

Міністерство освіти і науки України
Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

Інженерії машин, споруд і технології

(повна назва факультету)

Харчової біотехнології і хімії

(повна назва кафедри)

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня

Магістр

(назва освітнього ступеня)

на тему: «Характеристика властивостей молочнокислих лактококів»
«Characteristics of lactococci properties»

Виконав(ла): студент(ка) 6 курсу, групи МЛм361
спеціальності _____

181 «Харчові технології»

(шифр і назва спеціальності)

	_____	Ігнатів І.О.
	(підпис)	(прізвище та ініціали)
Керівник	_____	Юкало В.Г.
	(підпис)	(прізвище та ініціали)
Нормоконтроль	_____	Покотило О.С.
	(підпис)	(прізвище та ініціали)
Завідувач кафедри	_____	Покотило О.С.
	(підпис)	(прізвище та ініціали)
Рецензент	_____	Ткачук Р.А.
	(підпис)	(прізвище та ініціали)

Тернопіль 2020

Міністерство освіти і науки України
Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

Факультет Інженерії машин, споруд і технологій
(повна назва факультету)

Кафедра Харчової біотехнології і хімії
(повна назва кафедри)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

Покотило О.С

(підпис)

(прізвище та ініціали)

« »

20__ р.

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ

на здобуття освітнього ступеня Магістр
(назва освітнього ступеня)

за спеціальністю 181 “Харчові технології”
(шифр і назва спеціальності)

студенту Ігнатів Ірина Олександрівна
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Характеристика властивостей молочнокислих лактококів

Керівник роботи Юкало Володимир Глібович
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

Затверджені наказом ректора від « 01 » вересня 2020 року № 4-7621

2. Термін подання студентом завершеної роботи Грудень 2020

3. Вихідні дані до роботи Спеціальна, періодична література та нормативна документація з питань досліджень. Методики та методи досліджень стандартні та уніфіковані

4. Зміст роботи (перелік питань, які потрібно розробити)

Провести літературний та патентний пошук щодо характеристики властивостей молочнокислих лактококів

Провести характеристику заквасок, визначити основні властивості лактококів,

Охарактеризувати використання лактококів у виробництві молочнокислих продуктів та молочної кислоти

Характеристика протеїназо-позитивних штамів та визначення протеолітичної активності відібраних штамів

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень, слайдів)

таблиці, графіки, схеми, діаграми

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Охорона праці			
Безпека в надзвичайних ситуаціях			
Нормоконтроль			

7. Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	Аналітичний огляд та патентний пошук інформації відповідно до теми магістерської роботи	14.05.20 р. – 31.05.20 р.	
2.	Опрацювання методики досліджень	11.06.20 р. – 27.06.20 р.	
3.	Виконання розділу 1	03.09.20 р. – 28.09.20 р.	
4.	Виконання розділу 2	01.10.20 р. – 15.10.20 р.	
5.	Виконання розділу 3	09.10.2020.- 15.10.2020 р.	
6.	Збір інформації до виконання розділу «Безпека в надзвичайних ситуаціях» та «Охорона праці»	16.10.20 р. – 04.11.20 р.	
7.	Закінчення написання розділів	05.11.20 р – 30.11.20 р.	
8.	Подання магістерської роботи до захисту	07.12.20 р	

Студент

_____ (підпис)

Ігнатів І.О.

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Юкало В.Г.

_____ (прізвище та ініціали)

Анотація

Ігнатів І.О. Характеристика властивостей молочнокислих лактококів.-
Рукопис.

Дослідження на здобуття кваліфікації магістра з спеціальності 181 «Харчові технології». – Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, Тернопіль 2020.

Магістерська кваліфікаційна робота присвячена характеристиці властивостей молочнокислих бактерій.

Проведена характеристика властивостей кисломолочних лактококів та кисломолочних продуктів.

Ключові слова : молочнокислі бактерії, лактококи, морфологічні властивості, культуральні властивості.

Annotation

Ihnativ I.O. Characteristics of the properties of lactic acid lactococci.-
Manuscript.

Research to obtain a master's degree in specialty 181 "Food Technology".
- Ternopil National Technical University named after Ivan Pulyuy, Ternopil 2020.

The master's qualification work is devoted to the characterization of the properties of lactic acid bacteria.

The characteristics of fermented milk lactococci and fermented milk products are characterized.

Keywords: lactic acid bacteria, lactococci, morphological properties, cultural properties.

Зміст

	Вступ	4
1.	Огляд літератури	7
1.1.	Характеристика лактококів	7
1.2.	Характеристика заквасок	16
1.3.	Використання лактококів у виробництві молочнокислих продуктів	25
2.	Матеріали і методи досліджень	29
3.	Результати досліджень та їх обговорення	32
3.1.	Характеристика протеїназо-позитивних штамів та визначення протеолітичної активності відібраних штамів	32
3.2.	Кислотна коагуляція казеїнів. Утворення молочної кислоти	44
3.3.	Стійкість штамів лактококів до дії NaCl	47
4.	Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях	51
4.1.	Охорона праці	51
4.1.1.	Конституційні засади охорони праці в Україні	51
4.1.2.	Охорона праці жінок, неповнолітніх, інвалідів	53
4.1.3.	Відповідальність посадових осіб і працівників за порушення законодавства про охорону праці	54
4.2.	Безпека в надзвичайних ситуаціях	57

4.2.1.	Застосування засобів захисту та знезараження молочних продуктів та сировини на підприємствах молочної промисловості	57
	Висновки	60
	Перелік посилань	61
	Додатки	67

Вступ

Актуальність досліджень. Кисломолочні продукти, які виготовляють шляхом бродіння, мають важливу роль у харчуванні людини. Комерційні композиції заквасок створюють за допомогою досліджень та оцінки складу біологічної активності. Найпоширенішими в природі є лактококи. Їх виділяють з молока, шлунково-кишкового тракту тварин, мікробіоти рослин, ферментованих продуктів. Молочнокислі бактерії, потрапляючи у кишечник з кисломолочними продуктами, створюють кисле середовище. Що не дає змоги для розвитку гнільних бактерій. Такі бактерії викликають розпад білків їжі та утворюють токсичні речовини, які погано впливають на життєдіяльність організмів. Кисломолочні продукти мають в своєму складі антибіотичні речовини. Вони пригнічують розвиток небажаної мікрофлори кишечника та збудника туберкульозу. Антибіотичні речовини утворюють також біфідобактерії, ацидофільну паличку, молочний та вершковий стрептококи . Казеїн молока за допомогою молочної кислоти коагулює та утворює пластівці.

При таких умовах кисломолочні продукти засвоюються набагато краще. Кисле молоко протягом однієї години засвоюється організмом людини на 92%, коли незбиране молоко за такий же час на 32%. З точки зору фізіології кисломолочні продукти є досить корисними . Також, продукти кисломолочного бродіння багаті на амінокислоти, які є незамінними та легко засвоюються організмом людини. Особливо багато у кисломолочних продуктах міститься вітамінів, наприклад, вітаміни А, D та Е. Що стосується обміну речовин, то кисломолочні продукти мають в своєму складі кальцій, магній, фосфор та солі.

Постановка проблеми. Представники роду *Lactococcus* використовуються у вигляді заквасочних культур, наприклад для виготовлення сирів і ферментування молока. Основною проблемою є характеристика протеїназо-позитивних штамів та визначення протеолітичної активності відібраних штамів. Для промислових штамів важливим є бродіння

у сирому молоці. За допомогою кислоти молочної відбувається утворення згустку та пригнічується ріст небажаної сторонньої мікрофлори.

Мета досліджень. Метою даної роботи був відбір протеїназо-позитивних лактококів і характеристика біохімічних та фізіологічних властивостей.

Для досягнення мети, необхідно виконати наступні завдання:

1. Літературно-патентний огляд властивостей лактококів та їх вплив на кисломолочні продукти.

2. Відбір протеїназо-позитивних штамів і характеристика їх протеолітичної активності.

3. Характеристика кислотоутворюючих властивостей та кислотної коагуляції казеїнів.

4. Дослідження стійкості штамів лактококів до дії NaCl.

Об'єкт дослідження: Штами лактококів, що використовуються у складі заквасок молочнокислих продуктів.

Предмет дослідження: Культуральні та протеолітичні властивості лактококів, кислотоутворююча властивість та стійкість до NaCl.

Методи досліджень:

- Спектрофотометричний метод для виявлення протеолітичної активності лактококів.
- Протеоліз білкових фракцій молока визначали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі.
- Утворення молочної кислоти штамми лактококів визначали титриметричним методом і виражали у градусах Тернера.
- Стійкості штамів лактококів до дії NaCl.

Наукова новизна: Вперше охарактеризовано протеолітичну активність дев'яти штамів лактококів і відібрано протеїназо-позитивні штами по відношенню до білків молока.

Практичне значення одержаних результатів: Отримані результати можуть бути використані при відборі штамів до складу заквасок, які використовуються при виробництві молочних продуктів.

Особистий внесок: Полягає в огляді обраної теми та проведенні досліджень для подальшого формування висновків та підготовки одержаного матеріалу до публікації.

Апробація. Результати роботи доповідались на ІХ Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» 10-11 листопада 2020 року в НУХТ, (м. Київ).

Публікації. За результатами магістерської роботи опубліковано матеріали доповіді у тезах (Додаток 1).

Структура роботи. Робота включає: вступ, огляд літератури, матеріали та дослідження, результати досліджень, розділ «Охорона праці», «Безпека в надзвичайних ситуаціях», перелік посилань та додатки. Загальний зміст роботи викладений на 67 сторінках, містить 8 таблиць, 12 рисунків. Перелік посилань містить 60 найменувань.

Розділ 1

Огляд літератури

1.1. Характеристика лактококів

Молоко вважають відмінним джерелом лактококів. Адже, має властивість нейтралізувати стійкі антибіотичні мікроорганізми, та захищає від різноманітних інфекцій. У дослідженнях проведених в лабораторії ця бактерія знизилася кількість патогених організмів у 10 000 разів [1].

Lsc. lactis ще називають природним підсилювачем імунітету. Що в свою чергу допомагає запобігти пневмококовій інфекції та зменшує ураження легенів у людей ,які хворі на грип. В тому числі ризик застуди та грипу зменшується у декілька разів. Молоко це найкращий захист від імунних розладів та алергії [1, 2].

Lactococcus lactis є мікробом, який неофіційно класифікується як бактерія молочної кислоти, оскільки він ферментує молочний цукор до молочної кислоти. Лактококи є сферичними, яйцеподібними клітинами. Які мають розмір 1,2 мкм на 1,5 мкм, що зазвичай зустрічаються парами та короткими ланцюгами. Лактококи є грампозитивними, не рухомими і не утворюють спор. Виявлено, що лактококи легко прищеплюються в молоко. Зазвичай містяться в молоці та можуть бути природною причиною скисання.

Lactococcus lactis має основні два підвиди, *lactis* і *cremoris* . Їх використовують у виробництві сиру та інших кисломолочних продуктів та напоїв. *Lactococcus lactis* також пов'язаний з другими молочнокислими бактеріями, наприклад, *Lactobacillus acidophilus*. Він знаходяться у нашому кишковому тракті і *Streptococcus salivarius*, що перебуває у ротовій порожнині. Лактокок має відмінність від інших бактерій молочнокислого походження тим, що відрізняється за такими показниками як: рН та температурою, що дозволяє використовувати як культуру для виготовлення сиру.

Важливу роль *Lactococcus lactis* відіграє у виготовленні таких сирів як вершковий сир, камамбер, чеддер, брі, рокфор та молочнокислих продуктів як сметана, кефір та масло [3]. Він також використовується для овочевих ферментацій, наприклад, соління огіркові та капуста квашена. Бактерію використовують в заквасочних одношарових культурах та й у змішаних культурах разом з іншими бактеріями родів *Lactobacillus* і *Streptococcus*.

При додаванні *Lactococcus lactis* в молоко, бактерія використовує ферменти в результаті чого отримує молекули енергії, які називають АТФ. Побічним продуктом виробництва АТФ є молочна кислота. Молочна кислота згортає молоко, яке пізніше відокремлюється і утворює сир, який використовується для виробництва сиру та сироватки.

У виробництві сиру згущення молока не єдина роль бактерії. Молочна кислота, що виробляється бактерією, знижує рН продукту та характеризується властивістю захищати від розвитку небажаних бактерій і цвілі. Також ферменти та продукти метаболізму відіграють важливу роль в утворенні різноманітних ароматів, що допомагає відрізнити різновиди сирів.

Чудовим середовищем для мікроорганізмів людини вважають мікробіоту кишечника. Вони корисні для роботи мозку, імунітету, засвоюваності різноманітних поживних речовин, допомагають у травленні та обміні речовин [9]. Але існують такі, що можуть шкодити організму. Для збалансування флори кишківника є продукти, які у своєму складі містять бактерії, що несуть користь, наприклад, капуста квашена, різноманітні соління, соя та молоко та молочнокислі продукти [10]. Ці мікроорганізми носять назву пробіотики та дають змогу підтримувати організм здоровим. Молоко виявляється особливо корисним.

Кисломолочні продукти є більш засвоюванішими ніж молоко. При вживанні кисломолочних продуктів покращується апетит та моторика органів травлення та покращується стан організму, зміцнюється нервова система.

Людам, що мають непереносимість жиру рекомендовано вживати продукти кисломолочного походження. Ці кисломолочні продукти виготовляються із знежиреного молока.

Молоко вважається чудовим середовищем для розвитку мікроорганізмів, які вносяться за допомогою закваски [47].

Біохімічні процеси, при переробленні молока[6]:

- Розщеплюється казеїн молока за допомогою пліснявим грибам, протеолітичним та молочнокислим бактеріям, дріжджам, та мікрококам.
- Розщеплюється молочний жир та розвиваються плісняві гриби та ліполітичні мікроорганізми.
- Розщеплюються вуглеводи в молоці за допомогою маслянокислих бактерій, дріжджів та БГКП.

Молочнокислі лактококи широко поширені в природі [4]. Лактококи називають факультативними анаеробами, що є нерухливими та не утворюють спор та капсул, фарбуються позитивно за Грамом. *Lactococcus* є грам-позитивними бактеріями, які використовуються при виготовленні маслянки та сиру. Використовуються на виробництві ферментованих молочних продуктів. Використовуються як в одній групі заквасок так і можуть бути змішанні з другими бактеріями. Основною їх функцією є швидке підкислення молока, та запобігання розвитку бактерій, які псують та викликають падіння рН продукту ферментованого [4,10]. Також кисломолочні бактерії використовують при виготовленні білків, які в подальшому використовують у харчовій промисловості.

Молочнокислі лактококи

Молочнокислі лактококи, ще їх називають стрептококами є поширеними в навколишньому середовищі та мають властивість розмножуватись на квітах, листках і плодах рослин, також можливо у ґрунті,

кормах, молочних продуктах і м'ясних продуктах, не виключення є кишечник людини і тварини [10]. Всі лактококи є факультативними анаеробами, вони позитивно фарбуються за Грамом та можуть виявляти протеолітичну активність.

Гомоферментативні лактококи

До гомоферментативних лактококів належать *Lactococcus lactis* та *Lactococcus cremoris*. Використовуються у виробництві кисломолочних продуктів, та входять до складу заквасок для виробництва кисломолочних сирів, сметани, масла та різновидів твердих сирів. Лістер у 1873 році виділив *Lactococcus lactis* у чистій культурі [41]. *Lactococcus lactis* з пилком, який знаходиться на рослинах може потрапити на доїльне обладнання, а потім в молоко. Також властивістю *Lactococcus lactis* є утворення нізину, тобто антибіотика.

Морфологічні властивості

Молочний лактокок, а саме, його клітини круглої форми, розміщуються у вигляді диплокрків та можуть бути у вигляді коротких ланцюжків. Спор не утворює, є нерухливим, грампозитивним [59].

Культуральні властивості

Lactococcus lactis називають факультативним анаеробом. Він росте не тільки в анаеробних умовах, тобто без кисню, але і при наявності кисню молекулярного. Не росте на звичайних живильних середовищах. Тому до живильних середовищ додають різні екстракти, наприклад, дріжджовий автолізат та інші речовини що містять вітаміни. *Lactococcus lactis* також культивують на знежиреному стерильному молоці або на щільних та рідких живильних середовищах, які є штучними, та використовують молоко

гідролізоване. Мікроорганізм на таких живильних середовищах має можливість утворити колонії, які є човникоподібної чи округлої росинчастої форми. На поверхні середовища виростають круглі росинчасті колонії, які мають рівний край, а човникоподібні колонії характеризують вrostанням в агар. Оптимальною температурою для їх росту вважають 30-35°C. *Lactococcus lactis* характеризується активним кислотоутворенням, при якому молоко сквашується протягом 6-10 годин, та має кислотність 120°Т. Молоко, яке сквашене повинно мати рівний та щільний згусток з приємним кислуватим смаком і запахом. Також має властивість для зброджування мальтози, декстрину. Характеризується утворенням аміаку та росте за температури 40°C. Також може рости в середовищі при рН 9,2 з 4% розчином NaCl. Переважно використовується у заквасках при виробництві кисломолочного сиру, сметани та масла.

Lactococcus cremoris, який має назву як вершковий лактокок не так часто зустрічається у молоці сирому, в порівнянні з *Lactococcus lactis*. Окремі штами цього лактококу виробляють диплококцин, як антибіотик.

Морфологічні властивості

В порівнянні з молочним лактококом, вершковий має змогу утворити ланцюжки, які можуть бути середніх чи довших розмірів.

Культури штамів *Lactococcus cremoris*, які ще є досить молодими можуть мати капсулу. Є нерухливими та грампозитивними[10].

Культуральні властивості

Вершковий лактокок на живильному середовищі чимось подібний за ростом до *Lactococcus lactis*.

Оптимальною температурою для їх росту вважають 25-30°C. При таких умовах молоко сквашується протягом 8-12 годин, та має кислотність 110-115°Т. В процесі сквашування молока згусток набуває сметаноподібної консистенції, також їм притаманний кислуватий запах та смак. В такому випадку лактокок використовують у складі заквасок для виготовлення таких продуктів де потрібна в'язка консистенція. [43]. Тому, що коли вершковий стрептокок розмножується має специфічну властивість утворення слизу у молоці.

Гетероферментативні лактококи

Діацетилютворюючий лактокок відноситься до ароматоутворюючих та гетероферментативних лактококів та має назву *Lactococcus diacetylactis*. Лактокок характеризується слабким кислотоутворювачем, при тому продукуючи значну кількість діацетил-ароматизатора. Тому його віносять до складу заквасок для виготовлення кисломолочних сирів, кислого молока, твердих сирів, масла а також сметани.

Утворення кислоти є повільною, але попри це культура має властивість утворювати леткі кислоти та ароматичні речовини.

Морфологічні властивості

Клітинам *Lactococcus diacetylactis* властива округла форма, та в порівнянні з *Lactococcus lactis* мають значно менші розміри, розміщуються переважно ланцюжками.

Культуральні властивості

Lactococcus diacetylactis на щільних живильних середовищах має змогу утворити колонії, які є дрібними та мають рівний край. Оптимальною температурою росту вважають 25-30°C. Ще одною характеристикою цього

штаму є відновлення, а в подальшому згортання молока лакмусового. Характерним є швидке проявлення рожевого кольору, яке миттєво знебарвлюється [44]. *Streptococcus thermophilus* має властивість забруднювати доїльне обладнання, молочний посуд, в тому числі і сире молоко. є достатньо стійким до короткотривалої пастеризації, та при використанні високотемпературної пастеризації миттєво гине. *Streptococcus thermophilus* та *Lactobacillus bulgaricus* використовується у виробництві йогуртів. *Streptococcus thermophilus* чутливий до пеніциліну та деяких інших антибіотиків, і тому його використовують як тест-культуру для біологічного виявлення антибіотиків у молоці.

Морфологічні властивості

Термофільний стрептокок може утворити довгі ланцюжки, які можуть бути більшими за клітини певних видів молочнокислих стрептококів .

Культуральні властивості

Термофільний стрептокок на щільних живильних середовищах може утворити поверхневі колонії, що мають зернисту структуру. Вони є човникоподібні глибінні, та деколи можуть мати відростки [45]. Оптимальною температурою для його росту вважають 40-45°C. Характерною властивістю є згортання молока за 3,5-6 годин з граничною кислотністю 110-120°Т, також утворюють рівний щільний згусток сметаноподібної чи в'язкої, тягучої консистенції, та мають приємний кисломолочний смак та запах. Окремі штами мають властивість виділяти діацетил.

Молочнокислі бактерії (називають ще LAB) мають широке використання у виробництві багатьох ферментованих харчових продуктів [42]. Вони є грампозитивні, факультативно-анаеробні, каталазо-негативні та рухливі. LAB не можуть утворити цитохрому та не утворюють спор.

Їх відносять до порядку Eubacteriales під Streptococcaceae і Lactobacillaceae сімей.

LAB відіграють важливу роль для забезпечення захисту та безпеки молочних продуктів. Вони виробляють антимікробні засоби, куди входить молочна кислота, бактеріоцини, діацетил та перекис водню [46].

В молочних заквасках виявлено бактеріоцини, які використовують у вигляді консервантів.

Штами роду *Lactococcus* мають властивість утворити одиничні пари коків або коротко ланцюгові утворення за розмірами 0,5–1,5 мкм. Їх оптимальною температурою росту вважають 30 °C, також вони можуть рости в межах від 10 °C до 45 °C. Мають здатність рости вище 40 °C, також ростуть при більш високих концентраціях солі, > 4% хлориду натрію, та виробляють кислоту.

Не мають можливості рости в присутності 6,5% NaCl чи при pH 9,6. Їх надзвичайно важливою здатністю є ферментування лактози, а саме їх як заквасок для використання у молочній промисловості.

При відборі штамів характерним є їх пробіотичні властивості, під час виділення з молока сирого, кисломолочних продуктів та овочів.

Характерним критерієм пристосування та адаптації до кишкової флори є вживання лактококів, що мають високі концентрації та є харчового походження. Більшість з них є у молоці сирому та продуктах кисломолочного походження [47]. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* легко пристосовується до середовищ, включаючи молоко або молочні продукти, а отже, швидко і легко метаболізує лактозу.

До пробіотичних бактерій відносяться *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* spp., а деякі дріжджі, включаючи *Saccharomyces boulardii*, мають пробіотичні властивості.

Перевагами пробіотичних бактерій для здоров'я людини вважають захист від патогенних мікроорганізмів і поліпшення балансу мікробіоти кишечника . Другими сприятливими ефектами пробіотичних мікроорганізмів вважають стимуляцію імунної системи, синтез вітамінів та зниження рівня холестерину в крові. Також виявляють протиканцерогенну та антимікробну активність [14]. Інші критерії продукту, що розглядаються як пробіотики вважають прийняттям споживача та виживання мікроорганізмів через шлунково-кишковий тракт . Рекомендованою кількістю мікроорганізмів. Що споживаються у осіб становлять 100 г на день.

Для використання у якості пробіотиків розрізняють різноманітні критерії. *Lactococcus lactis* переважно виділяється з молочних продуктів, які в свою чергу включають також кефірні зерна та молоко сире. Використовується лактокок також у початкових культурах, які в подальшому йдуть на виробництво різноманітних продуктів, таких як сир кисломолочний [21].

У ферментаціях харчових продуктів, виходячи з історії використання *L. lactis* має такий статус як GRAS, що вважають безпечним. Лактокок виробляючи молочну кислоту у заквасках молочних має властивість розчеплювати молочні білки, які утворюються в результаті бродіння, що в подальшому сприяє таким властивостям як мікробіологічні та сенсорні. Для підтримування відповідного середовища та для росту лактококів використовують молоко сире [19] .

Тому головною метою даного дослідження було дослідити та дати характеристику біохімічним та технологічним властивостями штаму лактококів та охарактеризувати протеолітичний потенціал, що виділяються з зерен кефіру та з сирого молока.

1.2.Характеристика заквасок

Закваски мають у своєму складі певні види та штами бактерій, які використовуються для виробництва сиру, масла та різноманітних продуктів кисломолочного походження. Назва заквасок характеризується підвищеною кислотністю молока, для подальшого отримання згустку та виготовлення кисломолочних продуктів. Із штамів, які спеціально підбираються складається сама мікрофлора мікрофлора заквасок. Тому після використання теплової обробки закваски добавляють у молоко [5].

Класифікація заквасок

Класифікують закваски стосовно до умов вирощування у науково-виробничих лабораторіях. Можуть мати назви маткових або лабораторних заквасок. За допомогою цих досліджень є можливість отримання споживчих та виробничих заквасок. Видами споживчих заквасок є: материнські, ще їх називають первинними, проміжні які мають назву вторинних та виробничі з назвою третинні закваски [13].

При посівах маткових заквасок є можливість отримання материнських заквасок, а при посівах материнських і проміжних заквасок – проміжні та виробничі. Закваски, які мають у своєму складі один єдиний штам називають одноштамовими, а ті які складаються з декількох видів одного виду чи є змішаними, в їхній склад входить безліч різних штамів називаються багатоштамовими [32].

Кисломолочні продукти зазвичай отримують за допомогою сквашування молока чи, наприклад, вершків з допомогою чистих культур молочнокислих бактерій. Деколи можуть сквашуватись при допомозі оцтовокислих бактерій та дріжджів. Іноді за участю дріжджів і оцтовокислих бактерій. При сквашуванні відбувається ряд фізико-хімічних та мікробіологічних процесів, що в результаті впливає на зовнішній вигляд виготовленого продукту та завдяки чому формується запах, смак та консистенція. Відносяться до

кисломолочних продуктів наступні: сметана ,сир, сирні вироби та напої кисломолочного походження. Кисломолочні продукти, а саме напої включають : різномайття кислого молока, кефір, кумис та напої ацидофільні[17]. Вироблятися кисломолочні напої можуть як з цукром так із фруктово-ягідними сиропами включаючи різноманітні наповнювачі.

Заквасками можна назвати чисті культури або суміш культур мікроорганізмів, які були використанні для виготовлення кисломолочних продуктів, наприклад, кисловершкова олія та сири. Найпоширенішими у заквасках, які використовують найчастіше є пропіоновокислі та молочнокислі бактерії, також можливе використання цвілевих грибів. В склад природної симбіотичної закваски для виготовлення кефірів, окрім молочнокислих бактерій використовують також оцтовокислі бактерії та дріжджі [15].

Основна мікрофлора сквашування потрапляє разом із з закваскою, при чому залишкова мікрофлора пастеризованого молока не припиняє розмножуватися в процесі сквашування закваскою. Мікроорганізми, які є у заквасці активізують частину мікрофлори незаквасочного походження, а інша частина зупиняє свій ріст, тобто пригнічується. Існують такі мікроорганізми, наприклад як бактеріофаг, який має властивість припиняти та пригнічувати розвиток мікрофлори у заквасках. Від якості молока , тривалості сквашування, кінцевої температури охолодження, швидкості залежить чи відбудеться розмноження інтенсивно по всій мікрофлорі у кисломолочних продуктах .

Нижче наведенні 5 головних груп, основних кисломолочних продуктів в залежності від застосованих при виробництві заквасочних мікроорганізмів [23]:

- продукти, які готуються за допомогою використання багатокomпонентних заквасок , це є кефіри та кумис;

- продукти, які готуються за допомогою використання мезофільних молочнокислих стрептококів , наприклад, сметана, сири, сир домашній та кисле молоко;
- продукти, які готуються за допомогою використання термофільних молочнокислих бактерій, це є йогурт, кисле молоко, ряжанка;
- продукти, які готуються за допомогою використання мезофільних і термофільних молочнокислих бактерій, наприклад, сметана зниженої жирності, напої зниженої жирності з плодово-ягідними наповнювачами та сир;
- продукти, які готуються за допомогою використання ацидофільних паличок та біфідобактерій: ацидофільне молоко, дитячі ацидофільні суміші, ацидофільін, ацидофільне паста та ацидофільно-дріжджове молоко.

Виготовлення заквасок у спеціальних лабораторіях

Виробництво заквасок є одним із важливих та трудомістких процесів у молочній промисловості. Тому що, деякі мізерні недоліки в технологічному процесі виробництва заквасок мають можливість призвести до великих фінансових втрат, що пов'язані з недоотриманням або отриманням продукції низької якості або взагалі можуть бути непридатними[44]. Тому ефективність виготовлення заквасок включає в себе такі основні складові як: використання високоякісного молока для виготовлення заквасок, підбор штамів та дотримання санітарно-гігієнічних вимог у технологічному процесі виробництва заквасок. У спеціальних науково-виробничих лабораторіях , де виготовляють закваски, готують рідкі і сухі закваски, а також бактеріальні концентрати, у рідкому й висушеному стані [57].

Рідкі закваски

Рідкі закваски є чистими культурами молочнокислих бактерій, які отримують на стерильному молоці. Перевагами таких заквасок є активний стан мікрофлори та їх чистота, а недоліками є дуже короткий строк придатності.

Використовуються для того, щоб отримати материнську закваску. Але зараз її використовують дуже рідко [47]. Рідкі закваски повинні надходити на підприємство в герметично закритих флаконах. Для того щоб приготувати рідку закваску, основною умовою є використання високоякісного знежиреного молока. Яке перед внесенням стерилізують протягом 10-15 хв при температурі 121°C, та охолоджують до 37±1°C . Для перевірення стерильності його витримують у термостаті при такій же температурі дві доби . Перед тим як приготувати рідку закваску готують материнську закваску, у склад якої входять суміші культур мікроорганізмів.

У невелику кількість стерильного молока, яке підігріте до оптимальної температури, що є необхідним для розвитку мікроорганізмів, додають суміш культур в кількості 2-3%. Колбу із молоком заквашеним поміщають у термостат при температурі 30°C, після утворення згустку її необхідно одразу вийняти із термостата. Закваску охолоджують до 4-6°C та зберігають до наступного використання. Також з цієї материнської закваски готується рідка закваска, яку необхідно відправити на молокопереробні заводи. Тому для цього у колбу з кількома літрами знежиреного стерильного молока вноситься материнська закваска в кількості 2% та ретельно перемішується [46].

Заквашене молоко необхідно розлити у стерильні піпетки за допомогою стерильного автомату у спеціальні стерильні флакони по 25-30 чи 50 і 100 см³, які у подальшому поміщають у термостат при оптимальній температурі необхідній для нормального розвитку бактерій.

Виготовлення рідкої закваски

Закваска, що використовується повинна мати рідку консистенцію та мати незначну кількість крупинок, рідше може бути сметаноподібна консистенція. Допускається можливе відділення сироватки. Смак та запах кисломолочної закваски мають мати характерні для цього виду властивості,

та без сторонніх присмаків та запахів. Колір має бути білим з кремовим відтінком по всій масі. Також допускається буруватий відтінок [12]. Кислотність повинна становити 80-100°Т. У рідких заквасках кількість молочнокислих бактерій повинна становити 10^7 КУО/г.

Флакони необхідно закупорити та наклеїти етикетку. Термін придатності у рідких заквасках становить від 10 до 14 діб при температурі зберігання 2-5°С і 5 діб , при кімнатній температурі.

Сухі закваски

Сухими заквасками називаються чисті культури молочнокислих бактерій, що отримані на молоці стерильному, яке після сквашування однозначно підлягає зневодненню. Для того, щоб виготовити суху закваску, певні комбінації культур вносяться у знежирене стерильне молоко в кількості 2-3%. Витримують при оптимальній температурі до утворення згустку, внаслідок чого утворюється рідка закваска [46]. Після цього, отриману таким способом культуру у кількості 30% вносять у захисне середовище, так званний водний розчин, який містить сахарозу у кількості 10%, цитрат натрію -5%, глутамат натрію - 2,5% та желатозу -5% .

Отриману суміш необхідно перемішати, розфасувати у флакони по 1 см³, це є одна порція. Наступним кроком є заморожування та висушування шляхом сублімації. Сублімація допомагає видалити вологу з клітин, що знаходяться у замороженому стані за допомогою високого вакууму. Сушіння закваски починається при температурі від - 15°С, до - 17°С, основну кількість вологи можна видалити в замороженому стані. Далі волога видалається при температурі - 40°С , протягом 5 годин .

Якість сухих заквасок необхідно проконтролювати за таким самим показником, який використовується для рідких заквасок. Закваски, які були висушені методом сублімації, є більш активними та мають властивість добре розчинятися. У сухих заквасках кількість молочнокислих бактерій повинна

становити 10^8 КУО/г. Суха закваска може зберігатися не більш як вісім місяців при температурі 3-8°C. На підприємство такі закваски повинні надходити у герметично закритих флаконах. Зовнішній вигляд та консистенція має бути сухою. Закваски такого виду мають вигляд таблеток, з характерним для неї білим чи кремовим кольором.

Отримання кефіру у традиційний спосіб при використанні виробничої закваски застосовується рідко через значні витрати та трудомісткість при використанні. Тому, саме для цього створили іноваційні закваски. Найпоширенішими є сухі закваски прямого внесення, завдяки яким немає необхідності додаткового готування виробничої закваски. Це набагато спрощує процес виготовлення кефіру [15].

Сухі закваски прямого внесення бувають двох типів:

1. Бактеріальні закваски пробіотичних мікроорганізмів;
2. Закваски для виготовлення традиційних кисломолочних продуктів .

Бактеріальні закваски пробіотичних мікроорганізмів

Використовуються в основному для виготовлення кисломолочних продуктів , які мають пробіотичні властивості [36]. Застосовуються як самостійні чи використовуються разом з іншими заквасками. Вміст біфідобактерій , у цих заквасках має бути не менше $1 \cdot 10^{10}$ КУО / г, вміст лактобактерій становить не менше $1 \cdot 10^9$ КУО / г, та вміст пропіоновокислих бактерій повинен бути не менше $1 \cdot 10^{10}$ КУО / г[40].

Масова частка вологи має бути не більше 3,5%. Форма випуску це пластикові флакони з вмістом 0,25 т, 0,5 т, 1 т, 2 т та 5 т готового продукту .

Дозування має рекомендаційний характер, адже залежать від кінцевого титру пробіотичних мікроорганізмів у готовій продукції. Ці дозування

розрахові на титр - $1 \cdot 10^7$ КУО / см³ (г). Термін зберігання становить 1 рік за температури $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Способи внесення для сухих заквасок прямого внесення, такі :

1. Безпосередньо вносяться у ємність , де знаходиться нормалізована суміш ;
2. Перед внесенням повинна відбутися короткочасна активізація після чого вноситься у ємність з нормалізованою сумішшю.

Таблиця 1. Види сухих заквасок періодичної дії

№ п / п	позначення закваски	склад мікрофлори	
		груповий	видовий
1.	2.	3.	4.
1.	B 1	біфідобактерії	<i>B.bifidum</i>
2.	B 2		<i>B.longum</i>
3.	У 3		<i>B.adolescentis</i>
4.	У -4		<i>B.bifidum + B.longum</i>
5.	У -5		<i>B.bifidum + B.adolescentis + B.longum</i>
6.	L-1	лактобактерії	<i>L.acidophilus</i>
7.	L-2		<i>L.casei</i>
8.	L-3		<i>L.plantarum</i>
9.	L-4		<i>L. bulgaricus</i>
10.	L-5		<i>L.acidophilus + L.casei + L.plantarum</i>
11.	P -1	пропіоновокислі	

Закваски для традиційних кисломолочних продуктів

Використовуються при виробництві традиційних кисломолочних продуктів, таких як йогурт, сметана та ряжанка.

Культури молочнокислих бактерій, що були спеціально відібрані дозволяють одержати ферментований продукт, який має високу якість. Такі культури мають тривалий термін зберігання, без додаткового використання стабілізуючих компонентів.

В сухих заквасках прямого внесення для того щоб виготовити кисломолочні продукти необхідно обрати спеціальні штами. Вони ж в свою чергу мають властивість добре утримувати сироватку та утворювати в кисломолочних продуктах рівний та щільний згусток [23]. Такі штами є досить стійкими до сезонних змін якості молока.

Вміст заквасочних культур має бути не менше 10^{10} КУО / г. Масова частка вологи становить не більше 3,5%. Випускається у пластикових флаконах місткістю на 0,25 т, 0,5 т, 1 т, 2 т і 5 т готового продукту.

Термін зберігання становить 1 рік за температури 4 ± 2 °С.

Таблиця 2. Види сухих заквасок для традиційних кисломолочних продуктів

Позначення закваски	склад мікрофлори	склад мікрофлори	призначення закваски
St	термофільний стрептокок	Streptococcus thermophilus	Ряжанка, кисле молоко, йогурт.
LC	лактококи	Lactococcus	Сметани та сир
ASt	Ацидофільна паличка,	L.acidophilus + St.Thermophilus	Кисломолочний продукт- Біфацил і ін.

	стрептокок термофільний		
Топ	Лактококи, лактобактерії, пропіоновокислі бактерії	Lactococcus + Lactobacillus + Propionibacterium	Кисломолочний продукт - біфатонік, біфітон, тонус і ін.
LSt	Болгарська паличка, стрептокок термофільний	L.bulgaricus + St. Thermophilus	Кисломолочні продукти, йогурт, кумис, кисле молоко і ін.
А L 3	Ацидофільна паличка, лактококи	L.acidophilus + Lactococcus	Кисломолочні продукти –ацидофілін та кисле молоко.

Лактококами називають продуценти бактеріоцинів. Тому, вони пригнічують розвиток хвороботворних організмів, наприклад, патогенні стафілакоки, збудник бутулізму та туберкульозна паличка [25]. Характерними властивостями є протизапальні характеристики штамів молочнокислих стрептококів. Пробиотики використовуються при профілактиці та лікуванні хвороби Крона, також при захворюваннях кишечника і виразковому коліті. Молочнокислі стрептококи, а саме їхні клітини, вважаються джерелом де розвиваються активні травні ферменти.

1.3. Використання лактококів у виробництві молочнокислих продуктів

Лактококи переважно використовуються при виготовленні молочних продуктів [24]. Найбільш поширеними у межах виду є *L. lactis* два підвиди *L. lactis* subsp. *lactis* та *cremoris*. Вони використовуються, в основному для молочного бродіння. В порівнянні з двома попередніми третій вид *L. lactis* subsp. *hordniae*, не використовується в промисловому бродінні.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* і subsp. *cremoris* відносять до мезофільних заквасок. Вони використовуються у виробництві молочної кислоти [22]. Використовуючи при цьому набагато менше 0,5% лактози в молоці під час типового бродіння. Також не є кислотостійкими, в порівнянні з іншими молочнокислими бактеріями, як наприклад, *Lactobacillus*. Майже всі лактококи мають властивість продукувати $l +$, це є молочна кислота. Молочна кислота характеризується одним з основних кінцевих продуктів. Важливою властивістю *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* є утворення суміші молочної кислоти та ацетальдегіду, діацетилу та ацетоїну [39].

Лактококи у виробництві використовуються як одноштаммові закваски, чи як частина багат шарової суміші закваски. Ця суміш може складатися з декількох штамів різних видів чи різних штамів одного виду [21]. Лактококи також часто використовують у поєднанні з іншими різноманітними молочнокислими бактеріями, які мають у своєму складі лактобактерії і стрептококи.

Початковими культурами, які ферментують цукор для того щоб отримати молочну кислоту, яка відповідає за підкислення продукту, а також для створення аромату. У свою чергу вони гідролізують білки, при чому змінюють їх текстуру продукту та безперечно впливають на смак. *Lactococcus* є видом, який обмежений. Але *L. Lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* – має змогу надавати аромат, тому що виробляє для цього характерні органічні кислоти.

Закваска має змогу допомогти зберегти продукт , за рахунок вироблення бактеріоцинів, окрім утворення молочної кислоти. Найбільш вивчений з даних бактеріоцинів вважають нізин [30].

Такі молочнокислі бактерії використовувались при виробництві гетерологічних білків, та входили до складу вакцин. На теперішній час лактококи називають початковими культурами та мають можливості спільного використання в інтересах виготовлення молочних продуктів.

Lactococcus lactis довгий період вивчалась як технологічна бактерія. Та на даний час має своє використання для виготовлення ферментованих продуктів . Цю закваску , яку використовують для виготовлення м'яких сирів,також сирів таких як Чеддер та велику кількість ферментованих молоків . Зараз використовується як пробіотична культура , для розроблення новітніх вакцин. Безліч статей є написаними на *Lc. lactis* , а саме про його геном, та в основному його фізіологічні функції і технологічне використання при виробництві [47].

Двома особливо важливими родами вважають *Lactococcus* і *Lactobacillus* . В загальному вони спрямовані на виробленні молочної кислоти. А створюють кислоту за допомогою таких цукрів, як лактоза, та мають властивість швидкого росту в молоці, а саме коли температура є вищою за 20 ° C.

Отже, більшість молока має властивість прокисати, навіть якщо зберігається у холодильнику. Саме такі умови часто призводять до накопичення частинок казеїну у молоці.

Мезофільні молочнокислі бактерії переважно знищуються завдяки проведенні пастеризації, при низьких температурах, тобто при 15 °C - 72 °C). Та важливо зазначити, що низька температура пастеризації не може знищити молочнокислі бактерії , які називають теплолюбивими, наприклад, *Streptococcus thermophilus*.

Молочнокислі бактерії мають властивість псувати молоко. Тому ця група бактерій однозначно вважається надзвичайно корисною для виробництва кисломолочних продуктів, таких як йогурт та масло. Для цього штами, що були відібрані молочнокислих бактерій, необхідно вирощувати у контрольованих умовах.

Молочнокислі бактерії відносяться до гетерогенної група бактерій. Що відіграє значну роль при різноманітних процесах бродіння. При цьому вони ферментують харчові вуглеводи, та в результаті чого виробляють молочну кислоту, яка є основним продуктом бродіння. Деградація білків та ліпідів при виробництві різноманітних спиртів, альдегідів, кислот та складних ефірів, в тому числі і сполук сірки відіграють значну роль для розвитку специфічного смаку у різних ферментованих харчових продуктах [24].

Основним застосуванням вважають початкові культури, які мають величезну різноманітність для ферментованих молочних продуктів, наприклад для сирів, йогуртів, кисломолочних продуктів, м'яса, фруктів, риби, овочів та круп [45]. Допомагають сприяти на смак, текстуру та інші харчові цінності ферментованих продуктів. Саме тому, вони використовуються як допоміжні культури. Прикладами є прискорене визрівання сиру, покращується текстура йогурту та разом з тим виробляються екзополісахарид та контролюються вторинні ферментації при виробництві вина.

Молочнокислі бактерії відіграють значну роль у харчових та сільськогосподарських цілях. Опис бактерій, що входять до цієї групи, є грампозитивні, вважаються неспоровими, не дихаючими коками чи паличками. Виробляють при цьому молочну кислоту як основний кінцевий продукт під час бродіння вуглеводів [29,27].

Існує основна група, що складається з чотирьох родів: лактобактерії, лейконосток, педіокок та стрептокок. Їх важливість пов'язана головним чином з їх безпечною метаболічною активністю під час вирощування у продуктах,

що використовують доступний цукор для виробництва органічних кислот та інших метаболітів[31].

Поширення у харчових продуктах разом із довготривалим використанням сприяє їх природному прийняттю як GRAS, це загальноновизнаний, та є безпечним для споживання людиною. Експертна група EFSA з біологічних небезпек (BIOHAZ) робила висновок, що для ферментуючих бактерій, які однозначно пов'язані з їжею, незалежно від того, стійкі вони до антибіотиків чи ні та за винятком можливих ентерококів, у них відсутні дані про наявні клінічні проблеми.

Але вони мають можливість виступати резервуаром для передання генів стійкості. Штами з такими генами, які передаються таким чином, мають можливість взаємодіяти між харчовими ланцюгами та збільшують ймовірність перенесення в їжу кишкових патогенних організмів [34].

Основними шляхами, що беруть участь у виробництві та розвитку смаку у ферментованих харчових продуктах, є наступні:

- 1) гліколіз, безпосереднє бродіння цукрів;
- 2) ліполіз, який є важливим у розкладанні жиру;
- 3) протеоліз, який розкладає білки.

Внесок LAB у ліполіз є порівняно невеликий, проте протеоліз є ключовим біохімічним шляхом розвитку аромату у ферментованих продуктах. Деградація таких компонентів може бути перетворена на різні спирти, альдегіди, кислоти, складні ефіри та сполуки сірки для специфічного розвитку смаку у ферментованих харчових продуктах.

Розділ 2

Матеріали і методи досліджень

Дослідження проводились в науково- дослідній лабораторії кафедри харчової біотехнології і хімії ТНТУ.

Метод, який був вибраний для тестування штамів молочнокислих бактерій на наявність приклітинних протеїназ визначає концентрацію продуктів протеолізу. Цей метод характеризує вирощування штамів на протязі короткого періоду у знежиреному стерильному молоці. Отож , термофільні лактококи інкубували протягом 6 годин(40°C), а мезофільні протягом – 12 годин (30°C) . За наявності приклітинної протеїнази визначити на концентрації продуктів протеолізу.

За двома методами визначали кількість клітин лактобактерії. Шляхом посіву на чашки Петрі з гідролізованим агаризованим молоком визначаємо загальну кількість життєздатних бактерій [8]. За методом Т. Томаса та К.Тернера [11], що розроблений для середовища з білками казеїнового комплексу, визначали турбідиметрично кількість клітин бактерій в модельній протеолітичній системі. За раніше описаним методом визначаємо протеолітичну активність лактококів. Тому для 1,5мл молочного нативного середовища необхідно додати 1 мл H_2O та 5 мл 10% розчину ТХО суміш потрібно 10 хв перемішувати і фільтрувати. Далі до 2,5 мл фільтрату додали 5 мл 10% Na_2CO_3 , перемішуючи додавали реактив Фоліна 1 мл. Оптичну густину вимірювали (650 нм) на електрометрі СФ- 26, 45 хв. За калібрувальним графіком значення оптичної густини перераховуємо на вміст тирозину і триптофану в мл %.

Таблиця 3. Штами молочнокислих бактерій, що використовуються в роботі .

Види кисломолочних бактерій	Умовна назва	Назва штаму (оригінальна)
<i>Lcc.lactis subsp.cremoris</i>	C_2	T_{18}
<i>Lcc.lactis subsp.lactis</i>	1_1	144_4
<i>Lcc.lactis subsp.cremoris</i>	C_1	R_{211}
<i>Lcc.lactis subsp. lactis</i>	1_2	73_{23}
<i>Lcclactis biovar. diacetylactis</i>	d_1	$K_{109} 4$
<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>	st_1	9_1
<i>Lcc.lactis subsp.lactis</i>	1_3	81_4
<i>Streptococcus salivarius subsp.thermophilus</i>	st_2	14_2
<i>Lcc.lactis subsp. cremoris</i>	c_3	9682
<i>Lcc.lactis biovar. diacetylactis</i>	d_2	$K_{105} II$
<i>Lcc.lactis biovar. diacetylactis</i>	d_3	$D_{13} I_3 I$

Для того щоб отримати аміний азот осаджували поліпептиди 20 % розчином таніну із розчинного небілкового азоту. За методом, описаним раніше визначали утворення гірких пептидів під час протеолізу білків казеїнового комплексу ферментами лактококів і сичужного препарату.

Ступінь протеолізу визначали спектрофотометричним методом [13] у дослідних ферментованих продуктах визначали за концентрацією триптофану і тирозину.

Оптичну густина екстрактів вимірювали при довжині хвилі 290 і 270 нм.

Для розрахунку кількості розчинного тирозину і триптофану використовували формули:

$$M_{\text{три}} = 0,307E_{270} - 0,02E_{290}$$

$$M_{\text{тир}} = 0,95 E_{270} - 1,31 E_{290}$$

$M_{\text{тир}}$ – концентрація триптофану; $M_{\text{три}}$ – концентрація тирозину;

Характеристика біохімічних показників лактококів

За методом визначали концентрацію молочної кислоти [8] та виражали у градусах Тернера. Для визначення стійкості лактококів до NaCl у присутності концентрації NaCl, вирощуючи їх у стерильному знежиреному молоці. У дослідних зразках при порівнянні з контролем кількісно визначали стійкість за відсотком приросту титрованої кислотності і згідно формули:

$$\Pi = (T_0 - T_M) / (T_K - T_M) * 100$$

T_M – початкова титрована кислотність, °Т;

T_0 – титрована кількість поживного середовища з NaCl, °Т;

T_K – титрована кількість поживного середовища без NaCl, °Т.

Загальноприйнятими методами [8] визначили кількість утворених лактококами ацетоїну, CO₂ та діацетилу.

Розділ 3

Результати досліджень та їх обговорення

3.1. Характеристика протейназо-позитивних штамів та визначення протеолітичної активності відібраних штамів

Дослідження штамів молочнокислих бактерій проводилися на здатність розчеплювати білок та на кислотоутворюваність.

Першим етапом є дослідження здатності розщеплення білків та активності приклітинних протейназ. Існує кілька методів щоб визначити протейназо-позитивні штами. Дослідження дають можливість визначити приклітинні протейнази імунохімічними методами завдяки використанню антитіл [16,19] , також здатність штамів рости у рідкому середовищі чи на агарових пластинах з очищеними білками молока.

Щоб протестувати штами обрали метод визначення продуктів протеолізу завдяки вирощуванню штаму бактерій у стерильному знежиреному молоці протягом короткого періоду.

Протеолітичну активність за концентрацією продуктів протеолізу визначили після інкубування у молоці знежиреному (30°C) протягом 12 годин- мезофільні лактококи , а термофільні стрептококи (40°C) протягом 6 годин.

Засіювали молоко 3% свіжої культури кожного штаму. Концентрація продуктів виражається у мг % триптофану та тирозину щ входять в склад амінокислот та пептидів, що не осаджуються 10 % ТХО. У таблиці 4 показані результати досліджень.

Було проведено дослідження 2 штамів термофільних стрептококів та 9 штамів мезофільних лактококів. Протейназо-негативним є один штам мезофільних лактококів. При проведенні інкубації в знежиреному молоці концентрація амінокислот та продуктів протеолізу зменшилась.

Таблиця 4. Протеолічна активність штамів молочнокислих бактерій після проведені інкубації протягом 10 годин у стерилізованому знежиреному молоці

№ П/п	Вид (підвид) молочнокислих бактерій	Назва	Протеолітична активність при проведенні інкубації в мг % (12 годин)	Відсутність чи наявність приклітинної протеїнази
1	<i>Lcc.lactis</i> <i>subsp.cremoris</i>	c_1	0,11	+
2	-//-	c_2	0,49	+
3	-//-	c_3	1,76	+
4	<i>Streptococcus</i> <i>salivarius</i> <i>subsp.thermophilus</i>	st_1	0,09	?
5	-//-	st_2	0,06	?
6	<i>Lcc.lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	d_1	0,79	+
7	-//-	d_2	0,08	?
8	-//-	d_3	1,47	+
9	<i>Lcc.lactis</i> <i>subsp.lactis</i>	l_1	-0,07	?
10	-//-	l_2	2,91	+
11	-//-	l_3	2,75	+

Це свідчить про те, що в якості субстрату лактококи використовували у процесі росту протеозно-пептонну фракцію. У одному випадку в обох штамів термофільних стрептококів і у мезофільних лактококів після інкубації приріст концентрації продуктів протеолізу у середовищі був досить низьким. Це може означати про відсутність у даних штамів приклітинних протеїназ.

Штами лактококів були отримані з Литовського харчового інституту, що знаходиться у місті Каунас, що є сумнівними та протеїназо-негативними. Вирощувались штами на штучних поживних середовищах, що включали гідролізати білків.

З високою активністю приклітинних протеїназ можна виділити чотири штами це: c_3 , d_3 , l_2 та l_3 . Вирощувались штами в лабораторії БілНДКТІММП, що знаходиться у місті Мінську та лабораторії фізіології мікроорганізмів Інституту мікробіології НАН Білорусії у знежиреному молоці.

Ці штами використовували у дослідженнях, підтримували пересіванням у знежирене стерилізоване молоко. Штами можуть рости в поживному середовищі незважаючи який у них склад протеолітичних систем, рости можуть і протеїназо-негативні. Для своєї життєдіяльності протеїназо-негативні штами використовують амінокислоти та пептиди.

Протеолітичну активність на різних стадіях культивування визначали для трьох відібраних штамів лактококів, а саме: *Lcc.lactis subsp.lactis* l_2 , *Lcc.lactis subsp. cremoris* c_2 , *Lcc.lactis biovar diacetylactis* d_2 .

Концентрацію продуктів протеолізу триптофану і тирозину в складі амінокислот та пептидів, що не осаджувались 10% ТХО виражали у мг%. Результати досліджень у таблиці 5.

Таблиця 5. Протеолітична активність штамів лактококів, що використовувались у дослідженнях

Концентрація продуктів протеолізу на стадіях культивування (триптофан і тирозин)	Штами лактококів		
	<i>Lcc.lactis subsp.lactis l₂</i>	<i>lcc.lactis subsp. Cremoris c₂</i>	<i>Lcc.lactis biovar diacetylactis d₂</i>
24 години	6,5±0,13	0,9±0,06	0,2±0,01
72 години	8,5±0,15	0,5±0,03	2,5±0,09
120 годин	9,4±0,012	0,6±0,04	2,6±0,09
168 годин	9,7±0,0,14	0,6±0,05	2,7±0,09
30 діб	14,8±0,31	3,9±0,11	4,5±0,10

Із даних у таблицях, бачимо, що вони суттєво відрізняються між собою за протеолітичною активністю. *Lcc.lactis subsp.lactis l₁* має найбільшу протеїназну активність. Через 24 години концентрація протеолізу є вищою порівняно з двома іншими штамми, і впродовж 5 діб продовжує зростати. Показник через 30 діб становить 14,8 мг%, тобто є вищим.

Графіки зміни протеолітичної активності лактококів родів, таких як: *Lcc.lactis subsp.lactis l₂*, *Lcc.lactis biovar diacetylactis d₂*, *lcc.lactis subsp. Cremoris c₂* наведені нижче.

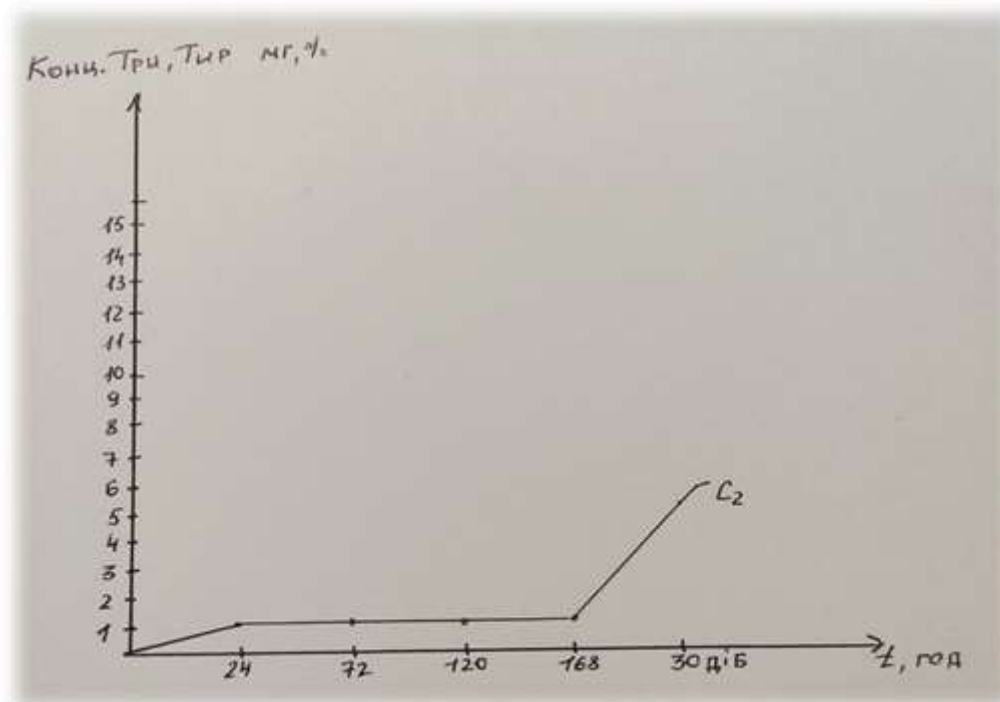


Рис. 1. Графік зростання протеолітичної активності штаму лактококів C_2 протягом 30 днів

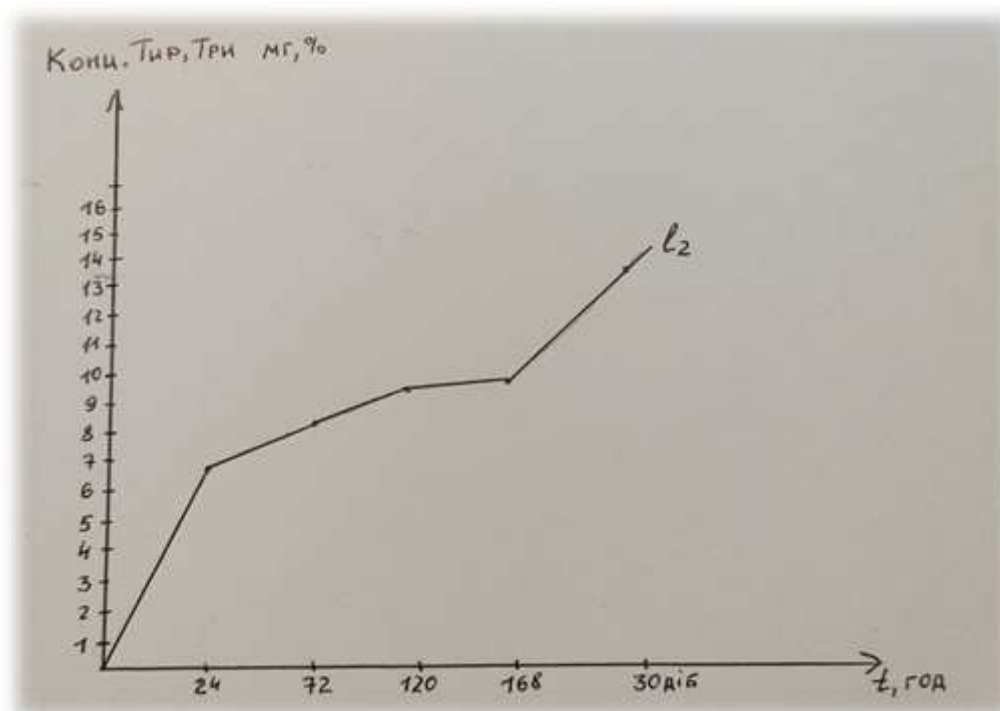


Рис. 2. Графік зростання протеолітичної активності штаму лактококів l_2 протягом 30 днів

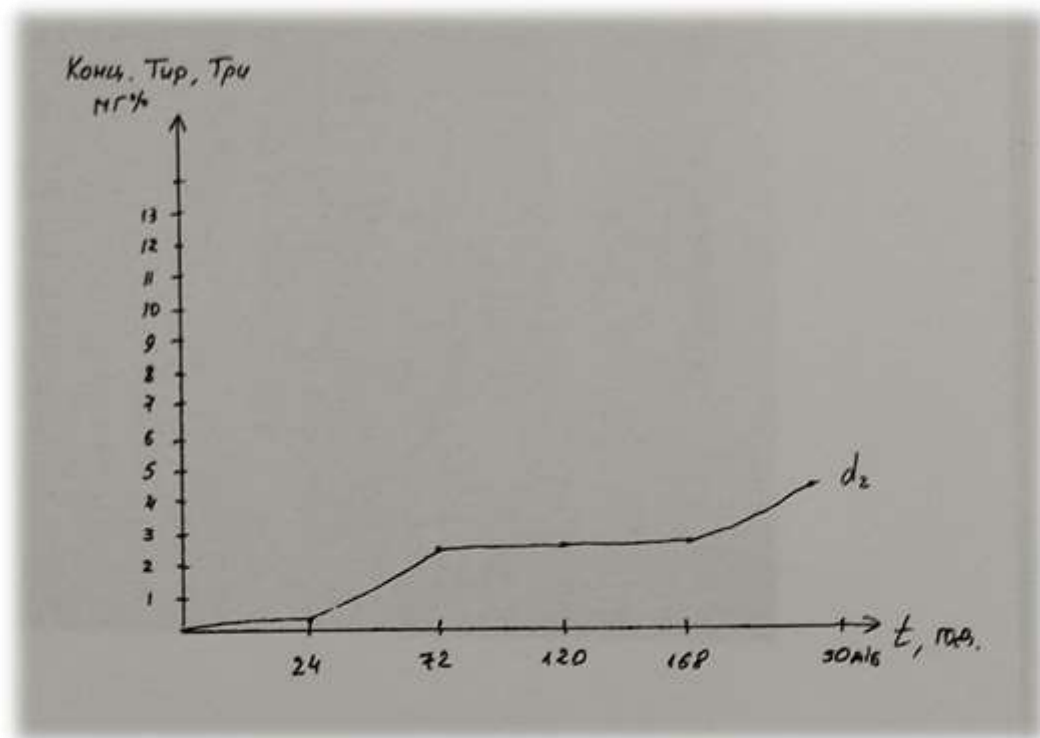


Рис . 3. Графік зростання протеолітичної активності штаму лактококів d_2 протягом 30 днів

Електрофоретичний аналіз відібраних ліофілізованих зразків культурального середовища на пластинах ПААГ проводили для того щоб визначити специфічність протеолізу окремих фракцій казеїнового комплексу.

Після осадження зразки у кількості 70 мг розчиняли в 1,5 мл подвійного електрофоретичного буферу 9 М сечовина з рН 7,9 і 1 мл H_2O , також додавали бромфеноловий синій та сахарозу. Розчин центрифугували 5 хвилин, 3000 g, після чого фільтрували. Гелю в комірку наносили по 15 мл зразку.

Для контролю використовували підкислене оцтовою кислотою до рН 4,6 стерилізоване молоко. На рис. показані результати електрофорезу.

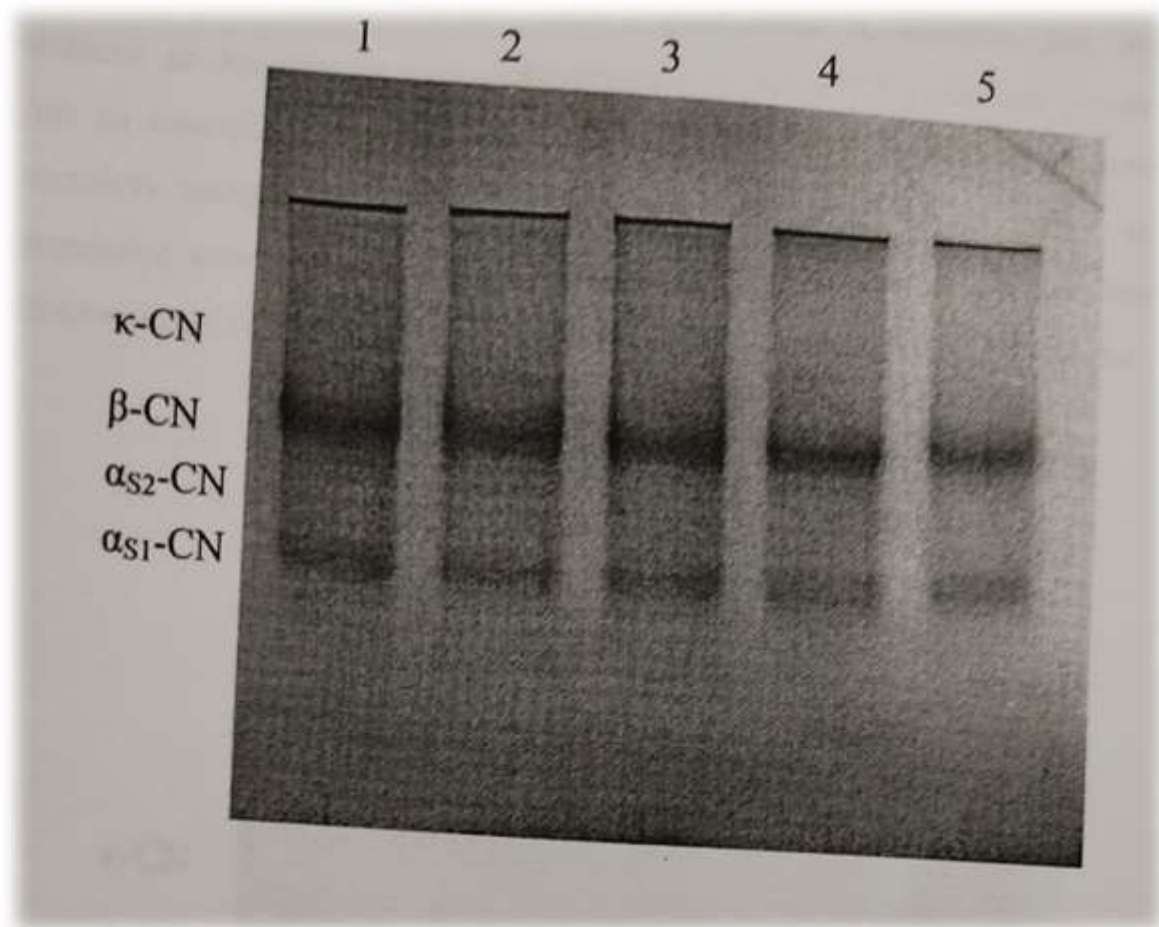


Рис. 4. Електрофореграма контрольних білків, з стерилізованого знежиреного молока (1), та білків осаджених після протеолізу лактококами штаму l_2 протягом 24(2), 72 (3), 120 (4) та 168 (5) годин, осаджених з культурального середовища.

Електрофореграми контрольних зразків молока знежиреного відрізняються від електрофореграми контрольного загального казеїну.

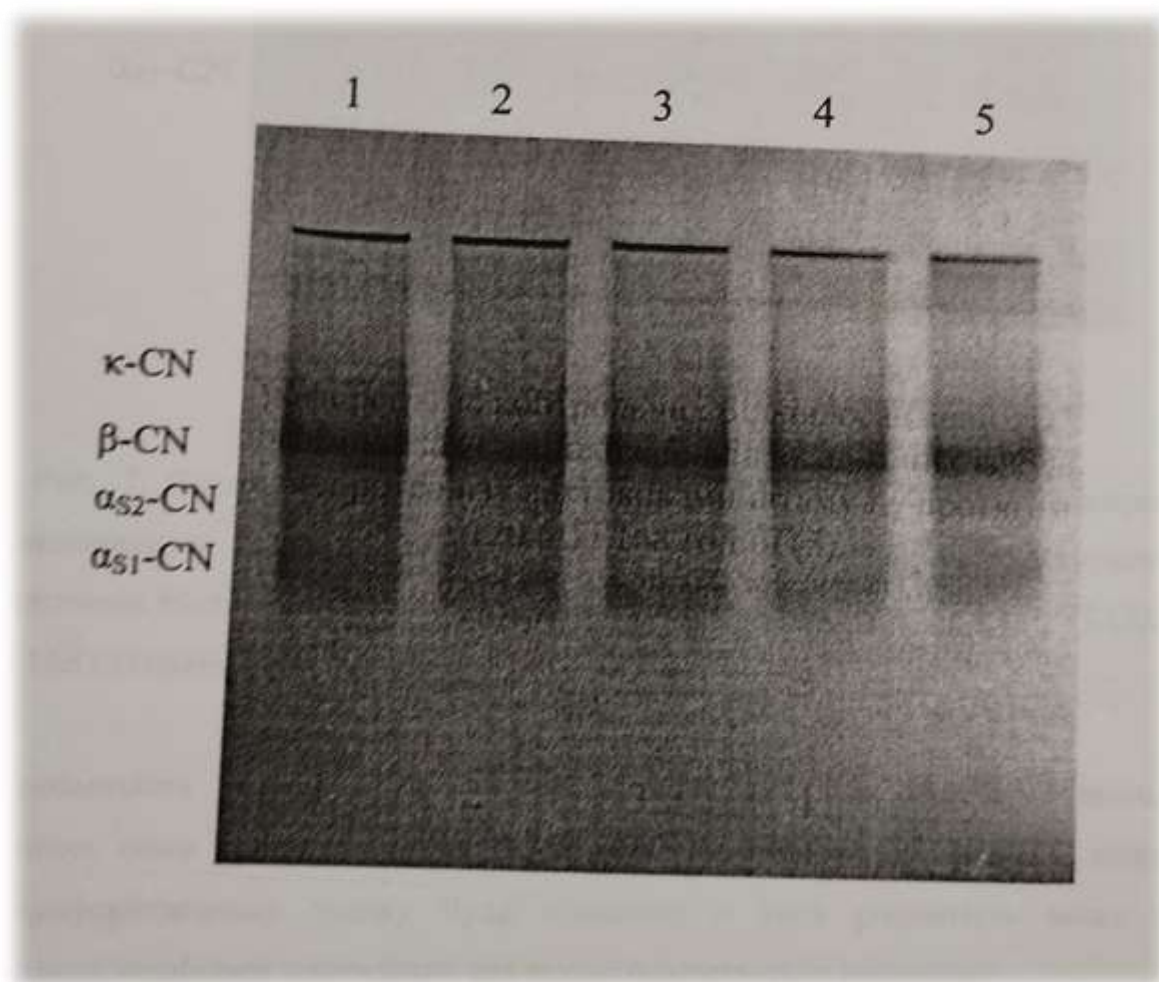


Рис. 5. Електрофореграма контрольних білків, з стерилізованого знежиреного молока (1), та білків осаджених після протеолізу лактококами штаму c_2 протягом 24(2), 72 (3), 120 (4) та 168 (5) годин, осаджених з культурального середовища.

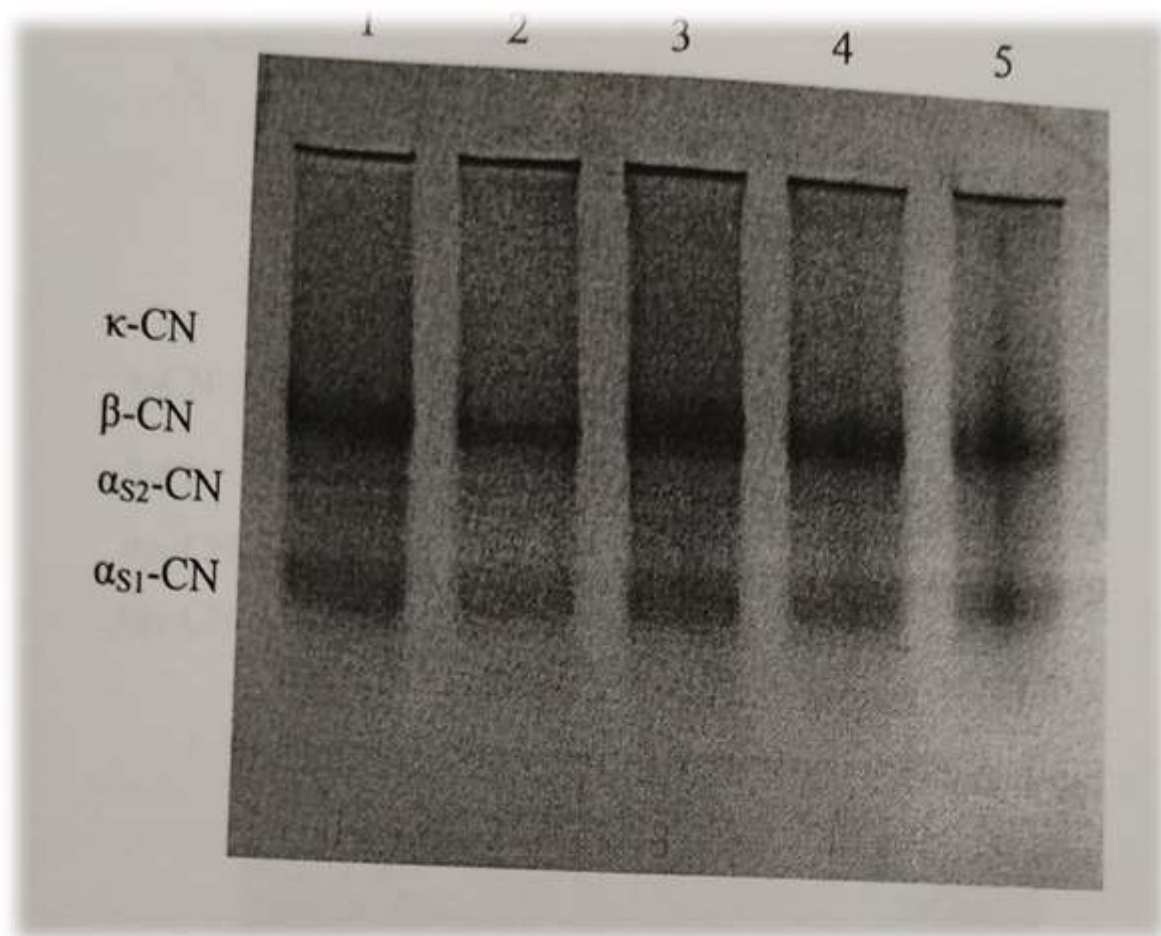


Рис. 6. Електрофореграма контрольних білків, осаджених із знежиреного стерилізованого молока (1), а також білків, осаджених з культурального середовища після протеолізу лактококами штаму d_2 протягом 24 (2), 72 (3), 120(4),168 (5) годин.

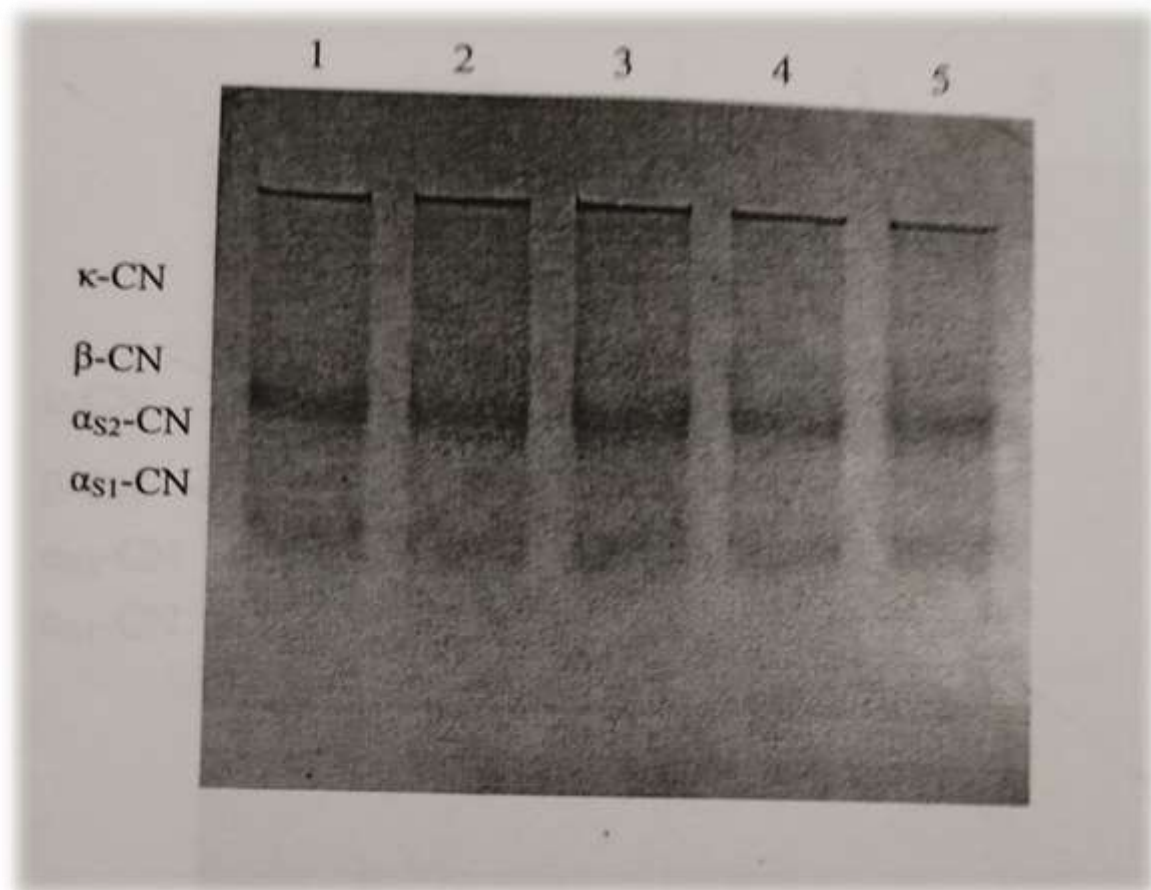


Рис. 7. Електрофореграма контрольних білків, осаджених із знежиреного стерилізованого молока (1), а також білків, осаджених з культурального середовища після протеолізу лактококами штаму l_2 протягом 24 (2), 72 (3), 120(4),168 (5) годин.

Висушений білок в кількості 90 мл 1 мл буферу з рН 7,9, 9М сечовина та 1 мл H_2O , бромфеноловий синій та сахарозу центрифугують впродовж 5 хвилин при 3000 g та фільтрують. Також у комірку вносили гель в кількості 17 мкл. Результати електрофорезу показані на рис. 4, 5, 6, 7.

На рисунках показано, що отримані зразки після інкубації протягом 1-5 днів, майже не відрізнялися від молока взятого за контроль. Зменшення інтенсивності забарвлення головних фракцій казеїну при інкубації штаму l_2 та штаму d_2 помітним стало за сім днів.

Помітнішими змінами у білкових фракціях виявились штами після інкубації після тридцяти днів. Інтенсивність забарвлення в обох головних фракціях зменшилась (таблиця 5). Кількісна оцінка електрофореграм ускладнюється використанням молока стерилізованого, де білки утворюють агрегати, руйнуються олігосахариди, відбувається дефосфорилування казеїнів, при чому і змінюється електрофореграма казеїнів.

Частина сироваткових білків знаходиться у складі агрегатів, а друга частина денатурує та утворює нерозчинні агрегати та під час центрифугування та фільтрування втрачається.

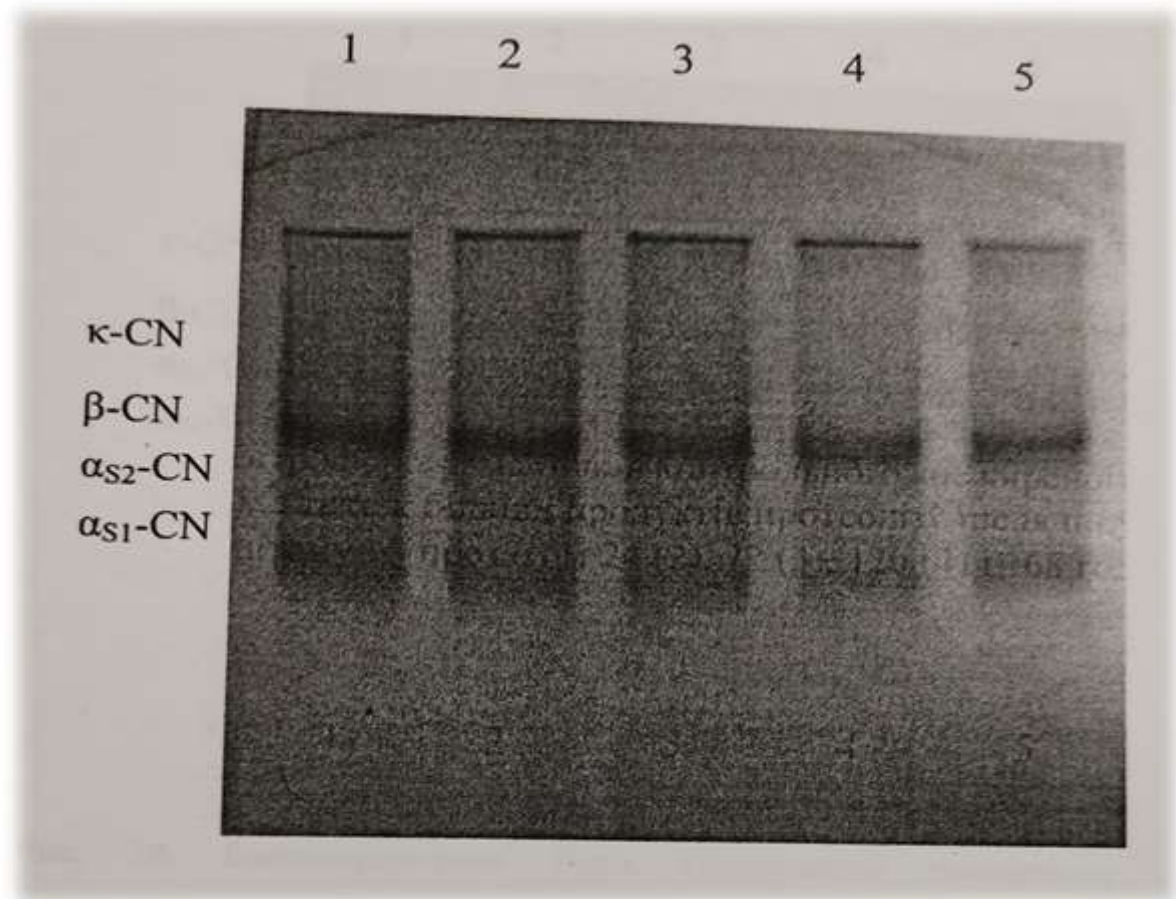


Рис. 8. Електрофореграма контрольних білків, осаджених із знежиреного стерилізованого молока (1), а також білків, осаджених з культурального середовища після протеолізу лактококами штаму c_2 протягом 24 (2), 72 (3), 120(4),168 (5) годин.

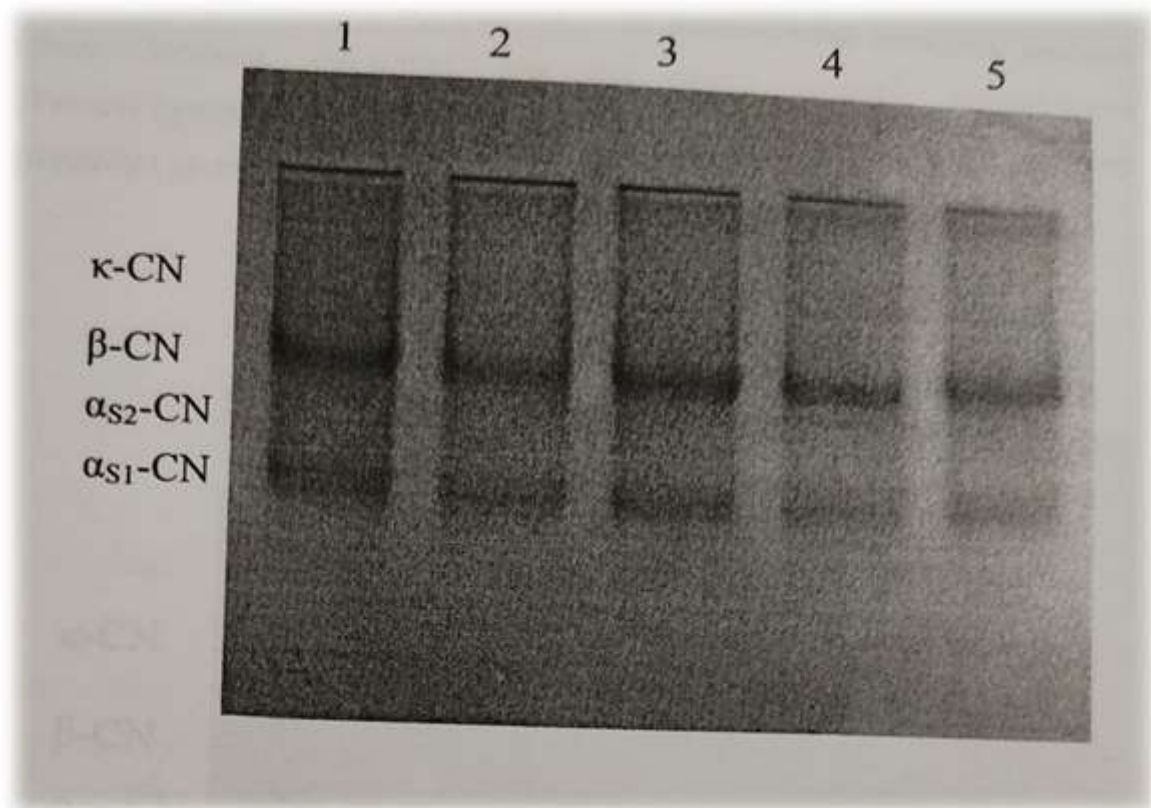


Рис. 9. Електрофореграма контрольних білків, осаджених із знежиреного стерилізованого молока (1), а також білків, осаджених з культурального середовища після протеолізу лактококами штаму d_2 протягом 24 (2), 72 (3), 120(4),168 (5) годин.

3.2. Кислотна коагуляція казеїнів. Утворення молочної кислоти.

Однією з властивостей молочнокислих бактерій та головним критерієм відбору є перетворення лактози в молочну кислоту. Такий процес характеризується швидким утворенням молочної кислоти та часом активної коагуляції білків казеїнового комплексу в молоці. Адже, висока кислотоутворююча активність зменшує розвиток сторонньої мікрофлори, в одночас пришвидшує процеси ферментації.

Титровану кислотність у градусах Тернера та активну кислотність в одиницях рН через 6, 24, 48 і 168 годин культивування їх у знежиреному стерилізованому молоці при температурі 30 ° С, визначали для того щоб охарактеризувати кислотоутворювану активність відібраних протеїназо-позитивних лактококів [36]. Також визначали час утворення згустку казеїнів та час коагуляції. Результаті наведені у таблиці 6.

Таблиця 6. Активність утворення молочної кислоти протеїназо-позитивними штамами лактококів.

Штами лакто- коків	Титрована кислотність, °Т через				Активна кислотність, од.рН через		Час кислотної коагуляції казеїну, год
	6 годин	24 години	48 годин	168 г/один	24 години	168 годин	
d_1	33±1,2	63±2,7	72±2,0	96±2,9	5,14±0,07	4,56±0,05	22,0±1,2
d_2	34±2,1	67±2,1	78±2,7	96±3,2	5,11±0,04	4,57±0,05	18,5±0,6
d_3	33±1,5	63±2,3	81±2,9	103±3,1	5,17±0,06	4,48±0,04	22,0±1,0
l_2	56±2,7	101±2,6	107±2,5	119±2,3	4,49±0,06	4,24±0,05	9,0±0,5
l_3	42±1,5	96±3,6	100±2,5	109±3,0	4,64±0,06	4,34±0,05	9,5±0,3
c_1	27±1,1	57±2,1	86±2,7	5,26±0,05	4,45±0,04	24,5±0,04	24,5±0,9

c_2	31±1,0	67±1,3	88±2,0	98±2,8	4,97±0,03	4,48±0,08	18,5±0,8
c_3	43±2,3	97±4,0	105±2,0	108±4,0	4,55±0,06	4,38±0,06	9,5±0,7

Найактивнішими є штами підвидів *Lcc. lactis subsp. cremoris* c_3 та *Lcc. lactis subsp. lactis* l_2 і l_3 , про що свідчать результати досліджень [39]. Лактококи характеризуються високою початковою швидкістю кислотоутворення, протягом 6 годин, значення якої – 43°Т для *subsp. cremoris* та 42-56°Т для *subsp. lactis*.

Отже, з досліджуваних штамів третина відноситься до активних кислотоутворювачів (штами що вказувались раніше), з виявленою кислотністю 96-102° Т, через 24 години і 100-107°Т через 48 годин інкубації. Інші два штами мають значно меншу активність кислотоутворення. Початкова швидкість знаходиться у межах 27-31°Тта гранична кислотоутворюваність становить 97-100°Т.

Lcc. lactis biovar diacetylactis , що використовувався у дослідах має меншу швидкість кислотоутворення – 34°Т та гранично кислотоутворення – 96-103°Т. Активні штами при утворенні молочної кислоти спричиняють коагуляцію казеїнів (9-9,5 годин), інші штами коагулюють казеїн знежиреного молока протягом 18-24 годин, це прослідковується під час визначення часу кислотної коагуляції казеїну.

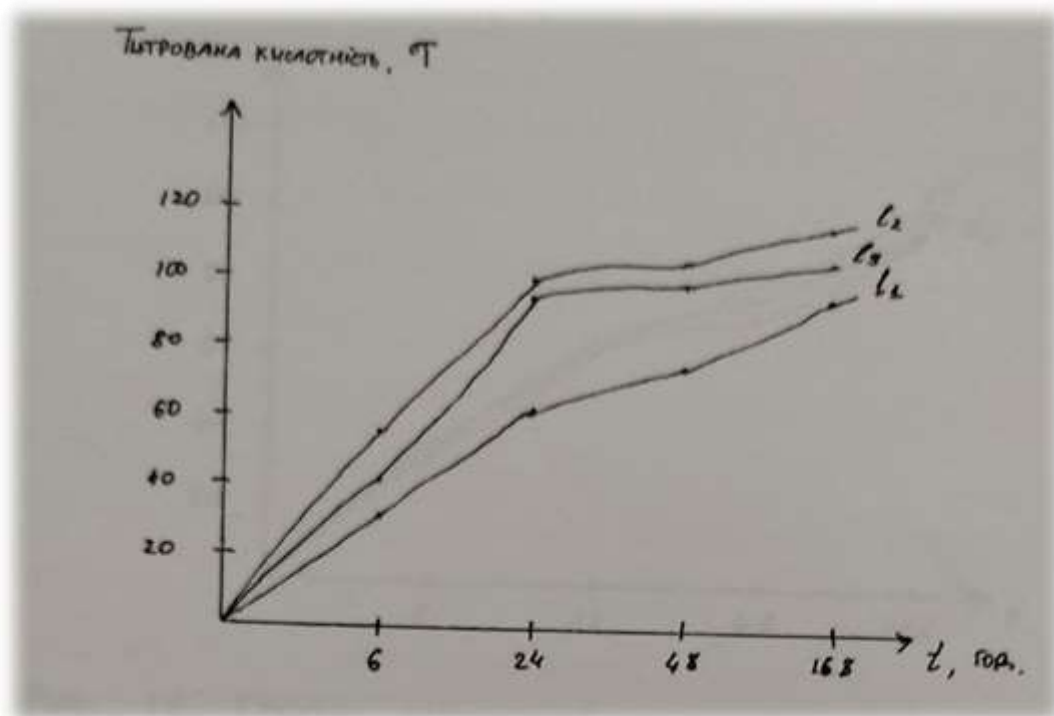


Рис. 10. Графік активності утворення кислоти молочної за допомогою протеїназо-активних штамів лактококів *Lcc.lactis subsp.lactis*

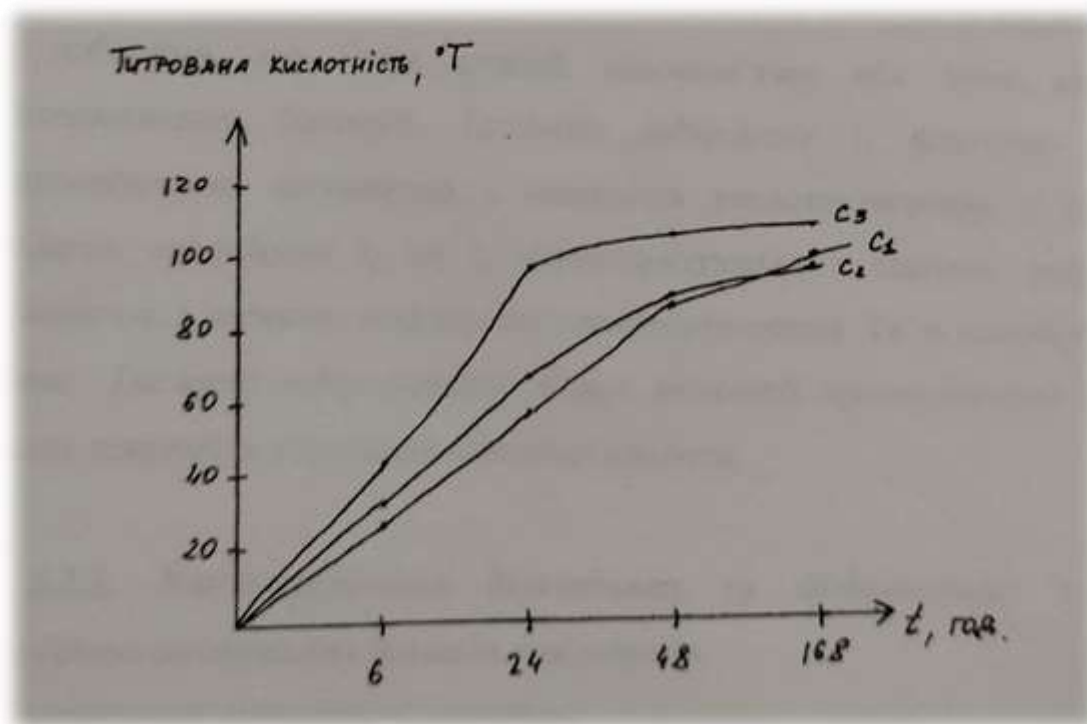


Рис. 11. Графік активності утворення кислоти молочної за допомогою протеїназо-активних штамів лактококів *Lcc.lactis subsp.cremoris*.

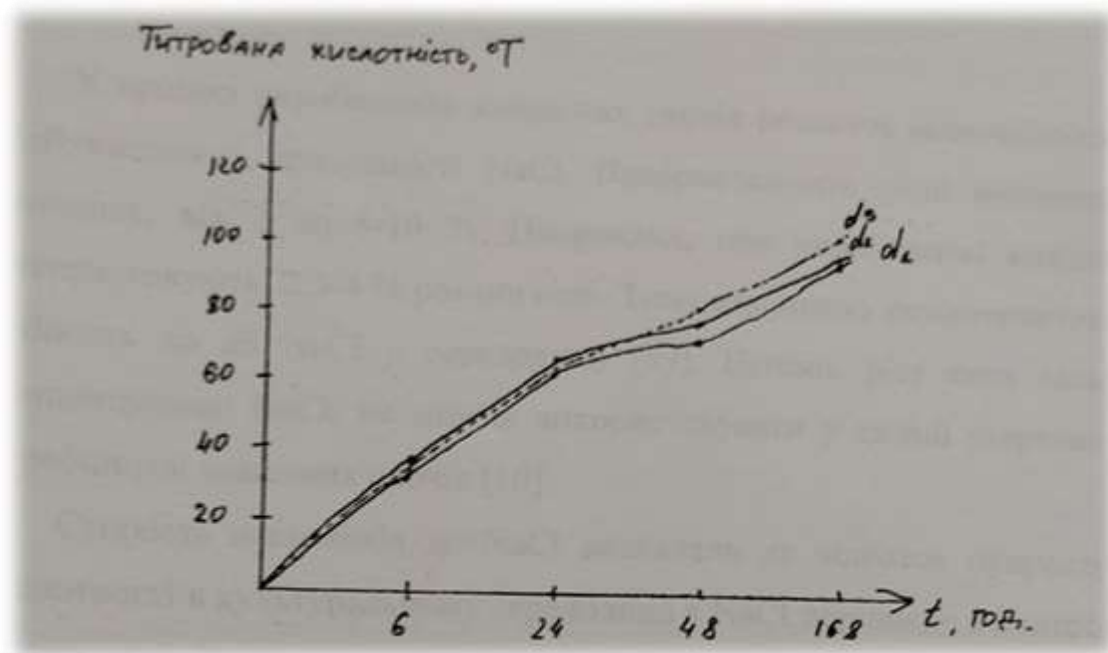


Рис.12. Графік активності утворення кислоти молочної за допомогою протеїназо-активних штамів лактококів *Lcc.lactis subsp.diacetylactis*.

При порівнянні протеолітичних властивостей та швидкості кислотоутворення видно, що між молочнокислими бактеріями є певний зв'язок.

Lcc.lactis subsp.lactis l₁ не володіє протеолітичною активністю та має низьку швидкість кислотоутворення, а *Lcc.lactis subsp.lactis l₂* і *l₃* має високу протеолітичну здатність та швидкість до кислотоутворення. Більшу швидкість утворення кислоти молочної має штам *s₃*, тому є і більш активним.

3.3. Стійкість штамів лактококів до дії NaCl

Важливою характеристикою штамів вважають стійкість до дії NaCl.

При виробництві кисломолочних продуктів молочнокислі бактерії розвиваються при дії NaCl [37]. Тому використовують різноманітні розчини, а точніше концентровані солі від 2 до 8-10%. Штами ріст яких припиняється 2 % NaCl у складі стартових культур не використовують. Стійкість лактококів до NaCl визначається як відсоток приросту титрованої кислотності у

культуральному середовищі в порівнянні з контролем, що не містить солі. Результати досліджень наведені в табл.7.

Більшість протеїназо-позитивних штамів є стійкими до 2% концентрації NaCl. Пригнічує ріст усіх штамів NaCl з концентрацією 6,5%. Тільки у штаму c_3 можна спостерігати незначний ріст. *Lcc.lactis subsp.diacetylactis* виявився найбільш стійким до 4% NaCl, *Lcc.lactis subsp.cremoris* є найменш стійким.

На початкових етапах розвитку *Lcc.lactis subsp.cremoris* характеризується незначними різницями у титрованій кислотності культуральногосередовищау зразках у порівнянні з контрольними. Різниця зростає через 24 години. Така ж закономірність проявляється при дослідженні штаму *Lcc.lactis subsp.lactis*. *Lcc.lactis subsp.diacetylactis* мають високу стійкість до NaCl на початковому етапі і після культивування (24 години).

Отже, штами *Lcc.lactis subsp.diacetylactis* мають більшу стійкість до NaCl, аніж інші лактококи. Не можна використовувати у кисломолочні продукти штами c_1 та c_2 . Ацетоїн та діацетил особливо впливають на запах і смак продуктів [38], тому були проведені дослідження на здатність штамів утворювати вуглекислий газ, ацетоїн та діацетил. Результати наведені у таблиці 8.

Було встановлено всі штами *Lcc.lactis subsp.cremoris* продукують ацетоїн та діацетил, окрім c_2 . Штами *Lcc.lactis subsp.diacetylactis* продукують ацетоїн та діацетил, а штам d_2 продукує у великих кількостях. Яскраво-рожеве забарвлення спостерігалось через 7-10 хвилин, а у двох інших спостерігалось через 10-15 хвилин.

Таблиця 7. Утворення вуглекислого газу , діацетилу та ацетоїну штамами лактококів.

Штами <i>Lcc.lactis</i> subsp.cremoris		c ₁	c ₂	c ₃
Утворення діацетилу і ацетоїну		+	-	+
Штами <i>Lcc.lactis</i> biovar. diacetylactis		d ₁	d ₂	d ₃
Утворення	CO ₂	+	+	+
	Ацетоїну та діацетилу	+	++	+

При тестуванні на ацетоїн та діацетил всі штами *Lcc.lactis* subsp.lactis дали негативний результат. Штами *Lcc.lactis* subsp.diacetylactis виявляють здатність на утворення CO₂.

Таблиця 8. Вплив NaCl на розвиток протеїназо-позитивних лактококів.

Штами лактококів	Концентрація NaCl					
	2		4		6,5	
	Час тестування, год					
	6	24	6	24	6	24
l_1	92	90	64	43	43	22
l_2	81	48	43	25	43	11
l_3	94	43	63	27	14	8
d_1	88	88	65	31	25	7
d_2	100	81	64	57	29	4
d_3	100	90	65	50	50	16
c_1	90	13	90	12	52	12
c_2	90	44	70	14	50	12
c_3	98	79	79	58	41	33

Розділ 4

Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях

4.1. Охорона праці

4.1.1. Конституційні засади охорони праці в Україні

В основному законі України – Конституції питанням охорони праці присвячені статті 43, 45 та 46.

Стаття 43: Кожен має право на працю, що включає можливість заробляти собі на життя працею яку він вільно обирає, або на яку вільно погоджується, «Кожен має право на належні, безпечні і здорові умови праці, на заробітну плату «меншу від визначеної законом», «Використання праці жінок і неповнолітніх на небезпечних для їхнього здоров'я забороняється».

Стаття 45: «Кожен хто працює має право на відпочинок. Це право забезпечує наданням днів щотижневого відпочинку, а також оплачуваної щорічної відпустки, встановленням скороченого робочого дня щодо окремих професій, скороченої тривалості роботи у нічний час».

Стаття 46: «Громадяни мають право на соціальний захист, що включає право на забезпечення їх у разі повної, часткової або тимчасової втрати працездатності втрати годувальника, безробіття з незалежних різних обставин, а також у старості та інших випадках».

Законодавство України про охорону праці. Закон України «Про охорону праці»

В розділі I Закону України "Загальні положення" ст. 4 мовиться, що основними принципами державної політики в галузі охорони праці є пріоритет життя та здоров'я людини перед будь-якими результатами виробничої діяльності, соціальний захист людини, відшкодування шкоди, заподіяної здоров'ю, та ін.

У розділі II "Гарантії прав громадян на охорону праці" передбачено інформувати працівника про умови праці; компенсувати за шкідливі умови

праці; зафіксовано право працівника відмовитись від виконання робіт при загрозовому стані для його здоров'я та життя; забезпечувати соціальне страхування від нещасних випадків і профзахворювань (оплата з фонду соціального страхування); відшкодувати власником шкоду, заподіяну працівникові на виробництві. В законі передбачено відшкодування моральної шкоди. У законі є статті про охорону праці жінок, неповнолітніх, інвалідів.

В розділі III "Організація охорони праці на виробництві" говориться про обов'язкове створення органів управління охороною праці на підприємстві для виконання керівництва, нагляду і навчання із питань охорони праці.

Розділ IV - "Стимулювання охорони праці". Економічне стимулювання охорони праці здійснюється згідно з колективним договором та законодавством. Відшкодування збитків від порушень охорони праці - державі і громадянам - згідно з діючим законодавством.

Розділ V - "Державні міжгалузеві та галузеві нормативні акти про охорону праці" - переглядаються у разі потреби, але не рідше 1 разу на 10 років.

Розділ VI - "Державне управління охороною праці" перелічує органи державного управління охороною праці: Кабінет Міністрів, Державний Комітет по нагляду за охороною праці України, міністерства та держкомітети, а також місцева держадміністрація, місцеві ради народних депутатів - та визначає їх компетенцію.

Розділ VII - "Державний нагляд і громадський контроль за охороною праці", що здійснює Державна служба України з питань праці; Державний комітет України з ядерної та радіаційної безпеки; Органи державного пожежного нагляду управління пожежної охорони МВС України; Органи та заклади санітарно-епідеміологічної служби Міністерства охорони здоров'я України.

Розділ VIII - "Відповідальність працівників за порушення законодавства про охорону праці". Передбачається дисциплінарна, адміністративна, матеріальна, кримінальна відповідальність згідно із законодавством.

4.1.2. Охорона праці жінок, неповнолітніх, інвалідів

Згідно зі ст. 24 Конституції України жінки мають рівні з чоловіками права і свободи. З метою фактичного забезпечення рівноправності, з урахуванням особливостей жіночого організму, трудовим законодавством передбачено спеціальні правила охорони праці жінок, пільги і додаткові гарантії їх трудових прав.

Забороняється застосування праці жінок на важких роботах і на роботах зі шкідливими або небезпечними умовами праці. Перелік важких робіт та робіт зі шкідливими і небезпечними умовами праці забороняється також застосування жіночої праці на підземних роботах, крім деяких підземних робіт (нефізичних робіт або Робіт із санітарного та побутового обслуговування). Забороняється залучення жінок до підймання і переміщення важких речей, маса яких перевищує встановлені для них граничні норми. Законодавство обмежує застосування праці жінок у нічний час. Така праця допускається тільки в тих галузях народного господарства, де це зумовлюється особливою необхідністю і дозволяється як тимчасовий захід.

В інтересах охорони здоров'я неповнолітніх забороняється застосування їх праці на важких роботах і на роботах зі шкідливими або небезпечними умовами праці, а також на підземних роботах. Забороняється також залучати осіб, молодших 18 років, до підймання і переміщення речей, маса яких перевищує встановлені для них граничні норми. Усі особи, молодші 18 років, приймаються на роботу лише після попереднього медичного огляду і в подальшому, до досягнення 21 року, щороку підлягають обов'язковому медичному оглядові (ст. 191 КЗпП). Забороняється залучати працівників, молодших 18 років, до нічних, надурочних робіт і робіт у вихідні дні.

З метою реалізації творчих і виробничих здібностей інвалідів та з урахуванням індивідуальних програм реабілітації їм забезпечується право працювати на підприємствах зі звичайними умовами праці, в цехах і на ділянках, де застосовується праця інвалідів, а також займатися індивідуальною та іншою трудовою діяльністю, яка не заборонена законом. Залучення інвалідів до надурочних робіт і робіт у нічний час без їх згоди не допускається. При працевлаштуванні інваліда роботодавець повинен керуватися індивідуальною реабілітаційною програмою інваліда.

Підприємства, які використовують працю інвалідів, зобов'язані створювати для них умови праці з урахуванням рекомендацій медико-соціальної експертної комісії та індивідуальних програм реабілітації і забезпечувати інші соціально-економічні гарантії, передбачені законодавством.

4.1.3. Відповідальність посадових осіб і працівників за порушення законодавства про охорону праці.

За порушення законів та Інших нормативно-правових актів про охорону праці, створення перешкод у діяльності посадових осіб органів державного нагляду за охороною праці, а також представників професійних спілок, їх організацій та об'єднань винні особи притягуються до дисциплінарної, адміністративної, матеріальної, кримінальної відповідальності згідно із законом.

Дисциплінарна відповідальність полягає в накладанні дисциплінарних стягнень, передбачених чинним законодавством. Відповідно до статті 147 КЗпП встановлено такі дисциплінарні стягнення, як догана та звільнення з роботи.

Адміністративна відповідальність регулюється Кодексом України про адміністративні правопорушення (ст. 41 КУпАП) і передбачає накладання на винних осіб грошового штрафу в розмірах, зазначених у статті 43 Закону України «Про охорону праці».

Матеріальна відповідальність включає відповідальність як працівника, так і роботодавця. Матеріальна відповідальність устанавлюється лише за пряму дійсну шкоду і за умови, коли така шкода заподіяна підприємству (установі) протиправними діями (бездіяльністю) працівника.

Роботодавець або уповноважена ним особа (орган) несе матеріальну відповідальність за заподіяну шкоду працівникові незалежно від наявності вини, якщо не доведе, що шкоду заподіяно внаслідок непереборної сили або умислу потерпілого. Збитки у зв'язку з порушеннями законодавства про охорону праці можуть включати відшкодування потерпілому втраченого заробітку, одноразову допомогу, додаткові витрати на лікування, протезування, якщо потерпілий залишився живим, а також витрати на поховання в разі смерті потерпілого, одноразову допомогу на сім'ю та на утриманців.

Кримінальна відповідальність регулюється Кримінальним кодексом України (ст. 135 і ст. 218-220):

- якщо порушення вимог законодавства та інших нормативних актів про охорону праці створило небезпеку для життя або здоров'я громадян. Карається виправними роботами на строк до одного року або штрафом до п'ятнадцяти мінімальних розмірів заробітної плати.

Те саме діяння, якщо воно спричинило нещасні випадки з людьми, карається позбавленням волі на строк до чотирьох років;

- суб'єктом кримінальної відповідальності з питань охорони праці може бути будь-яка юридична та фізична особа, яка використовує найману працю, незалежно від форм власності, а також роботодавець або уповноважена ним особа, на яких законом або на підставі наказу,

посадової інструкції і спеціального розпорядження безпосередньо покладено обов'язок забезпечення дотримання вимог законодавства про охорону праці. Кримінальна відповідальність визначається в судовому порядку.

4.2. Безпека в надзвичайних ситуаціях

4.2.1. Застосування засобів захисту та знезараження молочних продуктів та сировини на підприємствах молочної промисловості

Захист від зараження РР, НХР і БЧ забезпечується: надійною герметизацією і ущільненням технологічного обладнання, яке контактує з молочними продуктами, використанням герметичної тари для готової молочної продукції, пакування та покривних матеріалів, проведенням санітарно-профілактичних заходів.

При проектуванні та будівництві нових і реконструкції існуючих підприємств передбачають :

- використання механізованих (автоматизованих) ліній виробництва, що забезпечують герметизацію обладнання для виключення контакту молочних продуктів із зовнішнім середовищем і персоналом;
- герметизацію будівель, складських і виробничих приміщень, використання відповідних типів конструкцій і будівельних матеріалів; неможливість проникнення гризунів та комах в середину приміщень;
- випуск готової продукції у тарі і пакуванні, які забезпечують захист молочних продуктів від зараження РР, ХОР і БЧ;
- виконання внутрішніх поверхонь виробничих приміщень, складів, сховищ гладенькими (затиранням, залізненням або штукатуркою);
- установлення фільтрів на вентиляційних системах; установлення у камерах зберігання сиру кондиціонерів, які забезпечують певну герметизацію камер і умови для зберігання сирів;
- запаси покривних матеріалів (брзенту, прогумованої тканини, поліетиленової плівки) для покриття обладнання і молочних продуктів спеціальними захисними чохлами та полотнищами.

На підприємствах молочної промисловості під час складання плану робіт для підвищення стійкості роботи підприємства у надзвичайних

ситуаціях, передбачають заходи, спрямовані на герметизацію виробничих і складських приміщень та обладнання.

Планом визначають, які саме з герметизуючих та ущільнюючих пристроїв встановлюються в умовах нормальної роботи і в надзвичайних ситуаціях, нумерують та зберігають в певних місцях.

Герметизація виробничих та складських приміщень забезпечується: зашпаруванням фундаменту, підлоги, стін, дверей, перегородок, покрівлі, віконних рам, фрамуг;

- ущільненням дверей з дверними коробками за допомогою спеціальних притискачів;

- герметизацією стін, стелі, підлоги, де проходять труби, кабелі комунально-енергетичних, мереж.

Одним із основних засобів захисту молочних продуктів від зараження РР, ХОР та БЧ є використання захисної тари та пакування. Для захисту молочних продуктів слід використовувати тару вищої категорії: жерстяні та скляні консервні банки, скляні пляшки з кроне-пробками, металеві місткості (цистерни, фляги, бідони та ін.) із герметичним закупоренням.

Тара першої категорії: туби (з алюмінію, поліетилену), пакунки з покриттям (тетра-пак, пюр-паки, та ін.), комбіновані жерстяно-картонні банки з вкладками, крафт-мішки, фанерні бочки з вкладками поліетилену захищають молочну продукцію тільки від РР і БЧ.

Тара другої категорії (пляшки широкогорлі із фольги, ящики картонні й дощаті) можуть бути використані для захисту тільки від РР.

Якщо молочна продукція буде зберігатися у картонних ящиках з обклеєним швом або у дерев'яних ящиках з вкладками із пергаменту (поліетилену) у холодильних камерах, то вона буде повністю захищена від зараження РР, ХОР і БЧ.

Молочна продукція у дерев'яних ящиках при зберіганні у негерметичному приміщенні або перевезенні у негерметизованому

автотранспорті в умовах надзвичайної ситуації повинна бути вкрита брезентом або прогумованою тканиною, що захищатиме не тільки від радіоактивного пилу, пари ОР і БЧ, а й від краплиннорідких ОР протягом 2...5 годин.

Крім розглянутих заходів на молоко-, масло-, сироробних підприємствах потрібно проводити санітарно-профілактичні заходи: суворо і точно виконувати санітарно-гігієнічні та протиепідемічні вимоги і норми, встановлені Міністерством охорони здоров'я.

Виробничий персонал підприємств зобов'язаний: суворо дотримуватись правил особистої гігієни; регулярно проводити санітарно-гігієнічний та лабораторний контроль якості продуктів, режиму їх зберігання та оброблення, стану тари і пакувань, а також санітарно-гігієнічний і бактеріологічний контроль води у відкритих водоймах, артезіанських свердловинах і водопровідних мережах, що використовується для потреб виробництва; будівлі, приміщення підприємства, обладнання, інвентар, а також транспортні засоби для перевезення продукції слід тримати в чистоті; упорядковувати територію підприємства (асфальтувати, озеленяти, обгороджувати, обладнувати сміттеприймальники, вигрібні ями та ін.); створювати на підприємствах запаси засобів, матеріалів і обладнання для знезараження; своєчасно проводити санітарно-технічний ремонт (фарбувати, білити) у виробничих цехах, допоміжних приміщеннях, місцях зберігання молочних продуктів і сировини.

Висновки

1. На основі вивчення загальної протеолітичної активності при розвитку у знежиреному молоці виявлено протеїназо-позитивні штами лактококів.
2. Охарактеризовано протеолітичні властивості відібраних протеїназо-позитивних штамів. Встановлено специфічність дії протеолітичних систем до основних фракцій молока. Зокрема, показано вищу чутливість α_{s1} -казеїну.
3. Охарактеризовано кислотоутворюваність властивості відібраних штамів лактококів. Як правило, вона вища у сильних протеолітів. Виявлено особливості кислотної коагуляції казеїнів окремими штамми.
4. Встановлено стійкість штамів лактококів до різних концентрацій NaCl при розвитку у знежиреному молоці.
5. В результаті проведених досліджень виявлено штами лактококів, які здатні утворювати вуглекислий газ, ацетоїн та діацетил. Це всі штами *Lcc.lactis biovar. Diacetylactis*.

Список використаних джерел

1. Димань Т.М. Безпека продовольчої сировини і харчових продуктів: підручник / Т.М. Димань, Т.Г. Мазур. – К.: ВЦ «Академія», 2011. – 520 с.
2. Закон України «Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів» від 23.12.1997 № 771/97-ВР. Режим доступу: <http://zakon5.rada.gov.ua/laws/show/771/97-вр>.
3. Вольферц В.Ю. Ветеринарно-санітарна експертиза / В.Ю. Вольферц. – Москва, 1950. – 380с.
4. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М.: Наука, 1978. – 392 с.
5. Культури молочних заквасок. Визначення видового складу: ДСТУ IDF 149А:2003.-К:ДержспоживстандартУкраїни,2005.-14с.
6. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов / К.К. Горбатова. – М.: Легкая и пищевая пром., 2005. – 327 с.
7. ДСТУ 2661:2010. Молоко коров'яче питне [Чинний від 2011-10-01]. Вид. офіц. Київ: Держспоживстандарт України, 2010. 10 с.
8. Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства. – М.: Агропромиздат,1987. – 400с.
9. Лихачова А.Ю., Бондаренко В.М. Сучасний стан питання про номенклатуру та таксономії бактерій роду *Lactobacillus* // Тез.конф. «Прибуток і пробіотичні продукти у профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань людини». М., 21-23 квітня 1999. с.30-31.
10. Мосієнко В.С. Молочнокислі бактерії, їх властивості та використання в медичній практиці / В.С. Мосієнко, М.Д. Мосієнко, М.В. Рябуха // Український хіміотерапевтичний журнал. – № 1(13), 2002. – С. 16-23.
11. Thomas T.D., Prichard G. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures// FEMS Microbiology Reviews. – 1987. – Vol.46, №3. – P. 245 -268.

- 12.Коротяев А.И.,Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для мед.вузов - Спб., СпецЛит, 2008. – 20 – 25 с.
- 13.Wakeleris D.A., Pries W.V. A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening // J. Dairy Sci. – 1979. - №1. – P. 264 – 273.
- 14.Анализ физико-химических показателей кисломолочных продуктов зб. наук. ст./ редкол.: Д. Б. Якупова. Уральск: Вид-во ЗКГУ, 2013. Вип. 127, 74 с.
15. Гудима В.В., Шульга Н.М., Боднарчук О.В., Кігель Н.Ф. Створення ефективних заквашувальних композицій для виробництва кефіру високої якості / Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Тваринництво». - 2010.– №7(17). - С.35-41.
- 16.Algaron F., Miranda G., Le Bars D., Monnet V, Milk fermentation by *Lactococcus lactis* with modified proteolytic systems to accumulate potentially bio-active peptides // Lait. – 2004. – Vol. 84. – P. 115 – 123.
- 17.Иванов Ю. Г. Кисломолочная продукция, С.: Русич, 2006. 512 с
- 18.Домарецький В. А., Шиян П.Л., Калакура М.М. Загальні технології харчових виробництв: навч. пос., К : Університет «Україна», 2010. 814 с
19. Bockelman W., Monnet V., Geis A., Teunber M., Gripon J. C. Comparison of cell wall proteinases from *Lactococcus lactis* ssp.cremoris ACI and *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* NCDO763 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1989. – Vol. 31. – P.278 – 282.
- 20.Одарченко А.М. «Товарознавство молочних товарів», - Харків, 2007 р. – 15 с.
- 21.Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов: учебное издание, 3-е изд, перераб. и доп., СПб: ГИОРД, 2003. 320 с.
22. ДСТУ 7355:2013 Молоко, молочні продукти та закваски. Метод визначання кількості біфідобактерій [Чинний від 2014-01-01]. Вид. офіц. Київ: Держспоживстандарт України, 2013. 2 с.

23. Крусъ Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов: Учеб. для студ. вузов, обучающ. по спец «Технология молока и молочных продуктов», М.: Колос, 2000. 368 с.
24. Домарецький В. А., Шиян П.Л., Калакура М.М. Загальні технології харчових виробництв: навч. пос., К : Університет «Україна», 2010. 814 с.
25. Ефимочкина Н. Р. Значение некоторых потенциально патогенных микроорганизмов в возникновении пищевых токсикозов. Сообщение 1. S. aureus и стафилококковые энтеротоксины/ Н. Р. Ефимочкина, И.Б. Куваева, Ф.С. Флуер. - Вопросы питания, 2011. - №2 – С. 21-27
26. Флуер Ф.С. Стафилококковые энтеротоксины, их свойства и роль в качестве факторов патогенности // Ж. микробиол. – 2012. - № 2 . – С. 99-108.
27. Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Санитарная микробиология молока и молочных продуктов. - М.: Пищевая промышленность, 1980. -256 с.
28. Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства. - М.: Агропромиздат, 1987. - 400 с.
29. Микробиология продуктов животного происхождения /г.-Д. Мюнх, Х. Заупе, М. Шрайтер и др./ Пер. с нем. Е.Г. Токаря под ред. д-ра биол наук Н.С. Королевой, канд. биол. Наук Н.В. Билетовой, канд вет наук Р.П. Корнелаевой.- М.: Агропромиздат, 1985. - 591с.
30. Степаненко П. П. Микробиология молока и молочных продуктов.-- М.: Лира, 2002.--413с.
31. Полищук П.К., Дербинова Э.С., Казанцева Н.Н. Лабораторный практикум по микробиологии молока и молочных продуктов. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. - 200 с.
32. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Санитарные правила и нормы (СанПиН 2.3.2.560-96). - М., 1997.
33. Шепелев А.Ф. Товароведение и экспертиза молока и молочных продуктов. Уч.пос.для вузов. – Ростов н/Д: «Феникс», 2001 – 128 с.

34. Липатов Н.Н., Рогов И.А. Методология проектирования продуктов питания с требуемым комплексом показателей пищевой ценности. // Известия вузов. Сер. Пищевая технология.- 1987г №2.- С.9,
35. Азгальдов Г.Г. Теория и практика оценки качества товаров. — М.: Экономика, 1982. — 424с.
36. Шидловская Е.А. Органолептические свойства молока и молочных продуктов. Уч.пос.для вузов. — Ростов н/Д: «Феникс», 2000 — 240 с.
37. Алексеев В.Н. Количественный анализ.- М.:Химия, 1972.
38. Основы аналитической химии, Т.1,2. /Под ред. Ю.А.Золотова/ -М.: Высш. шк., 2000.
39. Christian G.D. Analytical Chemistry. - New York, J.Wiley & Sons, 1994.
40. Посыпайко В.И., Козырева Н.А., Логачева Ю.П. Химические методы анализа. -М.:Высш.шк., 1989.
41. Kellner J.R., Mermet M., Otto M., Widmer H.M. Analytical Chemistry. Verlag Chemie. Weinheim - New York, 1998.
42. Г. Є. Поліщук, О. В. Грек, Т. А. Скорченко та ін. Технологія молочних продуктів: підруч. — К. : НУХТ, 2013. — 502 с.
43. Домарецький В.А., Остапчук М.В., Українець А.І. Технологія харчових продуктів. — К.: НУХТ, 2003. — 572 с.
44. Технология пищевых производств: Учеб. для вузов /Под ред. Л.П. Ковальской // Ковальская Л.П., Суходол В.Ф., Куц А.М. и др.- М.: Колос, 1999.- 752 с.
45. Степаненко, П. П. Мікробіологія молока і молочних продуктів: підручник для ВУЗов - Сергієв Посад: ТОВ «Все для Вас Підмосков'я», 1999.? 415 з.:
46. R. Early The technology of dairy products. Newport Shropshire: Blackie academic & Profesional, 2nd edition. 1998. 426 с.

47. ДСТУ 7355:2013 Молоко, молочні продукти та закваски. Метод визначання кількості біфідобактерій [Чинний від 2014-01-01]. Вид. офіц. Київ: Держспоживстандарт України, 2013. 2 с.
48. Смоляр В.И. Фізфології та гігієни харчування: підруч. для студ. технол. спец. з напрямку «Харчова технологія та інженерія», К.: Здоров'я , 2000.
49. Анализ физико-химических показателей кисломолочных продуктов зб. наук. ст./ редкол.: Д. Б. Якупова. Уральск: Вид-во ЗКГУ, 2013. Вип. 127, 74 с.
50. Кравців Р.Й., Хоменко В.І., Островський Я.Ю., Гачак Ю.Р., Якубчак О.М. Молоко і молочні продукти: Посібник для студ. і викладачів вищих навч. закл. III-IV рівнів акредитації із спец. 7.130.201 «Зооінженерія» та як навч. посіб. для закл. освіти I-II рівнів акредитації, Л.: ЛА «Піраміда», 2001. 310 с.
51. Крусь Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов: Учеб. для студ. вузов, обучающ. по спец «Технология молока и молочных продуктов», М.: Колос, 2000. 368 с.
52. Тамим А., Робинсон К. Йогурты и другие кисломолочные продукты: научные основы и технология: пер. с англ., 2-е изд. СПб.: Профессия, 2003. 700 с.
53. Иванов Ю. Г. Кисломолочная продукция, С.: Русич, 2006. 512 с.
54. Стаценко Ю.Ф. Методичні рекомендації з дисципліни Безпека життєдіяльності для студентів очної і заочної форми навчання? ДДАУ, Дніпропетровськ, 2013. – 56 с/ 64.
55. Стрежекуров Е.Є. Охороні праці в галузі. Конспект лекцій. Дніпродзержинськ: Дніпродзержинський державний технічний університет. 2013. 48 с.
56. Ткачук К. Н., Халімовський М. О., Зацарний В. В. та ін. Основи охорони праці: Підручник. – 2-ге вид., допов. і перероб. – К.: Основа, 2006. – 444 с.
57. ГОСТ 30347-97. Молоко и молочные продукты. Методы определения *Staphylococcus aureus*. [Чинний від 1998-07-01]. Вид. офіц. Київ: Держспоживстандарт України, 1998. 5 с.

58. ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002) Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. [Чинний від 2013-07-01]. Вид. офіц. Київ: Держспоживстандарт України, 2013. 7 с.
59. Ленинджер А. Основы биохимии: Т. 3. Пер. с англ. / А. Ленинджер – М. : Мир, 1985. – 350 с.
60. Ткаль Т. К. Технохимический контроль на предприятиях молочной промышленности/ Ткаль Т. К – М.: Агропромиздат, 1990. 192 с.

Додатки

