

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему:

«Технологія отримання ферментованого
молочнокислими бактеріями яблучного соку»

Рівень вищої освіти перший (бакалаврський)
Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія
Освітня програма Біотехнологія

Виконав: студент групи ББТ-20

Морін В.В.

Науковий керівник: к.т.н., доц. Волошина І.М.

Рецензент: к.б.н., доц. Юнгін О.С.

Київ 2024

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти	<u>перший (бакалаврський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА
«__» _____ 20__ р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Моріну Володимиру Володимировичу**

1. Тема кваліфікаційної роботи: **«Технологія отримання ферментованого молочнокислими бактеріями яблучного соку»**
Науковий керівник роботи Волошина Ірина Миколаївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «01» березня 2024 року № 49-уч
2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо можливостей ферментації фруктових соків молочнокислими бактеріями, дослідження можливості ферментації яблучного соку *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, аналіз властивостей ферментованого *Lactobacillus* яблучного соку.
3. Зміст кваліфікаційної роботи: огляд літератури, об'єкт, мета та методи дослідження, експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки.
4. Дата видачі завдання 01.03.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ	05.04.2024	
2	Розділ 1 Огляд літератури	26.04.2024	
3	Розділ 2 Об'єкт, мета та методи дослідження	10.05.2024	
4	Розділ 3 Експериментальна частина	30.05.2024	
5	Висновки	31.05.2024	
6	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)	07.06.2024	
7	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку	10.06.2024	
8	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 14 днів до захисту)		
9	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		
10	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студент _____ Володимир МОРИН

Науковий керівник _____ Ірина ВОЛОШИНА

АНОТАЦІЯ

Морін В.В. Технологія отримання ферментованого молочнокислими бактеріями яблучного соку. – Рукопис.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 Біотехнологія та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2024 рік.

У цій кваліфікаційній роботі досліджували здатність отримувати ферментаційні продукти з яблучного соку сорту «Симиренка» з додаванням 50% апельсинового фрешу та заквасок «Йогурту VIVO» (*Streptococcus thermophilus* *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) № 3 «Vegan VIVO» (*Streptococcus thermophilus* *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) та № 4 (*Lactobacillus delbrueckii*). Отримані результати показали, що бродіння молочнокислих бактерій може покращити аромат і смак яблучного соку сорту «Симиренка» з додаванням апельсинового фрешу та зберігати свої корисні властивості за досліджуваними показниками, а саме концентрації іонів магнію та калію, аскорбінової кислоти. За органолептичними показниками продукт став краще виглядати, придбав солодкуватість та знизив солоність та гіркоту.

Ключові слова: яблучний сік, ферментація, лактобактерії, молочнокислі бактерії, функціональні продукти.

ABSTRACT

Morin V.V. Technology for the production of apple juice fermented with lactic acid bacteria. – Manuscript.

Qualification work on specialty 162 Biotechnology and bioengineering. – Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2024.

In this qualification work, the ability to obtain fermentation products from apple juice of the «Symyrenka» variety with the addition of 50% fresh orange and «Yogurt VIVO» starters (*Streptococcus thermophiles*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) № 3 "Vegan VIVO" (*Streptococcus thermophiles*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) and № 4 *Lactobacillus delbrueckii*. The obtained results showed that the fermentation of lactic acid bacteria can improve the aroma and taste of apple juice of the «Symyrenka» variety with the addition of fresh orange and preserve its beneficial properties according to the studied indicators, namely the concentration of magnesium and potassium ions, ascorbic acid. According to organoleptic indicators, the product looked better, gained sweetness and reduced saltiness and bitterness.

Key words: apple juice, fermentation, lactobacilli, lactic acid bacteria, functional products.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
ВСТУП	11
1.1 Ферментовані продукти	11
1.2 Переваги ферментованих продуктів	13
1.3 Молочнокисле бродіння.....	16
1.4 Молочнокисле бродіння фруктових соків.....	17
1.5 Вживання ферментованих соків та їх властивості	20
1.6 Технології ферментації для підвищення якості фруктових і овочевих соків	22
Висновки до розділу 1	25
РОЗДІЛ 2	26
ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	26
2.1 Проведення ферментації	26
2.2 Методика дослідження органолептичних властивостей	27
2.3 Методика дослідження іонів калію.....	27
2.4 Визначення концентрації глюкози глюкозооксидазним методом...	28
2.5 Визначення загальної кислотності	29
2.6 Визначення концентрації магнію	30
2.7 Визначення концентрації вітаміну С	31
2.8 Статистичний аналіз.....	31
Висновок до розділу 2	31
РОЗДІЛ 3	33
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	33
3.1 Дослідження органолептичних властивостей.....	33
3.2 Результати визначення вмісту глюкози у ферментованому соку....	36
3.3 Визначення концентрація магнію в досліджуваних зразках до та після ферментації.....	37
3.4 Значення вмісту іонів калію до та після ферментації	39
3.5 Вміст вітаміну С у ферментованому соку	40

3.6 Результати визначення загальної кислотності ферментованого соку	41
Висновок до розділу 3	42
ВИСНОВКИ.....	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	44
ДОДАТКИ.....	49

ВСТУП

Актуальність теми. Ферментовані продукти настійно рекомендуються, коли людина переживає процес одужання або для поліпшення здоров'я, при якому доцільно змінити стан травної системи. Ферментовані продукти є ідеальним союзником у тих випадках, коли потрібно лікувати кишечник і кишкову флору для хорошого травлення. Вони покращують травлення і засвоєння їжі. Ферментовані продукти є джерелом необхідних поживних речовин для організму, оскільки бродіння сприяє наявності вітамінів, таких як С або К₂, які важко знайти в продуктах, які не були ферментовані. Він виробляє вітаміни групи В, які беруть участь в метаболізмі деяких продуктів.

Ферментовані продукти допомагають правильно засвоювати мінерали, оскільки вони є симбіотичними продуктами, тобто вони мають пробіотичну та пребіотичну активність, яка посилює дію поглинання. При прийомі ферментованих продуктів досягається баланс кишкових бактерій і ферментів, що дозволяє краще засвоювати поживні речовини. Крім того, вони нейтралізують антипоживні речовини, які містяться в багатьох продуктах.

Ферментовані продукти збільшують антитіла, сприяючи розвитку природної імунної відповіді. Коли корисні бактерії стабільно існують у нашому кишечнику, кишкове запалення зменшується і навіть може бути усунено, а також проникність. Таким чином, він зменшує запальну реакцію організму та пригнічує ріст мікробів, які шкідливі для нашого організму.

Мета дослідження. Ферментація яблучного соку сорту «Симиренка» з внесеними добавками апельсинового фрешу за допомогою різних заквасок та чистої культури *Lactobacillus delbrueckii*. Дослідження його фізико-хімічних та органолептичних властивостей.

Завдання дослідження.

- Культивування яблучного соку сорту «Симиренка» з внесенням добавки апельсинового фрешу за допомогою різних заквасок

компанії VIVO (Йогурт, Веган, *Lactobacillus delbrueckii*).

- Дослідження органолептичних та фізико хімічних показників до та після ферментації з залученням заквасок та чистої культури *Lactobacillus delbrueckii*.

- Аналіз загальної кислотність та вміст концентрації глюкози, магнію, калію та вітаміну С у субстратах до та після ферментації з різними добавками;

- Опрацювання та оформлення отриманих результатів.

Об'єкт дослідження. Яблучний сок сорту «Симиренка» з внесенням добавки апельсинового фрешу та різних заквасок з залученням *Lactobacillus delbrueckii*.

Предмет дослідження. Дослідження фізико-хімічних на органолептичних показників до та після ферментації яблучного соку сорту «Симиренка» з внесенням добавки апельсинового фрешу за допомогою різних заквасок з залученням *Lactobacillus delbrueckii*.

Методи дослідження – огляд та аналіз наукових статей, використання мікробіологічних, біотехнологічних та хімічних методів дослідження, обробка даних статистичними методами.

Експериментальну частину кваліфікаційної роботи виконано на базі Науково-дослідного відділення експериментальної онкології ДНП «Національний інститут раку», а саме: дослідження оптимізації дозрівання генерованих дендритних клітин за допомогою біоактивних медіаторів.

Наукова новизна. Розробити та дослідити ферментований яблучний сік сорту «Симиренка» з додаванням апельсинового фрешу та різних заквасок з залученням *Lactobacillus delbrueckii*.

Практичне значення одержаних результатів. Дослідити та запровадити новий метод для виробництва ферментованого яблучного соку сорту «Симиренка» з внесеними добавками апельсинового фрешу за допомогою різних заквасок та чистої культури *Lactobacillus delbrueckii*, для можливої модифікації продукту. Результати дослідження можуть стати

базою для модифікації нових функціональних ферментованих продуктів на основі лактобактерій.

Апробацію наукових результатів проведено через їх оприлюднення на VI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Стан і перспективи розвитку хімічної, харчової та парфумерно-косметичної галузей промисловості». Фармацевтична технологія та фармакологія в забезпеченні активності довголіття» (Додаток А).

Публікації:

1. Петрух А.О., Потупа В.Ю., **Морін В.В.**, Волошина І.М. Використання наночасток металів у косметичі Стан і перспективи розвитку хімічної, харчової та парфумерно-косметичної галузей промисловості: Матеріали VI Всеукраїнської науково-практичної конференції. – Хмельницький, ХНТУ, 2024. С. 87-88 (Додаток А).

2. Луцій О.О., Макаренко М.В., **Морін В.В.**, Грецький І.О., Шидловська О.А. Дослідження можливостей використання дріжджів для синтезу наночасток металів. Освіта для сталого майбутнього: екологічні, технологічні, економічні і соціокультурні питання: колективна монографія за матеріалами Всеукраїнської наукової конференції / за ред. В. П. Плаван, А. О. Касич, О. О. Бутенко. Київ: КНУТД, 2024. 3 (Додаток Б).

Структура і обсяг роботи. Кваліфікаційна робота складається зі вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел із 43 найменувань та двох додатків. Загальний обсяг роботи 44 сторінки друкованого тексту.

ВСТУП

1.1 Ферментовані продукти

Бродіння – це процес, за допомогою якого мікроорганізми виробляють спирти, вуглекислий газ та/або органічні кислоти, в основному з цукрів і в переважно анаеробних умовах, для виробництва енергії. Пастер у ХІХ столітті використовував термін «бродіння» у вузькому значенні для опису змін, що викликаються дріжджами та іншими мікроорганізмами, що ростуть за відсутності повітря (анаеробно); він також визнав, що етиловий спирт та вуглекислий газ – не єдині продукти бродіння [1].

Ферментовані продукти визначаються як «продукти харчування або напої, вироблені за допомогою контрольованого зростання мікробів та перетворення харчових компонентів за допомогою ферментативної дії». Багато продуктів харчування історично піддавалися ферментації, включаючи м'ясо і рибу, молочні продукти, соки, овочі, соєві боби, інші бобові, крупи та фрукти. У процесі ферментації існує кілька змінних, включаючи мікроорганізми, харчові інгредієнти та умови довкілля, що призводить до тисяч різних варіацій ферментованих продуктів. Історично ферментація харчових продуктів проводилася як метод консервації, оскільки утворення антимікробних метаболітів (наприклад, органічних кислот, етанолу та бактеріоцинів) знижує ризик зараження патогенними мікроорганізмами. Ферментація також використовується для поліпшення органолептичних властивостей (наприклад, смаку та текстури), при цьому деякі продукти, такі як оливки, є їстівними без ферментації, що видаляє гіркі фенольні сполуки [2].

Існує два основних методи ферментації продуктів. По-перше, харчові продукти можуть зазнавати природної ферментації, при цьому мікроорганізми природним чином присутні в сирих харчових продуктах або в середовищі переробки, наприклад, квашена капуста, кімчі та деякі ферментовані соєві продукти. Подруге, продукти можна ферментувати шляхом додавання заквасок, відомих як «культурозалежні ферменти»,

наприклад кефіру, йогурту, чайного гриба тощо. Одним із методів проведення культурально-залежної ферментації є «зворотна закваска», при якій до сирих продуктів, наприклад хліба на заквасці, додається невелика кількість раніше ферментованої партії. Закваски, що використовуються для ініціації ферментації, можуть бути як натуральними (наприклад, зворотна закваска), так і обраними комерційними заквасками для стандартизації органолептичних характеристик кінцевого продукту.

По-перше, вони містять потенційно пробіотичні мікроорганізми, такі як молочнокислі бактерії [3]. Загалом було виявлено, що більшість ферментованих продуктів містить принаймні 10^6 мікробних клітин на грам, причому концентрація змінюється залежно від кількох змінних, таких як регіон продукту, вік і час аналізу/вживання продуктів [4]. Ферментація продуктів, мабуть, відіграє важливу роль у виживанні пробіотичних штамів через її буферизацію та захисний ефект проти захворювань кишечника (наприклад, низький рН, жовчні кислоти) [5]. Дійсно, ряд досліджень показали, що мікроорганізми з ферментованих продуктів можуть досягати шлунково-кишкового тракту, це, ймовірно, буде відрізнятися в різних продуктах, і їх присутність у кишківнику, здається, тимчасова [6]. Тим не менш, ці мікроорганізми все ще можуть мати потенціал для здійснення фізіологічної користі в кишківнику через конкуренцію з патогенними бактеріями та виробництво побічних продуктів імунної регуляції та нейрогенної ферментації. По-друге, метаболіти, отримані в результаті бродіння, можуть мати користь для здоров'я. Наприклад, молочнокислі бактерії виробляють біологічно активні пептиди та поліаміни з потенційним впливом на серцево-судинне, імунне та метаболічне здоров'я. По-третє, бродіння може перетворити певні сполуки на біологічно активні метаболіти. Наприклад, молочнокислі бактерії можуть перетворювати фенольні сполуки (флавоноїди) на біологічно активні метаболіти. По-четверте, харчові компоненти, що містяться у ферментованих продуктах, такі як пребіотики та вітаміни, також можуть мати користь для здоров'я. Нарешті, ферментація

може зменшити кількість токсинів і антипоживних речовин, наприклад, ферментація соєвих бобів може знизити концентрацію фітинової кислоти, а ферментація закваски може зменшити вміст ферментованих вуглеводів (наприклад, ферментованих олігосахаридів, дисахаридів, моносахаридів і поліолів, FODMAP), що може підвищити переносимість цих продуктів у пацієнтів із функціональними розладами кишечника, такими як синдром подразненого кишечника [7].

1.2 Переваги ферментованих продуктів

Ферментована їжа має довгу історію безпечного використання, зростає загальна думка, що споживання ферментованої їжі позитивно впливає на здоров'я. Це пояснюється поширеними спостереженнями про те, що для ферментованих харчових продуктів, як правило, використовуються необроблені сирі інгредієнти, вони містять мало або зовсім не додають консервантів, барвників чи ароматизаторів і виготовляються з використанням давно встановлених, стійких і в багатьох випадках традиційних технологій. Споживачів привертає те, що це живі продукти, що містять природну та різноманітну мікробіоту.

1) Перетворення в їжі, що виникають в результаті ферментації

Добре встановлено, що бродіння може підвищити засвоюваність складних вуглеводів і білків шляхом розщеплення крохмалю до олігосахаридів і поліпептидів до амінокислот [15]. Ферментація дозволяє дестабілізувати казеїнову міцелу бактеріями, присутніми в молоці, підвищуючи засвоюваність молочного білка. Ферментація, зокрема щодо сиру, сприяє концентрації ключових поживних речовин через видалення води та підвищує біодоступність кальцію, що важливо для здоров'я скелета.

Крім того, ферментація може полегшити перетворення в сирих продуктах, завдяки чому споживачі, які не переносять вихідний сирий продукт, сприймають ці продукти. Хорошим прикладом цього є здатність людей з непереносимістю лактози споживати кисломолочні продукти,

зокрема зрілі сири, такі як Чеддер. Причиною цього є те, що під час бродіння та дозрівання сиру LAB метаболізує лактозу, значно знижуючи рівень лактози в отриманому ферментованому харчовому продукті. Крім того, присутність ферменту лактази, що виробляється бактеріями, присутніми у ферментованій матриці, може допомогти у подальшому видаленні будь-якої залишкової лактози під час коктання та травлення. Подібний приклад включає зниження концентрації антипоживних компонентів у сирих продуктах, наприклад, часткове знищення шкідливих інгібіторів трипсину під час ферментації соєвих бобів.

Крім того, біологічно активні сполуки можуть вироблятися через катаболізм білків, ліпідів і вуглеводів під час процесу бродіння, і можуть бути результатом ряду мікробних метаболітів, що утворюються під час процесу. Дійсно, повідомлялося про виробництво вітамінів і антиоксидантів під час ферментації їжі для багатьох видів LAB, зокрема членів нової ребрендингової родини *Lactobacillaceae* [16]. Біоактивність, пов'язана зі зниженням артеріального тиску та холестерину, покращенням метаболічних синдромів, протираковими ефектами та покращенням імунної функції, були описані [16]. Вітаміни B7, B11 і B12 виробляються в кисломолочних продуктах *Lactobacillaceae* (наприклад, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Limosilactobacillus reuteri*), *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* і кількома видами *Streptococcus*. Фолієва кислота (B₁₁) необхідна для розвитку та відтворення та запобігає певним розладам, включаючи деякі види раку та серцево-судинні захворювання, тоді як багато метаболічних процесів вимагають B₁₂ як кофактора, включаючи метаболізм нуклеїнових і амінокислот. Немолочні ферментовані продукти містять мікроби, які синтезують вітаміни. Шалгам – турецький ферментований напій, що складається з чорної моркви та ріпи; його резидентна мікробіота складається переважно з *Lactobacillaceae* разом з *Leuconostoc* і *Pediococcus*. Цей напій є багатим джерелом вітамінів A, B і C, а також інших мінералів і поліфенолів. Антиоксиданти виконують корисні функції в їжі та захищають

від шкідливого впливу вільних радикалів, і виробляються в ферментованих продуктах мікробними естеразами. Комбуча, ферментований підсолоджений чай, містить багато антиоксидантів, які позитивно впливають на здоров'я, включаючи антагоністичні ефекти щодо прогресування нейродегенеративних захворювань, діабету та деяких видів раку. Було показано, що багато інших ферментованих продуктів позитивно впливають на різні аспекти здоров'я людини, наприклад кімчі, ферментована капуста, яка здатна мати антиатерогенну дію, викликану активною сполукою 3-(4'-гідроксил-3'). ,5'-диметоксифеніл) пропіонова кислота (HDMPPA) [17].

2) Вивільнення біоактивних пептидів

Вивільнення біоактивних пептидів у результаті гідролізу білка під час ферментації досліджувалося багатьма групами. Добре вивчений приклад вивільнення біоактивних пептидів як наслідок катаболізму білка включає пептиди, що інгібують ангіотензин-1-перетворюючий фермент (АПФ), групу пептидів зі здатністю знижувати артеріальну гіпертензію [16]. LAB як молочних, так і немолочних джерел можуть виробляти АПФ-інгібуючі пептиди під час бродіння молока. Вони в основному виробляються в ферментованих молочних продуктах, таких як йогурт і сир, хоча різні молекули казеїну можуть бути спрямовані залежно від використовуваних заквасок LAB. Два лактотрипептиди, ізолейцин-пролін-пролін (IPP) і валін-пролін-пролін (VPP), які не перетравлюються і залишаються недоторканими та здатні перетинати поверхню слизової оболонки, щоб надати свої антигіпертензивні переваги, привернули велику увагу. Наприклад, в одному дослідженні щурів зі спонтанною гіпертензією годували кисломолочним напоєм, що містив штам *Lactobacillus helveticus*, вид, відомий своєю здатністю вивільняти АПФ-інгібіторні пептиди з молочного білка, що значно знижувало артеріальний тиск порівняно з контролем. Випробування на людях також дали обнадійливі результати. Мета-аналіз опублікованої літератури про випробування втручання на людях підтвердив ефективність IPP та VPP, у тому числі у функціональних харчових продуктах; Пацієнти

азіатського походження, зокрема, повідомляли про зниження артеріального тиску, яке, здавалося, не залежало від віку, дози лактотрипептиду, тривалості лікування або початкових показників артеріального тиску на рівні, який був статистично значущим. АПФ-інгібіторні пептиди були виявлені в немолочних продуктах, таких як ферментовані м'ясні ковбаси, виготовлені з використанням штамів *Latilactobacillus sakei* і *Latilactobacillus curvatus*.

3) Виробництво екзополісахариду

Багато мікроорганізмів ферментації харчових продуктів здатні виробляти високомолекулярні екзополісахариди (ЕПС) із простих цукрів, присутніх у сирому харчовому продукті. ЕПС може вироблятися видами *Zyotomonas*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* і *Streptococcus*, а також представниками родини *Lactobacillaceae*. Приклади виробництва ЕПС включають ацетан, ксантан і кефір, деякі з яких важливі з точки зору виробництва харчових продуктів. Ксантан використовується для його бажаних реологічних характеристик при додаванні до кисломолочних продуктів. З точки зору здоров'я, було виявлено, що LAB, що виробляє ЕПС, відіграє роль в імунomodуляції, яка може бути або стимулюючою, або супресивною залежно від різних факторів [18].

1.3 Молочнокисле бродіння

Молочнокисле бродіння – це тип ферментації, що використовується при приготуванні ферментованих продуктів, таких як кімчі та квашена капуста. Це відбувається так: такі продукти, як капуста, поринають у солоний розсіл у бродильному котлі. Сіль вбиває бактерії, що викликають псування продуктів, але не шкодить лактобактерії, які присутні практично скрізь, у тому числі в капусті та інших продуктах. Таким чином, після деякого замочування в цьому солоному розсолі лактобактерії починають працювати, перетворюючи вуглеводи в овочі на молочну кислоту, яка, у свою чергу, сприяє збереженню, а також надає пікантного смаку. Тофу, м'ясо, соєвий соус і навіть кетчуп, пепероні та гострий соус також виготовляються з використанням

молочнокислого бродіння. Молочна кислота утворюється з пірувату, що утворюється при гліколізі. НАД⁺ утворюється з НАДН. Цю реакцію каталізує фермент лактатдегідрогеназу. Лактобактерії готують сир із молока у вигляді цього бродіння. Під час інтенсивних тренувань, коли постачання киснем недостатньо, м'язи одержують енергію, виробляючи молочну кислоту, яка накопичується в клітинах, викликаючи втому.

1.4 Молочнокисле бродіння фруктових соків

Молочнокисле бродіння свіжих фруктових соків є недорогим і стабільним процесом, метою якого є збереження і навіть поліпшення органолептичних і поживних властивостей сирих матриць і продовження терміну їх зберігання. Окремі молочнокислі бактерії (МКБ) були оцінені під час бродіння різних фруктових соків, що в деяких випадках призвело до виробництва фруктових напоїв з покращеними поживними та сенсорними характеристиками. Засіб молочнокислих бактерій дуже цікаві з точки зору їх застосування у ферментації широкого спектру субстратів рослинного походження, таких як овочі та фруктові соки, оскільки вони мають пластичність геному, високу універсальність і гнучкість. Лактобацили мають чудовий набір ферментів, які роблять його дуже важливим і багатофункціональним у ферментації фруктових соків. Таким чином, лактобактерії мають потенціал для виробництва різноманітних біологічно активних сполук, які підвищують харчову цінність і термін зберігання кінцевого продукту. Крім того, лактобацили можуть позитивно змінювати смак фруктових соків, що призводить до збільшення вмісту бажаних летких сполук.

Перевага споживачів фруктовим сокам, нектарам і готовим соковмісним напоям зростає за останнє десятиліття в усьому світі [9]. В основному це пов'язано зі зміщенням переваг споживачів у бік більш натуральних продуктів, що містять менше хімічних консервантів або взагалі без них, а також з більшою поінформованістю споживачів про харчову цінність

харчових продуктів [10]. Зокрема, фруктові соки містять значну кількість харчових волокон, антиоксидантів, поліфенолів, мінералів та вітамінів та відповідають вимогам споживачів до здорових, смачних та практичних продуктів харчування.

З іншого боку, свіжі фруктові соки схильні до псування різними мікроорганізмами [11]. Термін зберігання свіжих фруктових соків дуже короткий і коливається від 5 до 7 днів при температурі 4°C [12]. Тому збереження фруктових соків слід контролювати шляхом додавання різних синтетичних консервантів, таких як сорбат калію та бензоат натрію [13]. Тим не менш, свіжі соки, витягнуті з фруктів, продаються в охолоджену вигляді, без консервантів і з дуже коротким терміном зберігання [14]. Однак в даний час споживачі віддають перевагу фруктовим сокам, які не містять хімічних добавок і безпечним для вживання. Молочнокисле бродіння фруктових соків здається гарною альтернативою і може задовольнити вимоги та переваги споживачів. У літературі повідомлялося про кілька досліджень, що підтверджують явний позитивний вплив на продовження терміну придатності фруктових соків за допомогою ферментації LAB. Цей вплив залежить від виду фруктового соку та його хімічного складу, застосовуваного штаму та умов ферментації та зберігання (часу, температури тощо). Молочнокисле бродіння фруктових соків може зберегти або поліпшити: життєві властивості, поживні властивості, сенсорні властивості кінцевого продукту.

Він також вважається м'яким методом консервації, який відповідає стандартам споживання свіжих напоїв із мінімальною обробкою [15]. Найбільш поширеною мікробіоцидною групою, що застосовується для молочнокислого бродіння фруктових соків, є LAB. Було проведено та опубліковано у літературі кілька досліджень, а деякі приклади представлені у табл. 1.1 з відповідними перевагами [15].

**Приклади ферментованих соків фруктових з різними штамами
молочнокислих бактерій [15]**

Фруктові соки	Штами	Основні позитивні ефекти
Сік шовковиці (<i>Morus nigra</i>)	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i>	Підвищення загальної антоціанової, фенольної, антиоксидантної активності
Гранатовий сік (<i>Punica granatum</i> L.)	<i>L. plantarum</i>	Підвищення антимікробної активності. Підвищився вміст летючих вільних жирних кислот. Кращі органолептичні властивості та склад летючих сполук.
Гранатовий сік (<i>Punica granatum</i> L.)	<i>L. plantarum</i>	Покращені сенсорні характеристики. покращена ТРС і антиоксидантна активність.
Гранатовий сік (<i>Punica granatum</i> L.)	<i>L. paracasei</i>	Покращені сенсорні характеристики. Покращена ТРС і антиоксидантна активність.
Кизил (<i>Cornus mas</i> L.)	<i>L. paracasei</i>	Покращена ТРС і антиоксидантна активність.
Яблучний сік кешью (<i>Anacardium</i> <i>occidentale</i> L.)	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. johnsonii</i>	Покращена антиоксидантна активність. Модифікація типу та вмісту фенолу. Можлива пребіотична дія фенолів на молочнокислі бактерії. Вміщені пребіотичні олігосахариди (<i>mesenteroides</i>) посилили ріст <i>L.</i> <i>johnsonii</i> .
Диня канталупа (<i>Cucumis melo</i> L.) і яблучний сік кешью (<i>Anacardium</i> <i>occidentale</i> L.)	<i>L. casei</i>	Поява нових летких сполук.
Яблучний сік	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i>	Генерація нових ароматичних сполук.

Яблучний сік	<i>L. plantarum</i>	Підвищена антиоксидантна здатність і біодоступність поліфенолів.
Сік бузини (<i>Sambucus nigra</i> L.)	<i>L. plantarum</i>	Покращений склад летючих сполук.
Сік зизифуса (<i>Ziziphus jujuba</i> Mill.)	<i>L. plantarum</i>	Покращені сенсорні функції.
Сік ноні (<i>Morinda citrifolia</i>)	<i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i>	Незначне підвищення загальної антиоксидантної активності. Інгібіторний потенціал АПФ зменшився під час ферментації. Вміст аскорбінової кислоти та антиоксидантна активність залишалися стабільними.
Журавлинний сік (<i>Vaccinium macrocarpon</i>)	<i>L. paracasei</i>	Синергічний та адитивний антибактеріальний ефект комбінації ферментованого журавлинного соку та антибіотиків.
Фруктовий сік <i>Phyllanthus emblica</i>	<i>L. paracasei</i>	Підвищений загальний вміст поліфенолів і антиоксидантна активність.
Сік зизифуса (<i>Ziziphus jujuba</i> Mill.)	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i>	Підвищений вміст флавоноїдів.
Сік кактусової груші (<i>Opuntia fcus-indica</i>)	<i>L. plantarum</i>	Поліпшення резистентності до інсуліну.

1.5 Вживання ферментованих соків та їх властивості

Фруктові та овочеві ресурси багаті, але є деякі недоліки, такі як низькі можливості зберігання та переробки та суворий продаж у свіжому вигляді. Це призводить до відходів плодоовочевої сировини, тому для вирішення зазначених проблем потрібна подальша глибока переробка. Використання технології пробіотичної ферментації для розробки ферментованих фруктових і овочевих сокових напоїв зі спеціальними поживними та оздоровчими

функціями може не тільки усунути марну витрату ресурсів, покращити смак фруктових і овочевих продуктів, але також покращити їхню оздоровчу функцію та збагатити різноманітність кольорів плодоовочевої продукції, вирішуючи проблему вузьких місць, яка обмежує розвиток галузі переробки фруктів та овочів [19].

Ферментовані молочнокислими бактеріями фруктові та овочеві соки, як різновид поживної їжі з більшим потенціалом для розвитку, можуть виробляти різноманітні амінокислоти, вітаміни, травні ферменти та інші речовини, необхідні для людського організму шляхом бродіння молочнокислих бактерій та дріжджів. Він не тільки забезпечує приємний смак і аромат, але також надає фруктовим і овочевим сокам елегантний і збалансований смак молочнокислого бродіння, сприяє засвоєнню заліза і вітаміну D, покращує засвоюваність їжі і швидкість використання кальцію, фосфору і заліза. Дослідження показали, що фруктові та овочеві соки, ферментовані молочнокислими бактеріями, мають поживні та оздоровчі функції, такі як: регуляція шлунково-кишкової флори організму, підтримка мікроекологічного балансу, регуляція імунітету, антиоксиданти, пригнічення росту пухлинних клітин і зниження активності холестерину та біологічний антагонізм *in vitro*. Комбіновані ферментовані фруктові та овочеві соки поєднують різноманітні ефекти та мають широкі ринкові перспективи. Штами для бродіння, сировина для бродіння та нові функції ферментованих фруктових і овочевих соків будуть важливими темами в розробці та дослідженні плодоовочевих продуктів у майбутньому [20].

Ферментація свіжого фруктового та овочевого соку не тільки зберігає основні поживні речовини та розщеплює токсичні сполуки, але також створює низку нових активних інгредієнтів, які є корисними для здоров'я, покращують смак їжі та, таким чином, збільшують додану цінність та використання фруктів та овочів. Опитування показує, що пробіотичні продукти займають 65% світового ринку функціональних харчових продуктів і що ферментовані фруктові та овочеві соки стали новим популярним

пробіотичним продуктом завдяки своїм значним перевагам для здоров'я та гарному смаку [21]. Останніми роками з поглибленням досліджень технології пробіотичних ферментованих плодовоовочевих продуктів збільшується кількість повідомлень про використання пробіотиків у переробці фруктових та овочевих напоїв [22, 23]. Використання технології пробіотичної біологічної ферментації в розробці поживних і функціональних ферментованих фруктових і овочевих сокових продуктів є розширенням технології глибокої переробки фруктів і овочів. Ця технологія не тільки подовжує термін зберігання фруктових і овочевих соків, але й пригнічує ріст гібридних бактерій, що призводить до кращого смаку бродіння, поживної цінності та більшої різноманітності продукту [24].

1.6 Технології ферментації для підвищення якості фруктових і овочевих соків

Ферментація є ключовим процесом біологічної трансформації, в якому мікроорганізми використовуються для отримання цінних метаболітів. Цей складний процес має потенціал для покращення безпеки, поживності, сенсорних властивостей і терміну зберігання фруктів і овочів, позиціонуючи його як просту та екологічно чисту біотехнологічну практику. Універсальність бродіння демонструється різними методами, включаючи природне бродіння, інокуляцію ендogenousними штамами та ферментацію комерційно доступними штамами, кожен з яких забезпечує різні переваги [25].

Методи, які використовуються під час бродіння, відіграють вирішальну роль у результаті процесу. Під час природного бродіння використовуються мікроорганізми, властиві сировині, тоді як у інокульовані ендogenousні штами специфічні мікроорганізми вводяться спеціально [26]. З іншого боку, можна використовувати сорти овочів та фруктів, спеціально розроблені для досягнення оптимальних результатів бродіння (див. табл. 1.2). У таблиці 1.2 описано, як кожен із методів впливає на кінцевий продукт, і надається

уявлення про нюанси впливу на смакові профілі, покращення поживності та загальну якість [27]. Досліджуючи особливості методів бродіння, створюється глибше розуміння динамічної взаємодії між мікроорганізмами та сировиною та підкреслюється важливість бродіння як трансформаційного та стійкого біотехнологічного процесу [27].

Таблиця 1.2

Збродження фруктових і овочевих соків різними способами

Метод ферментації	Інгредієнти	Ферментаційний штам	Основна особливість
Складний штам [28 – 32]	Абрикос	<i>Lactobacillus i Bifidobacterium</i>	Зразки бродіння зі змішаними штамми показали більшу кількість життєздатних бактерій після бродіння.
	Яблуко	<i>Saccharomyces cerevisiae i Lactobacillus plantarum</i>	Процес бродіння додав нові леткі компоненти, які значно покращили смак яблучного соку.
	Гранат	<i>Lactobacillus plantarum i Lactobacillus acidophilus</i>	Розчинні тверді речовини в яблучному соку зменшилися до 4,63 %, тоді як титрована кислотність зросла до 0,92 мг/мл.
	Груша	<i>Lactobacillus plantarum, Lactobacillus swiss i Lactobacillus casei</i>	Змішана ферментація <i>Lactobacillus plantarum i Lactobacillus casei</i> мала сильну здатність 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил поглинати вільні радикали
	Бергамот	Три види <i>Lactobacillus plantarum</i>	pH, глюкозу та споживання фруктози, виробництво молочної кислоти та ефект поглинання 2,2-дифеніл-1-пікрилгідрозилу бінарним бродінням значно покращилися

Ендогенна ферментація штаму [33, 34]	Чорниця	Рослинні молочнокислі бактерії, <i>Lactobacillus fermentans</i>	Рівень молочної кислоти помітно підвищувався, коли кількість життєздатних бактерій перевищувала 10,0 log КУО/мл. Загальний вміст фенолів збільшився на 7,1–85,5 %, антиоксидантна здатність <i>in vitro</i> зросла на 38,0 %.
	Томат	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Кількість життєздатних бактерій була значно вищою, ніж екзогенних штамів, а вміст аскорбінової кислоти, глутатіону та загальна антиоксидантна активність томатного соку, ферментованого ендогенними. Під час зберігання <i>Lactobacillus plantarum</i>
	Морква, квасоля та цукіні	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>micrococcus pentosus</i>	pH швидко падає, а споживання вуглеводів є високим
Один вид [35 – 37]	Яблуко	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus swiss</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> і <i>Lactobacillus acidophilus</i> показали сильну здатність перетворювати яблучну кислоту в молочну кислоту.
	Солодка картопля	<i>Bifidobacterium</i>	Розчинні харчові волокна, загальний вміст поліфенолів, органічних кислот і стабільність залишків солодкої картоплі були покращені після того, як
	Грейпфрут	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus</i>	pH бродіння значно знизився, кислотність і V _c значно підвищилися

		<i>fermentans</i>	
Природне бродіння [38]	Rosa roxburghii	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Micrococcus lactis</i>	Загальний вміст кислоти у плодово-ягідному вині було збільшено, вміст відновного цукру зменшено, а антиоксидантну здатність значно покращено.
	Червона малинова	<i>Sphingosinomonas acanthoderma</i>	Сприяти виробленню ферментів, полісахаридів та інших активних речовин
	хурма	<i>Pichia</i> та <i>Saccharomyces</i> , молочнокислі бактерії, оцтовокислі бактерії, дріжджі тощо	Активність поглинання аніонів супероксиду була значно збільшена на 20,15 %, а загальна кількість флавоноїдів і поліфенолів також значно зросла

Висновки до розділу 1

Процес ферментації відіграє важливу роль у виробництві ферментованих харчових продуктів та зброджу вальних напоїв, впливаючи як на їхні органолептичні характеристики та покращують корисний вплив продуктів на організм людини. Вибір культур для ферментації відіграє центральну роль для рівня якості продукту, який буде позитивно впливати на організм людини і бути конкурентним на ринку.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В роботі було використано яблучний сік сорту «Симеренка», апельсиновий фреш та закваски компанії VIVO та чиста культура *Lactobacillus delbrueckii*, Також використовували тест-системи ТОВ НВП «ФілісІтДіагностика» за допомогою яких визначали концентрації досліджуваних речовин (глюкози, калію, магнію, вітаміну С). Для визначення загальної кислотності використовували гідроксид натрію і фенолфталеїн. Також перевіряли органолептичні властивості.

2.1 Проведення ферментації

Ферментація проводилася в поживному середовищі на основі яблучного соку сорту «Симиренка» та внесенням 50% апельсинового фрешу. Яблучний сік та апельсиновий фреш було відфільтровано та подвійно пастеризовано при змінах температур від 90 до 20°C.

У експерименті використано закваски «Йогурт VIVO», «Vegan VIVO» та виділено чисту культуру *Lactobacillus delbrueckii*, яку використовували у подальших дослідженнях. Використовували такі варіанти:

Зразок 1: (Контроль) Яблучний сік та апельсиновий фреш (50%).

Зразок 2: У яблучний сік та апельсиновий фреш вносили закваску Йогурт, що включає в себе ряд чистих культур, а саме: *Streptococcus thermophilus* *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*

Зразок 3: У яблучний сік та апельсиновий фреш вносили закваску Веган, що включає в себе ряд чистих культур, а саме: *Streptococcus thermophilus* *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

Зразок 4: У яблучний сік та апельсиновий фреш вносили чисту культуру *Lactobacillus delbrueckii*.

Засів та бродіння проводилося в скляних колбах загальним об'ємом

250 мл. *Lactobacillus delbrueckii* культивувались протягом 48 годин при температурі 37°C у термостаті. Закваски та чисту культуру розводили фізіологічним розчином або стерильною водою та вносили у продукти, що ферментувалися у кількості 10% від робочого об'єму.

У готовий пастеризований яблучний сік вносили 50% апельсинового фрешу та 10% культур для сквашування соку наведених вище.

2.2 Методика дослідження органолептичних властивостей

Органолептичні властивості напоїв та страв впливають на споживання продуктів, оскільки вони характеризують запах, текстуру, смак, та зовнішній вигляд. Органолептичні показники дуже важливі для модифікації та поліпшенню продуктів харчування. Оцінка за допомогою людських сенсорних систем вимірює реакцію організму на подразнення, що виникають внаслідок вживання напоїв чи їжі.

В експерименті використано кількісно-описовий аналіз. Даний аналіз передбачає опитування експертів та характеристика з використанням не технічної мови. Потім була складена карта органолептичних показників.

2.3 Методика дослідження іонів калію

Визначення концентрації калію проводили турбідиметричним методом без депротейнування.

Концентрацію калію в дослідних зразках визначали за допомогою спектрофотометра. При взаємодії іонів калію з тетрафенілборатом у середовищі з лугом утворюється суспензія. Каламутність виміряна при довжині хвилі 578 нм.

Готують три пробірки для проведення аналізу за схемою, наведеною в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Приготування проб для визначення іонів калію

Речовина, мкл	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Осаджуючий агент	100	100	100
Зразок	2,5	–	–
Калібрувальний розчин калію	–	2,5	–
Дистильована вода	–	–	2,5

Розчин зразку внесли та перемішали. Пробірки інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин, потім виміряли оптичну густину за довжини хвилі 578 нм, перед цим ретельно перемішавши.

Вимірюють оптичну щільність дослідної і калібрувальної проби проти холостої проби та розраховують за формулою 2.1:

$$C = E_d / E_k \times 5 \quad (2.1)$$

5 – концентрація калію в калібрувальному розчині ммоль/л,

E_d – оптична щільність дослідної проби

E_k – оптична щільність калібрувальної проби

C – концентрація калію в дослідній пробі, ммоль/л.

2.4 Визначення концентрації глюкози глюкозооксидазним методом

Вимірювання концентрації магнію проводили за допомогою стандартних лабораторних тест-наборів (ТОВ НВП «ФілісітДіагностика», Україна). Глюкоза в присутності глюкозооксидази окислюється киснем повітря до глюконової кислоти та перекису водню, який у присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміна червоно-фіолетового забарвлення, який визначається фотометрично.

Готовили контрольні дослідні зразки згідно табл. 2.2. Розчини у пробірках ретельно перемішували і інкубували протягом 15 хв в термостаті при температурі 37°C. Після чого вимірювали оптичну щільність дослідних і

калібрувальної проби проти холостої проби. Забарвлення стійке протягом 30 хв.

Таблиця 2.2

Приготування проб для визначення глюкози

Речовина, мкл	Дослідна проба	Калібрувальна проба	Холоста проба
Зразок	1	–	–
Калібрувальний розчин	–	1	–
Фізіологічний розчин	–	–	1
Монореагент	100	100	100

Розрахунок концентрації глюкози проводили за формулою (2.2).

$$C = E_d / E_k \times KK \times 10\{(180)\} \quad (2.2)$$

де $10\{(180)\}$ – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л {мг/дкл}

E_d – оптична щільність дослідної проби

E_k – оптична щільність калібрувальної проби

C – концентрація глюкози в дослідних пробах, ммоль/л чи мг/дкл

2.5 Визначення загальної кислотності

Загальну кислотність вимірювали методом титрування. Після бродіння протягом 48 годин при температурі 37°C, відбирали по 1 мл зразку. До суспензії додавали фенолфталеїн і титрували за допомогою 0,01н розчину NaOH, до появи рожевого забарвлення. Визначали за формулою (2.3).

$$C = (V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times E) / (1000 \times V_p) \quad (2.3)$$

де C – загальна кислотність, мг/л;

V_{NaOH} – об'єм гідроксиду натрію, що пішов на титрування, мл;

N_{NaOH} – нормальність гідроксиду натрію;

V_p – об'єм проби, мл;

E – еквівалент оцтової кислоти (60,01).

2.6 Визначення концентрації магнію

Вимірювання концентрації магнію проводили за допомогою стандартних лабораторних тест-наборів (ТОВ НВП «ФілісітДіагностика», Україна).

Даний метод базується на взаємодії магнію з ксилідиловим синім в лужному середовищі. Утворюється комплекс, який визначали спектрофотометричним аналізом. Досліджувальні зразки відбирали після 48 год культивування і проводили дослідження. До 1 мл ксилідилового реагенту додавали 0,01 мл зразку як показано в табл. 2.3. Паралельно ставили дослід з холостою та калібрувальною пробєю. Після 5 хв інкубації за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 520 нм проводили вимірювання.

Таблиця 2.3

Приготування проб для проведення аналізу

Речовина, мкл	Дослідна проба	Калібрувальн а проба	Холоста проба
Ксилідиловий реагент	100	100	100
Зразок	1	–	–
Калібрувальний розчин магнію	–	1	–

Отримані результати на спектрофотометрі перераховували за допомогою формули (2.4)

$$C = E_d / E_k \times 0,823 \quad (2.4)$$

0,823 – концентрація магнію в калібрувальному розчині, ммоль/л (мг);

E_d – оптична щільність дослідної проби, одиниці оптичної щільності;

E_k – оптична щільність калібрувальної проби, одиниці оптичної щільності;

C – концентрація магнію в дослідній пробі, ммоль/л (мг).

2.7 Визначення концентрації вітаміну С

Визначення кількості вітаміну С проводили завдяки методу йодометричного титрування. При титруванні йодом кислота аскорбінова окиснюється і перетворюється на дегідроаскорбінову кислоту.

Дослідні зразки відбирали по 1 мл до та після культивування. До 1мл додавали 5мл хлористоводневої кислоти та ретельно перемішували. Обов'язково потім фільтрували через паперовий фільтр у чисту пробірку в яку додавали 500мкл 0,5%-го розчину крохмалю. Титрували 0,003н розчином йоду до зміни кольору розчину на синій. Кількість вітаміну С визначали за допомогою перерахунку за формулою (2.5).

$$M = (N \times E \times V) / 1000 \quad (2.5)$$

де N. – молярна концентрація еквівалента йоду;

E – молярна маса еквівалента аскорбінової кислоти в г, яка в даному випадку дорівнює 88 г;

V – об'єм витраченого на титрування йоду, мл;

M – маса вітаміну С в зразку.

2.8 Статистичний аналіз

Статистичні результати розраховували за допомогою у MS Excel 2020 і представлені у вигляді медіани з інтерквартильним розкидом. Для порівняння контрольних та експериментальних значень змінних однієї і тієї ж групи використовували критерій Вілкоксона. Статистично значущий рівень був на рівні $p < 0,05$.

Висновок до розділу 2

В роботі використали органолептичні методи визначення, та визначення основних показників макро- та мікроелементів використовуючи стандартні лабораторні тест-набори (ТОВ НВП «ФілісітДіагностика», Україна). Визначали концентрацію магнію за допомогою ксилідилового синього, концентрацію глюкози методом глюкозидазного визначення, аскорбінової

кислоту методом йодометричного титрування, концентрації калію турбінометричний методом та загальну кислотність титрометричним методом. А також використовували методи статистичного аналізу з використанням критерію Вілкоксона.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Для порівняння яблучного соку сорту «Смиренка» з внесенням добавки апельсинового фрешу за допомогою різних заквасок компанії VIVO (Йогурт, Веган, *Lactobacillus delbrueckii*) до та після ферментації разом з експертами порівнювали органолептичні показники, а також вимірювали кількість глюкози, калію, магнію, вітаміну С та робили аналіз на загальну кислотність. У подальших дослідженнях зразки для зручності оформили:

Зразок 1: (контрольний зразок) яблучний сік сорту «Смиренка» з внесенням добавки апельсинового фрешу (50%).

Зразок 2: яблучний сік сорту «Смиренка» з внесенням добавки апельсинового фрешу (50%) та заквашувальні культури компанії «Йогурт VIVO».

Зразок 3: яблучний сік сорту «Смиренка» з внесенням добавки апельсинового фрешу (50%) та заквашувальні культури компанії «Vegan VIVO».

Зразок 4: яблучний сік сорту «Смиренка» з внесенням добавки апельсинового фрешу (50%) та заквашувальні культури *Lactobacillus delbrueckii*.

3.1 Дослідження органолептичних властивостей

При дослідженні експертами, та їх оцінці і реакції на подразники, завдяки людській сенсорній системі, було визначено органолептичні показники досліджуваних зразків (табл. 3.1), а саме: запах, зовнішній вигляд, загальну насиченість, кислість, солодкість, солоність, гіркоту.

Таблиця 3.1

Загальні дані органолептичних показників досліджуваних зразків

№	Органолептичні показники	Середні показники оцінки експертів за 10-бальною шкалою			
		Зразок № 1	Зразок № 2	Зразок № 3	Зразок № 4
1	Запах	7	6,2	9	6,8
2	Зовнішній вигляд	8	9,4	9,4	8
3	Загальна насиченість	7,2	8	9,4	8,4
4	Кислотність	9,2	8,4	5,8	5,2
5	Солодкість	2,8	8,6	7,6	4,4
6	Солоність	1,4	0,4	0,2	0,4
7	Гіркота	3,8	0	0	0

В табл. 3.1 вказані середні значення оцінок експертів за 10-бальною шкалою. Для кращого сприйняття і аналізу усіх показників приймаємо значення контролю за 100% і перераховуємо дані показники відповідно контролю. Тому, у табл. 3.2 представлені результати органолептичних показників ферментованого яблучного соку «Симиренка» з апельсиновим фрешем у відсотках по відношенню до контролю.

Таблиця 3.2

Загальні дані органолептичних показників досліджуваних зразків у відсотках у порівнянні з контролем.

№	Органолептичні показники	Середні показники оцінки експертів за 10-бальною шкалою у %			
		Зразок № 1	Зразок № 2	Зразок № 3	Зразок № 4
1	Запах	100	+22%	+28,5%	-3%
2	Зовнішній вигляд	100	+17,5%	+17,5%	+/-0%

3	Загальна насиченість	100	+11%	+30,5%	+16,6%
4	Кислість	100	-9.5%	-37%	-76.9%
5	Солодкість	100	+207%	+171%	+57%
6	Солоність	100	-250%	-600%	-250%
7	Гіркота	100	0%	0%	0%

Аналізуючи табл. 3.2 можемо описати органолептичні показники контролю з яким будемо порівнювати органолептичні показники досліджуваних зразків.

Зразок 1. Суміш яблучного соку «Симиренка» з внесенням 50% апельсинового фрешу до ферментації. Дані першого зразка брали за контроль, тому вважаємо ці показники за 100%. Проаналізувавши отримані дані від експертів можемо зробити висновок, що:

- 1) Має яблучну та цитрусову пахучість вище середнього.
- 2) Гарний зовнішній вигляд, який приємний для людського ока.
- 3) Насиченість вище середнього.
- 4) Завдяки кислому сорту яблук та цитрусовому фрешу, кислість дуже висока.
- 5) Присутня легка солоність.
- 6) Солодкість нижче середнього.
- 7) Гіркота даного напою нижче середнього.

Аналіз *зразка 2* з внесенням закваски «Vegan VIVO» показав, що збільшилися показники стійкості та пахучості напою на 28,5%, поліпшення зовнішнього вигляду на 17,5%, насиченість на 30,5%, солодкість збільшилась майже вдвічі і фіксували повне зникання гіркоти з напою. Також слід зазначити, що у 6 разів зменшилась солоність напою та знизилась на 37% кислість.

Дослідивши *зразок 3*, в який додавали закваску «Йогурт VIVO» можемо сказати, що загальна насиченість збільшилась на 11%, поліпшення

зовнішнього вигляду на 17,5%, солодкість збільшилась більш ніж у 2 рази по відношенню до контролю та спостерігали повне зменшення солоності та гіркоти напою. Також спостерігали зменшення насиченості запаху на 22%, кислоті – на 9,5%

Зразок 4 характеризувався відсутністю зміни зовнішнього вигляду напою, незначним зниженням пахучості напою (3%), зменшення кислоті на 76,9%, зменшення солоності напою у 2,5 рази та повне зникнення гіркоти. Слід зазначити, що солодкість збільшилась тільки на 57% і насиченості зразка – на 16,6%.

Результати експерименту свідчать про те, що внаслідок ферментації в 48 з додаванням заквасок та чистої культури *Lactobacillus delbrueckii*, повністю зникла гіркота в досліджуваних зразках, внаслідок температури та життєдіяльності лактобактерій. В експерименті з «Vegan VIVO» та «Йогурту VIVO», поліпшився зовнішній вигляд на 17,5%. В «Йогурті VIVO» та при додаванні чистої культури *Lactobacillus delbrueckii* можливе збільшення насиченості напоїв, що кардинально впливає на смак, результати становлять від 11 до 16,6%, що не скажеш про «Vegan VIVO» там насиченість збільшилася на 30,5%.

Визначили значне зменшення кислоті досліджуваних зразків після ферментації яке збільшило солодкість напою в середньому від 207 до 250%. Майже зникла солоність відносно зразків до ферментації.

Дослідження показало, що завдяки лактобактеріям гіркота, солоність майже зникли зі зразків, а сильна кислотність продукту, замінилась на значну солодкість. Продукт став краще виглядати, але внаслідок температури та життєдіяльності мікроорганізмів стійкий яблучний та цитрусовий запах починає знижуватись.

3.2 Результати визначення вмісту глюкози у ферментованому соку

На даному етапі проводили кількісне визначення вмісту глюкози у дослідних зразках, оскільки після ферментації спостерігали значне

зменшення кількості глюкози в зразку № 2 на 21,5 % та незначне зменшення в дослідних зразках № 3 та № 4 на 1,2 % та 2,7 % відповідно.

Таблиця 3.3

**Концентрація глюкози в досліджуваних зразках
до та після ферментації**

№	Досліджувальні зразки	Концентрація глюкози, ммоль/л	
		до ферментації	після ферментації
1	Зразок № 1	18,6	18,6
2	Зразок № 2	18,9	35,6
3	Зразок № 3	17,3	27,5
4	Зразок № 4	17,3	25,3

$p < 0.05$

Аналізуючи отримані результати можемо сказати, що у зразках № 3 «Vegan VIVO» (*Streptococcus thermophilus Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) та № 4 (*Lactobacillus delbrueckii*) значно знижувався рівень глюкози за рахунок споживання мікроорганізмами. В той же час у зразку №2 у якому використовували закваску «Йогурту VIVO» (*Streptococcus thermophilus Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium lactis*) спостерігали збільшення рівня концентрації глюкози у 2 рази. Це може свідчити про те, що бактерії здатні розчислювати складні полісахариди субстратів до глюкози.

3.3 Визначення концентрація магнію в досліджуваних зразках до та після ферментації

Рекомендована добова норма споживання магнію для дорослих становить приблизно 300 – 400 мг/добу. Швидкість всмоктування магнію в кишечнику залежить від спожитої кількості та загального рівня магнію в організмі. Поживні речовини діють узгоджено, щоб підтримувати фізіологічні функції клітин і тканин, і, отже, їх порушення регуляції може негативно вплинути на функції органів [39, 40]. Магній є четвертим за

поширеністю мінералом в організмі людини. Ця поживна речовина служить кофактором або активатором більш ніж 600 ферментів і впливає на позаклітинний рівень кальцію [41]. Магній незамінний для підтримки нормального функціонування клітин, оскільки він використовується в синтезі РНК і ДНК, підтримці рівня антиоксидантів у клітині та енергетичному обміні. Магній в організмі людини переважно знаходиться у внутрішньоклітинному просторі (40%) або в кістках і зубах (60%) [41].

Таблиця 3.4

**Концентрація магнію в досліджуваних зразках
до та після ферментації**

№	Досліджувальні зразки	Концентрація магнію, ммоль/л	
		до ферментації	після ферментації
1	Зразок № 1	0,76	0,76
2	Зразок № 2	0,78	0,98
3	Зразок № 3	0,79	0,72
4	Зразок № 4	0,79	0,77

Аналізуючи отримані результати ферментації яблучного соку «Смиренка» з додаванням 50% апельсинового фрешу з внесенням різних культур видно, що контроль (зразок № 1 та зразки № 3 «Vegan VIVO» № 4 з чистою культурою *Lactobacillus delbrueckii* мають рівень магнію однаковий і становить він близько 0,8 ммоль/л. Зразок № 2 з «Йогурт VIVO» демонструє незначне збільшення кількості магнію. Це може бути пов'язано з тим, що лактобацили та внесенні асоціації різних культур здатні до синтезу різних вітамінів та поживних речовин. Оскільки добова потреба в магнії для дорослої людини становить 12,3-14,4 ммоль, то можна рекомендувати дані продукти як функціональні харчові продукти, що містять додаткове джерело магнію для людини.

3.4 Значення вмісту іонів калію до та після ферментації

Калій є одним з електролітів мінеральних солей, які можуть проводити електричний струм, якщо вони розчинені у воді. Електроліти завжди знаходяться парами; позитивна молекула, як натрій або калій, завжди супроводжується негативною молекулою, як хлорид.

Калій тісно взаємодіє з натрієм, і разом вони відіграють величезну роль у здоров'ї кожної клітини, а також у регуляції артеріального тиску, здоров'я кісток і ризику хронічних захворювань.

Калій бере участь у підтримці водного та кислотно-лужного балансу, підтримує функцію м'язів і нервових клітин, серця, нирок і надниркових залоз [42]. У табл. 3.5 представлені результати, що демонструють зміну концентрації калію у досліджуваних зразках та контролі.

Таблиця 3.5

Концентрація іонів калію в досліджуваних зразках до та після ферментації

№	Досліджувальні зразки	Концентрація калію, ммоль/л	
		до ферментації	після ферментації
1	Зразок № 1	7,15	7,15
2	Зразок № 2	8,13	25,14
3	Зразок № 3	8,56	20,84
4	Зразок № 4	7,37	20,23

Після ферментації у дослідних зразках збільшився показник концентрації калію. В зразку № 2 з «Йогурт VIVO» кількість іонів калію збільшилась до 25,14 ммоль/л, тоді як у зразках № 3 «Vegan VIVO» № 4 з чистою культурою *Lactobacillus delbrueckii* мають рівень іонів калію майже однаковий 20,84 та 20,23 ммоль/л відповідно. Це дає можливість використовувати ці ферментовані продукти, як функціональні.

3.5 Вміст вітаміну С у ферментованому соку

Вітамін С є одним з найбезпечніших і найефективніших вітамінів антиоксидантів. Хоча він не може бути ліками від звичайної застуди, переваги вітаміну С можуть включати захист від дефіциту імунної системи, серцево-судинних захворювань, внутрішньоутробних проблем зі здоров'ям, захворювань очей і навіть зморшок на шкірі. Допустимий верхній рівень споживання (або максимальна кількість, яку ви можете прийняти в день, яке, ймовірно, не завдасть шкоди) становить 2000 мг/добу для дорослих.

Вітамін С, також відомий як аскорбінова кислота, необхідний для росту, розвитку та відновлення всіх тканин організму. Він бере участь у багатьох функціях організму, включаючи утворення колагену, засвоєння заліза, правильне функціонування імунної системи, загоєння ран і підтримку хрящів, кісток і зубів.

Таблиця 3.6

Концентрація аскорбінової кислоти в досліджуваних зразках до та після ферментації

Досліджувальні зразки	Вітамін С мг/л	
	до ферментації	після ферментації
Зразок № 1	0,35	0,30
Зразок № 2	0,35	0,45
Зразок № 3	0,33	0,42
Зразок № 4	0,32	0,39

Середньодобова рекомендована кількість вітаміну С становить 90 мг, то слід зазначити, що соки не мають достатнього рівня вітаміну С для забезпечення добової потреби дорослої людини. Але дані ферментовані продукти можуть бути додатковим джерелом аскорбінової кислоти для дорослої людини, оскільки вона дуже важлива у окисно-відновних реакціях організму.

Але після ферментації значної зміни концентрації вітаміну у зразках не виявлено, концентрація від 0,35 до 0,45 мг/л.

3.6 Результати визначення загальної кислотності ферментованого соку

В даному дослідженні використовували закваски № 2 «Йогурту VIVO» (*S. thermophilus* *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *B. lactis*), № 3 «Vegan VIVO» (*S. thermophilus* *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) та № 4 (*L. delbrueckii*) які містили молочнокислі бактерії, які здатні перетворювати цукри, такі як глюкоза і фруктоза, в молочну кислоту шляхом ферментації. Це сприяє формуванню кислого смаку соку, знижуючи рівень рН. У табл. 3.6 представлені результати загальної кислотності у ферментованих продуктах.

Таблиця 3.6

Концентрація загальної кислотності в досліджуваних зразках до та після ферментації

№	Досліджувальні зразки	Загальна кислотність, мг/л	
		до ферментації	після ферментації
1	Зразок № 1	0,015	0,014
2	Зразок № 2	0,015	0,011
3	Зразок № 3	0,014	0,038
4	Зразок № 4	0,014	0,046

За результатами загальної кислотності видно, що зразки № 3 та № 4 як і у табл. 3.1 мають вищу кислотність у порівнянні з контролем. Це може бути пов'язано з переважною кількістю молочнокислих бактерій, що мають гетеро- та гомоферментативне бродіння і синтезують органічні кислоти.

Висновок до розділу 3

Проаналізувавши отримані ферментовані продукти з яблучного соку з внесенням 50% апельсинового фрешу з додаванням різних заквашувальних культур мікроорганізмів № 2 «Йогурту VIVO» (*S. thermophilus* *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *B. lactis*), № 3 «Vegan VIVO» (*S. thermophilus* *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) та № 4 (*L. delbrueckii*) можна зробити висновок, що всі ферментовані зразки мають прийнятні органолептичні показники та зберігають свої основні мікро- та макроелементи у кількості, що не зашкодить здоров'ю людині і може використовуватися у якості ферментованих функціональних харчових продуктів.

ВИСНОВКИ

Дослідження показало, що завдяки присутнім молочнокислим бактеріям заквасок гіркота, солоність ферментованого яблучного соку «Симиренка» з додаванням 50% апельсинового фрешу майже зникли з усіх зразків, а сильна кислість продукту, замінилась на значну солодкість. Продукт став краще виглядати, але внаслідок температури та життєдіяльності мікроорганізмів стійкий яблучний та цитрусовий запах починає знижуватись.

Значно знижувався рівень глюкози за рахунок споживання мікроорганізмами у зразку № 3 «Vegan VIVO» (*Streptococcus thermophilus Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) та № 4 (*Lactobacillus delbrueckii*) значно знижувався рівень глюкози за рахунок споживання мікроорганізмами. В той же час у зразку №2 у якому використовували закваску «Йогурту VIVO» (*Streptococcus thermophilus Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) спостерігали збільшення рівня концентрації глюкози у 2 рази. Це може свідчити про те, що бактерії здатні розчислювати складні полісахариди субстратів до глюкози.

Аналізуючи отримані результати ферментації яблучного соку «Симиренка» з додаванням 50% апельсинового фрешу з внесенням різних культур видно, що усі зразки № 3 «Vegan VIVO» № 4 з чистою культурою *Lactobacillus delbrueckii* мають рівень магнію однаковий і становить він близько 0,8 ммоль/л. Зразок № 2 з «Йогурт VIVO» демонструє незначне збільшення кількості магнію 0,98 ммоль/л. Після ферментації у усіх дослідних зразках збільшився показник концентрації іонів калію і становив 20,23 – 25,14 ммоль/л. Тоді як після ферментації значної зміни концентрації вітаміну С у досліджуваних зразках не виявлено. Концентрація вітаміну С становить в межах 0,35 ÷ 0,45 мг/л.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Macori, G.; Коттер, П. Д. A new understanding of the microbiology of fermented dairy products. *Curr. Opinion Biotechnology*. 2018, 49, 172–178.
2. Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligné B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., et al. Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017; 44:94–102. doi: 10.1016/j.copbio.2016.11.010.
3. Rezac S., Kok C.R., Heermann M., Hutkins R. Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1785. doi: 10.3389/fmicb.2018.01785.
4. Zhang C., Derrien M., Levenez F., Brazeilles R., Ballal S.A., Kim J., Degivry M.-C., Quéré G., Garault P., Vlieg J.E.T.V.H., et al. Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes. *ISME J.* 2016; 10:2235–2245. doi: 10.1038/ismej.2016.13.
5. Panitsa, A.; Petsi, T.; Kandyli, P.; Kanellaki, M.; Koutinas, A.A. Tubular Cellulose from Orange Juice By-Products as Carrier of Chemical Preservatives; Delivery Kinetics and Microbial Stability of Orange Juice. *Foods* 2021, 10, 1882
6. Pessione E., Cirrincione S. Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Front. Microbiol.* 2016;7:74. doi: 10.3389/fmicb.2016.00876..
7. Salazar N., Gueimonde M., de Los Reyes-Gavilan C.G., Ruas-Madiedo P. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2016;56:1440–1453. doi: 10.1080/10408398.2013.770728.
8. Tamang, J.P., Holzapfel, W.H., Shin, D.H., Felice, G.E. Editorial: Microbiology of ethnic fermented products and alcoholic beverages of the world. *Front. microbiol.* 2017. Issue 8. P. 1377.
9. Lactic acid fruit or vegetable juices: past, present and future / C. Garcia et al. *Drinks* 2020. Issue 6. 8.
10. Capozzi V., Fragasso M., Romaniello R. Spontaneous fermentation of

food and potential risks to human health. *Fermentation*. 2017. Issue 3. P. 49.

11. Swain MR, Anandharaj M, Ray RS, Rani RP. Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics. *Biotechnology. res. International* 2014. R. 25-42.

12. Potential use of four types of tropical fruits in lactic acid fermentation / Maldonado R.R. et al. *LWT*. 2017. Issue 86. P. 254-260.

13. Apple fermented products: A review of technology, properties and health effects / R. P. F. Guiné et al. *Processes* 2021. Vol. 9. 223.

14. Effect of apple variety on cloudy apple juice fermented with a mixture of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* / W. Peng et al. *Food chemistry*. 2020. Issue 340. 127922

15. Advancements in the Use of Fermented Fruit Juices by Lactic Acid Bacteria as Functional Foods: Prospects and Challenges of *Lactiplantibacillus (Lpb.) plantarum* subsp. *plantarum* Application/ *Fermentation* 2022 <https://doi.org/10.3390/fermentation8010006>

16. Chabuk, B.; Noseworthy, M.G.; Stone, A. K.; Korber, D.R.; Tanaka, T.; House, J.D.; Nickerson, M. T. Effect of fermentation on protein digestibility and non-nutritive compound levels of pea protein concentrate

17. Hanlier, N.; Gekchen, B.B.; Sezgin, AC Health benefits of fermented foods. *Crete. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017, 59, 506–527.

18. Bashali, A.; Tsakalidou, E.; Kiriakou, A.; Karavasiloglu, N.; Matalas, A. L. Traditional low-alcohol and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a forgotten food group. *Nutr. res.* 2017, 30, 1–24.

19. Takeda, S.; Matsufuji, H.; Nakade, K.; Takenoyama, S.I.; Ahmed, A.; Sakata, R.; Kawahara, S.; Muguruma, M. Investigation of lactic acid bacteria strains for meat fermentation and antioxidant and inhibitory activities of angiotensin-I converting product. *Anime of science J.* 2017, 88, 507–516.

20. Žuntar I., Petric Z., Bursać Kovačević D., Putnik P. Safety of probiotics: functional fruit drinks and nutraceuticals. *Food*. 2020 year; 9 (7):947.

21. Garcia K., Guerin M., Suidi K., Remise F. "Lactic acid fruit or vegetable

juices: the past. Drinks "Present and Future". 2020 year; 6, No. 1:8. doi: 10.3390/beverages6010008.

22. Küçükgöz K., Trzaskowska M. Non-dairy probiotic products: functional products that require more attention. *Nutrients* 14. 2022; there is no 4:753. doi: 10.3390/nu14040753.

23. Mojikon FD, Kasimin ME, Molujin AM, Gansau JA, Jawan R. Probiotic nutritional fruit and vegetable juices: an alternative to dairy-based probiotic functional products. *Nutrients*. 2022; 14 (17):3457.

24. Žuntar I., Petric Z., Bursać Kovačević D., Putnik P. Safety of probiotics: functional fruit drinks and nutraceuticals. *Food*. 2020 year; 9 (7):947.

25. Kichorovski P., Kichorovska B., Samolinska V., Shmigelskii M., Vinyarska-Miechan A. Effect of fermentation of selected vegetables on nutrients, minerals and biocomponents in human and animal nutrition. *Sci Rep*. 2022; 12 (1):13422.

26. Skowron K., Budzyńska A., Grudlewska-Buda K., Wiktorczyk-Kapischke N., Andrzejewska M., Wałęcka-Zacharska E., Gospodarek-Komkowska E. Two Faces of Fermented Foods-The Benefits and Threats of Its Consumption. *Front Microbiol*. 2022; 7 (13)

27. Sharma R, Garg P, Kumar P, Bhatia SK, Kulshrestha S. Microbial fermentation and its role in improving the quality of fermented foods. *Fermentation*. 2020 year; 6:106. doi: 10.3390/fermentation6040106.

28. Sun W., Shahrajabian MH, Lin M. Research on advanced fermented functional food products and protein factory - microbial fermentation technology. *Fermentation*. 2022; 8 :688. doi: 10.3390/fermentation8120688.

29. Bujna E., Farkas NA, Tran AM, Dam MS, Nguyen QD. Lactic acid fermentation of apricot juice by mono- and mixed cultures of probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Food Sci Biotechnol*. 2017 year; 27 (2):547–554.

30. Chen L, Wang L, Shu G, Yuan J, Zhang J, Qin S, Li J. Improved antihypertensive potential of fermented pomegranate juice: contribution of

biotransformation of phenolic compounds and mechanism of angiotensin-I-converting enzyme inhibition. *Food chemistry*. March 15, 2023; 404 (Pt B): 134745. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134745. Epub 2022, October 29. PMID: 36444086.

31. Chen X., Lin M., Lujun Hu, Teng Xu, Xiong D., Li Li, Zhao Z. Study of the effect of simultaneous and sequential fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* on the antioxidant activity and taste of apple cider. *Fermentation*. 2023; 9, № 2 :102. doi: 10.3390/fermentation9020102.

32. Sharma R, Diwan B, Singh BP. etc. Probiotic fermentation of polyphenols: potential sources of new functional food products. *Food production process and Nutr*. 2022; 4:21 . doi: 10.1186/s43014-022-00101-4.

33. Hashemi, Seyed Mohammad Bagher and others. "Fermentation of sarshir (kaimak) with lactic acid bacteria: antibacterial activity, antioxidant properties, oxidation of lipids and proteins and fatty acid profile". *Journal of the science of food and agriculture* 97 13 (2017): 4595-4603 .

34. Wang L., Zhang H., Lei H. Phenolic profile, antioxidant activity and flavor volatiles of pear juice: effect of lactic acid fermentation using three *Lactobacillus* strains in monoculture and binary mixture. *Food*. 2021 year; 11 (1):11.

35. Luan X., Feng M., Sun J. Вплив *Lactobacillus plantarum* on antioxidant activity in fermented sausages. *Food Res Int*. 2021 year; 144 doi: 10.1016/j.foodres.2021.110351. Epub 2021, 23 March PMID: 34053544.

36. Wispen S., Somsong P., Santivarangkna C., Tiyyayon P., Chathiran W., Matthews KR, Srichamnong W. Changes in Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Chemical Properties of Pickled Tea Fermentation By-Product: Prospective Waste Management and Value Added Product. *Fermentation*. 2022; 8, № 10 :472. doi: 10.3390/fermentation8100472.

37. Yao D., Xu L., Wang C. Microbial community diversity and antioxidant activity during red raspberry enzyme fermentation. *Food Sci Nutr*. 2020 year; 9 (1): 99–110.

38. Ruan W., Liu J., Li P., Zhao W., Zhang A., Liu S., Wang Z., Liu J. Dynamics of microbial communities, taste and physicochemical properties during fermentation of zizypus in vinegar: correlation between microorganisms and metabolites. *Food*.2022; 11, № 21 :3334. doi: 10.3390/foods11213334.

39. Brown R.B., Razzak M.S. Phosphate toxicity and tumorigenesis. *Biochem. biophys. Acta Rev. Cancer*. 2018 pik; 1869 :303-309. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.04.007.

40. Krem S, Razzak MS. Dietary phosphate toxicity: an emerging global health problem. *Histochem. Cell Biol*. 2018 doi: 10.1007/s00418-018-1711-8.

41. Al-Alavi A.M., Majoni S.V., Falhammar H. Magnesium and human health: perspectives and research directions. *International J. Endocrinol*.2018 year :9041694. doi: 10.1155/2018/9041694.

42. Burnier M. Should we eat more potassium to better control blood pressure in hypertension? *Nephrol Dial Transplant*. 2019 Feb 1;34(2):184-193.

43. Bettina Moritz, Ariana E. Schmitz, Ana Lucia S. Rodríguez, Alcir L. Dafre, Mauricio P. Cunha, The Role of Vitamin C in Stress-Related Disorders, *Journal of Food Biochemistry*, Volume 85, November 2020,



VI Всеукраїнська науково-практична конференція

"Стан і перспективи розвитку хімічної, харчової та парфумерно-косметичної галузей промисловості"



31 травня 2024 року
м. Хмельницький



МІНІСТЕРСТВО
ОСВІТИ І НАУКИ
УКРАЇНИ



ХНТУ

ХЕРСОНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА ХІМІЧНИХ ТЕХНОЛОГІЙ, ЕКСПЕРТИЗИ ТА БЕЗПЕКИ ХАРЧОВОЇ ПРОДУКЦІЇ

СЕРТИФІКАТ

ПІДТВЕРДЖУЄ УЧАСТЬ

Моріна Володимира Володимировича

В VI ВСЕУКРАЇНСЬКІЙ НАУКОВО-ПРАКТИЧНІЙ КОНФЕРЕНЦІЇ "СТАН І ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ ХІМІЧНОЇ, ХАРЧОВОЇ ТА ПАРФУМЕРНО-КОСМЕТИЧНОЇ ГАЛУЗЕЙ ПРОМИСЛОВОСТІ"

М. ХЕРСОН
М. ХМЕЛЬНИЦЬКИЙ
31 ТРАВНЯ 2024 РОКУ



ректор ХНТУ, д.т.н., професор
Олена ЧЕПЕЛЮК



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

**Освіта для сталого майбутнього:
екологічні, технологічні, економічні
і соціокультурні питання**

Колективна монографія

Київ 2024

ДОСЛІДЖЕННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ВИКОРИСТАННЯ ДРІЖДЖІВ ДЛЯ СИНТЕЗУ НАНОЧАСТОК МЕТАЛІВ

О. О. ЛУЦІЙ, М. В. МАКАРЕНКО, В. В. МОРИН, І. О. ГРЕЦЬКИЙ,
О. А. ШИДЛОВСЬКА

Київський національний університет технологій та дизайну, вул. Мала
Шияновська, 2, Київ, 01011, olgashydlovska@gmail.com

Зелений синтез наночастинок металів є надзвичайно перспективним, оскільки є економічно-вигідним та безпечним способом отримання ефективних агентів з яскравою біологічною дією. В роботі було проведено підбір ресурсу для синтезу наночастинок та проведено експериментальний біогенний синтез наночастинок срібла для встановлення найкращого варіанту. Таким чином, найкращими властивостями для синтезу наночастинок срібла володіє штам дріжджів *S. cerevisiae* 530. Використання супернатанту або лізату дозволяє регулювати розмір наночастинок та біологічні властивості, що полягають в ефективній антибактеріальній дії проти *E. coli* та ефективній стимуляції росту бактерії *L. delbrueckii*. Отримані результати є перспективними для подальшого вивчення та розробки комплексних антибіотичних препаратів.

1 Вступ

Синтез наночастинок металів є ключовим аспектом наукових досліджень та промислового застосування у різних галузях, включаючи каталіз, медицину та електроніку. Останнім часом зелений синтез наночастинок металів став популярним напрямком досліджень, оскільки він відзначається низьким впливом на довкілля і пропонує кілька переваг порівняно з хімічним та фізичним синтезом.

Однією з найважливіших переваг зеленого синтезу наночастинок металів є його екологічна безпека. У порівнянні з традиційним хімічним синтезом, зелений синтез вимагає меншої кількості шкідливих хімічних речовин і забруднюючих викидів. Зелені методи використовують біоресурси або нейтральні речовини, що робить їх більш прийнятними для навколишнього середовища [1].

Зелений синтез наночастинок металів надає більшу вибірковість та можливість регулювання розміру частинок. В останні роки розроблено численні методи, які дозволяють контролювати розмір та розподіл наночастинок. Ця властивість є критично важливою для налаштування властивостей наночастинок з метою їх застосування в конкретних сферах.

Зелений синтез наночасток металів може призводити до формування частинок з особливими функціональними властивостями, що дозволяють їх застосовувати в різних галузях, таких як каталіз, сенсорика, медицина і наноелектроніка [2].

Зелений синтез може бути ефективнішим та економічно вигіднішим в порівнянні з хімічним або фізичним синтезом, оскільки він може значно знизити витрати на сировину та енергію. Застосування біоресурсів та м'яких умов синтезу може зменшити витрати виробництва [3].

Наночастки срібла привертають значну увагу у наукових та медичних дослідженнях завдяки своїм унікальним властивостям та потенційному застосуванню в біологічних системах. Наночастки срібла відзначаються високою активністю проти бактерій, вірусів та грибків, що робить їх об'єктом досліджень у сферах антимікробних застосувань. Зелений синтез наночасток срібла з біоресурсів може покращити їх біологічні властивості, зменшуючи токсичність та підвищуючи ефективність. Зелений синтез наночасток срібла дозволяє знизити їхню токсичність шляхом оптимізації умов синтезу та використання біоресурсів. Це робить їх більш прийнятними для біологічних систем і підвищує їх безпеку в медичних застосуваннях [4].

Наночастки срібла можуть бути використані для доставки лікарських засобів в конкретні місця в організмі. Зелений синтез дозволяє контролювати розмір та форму наночасток, що покращує їхню здатність до призначеної доставки лікарських препаратів [5]. Наночастки срібла можуть бути використані для покращення методів діагностики та зображення в медицині. Вони можуть функціонувати як контрастні агенти для позитронно-емісійної томографії (ПЕТ), магнітно-резонансної томографії (МРТ) та інших методів [6].

Зелений синтез наночасток срібла відкриває широкий спектр перспектив для біологічних досліджень та медичних застосувань. Ці наночастки демонструють антимікробні властивості, можуть бути

використані для доставки лікарських засобів, покращити методи діагностики та зображення та знизити токсичність. Це робить їх важливим об'єктом досліджень і розвитку в галузі біології та медицини.

Враховуючи актуальність зеленого синтезу наночасток металів, метою нашої роботи було підібрати об'єкт та ресурс для синтезу наночасток металів.

2 Матеріали і методи

2.1 Дослідження цитотоксичності солей металів на культурі клітин дріжджів *Saccharomyces sp.*

Перед плануванням зеленого синтезу наночасток провели дослідження по толерантності можливих біологічних агентів для зеленого синтезу до вихідних солей металів. Для цього, на культурах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* 530 та *Saccharomyces cerevisiae* 1995 проаналізували цитотоксичність солей AgNO_3 та CuSO_4 в концентраціях від 0,001мМ до 10мМ. Для цього, приготували серійні розведення солей в 96-лунковому планшеті, після чого внесли до них відповідну денну культуру дріжджів, вирощену на бульйоні Сабуро (ТОВ «Фармактив», Україна), в концентрації, що відповідає 0,1ОД. Після цього інкубували 24 год при 28°C. Далі, проводили аналіз життєздатності живих клітин дріжджів за допомогою тесту із резазурином. До культур дріжджових клітин вносили по 50 мкл розчину резазуринату натрію для досягнення кінцевої концентрації 0,01%. Планшети інкубували при 37°C протягом 20 хвилин. Після цього, проводили спектроскопічні дослідження на планшетному рідері з вертикальним променем (Thermo Labsystems, Вантаа, Фінляндія) при довжинах хвиль 570 нм та 620 нм. Для оцінки цитотоксичної дії металів приймали контроль дріжджових клітин (до відповідних лунок була внесена дистильована вода замість розчину солі) за 100%. Всі дослідження були проведені у трьох повторностях, дані усереднені за допомогою медіани, похибка представляє собою

інтерквартильний розкид. Для перевірки нульової гіпотези застосовували т-критерій Вілкоксона.

2.2 Зелений синтез наночасток металів срібла та міді

Для проведення зеленого синтезу наночасток використовували сіль AgNO_3 . Біологічний матеріал був підготовлений наступним чином. В колбах з бульйоном Сабуро вносили добову культуру дріжджів (*S. cerevisiae* 530 або *S. cerevisiae* 1995) в концентрації, що відповідає 0,1 ОД. При 28°C проводили вирощування бульйонних культур при постійному перемішуванні 180 об/хв протягом 4 діб. Після інкубації відділяли надосад від біомаси за допомогою центрифугування при 3 тис. об/хв протягом 30 хвилин. Отримані надосад і біомасу використовували в якості біологічного агенту для синтезу наночасток срібла та міді. До надосаду додавали суху сіль AgNO_3 та розчиняли її для досягнення кінцевої концентрації у 100 мМ. Для біомаси готували 100 мМ розчин солі AgNO_3 на дистильованій воді, до якого додавали біомасу відповідного штаму дріжджів для отримання лізату. Після цього інкубували зразки при 37° C та 180 об/хв протягом 4 діб. Утворення наночасток аналізували візуально по зміні кольору реакційної суміші: розчин з наночастками срібла змінювався на червонувато-коричневий, а розчин з наночастками міді – на зеленувато-блакитний.

Після проведення ферментації отримані розчини з наночастками очищували за допомогою центрифугування при 3 тис. об/хв протягом 30 хвилин та стерилізації через мікрофільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Отримані очищені розчини використовували для подальших досліджень.

2.3 Визначення розмірів синтезованих наночасток методом динамічного розсіювання світла

Отримані золі наночасток були проаналізовані з використанням Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical, Великобританія) для визначення розмірів методом динамічного розсіювання світла (DLS).

2.4 Дослідження антибактеріальної дії синтезованих наночасток срібла

Для визначення антибактеріальної дії наночасток срібла використовували референтний штам *Escherichia coli* K12 та штам нормофлори людини *Lactobacillus delbrueckii*. Визначення антибактеріальної дії наночасток срібла проводили за наступною схемою. Для отриманих наночасток проводили серійні 10-кратні розведення таким чином, щоб кінцева концентрація досліджуваних зразків становила від 0,1 до 10,0 мМ. Розведення наночасток проводили в 96-лунковому планшеті на середовища NB (ТОВ «Фармактив», Україна). До отриманих розведень вносили відповідні бактеріальні культури в кінцевій концентрації, що відповідає 0,1 ОД. Планшети інкубували при 37°C протягом доби. Після цього визначали життєздатність бактеріальних клітин за допомогою тесту з резазуринатом. До культур бактеріальних клітин вносили по 50 мкл розчину резазуринату натрію для досягнення кінцевої концентрації 0,01%. Планшети інкубували при 37°C протягом 20 хвилин. Після цього, проводили спектроскопічні дослідження на планшетному рідері з вертикальним променем (Thermo Labsystems, Вантаа, Фінляндія) при довжинах хвиль 570 нм та 620 нм. Для оцінки антибактеріальної дії наночасток приймали контроль відповідного штаму бактеріальної культури (до лунок була внесена дистильована вода замість розчину наночасток) за 100%. Всі дослідження були проведені у трьох повторностях, дані усереднені за допомогою медіани, похибка представляє собою інтерквартильний розкид. Для перевірки нульової гіпотези застосовували t-критерій Вілкоксона.

3 Результати досліджень

Першим етапом дослідження було встановлення цитотоксичності солей металів срібла та міді на культурах дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995. Результати дослідження цитотоксичності солі AgNO_3 представлення на рисунку 1.

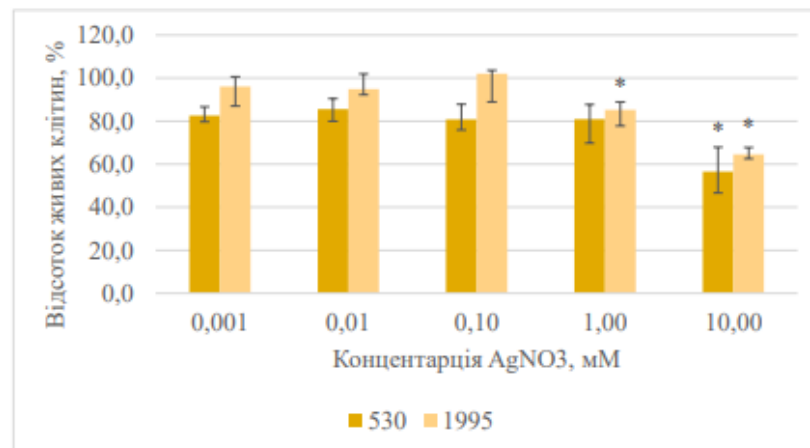


Рисунок 1 – Цитотоксичність AgNO₃ на культурах дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 (* $p \leq 0,05$)

Достовірне зниження показника відсотку живих клітин спостерігаємо в концентрації AgNO₃ 1,0 мМ для штаму *S. cerevisiae* 1995 – зниження на 19,1% ($p \leq 0,05$) в порівнянні з контролем, прийнятим за 100%. Також, в максимальній досліджуваній концентрації 10,0 мМ AgNO₃ викликає зниження життєздатності культур *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 на 44,4% та 35,5% відповідно ($p \leq 0,05$). Солі срібла, зокрема AgNO₃, відомі своєю високою токсичністю для мікроорганізмів та біологічних систем. Останні дослідження свідчать про те, що AgNO₃ може викликати відмирання дріжджів *S. cerevisiae* шляхом інгібування клітинного поділу та порушення генетичних процесів. Токсичність AgNO₃ може бути пов'язана зі змінами у структурі та функціях білків, а також іншими молекулярними подіями [7].

Сіль CuSO₄ проявила достовірне збільшення життєздатності клітин штаму *S. cerevisiae* 530 в концентраціях 0,001 мМ, 0,01 мМ та 1,0 мМ – на 2,7%, 7,3% та 4,9% відповідно (рис. 2). Даний аспект цікавий в ракурсі можливої оптимізації процесу отримання наночасток на основі біомаси дріжджових клітин.

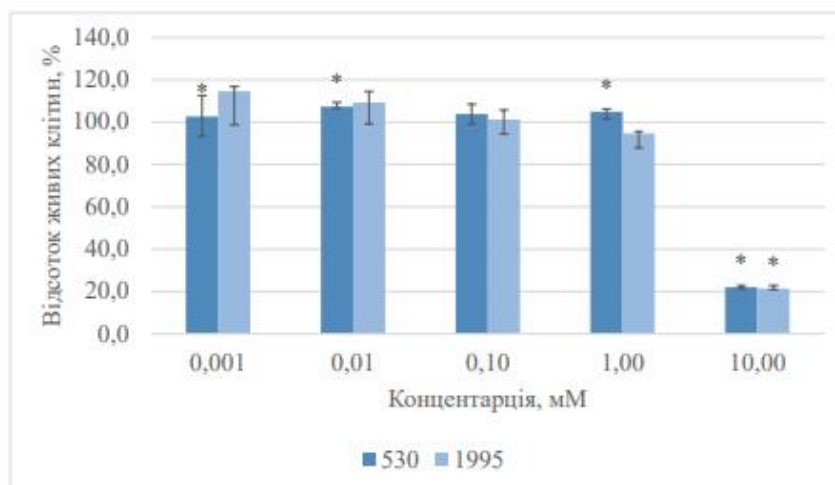


Рисунок 2 – Цитотоксичність CuSO_4 на культурах дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 (* $p \leq 0,05$)

Концентрація солі CuSO_4 10 mM проявляє значну токсичність для обох досліджених штамів дріжджів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 – зниження показника відсотку живих клітин на 78,1% та 78,6 відповідно. Загалом, у всіх досліджених концентраціях солей AgNO_3 або CuSO_4 вони не викликають значної токсичної дії на дріжджові клітини, окрім концентрації AgNO_3 або CuSO_4 10,0 mM. Солі міді, зокрема CuSO_4 , також виявляють токсичність для *S. cerevisiae*. Дослідження показали, що CuSO_4 може призводити до окислення та дисфункції білків у клітинах дріжджів [8]. Токсичність цієї солі також пов'язана з її здатністю до активної інтеракції з молекулами сірки та іншими біологічно активними сполуками [9]. Можна зробити висновок, що дані штами більше підходять для синтезу наночасток срібла. Тому подальший етап буде проводитися із використанням солі AgNO_3 .

За допомогою методу DLS було встановлено розміри отриманих наночасток. Результати вимірів представлені в таблиці 1. Найменший розмір наночастки мають у зразку, в якому для зеленого синтезу наночасток срібла використали біомасу дріжджів *S. cerevisiae* 530. Загалом,

синтезовані наночастки за допомогою *S. cerevisiae* 1995 мають більші розміри, ніж наночастки синтезовані за допомогою *S. cerevisiae* 530.

Таблиця 1 – Розміри синтезованих зеленим синтезом наночасток

штам <i>S. cerevisiae</i>	супернатант		біомаса (лізат)	
	1995	530	1995	530
	277,5±98,73	353,2±106,2	174,85±63,72	168,55±55,03

При дослідженні антибактеріальної дії на бактеріальному штамі *E. coli* отриманих наночасток було встановлено, що всі зразки володіють антибактеріальною дією на рівні контролю – розчину AgNO_3 відповідної концентрації (рис. 3). Проте, для зразків наночасток срібла, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 в концентрації 0,1 мМ, показана більша антибактеріальна дія, ніж для контролю AgNO_3 – значення на 16,7% та 36,7% менші, ніж у контролі AgNO_3 в концентрації 1 мМ.

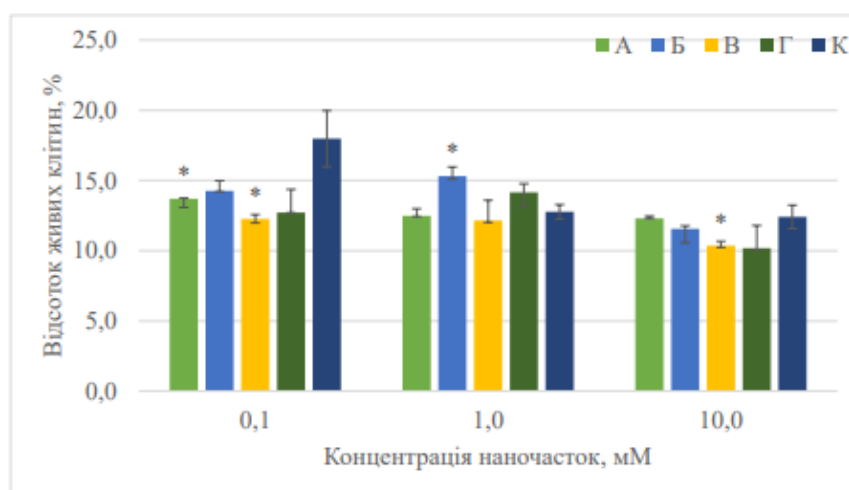


Рисунок 3 – Антибактеріальна дія наночасток, отриманих з А – супернатанту *S. cerevisiae* 530, Б – супернатанту *S. cerevisiae* 1995, В – лізату *S. cerevisiae* 530, Г – лізату *S. cerevisiae* 530 на *E. coli*. К – розчин солі AgNO_3 (* $p \leq 0,05$)

Також, для зразку наночасток, отриманих з лізату *S. cerevisiae* 530 показано зниження значення відсотку живих клітин на 16,1% в порівнянні з AgNO_3 в концентрації 10 мМ. AgNPs спричиняють зупинку клітинного

поділу у бактеріях шляхом впливу на структуру ДНК та мембранних білків [10]. AgNPs також взаємодіють з ферментами бактерій, порушуючи їхні молекулярні процеси та призводячи до інгібування росту та розмноження [11]. Генерування вільних радикалів кисню: AgNPs можуть генерувати вільні радикали кисню, які завдають пошкоджень бактеріальним мембранам та біологічним молекулам [12]. Останні дослідження вказують на ефективність AgNPs, отриманих зеленим синтезом на дріжджах *S. cerevisiae*, у боротьбі з різними видами бактерій, включаючи патогенні штами, що виявили стійкість до антибіотиків [13]. Ці дослідження відкривають перспективи використання AgNPs як антибактеріальних агентів у медицині та інших галузях.

При дослідженні антибактеріальної дії на *L. delbrueckii*, було встановлено, що всі досліджені наночастки не володіють цитотоксичною дією, навпаки, вони здатні інтенсифікувати життєздатність клітин *L. delbrueckii*. При порівнянні з контролем, AgNO_3 в концентрації 0,1 мМ, спостерігали підвищення показника живих клітин для зразків, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 та з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 1995 на 23,4%, 12,5%, 14,4% та 19,1% відповідно (рис. 4).

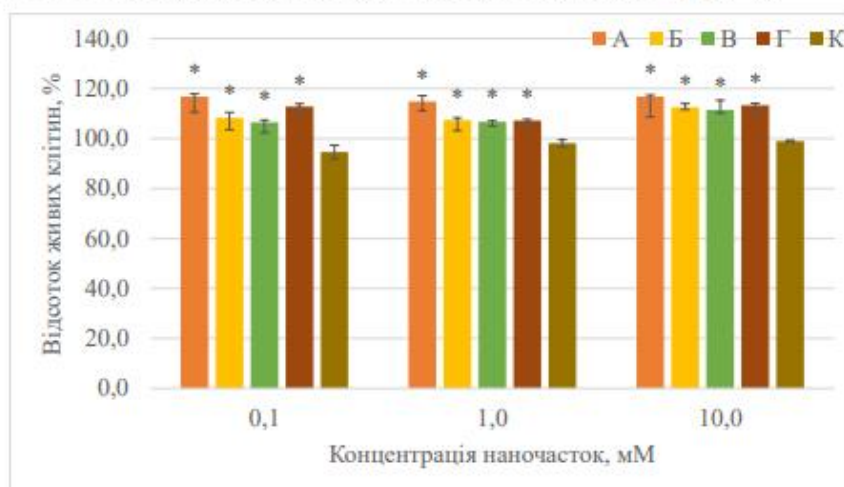


Рисунок 4 – Антибактеріальна дія наночасток, отриманих з А – супернатанту *S. cerevisiae* 530, Б – супернатанту *S. cerevisiae* 1995, В – лізату *S. cerevisiae* 530, Г – лізату *S. cerevisiae* 530 на *L. delbrueckii*. К – розчин солі AgNO_3 (* $p \leq 0,05$)

При порівнянні з контролем, AgNO_3 в концентрації 1,0 мМ, спостерігали підвищення показника живих клітин для зразків, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 та з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 1995 на 17,1%, 8,7%, 9,4% та 9,2% відповідно. При порівнянні з контролем, AgNO_3 в концентрації 10,0 мМ, спостерігали підвищення показника живих клітин для зразків, отриманих з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 та з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 1995 на 17,9%, 12,6%, 13,7% та 14,5% відповідно. Загалом, найбільший позитивний вплив на життєздатність клітин *L. delbrueckii* мають наночастки срібла, отримані з супернатанту *S. cerevisiae* 530. Подібних досліджень в науковій літературі на даний момент не існує, а тому перспектива посилення життєдіяльності бактерій нормофлори людини є надзвичайно важливою та перспективною.

Висновки

В даній роботі було проведено дослідження витривалості дріжджових клітин штамів *S. cerevisiae* 530 та *S. cerevisiae* 1995 до різних концентрацій солей AgNO_3 або CuSO_4 . Встановлено, що найкраще всього дріжджі переносять вплив солі AgNO_3 . Саме тому, було проведено синтез наночастинок срібла за допомогою двох штамів *S. cerevisiae* та в різних схемах, а саме з використанням лізату та супернатанту. Було встановлено, що найменші наночастки були отримані з використанням лізату *S. cerevisiae* 530, проте найефективнішу антибактеріальну дію проявили наночастки, отримані з супернатанту та лізату *S. cerevisiae* 530 в концентрації 0,1 мМ. Також, варто зазначити, що й позитивніший ефект щодо посилення життєздатності клітин нормофлори людини *L. delbrueckii* має зразок наночастинок, отриманий з супернатанту *S. cerevisiae* 530. Таким чином, нами було встановлено, що саме штам дріжджів *S. cerevisiae* 530 найкраще підходить для синтезу наночастинок срібла, а умови проведення біогенного синтезу можуть регулювати розмір наночастинок та їх біологічні властивості. Отримані результати можуть бути доповнені розширенням

спектром біологічним досліджень. Більше того, наночастки срібла, отримані зеленим синтезом, мають перспективи у застосування комплексної терапії бактеріальних захворювань.

Література

1. Ying, S., Guan, Z., Ofoegbu, P. C., Clubb, P., Rico, C., He, F., & Hong, J. Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. *Environmental Technology & Innovation*. 2022, 26, 102336-102356.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186422000359>
2. Pandit, C., Roy, A., Ghotekar, S., Khusro, A., Islam, M. N., Emran, T. B., Lam, S. E., Khandaker, M. U., Bradley, D. A. Biological agents for synthesis of nanoparticles and their applications. *Journal of King Saud University-Science*. 2022, 34(3), 101869-101882.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364722000507>
3. Vijayaram, S., Razafindralambo, H., Sun, Y. Z., Vasantharaj, S., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., Raeeszadeh, M. Applications of Green Synthesized Metal Nanoparticles—A Review. *Biological Trace Element Research*. 2023, 1-27. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-023-03645-9>
4. Vishwanath, R., Negi, B. Conventional and green methods of synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 2021, 4, 100205-100217.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666086521001521>
5. Gomes, H. I., Martins, C. S., Prior, J. A. Silver nanoparticles as carriers of anticancer drugs for efficient target treatment of cancer cells. *Nanomaterials*. 2021, 11(4), 964-995. <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/4/964>
6. Nadaf, S. J., Jadhav, N. R., Naikwadi, H. S., Savekar, P. L., Sapkal, I. D., Kambli, M. M., Desai, I. A. Green synthesis of gold and silver nanoparticles: Updates on research, patents, and future prospects. *OpenNano*. 2022, 100076-1000101.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235295202200038X>