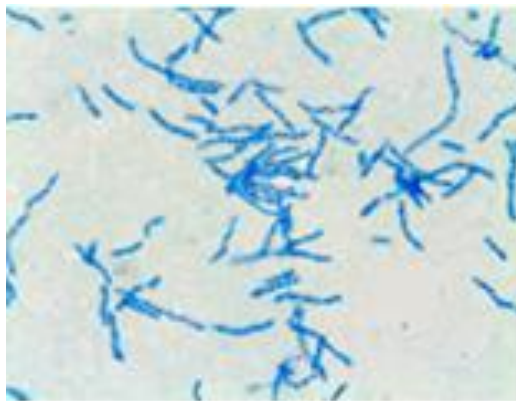


Рис. 1.4. Лактобактерії (*Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. lactis*)

Лактобактерії є факультативними анаеробами, вони краще ростуть при низькому вмісті кисню, або ж при вмісті в атмосфері вуглекислого газу (5-10%). Як говорилося раніше, по відношенню до температури бетобактерії і стрептобактерії є мезофілами, а термобактерії є термофілами.

Лактобактерії не ростуть на звичайних середовищах, вони ростуть на середовищах з молоком. Також при розвитку в молоці вони викликають утворення однорідного щільного згустку з приємним кисломолочним смаком і запахом.

Оптимальна температура для росту термофілів становить від 40 °С і більше, а ось для мезофілів становить від 25 °С до 40 °С. Щодо до оптимального рН, то він становить 7-7,6. Лактобактерії краще ростуть в нейтральних або слабколужних умовах. Вони вимогливі до поживних середовищ, тому що для їх розвитку потрібно не тільки мати вуглеводне джерело, а й нуклеотиди, амінокислоти та вітаміни [23].

Іноді через схожість в метаболізмі вуглеводів та їх роль в харчовій промисловості в одній групі з молочнокислими бактеріями, також розглядають представників роду *Bifidobacterium*.

Біфідобактерії належить до домену *Bacteria*, відділу *Actinobacteria*, класу *Actinobacteria*, підкласу *Actinobacteridae*, порядку *Bifidobacteriales*, родини *Bifidobacteriaceae*, роду *Bifidobacterium*. Типовим представником роду *Bifidobacterium* є *Bifidobacterium bifidum*. Він відноситься до гетероферментативних біфідобактерій.

Форму клітин бактерій з роду *Bifidobacterium* зазвичай описують як плеоморфну. Плеоморфізм змінюється в залежності від виду. Вони виглядають як прямі палички, вигнуті, мають багато гілок. Їх морфологічною особливістю є те, що у них є роздвоєння на кінці палички, в результаті чого вони мають V або Y-подібну форму, з булавовидними здуттями на кінцях [22].

Але якщо вирощувати біфідобактерії на печінковому агарі або ж в молоці то роздвоєння цих паличок зникає, в результаті з'являється багато гранульованих форм які іноді можна прийняти за коки. Клітини розміщуються поодинокі, буває парами, ланцюжками і розетками. Основний розмір біфідобактерій становить 0,5-1,3 × 1,5-8

мкм. Кожен вид має свою особливість щодо розміру, форми і розташуванням клітин [24] (рис. 1.5).

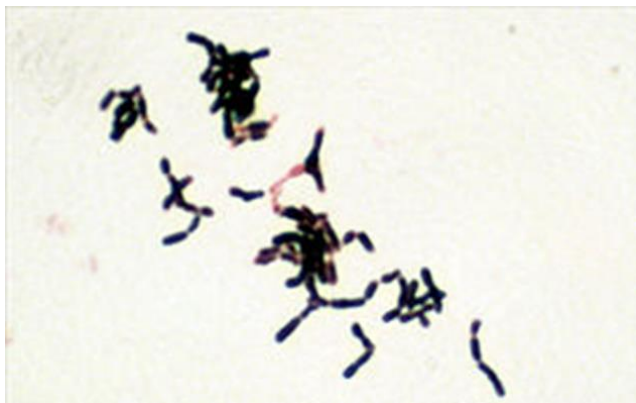


Рис. 1.5. Біфідобактерії (*Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. lactis*)

Всі біфідобактерії при первинному виділенні є строгими анаеробами. При культивуванні в лабораторії біфідобактерії набули здатність розвиватися в присутності невеликої кількості кисню, а ось в високопоживних середовищах можуть рости в абсолютно аеробних умовах.

Оптимальна температура для них становить 37-41° С, а рН від 4,5-8,5, але якщо значення буде нижче або вище допустимих норм, то ріст мікроорганізмів завершується. Для їх розмноження дуже важливі фактори росту. Важливий біотин, пантотенова кислота, цистеїн, рибофлавін, пуринові і пірамідонові основи, пептиди та ін. Також важливі мікроелементи, такі як Fe, Mg, P, K, Cl, Na, Mr [25].

При культивуванні біфідобактерій створюються анаеробні умови або знижують окисно-відновний потенціал середовища. Культивують на молоці, гідролізованому молоці і гідролізату казеїну, а також буває на печінковому бульйоні з додаванням ростових речовин.

При культивуванні в молоці біфідобактерії розвиваються повільно, тому що коров'яче молоко є природним середовищем їх проживання. Однією з причин є те, що в молоці служить розчинений в ньому кисень. Тому їх ріст в молоці стимулює екстракція дріжджів, гідролізоване молоко, а також збільшення співвідношення білка лактози і додавання гідролізату казеїну [26].

Тому для культивування цих бактерій зазвичай використовується печінково-цистеїнове середовище. Але для молочної промисловості для виявлення біфідобактерій рекомендується використовувати гідролізатно-молочне середовище [24].

Термофільний стрептокок (*Streptococcus thermophilus*) був виділений і описаний Орла-Єнсенем в 1979 році. Термофільний стрептокок належить до домену *Bacteria*, відділу *Firmicutes*, класу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, родини *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*.

Streptococcus thermophilus являє собою грампозитивні кулясті та еліпсоподібні клітини розміром $2-7 \times 0,7-0,9$ мкм, частіше розташовані довгими ланцюжками. *Streptococcus thermophilus* спор та капсул не утворює, нерухомий [22] (рис.1.6).

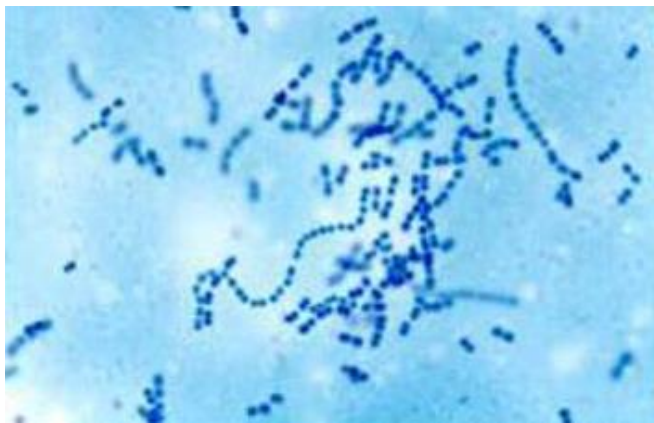


Рис. 1.6. Термофільні стрептококи (*Streptococcus thermophilus*)

По відношенню до кисню *Streptococcus thermophilus* як і всі молочнокислі бактерії, є факультативними анаеробами. Він добре росте на знежиреному і гідролізованому молоці, також на щільних поживних середовищах, особливо з додаванням до них основних амінокислот.

Характерною ознакою *Streptococcus thermophilus* є широкий діапазон температур росту від 20-50 °С, оптимальною температурою вважається від 37 до 40 °С, слабке зростання спостерігалось при 50 °С, а температура 53 °С ,

Є різновид термофільного стрептокока, який утворює слиз і надає кисломолочним продуктам особливу кремоподібну в'язку консенстенцію [27].

Лактозосбраживаючі дріжджі, які відіграють важливу роль у молочній промисловості (до них відносяться *Torulopsis* і ін.) При приготуванні кефіру і кумису, зброджують молочний цукор, утворюючи спирт і вуглекислоту, внаслідок чого поліпшується смак продукту і підвищується його засвоюваність організмом. Найважливішими для молочного виробництва є лактозосбраживаючі *Saccharomyces lactis*. Вони використовуються для приготування кефіру (з коров'ячого молока) і кумису (з кобилячого молока) та ін. Відомий спосіб виробництва кисломолочного продукту на основі молочної сироватки з використанням живих клітин дріжджів.

На щільних середовищах утворює опуклі зі злегка хвилястими краями колонії розміром від 0,5 до 3,0-3,5 мм, в залежності від складу середовища. Їх зростання супроводжується інтенсивним газоутворенням. У молоці і молочній сироватці утворює поодинокі клітини овальної форми, які виявляють схильність до спороутворення (рис. 1.7).

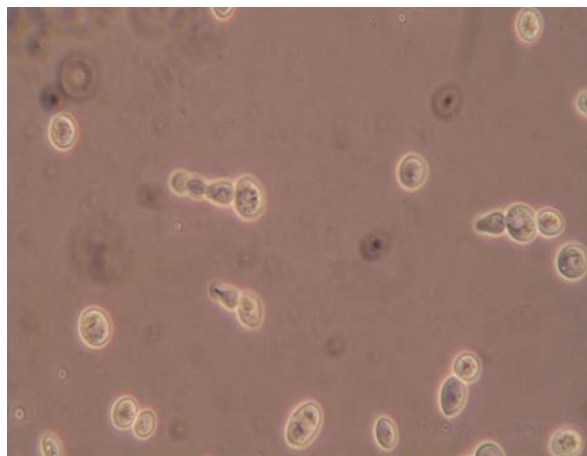


Рис. 1.7. Дріжджі (*Saccharomyces lactis*)

Факультативний анаероб, температурний оптимум розвитку 22-28 °С. Зброджує глюкозу, мальтозу, сахарозу, крохмаль, лактозу з утворенням молочної і частково пірвіноградної кислот. Молоко зброжує з утворенням дрібнопористою, дрібнозернистого згустку і з повним інтенсивним відторгненням сироватки. Володіє антибіотичну активність до грампозитивних бактерій і грибів [27].

1.5. Висновки до розділу

Проаналізовано, що сіль знижує активність води в клітині молочнокислих мікроорганізмів. Збільшення концентрації солі, а отже і підвищення осмотичного тиску веде до переміщення води з клітини молочнокислих мікроорганізмів назовні, в результаті чого йде дегідратація клітини і зменшується життєздатність молочнокислих мікроорганізмів.

При виробництві кисломолочного продукту типу «Айран» використовуються два способи: резервуарний і термостатний. Під час резервуарного способу йде сквашування молока та визрівання кисломолочного напою, яке відбувається у резервуарах з подальшим фасуванням у споживчу тару. Під час термостатного способу сквашування молока та визрівання кисломолочних напоїв відбувається в спеціальних камерах у споживчій тарі. До складу закваски в промисловому виробництві входять лактобактерії, біфідобактерії, термофільні стрептококи та дріжджі.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Мікробіологічні методи дослідження при культивуванні молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO»

Живлення є важливою функцією мікроорганізмів, воно необхідно для їх росту та розмноження. Молочнокислі мікроорганізмів найкраще ростуть на середовищах з молоком, тому для культивування молочнокислих мікроорганізмів використовували молочний агар

На сьогодні більшість середовищ випускають у вигляді порошків. Для приготування елективного поживного середовища обрано – молочний агар. Для його приготування брали наважку агар-агару та змішували з підігрітою дистильованою водою. Так, при постійному нагріванні даної суміші перемішували до повного розчинення компонентів середовища. Після цього до готового поживного середовища агар-агару вносили молоко (1%) і наважку харчової солі задля приготування молочного агару із дослідженими концентраціями солей для того щоб визначити їх вплив на життєздатність молочнокислих мікроорганізмів. Після застигання готове поживне середовище стерилізували у автоклаві за тиску 0,5-0,75 атм [28].

Для визначення концентрації (відсоткового відношення) солі в поживному середовищі, використали 100 г розчину (розтоплене поживне середовище) та наважку харчової солі відносно досліджених концентрацій.

В результаті визначили масову частку солі для різних концентрацій в поживному середовищі (табл. 2.1). Після розрахунку маси солі, необхідної для приготування поживного середовища, наважки зважували на електронних вагах з точністю результатів зважування до 0,01 г. Розтоплене поживне середовище розлили в мірні колби, та в кожну мірну колбу додали необхідну масу солі для конкретної

концентрації, та ретельно перемішували до повного розчинення солі, а потім автоклавували [29].

Таблиця 2.1

Співвідношення між концентрацією солі в поживному середовищі та масою солі

Концентрація солі в поживному середовищі, %	Маса солі, г
0,5	0,5
1	1
1,5	1,5
2	2
2,5	2,5
3,5	3,5
4	4
5	5
6	6

Після чого використовували метод розливання стерильного поживного середовища з дотримання правил асептики. Самі поживні середовища розливаються із колб у чашки Петрі по 10-15 мл. Для забезпечення стерильності розливали біля полум'я пальника в радіусі не більше ніж 10-15 см від центру. Але молочний агар є щільним поживним середовищем, тому перед розливанням розплавляли на електричній плитці та трохи охолодили до температури 50-60° С.

Під час розливу середовища у чашки Петрі колбу з середовищем брали в праву руку, та ретельно збовтували, та, тримаючи біля вогню, лівою рукою виймали курок (затиснувши мізинцем). Обпалюючи горлечко колби та, трохи відкривши лівою рукою чашку Петрі, вводили під неї горлечко, не торкаючись краю чашки. У кожную чашку Петрі наливали 15-20 мл середовища (приблизно шаром в 2-3 мм), та розподіляли середовище рівномірно по дону самої чашки.

В результаті отримали одну чашку Петрі чистого молочного агару для контролю, та чашки молочного агару з різною концентрацією солі. Після застигання агару, поверхневим способом відбувався засів суспензії із 18 годинної чистих культур молочнокислих мікроорганізмів у кількості 0,1 мл на поверхню агару. Процес інкубації тривав 24 години при температурі 37 °C [30].

2.1.1. Визначення кількості клітин закваски «Імуно VIVO» методом десятикратних розведень

Для культур молочнокислих мікроорганізмів використовували суспензію закваски «Імуно VIVO». До бактеріального складу цієї закваски входять:

- *Streptococcus thermophilus*;
- *Lactobacillus bulgaricus*;
- *Lactobacillus acidophilus* (2 штаму);
- *Lactobacillus casei*;
- *Lactobacillus paracasei*;
- *Bifidobacterium infantis*;
- *Bifidobacterium lactis* (2 штаму);

Посів суспензії на поверхню агару за методом десятикратних розведень йде в три етапи:

- I. Приготування розведень досліджуваного матеріалу;
- II. Посів на щільне середовище у чашках Петрі;
- III. Підрахунок сформованих колоній.

Для виготовлення суспензії молочнокислих мікроорганізмів використовували метод розведень. Розведення готували у фізіологічному розчині, крок розведення 10^{-1} . Тому стерильний фізіологічний розчин розлили по 9 мл у стерильні пробірки (дотримуючись правил антисептики). Далі 1 мл закваски «Імуно VIVO» стерильною піпеткою внесли у пробірку з фізіологічним розчином. Це вважається першим (10^{-1}) розведенням. Сам вміст пробірки ретельно перемішали, вбираючи в піпетку і

випускаючи з неї отриману суспензію. Таку процедуру виконували декілька разів, для забезпечення перемішування суспензії та зменшити адсорбцію клітин на стінках піпетки (рис. 2.1).

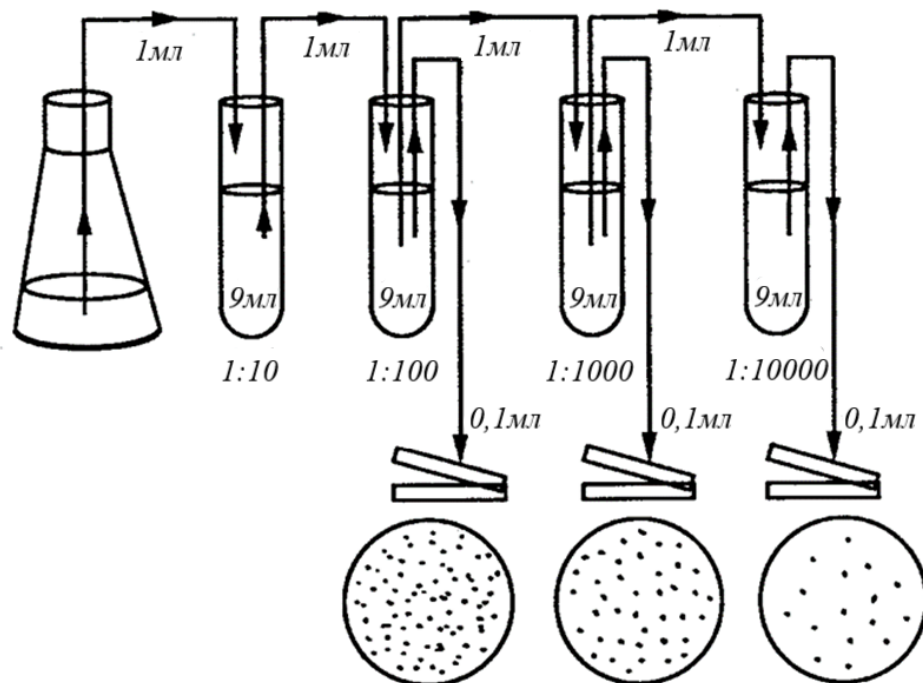


Рис. 2.1. Схема визначення кількості клітин методом десятикратних розведень.

Взявши іншу піпетку також відібрали 1 мл суспензії і перенесли у другу пробірку. Це вважається другим (10^{-2}) розведенням. Ступінь розведення залежить від щільності досліджуваної суспензії мікроорганізмів: чим вона вища, тим більше розведень слід застосувати. Всього було використано десять розведень [31].

Під часу посіву на поживне середовище в чашки Петрі вносили 0,1 мл розведеної суспензії мікроорганізмів та розподіляли стерильним шпателем по всій поверхні середовища. З кожного наступного розведення робили посів новою стерильною піпеткою і знову стерилізували шпатель.

Після посіву чашки Петрі помістили в термостат кришками донизу та інкубували 3-5 днів за температури 37°C .

Підрахунку сформованих колоній здійснили через 2-3 доби . Під час розрахунку кількості клітин молочнокислих мікроорганізмів у 1 мл вихідної суспензії визначали середню кількість колоній для даного розведення.

Кількість клітин у 1 мл досліджуваної суспензії мікроорганізмів визначали за формулою:

$$M = \frac{a \times 10^n}{V}$$

де M — кількість клітин в 1 мл; a — середня кількість колоній; V — об'єм суспензії, мл; 10 — коефіцієнт розведення; n — порядковий номер розведення [32].

2.1.2. Визначення кількості осмочутливих культур молочнокислих мікроорганізмів

На сьогоднішній день сіль життєво необхідна складова їжі і речовина яка століттями застосовувалося в харчовій технології, навряд чи підлягає законодавчим обмеженням, в тому числі і в частині гранично допустимого змісті в харчовому продукті. Сіль знижує активність води, погіршуючи тим самим умови існування молочнокислих мікроорганізмів.

Для визначення осмочутливості молочнокислих мікроорганізмів на поживне середовище чашок Петрі з різними відсотком концентрації солі: 0.5 %, 1 %, 1.5 %, 2 %, 2.5 %, 3.5 %, 4 %, 5 % та 6 % та контроль (молочний агар без сілі) засівали суспензію клітин, використовуючи розведення 10^{-7} , та поміщали в термостат кришками донизу та культивували 3-5 днів за температури 37 °C [33].

Після чого використали метод підрахунку кількості мікроорганізмів на поживному середовищі. Самі колонії розглядали за допомогою лупи. Для зручності відмічали прораховані колонії точкою на зовнішній стороні дна чашки, для цього використовували маркер чорного кольору. Колонії рахували в 4 секторах, знаходили, середнє арифметичне на один сектор, і потім множили на кількість

секторів. Або ж підраховували кількість колоній в кожному секторі та результати підсумовували:

$$N = a \times n$$

де N — загальна кількість колоній; a — кількість колоній на одному секторі; n — кількість секторів.

2.1.3. Мікроскопічні методи дослідження клітин молочнокислих мікроорганізмів

По завершенню підрахунку колоній приготували фіксовані забарвлені препарати (рис. 2.2), а підготовлені скельця нанесли суспензію отриманих молочнокислих мікроорганізмів в результаті впливу солі. Висушили тримаючи скло високо над полум'ям. Зафіксували, тобто вбили клітини та забезпечили їх прилипання до поверхні скла. Далі фіксовані препарати залили сумішшю спирту з ефіром. Препарати фарбували простим забарвленням метиленовим синім протягом 2-3 хв. Після чого сам препарат добре промили дистильованою водою. Краї скельця протерли сухою серветкою, і висушили препарати [34].

На готові сухі препарати нанесли краплю кедрової олії і розглядали препарати під мікроскопом «Микромед 3» використовуючи цифрову камеру DCM-800 (об'єктив $\times 90$). Зображення зразків відображалися на екрані комп'ютера, за допомогою програмного забезпечення TourView.

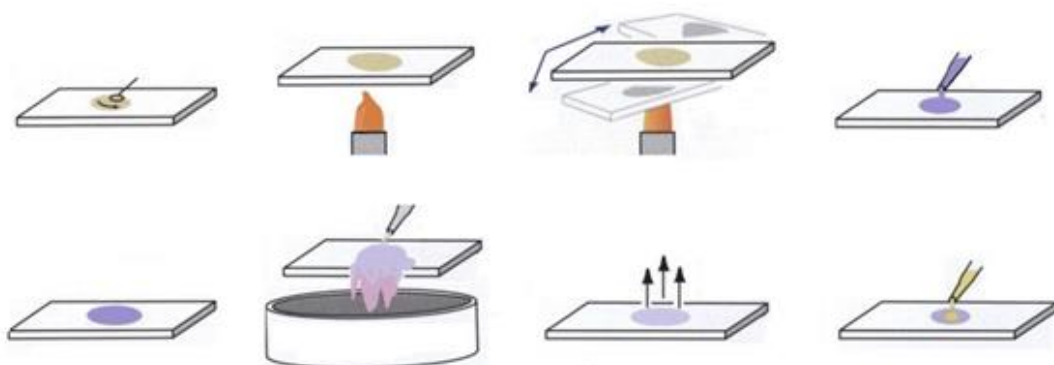


Рис. 2.2. Схема поетапного виготовлення фіксованого препарату

2.2. Фізико-хімічні методи дослідження молочнокислих мікроорганізмів

Кислотність кисломолочного продукту є найважливішим біохімічний показником, який необхідний для встановлення свіжості кисломолочного продукту, його сортності при продажі, закупівлі, а також для визначення придатності кисломолочного продукту і для термічної обробки [34].

2.2.1. Методика визначення титрованої кислотності кисломолочного продукту

Для визначення фізико-хімічних властивостей (титрованої кислотності) використали промислові зразки кисломолочного продукту «Айран» та типу «Айран» лабораторного приготування, виготовленого із додаванням закваски «Імуно VIVO».

Титрування проводять за допомогою бюретки, заповненої титрантом до нульової позначки. Для цього відібрали піпеткою в конічну колбу об'ємом 100 мл 10 мл «Айрану», додавали 20 мл дистильованої води і 2-3 краплі 1 %-го розчину фенолфталеїну. Суміш титрували (за постійного збовтування) 0,1 М розчином NaOH до ледь рожевого забарвлення яке не повинно зникати протягом 2 хв [37, 38].

Розраховували кислотність «Айрану» у градусах Тернера ($^{\circ}T$) за формулою:

$$^{\circ}T = a \cdot 10$$

де a — кількість, мл 0,1 М розчину NaOH, витраченого на нейтралізацію 100 мл молока помноженого на 10.

Та визначили вміст молочної кислоти враховуючи, що 1 мл 0,1М NaOH відповідає 0,009 г молочної кислоти [36].

2.2.2. Методика визначення рН та окисно-відновлювального потенціалу кисломолочного продукту типу «Айран»

Метод вимірювання активної кислотності базується на визначенні активності іонів водню потенціометричними аналізаторами (рН-метрами або іономірами). Для

даної роботи використовували рН-метр - мілівольтметр лабораторний рН-150МА. Активну кислотність молока виражають в одиницях рН.

Для визначення рН виготовили зразки «Айрану» з різною концентрацією солей. Для цього використовували 30 г «Айрану» та розраховану масу солі, яка відповідає певній концентрації. В результаті визначили масову частку харчової солі для створення різних концентрацій продукті «Айран» (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Співвідношення між концентрацією солі в кисломолочному продукті типу «Айран» та масою солі

Концентрація солі в кисломолочному продукті, %	Маса солі, г
1	0,3
2	0,6
3	0,9
4	1,2
5	1,5
6	1,8

Після розрахунку масової частки солі, зважили її наважку на електронних вагах з точністю результатів зважування до 0,01 г. Кисломолочний продукт розлили в склянки об'ємом 50 мл, та в кожен мірну колбу додали необхідну масу солі для конкретної концентрації, та ретельно перемішували до повного розчинення солі [32].

Перед визначенням рН перевірили прилад для потенціометрії за взірцевим буферним розчином. Для цього рН-метр включили за 30 хв до вимірювання, промили електроди дистильованою водою, залишки води видалили фільтрувальним папером. В склянку налили 40 см³ буферного розчину (20 °С), занурили в нього електроди і через 10—15 с зчитували покази рН-метра. Якщо покази відрізнялися

від стандартного значення рН взірцевого буферного розчину більше як на 0.05, то рН-метр настраювали з допомогою регулятора.

Для визначення рН в склянки налили по 30 мл «Айрану» (20 °С) та додали різний відсоток концентрації солі: 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 % та 6 % та залишили контроль (без додавання солі). Після чого занурили в склянку електрод. При цьому електрод не торкався стінок і дна склянки. Через 10-15 с зчитували покази на шкалі рН-метра. Перед наступним вимірюванням електроди промили дистильованою водою. Між вимірюваннями електроди знаходилися у склянці з дистильованою водою.

За кінцевим результатом брали середньоарифметичне значення вимірів рН. Розбіжність між результатами не перевищувала $\pm 0,03$ одиниці рН [30].

В усіх біологічних системах окисно-відновні процеси мають суттєве значення. Одним із найбільш значимих факторів регулювання параметрів окисно-відновних реакцій, що відбуваються в будь-якому рідинному середовищі, є активність електронів, або інакше — окисно-відновний потенціал цього середовища (ОВП, позначається E_h - редокс потенціал).

Окисно-відновні реакції можна визначити як процеси, які пов'язані з переходом електронів від одних атомів до інших. Сутність окиснення полягає у втраті електронів речовиною, що окиснюється, а відновлення – у приєднанні електронів речовиною, яка відновлюється. Окиснення і відновлення відбуваються одночасно – окиснення однієї речовини супроводжується відновленням іншої.

Показник окисно-відновлювального потенціалу залежить від співвідношення в системі окиснених і відновних форм: високе значення E_h свідчить про окиснювальні властивості системи, низьке — про відновні. Причому від'ємні значення відповідають відновному потенціалу, а позитивні – окиснювальному.

E_h – показник, за допомогою якого можна порівнювати між собою речовини щодо їхньої дії як відновників або окиснювачів, залежить від виду та концентрації речовин, приймаючих участь у реакції, від їх температури та інших факторів. Величина E_h у значній мірі залежить від рН [33].

2.3. Органолептичний метод дослідження кисломолочних продуктів

Сучасні методи дозволяють визначити органолептичні показники якості товару і провести дегустацію, спробувати харчові продукти на смак. Випробування проводяться за допомогою різних органів чуття у людини, таких як: зір, смак, нюх та дотик

У лабораторії застосовуються різні методи:

- візуальний, з визначенням колірних відтінків, стану поверхні.
- нюховий, для оцінки запаху харчових компонентів.
- дотиковий застосовується для визначення внутрішньої консистенції, особливостей поверхні.
- смаковий спосіб підходить для різних видів їжі, застосовується разом з нюховим.

Включають аналіз кольору, смаку, аромату, консистенції. Визначення засновані на різних властивостях і характеристиках. Вони включають в себе:

- колірну забарвлення, створювану відбитим потоком видимого спектру променів;
- запах, з аналізом інтенсивності і особливостей ефірних речовин, що містяться в продукті, а також хімічного складу;
- консистенцію у вигляді агрегатного стану, рівня однорідності, дисперсності, а також механічних властивостей, включаючи в'язкість, крихкість, еластичність, масу;
- смакові властивості мають вирішальний вплив на оцінку, при цьому враховується вид, яскравість, свіжість смаку [29].

Характерні ознаки для смаку визначаються як солодкий, кислий, солоний, гіркий. Він може містити різні відтінки за інтенсивністю, відповідну реакцію. Для кисломолочних продуктів органолептичний метод дослідження має вирішальне значення в оцінці якості, особливо при визначенні смаків, присмаків, запахів, їх відтінків, консистенції.

Експертним шляхом визначають значення показників якості продукції на основі рішення, прийнятого експертами. Для оцінки якості продукції за допомогою експертних методів створили експертну комісію.

При формуванні експертної групи враховали психофізіологічні можливості експерта і стан його здоров'я. Експерти були компетентними і об'єктивними.

Експертним шляхом визначили вагомість кожного показника у вигляді коефіцієнта. Вищий оцінний бал по будь-якого показника якості виходило множенням передбаченої максимальної бальної оцінки на коефіцієнти вагомості, фактичну якість визначається множенням середніх оцінок в балах на коефіцієнти вагомості.

Підсумували і отримали узагальнений показник якості, за яким судили про рівень якості продукції в цілому [31].

2.4. Висновки до розділу

Описано мікробіологічні методи для дослідження впливу осмотичного тиску на молочнокислі мікроорганізми (метод десятикратних розведень, визначення кількості осмочутливих культур та мікроскопічні дослідження). Описано фізико-хімічні методи для дослідження та оцінки якості кисломолочного продукту типу «Айран», а саме титрована кислотність, рН та окисно-відновний потенціал.

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ ОСМОТИЧНОГО ТИСКУ НА РІСТ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ПРИ ЇХ ВИКОРИСТАННІ У БІОТЕХНОЛОГІЯХ

Дослідження з впливу осмотичного тиску на молочнокислі мікроорганізми були проведені за наступною схемою (рис. 3.1):

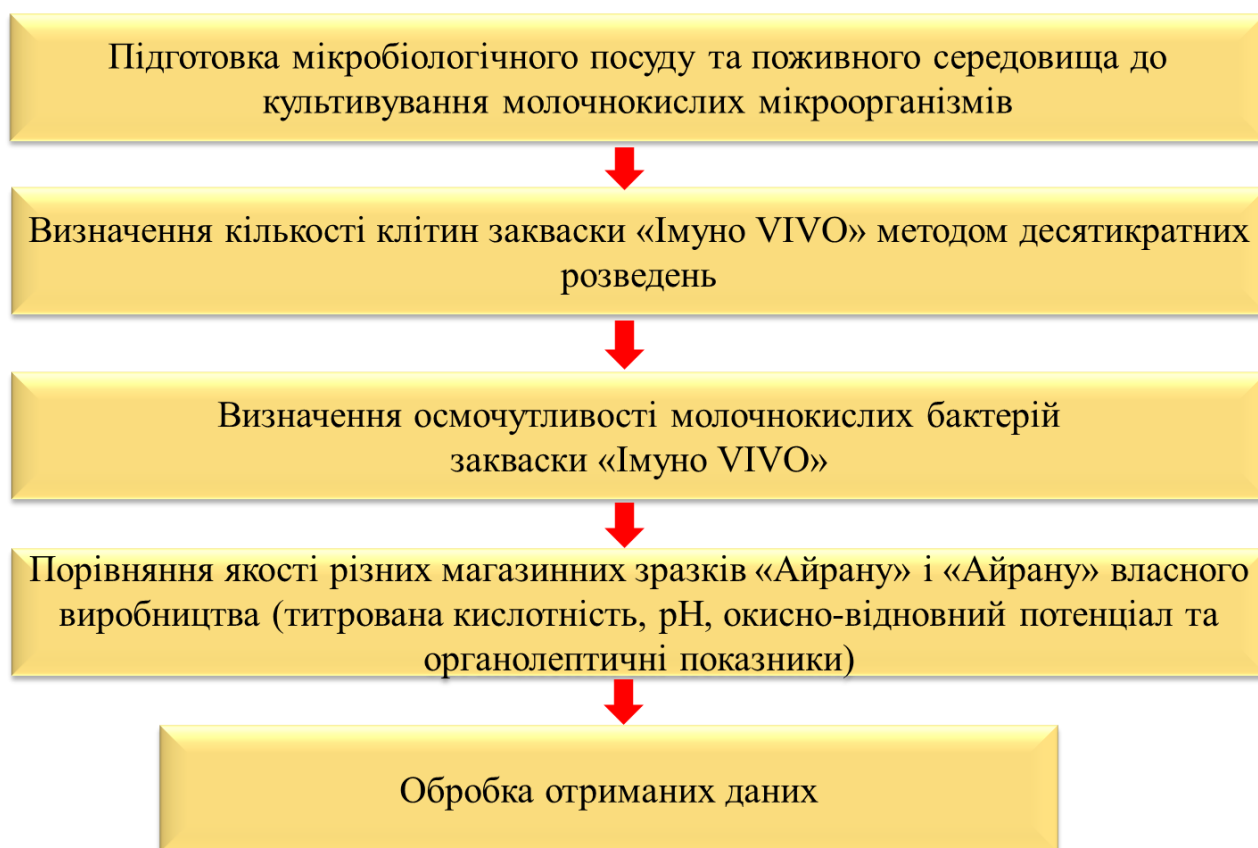


Рис. 3.1. Схема «етапи проведення експериментальних досліджень»

3.1. Визначення кількості клітин закваски «Імуно VIVO»

3.1.1. Підрахунок кількості клітин методом десятикратних розведень

Результати рахувалися на тих чашках Петрі, на яких виросло від 30-50 до 150-200 колоній. Результати паралельних висівів з одного і того самого розведення

підсумовували і визначали середню кількість колоній, що вирости за висіву з даного розведення на одній чашці Петрі $\times 10^8$. Кількість клітин в 1 мл досліджуваної суспензії мікроорганізмів (КУО/мл) представлено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Визначення концентрації клітин у бактеріальній суспензії

№ з/п	Розведення	Повторність висівів розведень			Середнє значення кількості колоній, <i>a</i>	Кількість клітин КУО/мл, <i>M</i>
		1	2	3		
1	10^{-1}	-	-	-	суцільний ріст	-
2	10^{-2}	-	-	-	суцільний ріст	-
3	10^{-3}	-	-	-	суцільний ріст	-
4	10^{-4}	-	-	-	суцільний ріст	-
5	10^{-5}	-	-	-	суцільний ріст	-
6	10^{-6}	1900	2000	1800	1900	$1900 \cdot 10^6 = 19 \cdot 10^8$
7	10^{-7}	197	197	200	198	$198 \cdot 10^7 = 19,8 \cdot 10^8$
8	10^{-8}	16	17	18	18	$18 \cdot 10^8$
9	10^{-9}	-	-	-	-	-
10	10^{-10}	-	-	-	-	-

В розведеннях 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} спостерігали суцільний ріст колоній молочнокислих мікроорганізмів, порахувати зовсім не можливо. В розведеннях 10^{-10} та 10^{-9} не спостерігалось зростання молочнокислих мікроорганізмів.

Оптимальну кількість колоній підраховували в розведеннях 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} — $18-19 \times 10^8$ КУО/мл та побудували графік залежності концентрації клітин суспензії в залежності від розведення (рис. 3.2). На осі абсцис відклали значення порядкового номера розведення (*n*), а на осі ординат — значення кількості клітин КУО/мл.

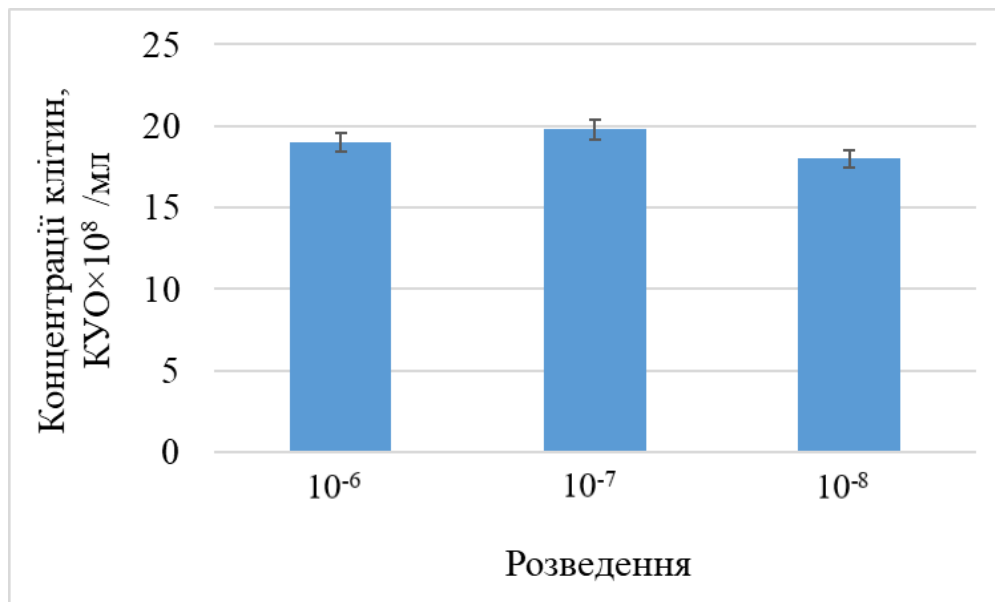


Рис. 3.2. Концентрація клітин (КУО×10⁸ /мл) в залежності від розведення бактеріальної суспензії методом десятикратних розведень

3.1.2. Морфолого-культуральні особливості молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO»

Дослідження морфолого-культуральних властивостей молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO» проводили шляхом мікроскопії колоній які вирости на молочному агарі із додаванням кухонної солі.

Дослідження морфології клітин молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO» показало, що лактобактерії, біфідобактерії та термофільним стрептокок є грампозитивними бактеріями (рис. 3.3).

Лактобактерії мають форму вигнутих прямих паличок розміром 4-15 × 0,5-0,6 мкм, з округленими кінцями і з різною довжиною. Біфідобактерії також мають форму вигнутих прямих паличок розміром 0,5-1,3 × 1,50-8 мкм. Їх морфологічною особливістю є те, що в них є роздвоєння на кінці палички, в результаті мають V або Y подібну форму з булавовидними кінцями. Термофільний стрептокок має кулясту або еліпсоподібну форму, розміром 2-7 × 0,7-0,9 мкм. Розташовуються ланцюжками.

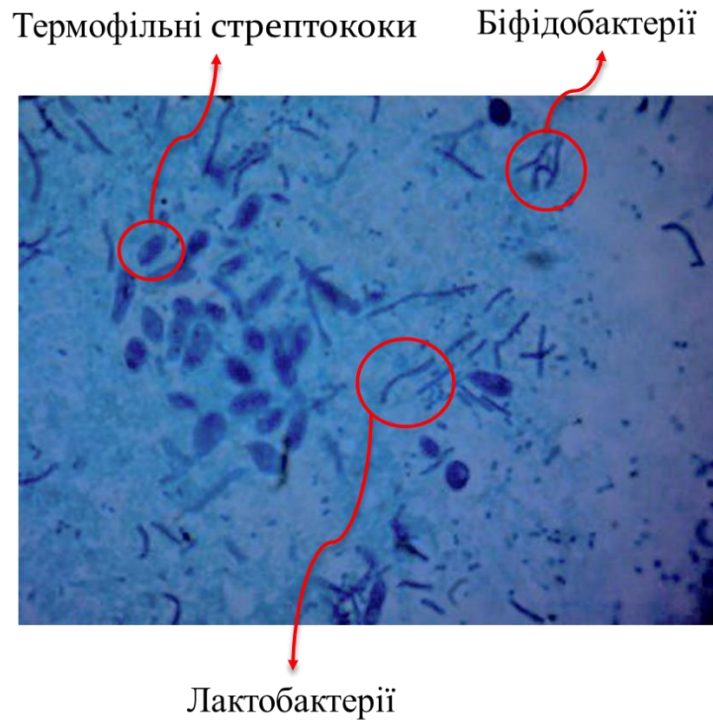


Рис. 3.3. Зразок пофарбованих клітин молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO» під мікроскопом (збільшення $\times 1350$)

Дослідження культуральних ознак молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO» показало, що вони утворюють світокоричневі колонії круглої або неправильної форми розміром 1-5 мкм, в'язкої або маслянистої консистенції.



Рис. 3.4. Зразок колоній молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO» на чашці Петрі

3.1.3. Визначення осмочутливості культур молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO»

Для визначення впливу осмочутливості молочнокислих мікроорганізмів, було проведено десятикратне розведення. Після чого зробили посів 10^{-7} розведення на молочний агар з концентрацією солей: 0.5 %, 1 %, 1.5 %, 2 %, 2.5 %, 3.5 % 4 %, 5 % та 6 %.

В результаті, підрахувавши, можна проаналізувати вплив осмотичного тиску на культури молочнокислих мікроорганізмів (табл. 3.2). Аналізуючи представлені результати досліджень встановлено:

— на молочному агарі в чашках Петрі без додавання солі (контрольна проба), відмічається активний ріст культур молочнокислих мікроорганізмів з титром $19,8 \times 10^8$ КУО/мл.

— на молочному агарі в чашках Петрі з додавання 0.5 % концентрації солі, кількість колоній молочнокислих мікроорганізмів починає знижуватися титром $9,2 \times 10^8$ КУО/мл.

— на молочному агарі в чашці Петрі з додавання 1 % концентрації солі, відмічено ріст культур молочнокислих мікроорганізмів, титр яких становить $6,8 \times 10^8$ КУО/мл.

— на молочному агарі в чашці Петрі з додавання 1,5 % концентрації солі, відмічено ріст культур молочнокислих мікроорганізмів з титром $6,5 \times 10^8$ КУО/мл.


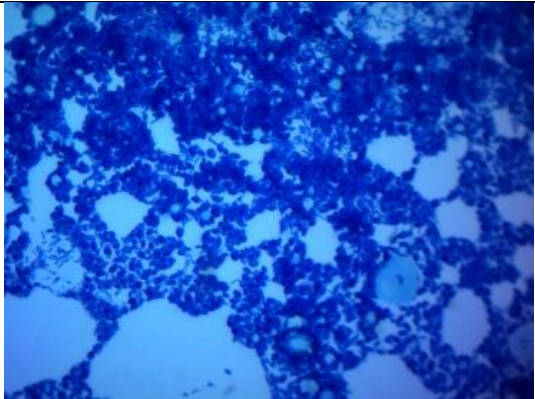

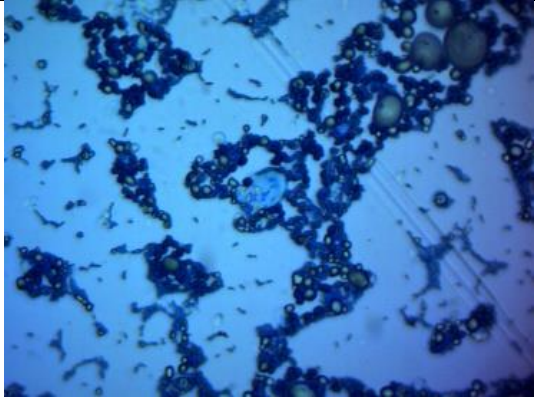


— на молочному агарі в чашці Петрі з додавання 2 % концентрації солі, зафіксовано ріст культур молочнокислих мікроорганізмів з титром $3,4 \times 10^8$ КУО/мл.


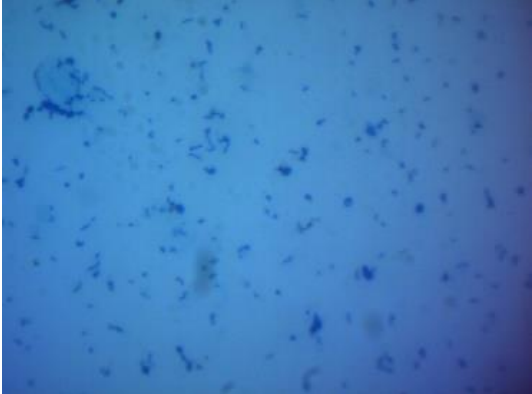

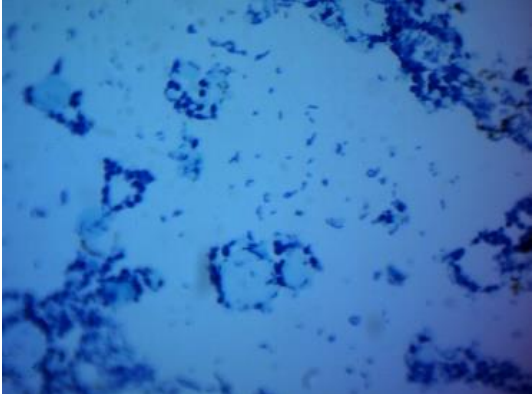

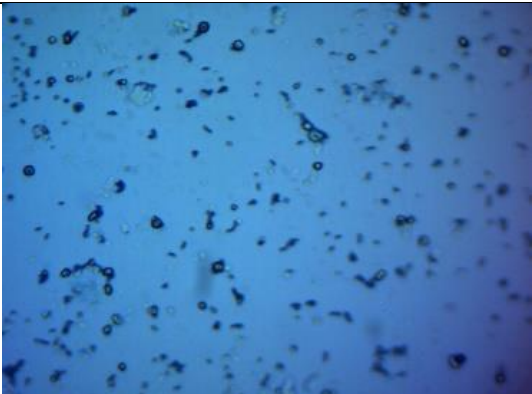

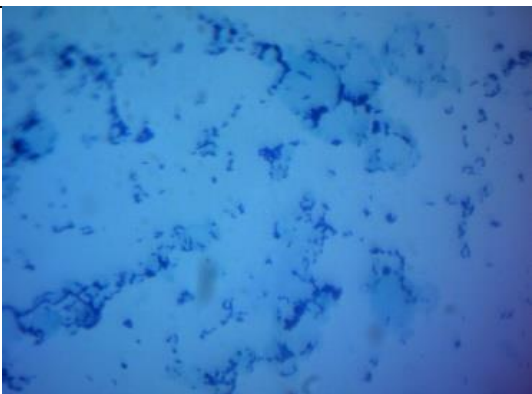
— на молочному агарі в чашці Петрі з додавання 2,5 % концентрації солі, відмічено ріст культур молочнокислих мікроорганізмів з титром $3,0 \times 10^8$ КУО/мл.




— на молочному агарі в чашці Петрі з додавання 3,5 % концентрації солі, відмічено ріст культур молочнокислих мікроорганізмів з титром $1,8 \times 10^8$ КУО/мл.

— на молочному агарі в чашці Петрі з додавання 4 %, 5 % та 6 % концентрації солі, ріст колоній молочнокислих мікроорганізмів відсутній.

Осмотично-стресорний вплив солі на ріст молочнокислих мікроорганізмів

Вміст солі у поживному середовищі, %	Кількість молочнокислих мікроорганізмів, КУО/мл	Світлова мікроскопія, збільшення $\times 1350$
Контроль (без додавання солі)	 $19,8 \times 10^8$	
0,5	 $9,2 \times 10^8$	
1	 $6,8 \times 10^8$	

1,5	 <p data-bbox="655 618 778 663">$6,5 \times 10^8$</p>	
2	 <p data-bbox="655 1066 778 1111">$3,4 \times 10^8$</p>	
2,5	 <p data-bbox="655 1514 778 1559">$3,0 \times 10^8$</p>	
3,5	 <p data-bbox="655 1962 778 2007">$1,8 \times 10^8$</p>	

4	 відсутній ріст колоній	—
5	 відсутній ріст колоній	—
6	 відсутній ріст колоній	—

В результаті отриманих даних побудували гістограму залежності концентрації клітин молочнокислих мікроорганізмів залежно від концентрації NaCl у поживному середовищі (рис. 3.5). На осі абсцис відклали кількість клітин ($KУО \times 10^8$ /мл), а на осі ординат – значення концентрації NaCl у поживному середовищі (%).

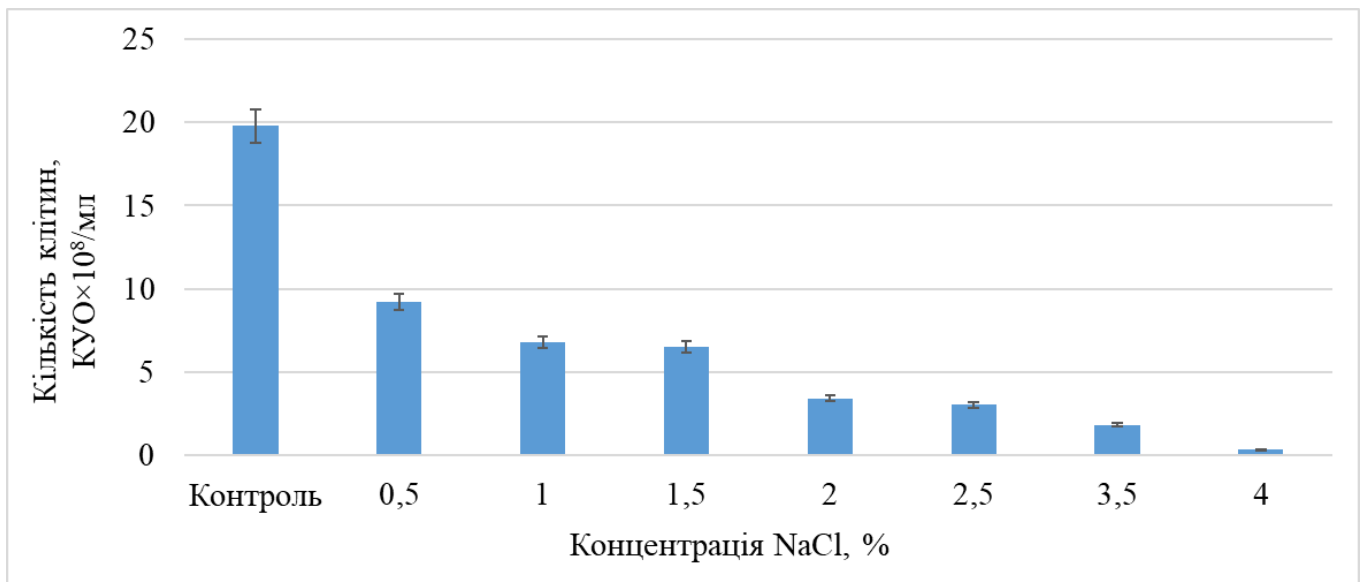


Рис. 3.5. Кількість клітин молочнокислих мікроорганізмів (КУО×10⁸ /мл) в залежності від концентрації NaCl у поживному середовищі

Аналізуючи отримані результати досліджень встановили, що сіль у будь яких концентраціях сприяє зниженню активності розмноження молочнокислих мікроорганізмів, про що свідчать результати посіву, які наведено в табл. 3.2. та на рис. 3.4.

Встановлено, що при концентрації 2% та 2,5%, сіль гальмує та згубно впливає на молочнокислі мікроорганізми. Тому, що сіль знижує активність води, погіршуючи тим самим умови існування молочнокислих мікроорганізмів йде зневоднення клітини молочнокислих мікроорганізмів. Результатами експерименту доведено, що при концентрації масовій концентрації солі 4% у молочному агарі – відбувається повне пригнічення розвитку молочнокислих мікроорганізмів (відсутній ріст будь яких колоній).

3.2. Порівняльна характеристика кисломолочних продуктів типу «Айран»

Для оцінки якості зразків кисломолочного продукту типу «Айран» за допомогою фізико-хімічних методів дослідження, було взято різні зразки: зразок

№1 (2 % жирності); зразок №2 (1 % жирності); зразок №3 — «Айран» лабораторного приготування;

3.2.1. Порівняння якості кисломолочних продуктів за титрованою кислотністю

Було визначено титровану кислотність у одиницях Тернера (°Т) досліджених зразків, кількість молочної кислоти (г) та обраховано результати (табл.3.3).

Таблиця 3.3

Визначення титрованої кислотності зразків «Айрану»

№ зразка	Кількість NaOH, мл <i>a</i>	Кількість молочної кислоти, г	Кислотність, °Т
1	11,5	0,10±	115±
2	9,5	0,08±	95±
3	10	0,09±	100±

Згідно з ГОСТ 31702-2013 «Айран. Технічні умови», титрована кислотність повинна бути від 90-120 °Т (рис. 3.5, 3.6).

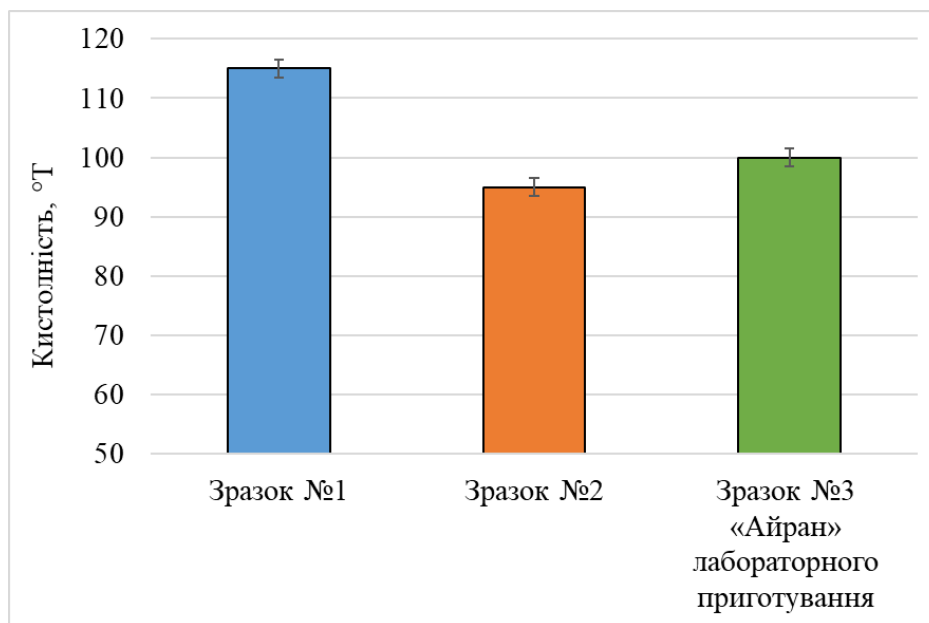


Рис. 3.6. Титрована кислотність (°Т) досліджених зразків «Айрану»

Було визначено, що за титрованою кислотністю і зразки – якісні. Найбільша титрована кислотність у зразку № 1 — 115 °Т, зразку №3 — «Айрану» лабораторного виробництва — 100 °Т. Менша титрована кислотність у зразку № 2 — 95 °Т.

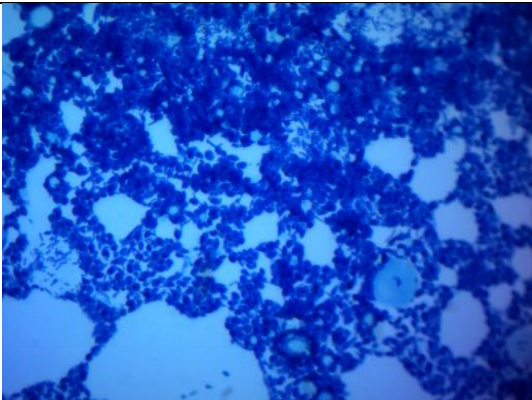
3.2.2. Порівняння якості кисломолочних продуктів за рН та окисно-відновним потенціалом

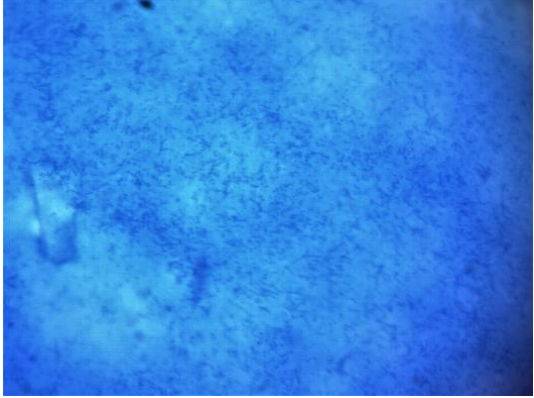
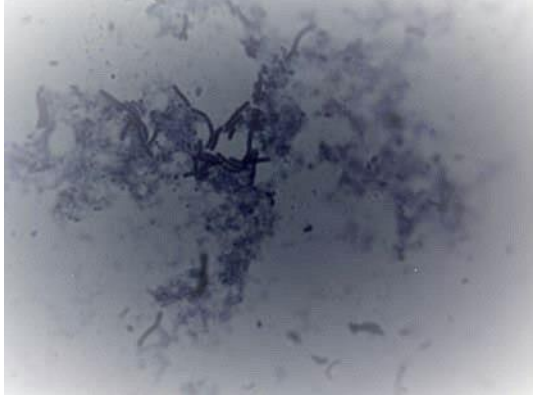
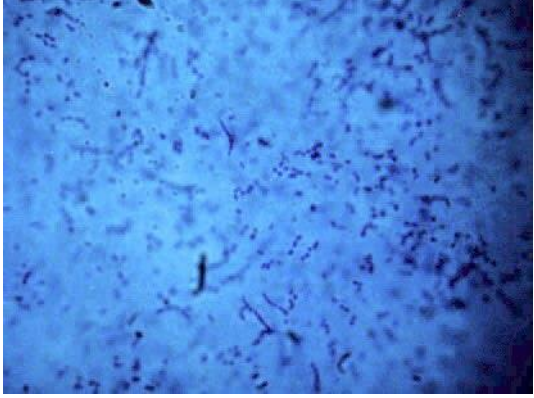
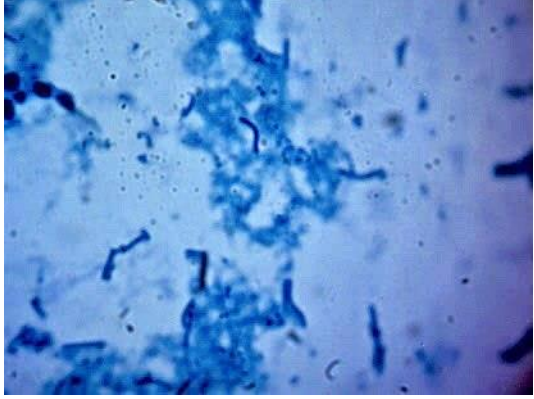
Для визначення рН та окисно-відновного потенціалу (ОВП) в склянки налили по 30 мл зразків «Айрану» №1, №2, №3 та додали кухонну сіль з різний відсотком концентрації: 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 % та 6 % та залишили контроль (без додавання солі).

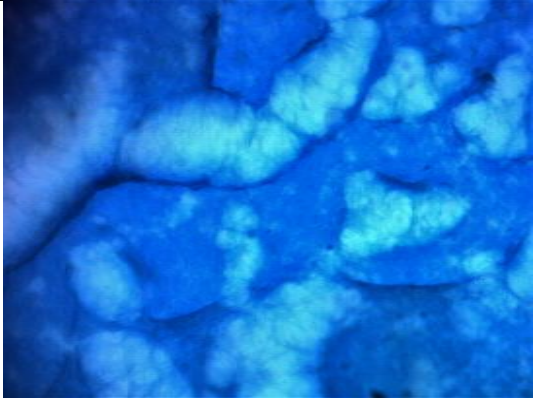
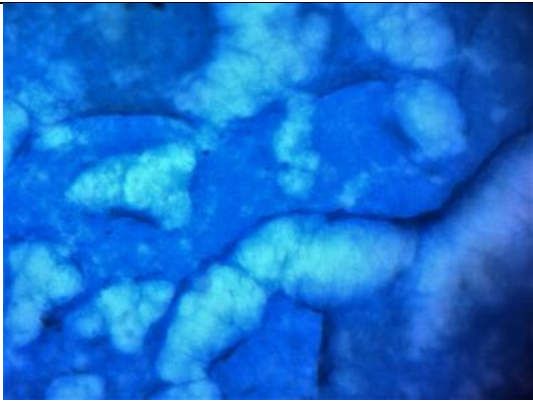
Відповідно до ГОСТ 31702-2013 «Айран. Технічні умови» було використано кухонну харчову сіль по ГОСТ Р 51574. Результати представлені в табл. 3.4, 3.5, 3.6.

Таблиця 3.4

Визначення рН та окисно-відновного потенціалу зразка № 1

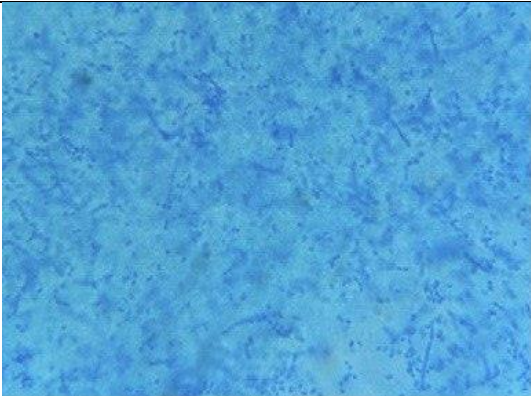
Концентрація солі в розчині, %	Зразок №1		
	Активна кислотність, рН	ОВП, mV	Світлова мікроскопія, збільшення ×1350
Контроль (без додавання солі)	4,6	-19	

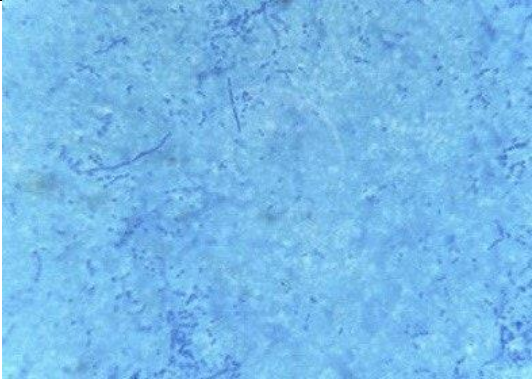
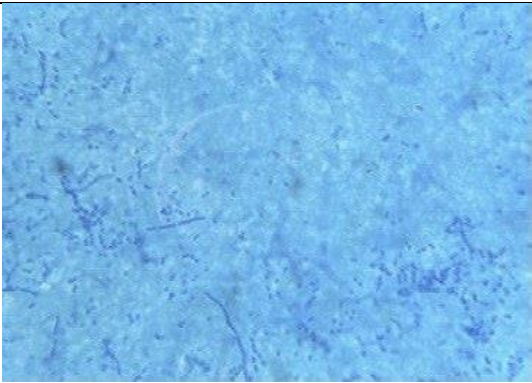
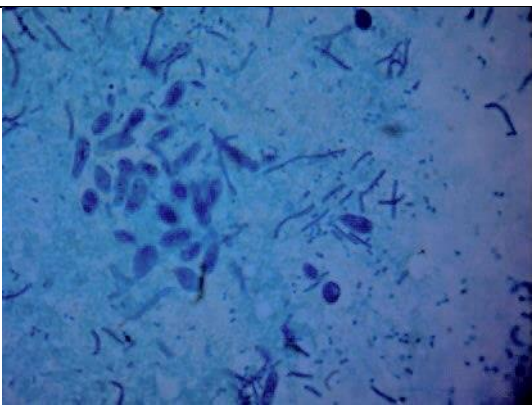
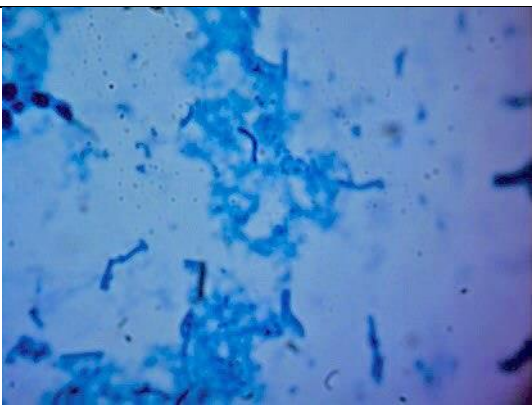
1	4,57	-17	
2	4,52	-14	
3	4,49	-12	
4	4,46	-10	

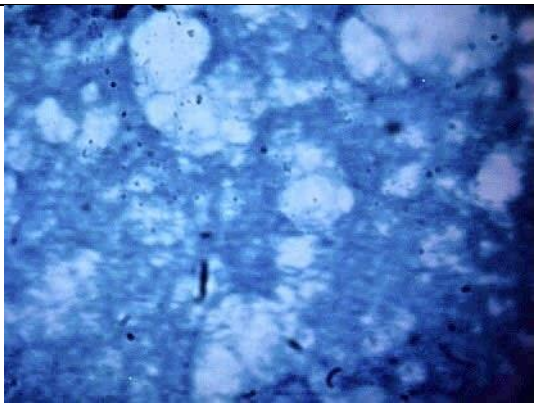
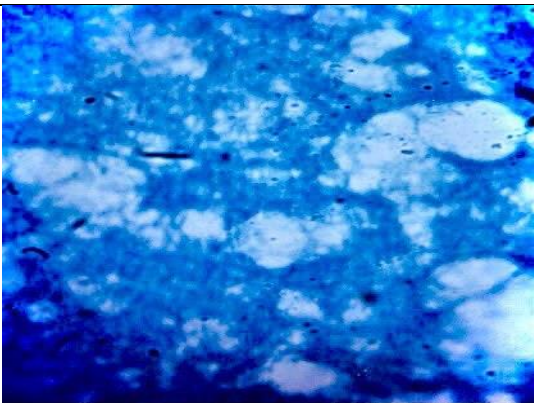
5	4,44	-9	
6	4,42	-8	

Таблиця 3.5

Результат визначення рН та окисно-відновного потенціалу зразка № 2

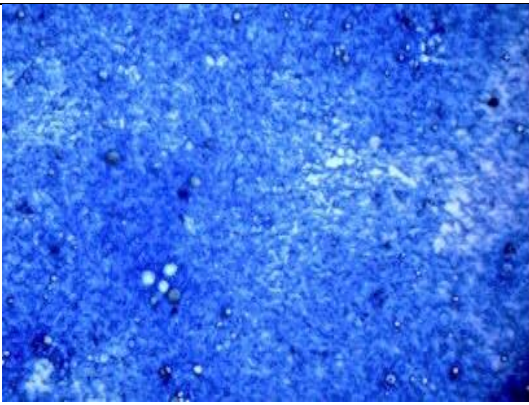
Концентрація солі в розчині, %	Зразок № 2		
	Активна кислотність, рН	ОВП, mV	Світова мікроскопія, збільшення 1350
Контроль (без додавання солі)	4,46	-15	

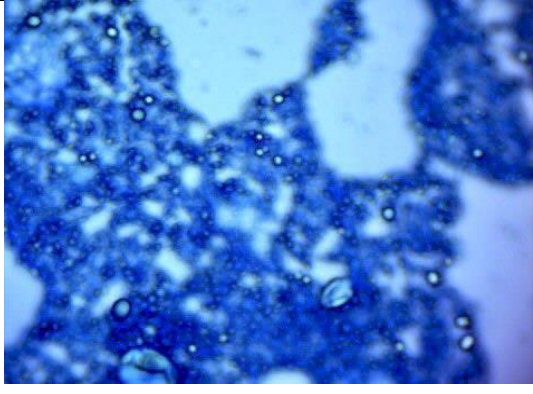
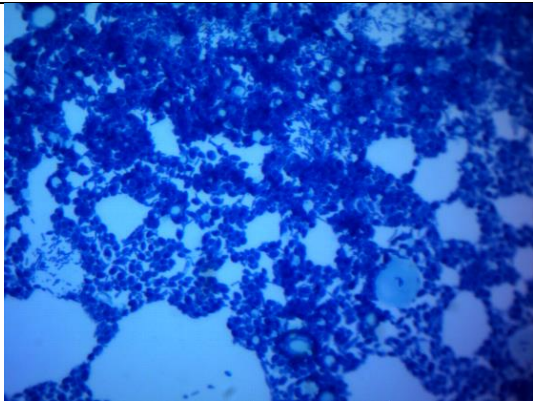
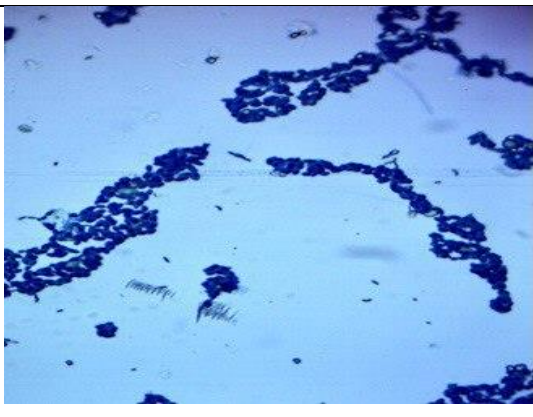

1	4,14	+7	
2	4,05	+13	
3	4,04	+14	
4	3,97	+19	

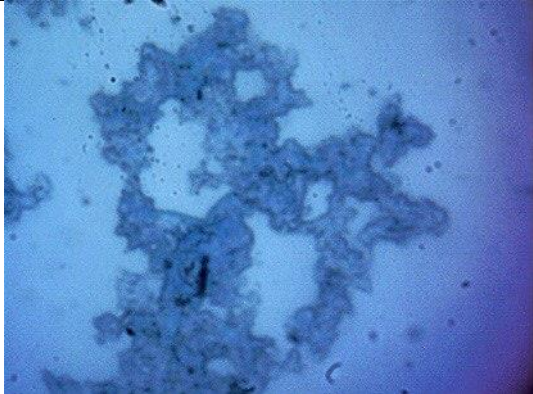
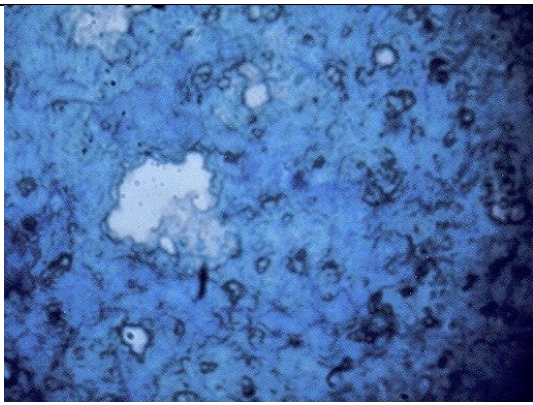
5	3,95	+20	
6	3,94	+21	

Таблиця 3.6

Визначення рН та окисно-відновного потенціалу
зразка № 3 — «Айран» лабораторного приготування

Концентрація солі в розчині, %	Зразок № 3 — «Айран» лабораторного виробництва		
	Активна кислотність, рН	ОВП, mV	Світлова мікроскопія, збільшення $\times 1350$
Контроль (без додавання солі)	4,7	-38	

1	4,62	-33	
2	4,58	-28	
3	4,53	-23	
4	4,47	-18	

5	4,44	-13	
6	4,42	-10	

Аналізуючи представлені результати досліджень встановлено (рис. 3.7) :

— в зразку № 1 внаслідок осмотичного тиску відбувається збільшення показника ОВП, що свідчить про призупинення та уповільнення процесів ферментації «Айрану», що супроводжується підвищенням цього показника. Тобто, біологічна система знаходиться у окислювальному стані. Це підтверджує, що сіль має властивості консерванту, який гальмує мікробіологічні зміни у даному продукті.

— в зразку № 2 сіль в будь яких концентраціях приводить до гальмування біотехнологічних процесів, які характеризуються зниженням чисельності та титру молочнокислих мікроорганізмів і як наслідок до порушення рівноваги та зміни ОВП у бік позитивних значень (ОВП дорівнює +10, +25 мілівольт). Це говорить про те, що кухонна сіль призупиняє процеси бродіння, що негативно впливають на життєздатність клітин, але використання її у невеликих концентраціях дозволить збільшити термін реалізації продукту.

— В зразку № 3, при використанні закваски «Імуно Vivo», яка характеризується високим титром молочнокислих мікроорганізмів та їх активністю, дозволяє навіть при збільшених концентраціях солі реалізувати ферментаційні процеси в біотехнології виробництва кисломолочного продукту типу «Айран». Встановлено, що при додаванні будь яких концентрацій солей відбувається збереження негативного потенціалу ОВП (-25, -10 мілівольт).

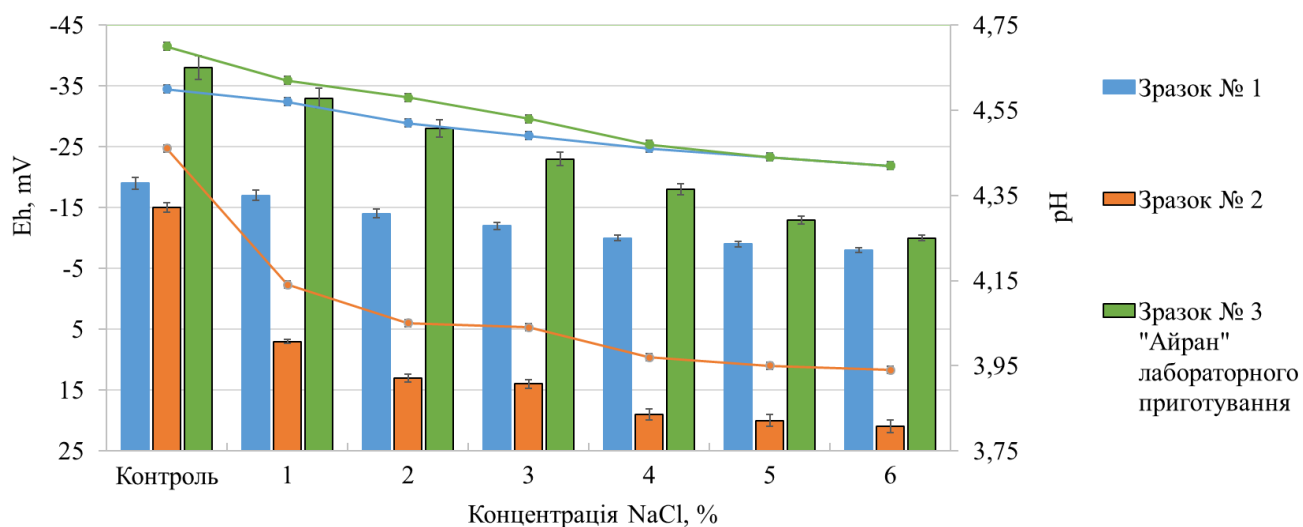


Рис. 3.7. Залежність Eh (mV) та pH зразку № 3 залежно від концентрації NaCl (%)

3.3. Порівняння якості кисломолочних продуктів за органолептичними показниками

Для визначення оцінки якості кисломолочного продукту був проведений метод визначення органолептичних показників (зовнішній вигляд та консистенція, смак і запах, колір продукту) дослідних різних зразків «Айрану». Результати визначення органолептичних показників наведені в табл.3.7.

Для визначення загальної оцінки якості «Айрану» промислових зразків та «Айрану» лабораторного виробництва було проведено експертний метод органолептичної оцінки.

В дегустації приймали участь 3 студенти групи ФБ-402 Національного авіаційного університету та мої батьки: Полончук Л.Ю., Дорошенко Є.О., Вернигора А.В, Шевчук Т.М., Шевчук О.М..

Таблиця 3.7

Порівняння органолептичних показників якості зразків «Айрану» та «Айрану» власного виробництва

№ зразку	Органолептичний показник		
	Зовнішній вигляд та консистенція	Смак і запах	Колір
1	Однорідна рідина, без пластівців, в міру густа, без газоутворення	Солонуватий, без сторонніх присмаків та запахів	Білий, рівномірний за всією масою
2	Однорідна рідина, без пластівців, з невеликою кількістю газоутворення	Кисломолочний, без сторонніх присмаків та запахів	Молочно—білий, рівномірний —за всією масою
3	Однорідна рідина, в міру густа, без газоутворення	Солонуватий кисломолочний, без сторонніх присмаків та запахів	Білий, рівномірний за всією масою

Відповідно до ГОСТ 31702-2013 «Айран. Технічні умови» на кисломолочний продукт типу «Айран» була проведена органолептична оцінка дослідних зразків. Експертний метод органолептичної оцінки полягав у визначенні якості продукту незалежними експертами. При цьому враховували вагомість кожного одиничного показника якості продукту.

Кожний одиничний показник якості кефіру оцінювали по 5-ти бальній системі: 5 — відмінно, 4 — добре, 3 — задовільно, 2 — незадовільно, 1 — дуже погано.

Згідно ГОСТ 31702-2013 «Айран. Технічні умови» одиничними зразками якості 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 проб «Айрану» 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 проб 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 «Айрану» обрані експерти проставили бали за кожним одиничним показником якості кефіру. Результат отриманих оцінок від дегустаторів представлена в табл. 3.8.

Таблиця 3.8

Статистична обробка результатів дегустації дослідних зразків «Айрану»

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

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

Отже, проведено визначення якості «Айрану» за органолептичними показниками експертним методом (рис. 3.8). В результаті дослідні проби кефірів отримали такі оцінки: зразок №1 — 4,6 балів, зразок №2 — 3,66 балів, зразок №3 — 4,73 балів;

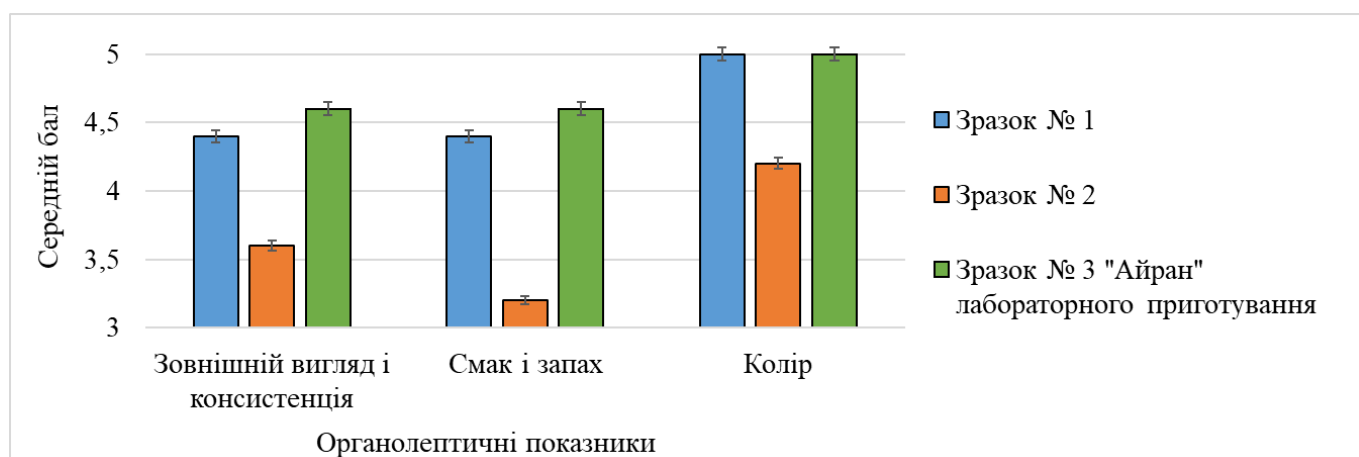


Рис. 3.8. Оцінка зразків «Айрану» за зовнішнім виглядом і консистенцією, смаком і запахом, коліром

3.4. Удосконалення схеми виробництва кисломолочного продукту типу «Айран»

В промисловому виробництві кисломолочного продукту типу «Айран» найчастіше використовується резервуарний спосіб приготування. Для удосконалення схеми виробництва запропонували лабораторне виробництво кисломолочного продукту типу «Айран».

Для приготування лабораторного кисломолочного продукту типу «Айран» було використано закваску «Імуно VIVO» яка складається з 9 штамів молочнокислих мікроорганізмів: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* (2 штаму), *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis* (2 штаму).

Для приготування «Айрану» використовували великий посуд, призначений для зберігання харчових продуктів (для вистоювання «Айрану»). У нашому випадку це пластмасовий бачонок.

Приготування кисломолочного продукту типу «Айран» в лабораторних умовах здійснювався за такими етапами (рис. 3.9):

I. Було взято 1 л домашнього (сирого) коров'ячого молока. Перед застосуванням молоко прокип'ятили та дали охолонути до температури 39-40 °С.

II. Флакон із закваскою наполовину наповнили молоком, закрили та збвтали до повного розчинення закваски. Розчинену закваску «Імуно VIVO» влили в молоко, перемішали, додали 2 г кухонної солі та ще раз ретельно перемішали.

III. Для сквашування перелили суміш молока з закваскою в пластиковий бачонок. Закрили кришку, та поставили холодильну камеру.

IV. Кілька разів в день відкривали ємність і перемішували вміст. Робили це протягом трьох днів. За ці дні в процесі вимішування ми змогли спостерігати, як спочатку рідке молоко, що має характерний молочний запах, поступово починав густіти, і з ємності лунав дуже характерний злегка кислуватий молочний запах «Айрану». Саме після трьох днів наш напій був готовий.

V. Фільтрували та розливали в ємності, в яких потім зберігали його в холодильній камері. Для цього підготували та взяли посуд, воронку і невелике сито з дрібним вічком. Та через це сито розливали готовий «Айран» в пляшки.

VI. Ємності з готовим айраном помістили в холодильну камеру, для досить довго зберігання

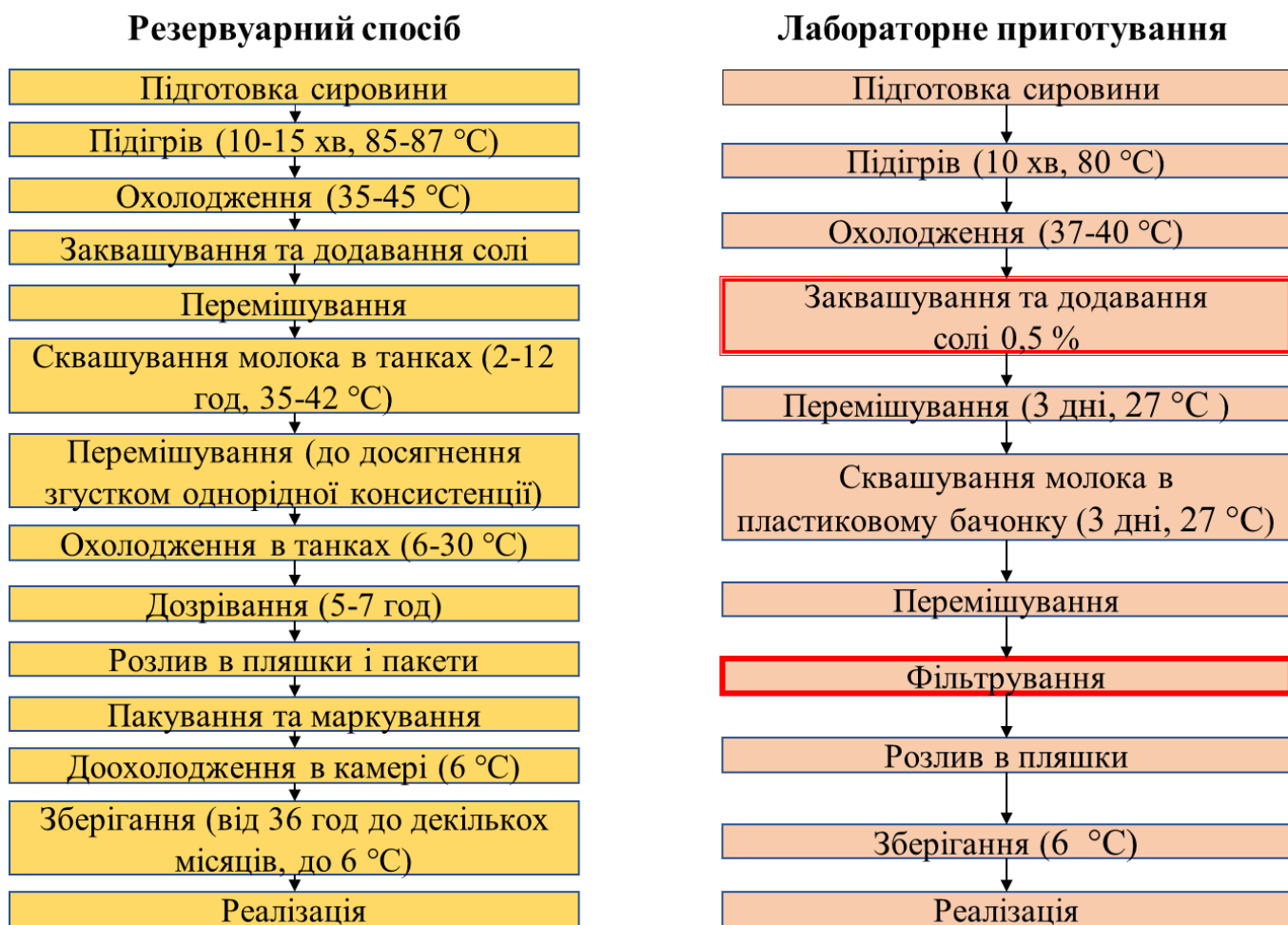


Рис. 3.9. Удосконалена блок схема виробництва кисломолочного продукту типу «Айран»

Резервуарний спосіб налічує 14 етапів. Було удосконалено цю схема на етапах заквашування та додавання солі 0,5% та на етапі фільтрування. В резервуарному способі також використовується сіль, але ні в якому ГОСТі, які було нами проаналізовано, це не прописується для промислового виробництва. В нашому

лабораторному способі було досліджено різні концентрації солі, концентрація солі яку мі використовували було 0,5 %. В промисловому виробництві не проводять фільтрування готової сировини, в лабораторному приготуванні відфільтровували сирну суспензія, щоб сам «Айран» став однорідніше.

Згідно ГОСТ 31702-2013 «Айран. Технічні умови» кисломолочний продукт «Айран» лабораторного виробництва відповідає фізико-хімічним та органолептичним показникам.

3.5. Висновки до розділу

Зразок №1:

— згідно з ГОСТ 31702-2013 «Айран. Технічні умови» дана проба відповідає граничній нормі титрованої кислотності. За візуальним спостереженням бачимо слаборожевий колір забарвлення розчину, згущувачів або інших домішок.

— згідно з ГОСТ 31702-2013 «Айран. Технічні умови», контроль даної проби відповідає вимогам за показником рН – 4,6 (норма 4,0-4,8). Зі збільшення концентрації солі в зразку відбувається зменшення активної кислотності, це говорить про те, що активність іонів водню зменшується, тобто відбувається кисла реакція.

— негативне значення показника ОВП (-19) контролю даного проби свідчить про те, що він має відновні властивості, це свідчить про його антиоксидантну активність, тобто активність молочнокислих мікроорганізмів та його корисність при вживанні. Зі збільшення концентрації солі в зразку, відповідно при зменшенні рН значення окисного-відновного потенціалу зростає.

Зразок №2:

— згідно з ГОСТ 31702-2013 «Айран. Технічні умови» дана проба відповідає нормі титрованої кислотності.. За візуальним спостереженням бачимо темнорожевий колір забарвлення розчину, це говорить про те, що дана проба якісна.

— згідно з ГОСТ 31702-2013 «Айран. Технічні умови», контроль даної

проби відповідає вимогам за показником рН – 4,46 (норма 4,0 – 4,8). Зі збільшення концентрації солі в зразку відбувається зменшення активної кислотності, це говорить про те, що активність іонів водню зменшується, тобто відбувається кисла реакція.

— негативне значення показника ОВП (-15) контролю даної проби свідчить про те, що він має відновні властивості, це свідчить про його антиоксидантну активність, тобто активність молочнокислих мікроорганізмів та його корисність при вживанні. Зі збільшення концентрації солі в зразку, відповідно при зменшенні рН значення окисного-відновного потенціалу зростає.

Зразок №3 – «Айран» лабораторного виробництва:

— згідно з ГОСТ 31702-2013 «Айран. Технічні умови» дана проба відповідає нормі титрованої кислотності.. За візуальним спостереженням бачимо темнорозовий колір забарвлення розчину, це говорить про те, що дана проба якісна.

— згідно з ГОСТ 31702-2013 «Айран. Технічні умови», контроль даної проби відповідає вимогам за показником активної кислотності – 4,7 (норма 4,0-4,8). Зі збільшення концентрації солі в зразку відбувається зменшення активної кислотності, це говорить про те, що активність іонів водню зменшується, тобто відбувається кисла реакція.

— негативне значення показника ОВП (-38) контролю даного зразку свідчить про те, що він має відновні властивості, це свідчить про його антиоксидантну активність, тобто активність молочнокислих мікроорганізмів та його корисність при вживанні. Зі збільшення концентрації солі в зразку, відповідно при зменшенні рН значення окисного-відновного потенціалу зростає.

Та було удосконалено цю схема на етапах заквашування та додавання солі 0,5% та на етапі фільтрування.

ВИСНОВКИ

1. Сіль - осмотично-стресовий агент для молочнокислих мікроорганізмів. Для виробництва кисломолочного продукту типу «Айран» використовують гомо- та гетероферментативні бактерії: термофільний стрептокок, лактобактерії та біфідобактерії, дріжджі. При виробництві кисломолочного продукту «Айран» використовуються резервуарний і термостатний способи, які відрізняються етапами сквашування та визрівання сировини.

2. Визначено, що оптимальна кількість молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO» становить 19×10^8 КУО/мл. Визначено осмочутливість молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO» до 2% та 2.5%.

3. Досліджено, що кількість життєздатних молочнокислих мікроорганізмів закваски «Імуно VIVO» зменшується з підвищеною концентрацією солі в порівнянні з контролем. Так при 0,5% - у 2 рази, 1-1,5% - в 3 рази, 2-2,5% - у 10 разів.

4. Порівняно якість зразків кисломолочних продуктів типу «Айран» промислового виробництва та лабораторного приготування. Всі зразки за титрованою кислотністю – якісні. Найбільші титровані кислотності у зразках №1 (115°Т), зразка №3 лабораторного приготування (100°Т), менша титрована кислотність у зразку №2 — 95 °Т. Згідно ГОСТ 31702-2013 за органолептичними показниками найбільш якісним кисломолочним продуктом є зразок № 1 та зразок №3 лабораторного приготування (4,5-4,8 балів). Визначено, що закислення відбувалося більше у зразку №2 (рН 3,9 , ОВП +5mV), менше у №1 та №3 №3 (рН 4,4 ?ОВП -13мВ), №1 (рН 4,2 ОВП -7мВ).

5. Удосконалено схему виробництва кисломолочного продукту типу «Айран» на стадії заквашування та фільтрування.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Даниленко С. Г. Дослідження впливу різних факторів на життєздатність молочнокислих бактерій / Даниленко С. Г. // Продовольчі ресурси. Серія : Технічні науки. — 2014. — № 3. - С. 130-134.
2. Pohilko Y. M., Kravchenko N. O. Probiotic properties of bacteria of *Lactobacillus* genus isolated from the gastrointestinal tract of rabbits / Pohilko Y. M., Kravchenko N. O. // *Studia Biologica*. — 2018.—Vol. 12. — P. 35–46.
3. Юкало В. Аналіз методів консервування продуктів / В. Юкало, О.Гащук // Вісник Тернопільського національного технічного університету — 2010. — № 1. — 36 - 48с.
4. Христова Т.Є. Еволюція поглядів на осмотичні явища/ Т.Є. Христова, О.Є. Пюрко, М.М. Мусієнко // Український ботанічний журнал. — 2009. — № 2. — С. 254-261.
5. Кудрашева А. А. Пищевые добавки и продовольственная безопасность / Кудрашева А. А. Шокина Л. И. // Пищ.ингредиенты. — 2000. — № 1. — С. 4-8
6. Баснакьян И.А. Стресс у бактерий / Баснакьян И.А. // Монография. — М.: Медицина, 2003. — 134 с.
7. Alcántara C. Proteomic and transcriptomic analysis of the response to bile stress of *Lactobacillus casei* BL23 / C. Alcántara, M. Zúñiga// *Microbiology*. — 2012. — №1 – P. 158-164
8. Nelson D. L. Principles of Biochemistry / D. L. Nelson, M. M. Cox // NY: Freeman and Company, 2008. — 1294 p.
9. Atkins P. Atkins' Physical Chemistry / P. Atkins, J. De Paula // NY: Freeman and Company, 2006. — 1085 p.
10. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria // K. Papadimitriou et al. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 2016. —Vol. 8. —P. 890 -910

11. Машкін М. І. Технологія молока і молочних продуктів: Навчальне видання / М. І. Машкін, Н. М. Париш — К.: Вища освіта, 2006. — 351 с.
12. Квасников Е. И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е. И. Квасников, О. А. Нестеренко. – М: "Наука", 2005. – 385 с.
13. Баранова Ю. П. Принципы оценки безопасности пищевых добавок и контаминантов в продуктах питания / Ю. П. Баранова — М.: «Медицина» по материалам ВОЗ , 1991. — 157 с.
14. Кігель Н. Ф. Критерії відбору заквашувальних культур / Н. Ф. Кігель, Г. Ф. Насирова // Вісник аграрної науки. – 2002. — № 2. – С. 60-68
15. Орлова Е.А. Технология производства молочных продуктов / Орлова Е.А., Мордвинова В.А., Остроухова И.Л. // Молокопереработка. – № 12. – 2009. – 58 с.
16. Флауменбаум Б. Л. Фізико-хімічні і біологічні основи консервного виробництва / Б. Л. Флауменбаум, А. Т. Безусов, В. М. Сторожук, Г. П. Хомич. — О: Друк, 2006. — 400 с
17. Степанова Л.И. Справочник технолога молочного производства. Технология и рецептуры / Степанова Л.И. — СПб.: ГИОРД, 2010. — 384 с.
18. Скорченко Т. А. Технологія незбираномолочних продуктів / Т. А. Скорченко, Г. Є. Поліщук, О. В. Грек, О. В. Кочубей — В.: Нова Книга, 2005. —264 с
19. Ruiz L. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* / Ruiz L., Margolles A., Sanchez B. // *Frontiers in Microbiology*. —2013.—Vol. 4.— 1-8 P.
20. Songisepp E. Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers / E. Songisepp, J. Kals, T. Kullisaar // *Nutr. J.* — 2005. — Vol. 4. — 1-10 P.
21. Maldonado C. Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria / C. Maldonado, A. de Moreno de LeBlanc, G. Vinderola // *Clin. & Vac. Immunol.* – 2007. — Vol. 14.— P. 492- 525

22. Шагинурова Г.Н. Техническая микробиология: учебно—методическое пособие / Шагинурова Г.Н. // Казан. гос. технол. ун. — К.: КНИТУ, 2010. — 124 с.
23. Chou L. S. Isolation and characterization of acid – and bile – tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* / L.S. Chou, B.Weimer. — 1999. — 44 p.
24. Громов Б. В. Экология бактерий / Б. В. Громов, Г. В. Павленко. – Л.: Издво ЛГУ, 2009. — 264 с.
25. Hartke A. Starvation - induced stress resistance in *Lactococcus lactis subsp. lactis IL 1403* / A. Hartke, S. Bouche, X. Gansel // Appl. and Envir. Microbiol. — 2004. — №2. — P. 236-258
26. Zotta T. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry / T. Zotta, E. Parente, A.Ricciardi. — 2017. — №5 — P. 857—869
27. Определитель бактерий Берджи // Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита и др.; Пер. с англ. в 2 т. — М.: Мир, 2001. — 743 с.
28. Дикий И. Л. Мікробіологія / Дикий И. Л. – К.: Видавничий дім “Професіонал”, 2007. — 624 с.
29. Бухарин О.В. Механизмы выживания бактерий / Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. — М.: Медицина, 2005. — 367 с.
30. Барабанщиков Н.В. Молочное дело / Н.В. Барабанщиков // 2 изд., перераб. и доп. — М.: Агропромиздат, 2002. — 351 с.
31. Похлебкин В.В. Национальные кухни наших народов / Похлебкин В.В.— М.: Пищевая пром-сть, 2008. — 180 с.
32. Жвирблянская А.Ю. Микробиология в пищевой промышленности / А. Ю. Жвирблянская, О.А. Бакушинская – М.: Пищевая промышленность, 2005. – 500 с.
33. Слюсаренко Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств / Слюсаренко Т.П. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 2004. —210 с.

34. Егоров Н.С. Биотехнология: учебное пособие для вузов / Егоров Н.С., Самуилов В.Д. // М.: Высшая школа, 2007. — 139 с.
35. Белова Г. А. Технология сыра: Справочник /Г. А. Белова, И. П. Бузов, К. Д. Буткус // Под общ. ред. Г. Г. Шиллера. — М.: Легкая и пищевая пром-сть, 2006. — 312 с.
36. Калинина Л. В. Технология цельномолочных продуктов / Калинина Л. В., В. И. Ганина, Н. И. Дунченко — СПб: Гиорд, 2008. — 167 с.
37. Векірчик К.М. Практикум з мікробіології / Векірчик К.М. — К.: Либідь, 2001. — 156 с.
38. Каплін М. М. Практикум до практичних занять з мікробіології, вірусології та імунології / М. М. Каплін, В. М. Голубнича, Т. В. Івахнюк. — С: СумДУ, 2013. — 85 с.
39. ГОСТ 31702-2013. Айран. Технические условия.
40. ГОСТ Р 51574. Соль пищевая. Основные технические условия.