

УДК 637.075:579.62

**Ідентифіковано з сирого молока вищих гатунків, яке призначене для виробництва дитячого харчування, новий для України умовно-патогенний мікроорганізм – *Enterobacter sakazakii*, сформовано його мікробіологічний профіль та здійснено офіційне депонування в колекції Національного центру штамів мікроорганізмів. Виявлено, що температура пастеризації молока 58 °C та вище протягом від 1 до 3-х хвилин інактивує *Enterobacter sakazakii***

**Ключові слова:** *Enterobacter sakazakii*, сухі дитячі суміші, загальна кількість мікроорганізмів, сире молоко

**Идентифицирован из сырого молока высших сортов, предназначенного для производства детского питания, новый для Украины условно-патогенный микроорганизм – *Enterobacter sakazakii*, сформирован его микробиологический профиль и проведено официальное депонирование в коллекции Национального центра штаммов микроорганизмов. Выявлено, что температура пастеризации молока 58 °C и выше на протяжении от 1 до 3-х минут инактивирует *Enterobacter sakazakii***

**Ключевые слова:** *Enterobacter sakazakii*, сухие детские смеси, общее количество микроорганизмов, сырое молоко

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ ENTEROBACTER SAKAZAKII В СЫРОМ МОЛОКЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА СУХИХ ДЕТСКИХ СМЕСЕЙ

**А. Н. Бергилевич**

Доктор ветеринарных наук, профессор\*

E-mail: bergilevich@ukr.net

**Е. А. Гришина**

Аспирант\*

E-mail: grishina\_zafar@mail.ru

**В. В. Касянчук**

Доктор ветеринарных наук, профессор\*

E-mail: vkasianchuk@yandex.ua

\*Кафедра технологии молока и мяса  
Сумской национальной аграрный университет  
ул. Григория Кондратьева, 160,  
г. Сумы, Украина, 40021

## 1. Введение

В последнее время в международных научных публикациях и в СМИ (в том числе, и в Украине) стали все чаще появляться сообщения о заболеваниях детей после вскармливания им детских смесей. Зарубежные исследователи провели четкую взаимосвязь между заболеванием новорожденных детей, случаями детской смертности с идентификацией бактерии *Enterobacter sakazakii* (*E. sakazakii*, *Cronobacter spp.*) в сухих детских смесях [1, 2]. К сожалению, в Украине пока не идентифицируется бактерия *E. sakazakii* ни при расследованиях причин детской смертности, ни при производстве сухих детских смесей. Это связано с недостаточностью научных исследований и отсутствием законодательно – методической основы в национальных лабораториях. Международным Соглашением про санитарные и фитосанитарные барьеры в торговле, вероятность возникновения или распространения возбудителя заболевания на территории страны, определяется на основе проведения оценки микробиологического риска – ОМР [3]. В 2009 году МОЗ Украины было утверждено «Микробиологические критерии для пищевых продуктов», в которых предусмотрен контроль за *Enterobacter sakazakii* в сухих детских смесях (также как и в соответствующем Регламенте ЕС № 2073 от 15.11.2005).

Бактерии *Enterobacter sakazakii* – это новый вид условно-патогенных микроорганизмов, который отнесен к категории очень опасных, особенно для де-

тей возрастом до 12 месяцев. Среди этой категории детей, наиболее уязвимыми являются новорожденные в возрасте до 28 дней, дети, которые родились преждевременно, имеют вес менее 2500 граммов, иммунодефицитные младенцы до 3 месяцев жизни и рожденные от ВИЧ – положительных матерей [1, 2, 4].

Основной компонент сухих молочных детских смесей – сухое молоко, изготавливаемое из сырого молока высших сортов. Производители этого вида детского питания должны быть уверены в безопасности сырья, и в том числе, относительно бактерий *E. sakazakii*.

В научной литературе имеется очень мало сообщений об идентификации *E. sakazakii* в сыром молоке коров. Кроме того, среди ученых нет единого мнения относительно существования этих микроорганизмов в сыром молоке. Одни исследователи сообщают о наличии *E. sakazakii* в молоке, а другие сообщают об его отсутствии в исследуемых пробах сырого молока [5–7]. Таким образом, очень важно знать имеется ли этот микроорганизм в сыром молоке с ферм Украины, и если он есть, то какие его свойства. Необходимо учитывать то, что свойства микроорганизмов могут изменяться под влиянием многих факторов: экологических, климатических, и, кроме того, один и тот же вид микроорганизма может иметь региональные различия, что и входит в ОМР. Вышесказанное подтверждает актуальность данных исследований.

## 2. Анализ литературных данных и постановка проблемы

### 2. 1. Таксономическая характеристика *Enterobacter sakazakii*

Микроорганизм *E. sakazakii* – это грамотрицательные бактерии, которые принадлежат к роду *Enterobacter*, семейству *Enterobacteriaceae*. Впервые эти бактерии были описаны в 1958 году как причина двух тяжелых случаев неонатального менингита. В 1980 году после исследования ДНК и биохимических свойств, бактерии *E. sakazakii* были классифицированы как отдельный вид и названы в честь японского бактериолога – Риччи Заказаки (*Riichi Sakazaki*). Дальнейшие исследования ученых показали то, что между отдельными штаммами *E. sakazakii* есть значительные различия, но в то же время, они имеют большое сходство с другими видами *Citrobacter* и *Enterobacter*. Однако было установлено, что *E. sakazakii* по своим фенотипическим и генетическим параметрам ближе к роду *Enterobacter*. Этими исследователями было предложено отнести *E. sakazakii* к новому роду, который был назван *Cronobacter* в честь греческого бога Кроноса. Согласно мифологии, бог Кронос, боясь свержения с престола, проглатывал своих новорожденных детей [8].

### 2. 2. *Enterobacter sakazakii* в окружающей среде

Существует много научной информации относительно распространения *E. sakazakii* в окружающей среде, и большинство ученых склонны считать, что естественным источником их существования является содержимое желудочно-кишечного тракта человека насекомых животных и грызунов. С испражнениями микроорганизм попадает в почву или воду, где может долго храниться. Кроме того, бактерии *Enterobacter sakazakii* могут попасть в сырье или пищевые продукты в процессе их производства с водой, в том числе питьевой с производственной пылью или воздухом. Таким образом, этот микроорганизм должен рассматриваться как потенциальный загрязнитель пищевых продуктов в пищевой цепи в их производства [9, 10].

По данным Всемирной организации здравоохранения, существует три основных источника попадания *E. sakazakii* в сухие молочные смеси для детского питания: 1) контаминированные эти микроорганизмами сырье и ингредиенты для производства; 2) технологические процессы (последопастеризационная контаминация или с окружающей среды (воздуха, оборудования), а также в процессе упаковки и хранения); 3) при нарушении правил гигиены во время приготовления продукта в домашних условиях или на детских молочных кухнях [2]. Схематически основные этапы производства сухих молочных детских смесей обозначены на рис. 1.

Р. Vuma и др. (1999) идентифицировали *E. sakazakii* на различных объектах молочной фермы [7]. Р. Skladal и др. (1993) изолировали *E. sakazakii* в смывах с молочного оборудования, которое используется в производстве молочных продуктов [11].

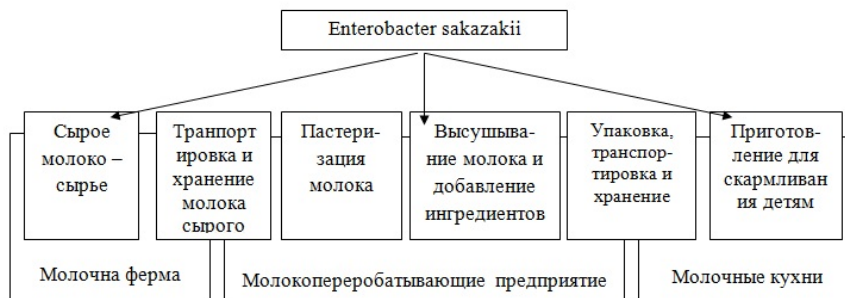


Рис. 1. Основные этапы производства сухих молочных детских смесей

### 2. 3. *Enterobacter sakazakii* в сыром молоке и пищевых продуктах

Научные данные о присутствии *Enterobacter sakazakii* в сыром молоке имеют определенные разногласия. Первые сведения о выделении этих бактерий из сырого молока можно найти в трудах Н.Л. Muytjens и др. (1990) [12]. По данным А.С. Norrakiah и др. (2009) при исследовании сырого молока, *E. sakazakii* были выделены в 63 % случаев, из пастеризованного молока в 13 % [5]. Salmon и др. (1998) выявляли бактерии *E. sakazakii* с выделений вымени больных маститом коров [13]. Н. Л. Muytjens (1990), М. С. Kandhai (2010) и др. не обнаружили бактерии *Enterobacter sakazakii* в сыром коровьем молоке [6, 9, 10, 12]. Этот микроорганизм был изолирован из продуктов питания молочных продуктов (сыр, масло), мяса и мясных продуктов, фруктов, специй, напитков [9–11].

### 2. 4. Эпидемиологические данные

По мнению большинства авторов, особую эпидемиологическую опасность представляют сухие молочные смеси для детского питания. В конце XX столетия в Великобритании, Бельгии, Франции, США, Нидерландах начинают регистрировать случаи смертности среди новорожденных детей с признаками менингита, сепсиса и некротического энтероколита, которые связывают со скормливанием сухих молочных смесей, с которых был выделен микроорганизм – *E. sakazakii*. Несмотря на то, что чаще заболевания, вызванные этими бактериями возникает у младенцев до года, есть сведения про случаи заболевания взрослых людей с признаками сепсиса, вызванного *E. sakazakii* [2, 4, 12].

Из выше приведенного обзора литературы следует, что бактерия *E. sakazakii* заслуживает внимания ученых, чтобы ее исследовать, и особенно в пищевой цепи сухих детских смесей. Началом этой пищевой цепи является сырье сухих молочных смесей – сырое молоко в котором *E. sakazakii* может существовать, и, что особенно опасно, что имеются сообщения о том, что этот микроорганизм может выживать после пастеризации молока. Эти факты подтверждают актуальность изучения *E. sakazakii* как вообще, так и в сыром молоке, в частности.

## 3. Цель и задачи исследования

Целью наших исследований было выделение бактерий *Enterobacter sakazakii* из сырого молока, полученного на молочных фермах Украины и изучение их характеристик. В задачи исследований входило:

1. Идентификация бактерий *E. sakazakii* в сыром молоке, изучение их морфологических и биохимических свойств.
2. Определение уровня контаминации бактериями *E. sakazakii* сырого молока наивысших сортов, которое идет на производство детского питания.
3. Изучение динамики роста и развития *E. sakazakii* в сыром молоке в процессе его хранения.
4. Определение терморезистентности *E. sakazakii*.

наличия *E. sakazakii*. Из этих проб было выделено 5 штаммов типичных для этого вида микроорганизмов. Все выделенные штаммы *E. sakazakii* росли в аэробных условиях при температуре  $36 \pm 1$  °C и  $24 \pm 1$  °C в зависимости от среды культивирования. Характеристика роста на питательных средах *E. sakazakii* представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика роста бактерий *E. sakazakii* на питательных средах

Питательная среда	Характеристика роста на питательной среде
Бульон обогащения для бактерий рода <i>Enterobacteriaceae</i> по Масселю	Изменение внешнего вида питательной среды с прозрачно-зеленого на мутновато-желтый с осадком на дне пробирки и образованием пленки на поверхности на протяжении 12–24 часов при температуре $36 \pm 1$ °C.
Глюкозо-желчный агар с кристаллическим фиолетовым и нейтральным красным	Образование темно-красных колоний через 20–24 часов культивирования при температуре $36 \pm 1$ °C
среда Эндо температура	Образование малиновых колоний через 18–24 часов культивирования при температуре $36 \pm 1$ °C
Триптон-соевый агар	Образование колоний желтого цвета размером в диаметре 1–2 мм через 24 часа культивирования (60 %), и диаметром 2–3 мм – через 48 часов (40 %) при температуре $24 \pm 1$ °C.

#### 4. Идентификация *E. sakazakii* в сыром молоке для производства сухих детских смесей

Пробы молока отбирали с молочных танков на фермах с соблюдением правил асептики. Было исследовано 475 проб молока. Изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств выделенных штаммов бактерий *E. sakazakii* проводили в соответствии с действующими национальными и международными методиками [14, 15].

Индикацию *E. sakazakii*, определение общего количества микроорганизмов и количества микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* в сыром молоке проводили также проводили в соответствии действующих национальных и международных методик, кроме того использовали собственные методические рекомендации «Методы определения и подсчета количества бактерий *Enterobacter (Cronobacter) sakazakii* », за основу которых взято ISO/TS 22964/ IDF/RM 210 (2006) [15]: в такой последовательности:

– обогащения посевов на жидкой среде (бульон обогащения для бактерий рода *Enterobacteriaceae* по Масселю);

– определение подозрительных колоний (похожие на колонии *E. sakazakii*) на глюкозо-желчном агаре с кристаллическим фиолетовым и нейтральным красным;

– подтверждение принадлежности подозрительных колоний к *E. sakazakii* путем их посева на селективную среду триптон-соевый агар. Колонии которые имели на триптон-соевом агаре желтый цвет, считали характерными для *E. sakazakii*.

Биохимическую видовую идентификацию выделенных штаммов *E. sakazakii* проводили на компьютеризированной тест-системе Rapid 20E производства «Bio Merieux» (Франция).

Подготовку культуры бактерий *E. sakazakii*, для определения их электронного строения проводили, применяя запатентованную нами методику, которая заключается в фиксации суточной агаровой культуры микроорганизмов фиксатором Трумпса 4F:1G с последующим обезвоживанием в разных концентрациях этилового спирта. Морфологическую структуру бактерий изучали с помощью растрового электронного микроскопа марки РЕМ-106и (2007) [16].

#### 5. Результаты изучения культуральных и биохимических свойств выделенных *E. sakazakii*

На первом этапе исследований было проведено исследование 125 проб молока для установления

на бульоне обогащения по Масселю у 80 % из выделенных штаммов *E. sakazakii* рост был отмечен уже через  $14 \pm 2$  часов культивирования, но в то же время 20 % штаммов проявляли рост не раньше чем, через  $20 \pm 2$  часов культивирования.

Характерными биохимическими свойствами для бактерий *E. sakazakii* являются: отрицательная реакция на оксидазу, D-сорбитол и индол, ферментация глюкозы, сахарозы, арабинозы и других сахаров.

Все выделенные штаммы были грамтрицательными короткими подвижными палочками с закругленными концами, не имели спор и капсул. В мазках бактерии размещались поодиночке или густыми скоплениями. Штамм *E. sakazakii* под названием *Enterobacter sakazakii* M1 (регистрационный № 503, свидетельство на штам от 17.11.2010 г.) был депонирован в коллекции Национального центра штаммов микроорганизмов Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов (г. Киев) [17].

При изучении бактерий *E. sakazakii* на ультраструктурном уровне было определено, что длина бактерий составляет до 3 мкм, а ширина до 1 мкм (рис. 2, а, б).

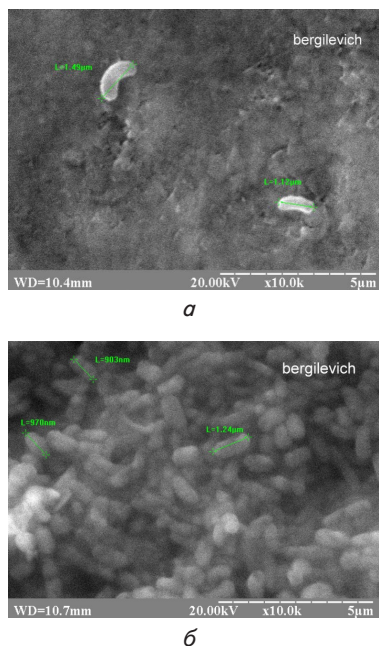


Рис. 2. Клетки *E. sakazakii* под растровым электронным микроскопом: а – отдельная клетка; б – скопления клеток

## 6. Результаты изучения количества *E.sakazakii* в сыром молоке в процессе его хранения и транспортировки

На втором этапе исследований было исследовано 360 проб сырого молока с разным уровнем общего бактериального обсеменения, в соответствии с градацией по сортам: экстра, высший, первый и второй. Из общего количества исследованных проб, в 86 были выявлены бактерии *E.sakazakii*, что соответствует 22,3 %. При этом, установлено, что среди всех положительных проб относительно *E. sakazakii*, этот микроорганизм чаще был идентифицирован в пробах молока первого и второго сорта и меньше всего – в пробах молока экстра сорта. Частота выявления бактерий *E. sakazakii* составляет: в молоке второго сорта – 24,7 %, первого сорта – 23,3 %, высшего – 22 %, а сорта экстра – 16 %. Было установлено, что количество бактерий *E. sakazakii* в пробах молока было разным и зависело от сорта молока. Наименьшая концентрация этих бактерий была в пробах сырого молока экстра сорта которая составляла от  $17 \pm 0,3$  КОЕ/см<sup>3</sup> до  $169 \pm 22,4$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

В технологии производства сухих молочных детских смесей сырое молоко используется после его хранения от 12 до 24 часов. Очень важно знать динамику роста и развития в нем микроорганизмов в процессе хранения. Мы определили динамику роста и развития микроорганизмов в молоке наивысших сортов, предназначенных для производства детских смесей. При этом определяли динамику роста и развития всех микроорганизмов которые формируют общее бактериальное загрязнение молока и бактерий *E. sakazakii* при хранении. Изменение количества вышеуказанных микроорганизмов определяли в зависимости от температуры хранения, которая обычно применяется как производителями сырого молока, так и производителями детских смесей. Результаты определения динамики роста и развития

микроорганизмов всех видов, которые формируют общее бактериальное загрязнение молока при его хранении, представлены на рис. 3

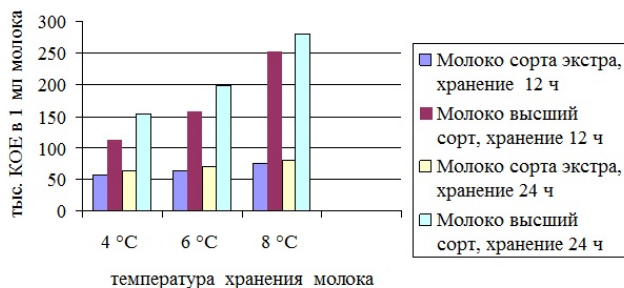


Рис. 3. Динамика роста и развития общего количества микроорганизмов сырого молока в процессе хранения

Данные диаграммы свидетельствуют о том, что общее бактериальное загрязнение молока, как сорта экстра так и высшего сорта, при хранении молока при температуре 4 °C на протяжении от 12 до 24 часов было более низким по сравнению с другими изучаемыми нами температурными режимами. Необходимо отметить, что в молоке-сырье для детского питания показатель общего бактериального загрязнения не должен превышать 100 тыс. КОЕ/см<sup>3</sup>. Как следует из наших данных, этому показателю может соответствовать только молоко экстра сорта. Молоко высшего сорта необходимо хранить при температуре 4 °C не больше 6 часов. Молоко экстра сорта сохраняет высокие микробиологические показатели в отношении общего бактериального загрязнения при хранении на протяжении 24 часов при температуре от 4 °C до 8 °C. Мы изучили изменение количества бактерий *E. sakazakii* в процессе хранения и транспортировки сырого молока. Результаты определения динамики роста и развития бактерий *E. sakazakii* в молоке сортов экстра и высшего приведены на рис. 4, 5.

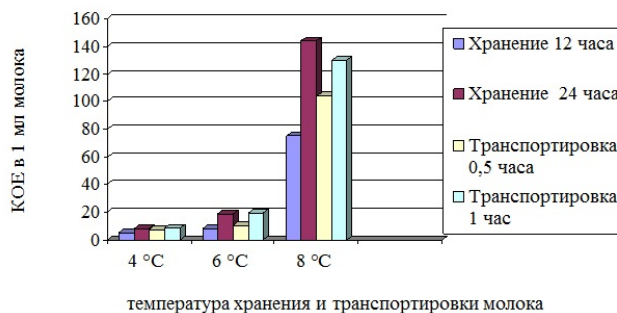


Рис. 4. Динамика количества *E. sakazakii* в сыром молоке экстра сорта в зависимости от условий хранения и транспортировки

Как видно из диаграммы, представленной на рис. 3 в сыром молоке экстра сорта количество бактерий *E. sakazakii* при его хранении от 12 до 24 часов, при температуре от 4 °C до 6 °C составляет от 3 до 20 КОЕ /см<sup>3</sup>. Транспортировка молока экстра сорта при этой температуре предупреждает интенсивное повышение количества бактерий *E. sakazakii*.

Существенное увеличение количества микроорганизмов *E. sakazakii* в молоке сорта экстра и высшего

при его хранении и транспортировке на протяжении 12–24 часов, мы отмечали при температуре 8 °С (рис. 4). В этом случае максимальное количество *E. sakazakii* было в пределах от 145±15 КОЕ/см<sup>3</sup> (молоко сорта экстра) и 1100±32 КОЕ/см<sup>3</sup> (молоко высшего сорта). Эти результаты свидетельствуют особенно высокую динамичность количественного состава исследуемых нами микроорганизмов в сыром молоке наивысших сортов при холодильном хранении и транспортировке при температуре 8 °С.

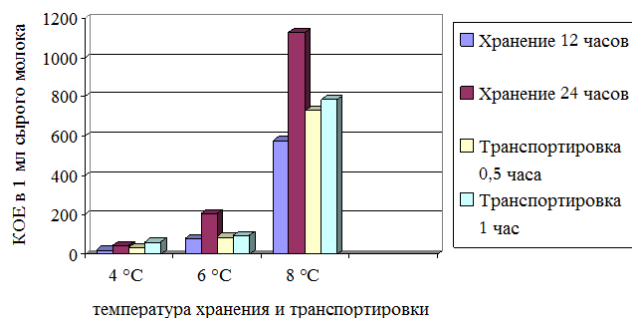


Рис. 5. Динамика количества *E. sakazakii* в сыром молоке высшего сорта в зависимости от условий хранения и транспортировки

Эта динамика роста и развития микроорганизмов приводит к очень высоким показателям количественного обсеменения сырого молока бактериями *E. sakazakii* и повышает уровень его микробиологической опасности. Поскольку отечественным законодательством разрешено использовать в технологии молокопродуктов молоко сырое, хранимое при температуре от 4 °С до 10 °С, необходимо знать условия его обезвреживания от *E. sakazakii*. Мы изучили терморезистентность 8 штаммов *E. sakazakii* при различных температурах пастеризации молока от 58 °С, до 74 °С. Было установлено, что большинство исследованных штаммов (5 штаммов) имели низкий уровень терморезистентности и погибли через 1 минуту при

температуре 58 °С, но два штамма из общего количества изучаемых выдерживали эту температуру на протяжении 3-х минут и один штамм утрачивал свою жизнеспособность при температуре пастеризации 66 °С через 1 минуту.

## 7. Выводы

Идентифицировано бактерию *Enterobacter sakazakii* в сыром молоке коров на основании изучения культуральных, биохимических, морфологических и электронномикроскопических характеристик этого вида микроорганизма.

Установлено, что только в 22,3 % исследованных проб сырого молока была выделена бактерия *E. sakazakii* и ее идентификация была в прямо пропорциональной зависимости от общей микробной обсемененности сырого молока: в молоке второго сорта эти бактерии выделяли в 24,7 % случаях, первого сорта – 23,3 %, высшего – 22 %, а сорта экстра – в 16 % случаев.

В охлажденном сыром молоке коров в процессе хранения и транспортировки бактерии *E. sakazakii* растут и размножаются: наиболее интенсивный рост отмечен при температуре 8 °С, при этом количество этих бактерий может быть от 140 до 1500 КОЕ/см<sup>3</sup>.

Изучаемые штаммы *E. sakazakii* проявляли невысокую терморезистентность разной степени при нагревании молока. Семь из восьми изучаемых штаммов погибали при подогревании молока до температуры 58 °С на протяжении от 1 до 3-х минут, а один выдерживал эту температуру и его жизнеспособность пропала при температуре пастеризации молока 66 °С через 1 мин.

При использовании молока-сырья для производства сухих детских смесей не обходимо исключать попадание бактерий *Enterobacter sakazakii* в готовый продукт путем постоянного контроля за температурой хранения молока, которая оптимально должна быть 4 °С и температурой пастеризации, которая не должна быть ниже 70 °С.

## Литература

1. Bowen, A. B. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants [Text] / A. B. Bowen, C. R. Braden. – Emerg. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 12. – P. 1185–1189.
2. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report. – MRA Series 6. – World Health Organization, 2004. – 45p.
3. The WTO Sanitary and Phytosanitary Measures. Agreement and SPS developments and activities around the world. – WTO, 2004. – 45p.
4. Fiore, A. *Enterobacter sakazakii*: epidemiology, clinical presentation, prevention and control [Text] / A. Fiore, M. Casale, P. Aureli. – Ann. Ist. Super. Sanit. – 2008. – Vol. 44, № 3. – P. 275–280.
5. Norrakiah, A. S. *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*, *Enterobacteriaceae* and aerobic plate count in raw and pasteurized milk: 1st International Conference on *Cronobacter* [Text] / A. S. Norrakiah, S. Md Z. Noorzatul. – Lim Yen Yi, 2009. – Poster 56.
6. Kandhai, M. C. A study into the occurrence of *Cronobacter* spp. in The Netherlands between 2001 and 2005 [Text] / M. C. Kandhai, A. E. Heuvelink, M. W. Reij // Food Control. – 2010. – Vol. 21, №8. – P. 1127–1136.
7. Buma, R. Isolation and characterization of pathogenic bacteria, including *Escherichia coli* O157:H7, from flies collected at a dairy farm field [Text] / R. Buma, H. Sanada, T. Maeda et al. // Med. Entomol. Zool. – 1999. – Vol. 50. – P. 313–321.
8. Iversen, C. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and description of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonicus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies I. [Text] / C. Iversen, A. Lehner, N. Mullane // BMC Evol Biol. – 2007. – № 7. – P. 64–67.

9. Drudy, D. Characterization of a collection of Enterobacter sakazakii isolates from environmental and food sources [Text] / D. Drudy, M. O'Rourke, M. Murphy et al. // Int. J. Food Microbiol. – 2006. – Vol. 110, № 2. – P. 127–134.
10. Friedemann, M. Enterobacter sakazakii in food and beverages (other than infant formula and milk powder) [Text] / M. Friedemann // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – Vol. 116. – P. 1–10.
11. Skladal, P. Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk as L-lactate biosensor [Text] / P. Skladal, M. Mascini, C. Salvadori, G. Zannoni // Enzyme Microb. Technol. – 1993. – Vol. 15. – P. 508–512.
12. Muijtjens, H. L. Enterobacter sakazakii meningitis in neonates: causative role of formula [Text] / H. L. Muijtjens, L. A. Kollee / Pediatric Infectious Disease. – 1990. – Vol. 9. – P. 372–385.
13. Salmon, S. A. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark [Text] / S. A. Salmon, J. L. Watts, F. M. Aarestrup et al. // J. Dairy Sci. – 1998. – Vol. 81. – P. 570–578.
14. Berhilevych, A. Methods of isolation and counting of bacteria Enterobacter (Cronobacter) sakazakii [Text] / A. Berhilevych, V. Kasyanchuk, T. Garkavenko, NA Mezhyńska // Approved scientific methods Council of State Committee for Veterinary Medicine of Ukraine, 2010 - 38 p.
15. ISO/TS 22964:2006, Milk and milk products - Detection of Enterobacter sakazakii.
16. Patent of Ukraine for useful model № 86516. Method of fixing microorganisms of the fixator Trumpsa 4F: 1G to study their ultrastructure under scanning electron mikrosokpom [Text] / Berhilevych OM, Kasyanchuk VV Berhilevych OO, Mohutova VF // applicant Sumy NAU. - Zavl. 26/11/2012; publ. 1. 01.2014 Bull. Number 1. - 5 seconds.
17. Patent of Ukraine for useful model № 86516. Method of fixing microorganisms lock Trumpsa 4F: 1G to study their ultrastructure under scanning electron mikrosokpom [Text] / Berhilevych O., Kasyanchuk V., Berhilevych O., Mohutova V. // applicant Sumy NAU. - Zavl. 26/11/2012; publ. 1. 01.2014 Bull. Number 1. - 5 seconds.

**Вивчено механізм утворення комплексу флаваноїдів з іонами алюмінію. На основі від'ємних низьких значень енергії Гіббса встановлено, що комплексоутворення є природним явищем. Вперше визначено термодинамічні властивості флаваноїдів листків стевії (*Stevia rebaudiana Bertoni*) сушеної та розроблено номограму залежності вмісту флаваноїдів від ймовірності ступеня комплексоутворення. У результаті проведених досліджень визначено антиоксиданту здатність флаваноїдів, що містяться в листках стевії**

**Ключові слова:** листки стевії, флаваноїди, ступінь комплексоутворення, енергія Гіббса, константа стійкості

**Изучен механизм образования комплекса флаваноидов с ионами алюминия. На основе отрицательных низких значений энергии Гиббса установлено, что комплексообразование является природным явлением. Впервые определены термодинамические свойства флаваноидов листьев стевии (*Stevia rebaudiana Bertoni*) сушеных и разработана номограмма зависимости содержания флаваноидов от возможности комплексообразования. В результате проведенных исследований определена антиоксидантная способность флаваноидов, которые содержатся в листьях стевии**

**Ключевые слова:** листья стевии, флаваноиды, степень комплексообразования, энергия Гиббса, константа стойкости

УДК 633.3:658.562

# STUDY OF THERMODYNAMICS OF COMPLEX FORMATION OF FLAVONOIDS OF STEVIA (*STEVIA REBAUDIANA BERTONI*) LEAVES

**I. Kuznetsova**

Candidate of Engineering Sciences,  
Senior researcher

Sector of researches and control of  
stevia quality indexes

Institute for Bioenergy Crops and  
Sugar Beet of NAAS

Klinichna str., 25, Kiev, Ukraine, 03141

E-mail: ingaV@ukr.net

## 1. Introduction

Flavonoids are natural herbal compounds, which show biological, antioxidant, protective, antiradical, antibacterial, antiviral, antiinflammatory and vasodilating abilities. A separate group is represented by flavolignans, which

are the condensed products of dihydroquercetin with lignin, show biological activity, the basic of which is hepatoprotective. One of such abilities is forming complexes with metals (e. g. iron and copper) that reduces the content of metals in a human body and reduces the generation rate of reactive oxygen species, thus protecting