

УДК 637.07

**ПЛР-СКРИНІНГ ЗАКВАШУВАЛЬНИХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ВМІСТУ
ЕСЕНЦІАЛЬНИХ НУТРИЄНТІВ У ОРГАНІЧНОМУ КИСЛОМОЛОЧНОМУ
ПРОДУКТІ**

Жукова Я. Ф., к.б.н., зав. відділу,
ДУ «Інститут охорони ґрунтів України», Київ
ORCID ID: 0000-0002-2755-5431

Петров П. І., в.о. заст. зав. відділу,
Інститут продовольчих ресурсів НААН, Київ
ORCID ID: 0000-0002-0736-3547

Даниленко С. Г., д.т.н., зав. відділу,
Інститут продовольчих ресурсів НААН, Київ
ORCID ID: 0000-0003-4470-4643

Шугай М. О., к.б.н., с.н.с.,
Інститут продовольчих ресурсів НААН, Київ
ORCID ID: 0000-0003-1844-5967

Чорна Н. А., н.с.,
Інститут продовольчих ресурсів НААН, Київ
ORCID ID: 0000-0002-2299-323X

Вакуленко М. М., н.с.
Інститут продовольчих ресурсів НААН, Київ
ORCID ID: 0000-0002-5816-6455

<https://doi.org/10.31073/foodresources2019-12-11>

Внаслідок трансформації технологій молочного тваринництва, які передбачають обмеження або повне виключення випасу худоби на пасовищах та, відповідно, суттєве збільшення частки силосу та концентрованих кормів в раціоні годівлі, молоко містить менше поліненасичених жирних кислот (ПНЖК). Збільшення частки грубих, та, особливо, зелених кормів, випас корів на пасовищі сприяють підвищенню вмісту ПНЖК, кон'югатів лінолевої кислоти (КЛК) та інших есенціальних нутрієнтів порівняно з силосно-сінажним типом годівлі. Водночас, за допомогою бактерій, яким властива здатність до синтезу КЛК, можна отримати молочні продукти, збагачені КЛК, без використання добавок КЛК, отриманих хімічним шляхом, що заборонено в органічному виробництві. Метою даної роботи було оцінювання фізико-хімічних та біохімічних параметрів органічного молока з ферм з різним типом годівлі худоби, скринінг заквашувальних культур, здатних до синтезу КЛК, дослідження впливу відібраних заквашувальних культур на ферментацію органічного молока з ферм з різним типом годівлі. Результати проведеного дослідження свідчать про те, що розроблені послідовності для ПЛР-ідентифікації здатності штамів *Lactobacillus plantarum* та *Bifidobacterium breve* до синтезу кон'югатів лінолевої кислоти дозволяють підібрати заквашувальні культури для ферментування органічного молока з метою підвищення вмісту КЛК в кисломолочному продукті. Проведене ферментування показало, що при використанні заквашувальної культури «Біфідокомплекс», до складу якої входять бактерії *Bifidobacterium breve*, здатні до синтезу КЛК, дозволило підвищити вміст КЛК в кисломолочному продукті до 0,882 відн.%, що було найвищим значенням серед усіх використаних культур та типів молока. Відношення вмісту КЛК до вмісту лінолевої кислоти, яке характеризує рівень конверсії лінолевої кислоти, у ферментованому культурою «Біфідокомплекс» молоці ОІ було на 21,3% вищим у порівнянні з заквашувальною культурою «Іпровіт» та на 12,9% у порівнянні з сумішшю

культур «Inprovit» +»Lyofast LPRA», в якій містилися бактерії *Lactobacillus plantarum*, здатні до синтезу КЛК. При ферментуванні молока О2 культурою «Біфідокомплекс» дане відношення було вищим на 17,1% та 9,5%, відповідно.

Ключові слова: заквашувальні культури, есенціальні нутрієнти, жирно кислотний склад, полімеразно-ланцюгова реакція, органічний кисломолочний продукт, ПЛР-скринінг

PCR-SCREENING OF BACTERIAL CULTURES FOR ENRICHMENT OF THE ESSENTIAL NUTRIENTS LEVEL IN ORGANIC FERMENTED DAIRY PRODUCT

Zhukova Ya., PhD, Head of Department,
DU «Institute of Soils Protection of Ukraine» Kyiv, Ukraine
ORCID ID: 0000-0002-2755-5431

Petrov P., Deputy Head of Department,
Institute of Food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine
ORCID ID: 0000-0002-0736-3547

Danylenko S., D-r of Sciences, Head of Department,
Institute of Food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine
ORCID ID: 0000-0003-4470-4643

Shugai M., PhD, Senior Researcher,
Institute of Food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine
ORCID ID: 0000-0003-1844-5967

Tshorna N., Researcher,
Institute of Food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine
ORCID ID: 0000-0002-2299-323X

Vakulenko M., Researcher,
Institute of Food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine
ORCID ID: 0000-0002-5816-6455

<https://doi.org/10.31073/foodresources2019-12-11>

The transformation of livestock farming, by reducing or eliminating grazing and significantly increasing of the proportion of silage and concentrated feed in the diet leads to decreasing of polyunsaturated fatty acids content (PUFA) in milk. The increasing in the proportion of rough feed and especially green fodder, grazing contributes to increasing of the content of PUFA, conjugates of linoleic acid (CLA) and other essential nutrients compared to the silage-haylage type of feeding. At the same time, with the help of bacteria with ability to synthesize the CLA, it is possible to obtain dairy products enriched with CLA, without the use of chemical additives, prohibited in organic production. The purpose of this work was to evaluate the physico-chemical and biochemical parameters of organic milk from farms with different types of feeding, screening of bacterial cultures capable of CLA-synthesis, and investigating the effect of selected bacterial cultures on fermentation of organic milk from farms with different types of feeding. The results of the conducted research indicate that the developed sequences for PCR-identification of the ability of strains *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium breve* to synthesize the CLA allow selected bacterial cultures for fermentation of organic milk in order to increase the CLA content in the fermented milk product. The conducted fermentation showed that using of the fermentation culture «Bifidocomplex», which contained bacteria *Bifidobacterium breve*, which are capable for the synthesis of CLA, increased the content of CLA in the fermented milk up to 0.882%, which was the highest value among all used cultures and types of milk. The ratio of the content of CLA to the content of linoleic acid, which characterizes the conversion rate of linoleic acid, in the fermented O1 milk with using of culture

«Bifidocomplex» was by 21.3% higher compared to the culture «Iprovit» and 12.9% compared with the mixture of cultures «Iprovit» + «Lyofast LPRA», which contained bacteria *Lactobacillus plantarum*, which are capable for the synthesis of CLA. During fermenting O2 milk with the culture «Bifidocomplex», this ratio was higher by 17.1% and 9.5%, respectively.

Key words: bacterial cultures, essential nutrients, fatty acid composition, polymerase chain reaction, organic fermented milk product, PCR-screening

Вступ. Інтерес до виробництва функціональних харчових продуктів, які сприяють зміцненню здоров'я, суттєво зростає протягом останніх років. Перспективним напрямком розробки таких продуктів є підвищення вмісту кон'югатів лінолевої кислоти (КЛК) – натурального компонента молочного жиру. За даними авторів [1-3], КЛК мають низку властивостей, що сприяють зміцненню здоров'я, характеризуються онкопротекторною, антидіабетичною, імуномодельною дією, запобігають серцевим захворюванням і ожирінню. З огляду на те, що лікування та профілактика даних захворювань потребують значних коштів, стає актуальним питання впровадження в повсякденне харчування продуктів, збагачених КЛК. Екстраполяція на людей результатів, отриманих на мишах, показала, що щоденне споживання близько 3,5 г КЛК може запобігти розвитку раку молочної залози [4]. Щоденне споживання від 1,8 до 3,6 г КЛК сприяє зростанню м'язової маси без збільшення жирових запасів [5].

Кон'югати лінолевої кислоти – це група геометричних та позиційних ізомерів лінолевої кислоти (C18:2n6), для якої притаманна наявність подвійного зв'язку в позиціях з 6 до 14 атому Карбону та чотири конфігурації: цис-, транс-; транс-, цис-; транс-, транс-; цис-, цис-. Поєднання конфігурації та різних позицій подвійного зв'язку формує 28 можливих ізомерів [6-7]. З огляду на те, що КЛК є і проміжним продуктом рубцевої біогідрогенації корму бактеріями у жуйних тварин, і продуктом *de novo* синтезу у молочній залозі, ці речовини завжди наявні у молоці та молочних продуктах (в діапазоні 0,34-1,07 г/100 г жиру) [8], а також яловичині (в діапазоні 0,12-0,68 г/100 г) [9]. Найбільш поширеним є ізомер C18:2n6 цис-9, транс-11, який може становити від 75% до 90% від сумарного вмісту КЛК [10].

На сьогоднішній день, внаслідок трансформації технологій молочного тваринництва, які передбачають обмеження або повне виключення випасу худоби на пасовищах та, відповідно, суттєве збільшення частки силосу та концентрованих кормів в раціоні годівлі, молоко містить менше поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) порівняно з результатами досліджень 30-річної давнини [6]. Зважаючи на те, що молоко та молочні продукти є елементом щоденного споживання для багатьох людей, зросло число досліджень, спрямованих на підвищення вмісту ПНЖК, в тому числі КЛК, шляхом коригування відповідного раціону худоби, впровадженням відповідних технологічних заходів при виробництві молочних продуктів.

Збільшення частки грубих, зелених кормів, випас корів на пасовищі сприяють підвищенню вмісту ПНЖК, та, особливо, КЛК порівняно з силосно-сінажним типом годівлі [11]. Нині, у зв'язку з економічною доцільністю, даний підхід до ведення молочного тваринництва можливий в першу чергу для органічних ферм з трав'яно-сінним типом годівлі. Молоко, отримане з таких господарств, відрізняється високим вмістом КЛК і є перспективною сировиною для виробництва молочних продуктів з підвищеною біологічною цінністю.

Водночас, існують спроби зміни жирнокислотного складу за допомогою додавання окремих жирних кислот різного походження. Бактерії, яким властива здатність до синтезу КЛК, дозволяють отримати молочні продукти, збагачені КЛК, без використання добавок КЛК, отриманих хімічним шляхом, які заборонені в органічному виробництві. Деякі молочнокислі бактерії (лакто-, біфідо-, пропіоновокислі бактерії) можуть змінювати жирнокислотний склад продукту під час його ферментації [12-13].

Слід зазначити, що обробка молока не знижує вміст КЛК [14], окрім високотемпературної пастеризації та при нагріванні до 200°C [15-16], що заборонено вимогами органічного виробництва. Залишається стабільним рівень КЛК в молоці та молочних продуктах і під час зберігання [15, 17-18].

Аналіз літературних джерел показав неоднозначний характер впливу заквашувальних культур на рівень КЛК у жировій фазі ферментованого молока – від повної відсутності ефекту до статистично достовірного підвищення, майже вдвічі (табл.1). Підвищення вмісту КЛК після ферментування молока залежить, в першу чергу, від видового та штамового складу заквашувальних культур, масової частки жиру та активної кислотності [12].

В основі синтезу КЛК бактеріями лежить процес, аналогічний біогідрогедації корму в рубці. Здатність до синтезу КЛК вперше встановлено у бактерії *Butyrivibrio fibrisolvens* – типового представника мікробіоти рубця корів [19]. Даний процес ґрунтується на токсичній для бактерій дії ПНЖК, що стимулює їх продукувати ізомерази та редуктази, які поетапно трансформують ПНЖК, серед яких більшу частину становлять лінолева (C18:2n6) та ліноленові кислоти (C18:3n3) [20-21]. Так, КЛК, а саме цис-9, транс-11 КЛК, є проміжним продуктом біогідрогедації лінолевої кислоти у вакценову (C18:2 транс-11), і в подальшому до насиченої стеаринової кислоти (C18:0) [20-22] (рис.1).

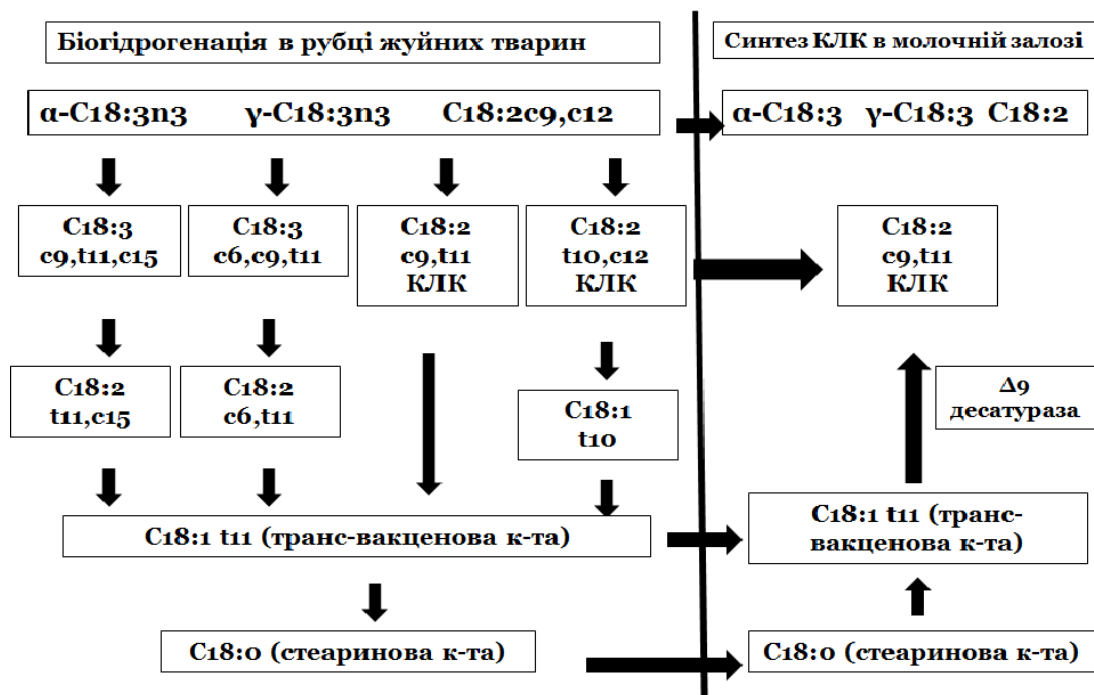


Рис.1. Шляхи біогідрогедації та ендogenous синтезу кон'югатів лінолевої кислоти в молочній залозі [23]

Подальші дослідження штаму *Butyrivibrio fibrisolvens* A38 показали, що ця облигатно анаеробна бактерія при культивуванні в середовищі з додаванням лінолевої кислоти акумулювала КЛК тоді, коли концентрація цієї кислоти була достатньо високою і інгібувала розвиток даного мікроорганізму [22].

Водночас, аналіз досліджень ферментування органічного та неорганічного молока з метою підвищення вмісту КЛК показав, що культури *L. acidophilus* та окремі штами *B. animalis* здатні статистично достовірно підвищувати їх вміст у ферментованому молоці (табл.1). Проте, дослідження здатності низки бактерій родів *Bifidobacterium* та *Lactobacillus* до конверсії лінолевої кислоти в КЛК на агарі показали, що деякі штами *Bifidobacterium breve* здатні конвертувати лінолеву кислоту в діапазоні від 19,5%

(статистично достовірно, при $p \leq 0,01$) до 53,5% (статистично недостовірно) [24], як і *Lactobacillus planntarum* (26,67%, статистично недостовірно) [25].

Таблиця 1

Результати досліджень впливу бактеріальних культур на вміст КЛК при ферментації молока різних типів господарювання

Заквашувальна культура	Тип молока	Зміни вмісту КЛК (значення в сировині/ значення в ферментованому молоці), г/100 г жиру	Джерело
Лактобактерії			
<i>Lactobacillus acidophilus</i> + стандартна йогуртна закваска*	Неорганіч не молоко	2,45/3,28**	Alkalin et al., 2007 [26]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Неорганіч не молоко	0/0,45	Xu et al., 2005 [27]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> + стандартна йогуртна закваска	Неорганіч не молоко	0/0,33	Xu et al., 2005 [27]
Біфідобактерії			
<i>Bifidobacterium animalis</i> + стандартна йогуртна закваска	Неорганіч не молоко	2,45/3,62**	Alkalin et al., 2007 [26]
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Неорганіч не молоко	0,14/0,15	Gorissen et al., 2012 [28]
<i>Bifidobacterium bifidum</i> + стандартна йогуртна закваска	Неорганіч не молоко	0,15/0,15	Gorissen et al., 2012 [28]
<i>Bifidobacterium breve</i>	Неорганіч не молоко	0,14/0,14	Gorissen et al., 2012 [28]
<i>Bifidobacterium breve</i> + стандартна йогуртна закваска	Неорганіч не молоко	0,15/0,15	Gorissen et al., 2012 [28]
<i>Bifidobacterium animalis subsp lactis</i> + стандартна йогуртна закваска	Органічне молоко	1,00/1,20**	Florence et al., 2012 [29]
<i>Bifidobacterium animalis subsp lactis</i> (штам BB12)	Органічне молоко	1,50/1,62**	Florence et al., 2012 [29]
<i>Bifidobacterium animalis subsp lactis</i> (штам HN019)	Органічне молоко	1,50/1,50	Florence et al., 2012 [30]
<i>Bifidobacterium animalis subsp lactis</i> (штам BB12)	Органічне молоко	1,18/1,87	Florence et al., 2009 [31]

* *Streptococcus thermophilus* та *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus*

**статистично достовірно ($p < 0,05$)

Метою даної роботи було оцінювання фізико-хімічних та біохімічних параметрів органічного молока з ферм з різним типом годівлі худоби, скринінг заквашувальних культур, здатних до синтезу КЛК, дослідження впливу відібраних заквашувальних культур на ферментацію органічного молока з ферм з різним типом годівлі тварин.

Матеріали та методи дослідження.

Молоко. Зразки пастеризованого органічного молока від двох виробників, сертифікованих відповідно до Council Regulation (EC) № 834/2007 та Commission Regulation (EC) № 889/2008, які відрізнялися за раціоном годівлі корів на фермах – силосно-сінажним (O1) та трав'яно-сінним (O2).

Заквашувальні культури. Для визначення здатності культур до синтезу КЛК використовували ліофілізовані заквашувальні препарати прямого внесення культур «Іпровіт» (державне дослідне підприємство ПП НААН, Україна, до складу якої входили *S. thermophilus* та *L. delbrueckii subsp.bulgaricus*), «Lyofast LPRA» («Sacco», Італія,

L. plantarum), «Симбіотик» («GoodFood», Італія; *S. thermophilus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *P. freudenreichii*), «Біфідокомплекс» («GoodFood», Італія; *S. thermophilus*, *L. acidophilus* та *Bifidobacterium*), «Lyofast SAB 440B» («Sacco», Італія, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* та *Bifidobacterium*).

Визначення здатності культур до синтезу кон'югатів лінолевої кислоти методом ПЛР. Підбір пар праймерів проводили згідно з правилами молекулярного дизайну. Для визначення наявності культур *B. breve*, здатних до синтезу КЛК використовували пару олігонуклеотидних послідовностей до гена RY69_RS01430, який кодує білок циклопропан-фосфоліпід синтазу жирних кислот («cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase»): F 5'-GCCTGATTCTCGACAAGCTG-3' 20 п.н., R 5'-CCAGATCCTGCAATCCCTCA-3' 20 п.н. для ампліфікації фрагмента 183 п.н.[32]. Для визначення наявності культур *L. plantarum* використовували пару олігонуклеотидних послідовностей до гена AKJ11_03385, який кодує білок «cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase»: F 5'-CTGGTTGACATTACGAGCCG-3' 20 п.н., R 5'-CCAGTTGGTGCTTCGACAAA-3' 20 п.н. для ампліфікації фрагмента 162 п.н. [33].

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили у термоциклері «GeneAmp PCR System 9600» з відповідним програмним забезпеченням з використанням маркеру молекулярної ваги з кроком 100 п.н. («Roche Diagnostics GmbH», Німеччина).

Ферментація молока. В стерильних умовах, в підігріті до 30°C зразки О1 та О2 молока вносили заквашувальні культури «Іпровіт», суміш культур «Lyofast LPRA» та «Іпровіт» у співвідношенні 1:1, заквашувальну культуру «Біфідокомплекс». Молоко ферментували впродовж 8 годин за температури 37°C.

Мікробіологічний аналіз. Кількість молочнокислих бактерій (МКБ) та біфідобактерій визначали шляхом 10-кратного розведення (чашковим методом) з подальшим висіванням на агарі Лі [34] та молочно-гідролізатному середовищі (ГМ), відповідно. Посіви МКБ та біфідобактерій інкубували впродовж 72 годин за температури 37°C в аеробних та анаеробних умовах, відповідно. Зразки для аналізу відбирали в молоці після інокуляції, на 1, 3 та 7 добу після ферментації.

Інструментальний аналіз. Визначали масову частку загального білка та небілкового азоту у молоці згідно ДСТУ ISO 8968: 2005-2,4 [35-36] (дигестор «Bege», Німеччина та дистильатор «Fisher Bioblock Scientific», Італія), масову частку сечовини – методом добавок та вимірювали на спектрофотометрі Unico S2100 (США) [37]. Титровану кислотність у молоці та кисломолочному продукті на 1, 3 та 7 добу зберігання визначали згідно ГОСТ 3624-92 [38], вміст летких жирних кислот – згідно з Іниховим та Брію [39].

Жирову фракцію молока та ферментованого молока екстрагували згідно з ДСТУ ISO 14156:2001 [40]. Суміш метилових ефірів жирних кислот готували відповідно до ДСТУ ISO 15884/IDF 182:2008 [41]. Жирнокислотний склад аналізували в молоці до ферментації та через добу після ферментації відповідно до ДСТУ ISO 15885/IDF 184:2008 [42] на газовому хроматографі «Купол-55» (НПФ «Аналітика», Україна) з полум'яно-іонізаційним детектором, колонкою SP 2556 («Supelco», США), довжиною 100 м, внутрішнім діаметром 0,25 мм та шаром плівки 0,20 мкм, за допомогою програмного забезпечення «Аналітика» (НПФ «Аналітика», Україна) для контролю за системою та обробки даних. В якості стандартного зразку використовували 37-компонентну суміш метилових ефірів жирних кислот FAME («Sigma-Aldrich», США). Відносний вміст жирної кислоти вираховували з площі кожного піку та виражали у відносних відсотках. Відповідно до отриманих даних жирнокислотного складу проводили розрахунок десатураційного індексу (ДІ) за формулою (1) [43],

$$ДІ = \frac{C14:1+C16:1+C18:1}{(C14:0+C16:0+C18:0)+(C14:1+C16:1+C18:1)} \quad (1)$$

атерогенного індексу (AI) за формулою (2)

$$AI = \frac{C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0}{2 \times \Sigma \text{Омега-6} + \Sigma \text{Омега-3} + \Sigma \text{МНЖК}} \quad (2),$$

де Σ Омега-6 – сума омега-6 жирних кислот, Σ Омега-3 – сума омега-3 жирних кислот, МНЖК – сума мононенасичених жирних кислот.

Також виконаний розрахунок тромбогенного індексу (TI) за формулою (3) [44].

$$TI = \frac{C14:0 + C16:0 + C18:0}{(0,5 \times \Sigma \text{МНЖК}) + (0,5 \times \Sigma \text{Омега-6}) + (3 \times \Sigma \text{Омега-3}) + (\Sigma \text{Омега-3} / \text{Омега-6})} \quad (3)$$

Статистичний аналіз. Для статистичної обробки даних використовували однофакторний дисперсійний аналіз в програмі MS Excel 2010.

Результати досліджень. Результати проведеного аналізу органічного молока з ферм з різним типом годівлі корів показано на табл. 2. Молоко О1 відрізнялося більшим вмістом загального білка (на 4,6%) та меншим вмістом летких жирних кислот (на 20,8%) порівняно з молоком О2. Слід зазначити, що масова частка небілкового азоту та сечовини була вищою в молоці О2 (на 22,8% та 22,9%, відповідно), що також підтверджує отримані раніше результати [45]. Це пояснюється тим, що на фермах О2 частка концентрованих кормів, які виступають джерелом енергії для рубцевої мікрофлори, була незначною, що призводило до певного дисбалансу вмісту сечовини.

Таблиця 2

Результати дослідження фізико-хімічних та біохімічних параметрів органічного молока з ферм з різним типом раціону

Параметр	Органічне молоко з ферм силосно-сінажним раціоном (О1)	Органічне молоко з ферм з трав'яно-сінним раціоном (О2)
Масова частка загального білка, г/100 г	3,35±0,12	3,10±0,10
Масова частка небілкового азоту, г/100 г	0,0251±0,0004	0,0325±0,0007
Масова частка сечовини, мг/100 г	29,34±1,35	38,07±1,58
Титрована кислотність, °Т	19±0,4	19±0,5
Вміст летких жирних кислот, меквNaOH/100 г	0,42±0,01	0,53±0,02
Загальне бактеріальне обсіменіння, тис./см ³	250±10	220±10
Кількість соматичних клітин, тис./см ³	350±5	290±5

Дані подані як середнє значення ± середнє квадратичне відхилення

З метою відбору заквашувальних культур, здатних до підвищення вмісту есенціальних нутрієнтів, а саме кон'югатів лінолевої кислоти, був проведений скринінг п'яти заквашувальних препаратів за допомогою методу полімеразно-ланцюгової реакції на наявність генів в культурах *Lactobacillus plantarum* та *Bifidobacterium breve*, які

кодують білок циклопропан-фосфоліпід-синтазу жирних кислот, що бере участь у синтезі КЛК. Результати відбору необхідних заквашувальних культур показали, що наявність культур *Lactobacillus plantarum* з таким геном встановлена в заквашувальних культурах «Lyofast LPRA» та «Симбіотик» (рис. 2, А, лунки 2 та 5), а наявність культур *Bifidobacterium breve* з таким геном – у препапаті «Біфідокомплекс» (рис. 2, Б, лунка 4).

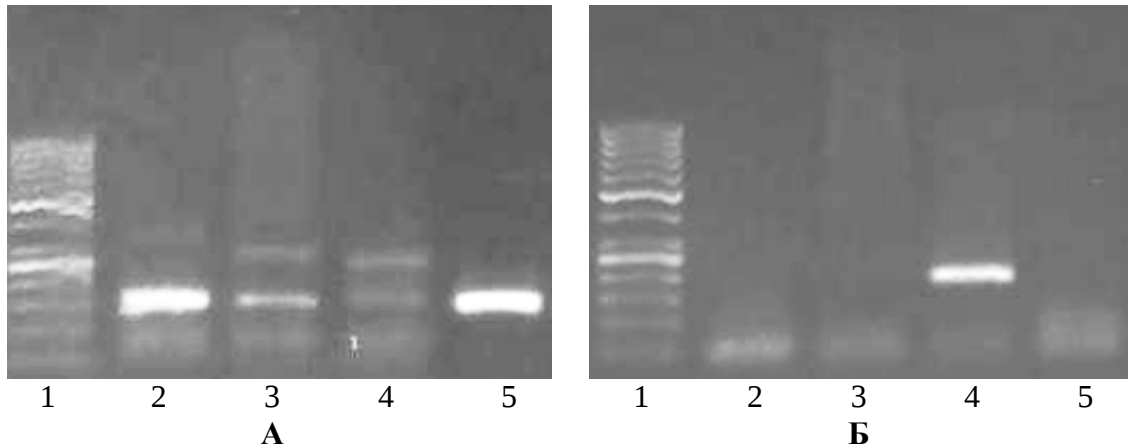


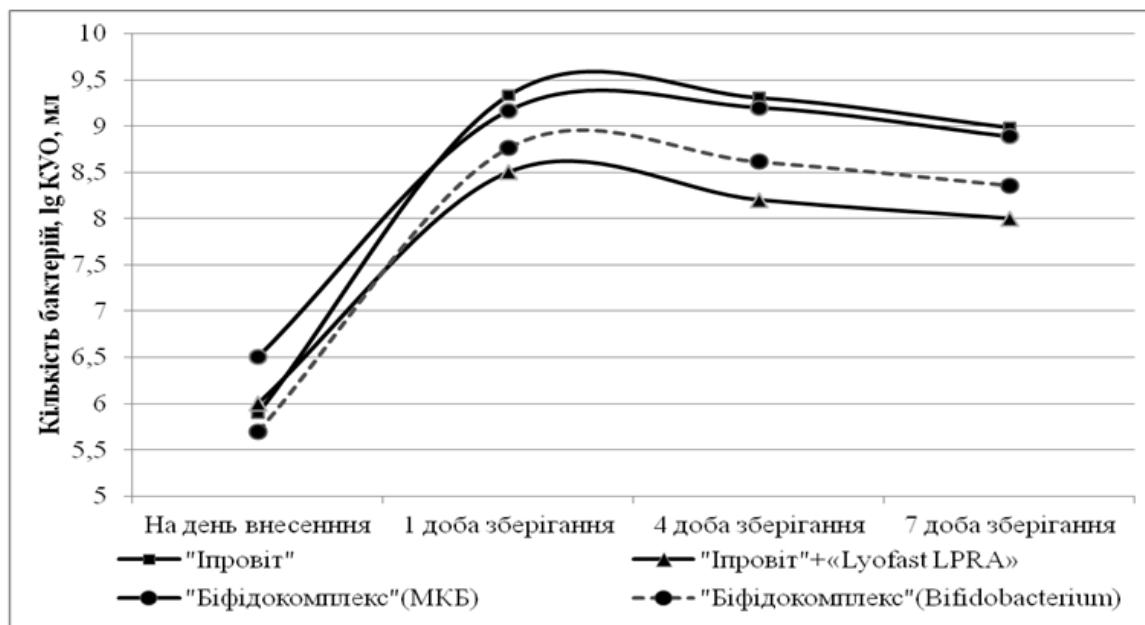
Рис.2. Результати відбору заквашувальних препаратів за допомогою ПЛР та електрофорезу в агарозному гелі.

А: 1 – маркер молекулярної ваги з кроком 100 п.н., 2 – «Lyofast LPRA», 3 – «Іпровіт», 4 – «Біфідокомплекс», 5 – «Симбіотик»;

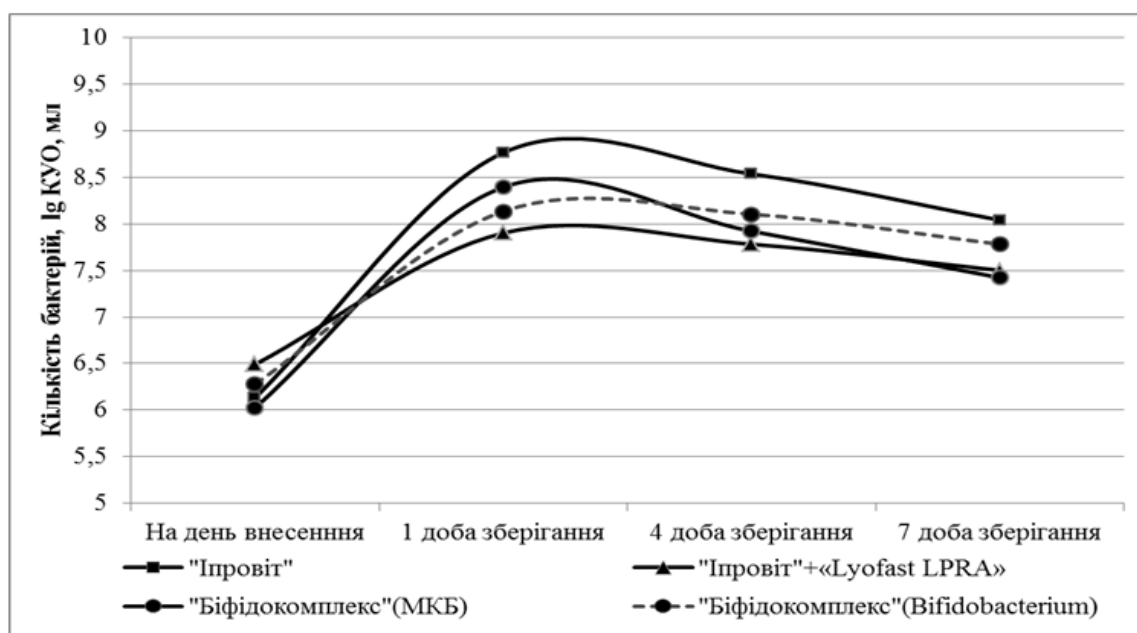
Б: 1 – маркер молекулярної ваги з кроком 100 п.н., 2 – «Іпровіт», 3 – «Lyofast LPRA», 4 – «Біфідокомплекс», 5 – «Lyofast SAB 440В».

На підставі отриманих даних, для ферментації молока були відібрані заквашувальні культури для ферментування молока – суміш культур «Іпровіт» + «Lyofast LPRA», культуру «Біфідокомплекс», здатні до синтезу КЛК та культуру «Іпровіт» в якості контролю. Результати проведеного ферментування органічного молока показали, що динаміка сквашування змінювалася залежно від використаних заквасок та типу молока. Так, заквашувальна культура «Біфідокомплекс» сквашувала молоко О1 за 5,4 год, молоко О2 – за 8,0 год. Водночас, заквашувальні культури «Іпровіт» та «Іпровіт» + «Lyofast LPRA» сквашували молоко О1 за 6,5 год та 7,6 год, відповідно, а молоко О2 – за 7,0 год та 8,2 год, відповідно. Аналіз динаміки чисельності молочнокислих бактерій (МКБ) показав, що при використанні заквасок «Іпровіт» та «Біфідокомплекс» у молоці з ферм О1 чисельність МКБ на 1 добу зберігання підвищувалася на 9,0% та 7,3% у порівнянні з комбінованою заквашувальною культурою «Іпровіт» + «Lyofast LPRA», відповідно (рис. 3, А), а у молоці з ферм О2 – на 9,5% та 5,53% (рис. 3, Б).

На першу добу зберігання, чисельність МКБ в ферментованому культурами «Іпровіт», «Іпровіт» + «Lyofast LPRA» та «Біфідокомплекс» молоці О1 була вищою на 6,2%, 7,1% та 8,5% порівняно з ферментованим даними культурами молоком О2. Це можна пояснити більшим вмістом сечовини в молоці О2, що може призводити до пригнічення активності молочнокислих бактерій при сквашуванні та підвищенням термостійкості молока [46].



А



Б

Рис.3. Динаміка чисельності молочнокислих бактерій (МКБ) та бактерій *Bifidobacterium* у ферментованому органічному молоці з ферм з різним тиом годівлі (А – молоко з ферми О1, Б – молоко з ферми О2)

Дослідження рівня титрованої кислотності показало схожу картину при використанні всіх трьох заквашувальних культур (рис. 4, А, Б). Проте, динаміка вмісту летких жирних кислот (ЛЖК) характеризувалася суттєво більшими значеннями при використанні комбінованої заквашувальної культури «Іпровіт» + «Lyofast LPR» – у молоці О1 вміст ЛЖК був вище на 62,9% та 42,2% порівняно з заквашувальними культурами «Іпровіт» та «Біфідокомплекс» на перший день після ферментування та на 37,7% та 38,7% – на сьомий день. Водночас, у молоці О2 на перший день після ферментування різниця у вмісті ЛЖК була меншою – 30,4% та 20,5% порівняно зі

заквашувальними культурами «Іпровіт» та «Біфідокомплекс» та 21,0% та 25% – на сьомий день (рис.4, В, Г). Отримані результати можна пояснити меншою кислотоутворюючою здатністю та високою ліполітичною активністю комбінованої заквашувальної культури «Іпровіт» + «Lyofast LPRA» (рис.4, В, Г).

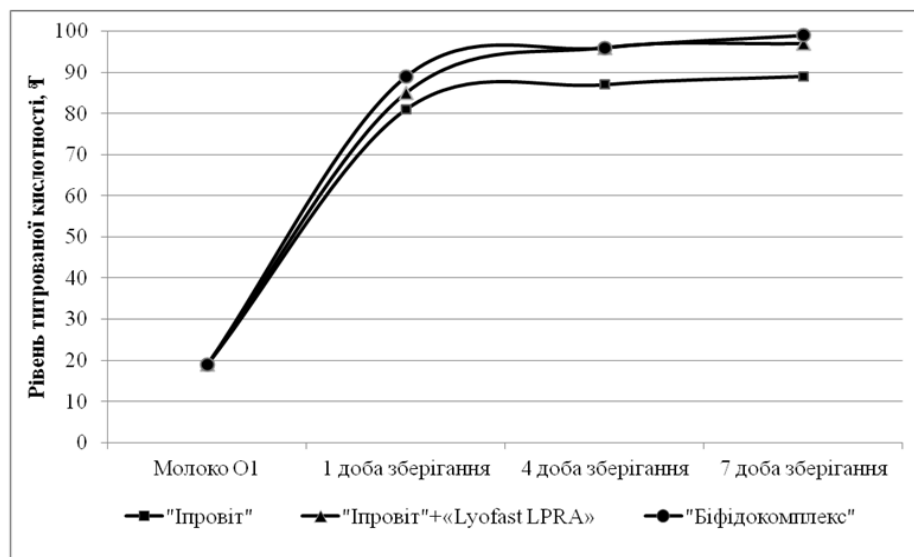
Використання заквашувальної культури «Біфідокомплекс» у молоці О1 на перший та четвертий дні після ферментування дозволяє утримувати показник вмісту ЛЖК на рівні 0,200 мекв/100 г, а на сьомий день досягати значень характерних для використання контрольної заквашувальної культури «Іпровіт». Порівняння особливостей протікання процесів ферментування в двох типах органічного молока дозволило встановити, що на 7 добу зберігання при використанні заквашувальних культур «Іпровіт», «Іпровіт» + «Lyofast LPRA» та «Біфідокомплекс» вміст ЛЖК був вищим у молоці О1 на 21,0%, 20,2% та 19,0%, відповідно, що пояснюється меншою чисельністю МКБ (отримані дані не відрізнялися статистично достовірно).

Проведений аналіз жирнокислотного складу молока показав, що вміст α -ліноленової кислоти (C18:3n3) був вищим в молоці О1 на 39,8%, проте вміст КЛК був вищим в молоці О2 на 45,2%, що пояснюється особливостями годівлі худоби [11]. При ферментуванні молока О1 заквашувальними культурами «Іпровіт» вміст кон'югатів лінолевої кислоти (C18:2n6 цис-9,транс-11) підвищувався на 10,2% у порівнянні з відповідними значеннями в молоці, а при використанні комбінованої заквашувальної культури «Іпровіт» + «Lyofast LPRA» та «Біфідокомплекс» вміст КЛК підвищувався на 26,3% та 29,8% відповідно. В молоці О2 після ферментування вміст КЛК підвищувався на 1,5%, 8,0% та 11,9% при використанні заквашувальних культур «Іпровіт», «Іпровіт» + «Lyofast LPRA» та «Біфідокомплекс» відповідно.

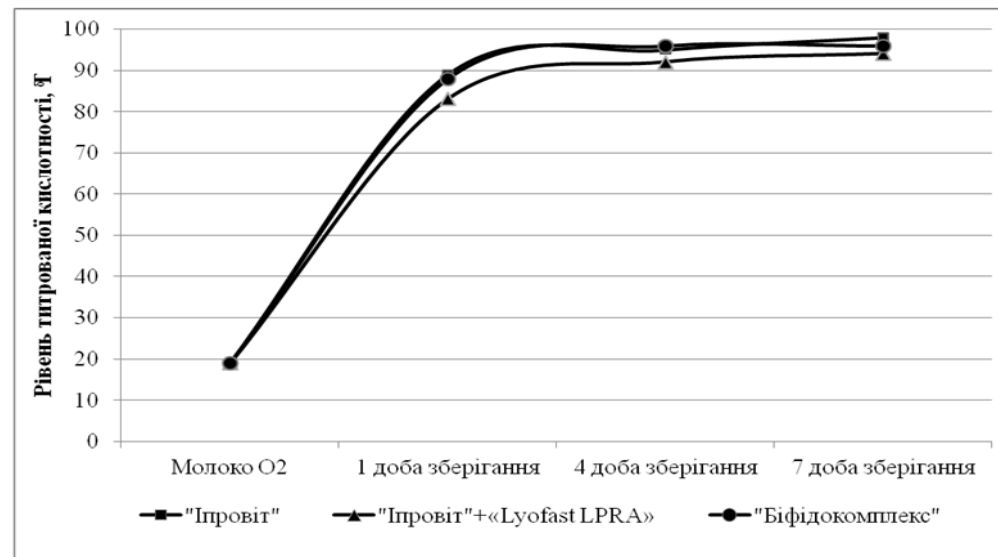
Відношення C18:2n6 цис-9,транс-11/C 18:2 n6 цис, що характеризує рівень конверсії лінолевої кислоти, при ферментуванні культурами «Іпровіт», «Іпровіт» + «Lyofast LPRA» та «Біфідокомплекс» молока О1 зростало на 6,4%, 18,5% та 26,4% відповідно, а при ферментуванні молока О2 – на 9,1%, 2,9% та 14,7%. Це свідчить про те, що у молоці О1 рівень конверсії лінолевої кислоти був вищим, у порівнянні з молоком О2. Можна припустити, що менший вміст лінолевої кислоти (C 18:2 n6 цис) у молоці О2 в порівнянні з О1 (на 19,1%) може бути обумовлений меншою кількістю субстрату для конверсії та, відповідно, меншою токсичною дією на мікрофлору, що є необхідним підґрунтям для синтезу КЛК.

Водночас, використання заквашувальної культури «Біфідокомплекс» при ферментуванні молока О2 дозволило підвищити рівень КЛК найбільше серед усіх використаних культур та типів молока, до 0,841 відн.%, що було вище на 31,3% у порівнянні з ферментованим тією самою культурою молоком О1.

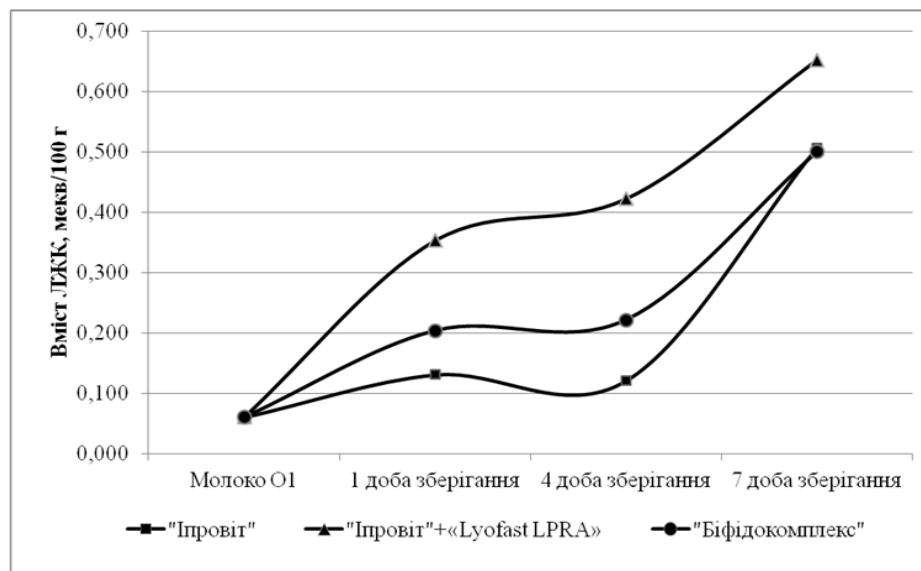
Обробка даних жирнокислотного складу ферментованого молока дозволяє розрахувати індекси, які характеризують потенційний вплив на серцево-судинну систему людини обрати для ферментації необхідну заквашувальну культуру залежно від типу молока (табл. 3.). Так, десатуразний індекс жиру виражає частку основних ненасичених жирних кислот у сумі основних ненасичених та насичених жирних кислот. При ферментації молока О1 даний індекс збільшувався при використанні заквашувальних культур «Іпровіт» та «Біфідокомплекс» на 2,49% та 3,77%, відповідно, тоді як при використанні «Іпровіт» + «Lyofast LPRA» він зменшувався на 0,77% в порівнянні з вихідною сировиною. Водночас, при ферментації молока О2 було встановлено більшу різницю у значеннях – збільшення на 20,62%, 16,10% та 15,62% при використанні культур «Іпровіт», «Іпровіт» + «Lyofast LPRA» та «Біфідокомплекс», відповідно.



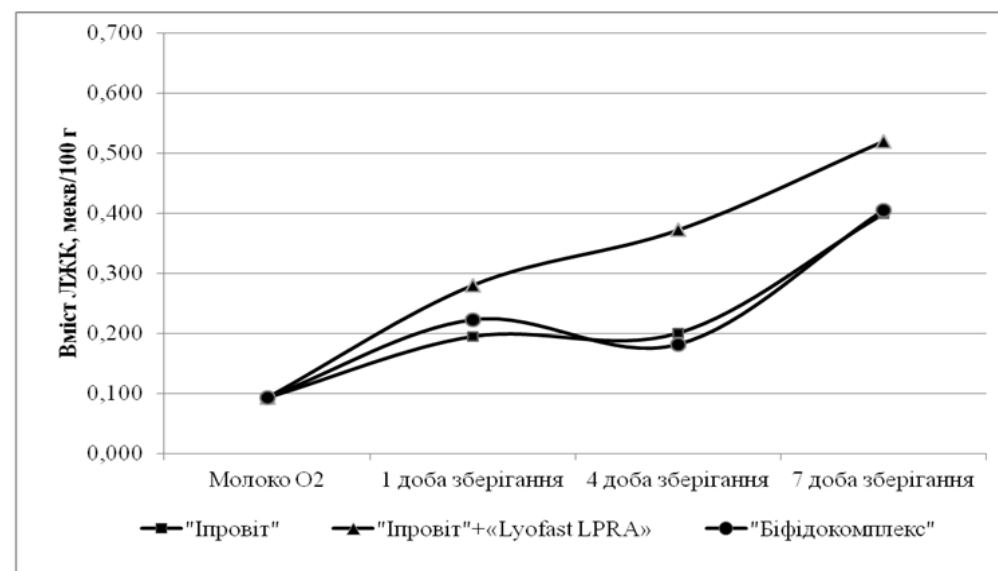
А



Б



В



Г

Рис. 4. Титрована кислотність та вміст летких жирних кислот (ЛЖК) ферментованого органічного молока з ферм з різним типом годівлі (А, В – молоко з ферми О1, Б, Г – молоко з ферми О2)

Атерогенний індекс характеризує відношення основних насичених жирних кислот, які вважаються проатерогенними, до основних класів ненасичених жирних кислот, які вважаються антиатерогенними. При ферментації молока О1 найбільше зменшення значень цього індексу було встановлено при використанні заквашувальної культури «Біфідокомплекс» (на 7,03%), а при ферментації молока О2 – при використанні культури «Іпровіт» (на 28,51%) в порівнянні з вихідною сировиною. Використання культур «Іпровіт» + «Lyofast LPRA» та «Біфідокомплекс» при ферментації молока О2 також призвело до зменшення значень даного індексу на 23,14% та 22,31%.

Тромбогенний індекс характеризує зв'язок між насичених жирними кислотами (з протромбогенними властивостями) та основними класами ненасичених жирних кислот (з антитромбогенними властивостями). Загалом, ферментація знижувала значення цього індексу в обох типах молока та за використання всіх типів заквашувальних культур, окрім культури «Іпровіт» + «Lyofast LPRA» при ферментації молока О1 (значення індексу збільшувалися на 1,33%) в порівнянні з вихідною сировиною.

Таблиця 3

Результати дослідження впливу заквашувальних культур на жирнокислотний склад органічного ферментованого молока з ферм з різним типом годівлі

Параметр жирнокислотного складу	Молоко О1	Ферментоване молоко О1			Молоко О2	Ферментоване молоко О2		
		«Іпровіт»	«Іпровіт» + «Lyofast LPRA»	«Біфідокомплекс»		«Іпровіт»	«Іпровіт» + «Lyofast LPRA»	«Біфідокомплекс»
С 18:3 н 3, відн.%	0,883	0,919	0,912	0,907	0,532	0,502	0,533	0,522
С18:2n6 цис-9, транс-11 (КЛК), відн.%	0,406	0,452	0,551	0,578	0,741	0,750	0,835	0,882
КЛК/С 18:2 n6 с	0,190	0,203	0,233	0,258	0,428	0,418	0,462	0,504
Σ НасиченихЖК, відн.%	61,4	61,032	60,931	60,964	49,973	52,992	48,402	51,191
Σ Ненасичених ЖК, відн.%	29,717	30,572	31,095	30,586	36,883	34,919	37,82	36,206
Σ Мононенасичених ЖК, відн.%	25,941	26,599	26,944	26,509	33,313	31,634	34,032	32,656
Σ Поліненасичених ЖК, відн.%	3,776	3,973	4,151	4,077	3,57	3,285	3,788	3,55
Σ omega-3, відн.%	0,883	0,919	0,912	0,907	0,532	0,502	0,533	0,522
Σ omega -6, відн.%	2,756	2,913	3,142	3,029	2,719	2,513	2,909	2,712
Omega 3/ omega 6	0,320	0,315	0,290	0,299	0,196	0,200	0,183	0,192
Десатуразний індекс	25,78	26,44	25,58	26,79	26,37	33,22	31,43	31,25
Атерогенний індекс	2,56	2,46	2,54	2,38	2,42	1,73	1,86	1,88
Тромбогенний індекс	2,97	2,86	3,01	2,72	2,86	2,40	2,55	2,60

Умовні позначення: Σ – сума, ЖК – жирні кислоти.

Дані подані як середні значення ($p \leq 0,05$).

Висновки

Встановлено, що органічне молоко з ферм з різним типом годівлі відрізняється за вмістом сечовини, небілкового азоту та вмістом окремих жирних кислот, що потребує врахування при виборі заквашувальної культури. Дослідження ферментування органічного молока показало, що більший вміст сечовини в молоці з ферм з трав'яно-сінним типом годівлі худоби призводить до пригнічення розвитку молочнокислих бактерій та вимагає підбору культур з більшою кислотоутворюючою здатністю. Вміст КЛК в молоці, отриманого з ферм з трав'яно-сінним типом годівлі худоби, був вищим на 45,2%, порівняно з молоком з ферм силосно-сінажним типом годівлі. Проведене ферментування показало, що при використанні заквашувальної культури «Біфідокомплекс», до складу якої входять бактерії *Bifidobacterium breve*, здатні до синтезу КЛК, дозволило підвищити вміст КЛК в кисломолочному продукті до 0,882 відн.%, що було найвищим значенням серед усіх використаних культур та типів молока. Відношення КЛК до лінолевої кислоти, що свідчить про рівень конверсії лінолевої кислоти у КЛК, за участі заквашувальних культур «Біфідокомплекс» було вищим у порівнянні з заквашувальною культурою «Іпровіт» на 21,3% при ферментуванні молока О1 та 17,1% при ферментуванні молока О2, а в порівнянні з ферментуванням сумішшю «Іпровіт» + «Lyofast LPRA», в якій містилися бактерії *Lactobacillus plantarum*, здатні до синтезу КЛК – на 12,9% та 9,5%, відповідно. Ферментування культурою «Біфідокомплекс» знижувало значення атерогенного та тромбогенного індексу, підвищувало значення десатуразного індексу в кисломолочному продукті в порівнянні з контрольною культурою «Іпровіт» та сумішшю культур «Іпровіт» + «Lyofast LPRA».

Таким чином, розроблені олігонуклеотидні послідовності для ПЛР-ідентифікації здатності штамів *Lactobacillus plantarum* та *Bifidobacterium breve* до синтезу кон'югатів лінолевої кислоти дозволяють швидко відібрати заквашувальні культури для ферментування органічного молока з метою підвищення вмісту КЛК в кисломолочному продукті.

Бібліографія

1. Hennessy A., Ross R., Devery R., Stanton C. The health promoting properties of the conjugated isomers of α -linolenic acid. *Lipids*. 2011. 46(2). P.105–119.
2. Farmani J., Safari M., Roohvand F., Razavi S., Aghasadeghi M., Noorbazargan H. Conjugated linoleic acid-producing enzymes: A bioinformatics study. *European journal of lipid science and technology*. 2010. 112(10). P.1088–1100.
3. Bhattacharya A., Banu J., Rahman M., Causey J., Fernandes G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2006. 17(12). P.789–810.
4. Ip C., Singh M., Thompson H., Scimeca J. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer research*. 1994. 54(5). P.1212–1215.
5. Kamphuis M., Lejeune M., Saris H., Westerterp-Plantenga M. The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subjects. *International journal of obesity*. 2003. 27(7). P. 840.
6. Rodríguez-Alcalá L., Villar-Tajadura A., Juarez M., Fontecha J. Commercial conjugated linoleic acid (CLA) fortified dairy products. In *Handbook of Food Fortification and Health*. P. 173–184. New York: Humana Press. 2013.
7. Roach J., Mossoba M., Yurawecz M., Kramer J. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Analytica Chimica Acta*. 2002. 465(1–2). P. 207–226.

8. Schmid, A., Collomb, M., Sieber, R., & Bee, G. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. *Meat Science*. 2006. 73(1). P.29–41.
9. Fritsche J., Rickert R., Steinhart H., Yurawecz M., Mossoba M., Sehat N., Ku Y. Conjugated linoleic acid (CLA) isomers: formation, analysis, amounts in foods, and dietary intake. *Lipid/Fett*. 1999. 101(8). P.272–276.
10. Collomb M., Schmid A., Sieber R., Wechsler D., Ryhänen E. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *International dairy journal*. 2006. 16(11). P. 1347–1361.
11. Zhukova Ya., Petrov P., Klimenko L., Demikhov Yu. Chemometric Approach Based on Fatty Acid Composition and $\Delta^{13}\text{C}$ Analysis for Verification of Organic Raw Milk from Cows With Different Diet. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*. 2019. Vol.11(1). P. 203–217.
12. Gorissen L., Leroy F., De Vuyst L., De Smet S., Raes K. Bacterial production of conjugated linoleic and linolenic acid in foods: a technological challenge. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2015. 55(11). P.1561–1574.
13. Sieber R., Collomb M., Aeschlimann A., Jelen P., Eyer H. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products – a review. *International Dairy Journal*. 2004. 14(1). P.1–15.
14. Dhiman T., Nam S., Ure A. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2005. 45(6). P.463–482.
- Campbell W., Drake M., Larick D. The Impact of Fortification with Conjugated Linoleic Acid (CLA) on the Quality of Fluid Milk. *Journal of Dairy Science*. 2003. 86(1). P.43–51.
15. Precht D., Molkentin J., Vahlendieck M. Influence of the heating temperature on the fat composition of milk fat with emphasis on cis-/trans-isomerization. *Food/Nahrung*. 1999. 43(1). P.25–33.
16. Ryhänen E., Tallavaara K., Griinari J., Jaakkola S., Mantere-Alhonen S., Shingfield K. Production of conjugated linoleic acid enriched milk and dairy products from cows receiving grass silage supplemented with a cereal-based concentrate containing rapeseed oil. *International Dairy Journal*. 2005. 15(3). P.207–217.
17. Gonzalez S., Duncan S., O'keefe S., Sumner S., Herbein J. Oxidation and textural characteristics of butter and ice cream with modified fatty acid profiles. *Journal of Dairy Science*. 2003. 86(1). P.70–77.
18. Kepler C., Hirons K., McNeill J., Tove S. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*. 1966. 241(6). P.1350–1354.
19. Palmquist D. Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon. In *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (pp. 43–92). Boston: Springer. 2006.
20. Jenkins T. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*. 76(12). P.3851–3863.
21. Kim Y., Liu R., Bond D., Russell J. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. 66(12), 5226–5230.
22. Adamczak M., Bornscheuer U., Bednarski W. Properties and biotechnological methods to produce lipids containing conjugated linoleic acid. *European journal of lipid science and technology*. 2008. 110(6), 491–504.
23. Gorissen L., Raes K., Weckx S., Dannenberger D., Leroy F., De Vuyst L., De Smet S. Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers by *Bifidobacterium* species. *Applied microbiology and biotechnology*. 2010. 87(6). P.2257–2266.
24. Zeng Z., Lin J., Gong D. Identification of lactic acid bacterial strains with high conjugated linoleic acid-producing ability from natural sauerkraut fermentations. *Journal of food science*. 2009. 74(4), M154–M158.

25. Akalin A. S., Tokuşoğlu, Ö., Gönç S., Aycan Ş. Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *International Dairy Journal*. 2007. 17(9), P. 1089–1095.
26. Xu S., Boylston T., Glatz B. Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005. 53(23). P.9064–9072.
27. Gorissen L., Raes K., De Smet S., De Vuyst L., Leroy F. Microbial production of conjugated linoleic and linolenic acids in fermented foods: Technological bottlenecks. *European journal of lipid science and technology*. 2012. 114(4). P.486–491.
28. Florence A., Béal C., Silva R., Bogsan C., Pilleggi A., Gioielli L., Oliveira M. Fatty acid profile, trans-octadecenoic, α -linolenic and conjugated linoleic acid contents differing in certified organic and conventional probiotic fermented milks. *Food chemistry*. 2012. 135(4). P.2207–2214.
29. Florence A., Oliveira R., Silva R., Soares F., Gioielli L., Oliveira M. Organic milk improves *Bifidobacterium lactis* counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. *Lwt-Food Science and Technology*. 2012. 49(1). P.89–95.
30. Florence A., Da Silva R., do Espírito Santo A., Gioielli L., Tamime A., De Oliveira M. Increased CLA content in organic milk fermented by bifidobacteria or yoghurt cultures. *Dairy science & technology*. 2009. 89(6). P.541–553.
31. Пат. № 116555 Україна, МПК C12N15/11 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01), C12Q 1/04 (2006.01), C12Q 1/6876 (2018.01), C12N 1/02 (2006.01), G01N 33/50 (2006.01), C12R 1/01 (2006.01). Спосіб визначення культури *Bifidobacterium breve*, здатної до синтезу кон'югатів лінолевої кислоти, за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції. Я.Ф. Жукова, М.М.Вакуленко, П.І.Петров, О.А. Семенівська; заявник і патентовласник Інститут продовольчих ресурсів НААН. № а 2017 04766; заявл. 17.05.2017; опубл. 26.03.2018. 17 с.
32. Пат. № 116554 Україна, МПК C12N15/11 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01), C12Q 1/04 (2006.01), C12Q 1/6876 (2018.01), C12N 1/02 (2006.01), G01N 33/50 (2006.01), C12R 1/25 (2006.01), C12R 1/225 (2006.01). Спосіб визначення культури *Lactobacillus plantarum*, здатної до синтезу кон'югатів лінолевої кислоти, за допомогою пари специфічних олігонуклеотидних праймерів методом полімеразної ланцюгової реакції. Я.Ф. Жукова, М.М.Вакуленко, П.І.Петров, О.А. Семенівська; заявник і патентовласник Інститут продовольчих ресурсів НААН. № а 2017 04765; заявл. 17.05.2017; опубл. 26.03.2018. 17 с.
33. Lee S., Vedamuthu E., Washam C., Reinbold G. An agar medium for the differential enumeration of yogurt starter bacteria. *Journal of Milk and Food Technology*, 1974. 37(5). P. 272–276.
34. ДСТУ ISO 8968-2:2005 (IDF 20–2:2001) Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 2. Метод із використанням блоку для спалювання (макрометод): чинний з 01.07.2007. К.: ДП «УкрНДНЦ», 2007. 14 с.
35. ДСТУ ISO 8968-4:2005 (IDF 20–4:2001) Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 4. Метод визначення небілкового азоту: чинний з 01.07.2007. К.: ДП «УкрНДНЦ», 2007. – 11 с.
36. Zhukova Ya., Petrov P., Klimenko L. Express Method Of Quantitative Determination Of Urea In Milk. *Товари і ринки*. 2017. №2. С.17–35.
37. ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности: действует от 01.01.1994. – М.: «Стандартинформ», 2009. 8 с.
38. Инихов, Г. С., & Брио, Н. П. (1971). Методы анализа молока и молочных продуктов. М.: Пищевая промышленность, 275 с.
39. ДСТУ ISO 14156:2005 (IDF 172:2001). Молоко та молочні продукти. Методи екстрагування ліпідів та ліпорозчинних сполук: чинний з 01.07.2007. К.: ДП «УкрНДНЦ», 2007. 10 с.

40. ДСТУ ISO 15884/IDF 182:2008 Жир молочний. Метод приготування метилових ефірів жирних кислот: чинний з 01.01.2011. К.: ДП «УкрНДНЦ», 2011. 9 с.
41. ДСТУ ISO 15885/IDF 184:2008 Жир молочний. Визначення жирнокислотного складу методом газорідинної хроматографії: чинний з 01.01.2011. К.: ДП «УкрНДНЦ», 2011. 12 с.
42. Kay J., Roche J., Kolver E., Thomson N., Baumgard L. A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *Journal of Dairy Research*. 2005.72(3). P.322–332.
43. Ulbricht T., Southgate D. Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*. 1991. 338(8773). P. 985–992.
45. Жукова Я.Ф. Петров П.І. Вплив типу годівлі корів на параметри якості органічного молока. *Продовольчі ресурси*. 2018. № 10. С.111–122.
46. Шидловская В. П. Небелковые азотистые вещества и их роль в оценке качества молока. *Молочная промышленность*. 2008. №. 3. С. 48–51.

References

1. Hennessy A., Ross R., Devery R., Stanton C. (2011). The health promoting properties of the conjugated isomers of α -linolenic acid. *Lipids*, 46(2), 105–119.
2. Farmani J., Safari M., Roohvand F., Razavi S., Aghasadeghi M., Noorbazargan H. (2010). Conjugated linoleic acid-producing enzymes: A bioinformatics study. *European journal of lipid science and technology*, 112(10), 1088–1100.
3. Bhattacharya A., Banu J., Rahman M., Causey J., Fernandes G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, 17(12), 789–810.
4. Ip C., Singh M., Thompson H., Scimeca J. (1994). Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer research*, 54(5), 1212–1215.
5. Kamphuis M., Lejeune M., Saris W., Westerterp-Plantenga M. (2003). The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subjects. *International journal of obesity*, 27(7), 840.
6. Rodríguez-Alcalá L., Villar-Tajadura A., Juarez M., Fontecha J. (2013). Commercial conjugated linoleic acid (CLA) fortified dairy products. In *Handbook of Food Fortification and Health*. Humana Press, New York. P. 173–184.
7. Roach J., Mossoba M., Yurawecz M., Kramer J. (2002). Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Analytica Chimica Acta*, 465(1–2), 207–226.
8. Schmid A., Collomb M., Sieber R., Bee G. (2006). Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. *Meat Science*, 73(1), 29–41.
9. Fritsche J., Rickert R., Steinhart H., Yurawecz M., Mossoba M., Sehat N., Ku Y. (1999). Conjugated linoleic acid (CLA) isomers: formation, analysis, amounts in foods, and dietary intake. *Lipid/Fett*, 101(8), 272–276.
10. Collomb M., Schmid A., Sieber R., Wechsler D., Ryhänen E. (2006). Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *International dairy journal*, 16(11), 1347–1361.
11. Zhukova Ya., Petrov P., Klimenko L., Demikhov Yu. (2019). Chemometric Approach Based on Fatty Acid Composition and $\Delta^{13}\text{C}$ Analysis for Verification of Organic Raw Milk from Cows With Different Diet. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, Vol.11(1), 203–217.

12. Gorissen L., Leroy F., De Vuyst L., De Smet S., Raes K. (2015). Bacterial production of conjugated linoleic and linolenic acid in foods: a technological challenge. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(11), 1561–1574.
13. Sieber R., Collomb M., Aeschlimann A., Jelen P., Eyer H. (2004). Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products – a review. *International Dairy Journal*, 14(1), 1–15.
14. Dhiman T., Nam S., Ure A. (2005). Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(6), 463–482.
15. Campbell W., Drake M., Larick D. (2003). The Impact of Fortification with Conjugated Linoleic Acid (CLA) on the Quality of Fluid Milk. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 43–51.
16. Precht D., Molkentin J., Vahlendieck M. (1999). Influence of the heating temperature on the fat composition of milk fat with emphasis on cis-/trans-isomerization. *Food/Nahrung*, 43(1), 25–33.
17. Ryhänen E., Tallavaara K., Griinari J., Jaakkola S., Mantere-Alhonen S., Shingfield K. (2005). Production of conjugated linoleic acid enriched milk and dairy products from cows receiving grass silage supplemented with a cereal-based concentrate containing rapeseed oil. *International Dairy Journal*, 15(3), 207–217.
18. Gonzalez S., Duncan S., O'keefe S., Sumner S., Herbein J. (2003). Oxidation and textural characteristics of butter and ice cream with modified fatty acid profiles. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 70–77.
19. Kepler C., Hirons K., McNeill J., Tove S. (1966). Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, 241(6), 1350–1354.
20. Palmquist D. (2006). Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon. In *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (pp. 43–92). Springer, Boston, MA.
21. Jenkins T. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76(12), 3851–3863.
22. Kim Y., Liu R., Bond D., Russell J. (2000). Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *butyrivibrio fibrisolvens*A38. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5226–5230.
23. Adamczak M., Bornscheuer U., Bednarski W. (2008). Properties and biotechnological methods to produce lipids containing conjugated linoleic acid. *European journal of lipid science and technology*, 110(6), 491–504.
24. Gorissen L., Raes K., Weckx S., Dannenberger D., Leroy F., De Vuyst L., De Smet S. (2010). Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers by *Bifidobacterium* species. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(6), 2257–2266.
25. Zeng Z., Lin J., Gong, D. (2009). Identification of lactic acid bacterial strains with high conjugated linoleic acid-producing ability from natural sauerkraut fermentations. *Journal of food science*, 74(4), M154–M158.
26. Akalın A., Tokuşoğlu Ö., Gönç S., Aycan, Ş. (2007). Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *International Dairy Journal*, 17(9), 1089–1095.
27. Xu S., Boylston T., Glatz B. (2005). Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9064–9072.
28. Gorissen L., Raes K., De Smet S., De Vuyst L., Leroy F. (2012). Microbial production of conjugated linoleic and linolenic acids in fermented foods: Technological bottlenecks. *European journal of lipid science and technology*, 114(4), 486–491.
29. Florence A., Béal C., Silva R., Bogsan C., Pilleggi A., Gioielli L., Oliveira M. (2012). Fatty acid profile, trans-octadecenoic, α -linolenic and conjugated linoleic acid contents differing

in certified organic and conventional probiotic fermented milks. *Food chemistry*, 135(4), 2207–2214.

30. Florence A., Oliveira R., Silva R., Soares F., Gioielli L., Oliveira M. (2012). Organic milk improves *Bifidobacterium lactis* counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. *Lwt-Food Science and Technology*, 49(1), 89–95.

31. Florence A., Da Silva R., do Espírito Santo A., Gioielli L., Tamime A., De Oliveira M. (2009). Increased CLA content in organic milk fermented by bifidobacteria or yoghurt cultures. *Dairy science & technology*, 89(6), 541–553.

32. Zhukova Ya., Vakulenko M., Petrov P., Semenivska O. Patent UA 116515 S2 Sposib vyznachennia kultury *Bifidobacterium breve*, zdatnoi do syntezu koniuhativ linolevoikysloty, za dopomohoiu pary spetsyfichnykh olihonukleotydnykh praimeriv metodom polimeraznoi lantsiuhovoi reaktsii [Determination of the culture of *Bifidobacterium breve*, enable to the synthesis of conjugate of linoleic acid, with the help of specific oligonucleotide primers by the method of polymerase chain reaction]. 26.03.2018, Biul.No 6

33. Zhukova Ya., Vakulenko M., Petrov P., Semenivska O. Patent UA 116514 S2 Sposib vyznachennia kultury *Lactobacillus plantarum*, zdatnoi do syntezu koniuhativ linolevoi kysloty, za dopomohoiu pary spetsyfichnykh olihonukleotydnykh praimeriv metodom polimeraznoi lantsiuhovoi reaktsii [Determination of the culture of *Lactobacillus plantarum*, enable to the synthesis of conjugate of linoleic acid, with the help of specific oligonucleotide primers by the method of polymerase chain reaction]. 26.03.2018, Biul.No 6.

34. Lee S., Vedomuthu E., Washam C., Reinbold G. (1974). An agar medium for the differential enumeration of yogurt starter bacteria. *Journal of Milk and Food Technology*, 37(5), 272–276.

35. DSTU ISO 8968–2:2005 (IDF 20–2:2001) Moloko. Vyznachennia vmistu azotu. Chastyna 2. Metod iz vykorystanniam bloku dlia spaliuvannia (makrometod): chynnyi z 01.07.2007 [Milk – Determination of nitrogen content. Part 2: Block-digestion method (Macro method)]. K.: DP «UkrNDNTs», 2007. – 14 s.

36. DSTU ISO 8968–4:2005 (IDF 20–4:2001) Moloko. Vyznachennia vmistu azotu. Chastyna 4. Metod vyznachennia nebilkovoho azotu: chynnyi z 01.07.2007 [Milk – Determination of nitrogen content. Part 4: Determination of non–protein–nitrogen content]. K.: DP «UkrNDNTs», 2007. 11 s.

37. Zhukova Ya., Petrov P., Klimenko L. (2017). Express Method Of Quantitative Determination Of Urea In Milk. *Товари і ринки [Markets and Comodities]*, 2, 17–35

38. GOST 3624–92. Moloko i molochnye produkty. Titrimetricheskie metody opredelenija kislrotnosti: dejstvuet ot 01.01.1994 [Milk and dairy products. Titrimetric methods for the determination of acidity]. M.: «Standartinform», 2009. 8 s. c.

39. Inihov G., Brio N. (1971). Metody analiza moloka i molochnyh produktov [Methods of analysis of milk and dairy products]. M.: Pishhevaja promyshlennost', 275.

40. DSTU ISO 14156:2005 (IDF 172:2001). Moloko ta molochni produkty. Metody ekstrakuvannia lipidiv ta liporozchynnykh spoluk: chynnyi z 01.07.2007 [Milk and milk products – Extraction methods for lipids and liposoluble compounds]. K.: DP «UkrNDNTs», 2007. 10 s.

41. DSTU ISO 15884/IDF 182:2008 Zhyr molochnyi. Vyznachennia zhyrnokyslotnoho skladu metodom hazoridynnoi khromatohrafii: chynnyi z 01.01.2011 [Milk fat – Preparation of fatty acid methyl esters]. K.: DP «UkrNDNCz», 2011. 9 s.

42. DSTU ISO 15885/IDF 184:2008 Zhyr molochnyi. Vyznachennia zhyrnokyslotnoho skladu metodom hazoridynnoi khromatohrafii: chynnyi z 01.01.2011 [Milk fat – Determination of the fatty acid composition by gas–liquid chromatography]. K.: DP «UkrNDNTs», 2011. 12 s.

43. Kay J., Roche J., Kolver E., Thomson N., Baumgard L. 2005. A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 72(3), 322–332.

44. Ulbricht T., Southgate D. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. The Lancet, 338(8773), 985–992.

45. Zhukova Ya., Petrov P. (2018). Vplyv typu hodivli koriv na parametry yakosti orhanichnoho moloka. [Influencing the type of year on the parameters of organic milk]. Prodovolchi resursy [Food Resources], 10, 111–122.

46. Shidlovskaja V. (2008). Nebelkovye azotistye veshhestva i ih rol v ocenke kachestva moloka [Non-protein nitrogenous substances and their role in assessing the quality of milk.] Molochnaja promyshlennost [Dairy industry], (3), 48–51.