

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 ультразвукових коливань на молочнокислі бактерії при
технології виготовлення біойогурту»**

Виконавець: студент групи ФБ-402

Дорошенко Є.О.

Керівник: к.с.-г.н., доцент

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»

ОПП: «Фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач випускової кафедри

_____ М.М. Барановський

«___» _____ 2021 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Дорошенко Євгеній Олександрович

1. Тема дипломної роботи: «Вплив ультразвукових коливань на молочнокислі бактерії при технології виготовлення біойогурту» затверджена наказом ректора від «11» травня 2021 р. № 715/ст.
2. Термін виконання роботи: з 17 листопада 2020 р. по 01 червня 2021 р.
3. Вихідні дані роботи: власні експериментальні дані зроблені на базі Національного авіаційного університету, літературні джерела.
4. Зміст пояснювальної записки: ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ; ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ; ДОДАТКИ.
5. Перелік обов'язкового ілюстративного матеріалу: 14 рисунків, 13 таблиць, 1 додаток.

6. Календарний план-графік

№ з/п	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Літературний огляд та збір інформації за темою дипломної роботи «Вплив ультразвукових коливань на молочнокислі бактерії в технології виготовлення біойогурту»	10.05.21 – 16.05.21	
2	Виконання експериментальної частини	16.11. – 20.11.2020	
3	Написання основної частини	16.05.21 – 22.05.21	
4	Формулювання висновків та рекомендацій	22.05.21 – 25.05.21	
5	Перевірка дипломної роботи керівником	23.05.21 – 30.05.21	
6	Кінцеве оформлення роботи	26.05.21 – 30.05.21	
7	Захист дипломної роботи	15.06.2021	

7. Консультація з окремого(мих) розділу(ів):

8. Дата видачі завдання «7» листопада 2020 р.

Керівник дипломної роботи:

(підпис керівника)

Ястремська Л.С.
(П.І.Б.)

Завдання прийняв до виконання:

(підпис випускника)

Дорошенко Є.О.
(П.І.Б.)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Вплив ультразвукових коливань на молочнокислі бактерії при технології виготовлення біойогурту»: 72 сторінки, 14 рисунків, 13 таблиць, 42 використаних джерела.

Мета дипломної роботи — Вплив ультразвукових коливань на молочнокислі бактерії в технології виготовлення біойогурту.

Об'єкт дослідження – процес впливу ультразвукових коливань на молочнокислі бактерії в технології виготовлення біойогурту.

Предмет дослідження – молочнокислі бактерії при дії ультразвукових коливань в технології виготовлення біойогурту.

Методи дослідження – мікробіологічні, фізико-хімічні, аналітичні, статистичні методи дослідження.

Результатом дипломної роботи є: виявлення оптимальної частоти ультразвукових коливань, при якій відбувається підвищення біологічної активності біойогурту та зменшення часу ферментації молока.

ЙОГУРТ, БІОЙОГУРТ, МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ, УЛЬТРАЗВУК, ФЕРМЕНТАЦІЯ, ТИТР, БРОДІННЯ.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	12
1.1. Загальна характеристика біойогурту.....	12
1.2. Молочнокисле бродіння	17
1.3. Морфологічні та культуральні особливості молочнокислих бактерій закваски «VIVO»	19
1.4. Сучасні технології виготовлення біойогуртів.....	24
1.5. Вплив ультразвуку на активність біологічних об'єктів	27
1.6. Висновки до розділу.....	30
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	32
2.1. Основні етапи проведення експериментальних досліджень	32
2.2. Методи контролю процесу культивування.....	33
2.3. Методика впливу ультразвуку на фізико-хімічні показники досліджуваних зразків біойогурту	36
2.4. Методи визначення показників якості лабораторного біойогурту	38
2.4.1. Визначення органолептичних показників якості лабораторного біойогурту... 39	
2.4.2. Визначення фізико-хімічних показників якості лабораторного біойогурту.....	40
2.5. Висновки до розділу.....	45
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	46
3.1. Дослідження впливу ультразвукової обробки на активність клітин лібораторного біойогурту	46
3.2. Дослідження впливу ультразвукової обробки лабораторного біойогурту	47
3.3. Порівняльна оцінка показників якості лабораторного та промислових біойогуртів	52
3.3.1. Визначення органолептичних показників якості йогуртів	52
3.3.2. Визначення фізико-хімічних показників якості йогуртів	53
3.3.3. Визначення мікробіологічних показників йогурту	54

3.4. Удосконалена технологічна схема виготовлення біойогуртів	58
3.5. Висновки до розділу	59
ВИСНОВКИ	60
СПИСОК БІБЛОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	61
ДОДАТКИ.....	65

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

УЗ - ультразвук

УЗВ - ультразвуковий вплив

УФ- ультрафіолет

ДСТУ – Державні стандарти України

ГОСТ - Межгосударственный стандарт

ВСТУП

Актуальність теми. Актуальною проблемою сьогодення є якісні молочнокислі продукти. Перед сучасним суспільством постало питання щодо підвищення якості, біологічних цінностей, безпечності, покращення смакових показників та розширення асортименту вибору молочнокислих продуктів.

Зважаючи на екологічну ситуацію в Україні та світі, та зростаючу частоту захворювань, у всіх країнах світу сформульована державна політика у сфері харчування. Розробка нових технологій функціональних молочнокислих продуктів є надзвичайно актуальною. Функціональні харчові продукти призначені підтримати та покращити здоров'я людини, володіють профілактично-лікувальною дією, вони є джерелом корисних вітамінів і амінокислот. Першочерговою задачею науковців-харчовиків є створення функціональних продуктів профілактичного призначення, а задачею держави популяризація їх серед населення, поряд з пропагандою здорового способу життя. Держава захищає своїх громадян, застосовуючи механізми контролю виробників шляхом впровадження стандартів. В Україні діють такі державні стандарти на молочнокислі продукти: «ДСТУ 7999:2015 Продукти харчові. Методи визначання молочнокислих бактерій» [1], «ДСТУ 4540:2006 Напої ацидофільні» [2], «ДСТУ 7710:2015 Продукти кисломолочні для дитячого харчування» [3], «ДСТУ ISO 9232/ IDF 146:2012 Йогурт. Ідентифікація характерних мікроорганізмів *D (Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* та *Streptococcus thermophilus*) (ISO 9232:2003 (IDF 146:2003)» [4], «ДСТУ ISO 11869:2007 Йогурт. Визначення титрової кислотності потенціометричним методом (ISO 11869:1997, IDT)» [5].

Функціональні харчові продукти – це продукти, які отримані з природних інгредієнтів, та містять велику кількість біологічно активних речовин; можуть і повинні входити до щоденного раціону харчування людини; при вживанні повинні регулювати певні процеси в організмі (наприклад, стимулювати імунні реакції, попереджувати розвиток захворювань, передчасне старіння і т.д., інакше кажучи, призначені покращити здоров'я споживача та зменшити ризик захворювань) [6].

Ці продукти можуть знижувати рівень холестеролу, мають протизапальну дію та відновлюють мікробіологічний баланс. Молочнокислі продукти відіграють важливу роль в житті кожної людини, адже вони допомагають нам з оздоровленням і зміцненням нашого організму. Важливим компонентом раціону функціональні продукти стають при перебуванні людей в космосі, коли вони знаходяться під дією високих або низьких температур та під впливами мікрогравітації (особливо ефективними в такому разі можуть бути напої, збагачені вітамінами та рослинними екстрактами). За таких умов функціональне харчування може бути використане як тонізуючий та оздоровчий компонент раціону, а також з метою попередження розвитку перетому та виснаження організму.

В сучасній мікробіології актуальними є питання вивчення особливостей та механізмів впливу зовнішніх фізичних факторів на стан мікроорганізмів молочних продуктів зокрема, бактерій, для можливого використання цих факторів при вирішенні складних завдань та впровадження нових технологій у медицину та біологію.

Існує велика кількість фізичних методів дії на активність молочнокислих бактерій, але популярним методом є використання ультразвукової обробки.

Незважаючи на те, що ультразвук (УЗ) давно використовується в різних віддзеркаленнях наук, техніки, але у медицині його вплив на мікроорганізми вимагає більш детального вивчення. Ультразвукові хвилі володіють великою механічною енергією та викликають ряд фізичних, хімічних та біологічних явищ [7]. Ультразвук має велике значення у сьогоденні та знайшов застосування у біотехнології.

Ультразвуком називають механічні коливання пружного середовища з частотою, що перевищує верхню межу чутності -20 кгц. Він має локальний образ дії на матеріал дослідження [8].

Відомі способи надвисокочастотної обробки в безперервному і імпульсному режимі, ультрафіолетове та інфрачервоне випромінювання, електроконтактні нагрів, обробка в електростатичному полі та ін.

Сьогодні методи ультразвукового впливу (УЗВ) визначені світовим науковим співтовариством як особливо перспективна технологія для харчової промисловості в

цілому і молочної галузі зокрема. Доведено, що механічні та хімічні ефекти, які генеруються низькочастотним ультразвуком високої інтенсивності, може бути корисним для інактивації патогенних мікроорганізмів в харчових продуктах і знаходять застосування в процесах пастеризації та стерилізації мікроорганізмів в харчових продуктах.

Метою даної роботи є вплив ультразвукових коливань на молочнокислі бактерії в технології виготовлення біойогурту.

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

1. Проаналізувати молочнокислі мікроорганізми пробіотичних препаратів, сучасні технології виготовлення біойогуртів на виробництві та застосування ультразвуку на біологічні об'єкти.
2. Дослідити кількість клітин закваски “VIVO” методом Коха до та після дії ультразвуку;
3. Визначити кількість лакто- та біфідобактерій на диференційно-діагностичних середовищах після дії ультразвуку;
4. Порівняти органолептичні, фізико-хімічні та мікробіологічні показники якості лабораторного біойогурту та відомих торгових марок після дії ультразвукових коливань.
5. Запропонувати удосконалену технологічну схему виготовлення біойогуртів

Об'єкт дослідження – процес впливу ультразвукових коливань на молочнокислі бактерії в технології виготовлення біойогурту.

Предмет дослідження – молочнокислі бактерії при дії ультразвукових коливань в технології виготовлення біойогурту.

Методи дослідження – мікробіологічні, фізико-хімічні, аналітичні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Для активного росту молочнокислих мікроорганізмів доцільно застосування ультразвукової обробки молочної сировини в технології виробництва біойогурту. Встановлено, що дія ультразвукової обробки з частотою 200 кГц та тривалістю 10 хв сприятлива для росту

та активності молочнокислих мікроорганізмів. За органолептичними, мікробіологічними та фізико-хімічними показниками отриманий лабораторний біойогурт має переваги порівняно з відомими торговими марками «Активія» та «Молокія».

Практичне значення отриманих результатів. Можна запропонувати застосування ультразвуку в технології виробництва біойогурту для поліпшення споживчих властивостей біойогуртів, які за органолептичними, мікробіологічними та фізико-хімічними показниками не уступають у якості промисловим, відомим торговим маркам. 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 Ястремської Л.С., Корнієнко І.М. та на базі Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сикорського» під керівництвом Єременко В.С., завідувача кафедри інформаційно-вимірювальної техніки, професор, доктор технічних наук.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Загальна характеристика біойогурту

Кисломолочні продукти – це продукти, отримані шляхом сквашування молочної сировини спеціальними мікроорганізмами, які входять до складу заквасок або заквашувальних препаратів. Готові до вживання кисломолочні продукти в кінці терміну придатності повинні містити життєздатні клітини мікроорганізмів у кількості, не меншій ніж 10^6 колоніє-утворюючих одиниць (КУО) в 1 г продукту. У процесі ферментації відбуваються складні мікробіологічні і фізико-хімічні процеси, у результаті яких формуються смак, запах, консистенція і зовнішній вигляд готового кисломолочного продукту [9].

Кисломолочні продукти мають добре виражені харчові, дієтичні, лікувальні та лікувально-профілактичні властивості. Завдяки цим своїм властивостям вони краще засвоюються та найчастіше рекомендуються хворим, які мають розлади шлунково-кишкового тракту. Кисломолочні продукти містять у легкозасвоюваній формі багато корисних речовин, які утворилися в процесі життєдіяльності заквасочних мікроорганізмів. Це частково розщеплені складні сполуки молока (білки, вуглеводи, жир) до простих речовин, ферментів, вітамінів та ін. Крім того, молочнокисла мікрофлора кисломолочних продуктів є антагоністом гнильної й патогенної мікрофлори [9].

На сьогоднішній день одним з найпопулярніших кисломолочних продуктів, який людина використовує у повсякденному вжитку став йогурт [9].

Йогурт - кисломолочний продукт, склад якого збагачений сухими речовинами та культурами болгарської палички *Lactobacillus bulgaricus* та термофільних стрептококів *Streptococcus thermophilus* [10].

Йогурт застосовують як для вживання в їжу так і в косметології. На жаль, на сьогоднішній момент, не всі йогурти, представлені на полицях магазинів, реально

здатні принести користь нашому організму. Багато з йогуртів проходять додаткову термічну обробку, щоб збільшити термін зберігання, але дана процедура не приносить користі нашому організму. Допомога організму може принести тільки той кисломолочний продукт, який містить живі мікроорганізми [8].

Йогурти, залежно від виду закваски, що застосовують для їх виробництва, поділяють на: йогурт, біойогурт та біфідойогурт [9].

Біойогурт - біопродукт на основі йогурту, який додатково містить *Lactobacillus acidophilus* та інші культури молочнокислих бактерій у кількості, не меншій ніж 10^7 КУО/г до закінчення терміну придатності готового продукту. Пробиотичні мікроорганізми сприяють кращому засвоєнню їжі та нормалізує осніний вміст та функції мікрофлори шлунково-кишкового тракту [11].

Біфідойогурт - біфідопродукт на основі йогурту, який додатково містить *Bifidobactericum* у кількості, не меншій ніж 10^6 КУО/г до закінчення терміну придатності готового продукту [11].

Сьогодні промислове виробництво біойогурту, як готового продукту, включає у своїй технології додавання стабілізуючих речовин та різних наповнювачів, внесення бактеріологічних заквасок, що містять чисті культури молочнокислих бактерій.

Основна перевага органічного йогурту для організму полягає в тому, що містяться в ньому молочнокислі бактерії, що можуть впливати на середовище, в яку вони потрапляють. Тобто лікувальну дію корисних бактерій має тривалий ефект. Він дуже корисний для підтримки мікрофлори в організмі та відновлення бактеріального балансу корисних мікроорганізмів кишківника. Регулярне вживання натурального біойогурту допомагає мінімізувати розвиток дисбактеріозу та різних шлунково-кишкових розладів.

У йогурті багато кальцію, і він не тільки підтримує стан кісток і зубів, але і підтримує здоров'я слизових оболонок, знижує ризик його розвитку раку кишечника. Прийнято розглядати молоко як основним компонентом кальцію, але ж кальцій з молока гірше засвоюється - воно не містить тих чистих культур молочнокислих мікроорганізмів, які присутні в біойогурті.

Йогурт сприяє кращому засвоєнню інших мінералів і вітамінів і зміцнює імунну

систему: дослідження показали, що 100-200 г йогурту в день дозволяють організму більш активно виробляти інтерферон; а бактеріальні клітини, що входять у його склад підтримують активність лейкоцитів, допомагаючи їм зміцнити та покращити захист організму від інфекцій.

Справжній натуральний йогурт, збагачений культурами молочнокислих бактерій визначається високою цінністю та покращує самопочуття здоров'я людини. До складу біойогуртів входить різноманітна кількість поживних речовин таких як: кальцій, калій, фосфор. Добова норма поживної та енергетичної цінності знаходиться у 100 г готового продукту - 25% кальцію і 15% фосфору, його білок легко засвоюється і не викликає алергії. Звичайно, що готовий біойогурт за широким своїм спектром поживних компонентів та властивостям порівнюють з кисломолочними продуктами як кефір. Натуральний йогурт корисний:

- дітям та підліткам (легко засвоюється);
- літнім людям;
- для зміцнення кісток та м'язів (містить залізо, кальцій, магній);
- для здоров'я серцево-судинної системи;
- для поліпшення роботи нервової системи (завдяки фосфору, кальцію, магнію і вітаміну B₅ у вмісті готового продукту - біойогурту);
- для профілактики остеопорозу (кальцій у складі йогурту зміцнює кістки);
- для нормалізації роботи шлунково-кишкового тракту (живі бактерії);
- нормалізація патогенної мікрофлори кишківника;
- при ентеритах;
- при колітах;
- при дисбактеріозі;
- для підвищення імунної системи (вітаміни А, В, С і D);
- при захворюваннях, пов'язаних зі зниженням функцій наднирників та щитоподібної залози;
- для жінок у період годування груддю та нормалізує будь-які гормональні порушення [11].

Добова норма вживання в їжу натурального йогурту становить 250-400 мл [11].

У ньому багато сухої речовини (12,5-22%). Також основними компонентами йогурту складу є цукор, вершки, сухе знежирене молоко, згущене знежирене молоко, пахта, фруктові і ягідні сиропи, ванілін та інші. Молоко ферментує чистими культурами молочнокислих продуцентів, що входять до складу бактеріологічних заквасок. Кислотність йогурту повинна знаходитись у межах 80-140 ° Т. Залежно від наповнювачів та вмісту інших сухих речовин розрізняють готовий продукт за органолептичними показниками: біойогурт (без добавок), солодкий біойогурт (з вмістом цукру 5%) і біойогурт фруктово-ягідний (з додаванням фруктів і ягідні сиропи). Основна жирність готового продукту - біойогуртів повинна відповідати нормам та становить 1,5; 3,2 і 6%.

У 100 грамах органічного біойогурту (1,5% жирності) близько 60 ккал; До його складу входять наступні компоненти та поживні речовини: жирні та органічні кислоти, жири, білки, вуглеводи, холестерин; вітаміни А, С, РР, групи В; мінерали - калій, кальцій, магній, натрій, сірка, фосфор, хлор, залізо, цинк, йод, мідь, марганець, селен, хром, фтор, молібден, кобальт.

Якість йогуртів визначається за органолептичними, фізико-хімічними показниками та показниками безпеки на відповідність вимогам нормативних документів (ДСТУ, ТУ). У відповідності з ДСТУ 4343:2004 [12] йогурт повинен відповідати наступним вимогам (табл. 1.1):

Таблиця 1.1

Характеристика органолептичних показників йогуртів

Назва показника	Без харчових добавок /наповнювачів	З харчовими добавками /наповнювачами
Смак і запах	Чистий, кисломолочний, без сторонніх присмаків і запахів, у міру солодкий, з присмаком відповідного наповнювача фбо ароматизатора	
Консистенція	Однорідна, ніжна, з порушеним або непорушним згустком, у міру щільна, без газоутворення	
Колір	Від білого до світло-жовтого	Обумовлений кольором застосованного наповнювача

За фізико-хімічними показниками йогурти повинні відповідати вимогам, наведеним у таблиці 1.2.

Таблиця 1.2

Характеристика фізико-хімічних показників йогуртів

Назва показника	Норма
Масова частка жиру, %:	≤ 1
-нежирний	1,5 – 6,0
-жирний	$\geq 6,0$
-вершковий	
Масова частка сухих речовин, %	9,5
Кислотність:	
-титрована, °Т	80 – 140
-активна, рН	4,0 – 4,8
Масова частка білка, %	0,15 - 7,00
Температура зберігання, °С	4 ± 2

За мікробіологічними показниками йогурти повинні відповідати вимогам, наведеним у таблиці 1.3.

Таблиця 1.3

Норми мікробіологічних показників

Назва показника	Норма для		
	йогурту	біойогурту	біфідойогурту
Кількість молочнокислих життєздатних молочнокислих бактерій (<i>Lactobacillus bulgaricus</i> і <i>Streptococcus thermophilus</i>), КУО в 1 см ³ , не менше ніж	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$
Кількість біфідобактерій (<i>Bifidobacterium</i>), КУО в 1 см ³ , не менше ніж	-	-	$1 \cdot 10^6$
Кількість бактерій ацидофільної палиски (<i>Bifidobacterium</i>), КУО в 1 см ³ , не менше ніж	-	$1 \cdot 10^7$	-
Бактерії групи кишкових паличок (коліформи), в 0,1 см ³	Не допускається		
Патогенні мікроорганізми, в тому числі бактерії роду <i>Salmonella</i> , в 25 см ³			
<i>Staphylococcus aureus</i> , в 1,0 см			
Дріжджі, КУО в 1 см ³ , не більше ніж		50	
Плісеневі гриби, КУО в 1 см ³ , не більше ніж		50	

1.2. Молочнокисле бродіння

Молочне ферментація - це процес анаеробного окислення вуглеводів, кінцевим продуктом якого є лактат. Молочнокислі мікроорганізми катаболізують вуглеводи і виділяють основне джерело енергії у вигляді АТФ [13, 14].

Молочнокислі бактерії об'єднують у родину *Lactobacillaceae*. Ця група є морфологічно гетерогенною, але має спільні фізіологічні ознаки. В Більшості випадків молочнокислі бактерії використовують вуглеводи як джерело вуглецю та енергії і виділяють молочну кислоту. В основному процес культивування молочнокислих мікрорганізмів відбувається в анаеробних умовах, але деякі роди можуть продукувати молочну кислоту і при наявності кисню [15].

Для оптимального росту молочнокислих бактерій необхідні поживні речовини, вітаміни, деякі амінокислоти та ін. Оскільки кисломолочне бродіння здійснюється шляхом виробництва молочної кислоти, то рН середовища дуже низька, тому необхідно додатково підливати буферний розчин для стабілізації рН та розвитку нових клітин [16].

Промисловими штамми-продуцентами для виробництва біоюгурту визначались наступні роди та види: *Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. delbruekii*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus faecalis*, *S. bouis*, *S. pneumoniae* [16].

На сьогоднішній день розрізняють 2 методи молочнокислого бродіння в залежності від кінцевих продуктів, що утворюються: гомоферментативне та гетероферментативне молочнокисле бродіння. При гомоферментативному процесі утворюється понад 90 % лактату, а при гетероферментативному бродінні, крім лактату, утворюються CO₂, етанол, оцтова кислота й інші продукти [16].

При гомоферментативному бродінні глюкоза катаболізується гліколітичним шляхом, а водень, який відщеплюється під час дегідрування гліцеральдегід-3-фосфату у вигляді НАДН, передається на піруват (рис. 1.1). У присутності

лактатдегідрогенази піруват відновлюється до лактату. Мала доля пірувату декарбоксілюється та перетворюється на оцтову кислоту, етанол і CO₂ [16].

При гетероферментативному бродінні розщеплення глюкози відбувається лише пентозофосфатним шляхом (див. рис. 1.1). Рибулозо-5-фосфат під дією епімерази перетворюється на ксилулозо-5-фосфат, який в результаті реакції, що каталізується пентозофосфокетолазою, розщеплюється з утворенням гліцеральдегідфосфату та ацетилфосфату. З гліцеральдегідфосфату через піруват утворюється молочна кислота, а ацетилфосфат відновлюється через ацетил-КоА та ацетальдегід до етанолу. Такий тип бродіння є характерним для *Leuconostoc mesenteroides* [16].

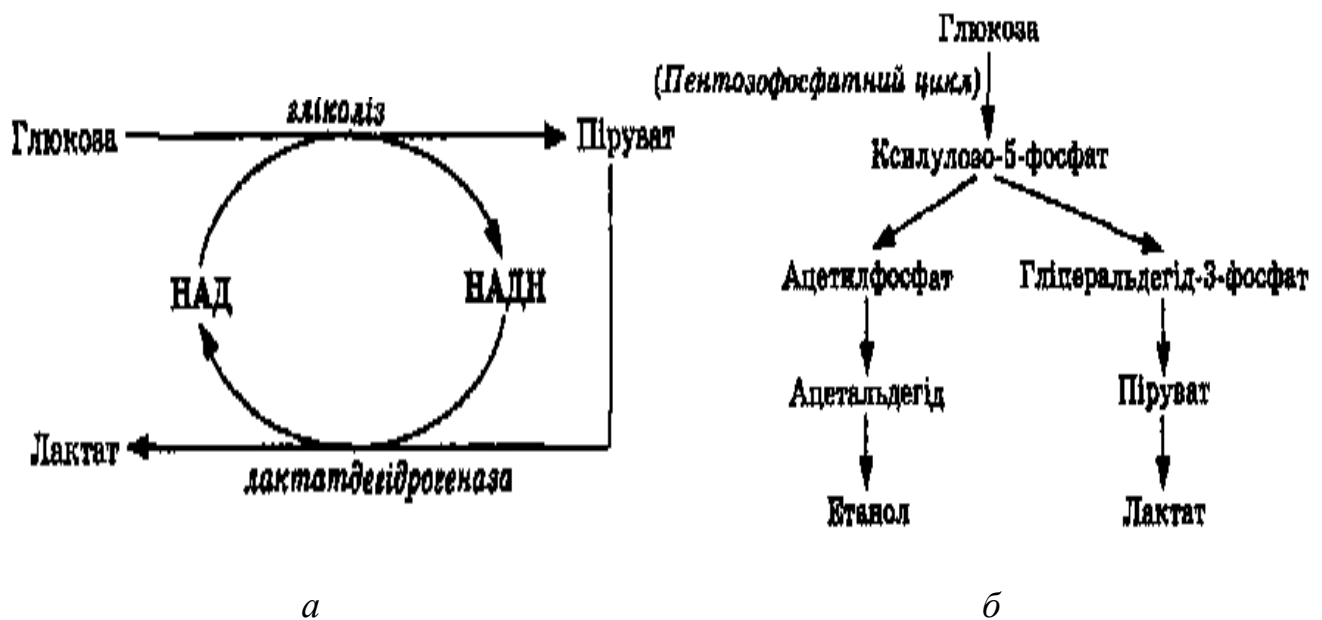


Рис.1.1. Молочнокисле бродіння: а – гомоферментативне молочнокисле бродіння; б – гетероферментативне молочнокисле бродіння

З гліцеральдегідфосфату через піруват утворюється молочна кислота, а ацетилфосфат відновлюється через ацетил-КоА та ацетальдегід до етанолу. Такий тип бродіння є характерним для *Leuconostoc mesenteroides* [16].

Інші роди молочнокислих бактерій при гетероферментативному молочнокислому бродінні переводять частково чи повністю ацетилфосфат в оцтову кислоту, що супроводжується утворенням АТФ. У цьому разі надлишок водню

передається на глюкозу, яка відновлюється до маніту. З гліцеральдегідфосфату через піруват утворюється лактат (див. рис. 1.1).

Зброджування фруктози здійснюється за рівнянням:



Гетероферментативне молочнокисле бродіння здійснюють *Leuconostoc mesenteroides*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Bifidobacterium bifidum* [16].

Розмножуючись, молочнокислі бактерії сильно знижують рН (до значень, менших за 5,0) і тим самим пригнічують ріст інших анаеробних бактерій. Завдяки такій стерилізуючій дії вони використовуються в різних галузях промисловості [17].

1.3. Морфологічні та культуральні особливості молочнокислих бактерій закваски «VIVO»

Об'єктом дослідження є процес впливу ультразвукових коливань на молочнокислі бактерії в технології виготовлення біойогурту. на основі бактеріальної закваски «VIVO» з підвищеним титром молочнокислих бактерій. Дану закваску обрано тому, що вона володіє високим вмістом живих і корисних бактерій, які не просто перетворюють молоко в кисломолочний напій, а роблять його справжнім пробіотичним продуктом та не містить шкідливих добавок, він гарантовано свіжий і безпечний, тому підходить для щоденного харчування всієї родини. На даному етапі роботи використовувались продуценти, що входять до складу закваски VIVO, що містить підвищену кількість корисних бактерій (болгарська паличка – *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*, ацидофільна паличка – *Lactobacillus acidophilus*, біфідобактерії – *Bifidobacterium lactis*, термофільний стрептокок – *Streptococcus thermophiles*).

Оскільки предметом дослідження є вищевказана закваска VIVO з відповідним складом, то розглянемо морфологічні та культуральні особливості штамів, що

входять у її склад.

Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus – велика неспоріднена бактерія, що має форму палички, грам-позитивний факультативний анаероб, часто утворює ланцюжки, характеризується температурним оптимумом росту в інтервалі $t = 45-50^{\circ}\text{C}$ (див. рис. 1.2). Зброджуючи лактозу і глюкозу, утворює молочну і трохи летких кислот [18].

Таксономія:

- Царство: *Bacteria*
- Тип: *Firmicutes*
- Клас: *Bacilli*
- Підклас: *Lactobacillales*
- Сімейство: *Lactobacillaceae*
- Рід: *Lactobacillus*
- Вид: *Lactobacillus delbrueckii*



**Рис.1.2. Загальний вигляд продуцента
*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus***

Lactobacillus bulgaricus – нерухомі, спороутворюючі грампозитивні бактерії розміром $0,5-0,8 \times 2,0-9,0$ мкм. Хемоорганогетеротрофи, мікроаерофіли. Енергію отримують в результаті гомоферментативного молочнокислого бродіння. Для зростання на поживних середовищах потребують факторів росту і вітамінів. Мають набір протеаз, що беруть участь в дозріванні деяких сортів сирів, специфічна пептидаза *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* - пролидаза

гидролізує білки з високим вмістом проліну і має унікальні шляхи регуляції біосинтезу. Також синтезує пептидоглікангідролазу – специфічний фермент, відповідальний за гідроліз пептидоглікана, важливого компонента клітинної стінки бактерій. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* продукує позаклітинні полісахариди, що покращують структуру, підвищують стабільність і запобігають синерезису йогурту. Бактерія проявляє імуностимулюючу дію і здатна виживати при проходженні через шлунково-кишковий тракт [18].

Геном *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* штаму ATCC 11842 представлений кільцевою двухланцюговою молекулою ДНК розміром 1864998 п.н. і містить 2217 генів, з яких 1562 кодують білки. Г-Ц пари складають 73 %. Дослідження нуклеотидної послідовності генома штаму ATCC 11842 виявили, що в процесі еволюції цей мікроорганізм втратив деякі функції. Геном *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* штаму ATCC ВАА – 365 також представлений кільцевою двухланцюговою молекулою ДНК розміром 1856951 п.н. і містить 2040 генів, з яких 1721 кодують білки. Г-Ц пари складають 77%, порівняння геномів представників роду *Lactobacillus* виявляють інтенсивну втрату генів і багатьох метаболічних функцій. Також в геномі представників підвиду виявлені плазмиди, наприклад плазмида рDOJ1 представлена кільцевою двухланцюговою молекулою ДНК розміром 6220 п.н. і містить всього 6 генів, кільцева криптична плазмида рLVB1 має розмір 6127 п.н. і містить 4 гена [18].

Lactobacillus acidophilus отримав свою родову назву від лат. *lacto-* — «молоко» і *-bacillus* — «паличка» та видову назву від *acid* — «кислота» та «philus» — «любити». Ця бактерія виживає в кисліших середовищах, ніж пов'язані види (рН 4-5 або менше) та оптимально росте за температурами близько 30 градусів Цельсія. *L. Acidophilus* природно зустрічається в травному тракті людини і деяких інших ссавців [18].

L. acidophilus ферментує лактозу до молочної кислоти, подібно до багатьох інших (хоча і не всіх) молочнокислых бактерій. Деякі споріднені види виробляють етанол, діоксид вуглецю та оцтову кислоту, проте *L. acidophilus* є гомоферментативним організмом, що виробляє лише молочну кислоту. Як і більшість

бактерій, *L. acidophilus* може бути вбитий нагріванням, вологістю або прямим сонячним світлом [18].

Таксономія:

- Царство: *Bacteria*
- Тип: *Firmicutes*
- Клас: *Bacilli*
- Підклас: *Lactobacillales*
- Сімейство: *Lactobacillaceae*
- Рід: *Lactobacillus*
- Вид: *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus - один з видів бактерій роду *Lactobacillus* (див. рис. 1.3). Ця бактерія використовується в промисловості разом з *Streptococcus salivarius* і *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* для виготовлення ацидофільного молока. Білі колонії діаметром 1-3 мм, поверхня колоній гладка, форма опукла, краї рівні, непрозорі, непігментовані, структура однорідна, консистенція пастоподібна є факультативним анаеробом.

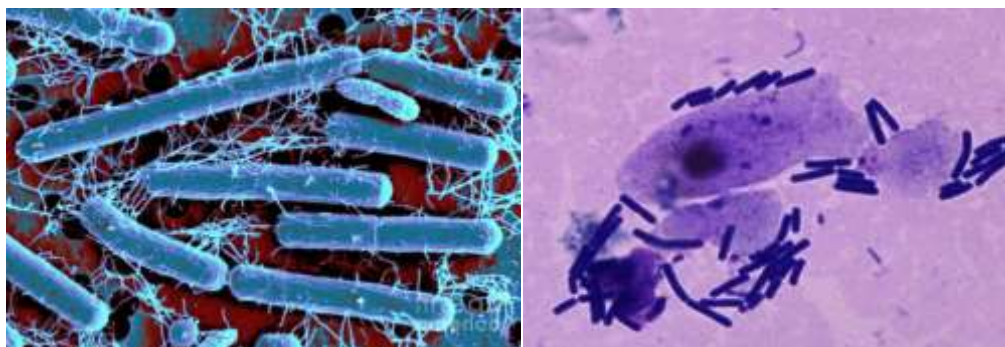


Рис 1.3. Загальний вигляд продуцента *Lactobacillus acidophilus*

Для росту необхідні ацетат, рибофлавін, пантотенат кальцію, ніацин, фолієва кислота. Зростає при 45°C, немає росту при 15°C, оптимальна температура культивування 35-39 ° C [18].

Streptococcus thermophilus – факультативний анаероб. Коки величиною 0,7-1,0 мкм, нерухомі, розташовуються переважно попарно, зустрічаються ланцюжки коків

середньої довжини. Клітини овальні, нерухомі, ендоспор не утворює. На поверхні щільних середовищ МА4, МА6 і МА20 через 24 години при 37-42 ° С утворює білі, опуклі, гладкі колонії з рівними краями [20].

Таксономія:

- Царство: *Bacteria*
- Тип: *Firmicutes*
- Клас: *Bacilli*
- Підклас: *Lactobacillales*
- Сімейство: *Streptococcaceae*
- Рід: *Streptococcus*
- Вид: *S. Thermophiles*

Фізіолого-біохімічні властивості. Освіта молочного згустку відбувається через 6 годин інкубування при 37 ° С, приводячи до закислення середовища до значення рН 4,5-4,7, а через 24 години до значення 3,9-4,0. Штам зброжує глюкозу і лактозу, зростає при 50 ° С [20]. Загальний вигляд штаму представлено на рисунку 1.4



Рис 1.4. Загальний вигляд продуцента *Streptococcus thermophilus*

Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 - один з найбільш вивчених штамів біфідобактерій (див. рис. 1.5). Його представники є грампозитивними нерухомими анаеробними бактеріями, продукують молочну кислоту і не мають каталазної активності. BB-12 мають нерегулярну паличкоподібну форму, не утворюють спор і є одними з найбільш поширених бактерій, що входять до складу пробіотиків, а також популярним модельним об'єктом для вивчення властивостей біфідобактерій [20].



Рис.1.5. Загальний вигляд продуцента *Bifidobacterium lactis*

Таксономія:

- Царство: *Bacteria*
- Тип: *Actinobacteria*
- Клас: *Actinobacteria*
- Підклас: *Bifidobacteriales*
- Сімейство: *Bifidobacteriaceae*
- Рід: *Bifidobacterium*
- Вид: *Bifidobacterium animalis*

Біфідобактерії мають морфокінетичні властивості, продукують біологічно активні сполуки, зокрема, вітаміни групи В, виконують імуногенну й антимуtagenну функції, а також беруть участь у детоксикації екзо- та ендogenous токсичних агентів. Переваги *Bifidobacterium lactis* дають можливість розглядати даний продуцент як один з основних складових функціонального харчування [21].

1.4. Сучасні технології виготовлення біойогуртів

Сучасними технологіями виробництва промислових серій біойогурту, розрізняють 2 методи виробництва йогурту, які розрізняють за процесом проведення основної ферментації готового продукту [22-23]:

1. Термостатний (ферментація відбувається після розливу в тару, тару зберігають в термостатичній камері для проведення основної ферментації).
2. Резервуарний (ферментація в резервуарах).

Термостатний спосіб. Н асьогоднішній день технологія виробництва біойогурту термостатним способом вважається кращою, оскільки поживна цінність у порівнянні з резервуарним, більша, а процес технології зменшує ризик контамінації готового продукту (рис. 1.6) Термостатна технологія сучасного виробництва біойогурту складається з наступних етапів: приймання і підготовка сировини і матеріалів, нормалізація по жиру і сухих речовин, очищення, гомогенізація суміші, пастеризація і охолодження суміші, закваска, розлив, пакування, маркування, сквашивание і охолодження. Внесення наповнювачів та стабілізаторів до вмісту готового пробукту біойогурту здійснюється відповідно до резервуарної технології після основного процесу ферментації та охолодження продукту [23].

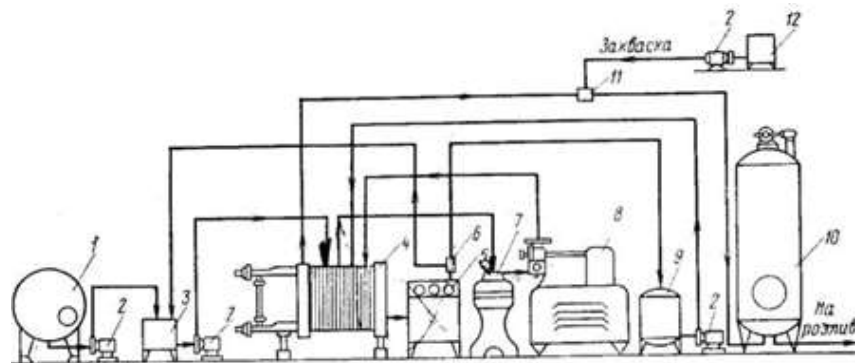


Рис. 1.6. Схема технологічної лінії виробництва йогурту термостатним способом:
 1 – двошаровий резервуар; 2 – молочний насос; 3 – сепаратор-сливкоотделитель і нормалізатор; 4 – буферна ємність для вершків, 2-х шаровий резервуар з мішалкою; 5 – гомогенізатор; 6 – проточний охолоджувач; 7 – емальгатор; 8 – заквасочник; 9 – фасувальний апарат; 10 – запірні і трубопровідні арматури; 11 – пульт управління

В задалегіть підготовану молочну сировину вносять декілька відсотків бактеріальної закваски та розливають у тару, також приготованої задалегіть за нормативною документацією та ферментують у термостатних камерах при температурі 40 - 45 °С протягом 3 - 4 годин. Готовий згусток повинен відповідати нормам ДСТУ на готовий продукт та має кислотність 70-80°Т.

Після процесу ферментації на досягнення відповідних показників якості проводять охолодження продукту до 4-6 °С. Обовязково перед внесенням

бактеріологічної закваски супутньо вносять наповнювачі – в основному плодово-ягідні сиропи та стабілізатори. Щоб уникнути утворення пластівців згустку, тривалість етапу розливу у тару повинно тривати не більше 30 - 40 хвилин [24].

Резервуарний спосіб. Перед початком основного процесу ферментації проводять підготування сировини – в основному резервуарі. В залежності від основних характеристик продукту додають молоко відповідної жирності, вершки, відповідну концентрацію сухих речовин та цукру. Суміш нормалізують, гомогенізують при тиску 10-15 МПа та пастеризують при температурі 84-86°C. Після охолодження до температури ферментації готового продукту при температурі 40 - 45 °С, суміш переносять у резервуар та вносять 3-5% закваски, що складає у своєму вмісті чисті культури молочнокислих бактерій. Суміш ферментують при температурі 40 - 45 °С протягом 3 - 4 годин до утворення згустку кислотністю 80°Т. Готовий продукт біойогурту охолоджують до температури 20°C в резервуарі при постійному перемішуванні. Після досягнення відповідної температури охолодження переходять до процесу пакування готової продукції та після розливу у тару – процес маркування. Схема технології виробництва йогурту резервуарним способом наведена на рис.1.7 [11].

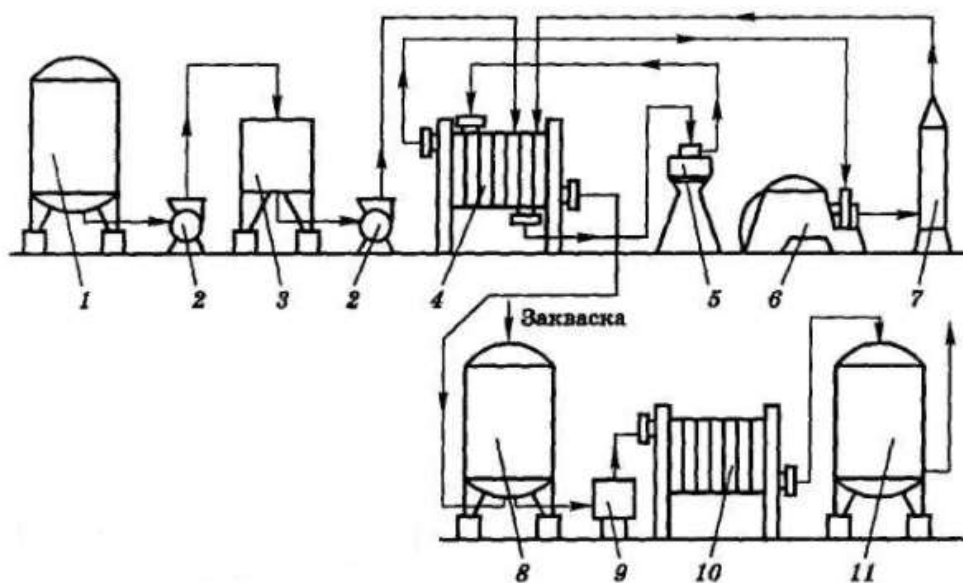


Рис. 1.7. Схема технологічними лінії виробництва йогурту резервуарним способом: 1 – ємність для сирого молока; 2 – насоси; 3 – балансвальний бачок; 4 – пластинчаста пастеризаційно-охолоджувальна установка; 5 – сепаратор-

молочноочисник; 6 – гомогенізатор; 7 – витримувач; 8 – ємність для сквашування молока; 9 – насос; 10 – охолоджувач згустку; 11 – ємність для охолодженого згустку

Біойогурт, виготовлений за вищевказаними способами, зберігається при температурі 4 - 6 °С протягом 36 годин у холодильній камері, в тому числі на підприємстві виробника - не більше 18 годин.

На виробництво йогуртів відбирається сировина вищого гатунку, з необхідними органолептичними, фізико-хімічними і мікробіологічними показниками, а також до основного складу додають різні наповнювачі та стабілізатори для покращення основних параметрів та смакових властивостей готового продукту.

Усі наповнювачі та стабілізатори за основною технологією потрібно вносити в уже охолоджений згусток для запобігання порушення їх структури. В залежності від роду чистих культур, температура ферментації в основному сягає більше 40 °С, при якій активізується ріст та розвиток молочнокислих бактерій, щоб регулювати кількість колоній в готовому продукті. Загальна кількість термофільних молочнокислих стрептококів і болгарської палички в 1см³ продукту повинна становити 10⁷ - 10⁸ клітин [11].

1.5. Вплив ультразвуку на активність біологічних об'єктів

У процесі еволюційного розвитку біологічних об'єктів на формування їх біологічних властивостей впливали багато абіотичні фактори, в тому числі природний радіаційний фон. В останні десятиліття через зростання антропогенного і техногенного навантаження відбулося різке збільшення рівнів абіотической радіації і, як наслідок, посилення впливу цих факторів на біоклетки, що, ймовірно, буде сприяти фенотипическим змін біологічних властивостей і нові мутації. Тому в сучасній мікробіології актуальні питання вивчення особливостей і механізмів впливу зовнішніх фізичних факторів на стан мікроорганізмів, зокрема бактерій, для можливого використання цих впливів при вирішенні прикладних задач і

впровадження нових технологій в різних галузях [25].

Основний параметри, що впливають на функціональний стан мікроорганізмів, є ультразвукові коливання. Ультразвукові - це пружні акустичні хвилі, які можуть поширюватися в матеріальних середовищах (твердих, рідких, газоподібних). Низько частотній ультразвуку знаходиться в діапазоні 16-20 кГц, верхній досягає сотень мегагерц. Пружність забезпечує повернення в початкове положення частинок середовища, зміщених під дією зовнішніх сил. Частинки середовища не переносяться в напрямку поширення хвилі, а тільки коливаються поблизу положення рівноваги. Обурення від частинок, що коливаються в кожному шарі поблизу положення рівноваги, передається від шару до шару в напрямку поширення хвилі. Таким чином, в акустичній хвилі відбувається передача енергії без передачі речовини. Хвилі бувають поздовжніми, якщо напрямок коливань частинок збігається з напрямком поширення хвиль, і поперечними, якщо ці напрямки взаємно перпендикулярні. Поздовжні хвилі поширюються в газових і рідких середовищах, в тому числі в м'яких тканинах макроорганізмів і в клітинах мікроорганізмів, які складають 75% води [25].

Ультразвукові хвилі володіють великою механічною енергією і викликають ряд фізичних, хімічних і біологічних явищ, тому на даний момент визиває велику зацікавленість та застосування у різних галузях промисловості.

Певні частоти ультразвуку при штучному впливі здатні викликати деполімеризацію органел мікробних клітин - під дією ультразвуку газу, що знаходяться в рідкому середовищі цитоплазми, активуються і всередині клітини виникає високий тиск (до 10 000 атм). Це призводить до розриву клітинної оболонки і загибелі клітини [25].

Однією з основних особливостей ультразвукової обробки на молочнокислі мікроорганізми важається його здатність впливати на клітинні мембрани. Дія ультразвуку може привести до значної зміни механічних, електричних та інших властивостей клітинних мембран, а також до порушення внутрішнього складу клітин і зміни концентрацій розчинених в цитоплазмі речовин. При тривалій експозиції ультразвукової обробки стабілізація системи клітини порушуються, та може відновлюватись до кількох днів.

При високочастотних обробка ультразвуку спостерігається розрив клітинних мембран і порушення механічної цілісності клітин. Встановлено, що особливо небезпечний для мікроорганізмів низькочастотний УЗ. Однак низькочастотний ультразвук веде до загибелі тільки при високих інтенсивностях та тривалого часу обробки [25].

Через вплив ультразвукових коливань порушується кількісний склад клітинної мембрани, що призводить до втрати макромолекул і молекулярних комплексів з зовнішньої поверхні мембрани. Завдяки цьому порушується електролітний баланс та зменшується об'єм циркулюючої рідини в мембрані клітини, що може призвести до аномального функціонування з летальним наслідком для клітини.

Однією з особливостей дії ультразвукових коливань є властивість змінювати не тільки концентрацію речовин у клітинних мембран, а й в середині клітини- у цитоплазмі. Завдяки цьому змінюється відповідно тиск клітини та осмотичний тиск, що призводить до розриву клітини або мутацій [25].

Оскільки порушення внутрішньої концентрації клітини призводить до значних дефектів функціонування клітини, в залежності від інтенсивності ультразвукових коливань, клітина у свою чергу може залишатися недієздатною до декількох днів після обробки. Тому зважаючи на ці зміни, та в залежності від інтенсивності ультразвукової обробки клітинні дефекти можна розташувати наступним чином: порушення цілісності клітин - зміна властивостей мембрани - зміна концентрацій речовин в цитоплазмі - порушення життєво важливих функцій [25].

Виявилося, що результати досліджень можуть бути найрізноманітнішими: з одного боку, дослідники спостерігали збільшення аглютинації, втрату вірулентності або повну загибель бактерій, з іншого боку, спостерігався зворотний ефект - збільшення кількості життєздатних особин. Останнє було особливо поширене після короткочасного впливу. Очевидно, що короткочасна дія ультразвуку сприяє механічному розділенню скупчень бактеріальних клітин, так що кожна окрема клітина дає початок новій колонії [25].

Завдяки бактерицидній ефекту ультразвуку в даний час ультразвукова технологія використовується в харчовій промисловості для стерилізації деяких

харчових продуктів (молока, фруктових соків, вин). Перевагою стерилізаційних методів за допомогою ультразвуку зменшують кількість патогенних мікроорганізмів в молочній сировині в технології виробництва йогурту та завдяки високочастотній ультразвукової обробки зменшує час технологічного процесу у 2-3 рази, порівняно з процесом пастеризації молока [25].

Мета нашої роботи - стимулювати зростання лакто-і біфідобактерій і вивчити можливості використання ультразвукових методів в технології виробництва кисломолочних продуктів. Тому зростання молочнокислих бактерій вивчали при різних частотах ультразвукового дослідження та тривалості лікування.

1.6. Висновки до розділу

Біойогурт – молочнокислий продукт, виготовлений за технологією ферментації молока та бактеріально закваски з високим вмістом чистих культур продуцентів. Завдяки високому вмісту жирів, білків, вуглеводів та інших поживних речовин, біойогурт має велику енергетичну та подивну цінність для організму людини.

Біойогурти виробляють за молочнокислим бродінням, яке у свою чергу також поділяють за кінцевими продуктами їх утворення – гомоферментативне та гетероферментативне бродіння.

На сьогодні, одними з сучасних технологій виробництва біойогурту вважаються термостатний та резервуарний способи, які відрізняють між собою на етапі ферментації основного продукту (в тарі або в резервуарі).

Для визначення впливу УЗ коливань, в роботі використовувались продуценти, що входять до складу закваски «VIVO», що містить підвищену кількість корисних бактерій (*Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Streptococcus thermophiles*). Дані продуценти належать до грам-позитивних, факультативних анаеробів.

Одним з основних фізичних факторів, що впливає на функціональний стан мікроорганізмів, є ультразвук (УЗ). УЗ коливання не тільки руйнують клітину (процес кавітації), а також можуть сприяти збільшенню активності та росту мікроорганізмів.

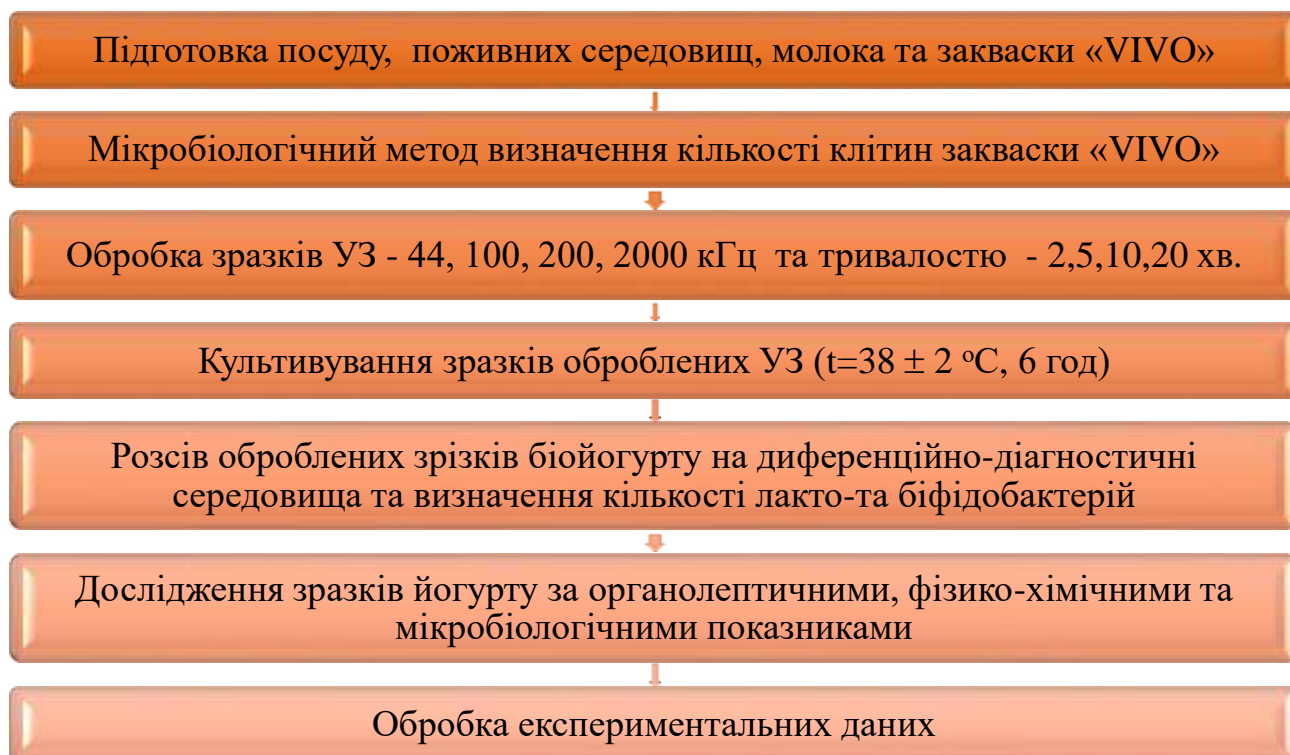
Тому розглянемо вплив УЗ коливань на штами продуценти молочнокислих бактерій у процесі виробництва біойогурту.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Основні етапи проведення експериментальних досліджень

Дослідження молочнокислих бактерій, вплив ультразвукових коливань на їх ріст проводили за схемою:



Основні етапи роботи:

- Підготовка посуду, поживних середовищ, молока та закваски для отримання біойогурту.
- Дослідження технології ультразвукових коливань на інтенсивність бродильних процесів у молоці внаслідок додавання закваски «VIVO» за фізико-хімічними та мікробіологічними показниками.
- Контроль процесу культивування мікроорганізмів при виробництві біойогурту.
- Органолептична оцінка йогурту власного виробництва, порівняльна органолептична оцінки йогуртів торгівельних марок «Молокія» та «Активія», що

представлені на полицях магазинів.

- Оцінка за фізико-хімічними та мікробіологічними показниками йогуртів торгівельних марок «Молокія» та «Активія», що представлені на полицях магазинів.

Для проведення експериментальних досліджень дипломної роботи, а саме визначення титру молочнокислих бактерій під впливом ультразвукової обробки, дослідження якості зразків йогуртів, були проведені наступні методики, описанні нижче.

2.2. Методи контролю процесу культивування

Для вирощування молочнокислих бактерій необхідно надати оптимальні умови культивування, які будуть залежать від фізіологічних особливостей кожного из продуцентів. Основними факторами, що впливають на ріст молочнокислих бактерій, є такі: температура, аерація, рН та інші чинники. Крім того, ріст і життєдіяльність мікроорганізмів залежать від живильних матеріалів, які використовуються в якості енергетичного матеріалу – для живлення, а також необхідні як і будь-які інші джерела енергії для процесів життєдіяльності [27].

Необхідним показником росту – це процес приготування живильного середовища. Склад живильних середовищ залежить від основних морфологічних та фізіологічних потреб найпоширеніших промислових штамів для отримання біойогуртів. У виробництві головним фактором є доцільність застосування того чи іншого складу живильних середовищ [20]. У поставленому експериментальному дослідженні було використано два поживних середовища для лакто- та бівідо бактерій відповідно – лактобакагар та біфідіум. Лактобактерії є ауксотрофними організмами і тому надзвичайно вибагливі до штучних живильних середовищ. На сьогодні оптимальним для культивування лактобактерій є середовище Лактобакагар [28].

Лактобакагар - диференціальне живильне середовище, яка являється найоптимальнішою, а ніж інші дорожчі середовища. Компоненти живильного середовища стимулюють ріст лактобактерій і пригнічують сторонню мікрофлору, місять в своєму складі: вуглевод (глюкоза), складні органічні компоненти (пептони,

екстракт дріжджів), і мінеральні добавки (магній, марганець). Завдяки різноманітності компонентів у складі, концентрація та масова доля кожного компоненту виміряні у точній величині. Оскільки в складі наявні деякі солі органічних кислот (ацетат, цитрат), а середовище містить низький рівень рН пригнічуються розвиток патогенів. Склад середовища наведений у таблиці 2.1 [28].

Таблиця 2.1

Склад поживного середовища Лактобакагар

Інгредієнти	Склад середовища (на 1 літр дистильованої води)
Пептон	15 г/л
Дріжжєвий екстракт	2,8 г/л
Глюкоза	15,0 г/л
Натрій ацетат	4,0 г/л
Амоній цитрат	1,5 г/л
Mg Cl ₂	0,1 г/л
MnSO ₄	0,04 г/л
K ₂ HPO ₄	1,5 г/л
Аскорбінова кислота	0,04 г / л
рН 6,0 ± 0,2 при 25°C	

Сьогодні оптимальним для культивування біфідобактерій є середовище Біфідіум - рідке живильне середовище, склад якого збалансований для максимального накопичення біфідобактерій. Біфідобактерії утворюють плоскі, напівкулевидні, блискучі колонії сірого кольору, розміром від 0.5 - 1.4 мм. Культивують зразки біоїогурту за температури 37 °С протягом 48 годин. Склад середовища наведений у таблиці 2.2 [28].

Таблиця 2.2

Склад поживного середовища Біфідіум

Інгредієнти	Склад середовища (на 1 літр дистильованої води)
Пептон	23 г/л
Дріжжєвий екстракт	5,25 г/л
Глюкоза	7,5 г/л
Натрію хлорид	5 г / л
Лактоза	2,5 г / л
Натрій ацетат	0,5 г/л

Амоній цитрат	1,5 г/л
	Закінчення таблиці 2.2
Mg Cl ₂	0,5 г/л
Цистеїну гідрохлорид	0,5 г/л
Аскорбінова кислота	0,5 г / л
рН 7,0 ± 0,2 при 25°C	

Використовуючи метод глибинного посіву необхідно належно підготувати кімнату та посуд. В стерильну чашку Петрі наливають декілька мл розведеної проби методом серійних розведень (метод Коха) та одразу додають поверх живильне середовище - охолоджене до 45-50 ° С. Повторіть процедуру двічі та інкубуйте при 35 ° С протягом 3 діб або при 30 ° С протягом 5 діб. Необхідно зволожнювати середовище під час інкубації для запобігання висихання [28].

Для росту мікроорганізмів необхідно підтримувати температурний режим. Температурний режим залежить від видових потреб культури. Оскільки в бактеріальній заквасці «VIVO» використовувались теплолюбиві (термофільні) мікроорганізми, то їх оптимальна температура росту становить 45-65°C. Якщо температурний режим не стабільний, то ріст мікроорганізмів гальмується. Вирощування молочнокислих бактерій здійснюють у герметичних інкубаторах, де температура відповідає вимогам виробництва та основним ГОСТ [20].

Мікроорганізми мають різні вимоги до вільного кисню. У звичайних умовах повітря аеробні мікроорганізми та факультативні анаероби ростуть у контакті з киснем. Мікроорганізми, що входять до складу бактеріальної закваски «VIVO», є анаеробними бактеріями, тому культивування проводять в анаеробних умовах, які отримують різними методами. Культивування шляхом посіву у рідке середовище вважається найпростішим методом, але ми зробили посів шляхом вирощування на щільні поживні середовища. Поверхню середовища заповнюють тонким шаром стерильного вазеліну або парафіну. Кисень дифундує з повітря в рідке середовище і зменшується в міру згущення агарового середовища (0,2-0,3%). [29].

Головним чинником для існування та підтримки життєздатності мікроорганізмів є кислотність середовища. Мікроорганізми, що входять до складу бактеріальної закваски «VIVO», відносяться до кислотоутворюючої групи, в багатьох

дослідженнях було встановлено, що при зменшенні значення рН, пригнічувався ріст кисломолочних бактерій. Оптимальне значення рН середовища становить від 6,5 до 7,0 [29]. Для визначення рН середовища лабораторного біойогурту використовували лабораторний рН-метр «рН-150МА».

2.3 Методика впливу ультразвуку на фізико-хімічні показники досліджуваних зразків біойогурту

Для впливу ультразвуку на лабораторний біойогурт використовували апарат серії «ВОЛНА-Л» (див. рис. 2.1), який призначений для проведення лабораторних досліджень використовуються в наукових установах для проведення досліджень по високоінтенсивної (до 100 Вт / см²) кавітаційній обробці рідких середовищ в пробірках, боксах та інших технологічних обсягах. Відмінною особливістю апаратів є наявність широкого спектру робочих інструментів та виробничих обсягів [30].

Комплектація лабораторної ультразвукової обробки «ВОЛНА-Л» складається з електронного генератора з таймером і регулятором вихідної потужності (30-100%), коливальна система в металевому корпусі з примусовим повітряним охолодженням, технологічний обсяг, набір змінних робочих інструментів (полухвильовий з робочим закінченням діаметром 12 мм і полухвильовий порожнистий з внутрішнім діаметром 21 мм). Основні технічні характеристики апарату «ВОЛНА-Л» наведені у таблиці 2.3 [30].

Таблиця 2.3

Основні технічні характеристики

Найменування показника	Значення
Потужність, Вт	630
Частота ультразвукових коливань, кГц	22 ± 1,65
Харчування від мережі змінного струму напругою, В	220 ± 22
Інтенсивність ультразвукового впливу, Вт / см ²	100
Час безперервної роботи, год	8

Габаритні розміри:	
електронний генератор, мм	300x280x110
коливальна система з технологічним обсягом, мм	не більше 200x200x240

Ультразвукова коливальна система побудована на п'єзоелектричних кільцевих елементах і виготовлена з титанового сплаву ВТ5. Принцип дії заснований на використанні властивостей ультразвукових коливань високої інтенсивності в рідких і рідко-дисперсних середовищах.

Кожному з об'єктів дослідження були визначені умови ультразвукового впливу з урахуванням варіацій по потужності (120 Вт - 30% від паспортної, 180 Вт - 45% від паспортної, 240 Вт - 60% від паспортної) [30].

Доведено, що механічні та хімічні ефекти, які генеруються низькочастотним ультразвуком (УЗ) високої інтенсивності, можуть бути корисні для інактивації патогенних мікроорганізмів в харчових продуктах і знаходять застосування в процесах пастеризації і стерилізації рідких харчових продуктів .

Ультразвукова технологія прискорює процес екстрагування біологічно активних речовин із сировини, а в поєднанні з сорбційними процесами сприяє зниженню рівня техногенних забруднень в молоці [30].

Для дослідження ультразвукового впливу на лабораторний біойогурт, кожному з об'єктів дослідження були визначені умови ультразвукового впливу з урахуванням варіацій по потужності (44 кВт, 100 кВт, 200 кВт) та тривалість впливу на бактерії (2, 5, 10, 20 хв.).



Рис.2.1. Апарат для лабораторних досліджень серії «ВОЛНА-Л»

Експериментальні дослідження здійснювалися в трьох-кратній повторності із застосуванням загальноприйнятих і стандартних методів дослідження фізико-хімічних і мікробіологічних показників сировини, функціональних компонентів готової продукції.

Отримані результати експерименту оцінювалися методами математичним, статистичним а порівняльним методами із застосуванням сучасних програмних засобів MICROSOFT Office Word XP, Excel XP для Windows 2016 року.

2.4. Методи визначення показників якості лабораторного біойогурту

Оцінку якості досліджуваних об'єктів здійснювали за номенклатурою, що включає загальноприйняті (стандартні) і додаткові показники якості об'єктів, в тому числі методи порівнянь і узагальнень, аналізу, моделювання, метод експертних оцінок отриманих результатів. Показники якості йогурта поділяють на 3 основні групи: органолептичні, фізико-хімічні та мікробіологічні, що наведені у таблиці 2.4

Номенклатура показників якості біойогурту

Група показників	Найменування показників
Органолептичні	Консистенція
	Колір
	Запах
	Смак
Фізико-хімічні	Температура, ° С
	Масова частка вологи, %
	Масова частка білка, %
	Титрована кислотність, ° Т
	Активна кислотність, рН
	Масова частка сухих речовин, %
	Густина, кг / м ³
Мікробіологічні	КУО молочнокислих мікроорганізмів тис. / см ³
	Морфологічні ознаки заквасок мікрофлори

2.4.1. Визначення органолептичних показників якості лабораторного біойогурту

Органолептична оцінка якісних та кількісних показників описує індекс, а кількісна оцінка характеризується сенсорною інтенсивністю, яка представлена цифрами. Зразки зберігають при 4 ° С та аналізують відразу після виготовлення біойогурту. Температура зразка йогурту, який використовували для дегустації, становила 12 ° С. Під час органолептичної оцінки зовнішній вигляд та колір йогурту визначали після відкриття упаковки. Не перемішуючи поверхні досліджуваного зразку, перевірте наявність цвілі на поверхні виробу. Поверхня йогурту повинна бути гладкою і блискучою, без бульбашок та інших ознак нерівностей. Щільність згустку оцінюють ложкою. Колір йогурту вимірюють у чашці Петрі, яку кладуть на білу

поверхню і оглядають. Консистенція йогурту залежить від способу виробництва. Йогурт, вироблений методом постійної температури, повинен мати щільну консистенцію і згусток (що дозволяє відокремлювати сироватку), при резервуарному способі виробництва, згусток повинен бути порушеним. При проведенні органолептичної оцінки слід відзначати можливі вади запаху та смаку (порожній, різкий, кислий, гіркий, зі сторонніми смаком і ароматом, з або без запаху, надто солодкий), вади зовнішнього вигляду (нетиповий колір або відтінок, зморшкуватість, порушення поверхні), пороки консистенції (надмірно щільна, недостатньо щільна, слизова, крупинчаста, зерниста). Органолептичну оцінку якості досліджуваних зразків лабораторного біойогурту проводили по 10-бальній шкалі. Під час оцінки органолептичних методів досліджених зразків біойогуртів основними були наступні показники: колір (2 бали), смак і запах (5 балів), зовнішній вигляд і консистенція (3 бали). Отримані дані були статистично обробляють та роблять висновок [31].

2.4.2. Визначення фізико-хімічних показників якості лабораторного біойогурту

Визначення масової частки вологи проводили термогравіметричним методом (ГОСТ 29246-91) [32]. При його застосуванні цей метод в більшості випадків визначається не істинна масова доля вологи, від прийнятого методу визначення, залежить її умовна величина, яки визначається фактично. Термогравіметричні методи: висушування матеріалу до постійної маси, прискорене висушування, методи висушування вологи матеріалів з попереднім підсушуванням, експрес-методи висушування з використанням інфрачервоного випромінювання.

Термогравіметричний метод базується на висушиванні певної маси речовини, яку охолоджують і зважують. Масова частка вологи W , %, визначається за формулою:

$$W = \frac{G1 - G2}{G1} * 100\%$$

де

$G1$ – початкова маса продукту, г;

$G2$ – кінцева маса продукту після висушування, г.

У промисловості досить часто використовуються термогравіметричні методи,

оскільки вони економічно доцільні та не вимагають додаткового обладнання чи реактивів. Але точність результатів аналізу може бути абсолютно різною, оскільки залежать від хімічного складу продукту і режиму висушування досліджуваних зразків біоїогурту [32].

Визначення масової частки жиру проводили на основі ГОСТ 29247-91 [33]. Метод визначення жиру біоїогурту ґрунтується на дії концентрованої сірчаної кислоти і ізоамілового спирту, далі суспензію центрифугують і визначають об'єму виділеного жиру в жирометрі.

Молоко наливають піпеткою в градуйовану частину жироміра та додають 10 мл сірчаної кислоти. По стінкам дуже обережно вивають мірною піпеткою 5 мл йогурту, але стараючись уникнути змішування з сірчаною кислотою. Додають 6 мл води. Додають 1 мл ізоамілового спирту та швидко надягають гумовий корок. збовтують до повного розчинення білків і досліджувані зразки опускають у водяну баню на 5 хвилин за температури 65 ± 2 °С. Потім їх виймають із води поміщають в центрифугу. Центрифугують 5 хвилин та визначають стовпчик жиру. Отриманні показники жироміра, які були визначені в ході експерименту помножують на 2,15 та отримують вміст жиру у відсотках [33].

Визначення масової частки білка проводили на основі ГОСТ 25179-90 [34]. Метод визначення масової долі білка ґрунтується на пропорційній залежності між кількістю вільних карбоксильних груп і масовою часткою білка у досліджуваних зразках [34].

В колбу наливають молоко та спиртовий р-н фенолфталеїну у пропорції 4:1 (об/об) та титрують натрієм гідроксиду до появи рожевого забарвлення, яке має відповідати стандартному розчину. В колбу додатково вливають 40 % формалін та продовжують титрувати розчином гідроксиду натрію до появи забарвлення, яке відповідає еталону. Кількість лугу, яка була витрачена на титрування досліджуваних зразків порівнюють с даними довідникової таблиці та за значенням визначають кількість білку у біоїогурті [34].

Найважливішим біохімічним показником, за яким здійснюють контроль молочної сировини чи готового молочного продукту, в нашому випадку біоїогурту -

кислотність Молочні продукту вмістить в собі різні компоненти, які мають як кислотні так і лужні властивості. Кислотність поділяють на 2 види: титрована та активна. Титраційна кислотність відображає склад кислотних сполук у йогурті, активна - концентрацію активних іонів водню. Титрувана кислотність молока збільшується у декілька разів під час зберігання готового продукту, активна кислотність залишається на постійному рівні завдяки тривалій буферній системі в ньому та насамперед не існую ніякого зв'язку між цими показниками.

Титрувана кислотність основана на кислотності казеїну, наявності в готовому продукті основних кислих речовин таких як: фосфату, цитрату, лимонної кислоти та вуглекислого газу, які утворюються при розчиненні вуглекислого газу в кисломолочному продукті. Середня значення показника кислотності біойогурту становить 80-140 ° Т, та виражається у градусах Тернера, що позначаються °Т [35].

Кислотність визначають за слідуючою процедурою: у досліджуваній зразок додають 10 мл дистильованої води та 3 краплі 1% спиртового розчину фенолфталеїну. Суспензію титрують 0,1 М розчином їдкого натру до появи рожевого забарвлення. Кількість мілілітрів 0,1 н. розчину їдкого натру, що пішла на нейтралізацію 10 мл молока, множать на 10 і таким чином визначають кислотність досліджуваного молока (за ГОСТ 3624-92) [36].

Активну кислотність вимірюють за допомогою лабораторного приладу для визначення рН типу рН-340 та іономір універсальний ЭВ-74. Перед початком роботи прилад калібрують. За методикою очищений електрод занурюють у дистильовану воду та врівноважують систему, далі занурюють у досліджені зразки для визначення рН. Зразки аналізують тричі для підрахунку стандартного відхилення показників [37].

Масову частку сухих речовин визначають за арсометричним методом (за ГОСТ Р 54761-2011) [38]. Розрахунки сухої речовини молока здійснюють за формулою, якою масову частку сухих речовин знаходять як функцію густини та масової частки жиру. Масову долю сухих речовин здійснюють розрахунковим методом та визначають по формулі:

$$C = (4,9 \text{ Ж} + \text{Д}) / 4 + 0,5,$$

де С – масова частка сухих речовин, %,

Ж – масова частка жиру, %,

Д – густина молока, °

А; 4,9; 0,5 – емпіричні коефіцієнти [38].

Густину йогуртів визначають за ареометричним методом. Густину молока визначають згідно з ГОСТ 3625-85 не раніше ніж через 2 год після виробництва готового продукту. Перед здійсненням аналізу, зразки попередньо нагрівають до 35 ± 5 °С та обережно наливають по стінкам циліндру для попередження взбовтування йогурту. Очищений та сухий аерометр занурюють у циліндр з дослуджуваним зразком та визначають позначку занурення приладу через 3 хвилини після стабілізації приладу у зразку. Результати густини наведені у таблиці при температурі 20 °С за даними довідникових таблиць [39].

2.4.3. Визначення мікробіологічних показників якості лабораторного біойогурту

Визначення кількості кліти в суспензії проводять висіву на живильні середовища.

Визначення мікроорганізмів методом висіву на тверді середовища базується на принципі багатосерійних розвередь – методо Коха. На чашках Петрі підраховують кількість колоній, а потім розрахунковим методом обчислюють кількість клітин в 1 мл суспензії досліджуваного зразку [40].

Отриманні результати кількості мікроорганізмів, проведеного методом серійних розведень, виражають в колонієутворювальних одиницях (КУО).

Для визначення кількості клітин в суспензії здійснюють розведення суспензії у декілька разів, а потім висівають її на щільні середовища. Інкують певний проміжок часу та підраховують вирості колонії [40].

Розвереду суспензію висівають по щільні поживні середовища у чашки Петрі або поверхневим, або глибинним способом. Для кожного методу виконуються індивідуальні вимоги. При поверхневому способі агаризоване живильне середовище наливають в чашки Петрі та охолоджують до застигнення, а потім за допомогою

шпателью Дригальського або мікробіологічною петлею висажують розведену суспензію або чисту культуру. Перед посівом, обов'язково треба вилучити конденсат, оскільки, краплі моуть розмити колонії, що приведе неточності в отриманих результатах [40].

Метод глибиного посіву базується внесенні розведеної суспензії у чашку Петрі, а потім жосліджений матеріал заливають рідкоподібним охолодженим середовищем, культивують та підраховують кількість клітин зразку [40].

Для підрахунку вирослих колоній, чашку Петрі розділяють маркером на 4 сектори, та підраховують колонії у кожному з них. Підрахунок здійснюють не відкриваючи чашки Петрі та в залежності від роду культури та/або фізіологічних потреб штаму підрахунок здійснюють через 72 години після посіву [40].

Підрахунок кількості клітин здійснюють за формолою:

$$M = a \times 10^n / V,$$

де M – кількість клітин в 1 мл;

a – середнє число колоній на чашці Петрі;

V – об'єм суспензії, взятий для посіву, мл; 10^n – коефіцієнт розведення.

Приготуйте послідовні 10-кратні розведення вихідної суспензії бактерій: 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5 (до 4,5 мл дистильованої води додайте 0,5 мл суспензії бактерій). Отримані розведення суспензії мікроорганізмів ретельно перемішати (струсити) і висіяти на поверхню агару до чашки Петрі (0,1 або 0,2 мл). Посів проводити, починаючи з найбільшого розведення (10-5). Рівномірно розподіліть на поверхні агару висіяні суспензії, повільно обертаючи чашки Петрі, і залиште їх за кімнатної температури на 30 хв для адсорбції мікробів на поверхні агару [40].

Фарбування бактерій за методом Грама. В залежності від морфологічних ознак родів та видів аналізуючого штаму продуценту, використовують різні барвники для виявлення морфологічної будови та основного вмісту клітини. В залежності від виду бактерій – грампозитивні при обробці етаноловим спиртом та комбінації йоду клітинна стінка забарвлюється у фіолетовий колір, тоді як грамнегативні бактерії тільки після дофарбовування фуксином клітини забарвлюються в червоний колір [40].

Зверніть увагу, що результати процесу фарбування вищевказаним методом

залежить від якісної підготовки допоміжних речовин, препарату та якості барвників. Даний метод доволі широко використовуються у визначенні грампозитивних та грамнегативних бактерій і визначенні їх морфологічної будови [40].

2.5. Висновки до розділу

Для впливу ультразвуку на лабораторний біойогурт використовували апарат серії «ВОЛНА-Л», який призначений для проведення лабораторних досліджень. Ультразвукову обробку досліджувальних зразків біойогурту здійснювали після заквашування молока бактеріальною закваскою VIVO.

Після процесу сквашування, оцінку якості досліджуваних об'єктів здійснювали за номенклатурою, що включає загальноприйняті (стандартні) і додаткові показники якості об'єктів, в тому числі методи порівнянь і узагальнень, аналізу, моделювання, метод експертних оцінок отриманих результатів. Показники якості йогурта визначали за 3-ма основними групами: органолептичні, фізико-хімічні та мікробіологічні.

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Дослідження впливу ультразвукової обробки на активність клітин лібораторного біойогурту

Ультразвукове опромінювання біооб'єктів широко використовується в практиці отримання різних клітинних структур еукаріот та прокаріот, в цитології, для стерилізації харчових продуктів, а також, у якості мутагенного фактору. В залежності від інтенсивності, ультразвукові коливання призводять до загибелі бактеріальних та дріжджових клітин або до стимуляції їх росту [25].

Перед початком впливу ультразвуку на молочнокислі бактерії було заздалегідь підготоване поживне середовище Лактобакагар (середовище для лактобактерій та Біфідіум середовище (для біфідобактерій), пастеризоване молоко «Селянське» та бактеріальна закваска VIVO (молоко та закваску було придбано заздалегідь в продовольчому магазині). Біотехнологія приготування біойогурту (на основі закваски «VIVO біойогурт» з використанням чистих культур молочнокислих бактерій) складалася з декілька етапів:

- пастеризація молока;
- внесення закваски,
- ферментація (дозрівання біойогурту) при температурі 38°C протягом 6 годин.

Задля інтенсифікації бродильних процесів ферментації, молоко із закваскою, після перемішування, активували шляхом ультразвукової обробки при низькочастотному озвучуванні (44 кГц), середній (100 та 200 кГц) та кавітаційній (2 мГц) інтенсивності ультразвуку на установці ультразвукової технологічної «ВОЛНА-Л» модель УЗТА-0,4 / 22-ОМ (характеристика даного обладнання наведена у розділі 2). Ферментація йогурту проходила при температурі $38 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 6 годин в мультіварці Moulinex. Після зброджування, досліджений продукт було охолоджено

при кіманатній температурі та поміщено у холодильну камеру при температурі $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2. Дослідження впливу ультразвукової обробки лабораторного біойогурту

Методом Коха (метод серійних розведень) було досліджено мікробіологічну активність штамів-продуцентів йогурту. Титр молочнокислих бактерій визначали шляхом висіву дослідних та контрольного зразків йогурту на селективні поживні середовища (лакто – та біфідоагар) [27, 28]. Для контролю було взято йогурт, приготований за вищевказаною технологією, без ультразвукової обробки. Результати ультразвукової обробки лабораторного біойогурту за різної частоти та тривалості вказані у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Визначення титру лабораторного біойогурту з лактобактеріями після ультразвукової обробки

Частота ультразвуку, кГц	Час експозиції, хв.	Титр лактобактерій, *10 ⁸ КУО/мл
44	2,0	1
	5,0	40
	10,0	450
	20,0	400
100	2,0	70
	5,0	350
	10,0	4000
	20,0	3500
200	2,0	70
	5,0	400
	10,0	7000
	20,0	5000
2000	2,0	не має росту (стерилізаційний ефект ультразвуку)
	5,0	
	10,0	
	20,0	
Чашка с ростом колоний на лактоагарі – контроль (без ультразвуку) Титр лактобактерій: $7 \cdot 10^7$ КУО/мл		







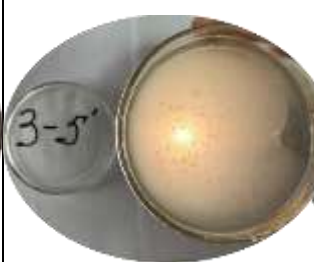









№	44 кГц	100 кГц	200 кГц	2 МГц
2 хв.				
5 хв.				
10 хв.				
20 хв.				

Рис.3.1. Чашки Петрі з лактобактеріями на лактоагарі після ультразвукової обробки за різної частоти та тривалості

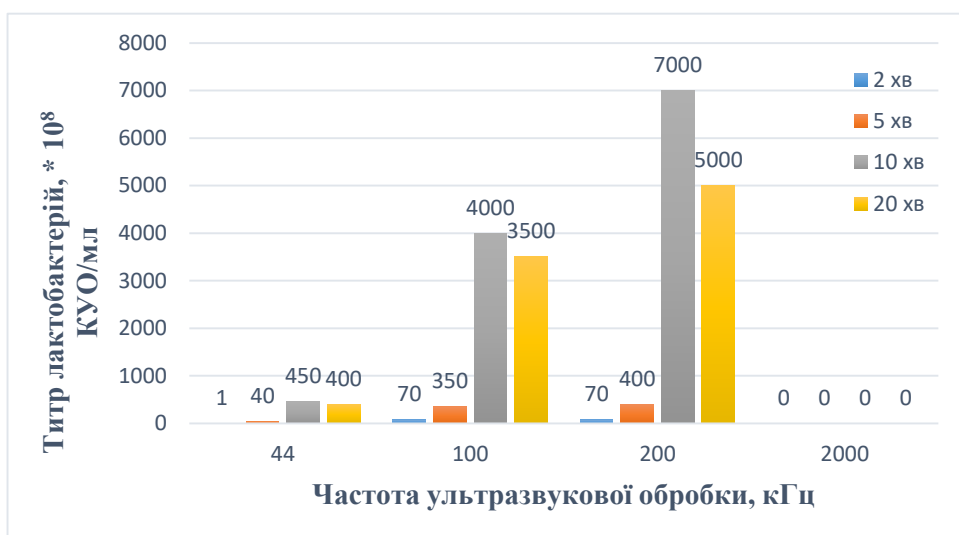


Рис. 3.1. Залежність росту лактобактерій від частоти та тривалості ультразвукової обробки

Результати ультразвукової обробки лабораторного біойогурту з біфідобактеріями за різної частоти та тривалості вказані у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Визначення титру лабораторного біойогурту з біфідобактеріями після ультразвукової обробки

Частота ультразвуку, кГц	Час експозиції, хв.	Титр біфідобактерій, *10 ⁷ КУО/мл
44	2,0	1
	5,0	1
	10,0	1
	20,0	1
100	2,0	40
	5,0	400
	10,0	400
	20,0	500
200	2,0	700
	5,0	7000
	10,0	8000
	20,0	9000
2000	2,0	не має росту (стерилізаційний ефект ультразвуку)
	5,0	
	10,0	
	20,0	
Титр біфідобактерій на біфідоагарі (контроль без ультразвуку 2*10 ⁷ кл/мл)		

















№	44 кГц	100 кГц	200 кГц	2 МГц
2 хв.				
5 хв.				
10 хв.				
20 хв.				

Рис. 3.2. Чашки Петрі з біфідобактеріями на біфідоагарі після ультразвукової обробки за різної частоти та тривалості

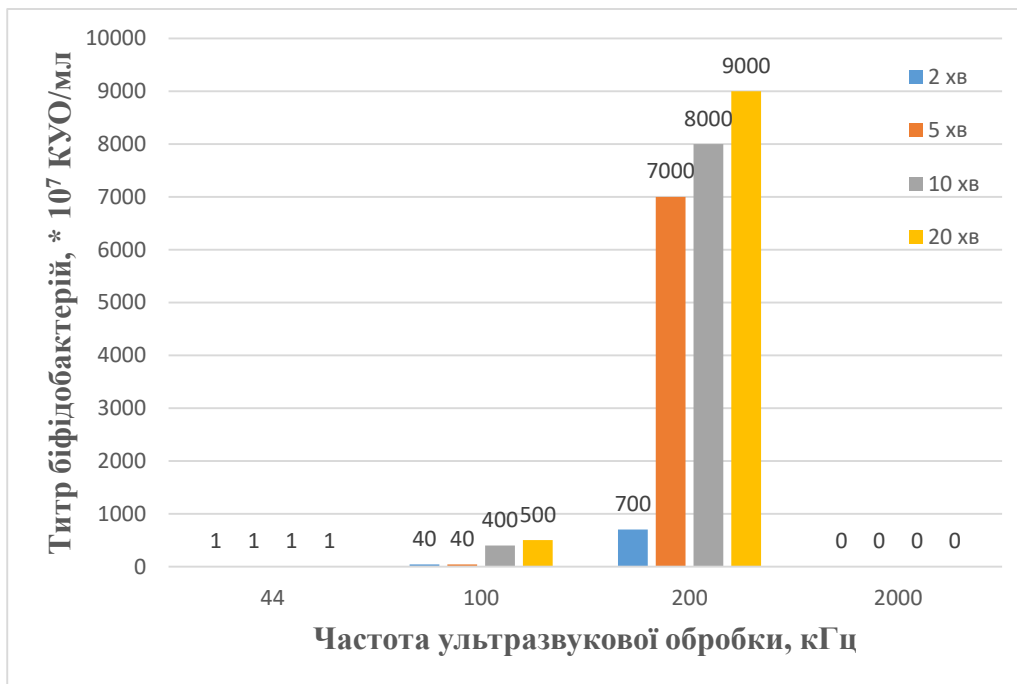


Рис. 3.3. Залежність росту біфідобактерій від частоти та тривалості ультразвукової обробки

За результатами досліджень встановлено оптимальні частоти ультразвукової обробки сировини та час експозиції, які сприяють інтенсивному розвитку молочнокислих бактерій, збільшенню їх титру, і як наслідок – інтенсифікації бродіння (ферментації) продукту на 30-35 %. Експериментами встановлено, що при низьких та середніх частотах ультразвукової обробки (44,100,200 кГц) відбувається нарощування біомаси молочнокислих бактерій та збільшення їх титру на 35 % а при високій частоті (2мГц) - відбувається стерилізаційний ефект від ультразвуку. Найоптимальніший умови нарощування біомаси за допомогою ультразвукової обробки як лакто- так і біфідобактерій за результатами дослідження встановлено при частоті ультразвуку 200 кГц та тривалістю 10 хвилин.

Отже, за результатами досліджено було встановлено можливість використання ультразвукового впливу та визначено його оптимальні режими в технології кисломолочних продуктів на етапі підготовки сировини до сквашування, яке дозволяє поліпшити технологічні властивості молочної сировини та стимулювати ріст

мікроорганізмів в ньому.

Оцінку якості досліджуваних зразків йогурту здійснювали за органолептичними, фізико-хімічними та мікробіологічними методами, описаними у розділі 2 [12].

3.3. Порівняльна оцінка показників якості лабораторного та промислових біойогуртів

3.3.1. Визначення органолептичних показників якості йогуртів

Якість йогурту оцінюють органолептично або сенсорно - визначають колір, консистенцію, запах, смак і на основі цього встановлюють наявність тих чи інших вад. Органолептичну оцінку йогурту проводили в світлому, добре провітреному приміщенні без сторонніх запахів [31]. Порівнювали промислові йогурти «Активія» (виробника «Danone»), «Молокія» (виробника «Тернопільський молокозавод») та лабораторні біойогурти без ультразвукової обробки – контроль та за ультразвукової обробки (див. таблицю 3.3).

Таблиця 3.3

Оцінка органолептичних показників якості лабораторних та промислових біойогуртів

Зразки досліджуваних проб йогурту	Досліджуваний показник		
	Колір	Запах і смак	Консистенція
«Активія»	Білий	Чистий, кисломолочний без сторонніх запахів	рідка
«Молокія»	Світло – жовтий	Чистий, кисломолочний без сторонніх запахів	рідка
Лабораторний, без ультразвукової обробки – Контроль	Кремовий	Чистий, кисломолочний без сторонніх запахів	густий
Лабораторний, за ультразвукової обробки	Світло – жовтий	Чистий, кисломолочний без сторонніх запахів	густий

Було виявлено, що колір, консистенція, запах та смак подібні що у

лабораторних зразків, що у промислових. Тому можна сказати, що лабораторний біойогурт, зроблений за вдосконаленою технологією зі застосуванням ультразвуку, відповідає вимогам ДСТУ 4343:2004 [12] та не уступає у якості відомих продуктів.

3.3.2. Визначення фізико-хімічних показників якості йогуртів

Відповідно до результатів, вказаних у таблиці, можна зробити висновок, що йогурт, зроблений за вдосконаленою технологією за застосуванням ультразвуку, відповідає вимогам ДСТУ 4343:2004 [12] та не уступає у якості відомих продуктів. Визначення фізико-хімічних показників проводилось у наступній послідовності:

- Температура, °С
- Масова частка вологи, %
- Масова частка білка, %
- Група чистоти
- Титрована кислотність, °Т
- Активна кислотність, рН
- Масова частка сухих речовин, %
- Густина, кг/м³

Дослідження проводили за вищезазначеними методиками пописанах у розділі 2. Результати розрахунків кожного з фізико-хімічних методів для кожного зразка представлено у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Фізико-хімічні показники зразків йогурту

Досліджуваний показник	Зразки досліджуваних проб йогурту			
	«Активія»	«Молокія»	Лабораторний, без ультра-звукової обробки – Контроль	Лабораторний, за ультразвукової обробки
Температура, °С	5	5	5	5
Масова частка вологи, %	65	66	60	60
Масова частка жиру, %	1,5	1,5	2,5	2,5

Закінчення таблиці 3.4

Масова частка білка, %	3	3	2,7	2,7
Титрована кислотність, °Т	98	85	94	115
Активна кислотність, рН	4,61	4,43	4,24	4,5
Масова частка сухих речовин, %	3,3	3,2	3,1	3,3
Густина, кг /м ³ (при температурі 20±5°С)	920	1000	1200	1200

Було виявлено, що значення результатів досліджуваних показників якості зразків лабораторних та промислових біойогуртів істотно не відрізнялись. Тому також можна зробити висновок, що лабораторні зразки біойогуртів відповідають вимогам ДСТУ 4343:2004 [12], а удосконалену технологію слід використовувати в промислових цілях для збільшення поживної цінності магазинної продукції, а саме біойогуртів.

3.3.3. Визначення мікробіологічних показників йогурту

Загальноприйнятим вважається, що молочнокислий продукт може називатися "біо", якщо він містить 10^6 - 10^7 КУО/г (або КУО/мл) пробіотичних мікроорганізмів (молочнокислих бактерій і біфідобактерій) (див. таблицю 1.3). Для визначення мікрофлори досліджувальних зразків було визначено наступні мікробіологічні показники:

- Титр молочнокислих бактерій КУО/мл (за методом Коха) [40];
- Морфологічні ознаки мікрофлори йогуртів та закваски (за методом Грама) [40].

Роботу проводили у стерильному, добре освітленому приміщенні, завчасно обробивши УФ-випромінюванням близько 30 хв. Роботу проводили над спиртівкою, підтримуючи стерильні умови.





Титр молочнокислих бактерій визначали за методом Коха (методом серійних

розведень). З кожного дослідженого зразку було відібрано по 1 мл та додали 9 мл дистильованої води. Розведення здійснювали до 6-кратного для кожного зразку йогурту та посіяно по 0,2 мл на агаризоване тверде середовище [40].

Зразки культивували в термостаті при температурі $37 \pm 2^\circ\text{C}$ протягом 48 годин. Результати, отримані в ході дослідження, наведені у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Визначення титру молочнокислих бактерій
у досліджувальних зразках йогурту

Зразки досліджуваних проб йогурту	Титр молочнокислих бактерій, КУО/мл	Візуалізація результатів
«Активія»	$12 \cdot 10^4$ КУО/мл	
«Молокія»	$35 \cdot 10^3$ КУО/мл	
Лабораторний, без ультразвукової обробки – Контроль	$14 \cdot 10^7$ КУО/мл	
Лабораторний, за ультразвукової обробки	$29 \cdot 10^{11}$ КУО/мл	

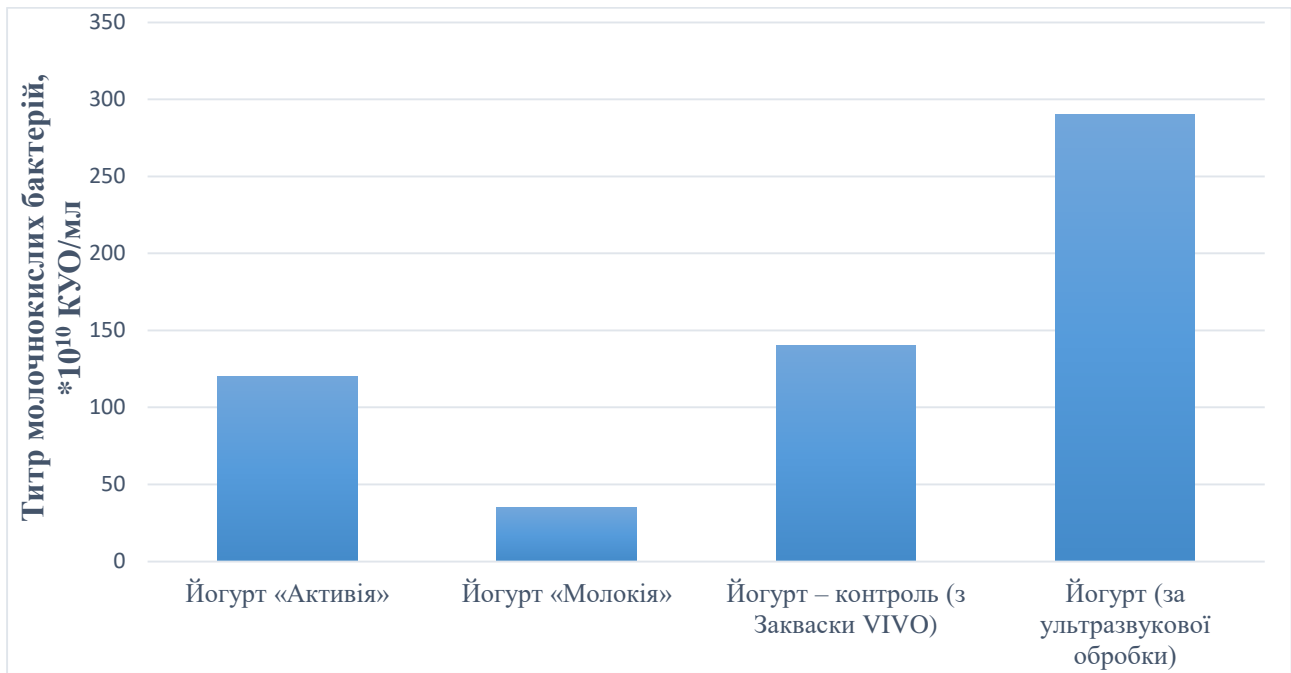


Рис.3.4. Графік визначення титру молочнокислих бактерій у лабораторних та промислових біойогуртах

Мікроскопічні препарати готували за загально визнаною методикою та фарбували метиленовим синім відповідно до ГОСТ 33951-2016 [42] Аналіз мікроскопічних препаратів здійснювали за допомогою мікроскопу Microscope Digital Eyepiece DCM-800 зі збільшенням 1350 разів (див. рис. 3.5).

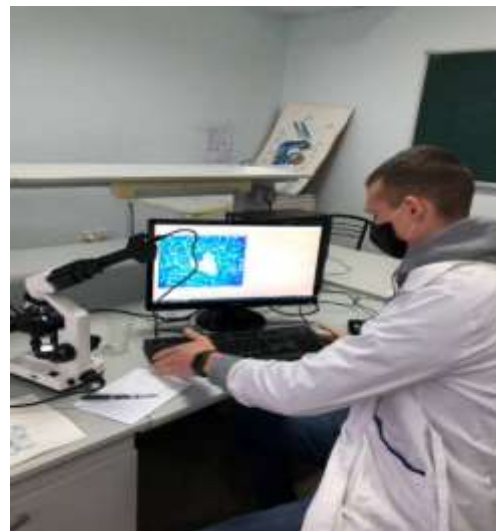
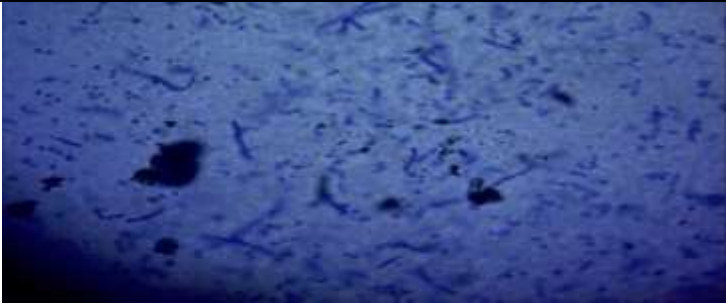





Рис. 3.5. Мікроскопіювання дослідних зразків лабораторних та промислових біойогуртів

Шляхом мікроскопії досліджених зразків йогурт торгової марки «Активія» було визначено різноманіття мікрофлори, а саме лакто- та біфідобактерії. Відповідно до встановлених результатів, в йогурті торгової марки «Молокія» показав низький титр молочнокислих бактерій та бідне різноманіття молочнокислих бактерій у порівнянні з йогуртом «Активія». Результати мікроскопіювання наведенні у таблиці 3.6.

Таблиця 3.6

Морфологічні ознаки мікрофлори йогуртів та закваски
(за методом Грама)

Зразки досліджуваних проб йогурту	Мікробіота зразків (світловий мікроскоп, збільшення 1350)
«Активія»	
«Молокія»	
Лабораторний, без ультразвукової обробки – Контроль	
Лабораторний, за ультразвукової обробки	

Досліджуючи зразки йогурта власного виробництва, відповідно зразок йогурту за ультразвукової обробки та йогурт-контроль, можна охарактеризувати як високоактивні, про що свідчить скупчення колоній при мікроскопіюванні та високий титр молочнокислих бактерій.

3.4. Удосконалена технологічна схема виготовлення біойогуртів

Основними традиційними технологіями виробництва біойогуртів є термостатний та резервуарний способи (див. роздал 1). За результатами аналізу лабораторних та промислових біойогуртів, можна зробити висновок, що промислові продукти менш корисні через низький титр молочнокислих бактерій у їхньому складі. Тому пропонуємо удосконалену технологію виробництва біойогуртів з використанням ультразвукової установки, резервуарним методом (див. Додаток А).

Перед технологічним процесом виробництва, були здійснені допоміжні роботи, такі як: підготовка обладнання та приміщень з метою запобігання контамінації патогенними мікроорганізмами і підготовка повітря та води – для використання у технологічних етапах виробництва.

Невід'ємним етапом виробництва є підготовка молока. Молоко до переробки зберігають охолодженим в резервуарах при температурі $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Термін зберігання молока в резервуарах не повинен перевищувати 3-4 години. Відбирають певну кількість молока для виробництва готового продукту та нормалізують по масовій частці сухих речовин та жиру. У якості сухих компонентів додають цукор та стабілізатори. Суміш гомогенізують при температурі $60-65^\circ\text{C}$ та тиску 10-15 МПа, пастеризують при температурі $84-86^\circ\text{C}$ тривалістю 15 хвилин. Отриману суспензію охолоджують до температури заквашування $40-45^\circ\text{C}$ та передають до наступного технологічного етапу виробництва.

В резервуар з пастеризованим та охолодженим молоком вносять 3-5 % бактеріальної закваски, в склад якої входять молочнокислі бактерії (лакто- та біфідобактерії).

Ультразвукову обробку проводять негайно після заквашування при частоті

ультразвуку 200 кГц та тривалості 10 хвилин для підвищення активності молочнокислих бактерій (див. розділ 3).

Процес ферментації (або сквашування) проводять протягом 4-6 годин до утворення згустку, при значенні рН 6,5-7,0. Титр молочнокислих бактерій та кислотність згустку підлягає постійному контролю.

Після ферментації згусток охолоджують при постійному перемішуванні до кімнатної температури 20-25 °С та, за бажанням виробника, вносять наповнювачі (ягідні, фруктові та ін.).

Готовий продукт розливають у промарковану тару та упаковують для реалізації. Упакований продукт зберігають у холодильних камерах за температури $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.5. Висновки до розділу

Для визначення впливу ультразвукової обробки, лабораторні зразки біоїогурту обробляли при різній частоті УЗ (44, 100, 200 та 2000 кГц) та тривалості обробки (2, 5, 10 та 20 хвилин). В кожному із зразків підраховували титр молочнокислих бактерій.

Для підтвердження якості лабораторних зразків біоїогурту, порівнювали основні показники якості (органолептичні, фізико-хімічні та мікробіологічні) з промисловими зразками біоїогуртів – торгової марки «Активія» та «Молокія». За результатами досліджень встановлено, що титр та різноманітність молочнокислих бактерій переважає у зразках йогурту за обробки УЗВ.

Запропонована технологія виробництва біоїогурту зі застосування ультразвуку в технології виробництва біоїогурту, поліпшує споживчі властивості готових біоїогуртів, які більш корисні для організму та не уступають у якості магазинним продуктам.

ВИСНОВКИ

1. З'ясовано, що до пробіотичних препаратів входять молочнокислі бактерії різних родів: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* та ін. Сучасні технології виробництва йогуртів віддають перевагу резервуарному способу, як найбільш економічно та технологічно доцільному.
2. Досліджено, що кількість клітин закваски "VIVO" після дії ультразвуку збільшується у 10^4 разів у порівнянні з контролем.
3. Також, показано стимулююча дія ультразвуку при визначенні кількості лакто- та біфідобактерій на диференційно-діагностичних середовищах після дії УЗ. Досліджено, що максимальний титр лактобактерій становить $7 \cdot 10^{11}$ КУО кл/мл впродовж 10 хв за 200 кГц, а біфідобактерій в 10 разів менше - $9 \cdot 10^{10}$ КУО кл/мл впродовж 20 хв за 200 кГц.
4. Проведено оцінку якості дослідних зразків лабораторного біойогурту (обробленого ультразвуком) та наведено порівняльну характеристику магазинних зразків різних торговельних марок. Встановлено, що лабораторний біойогурт (оброблений ультразвуком) у порівнянні з торговими марками «Активія» та «Молокія» не поступається за органолептичними та фізико-хімічними показниками. Але титр клітин переважає у зразку лабораторного йогурту за обробки ультразвуком у 10^7 разів.
5. Використання ультразвукової обробки молочної сировини на стадії заквашування може допомогти збільшити кількість молочнокислих бактерій та поліпшити споживчі властивості біойогуртів.

СПИСОК БІБЛЮГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. ДСТУ 7999:2015 Продукти харчові. Методи визначання молочнокислих бактерій», [Чинний від 01.01.2017] Вид. офіц. Київ, 2016. 16 с.
2. ДСТУ 4540:2006 Напої ацидофільні. [Чинний від 01.04.2007] Вид. офіц. Київ, 2007. 9 с.
3. ДСТУ 7710:2015 Продукти кисломолочні для дитячого харчування. [Чинний від 01.08.2016] Вид. офіц. Київ, 2016. 11 с.
4. ДСТУ ISO 9232/ IDF 146:2012 Йогурт. Ідентифікація характерних мікроорганізмів Д (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* та *Streptococcus thermophilus*) (ISO 9232:2003 (IDF 146:2003) [Чинний від 01.05.2013] Вид. офіц. Київ, 2012. 19 с.
5. ДСТУ ISO 11869:2007 Йогурт. Визначення титрової кислотності потенціометричним методом (ISO 11869:1997, IDT) [Чинний від 01.01.2000] Вид. офіц. Київ, 2000. — 8 с.
6. Некрасов П. О. Інноваційна технологія біфідовмісних комбінованих кисломолочних напоїв функціонального призначення. Харчова наука і технологія. - 2014. - № 2. - С. 49-56.
7. Акопян, В. Б. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами: Ультразвук в медицине, ветеринарии и экспериментальной биологии. — М. : МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2005. — 224 с.
8. Ультразвук і інфразвук: застосування. URL: <https://ru.osvita.ua/vnz/reports/bjd/22731/> (Дата звернення: 15.12.2020).
9. Старовойтова А.А. Мікробіологія молока і молочнокислих продуктів. — Біла Церква: Навчальний посібник. НАУ, 2017. — 153 с.
10. Андрушків К.В. Розробка технології йогурту з екстрактом чебрецю / Андрушків К.В., Вічко О.І., Сторож Л.А. — Тернопіль: Навчальний посібник. Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, 2020. — 82 с.

11. Вивчення мікробіологічного складу і органолептичних показників якості кисломолочних йогуртів на різних етапах терміну придатності». URL: https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2019/04/KONKURS_SHYFR-More.pdf (Дата звернення: 03.04.2021).
12. ДСТУ 4343:2004 Йогурти. Загальні технічні умови. Дата початку дії, 01.10.2005. [Чинний від 20.09.2004] Вид. офіц. Київ, 2005. 11 с.
13. Молочнокисле бродіння URL: https://uk.wikipedia.org/wiki/Молочнокисле_бродіння (Дата звернення: 11.03.2021).
14. Молочнокисле бродіння: поетапний процес та приклади URL: <https://uk.warbletoncouncil.org/fermentacion-lactica-753> (Дата звернення: 16.05.2021).
15. Філімоненко О. Ю. Біохімічні основи мікробного синтезу. – Дніпродзержинськ: Конспект лекцій: Біотехнологія, 2016. – 183 с.
16. Пирог, Т. П. Становлення та розвиток мікробіології. / Т. П. Пирог Загальна мікробіологія : підручник. - 2 вид., доп. і перероб. – К. : НУХТ, 2010. – 620 с.
17. Беспоместных К.В. Исследование биохимических, морфологических и свойства штаммов бактерий рода *Lactobacillus*. / К.В. Беспоместных, А.Г. Галстян, Е.В. Короткая: Техника и технология пищевых производств, 2011. – №2. – С. 11-15.
18. Закваска болгарська паличка URL: <https://cbo.org.ua/zakvaska-bolgarska-palichka> (Дата звернення: 06.03.2021).
19. Соломон А. М. Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник для студентів напряму підготовки «Харчові технології». / Соломон А.М., Казмірук Н.М., Тузова С.Д. – Вінниця: РВВ ВНАУ, 2020. – 312 с.
20. Мокрозуб В. В. Антибактеріальні й імуномодулювальні властивості штамів лакто- та біфідобактерій за експериментальної стафілококової інфекції. Біотехнологія. / Мокрозуб В. В., Лазаренко Л. М., Бабенко Л. П., Шинкаренко Л. М., Співак М. Я. – К.: Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, 2012. – Т. 5, № 2 – С. 98–104.
21. Володин Д.Н. Прогресивний підхід до класичних технологій. Молочна промисловість. / Власенко В. В., Головка М. П., Семко Т. В., Головка Т. М. – Харків:

ХДУХТ, 2018. – № 10. – 240 с.

22. Гордієнко Л.А. Обогащенные ацидофильные напитки. Молочная река. – Ставрополь : Северо-Кавказский федеральный университет, 2014. – № 2(54). – С. 62-63.

23. Хамагаева И.С. Научні основи біотехнології кисломолочних продуктів для детского и диетического питания: монографія. – Улан-Уде: Изд-во ВСГТУ, 2005. – 279 с.

24. Антушева Т. И. Некоторые особенности влияния ультразвука на микроорганизмы. «Живые и биокосные системы». – 2013. – № 4; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue4/article-11> (Дата звернення: 25.04.2021).

25. Литвинова Н. К. Пути повышения эффективности ультразвукового воздействия для выделения коклюшных антигенов и конструирования эритроцитарных диагностикумов. Автореф. дис. канд. биол. наук.: 03.00.07 – Ростов-на-Дону, 1982. – 164 с.

26. Мельничук М.Д. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник. – К.: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. – 254 с.

27. Середовище Лактабакагар. URL: http://agar.com.ua/Lactobac_agar_250 (Дата звернення: 13.04.2021).

28. Середовище Біфідіум. URL: https://chemtest.com.ua/ua/bifidum-seredovishhe_zhivilna_suxa (Дата звернення: 13.04.2021).

29. Халіль А. Х. Оптимізація процесів культивування у виробництві пробіотичних препаратів на основі лактобаціл: Автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.20 / НАН України; Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. – К., 2004. – 32 с.

30. Ускова Д.Г. Формирование и оценка качества йогуртов с использованием фукоидана и ультразвуковой микронизации: автореф. дис. канд. техн. наук : 05.18.15 / Технология и товароведение пищевых продуктов. – Челябинск, 2019. – С. 39-47.

31. Болгова Н.В. Органолептична характеристика йогурту. З рослинною добавкою. Болгова Н.В., канд. с.-г. наук, доц. – Суми: Сумський національний аграрний університет, 2017. – 185 с.

32. ГОСТ 29246-91 Консервы молочные сухие. Методы определения влаги. [Чинний від 01.07.1993] Вид. офіц. Київ, 1991. 10 с.
33. ГОСТ 29247-91 Консервы молочные. Методы определения жира. [Чинний від 01.07.1993] Вид. офіц. Київ, 1991. 5 с.
34. ГОСТ 25179-90 Молоко. Методы определения белка. [Чинний від 01.01.1991] Вид. офіц. Київ, 1991. 10 с.
35. Похил В.І. Технологія переробки продукції тваринництва. / Похил В.І., Похил О.М., Рубан О.А. Методичні вказівки. – Біла Церква: БНАУ, 2012. – 104 с.
36. ГОСТ 3624-92 Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. [Чинний від 01.01.1994] Вид. офіц. Київ, 1992. 7 с.
37. ГОСТ 32892-2014 Молоко и молочная продукция. Метод измерения активной кислотности. [Чинний від 29.04.2014] Вид. офіц. Київ, 1985. 3 с.
38. ГОСТ Р 54761-2011 «Молоко и молочная продукция. Методы определения массовой доли сухого обезжиренного молочного остатка» [Чинний від 01.01.2011] Вид. офіц. Київ, 2011. 12 с.
39. ГОСТ 3625-84 Молоко и молочные продукты. Методы определения плотности. [Чинний від 01.07.1984] Вид. офіц. Київ, 1984. 13 с.
40. Мельничук М.Д. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник / Мельничук М. Д., Кляченко О. Л., Бородай В. В., Коломієць Ю. В. – К.: ФОП Корзун Д. Ю., 2014. – 252 с.
41. Грінченко Д.М. Мікробіологія. Методичні рекомендації. / Грінченко Д.М. Білоконов І.І. – Харків: РВВ ХДЗВА, 2017. – 56 с.
42. ГОСТ 33951-2016 Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. [Чинний від 01.09.2017] Вид. офіц. Київ, 2016. 13с.

ДОДАТКИ

Додаток А

Удосконалена технологічна схема виготовлення біойогуртів

