

ИННОВАЦИОННЫЙ ЕВРАЗИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛЬТЕТ МАГИСТЕРСКОГО И
ВТОРОГО ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

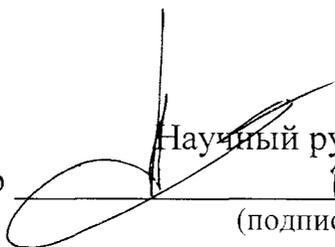
Кафедра «Прикладная биотехнология»

Магистерская диссертация

6N0701 «Биотехнология»

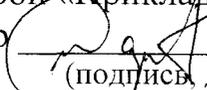
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗО- И ТЕРМОФИЛЬНЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ПРОЦЕССЕ МОЛОЧНОКИСЛОГО БРОЖЕНИЯ

Исполнитель  18.06.2009г. В.Ю. Дорденко
(подпись, дата)

Профессор  19.06.2009г. Е.Б. Никитин
Научный руководитель
(подпись, дата)

Допущена к защите:

Зав.кафедрой «Прикладная биотехнология»

Профессор  М.С. Омаров
(подпись, дата)

Павлодар 2009

Министерство образования и науки Республики Казахстан
Инновационный Евразийский Университет

Магистратура

Направление подготовки _____

6.1.07.01 Биотехнология (ЦИФР. НАИМЕНОВАНИЕ)

Кафедра _____

Прикладная биотехнология

ЗАДАНИЕ

на выполнение магистерской диссертации

Магистранту (ке) _____

Дордеева Виктория Сергеевна (Фамилия, имя, отчество)

Тема диссертации _____

Изучение влияния симбиотических мезо- и периферических молочнокислых бактерий в процессе молочнокислого брожения

утверждена приказом по университету от " _____ " _____ 200 _____ г. № _____

Срок сдачи законченной диссертации _____

15 июня 2009

Исходные данные к диссертации _____

Среди микроорганизмов, входящих в состав заквасок для приготовления кисломолочных продуктов, могут проходить в процессе совместного культивирования как симбиотические так и антагонистические взаимодействия, что может влиять на качество получаемого продукта

Перечень подлежащих разработке в магистерской диссертации вопросов или краткое содержание:

- Ознакомить с видами микроорганизмов, участвующих в процессе кисломолочного брожения, описать процесс брожения, методы культивирования
- Изучить взаимодействия между мезо- и периферическими микроорганизмами при совместном культивировании на сахаросбраживающих и сбраживающих питательных средах

в) Исследовать основные свойства многокомпонентных баббл в процессе их соудавивания на различных этапах технологического процесса

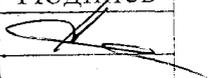
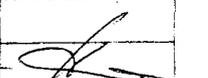
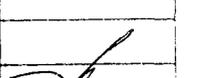
Перечень графического материала с точным указанием обязательных чертежей

Таблицы, характеризующие свойства микроструктур при их осветлении
 фотографии мезов микроструктур

Рекомендуемая основная литература

Киселева Е.И. Место и значение многокомпонентных баббл в биосфере. Микробиол. журн. 1992, 7-57
 Стоянова Л.Г., Фригалева З.А. Сравнительный анализ строения многокомпонентных баббл // Микробиология, 2000, 7-69
 Баранова Л.А. Свойства многокомпонентных баббл и их применение в пищевой промышленности, 1975

Консультации по диссертации, с указанием относящихся к ним разделов диссертации

Раздел	Консультант	Сроки	Подпись
Обзор литературы	Киселева Е.И.	апрель 2009	
Метод микробиологических исследований	Киселева Е.И.	май 2009	
Собственные исследования	Киселева Е.И.	май 2009	

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация выполнена на семидесяти восьми страницах, данные анализа результатов работы приводятся в виде одного приложения, двадцати трех таблиц и трех рисунков. Количество использованных источников равно шестидесяти шести.

Наиболее употребляемые в работе термины и терминосочетания – ключевые слова: микроорганизм, молочнокислые бактерии, закваска, бактериальные концентраты, культивирование, посев, мазок, окраска, исследование, микрокопирование, антагонизм, синергизм, паразитизм.

Целью наших исследований было изучение особенностей сокультивирования микроорганизмов, используемых в производстве кисломолочных продуктов.

При выполнении практической части работы применялись микробиологические и бактериологические исследования.

Анализируя полученные результаты выполненной работы пришли к выводу, что при культивировании при различных температурах и сроках хранения в искусственных питательных средах проявляются симбиотические и антагонистические взаимодействия между отдельными компонентами микробных заквасок.

Считаем, что полученные результаты при выполнении практической части работы имеют определенное научное и практическое значение.

В процессе выполнения магистерской диссертации были изучены данные о характере симбиотических и антагонистических взаимоотношений компонентов микробных заквасок между собой, что необходимо учитывать при разработке технологии приготовления кисломолочных продуктов, отработке оптимальных и предельно допустимых режимов их хранения.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	8
Глава 1 Обзор литературы	
1.1 Характеристика микроорганизмов, используемых в производстве кисломолочных продуктов	10
1.1.1 Молочнокислые стрептококки	11
1.1.2 Молочнокислые палочки	14
1.1.3 Дрожжи	16
1.1.4 Пропионовокислые бактерии	17
1.1.5 Бифидобактерии	18
1.2 Взаимоотношения между микроорганизмами в процессе их жизнедеятельности в молоке и молочных продуктах	20
1.2.1 Антагонизм или антибиоз	20
1.2.2 Синергизм и симбиоз	22
1.2.3 Метабиоз	23
1.2.4 Паразитизм	23
1.3 Процессы брожения, вызываемые микроорганизмами, используемыми в производстве кисломолочных продуктов	24
1.3.1 Молочнокислое брожение	28
1.3.1.1 Гомоферментативное молочнокислое брожение	28
1.3.1.2 Гетероферментативное молочнокислое брожение	29
1.3.2 Спиртовое брожение	30
1.4 Изучение процессов культивирования молочнокислой микрофлоры в молочной смеси с различным использованием сухих веществ	31
1.5 Особенности культивирования молочнокислых бактерий в молочной смеси	36
1.6 методы культивирования микроорганизмов, используемых в производстве кисломолочных продуктов	44
1.6.1 Питательные среды	44
1.6.2 Выделение чистой культуры	48
1.7 Приготовление бактериальных препаратов и методы окраски бактерий	51
1.7.1 Приготовление бактериальных препаратов	51
1.7.2 Метод простой окраски	54
1.7.3 Сложные методы окраски микроорганизмов	54
1.8 Микроскоп и микроскопические методы исследования	57
1.8.1 Световая микроскопия	57

Глава 2 Собственные исследования	59
2.1 Материалы и методы	59
2.2 Цели и задачи	62
2.3 Полученные результаты и их интерпретация	62
Выводы и предложения	74
Список использованных источников	75
Приложения	79

Нормативные ссылки

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

- ГОСТ 3622 Отбор проб и подготовка их к испытанию.
- ГОСТ 13928 Молоко и сливки заготавливаемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу.
- ГОСТ 1770-74Е Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки.
- ГОСТ 26669 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов.
- ГОСТ 26670 -91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.
- ГОСТ 26781 Методы определения рН.
- ГОСТ 26809 Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу.
- СП 1.2.006 Санитарные правила по безопасности работ с микроорганизмами.
- ГОСТ 4.180-85 СПКП. Меры массы. Номенклатура показателей.
- ГОСТ 4517-87 Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе.
- ГОСТ 4919.2-77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов.
- ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.
- ГОСТ 7328-82Е Меры массы общего назначения и образцовые. Технические условия.
- ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.
- ГОСТ 13718-68 Весы крутильные (торсионные). Методы и средства поверки.
- ГОСТ 14919-83Е Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия.
- ГОСТ 17206-96 Агар микробиологический. Технические условия.
- ГОСТ 17227-71 рН-метры, таблетки для приготовления рабочих буферных растворов.
- ГОСТ 17299-78 Спирт этиловый технический. Технические условия.
- ГОСТ 17356-89 Горелки на газообразном и жидком топливах. Термины и определения.
- ГОСТ 19126-79Е Инструменты медицинские металлические. Общие технические условия.
- ГОСТ Аппараты и установки сушильные. Классификация.
- ГОСТ 29112-91 Среды питательные плотные. Общие технические условия.
- ГОСТ 30204-95 Приборы холодильные бытовые. Эксплуатационные характеристики и методы испытаний.

Определения, обозначения и сокращения

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Морфология бактерий - это раздел бактериологии, который изучает форму и взаиморасположение клеток, их структуры, строение бактериальной клетки и её отношение к красителям.

- Бактерии — прокариотические, преимущественно одноклеточные микроорганизмы, которые могут также образовывать ассоциации (группы) сходных клеток, характеризующиеся клеточными, но не организменными сходствами.

- Брожение – распад молочного сахара под действием микроорганизмов.

- Микроорганизмы — это организмы, невидимые невооруженным глазом из-за их незначительных размеров.

- Пребиотики — вещества, способные оказывать благоприятный эффект на организм хозяина через селективную стимуляцию роста и (или) активности представителей нормальной микрофлоры кишечника.

- Пробиотики – продукты, содержащие в своем составе живые микроорганизмы, пищевые добавки микробного происхождения, проявляющие свои позитивные эффекты на организм человека через регуляцию кишечной микрофлоры.

- Синбиотики - рациональной комбинацией пробиотиков и пребиотиков. Получаемые в результате препараты, названные

2. В настоящей работе применяют следующие обозначения единиц измерений: %; г; °Т; °С; ч; мкм; мг/кг; см³; мг%; МПа; мин; ч; сут; л; см; мм.

3. В настоящей работе применяют следующие сокращения:

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ЖПС – жидкие питательные среды

КОЕ/г – колонии образующая единица в 1 г продукта

МПА – мясопептонный агар

МПБ - мясопептонный бульон

pH – кислотность раствора

СА- сывороточный агар

СБ – сывороточный бульон

ТПС – твердые питательные среды

ФП – функциональное питание.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка доступных продуктов здорового питания – важная и актуальная задача государственной политики, позволяющая укрепить здоровье и проводить профилактику заболеваний среди населения. При этом ведущая роль принадлежит молочным продуктам, микрофлора которых способствует регуляции многих физиологических реакций и процессов.

Поэтому наряду с традиционным подходом к роли пищевых продуктов в здоровье человека в последние годы получило развитие новое направление – так называемое функциональное питание (ФП).

В отличие от рационального питания подразумевается использование таких продуктов естественного происхождения, которые при систематическом употреблении оказывают определенное регулирующее действие на организм в целом или на его определенные системы и органы, как биокорректор кровяного давления, уровня холестерина и т.п.

К наиболее распространенным и массовым продуктам относятся прежде всего продукты, способствующие поддержанию и восстановлению микробной экологии человека и в первую очередь микрофлоры его желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

По международной классификации в зависимости от способа восстановления микрофлоры хозяина принято различать продукты: пробиотические; пребиотические; синбиотические.

Пробиотические – содержат в своем составе живые микроорганизмы, пищевые добавки микробного происхождения, проявляющие свои позитивные эффекты на организм хозяина через регуляцию кишечной микрофлоры. В настоящее время подобные продукты представлены на нашем рынке в широком ассортименте.

Пребиотическими называют продукты, содержащие в своем составе **пребиотики** — вещества, способные оказывать благоприятный эффект на организм хозяина через селективную стимуляцию роста и (или) активности представителей нормофлоры кишечника. Так, в РФ разработана серия молочных продуктов с лактулозой марки «Божья коровка».

Однако максимальный позитивный эффект можно получить рациональной комбинацией пробиотиков и пребиотиков. Получаемые в результате препараты, названные **«синбиотики»**, могут быть использованы в качестве основы для производства синбиотических продуктов ФП. Примером могут служить кисломолочные продукты серии «Бифилюкс» с концентратом лактулозы «Лактусан», разработанные в РФ синбиотические продукты [1].

Можно подобрать набор пищевых продуктов, который будет в наилучшей степени соответствовать особенностям метаболического статуса организма и обеспечивать минимальную вероятность возникновения болезней, к которым организм предрасположен, судя по его биохимическим особенностям. Например, для лиц с предрасположенностью к атеросклерозу и раку толстого кишечника особенно полезной может оказаться растительная пища, в то время как при заболеваниях щитовидной железы она

нежелательна. Более того, индивидуальный пищевой режим, основанный на тщательном изучении процессов обмена у данного больного, должен быть основой терапии многих Пит наследственных, так и ненаследственных заболеваний. Соответствующий уровень развития методов определения биохимической индивидуальности позволит со временем отражать сведения о ней в специальной карте и соответственно этим данным рекомендовать питание, учитывающее метаболические особенности данного человека.

Интенсивное развитие прикладной биотехнологии открывает широкие перспективы для производства кисломолочных продуктов нового поколения. Это продукты, вырабатываемые с применением пробиотиков - моно-или смешанной культуры микроорганизмов, которые при использовании человеком благотворно влияют на свойства природной микрофлоры. Такие закваски обладают особыми диетическими и терапевтическими свойствами: они продуцируют антимикробные вещества (бактериоцины, молочную, уксусную кислоты и др.), участвуют в подавлении нежелательной микрофлоры кишечника, развиваются на слизистой оболочке, жизнеспособны в пищеварительном тракте.

При подборе культур для продуктов лечебно-профилактического назначения больше внимание обычно уделяется лактобациллам и бифидобактериям как основным представителям нормальной микрофлоры кишечника, известно также использование пропионовокислых и уксуснокислых бактерий при производстве кисломолочных продуктов с лечебными свойствами.

Следует отметить, что в современной биотехнологии широко применяются симбиотические закваски, ассоциаты и консорциумы микроорганизмов, позволяющие повышать биологическую ценность продукта, улучшать органолептические и реологические показатели [2].

Цель магистерской диссертации – изучение особенностей сокультивирования микроорганизмов, используемых в производстве кисломолочных продуктов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи исследований**:

- ознакомиться с видами микроорганизмов, используемых в производстве кисломолочных продуктов;
- исследовать основы процесса брожения;
- ознакомиться с существующими методами культивирования, выделения чистой культуры, окраски и микроскопирования;
- изучить взаимоотношения между микроорганизмами при совместном культивировании на искусственных и естественных питательных средах;
- исследовать основные свойства молочнокислых бактерий в процессе их культивирования и сокультивирования на различных питательных средах.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика микроорганизмов, используемых в производстве кисломолочных продуктов

По рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения ФАО/ВОЗ продукты, содержащие более 10 млн. жизнеспособных клеток в 1 г, могут применяться в качестве лечебно-профилактических в отношении желудочно-кишечных заболеваний.

Нормальная микрофлора, заселяющая кишечник человека, имеет важное значение для регулирования оптимального уровня метаболических процессов, протекающих в организме, а также для создания высокой колонизационной резистентности кишечного тракта к условно патогенным микроорганизмам. Многообразие функций, выполняемых сапрофитными микроорганизмами, определяют их важную роль в поддержании нормальной жизнедеятельности человека. Однако в последние годы отмечается тенденция к росту патологических состояний, сопровождающихся нарушением макроэкологического равновесия кишечника, что практически во всех случаях требует фармакологической коррекции. Впервые на существенную роль нормальной микрофлоры кишечника в жизнедеятельности человека, поддержании его здоровья указал выдающийся русский ученый И.И.Мечников. Он впервые предложил использовать молочнокислую диету в профилактике заболеваний ЖКТ. Микрофлора молочнокислых продуктов в большинстве, как правило, является транзитной и не колонизируется в кишечнике. Поэтому в последние годы все шире используются бифидо- и лактобактерии, являющиеся пробиотиками, т.е. биологическими препаратами, содержащими живые, ослабленные штаммы нормальной микрофлоры кишечника [3].

Из данных таблицы 1 видно, что молочнокислая микрофлора имеет межвидовые и внутривидовые различия [4,5].

Гелеобразующая способность выражена у молочнокислых термофильных палочек и молочнокислых стрептококков *Str. lactis*. Более слабо она проявляется у *L. plantarum* и *Str. diacetylactis*.

По кислотообразующей способности их можно условно разделить на три группы: сильные кислотообразователи (*L. lactis*, *L. helveticus*, *Str. lactis*, *Str. cremoris*), средние кислотообразователи (*Str. acetoinicus*) и слабые кислотообразователи (*Str. diacetylactis*, *Str. paracitrovorus*, *Lbm. casei*).

Таблица 1 - Свойства молочнокислых бактерий

Вид молочнокислых бактерий	Способность к гелеобразованию, мин	Кислотообразующая способность. °Т	Оптимальная температура роста. °С
<i>Str.lactis</i>	260-450	95-115	25-32
<i>Str.diacetilactis</i>	720-900	80-105	28-32
<i>Str.cremoris</i>	350-500	105-120	22-30
<i>Str.citrovorus</i>	—	40-50	21-25
<i>Str.paratitrovorus</i>	320-450	70-80	21-25
<i>Str.acetoicus</i>	320-450	80-100	28-32
<i>Str.thermophilus</i>	200-300	100-140	40-45
<i>L.lactis</i>	200-350	150-180	40-45
<i>L.belveticum</i>	200-350	240-300	40-45
<i>L.bulgancum</i>	150-300	160-320	40-45
<i>L.acidophium</i>	150-300	180-320	37-40
<i>L.plantarum</i>	500-800	150-200	28-32
<i>L.casei</i>		80-180	28-32
<i>L.difidum</i>			35-37
<i>Propionibacteriu shermanii</i>		160-170	30-35

1.1.1 Молочнокислые стрептококки

Молочнокислые стрептококки разделяют на гомо- и гетероферментативные. Гомоферментативные стрептококки в процессе своей жизнедеятельности сбразивают лактозу до молочной кислоты, тогда как гетероферментативные микроорганизмы при брожении образуют, кроме молочной кислоты, диацетил, этиловый спирт, летучие кислоты и другие ароматобразующие соединения.

К гомоферментативным стрептококкам относят мезофильные стрептококки - *Str. lactis*, *Str. cremoris*, а к гетероферментативным - *Str. diacetylactis*, *Str. acetoinicus*, *Str. paracitrovorus* (*Leuconostoc dextranum*), *Str. Citrovorus* (*Leuconostoc citrovorum*). Термофильный молочнокислый стрептококк *Str. thermophilus* относят к гомоферментативным бактериям, однако многие его штаммы продуцируют при брожении ароматические соединения [6].

Молочнокислый стрептококк *Streptococcus lactis* - обычно это диплококки или короткие цепочки. Активный кислотообразователь, образует ровный плотный сгусток колющейся консистенции при свертывании молока. Вкус и запах сквашенного молока чистый, кисломолочный. Сбразивает лактозу,

мальтозу, декстрины; синтезирует антибиотик - низин - ингибитор маслянокислых бактерий; при увеличении концентрации растворимых веществ повышает осмотическое давление, при создании благоприятных условий для развития микроорганизмов подавляет патогенные микроорганизмы, повышает стойкость продукта.

Он является первым микроорганизмом, который выделен в чистой культуре (в 1873 г. Листером). *Streptococcus lactis* встречается на растениях. Определенные штаммы, которые не образуют слизи и ароматических веществ с неприятным запахом, как многие дикие штаммы, входят в состав заквасок. Оптимальная температура развития *Streptococcus lactis* — около 30°C. Отдельные штаммы, однако, могут также размножаться, но медленно, при низких температурах (ниже 7°C). При температуре 25°C *Streptococcus lactis* за счет образования молочной кислоты снижает показатель pH примерно до 4,5 и молоко свертывается вследствие выпадения казеина [7].

Сливочный стрептококк *Streptococcus cremoris* - клетки его размещаются в виде цепочек. При свертывании молока образуют ровный, плотный сгусток сметанообразной консистенции, имеющий чистый, кисломолочный, приятный вкус и запах. Активный кислотообразователь. По своим биохимическим свойствам *Str. cremoris* близок к *Str. lactis*, эти два вида различаются по способности сбраживать мальтозу и декстрин. Обладает антибиотической активностью к кишечной палочке, образует аммиак из аминокислоты аргинин.

Оптимальная температура развития *Streptococcus cremoris* 20—25°C. В течение 24 ч под влиянием *Streptococcus cremoris* при температуре 25°C наблюдается свертывание молока при pH, равном 5,0—5,2, однако без наличия сгустка.

При температуре 10—18°C *Streptococcus cremoris* склонен к образованию слизи. В северных странах этот стрептококк используется для приготовления особо устойчивого кислого молока. В закваске молочнокислых бактерий *Streptococcus cremoris* в сочетании с *Streptococcus lactis* способствует более густой консистенции продукта [8].

Термофильный стрептококк *Streptococcus thermophilus* - клетки его подобно *Str. cremoris* располагаются в виде длинных цепочек, более крупные, чем клетки сливочного стрептококка. От мезофильных стрептококков отличается способностью сбраживать сахарозу, некоторые расы вырабатывают диацетил, что улучшает качество молочных продуктов. При сквашивании молока дает ровный, плотный сгусток сметанообразной консистенции, приятного кисломолочного вкуса и запаха. Зачастую его комбинируют с болгарской, ацидофильной и другими молочнокислыми палочками.

Устойчив к кратковременной пастеризации, но погибает при

высокотемпературной пастеризации. Оптимальная температура его развития 40—45°C. Он совместно с *Lactobacillus bulgaricus* используется для приготовления йогурта и в качестве компонента культуры для приготовления эментальского сыра. *Streptococcus thermophilus* чрезвычайно чувствителен по отношению к пенициллину и некоторым антибиотикам и поэтому применяется в качестве тест-микроба для биологического определения (обнаружения) антибиотиков в молоке [9].

Ароматобразующий стрептококк *Streptococcus diacetylactis* - клетки его несколько мельче, чем у *Str. lactis*, *Str. cremoris*, и располагаются в виде отдельных клеток, диплококков, цепочек разной длины. Сбраживает мальтозу, цекстрин, лимонную кислоту, среди ароматобразующих стрептококков наиболее энергичный кислотообразователь, однако менее энергичный кислотообразователь по сравнению со *Str. lactis* и *Str. cremoris*, образует значительное количество диацетила. Во времени свертывания молока между отдельными штаммами наблюдается довольно значительная разница: более активные из них свертывают молоко через 16-18 ч, тогда как у менее активных время свертывания увеличивается до 48 ч. В результате образования диацетила, эфиров, летучих кислот и других соединений ароматобразующие стрептококки обогащают вкус и запах молочных продуктов [10].

Ароматобразующий стрептококк *Streptococcus acetoinicus* - клетки его мельче, чем клетки *Str. lactis*, *Str. cremoris* и располагаются в виде диплококков и цепочек различной длины. Наиболее активный среди ароматобразующих стрептококков, образует преимущественно ацетоин и мало диацетила. Как и все ароматобразующие бактерии содержит фермент цитритазу, вследствие чего обладает способностью сбраживать лимонную кислоту. При свертывании молока образует ровный плотный сгусток, в котором можно обнаружить мелкие пузырьки углекислого газа в небольшом количестве. В результате образования диацетила, эфиров, летучих кислот и других соединений ароматобразующие стрептококки обогащают вкус и запах молочных продуктов [11,12].

Ароматобразующие стрептококки *Streptococcus citrovorus*, *Streptococcus paracitrovorus* - клетки его мельче, чем клетки *Str. lactis*, *Str. cremoris* и располагаются в виде диплококков и цепочек различной длины. Как и все ароматобразующие бактерии содержит фермент цитритазу, вследствие чего обладает способностью сбраживать лимонную кислоту. При свертывании молока образует ровный плотный сгусток, в котором можно обнаружить мелкие пузырьки углекислого газа в небольшом количестве. Слабые кислотообразователи: *Str. paracitrovorus* свертывает молоко при оптимальной температуре через 2-3 дня. Самый малоактивный из ароматобразующих стрептококков *Str. citrovorus* медленно развивается в молоке и не сквашивает его. В результате образования диацетила, эфиров, летучих кислот и других

соединений ароматобразующие стрептококки обогащают вкус и запах молочных продуктов [13].

1.1.2 Молочнокислые палочки

Лактобактерии, так же, как и молочнокислые стрептококки, широко распространены в природе: на цветах, на листьях, плодах растений, в кормах, в растительных, мясных и молочных продуктах, в кишечнике человека и животных. Молочнокислые палочки характеризуются устойчивостью к кислой среде, соли, способностью расти при температурах от 15-20 до 38-50 °С в аэробных (плохо) и анаэробных условиях.

По количественному соотношению продуктов брожения молочнокислые палочки делятся на гомо- и гетероферментативные палочки. К первой группе относятся термофильные палочки (термобактерии), *Lactobacterium helveticum*, *Кtobacterium bulgaricum*, *Lactobacterium acidophilum*, а ко второй – мезофильные палочки бета-бактерии, являющиеся слабыми кислотообразователями.

Лактобактерии подавляют кишечные палочки, маслянокислые палочки, гнилостные бактерии, обладают высокой протеолитической способностью.

Кроме молочнокислых палочек, используемых в молочной промышленности, в молочных продуктах и на оборудовании часто обнаруживают термоустойчивые молочнокислые палочки, являющиеся возбудителями пороков молочных продуктов, и микробактерии, выдерживающие нагревание до 85 °С и обсеменяющие пастеризованное и сухое молоко [14].

Термофильные молочнокислые палочки (термобактерии). Они наиболее активно развиваются в слабокислой среде с рН 6,5, но способны расти и в кислой среде с рН 3,8, в которой молочнокислые стрептококки полностью прекращают развитие.

Оптимальная температура развития термобактерий 40-45°С. Большинство из них - активные кислотообразователи. При внесении 0,5 мл в 10 мл стерильного молока и термостатировании при оптимальной температуре они сквашивают молоко через 4-5 час. Предельная кислотность молока, сквашенного термобактериями, достигает 200-350°Т. Вследствие этого вкус сквашенного молока чистый, но кислый: сгусток ровный и плотный. Клетки термобактерий представляют довольно крупные палочки (часто с зернами волютина), располагающиеся по одной клетке, в виде диплобактерий или цепочек.

Lactobacterium acidophilum - характеризуется способностью сбраживать мальтозу, сахарозу, салицин, а также зачастую и раффинозу, декстрин.

Lactobacterium bulgaricum - гомоферментативная кислотоустойчивая палочка; под электронным микроскопом представляют собой короткие палочки

с закругленными краями, длиной 4-10 мкм, толщиной от 0,8 до 1 мкм; Неположительные, с зернами волютина. Не образует каталазу, плохо сбраживает мальтозу и совсем не сбраживает декстрин. Оптимальная температура развития 45-50 °С, минимальная - 20-22 °С. Погибает при 65 °С в течение 30 мин. Образует до 2% D(-) молочной кислоты. При своем развитии нуждается в витаминах - никотиновой кислоте, рибофлавине, пантотеновой кислоте. Выделяет антибиотические вещества, не разжижает желатин, заметно не разлагает казеин [15].

Lactobacterium helveticum - сбраживает мальтозу, декстрин, развивается при температурах 22-53 °С, некоторые расы могут развиваться при повышенных содержаниях поваренной соли (до 5 %); оказывает сильное действие на белок, вызывая его протеолиз с образованием различных растворимых фракций (растворимые пептиды, аминокислоты). Эта палочка не сбраживает сахарозу, раффинозу, салицин.

Lactobacterium lactis - характеризуется ферментативной активностью: сбраживает глюкозу, галактозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, раффинозу, декстрин, салицин.

Lactobacterium jugurti образует в молоке высокую кислотность, не сбраживает мальтозу и декстрин [13, с.100-102].

Стрептобактерии (мезофильные молочнокислые палочки). Клетки этих бактерий мельче, чем клетки термобактерий, и часто располагаются в виде цепочек. При развитии в молоке эти бактерии малоактивны; молоко сквашивают через 2-3 суток. После семисуточного культивирования предельная кислотность достигает 180-200 °Т. Образующийся сгусток молока ровный, плотный, с чистым кислым вкусом. Стрептобактерии сбраживают значительное количество углеводов.

Из числа этих бактерий в молочных продуктах чаще встречаются *Lactobacterium casei* и *Lactobacterium plantarum*, играющие важную роль в сыроделии. Небольшое количество этих бактерий присутствует в составе остаточной микрофлоры пастеризованного молока. Поскольку стрептобактерии могут развиваться в безуглеводной среде, они размножаются в сыре и достигают значительного количества после полного сбраживания лактозы.

Lactobacterium casei - сбраживает значительное количество различных углеводов; может развиваться в безуглеводной среде, при содержании поваренной соли 5,5 %; играет положительную роль при созревании многих сыров. Он не сбраживает рамнозу, арабинозу, раффинозу, глицерин.

Lactobacterium plantarum - по биохимическим свойствам близок к *Lactobacterium casei* и не сбраживает рамнозу, глицерин и крахмал. Некоторые штаммы вызывают образование ржавых пятен на поверхности на поверхности сыров. Некоторые штаммы этих бактерий

характеризуются антагонистическими свойствами в отношении маслянокислых бактерий и кишечных палочек.

Бета-бактерии (мезофильные гетероферментативные палочки). Эти бактерии характеризуются слабой энергией кислотообразования и молоко не сквашивают. При добавлении дрожжевого автолизата к молоку развитие бета-бактерий усиливается и кислотность молока может достигнуть 150-160 °Т. При развитии в молоке бета-бактерий образуется незначительное количество летучих кислот, углекислый газ, этиловый спирт и молочная кислота. Они способны сбраживать лактозу, глюкозу, мальтозу, раффинозу, арабинозу. Бета-бактерии образуют аммиак из аргинина. В молочных продуктах встречаются *betabacterium caucasicum* (в кефирных зернах и кефире) и *Betabacterium breve* [13, с.113-114].

Термоустойчивые молочнокислые палочки - клетки этих бактерий представляют собой довольно крупные палочки, располагающиеся одиночно или цепочками с зернами в цитоплазме, неподвижны, спор не образуют. Это активные кислотообразователи и сквашивают молоко через 8-10час, сгусток ровный, слизистый, или без слизи, без газа. Эти бактерии сбраживают лактозу, глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, левулезу, раффинозу и декстрин; отличаются термостойкостью и термофильностью: выдерживают кратковременное нагревание в молоке до 85-90 °С, растут при температуре от 20 до 60-65°С (оптимум 45-55 °С); устойчивы к поваренной соли (до 2-3 %), к желчи (до 30-40 %) и к действию дезинфицирующих веществ. Термоустойчивые палочки обнаруживают как в сыром молоке, так и в пастеризованном молоке, выдерживают нагревание до 85 °С, в оборудовании, в готовых продуктах и вызывают порок продуктов - излишняя кислотность [13, с. 114-115].

1.1.3 Дрожжи

Дрожжи - это одноклеточные, неподвижные микроорганизмы, являются факультативными анаэробами, хорошо развиваются в кислой среде. Оптимальная температура развития дрожжей 20-30 °С, но многие из них способны развиваться при 10°С. Вегетативные клетки гибнут при 60-65 °С, споровые при 70-75 °С. Они широко распространены в природе - в почве, на растениях, в кормах, в воздухе, откуда попадают в молоко и молочные продукты.

Дрожжи семейства *Saccharomycetaceae* (истинные дрожжи) являются наиболее активными возбудителями спиртового брожения, а дрожжи семейства *Torulopsidaceae* (несахаромицеты) слабо сбраживают сахара или вовсе их не сбраживают (*Mycoderma*).

Они дают при брожении этиловый спирт. CO₂, уксусный альдегид,

глицерин, спирты - бутиловый, изобутиловый, амиловый, изоамиловый, кислоты - уксусная, янтарная. При развитии в кисломолочных продуктах, в сгущенном молоке, в сыре, в масле они могут образовать этиловый спирт и создают условия для развития уксуснокислых бактерий, что приводит к спиртовому вкусу и запаху, обильное газообразование, бомбаж баночных консервов, вспучивание сыров [16].

1.1.4 Пропионовокислые бактерии

Пропионовокислые бактерии *Propionibacterium shermanii* - это неспорогенные, неподвижные палочки, отличающиеся полиморфностью, прямые, изогнутые, ветвящиеся палочки средней величины, мелкие и даже кокковые бактерии. В молоке развиваются медленно и свертывают его через 5-7 дней. Несмотря на слабую энергию кислотообразования, при развитии этих бактерий кислотность молока может повыситься до 160-170 °Т.

Пропионовокислые бактерии представляют собой палочки, 0.5- 0.8 x 1-5 мкм, часто булабовидной формы с одним концом закругленным, а другим суженным; некоторые клетки могут быть кокковидными, раздвоенными или разветвленными, но нитчатые формы отсутствуют. Наблюдается рудиментарное ветвление в аэробных или анаэробных условиях при низких значениях рН. Это аэротолерантные или микроаэрофильные бактерии. Их аэротолерантность обусловлена наличием полностью сформированной ферментной системы защиты от токсических форм кислорода. Размножаются бинарным делением.

Бактерии растут в пределах температуры 15-40°C, возможен рост и при более низкой температуре - 2.8-7.2°C. Оптимальная температура для классических пропионовых бактерий - 28-30°C. Оптимальными значениями рН для роста 6.5-7.0; при рН 5.0 рост практически отсутствует, при рН ниже этого критического уровня жизнеспособность бактерий сильно снижается.

Цвет колоний у пропионовокислых бактерий желтый, оранжевый, кремовый, красный и коричневый. Их отличает от других бактерий своеобразное "палисадное" расположение клеток наподобие "китайских иероглифов". Клетки неровные, могут быть покрыты слизью, образуя слизистые тяжи. Ряд штаммов *P. thoenii* и *P. jensenii* образуют, полисахаридные капсулы. Слизистые капсулы могут защищать клетки от внедрения бактериофага или других вредных воздействий. Отмечается сильное разрастание муреинового слоя, а также поперечных стенок.

При сбраживании молочного сахара (а в сырах - и молочной кислоты и ее солей) пропионовокислые бактерии образуют пропионовую и уксусную кислоты и углекислый газ; кислоты обогащают вкус и запах сыров, а медленно накапливающийся углекислый газ обуславливает образование в сыре крупных

глазков правильной округлой формы. Ввиду медленного развития и высокой чувствительности к условиям среды эти бактерии имеют большое значение только при производстве крупных сыров с длительным периодом созревания. В процессе размножения эти бактерии способны синтезировать витамин В₁₂ и обогащать им молочные продукты [17].

Пропионовокислые бактерии рассматриваются как перспективные пробиотики, положительное влияние которых на здоровье человека общепризнано. Пропионовокислые бактерии:

- подавляют активность гнилостных грибов и патогенных грибов,
- образуют витамины группы В и в большом количестве витамина В₁₂,
- некоторые штаммы вызывают торможение роста раковых клеток,
- обеспечивают защиту от кишечной инфекции.

Кроме того, пропионовокислые бактерии не перевариваются в желудочно-кишечном тракте людей, устойчивы к действию желчных кислот и выщерчивают низкую (рН 2.0) кислотность желудка. *P. acidipropionici* ингибирует активность 3-глюкуронидазы, азаредуктазы и нитроредуктазы - ферментов, образуемых кишечной микрофлорой и вовлекаемых в образование мутагенов, канцерогенов и промоторов роста опухолей. Пропионовые бактерии стимулируют рост фекальных бифидобактерий и помогают в лечении бактериальных дисбактериозов [18].

1.1.5 Бифидобактерии

Бифидобактерии - бесспорные, грамположительные, неподвижные палочки, не образующие каталазу, индол, сероводород, не разжижающие желатин, не восстанавливающие нитраты. Сбраживают глюкозу с образованием уксусной и молочной кислот, без выделения газа; снижают рН до 4,1-3,8; оптимальная температура культивирования - (37±1)°С. В молоке развиваются очень медленно, могут вызвать его свертывание. Стимуляторами бифидобактерий являются олигосахариды, декстрин-мальтоза, кукурузный, ячменно-солодовый экстракты, гидролитический фермент - лизопим [19]. Это анаэробные бактерии - *Bifidobacterium bifidum*, *B. bifidus*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*. Являются основными представителями кишечной микрофлоры, совместно с аэробными лактобактериями (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. salivares*, *L. cellobiosus*), играющие большую роль в поддержании здоровья человека и выполняющие ряд функций, имеющих важное значение для жизнедеятельности человека:

- Регулируют стабильность микробиоценоза и предотвращают заселение кишечника патогенными микроорганизмами, синтезируют антибиотик бифидин, создают кислую среду в кишечнике, обеспечивая тем самым колонизационную резистентность кишечника:

- Способствуют процессам ферментативного переваривания белков, липидов, высокомолекулярных углеводов, нуклеиновых кислот, клетчатки:

- Участвуют в синтезе витаминов группы В, К, аскорбиновой кислоты, повышая тем самым резистентность организма к неблагоприятным факторам внешней среды:

- Участвуют в азотистом, липидном, водно-солевом, электролитном обмене;

- Регулируют метаболизм желчных кислот, холестерина;

- Участвуют в детоксикации экзогенных и эндогенных субстратов, выступая в роли «естественного биосорбента», а также осуществляя микробную трансформацию токсических веществ;

- Синтезируют вещества с антибактериальной активностью: органические кислоты - молочную, уксусную; бактериоцины - лизоцим, лектролин, низин, лактоцидин, ацидофилин;

- Стимулируют перистальтику кишечника, участвуя в образовании продуктов распада белков, и нормализуют эвакуацию кишечного содержимого;

- Участвуют в синтезе незаменимых аминокислот (триптофан) и гистамина, способствуют лучшему усвоению солей кальция, железа, фосфора, витамина Д;

- Повышают иммунную реактивность организма: стимулируют лимфоидный аппарат, синтез иммуноглобулинов, увеличивают уровень пропердина и комплемента, увеличивают активность лизоцима и способствуют снижению проницаемости сосудистых тканевых барьеров для токсических продуктов генных микроорганизмов (наиболее характерно для бифидобактерий);

- Способствуют уничтожению атипичных клеток организма в результате активации иммунных процессов [20-22].

Лечебные препараты на основе анаэробных бактерий - бифидумбактерин (Гончарова Г.И. и соавт., 1972) и лактобактерин (Тарасова И.Б., 1970), применяемые в терапии дисбактериозов, и многие другие, созданные в последние годы, регулируют равновесие кишечной микрофлоры. По существующей классификации (Шендеров Б.А., 1996) препараты для коррекции микробиоценоза можно разделить на 6 групп:

I - препараты, содержащие монокультуры живых микроорганизмов представителей нормальной микрофлоры кишечника;

II- препараты, содержащие комплекс живых микроорганизмов;

III- препараты, содержащие субстанции, которые при оральном введении стимулируют рост и размножение индигенной флоры, прежде всего, бифидо- и лактобактерий;

IV - препараты, содержащие монокультуры или комплекс живых

микроорганизмов и субстанций, стимулирующих их приживание, рост и размножение;

V-препараты, содержащие генно-инженерные штаммы микроорганизмов с заданными характеристиками:

VI - препараты, содержащие помимо микроорганизмов или средств, стимулирующих их рост и размножение, другие соединения, влияющие на функции клеток органов и тканей человека.

Положительное действие этих препаратов на организм связано с влиянием на различные звенья функционирования микрофлоры кишечника:

- Препараты обладают антагонистической активностью по отношению к широкому спектру патогенных и условно патогенных микроорганизмов за счет продукции антибактериальных веществ и конкуренции за лимитируемые питательные субстраты и места адгезии на эпителиоцитах слизистой кишечника;

- Влияют на ферментативную и синтетическую активность кишечных микроорганизмов;

- Стимулируют иммунную систему макроорганизма [23].

1.2 Взаимоотношения между микроорганизмами в процессе их жизнедеятельности в молоке и молочных продуктах

Между микроорганизмами, развивающимися в молоке и молочных продуктах, распространены следующие типы взаимоотношений: антагонизм, синергизм, симбиоз, паразитизм, метабиоз. Разные типы взаимоотношений могут наблюдаться в одном и том же продукте.

Характер и степень влияния микробов друг на друга зависят от количественных соотношений между микробами разных видов, свойств молочного продукта и условий его выработки или хранения [24].

1.2.1 Антагонизм или антибиоз

Антагонизм или антибиоз - такое взаимоотношение микроорганизмов, когда один вид микробов не может развиваться в присутствии другого вида.

Взаимоотношения между молочнокислыми бактериями весьма сложные. Так, вырабатываемый отдельными штаммами *Str. lactis* антибиотик низин подавляет развитие, т.е. является ингибитором многих бактерий, в том числе не только патогенных, или вызывающих порок в молочных продуктах, например, маслянокислых бактерий, но и ароматообразующих молочнокислых стрептококков, молочнокислых палочек и многих штаммов *Str. lactis*. Однако Иуществуют штаммы молочнокислых бактерий, малочувствительных и не чувствительных к низину. Так, у некоторых штаммов *Str. thermophilus*

обнаружена способность выделять фермент низиназу, разрушающую низин.

Антагонизм между молочнокислыми бактериями и патогенными и гнилостными бактериями обуславливается снижением рН среды и выделением антибиотических веществ молочнокислыми бактериями. В начале молочнокислого процесса подавляется развитие гнилостных бактерий, затем они медленно отмирают. При значительном нарастании кислотности развитие микрококков, которые являются слабыми кислотообразователями, подавляется. При кислотности свыше 80°T подавляется развитие бактерий группы кишечных палочек, которые также продуцируют молочную, уксусную и другие кислоты.

Исследования Т.С.Суховой. Н.С.Королевой. Л.Н.Ивановой по изучению биохимических свойств бактерий группы кишечной палочки, выделенных после совместного культивирования с чистыми культурами и заквасками молочнокислых стрептококков, а также из творога и кефира, выработанных в производственных условиях, показали, что основные компоненты микрофлоры закваски для творога *Str. lactis* и *Str. cremoris* обладали более высокой ан-тибиотической активностью по отношению к цитратотрицательным (*E.coli*), чем к цитратположительным (*Ent. aerogenes*) видам кишечных палочек. При совместном культивировании в молоке с *E.coli* антибиотическая активность Штаммов *Str. lactis* зависела от количества вносимой закваски и определялась, в основном, снижением рН. Штаммы *Str. cremoris* проявляли антагонизм даже при незначительной концентрации клеток, что объяснялось присутствием антибиотических веществ. Штаммы *Str. cremoris* также тормозили размножение кишечных палочек *Citrob. freundii*. Ароматобразующие бактерии, скорость Размножения и кислотообразования которых в молоке существенно ниже, чем *Str. lactis* и *Str. cremoris*, затормаживали размножение штаммов кишечных Палочек в меньшей степени. Исследования Т.С.Суховой в лабораторных условиях показали, что конечное содержание бактерий группы кишечной палочки в твороге зависело от первоначального обсеменения этими микроорганизмами молока, видового состава заквасок, длительности процесса синерезиса, санитарно-гигиенического состояния технологического оборудования, выбора способа выработки молочного продукта и др. Установлено что если период до момента разрезки сгустка составляет не более 6 ч, то можно рассчитывать на получение творога со сравнительно небольшим количеством кишечных палочек. При увеличении продолжительности этого процесса их содержание значительно повышается. По данным французской фирмы «Жерве-Данон» для получения мягкого творога с конечным содержанием кишечных палочек 1-10 в 1 г требуется свежепастеризованное обезжиренное молоко и сливки, почти асептические условия производства. немедленное охлаждение продукта до 3-4°C. В таблице 2 приведены данные способов производства творога и их микробиологические показатели [25].

Таблица 2 - Способы производства творога и их микробиологические показатели

№ п/п	Способы производства творога	Бродильный титр исследуемых проб по ходу технологического процесса при производстве творога				
		молоко из ванны после заквашивания	сгусток	творог до охлаждения	творог после охлаждения	готовый творог
1	Непрерывный метод коагуляции белков в потоке	10^{-4}	$3 \cdot 10^{-3}$	-	$4,3 \cdot 10^{-2}$	$4,5 \cdot 10^{-2}$
2	С отвариванием сгустка	$3 \cdot 10^{-2}$	$8 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$	10^{-4}	10^{-5}
3	Традиционный сычужно-кислотный	$4 \cdot 10^{-2}$	$8 \cdot 10^{-4}$	—	$8 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$
4	Раздельный с применением сепаратора	$5 \cdot 10^{-2}$	$8 \cdot 10^{-3}$	10^{-5}	10^{-5}	10^{-6}

1.2.2. Синергизм и симбиоз

Симбиоз - такое сожительство, когда в одной среде существуют и размножаются два вида или более, не мешая друг другу. Форма полезного сожительства называется мутуализм. Симбиоз широко распространен в кефирном грибке, между молочнокислыми бактериями и дрожжами, молочнокислыми и уксуснокислыми бактериями, между дрожжами и уксуснокислыми бактериями, молочнокислыми бактериями и плесенью и т.п. Молочнокислые бактерии создают кислую среду, в которой дрожжи хорошо развиваются и интенсивно продуцируют этиловый спирт, а дрожжи благоприятно действуют на развитие молочнокислых бактерий - они повышают рН среды вследствие образования щелочных продуктов распада белка и обогащают среду необходимыми для развития молочнокислых бактерий азотистыми веществами, выделяют витамины. Совместное культивирование молочнокислых бактерий с дрожжами позволяет сохранить жизнеспособность первых до 3-6 месяцев [26].

Некоторые молочнокислые бактерии выделяют в среду этиловый спирт, который уксуснокислые бактерии используют в качестве субстрата энергетического обмена, а уксуснокислые бактерии частично разлагая

казеин, обогащают среду необходимыми для молочнокислых бактерий азотистыми веществами и несколько снижают рН среды.

Дрожжи и уксуснокислые бактерии находятся в кефирных грибочках и активно сосуществуют в них.

Синергизм - содружественное действие двух или нескольких видов микробов. При развитии смешанной культуры *Str. thermophilus* и *L. bulgari-cum* в молоке кислотообразование происходит интенсивнее, чем при развитии каждой культуры в отдельности. Получение комбинированных заквасок из культур молочнокислых бактерий основано на явлении синергизма [27].

1.2.3. Метабиоз

Метабиоз - такое сожительство, когда один вид микроорганизмов в процессе жизнедеятельности создает благоприятные условия для другого вида микробов. В процессе выработки и продолжительного хранения кисломолочных продуктов и сыров при температурах выше 10°C наряду с явлениями симбиоза и антагонизма происходит смена групп микроорганизмов. Вначале непродолжительное время развиваются микробы разных групп, затем молочнокислые бактерии все более преобладают над другими группами;

вследствие их развития и повышения кислотности продукта через несколько дней отмирают почти все микроорганизмы, в том числе и молочнокислые бактерии. В кислой среде развиваются плесени и дрожжи, разлагающие белки, в результате среда становится слабощелочной, благоприятной для развития протеолитических бактерий [28].

1.2.4 Паразитизм

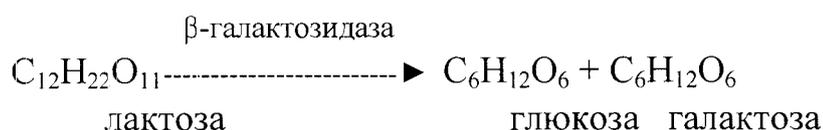
Взаимоотношения между молочнокислыми бактериями и бактериофагами яркий пример абсолютного паразитизма между микроорганизмами: бактериофаги паразитируют в клетках бактерий и разрушают их. Однако взаимоотношения между этими организмами отличаются сложностью. С одной стороны, бактериофаги могут находиться в клетках бактерий, не разрушая их; (состояние лизогении). Но под влиянием некоторых мутагенов могут образоваться вирулентные мутанты умеренных фагов. Мутанты лизируют чувствительные к ним штаммы бактерий. С другой стороны, в природе имеются штаммы бактерий, резистентные к определенным фагам, но чувствительные к другим фагам.

Существуют моновалентные фаги, поражающие только отдельные штаммы бактерий, и поливалентные фаги, лизирующие многие штаммы. В результате пересевов фага с одними и теми же культурами молочнокислых стрептококков фаг приобретает способность лизировать новые штаммы

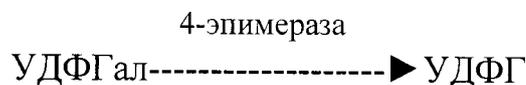
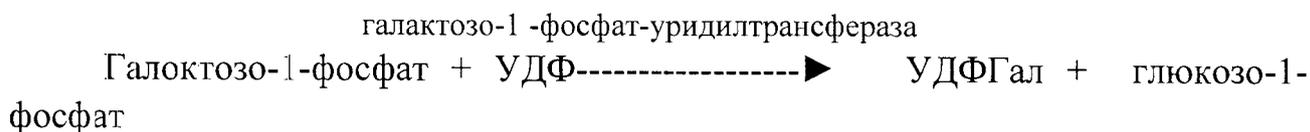
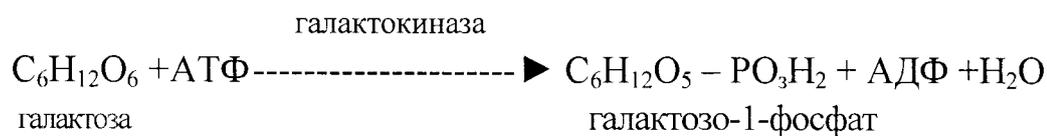
бактерий и превращается из моновалентного в поливалентный [22 с.70].

1.3 Процессы брожения, вызываемые микроорганизмами, используемыми в производстве кисломолочных продуктов.

Начальным этапом всех типов брожения является расщепление молочного сахара на глюкозу и галактозу под действием фермента β -галактозидазы :

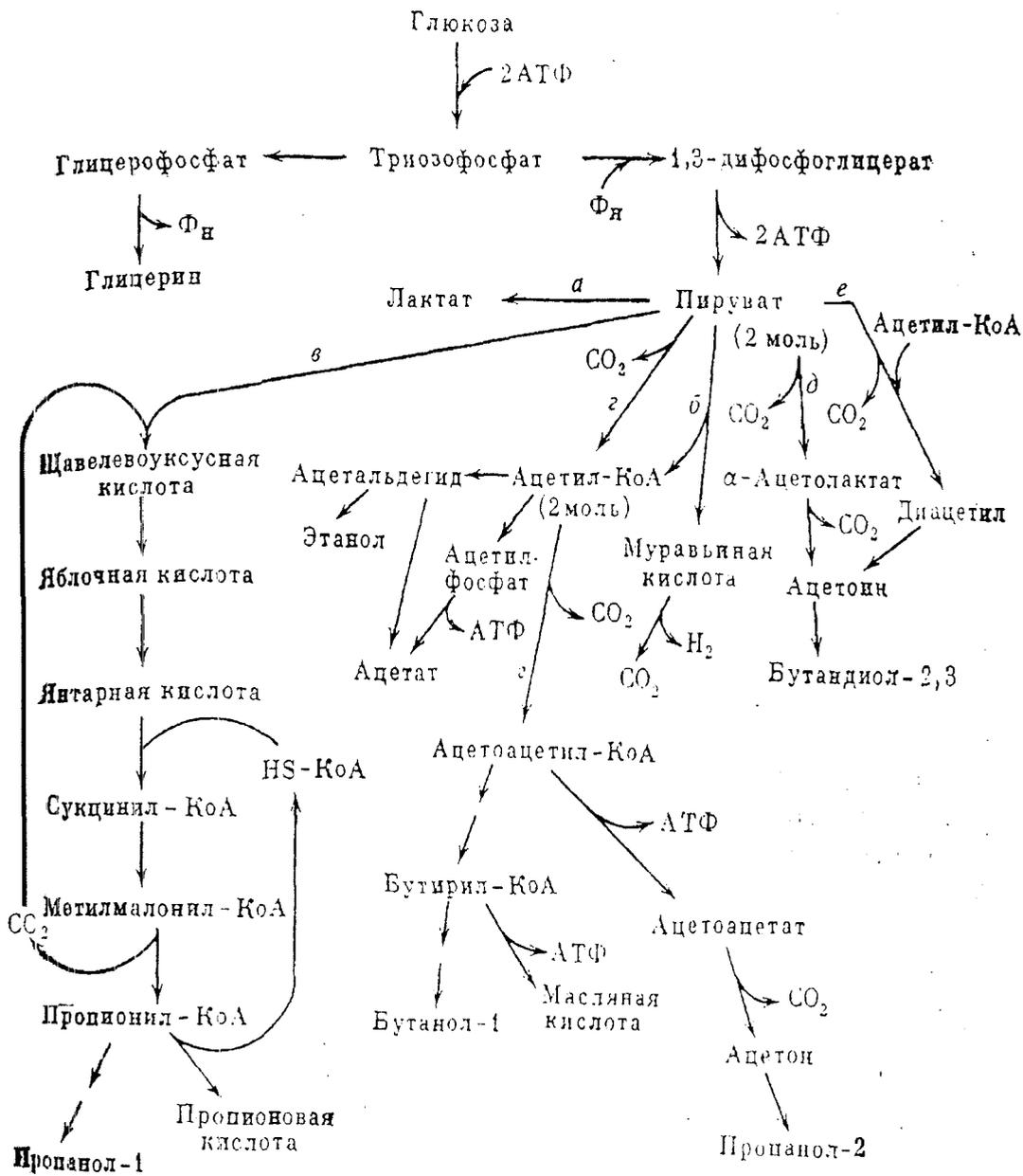


Далее галактоза с участием фермента уридиндифосфатглюкозы превращается в глюкозо-1-фосфат, который после изомеризации с участием фосфоизомераз переходит в глюкозо-6-фосфат и включается в схему превращений глюкозы:

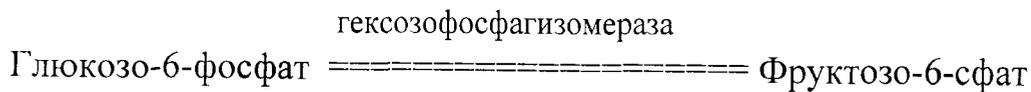


Все типы брожения до образования пировиноградной кислоты идут по одному и тому же пути Эмбдена-Мейергофа (рисунок 1).

Рисунок 1 – Пути превращения глюкозы гомоферментативными молочнокислыми и другими бактериями (по Д.Мецлеру) [27, с.172]



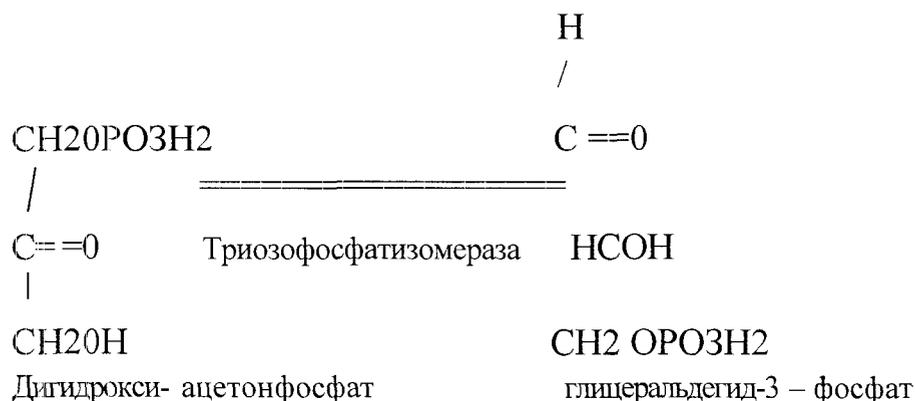
Следующая реакция - превращение глюкозо—6-фосфат действием фермента гексозофосфатизомеразы во фруктозо-6-фосфат:



Затем образовавшийся фруктозо-6-фосфат вновь фосфорилируется за счет второй молекулы АТФ с участием фермента фосфофруктокиназы в фруктозо-1,6-дифосфат.

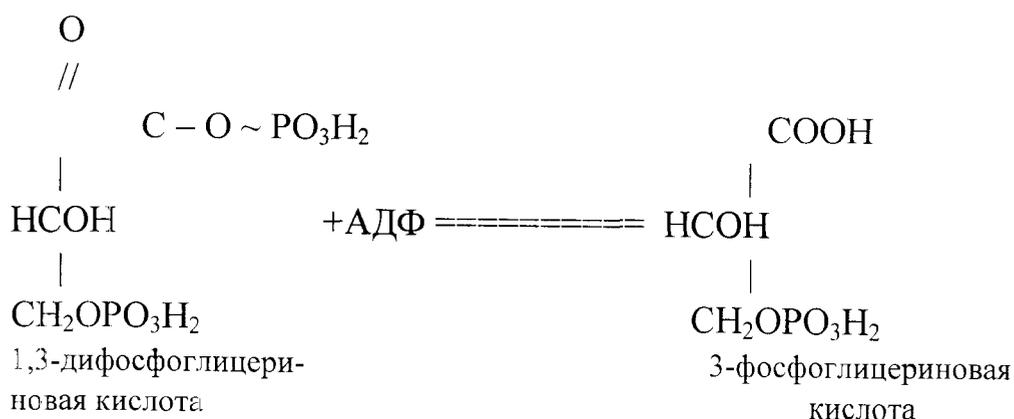
В следующей реакции фруктозо - 1,6-дифосфат под действием фермента альдолазы расщепляется на две фосфотриозы - дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат.

Затем протекает реакция изомеризации дигидроацетонфосфата в глицеральдегид-3-фосфат с участием фермента триозофосфатизомеразы:



Образованием глицеральдегид-3-фосфата завершается первая стадия гликолиза. Во второй стадии, наиболее важной, происходит гликолитическая оксиредукция, сопряженная с субстратным фосфорилированием, в процессе которого образуется АТФ.

Глицеральдегид-3-фосфат в присутствии фермента глицеральдегид-фосфатдегидрогеназы, кофермента НАД и неорганического фосфата подвергается своеобразному окислению с образованием 1,3-дифосфоглицериновой кислоты и восстановленной формы НАД (НАДН₂). Реакция идет в несколько этапов. Суммарная реакция имеет следующий вид:

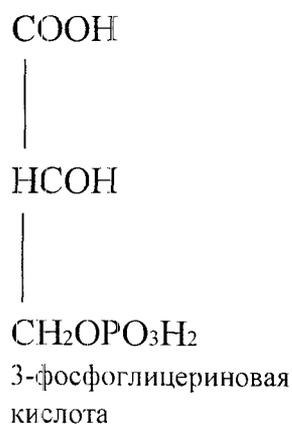


В присутствии неорганического фосфата НАД выступает как акцептор водорода, отщепляющегося от глицеральдегид-3-фосфата. В процессе образования НАДН₂ глицеральдегид-3-фосфат связывается с молекулой фермента за счет SH-групп последнего. Образовавшаяся связь богата энергией, но она непрочна и расщепляется под влиянием неорганического фосфата. При этом образуется 1,3-дифосфоглицериновая кислота - высокоэнергетическое соединение.

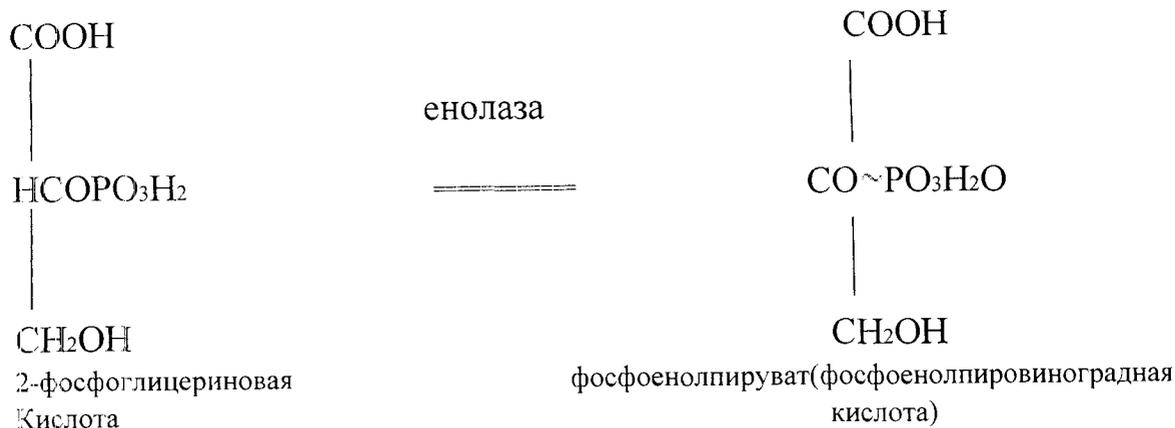
Затем происходит передача богатой энергией остатка фосфата в положении 1 на АДФ с образованием АТФ и 3-фосфоглицериновой кислоты:

Таким образом, благодаря действию двух ферментов (глицеральдегид-фосфатдегидрогеназы и фосфоглицераткиназы) энергия, высвобождающаяся при окислении альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата до карбоксильной группы, запасается в форме энергии АТФ.

В следующей реакции происходит внутримолекулярный перенос остатка фосфатной группы и 3-фосфоглицериновая кислота превращается в 2-фосфоглицериновую кислоту. Реакция обратимая и протекает в присутствии ионов магния. Кофактором фермента является также 2,3-дифосфоглицериновая кислота.



Затем 2-фосфоглицериновая кислота с отщеплением воды переходит в фосфоенолпировиноградную кислоту. При этом фосфатная связь в положении 2 становится высокоэнергетической при участии фермента енолазы:



Енолаза активируется катионами двухвалентного магния или марганца и ингибируется фторидом.

Затем происходит разрыв макроэргической связи и перенос остатка фосфата от фосфоенолпировиноградной кислоты на АДФ с участием фермента пируваткиназы, которую необходимо активировать катионами одновалентных металлов (калия и др.) или катионами двухвалентных магния или марганца [28,с. 160-165].



1.3.1 Молочнокислое брожение

1.3.1.1 Гомоферментативное молочнокислое брожение

Гомоферментативные бактерии (молочнокислые стрептококки *Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis* и др., термофильные и мезофильные молочные палочки *Lbm. bulgaricum*, *Lbm. acidophilum*, *Lbm. casei* и др.) сбраживают глюкозу по пути Эмбдена-Мейергофа.

В заключительной реакции пировиноградная кислота восстанавливается до молочной кислоты под действием фермента лактатдегидрогеназы. Восстановителем является НАДН₂:



На 1 моль глюкозы образуется 2 моля молочной кислоты и 2 моля АТФ. Молочная кислота является не единственным конечным продуктом томоферментативного молочнокислого брожения. В качестве побочных продуктов могут образовываться летучие и нелетучие органические кислоты, глицерин, спирты, ацетон, ацетоин, диацетил, бутиленгликоль и др. Часть глюкозы может превращаться в янтарную, яблочную, пропионовую и другие органические кислоты. Однако эти вещества образуются из глюкозы в очень небольших количествах. В основном образуется более 90% молочной кислоты этом виде брожения [29].

1.3.1.2 Гетероферментативное молочнокислое брожение

Гетероферментативные бактерии (*Str. citrovorus*, *Str. paracitrovorus*, *Lbm. brevis*) около 50% глюкозы превращается в молочную кислоту, остальное количество - в этиловый спирт, уксусную кислоту, CO_2 . Превращения протекают пентозофосфатным путем в связи с отсутствием фермента (рисунок 2).

Сначала происходит дегидрирование глюкозо-6-фосфата с участием фермента глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, которая в качестве акцептора водорода использует НАДФ или НАД. Затем 6-фосфоглюконовая кислота подвергается окислительному декарбоксилированию (с участием фермента 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы) с образованием рибулозо-5-фосфата и восстановленной формы НАД или НАДФ. Рибулозо-5-фосфат под действием изомеразы превращается в рибозо-5-фосфат. Образовавшийся пентозофосфат при участии фосфокетолазы расщепляется на 3-фосфоглицериновый альдегид и ацетилфосфат, которые соответственно превращаются в лактат и этанол.

В ходе реакции образуются из 1 моля глюкозы 1 моль молочной кислоты, 1 моль этанола и CO_2 :



Энергетический баланс брожения глюкозы составляет 1 молекулу АТФ. В аэробных условиях возможно образование двух молекул АТФ, тогда ацетилфосфат превращается не в этанол, а в уксусную кислоту. Бифидобактерии (*Lbm. bifidum*) сбраживают глюкозу по фруктозо-6-фосфатному пути. В отличие от пентозофосфатного пути глюкоза превращается не в глюкозо-6-фосфат, а во фруктозо-6-фосфат, который далее расщепляется на эритрозо-4-фосфат и ацетилфосфат. Первый через последовательности реакций превращается в уксусную и молочную кислоты, вторая - в уксусную кислоту. Таким образом,

выход уксусной кислоты в 1,5 раза больше выхода молочной кислоты [28,с. 173, 19].

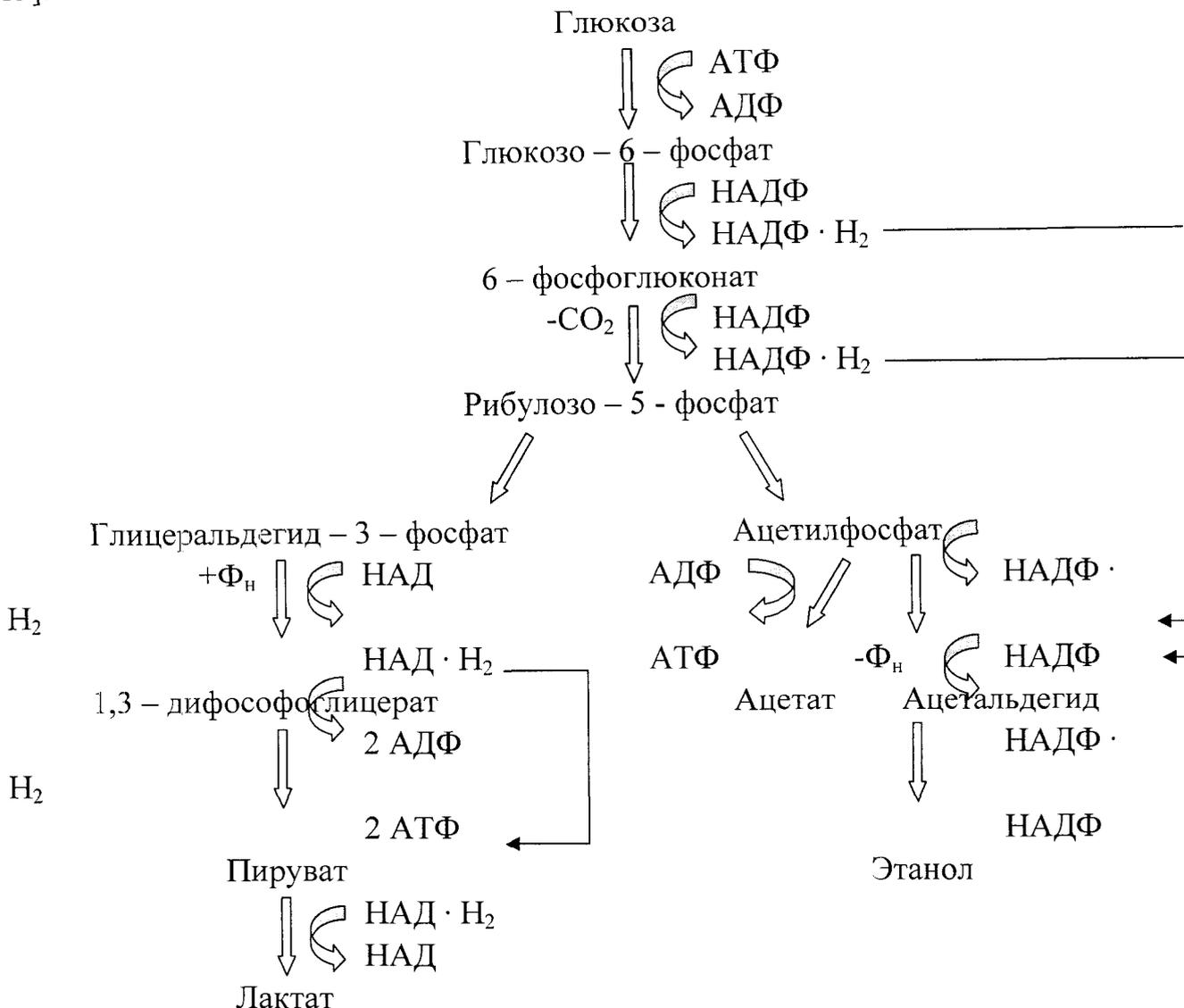


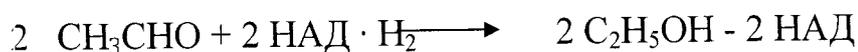
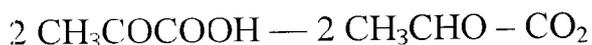
Рисунок 2 – Пентозофосфатный путь расщепления глюкозы гетероферментативными молочнокислыми бактериями [28, с.174]

1.3.2 Спиртовое брожение

Возбудителями спиртового брожения являются дрожжи *Sacch. cartilaginosus*, *Sacch. fragilis*, *Sacch. cerevisiae* и другие виды.

Превращение глюкозы в пировиноградную кислоту в первой стадии спиртового брожения идет по гликолитическому пути аналогично гомоферментативному молочнокислому брожению. Затем пировиноградная кислота подвергается декарбоксилированию под действием фермента пируватдекар-боксилазы с образованием уксусного альдегида и CO₂.

Уксусный альдегид вступает во взаимодействие с НАДН₂. В результате образуется этанол:



Суммарная реакция:



Кроме этанола и углекислоты дрожжи могут образовывать в небольшом количестве другие спирты (изобутиловый, пропиловый, глицерин и др.), уксусную, пропионовую, янтарную кислоты, ацетоин, диацетил [30].

1.4 Изучение процессов культивирования молочнокислой микрофлоры в молочной смеси с различным количеством сухих веществ

Было проведено исследование по изучению развития молочнокислой микрофлоры в молоке с различным содержанием сухих веществ (СВ). При этом были выбраны следующие варианты экспериментов, обоснование которых было проведено автором: 1 вариант - контроль - нормализованное молоко;

2 вариант - опыт - молочная смесь с СВ 13-15 %; 3 вариант - опыт - молочная смесь с СВ 18-20 %.

Изучали развитие молочнокислых бактерий в обезжиренном восстановленном молоке с дополнительным введением сухого обезжиренного молока - варианты опыта 2,3. Контролем служило обезжиренное молоко. В исследованиях использовали четыре вида молочнокислых бактерий в монокультуре - *Lactis*, *Str.cremoris*, *Str.diacetilactis*, *Lbm.acidophilum* и три вида заквасок - для масла, сыра, биолакта. В молоко с различным содержанием белка, СВ, и контроль вносили 5 % культуры или закваски и термостатировали при оптимальной температуре активные культуры и закваски в течение 24 ч, мало-активные - 48 ч. Выбор этих культур обусловлен вышеприведенными свойствами бактериальных культур.

В процессе культивирования определяли количество клеток посевом на агар с гидролизованным молоком и мелом, титруемую и активную кислотность, содержание лактозы - по методу Бертрана. Количество клеток и кислотность культур - активных кислотообразователей и заквасок учитывали через 0, 2, 4, 6, 8 и 24 часа культивирования, культур - слабых кислотообразователей через 0, 8, 24 и 48 ч. Повторность опытов трехкратная.

В прижизненный период лактобактерии продуцируют молочную кислоту,

а также бактериальные ферментные системы, взаимодействующие с компонентами кисломолочных сгустков, сырной массы и преобразующие их в многочисленные соединения. Молочнокислое брожение и скорость биохимических превращений определяют длительность производственного цикла и качество продукта[31].

Таблица 3 – Накопление биомассы культур в смеси с разной дозой СОМ

Культура	Варианты	Кол-во клеток мк бактерий, млн/мл с разной дозой СОМ при культивировании в течение, ч						
		0	2	4	6	8	24	48
Str.lactic	Контроль	50	50	227	582	527	110	-
	Опыт 2	52	96	396	854	918	354	-
	Опыт 3	50	94	458	945	916	384	-
Str.cremoris	Контроль	52	61	288	806	1010	402	-
	Опыт 2	62	87	370	1293	1306	667	-
	Опыт 3	63	91	590	1454	1710	671	-
Str.diace-tilactis	Контроль	30	-	-	-	423	751	430
	Опыт 2	30	-	-	-	540	2000	840
	Опыт 3	32	-	-	-	564	1040	1122
Lbm.acidophilum	Контроль	58	-	95	124	202	2910	410
	Опыт 2	66	-	99	180	283	4420	1032
	Опыт 3	67	-	144	186	341	5120	990

Таблица 4 – Накопление биомассы культур заквасок в смеси с разной дозой СОМ

Закваска	Варианты	Кол-во клеток мк бактерий, млн/мл с разной дозой СОМ при культивировании в течение, ч					
		0	2	4	6	8	24
для масла	Контроль	99	289	1112	1318	2000	850
	Опыт 2	96	344	986	2030	2700	1253
	Опыт 3	83	272	1174	2360	3500	1286
для сыра	Контроль	94	172	404	1012	935	795
	Опыт 2	124	254	819	1890	1610	1037
	Опыт 3	105	243	730	1440	1880	1360
для биолакта	Контроль	17	96	315	321	-	123
	Опыт 2	22	152	320	164	-	160
	Опыт 3	19	151	403	350	-	218

Наибольшая скорость развития молочнокислой микрофлоры наблюдалась в молочной смеси с СВ 18-20 %. Наличие в среде повышенного содержания белковых веществ способствовало более длительному сохранению жизнеспособности клеток. Через 24 часа термостатирования активных монокультур и закваски количество сохранившихся живых клеток было ниже, чем после 12 часов культивирования.

Из таблиц 3,4 видно, что изменение титруемой и активной кислотности в начальный период имело возрастающий характер по мере увеличения СВ в молоке. Увеличение СВ, в том числе и белка, повышало буферные свойства молочной смеси, что приводило к изменению значений рН в опытных вариантах, близкими к рН в контроле, что способствовало интенсификации молочнокислого брожения, снижению ингибирующего действия молочной кислоты, увеличению накопления биомассы и более длительному сохранению Жизнеспособности клеток (таблицы 3,4,5) всех испытанных культур.

Таблица 5 – Культивирование закваски для сыра в молоке COM

Срок культивирования, ч	Кол-во клеток в молоке С COM. млн		Кислотность молока с COM. °Т		рН молока с COM	
	13,5 % СВ	18,5 % СВ	13,5 %	18,5 %	13,5 %	18,5 %
	0	70	70	32	36	6,31
4	760	1520	50	65	5,36	5,26
6	1500	2140	81	95	4,85	4,88
8	1620	2100	95	101	4,84	4,83
12	1700	2180	102	120	4,42	4,53
24	2100	2280	120	132	4,41	4,52

Наибольшее содержание клеток у всех культур отмечено при увеличении СВ до 13 % и 18,5 % причем больше - у слабых кислотообразователей *Str. Diacetilactis*, *Lbm.acidophilum* - после 24 ч культивирования, двух видах заквасок - для масла, сыра - через 6-8 ч культивирования [32].

Тщательный анализ свойств микроорганизмов привел к следующим видам. *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetilactis*, *Streptococcus thermophilus* обладают антибиотической активностью к кишечной палочке, способностью продуцировать антибиотические и ароматические соединения. *Lactobacterium lactis*, *Lactobacterium bulgaricum* также подавляют кишечные, маслянокислые, гнилостные бактерии с образованием антибиотических веществ, синтезируют ароматические соединения. *Streptococcus mophilus* совместно с *Lactobacterium bulgaricum* проявляют синергизм с интенсивным кислотообразованием. Бифидобактерии

проявляют антагонистическую активность к патогенным и условно патогенным бактериям, повышают иммунитет, участвуют практически во всех видах обменных процессов в организме, синтезируют витамины, НАК, антибиотик бифидин и др.

Важное значение при подборе штаммов молочнокислых и бифидобактерии имеет оптическая характеристика образующейся молочной кислоты. Известно, что молочнокислые бактерии продуцируют две формы молочной кислоты с опическим вращением: левовращающая L (+) и правовращающая D (-). Смесь обоих изомеров составляет рацемат DL. Молочная кислота формы L (+) образуется при энергетическом обмене, поэтому ее считают физиологической. Она используется организмом взрослых и детей, тогда как D (-) форма участвует в обмене веществ ограниченно, только в организме взрослых. В организме ребенка D (-) форма приводит к ацидозу. Учитывалась также термоустойчивость бактерий, особенно при выработке катыка, курта и иримшика в связи с наличием в их технологии Высокотемпературной обработки (катык, иримшик) и сушки (курт, иримшик) [33].

Кроме специфических требований, связанных со способностью Приживаться в кишечнике, устойчивостью к продуктам обмена кишечной микрофлоры, например, к фенолу), антибиотической активностью молочнокислых и бифидобактерии к патогенным и условно патогенным бактериям, учитывали также их физиолого-биохимические признаки, т.е. скорость свертывания молока с различным СВ и Б, образование сгустка определенных вкуса и консистенции, что подтверждалось изучением реологических характеристик их.

Таким образом, возможно использовать эти свойства микроорганизмов при разработке кисломолочных продуктов нового поколения.

Дрожжи напротив, активизируют уксуснокислое, спиртовое брожение с обильным газообразованием, вспучиванием продуктов, приводящее к значительному снижению качества продуктов.

Проведенные многими учеными исследования показали, что при розливе, хранении до реализации катыка зачастую происходило резкое нарастание кислотности продукта вследствие присутствия сильных кислотообразователей в составе бактериальной закваски, что приводило к снижению качества продукта, его хранимостепоспособности. Розлив катыка длился определенное время, поэтому в продукте, имеющем температуру 20-25 °С, продолжались биохимические и микробиологические процессы. Этот фактор, особенно в летне-осенний периоды сезона, когда объемы выработки молочной продукции максимальны, приводил к нежелательным последствиям снижения качества. Активизация молочнокислого брожения с участием сильных кислотообразующих бактериальных культур способствовала

получению продукта, нестойкого при хранении, с резко выраженным кислым привкусом, с газообразованием.

Подбор совместимых молочнокислых культур, с низко кислотообразующей способностью, без включения кефирной закваски и дрожжей - активных кислотообразователей, производящих спиртовое брожение, зачастую подавляющих молочнокислое брожение, приводящих к резкому нарастанию активной и титруемой кислотности в готовых продуктах, особенно при хранении приводит к повышению качества и биологической ценности кисломолочных продуктов и их хранимоспособности [34].

Анализ технологий катыка, курта, иримшика, включающих технологические процессы, при которых молочная смесь подвергается длительной высокотемпературной обработке, приводящей к глубоким изменениям лактозы белковых компонентов, привел к выводу о необходимости включения в состав бактериальной закваски термофильных молочнокислых стрептококков, являющихся слабыми кислотообразователями, а также ароматообразующих и бифидобактерий для получения продукта высокого качества.

По данным литературы, известны 6 вариантов композиций молочнокислых культур:

1 вариант - термофильный стрептококк *Streptococcus thermophilus*- 2%, бакзакваска для сметаны *Streptococcus lactis*. *Streptococcus cremoris* - 1,5 %; бактериальная закваска для биолакта - 1,5 %. Титруемая кислотность термофильного стрептококка - 81 — 104°Т, бакзакваски для сметаны - 72-77°Т. бакзакваски для биолакта - 71 °Т.

2 вариант -термофильный стрептококк *Streptococcus thermophilus*- 2%; бакзакваска для сметаны *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* - 1,5 %; бакконцентрат для творога-1,5 %. Титруемая кислотность для бакконцентрата Для творога - 67°Т, столь низкая кислотность для бакконцентрата приводила к желательным последствиям в готовом продукте, объяснение которых будет предложено ниже.

3 вариант - термофильный стрептококк *Streptococcus thermophilus*- 2%; бактериальная закваска для масла и сметаны -1,5 %; для диетической сметаны -1,5 %. Титруемая кислотность бакзаквасок для масла и сметаны -72°Т, для Диетической сметаны - 66°Т.

4 вариант - молочнокислый стрептококк *Streptococcus lactis* 204 к - 2%; сливочный стрептококк *Streptococcus cremoris* - 1,5 %; ароматообразующий стрептококк *Streptococcus diacetylactis* - 1,5 %.

В 4 варианте титруемая кислотность готовых бактериальных заквасок не Превышала: *Streptococcus lactis* 204 к—108 °Т; *Streptococcus cremoris* 215 к - 97°Т; *Streptococcus diacetylactis* 199 к - 107 °Т. Производитель - ВНИМИ (г.

Москва).

5 вариант. БАД «Ацидобак». Титруемая кислотность - 86 °Т;

6 вариант. БАД «Бифидобак». Титруемая кислотность - 74°Т [35].

1.5 Особенности культивирования молочнокислых бактерий в молочной смеси

В таблицах 6-17 представлены экспериментальные данные по исследованию поведения бактериальных культур в опытных и контрольных вариантах кисломолочных продуктов, их физико-химических свойств в процессе выработки.

При приготовлении бактериальных заквасок хорошие результаты получены в первом варианте при производстве катыка. Количество вносимой закваски составляло 5%. Продолжительность сквашивания 3,5-4,5 ч. Готовые продукты имели невысокую кислотность, приятный кисломолочный вкус и запах, значительную биомассу молочнокислых бактерий, препятствующих развитию посторонней микрофлоры, увеличивающих сроки хранения продуктов без снижения качества. Температура хранения готовых продуктов 5-6°С.

Во втором варианте сквашивание молока происходило через 6 часов с обильным выделением сыворотки желтоватого цвета, неприятного вкуса, что недопустимо по стандарту для кисломолочных продуктов (сыворотка не должна отделяться либо выделение сыворотки сладковатого привкуса не должно превышать 3 % от объема продукции). Количество молочнокислых бактерий исчислялось несколькими десятками тысяч (вместо 10^7 - 10^9). Культивирование f-бакконцентрата, предназначенного для производства творога, и его использование при выработке национальных молочных продуктов не дало положительных результатов, так как невысокая кислотность бакконцентрата вызывает, по-видимому, незапланированное развитие термоустойчивых молочнокислых палочек, нередко обнаруживаемых в кисломолочных продуктах и являющихся посторонней микрофлорой с активной кислотообразующей способностью. В связи с этими обстоятельствами данный вариант исключили из дальнейших исследований.

Таблица 6 - Процессы культивирования бактериальной закваски для катыка (контроль)

Показатели	Закваски			Молоко после выдержки	Молоко после заквашивания	Сгусток перед розливом
	термофильный стрептококк	кефирная	болгарская палочка			
Титруемая кислотность. °Т	81.0	90.0	75.0	24.0	75.0	105.0
pH	4.397	4.363	4.599	6.002	4.613	4.010
Лактоза, %	3.86	4.37	4.80	3.31	4.96	4.29

Таблица 7 - Процессы культивирования бактериальной закваски для катыка (контроль)

Показатели	термофильная закваска	кефирная закваска	молоко с закваской	сгусток перед розливом
Титруемая	104.0	109.0	54.0	201.0
pH	4.523	4.50	5.571	3.627
Лактоза, %	3,93	3.93	3.93	3.63

Таблица 8 - Процессы культивирования бактериальной закваски для катыка (опыт-вариант 1)

Показатели	Закваски			Молоко после выдержки	Молоко после заквашивания	Сгусток перед розливом
	термофильный стрептококк вязкий	для сметаны	биолакт			
Титруемая кислотность. °Т	63.0	77,0	71.0	22,0	75,0	81.0
pH	4,661	4,60	4.623	6,62	4,612	4,497
Лактоза, %	4,21	4,13	4.19	4.31	4,326	4,26

Таблица 9 - Процессы культивирования бактериальной закваски для катыка (опыт-вариант 2)

Показатели	Закваски			Молоко после выдержки	Молоко после заквашивания	Сгусток перед розливом
	термофильный стрептококк	для сметаны	бакконцентрат для творога			
Титруемая кислотность, °Т	61.0	72.0	67.0	19.0	62.0	65.0
РН	4.762	4.437	4.497	6.700	4.77	4.765
Лактоза, %	3.64	3.77	3.58	3.56	3.64	3.60

Таблица 10 - Процессы культивирования бактериальной закваски для катыка (опыт-вариант 3)

Показатели	Закваски			Молоко после выдержки	Молоко после заквашивания	Сгусток перед розливом
	термофильный стрептококк вязкий	для масла и сметаны	для диетической сметаны			
Титруемая Кислотность, °Т	60.0	72.0	66.0	21.0	67.0	69.0
РН	4.460	4.431	4.473	6.63	4,826	4.815
Лактоза, %	3.86	3.71	3.41	3.52	1.61	3.57

Таблица 11 - Процессы культивирования бактериальной закваски для катыка (опыт-вариант 4)

Показатели	Закваски			Молоко после выдержки	Молоко после заквашивания	Сгусток перед розливом
	термофильный стрептококк, 204 К	Str. cremoris 215 К	Str. diacetylactis 199 К			
титруемая кислотность, °Т	63,0	77,0	71,0	22,0	86,0	108,0
РН	4,661	4,60	4,62	6,62	4,61	4,497
Лактоза, %	4,21	4,13	4,19	4,31	4,32	4,26

В третьем варианте также количество вносимой закваски -5 %, продолжительность сквашивания -4 ч, катык имел невысокую кислотность, приятный кисломолочный вкус, высокое содержание молочнокислых бактерий, хорошую хранимоспособность в течение 30 суток при 5-6 °С.

В лабораторных условиях из 4 варианта молочнокислых культур также были выработаны закваски и использованы для производства катыка.

Количество внесенной закваски - 5 %. Продолжительность сквашивания - 4-5 часов. Сгусток был плотный, ровный, без пузырьков газа, сыворотка не отделялась, при органолептической оценке обнаружен приятный, чистый, кисломолочный вкус, прекрасно выраженная ароматичность за счет наличия диацетила, вырабатываемого ароматообразующими бактериями. Кислотность готового продукта не превышала 108°Т. Количество молочнокислых бактерий было 1650-1083 млн. в 1 мл катыка.

Таблица 12 - Накопление биомассы при культивировании бактериальной закваски для иримшика (вариант 3)

Варианты	Молоко с закваской	Сгусток	
		в начале	в конце
		отваривания	
Контроль	66670±82	39838±85	37088±905
I серия (народн.)	59851±386	39588±42.5	37425±37.5
II серия опыт	60210±224	39750±99	37750±99

Свертывание молочной смеси для выработки сузбе проводили пепсином, количество которого рассчитывали в соответствии с технологической инструкцией.

Проведение предварительных экспериментов позволило установить возможность исключения дорогостоящего фермента пепсина для свертывания молочной смеси в связи с использованием ПКМС, СОМ, УФ- и ЭД-концентратов, предварительного подсушения молока. В опытных партиях при изготовлении курта применяли 5 % бакзакваски четвертого варианта.

Таблица 13 - Изменение физико-химических показателей при культивировании бактериальной закваски для сузбе (вариант 1)

Показатели	Бак. за- кваска	Смесь молочная	Готовый сгусток
Титруемая кислотность, °Т	92.0	78,0	78-80.0
pH	3.783	4,531	4,152
Лактоза, %	1,3386	4,13	3.89

В результате проведенных исследований была подтверждена целесообразность создания новых комплексов бактериальных заквасок для КНМП, были установлены физико-химические изменения при выработке КНМП, причем более благоприятными для получения продуктов высокого качества оказались опытные 1,3, 4, 5,6 варианты.

Пятый и шестой варианты бакзаквасок использовали для выработки пастообразных молочных продуктов. В молоке бифидобактерии могут вызвать его свертывание, однако развиваются очень медленно. Стимуляторами бифидобактерий являются олигосахариды. декстрин-мальтоза, кукурузный, ячменно-солодовый экстракты, поэтому исследователи применяли их в комплексе БАД «Ацидобак» и «Бифидобак» (компания «Артлайф»).

Таблица 14 - Изменение физико-химических показателей при культивировании бактериальной закваски для курта (вариант 3)

Варианты	Молоко	Сгусток до нагревания
контроль М	12570,0	444.4*10 ⁷
	1300,4	14051,0
1 серия (нар.) М	12077,0	394.2 *10 ⁷
	1239,0	10129,0

Продолжение таблицы 14

II серия опыта М	14327.7	$539.6 \cdot 10^7$
	148.09	17045,0

Таблица 15 - Динамика размножения бактериальных культур (lg 10)

Варианты	Продолжительность культивирования, ч						
	2	4	6	8	12	18	24
1	5,4	6,6	7,4	7,6	7,73	7,80	7,80
2	4,0	4,7	5,5	6,6	6,72	6,80	6,81
3	4,2	6,6	7,4	7,5	7,56	7,59	7,62
4	4,0	7,5	7,7	8,0	8,15	8,19	8,20
5	5,6	7,1	8,3	8,7	8,82	8,98	9,04

Таблица 16 - Изменение кислотообразующей активности бактериальных культур, °Т

Варианты	Продолжительность культивирования, ч						
	2	4	6	8	12	18	24
1	22	25	32	72	81	94	97
2	22	24	30	65	76	82	84
3	22	26	39	78	86	90	92
4	21	26	48	80	92	106	10
5 контроль	24	40	52	72	75	116	14

Изучение динамики размножения бактериальных культур для создания поликомпонентных продуктов показало, что скорость развития смешанных культур различная. Наиболее интенсивное развитие протекало в контроле, что объясняется присутствием в составе закваски кефирных грибков или смывов кефирных грибков, содержащих дрожжи.

Кислотообразующие свойства вводимых микроорганизмов играют основную роль в характере образования сгустка и консистенции. Введение энергичных кислотообразователей позволяет получить прочные сгустки, но существует опасность резкого нарастания кислотности, как в случае катыка. Слабые кислотообразователи способствуют образованию более нежных сгустков. Молочнокислые бактерии *Str.lactis*, обладающие достаточной кислотообразующей активностью, являются основными компонентами многоштаммовых заквасок для вырабатываемых нами национальных кисломолочных напитков. Они обеспечивают формирование структуры сгустка и его консистенцию [36].

При исследовании химического состава молока различных животных - коровье, козье, овечье - нами установлено, что составные части молока, в том числе и белковые вещества, существенно изменяются в течение лактационного периода. Аминокислотный состав молока также претерпевает значительные изменения в течение года, вследствие этого в весенний период из-за снижения содержания аминокислот часто на заводах наблюдались случаи несквашивания молока. Для избежания ухудшения качества кисломолочных напитков в этот период, улучшения их консистенции мы сочли целесообразным введение в состав закваски штаммы молочнокислых и ароматобразующих стрептококков с высокой протеолитической активностью.

При этом установлено, что молочнокислые бактерии образуют вязкие вещества при сквашивании молока. Изучение природы вязких веществ, повышающих прочностные характеристики КМН, позволило сделать вывод о том, что они представляют собой углеводно-белковые комплексы.

Данные

выводы основываются на изучении процессов высокотемпературной обработки молока при выработке катыка, а именно, 95-98 °С с выдержкой в течение 2-4 ч. Образующиеся полисахарид-белковые комплексы, например, при реакции Майяра, позволяют получить гомогенную, вязкую, сметанообразную консистенцию, а также повышают пищевую и биологическую ценность продукта, так как полисахарид-белковые комплексы способны регулировать проницаемость клеточных оболочек, обволакивая слизистую кишечника, препятствовать ее поражению, содействовать лучшему всасыванию витаминов в верхних частях кишечника, активизировать окислительно-восстановительные процессы обмена веществ.

Кроме того, благодаря высокой влагоудерживающей способности вязких полимеров повышается стойкость продуктов, уменьшается их синерезис при хранении. Прочностные характеристики сгустков повышаются также благодаря составлению поликомпонентной молочной смеси с использованием коровьего, козьего, овечьего молока и добавок растительного происхождения. Синерезиса сгустков при хранении нового продукта также не происходит. Исследования процессов сквашивания молока с различным содержанием СВ позволят установить, что молочнокислые стрептококки более интенсивно развиваются в кисломолочных продуктах с содержанием СВ 16-18 % по сравнению с обычными кисломолочными продуктами. Ряд исследователей также подтвердили положительное влияние увеличения СВ в молоке на рост молочнокислых бактерий [20, с.60], а также выявили воздействие высоких температур на рост и развитие *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus forphilus*, высоких давлений молочной смеси для выработки сыра из козьего 1ка [37-38].

В молоке с повышенным содержанием СВ до 13-15 % *Streptococcus lactis*

и *Streptococcus diacetylactis* развивались лучше, чем *Streptococcus cremoris*, что приводило к снижению кислотообразования. Оптимальное pH для роста лактококков - 6,3.

Таблица 17 - Влияние СВ на физико-химические показатели при культивировании бактериальных культур

Показатели	Обезжиренное молоко	Восстановленное молоко			
		9.9	11.3		12.4
сухие вещества, %	9.4	9.9	11.3		12.4
время выдержки, ч	Титруемая кислотность, °Т				
6	34.5	29.5	33.0		35.0
8	51.0	50.0	52.0		58.0
10	90.0	91.0	93.5		101.0
24	111.0	113.0	127.0		135.0
Накопление <i>Sir. cremoris</i> , %	25.0	22.0	7.0		6.0
Накопление <i>Str. diacetylactis</i> , %	75.0	78.0	93.0		94.0

Первый, третий, четвертый варианты композиций молочнокислых культур были испытаны в производственных условиях на молочных заводах РК для выработки различных КНМП.

При выработке пастообразных молочнобелковых продуктов с использованием добавок растительного происхождения, а также при создании пастообразных молочнобелковых продуктов из молозива на основе проведенных экспериментов была научно обоснована целесообразность использования в качестве бактериальных культур прямого внесения БАД «Арт Лайф» - БАД «Ацидобак» и «Бифидобак», состав которых приведен выше, поскольку сложный состав их, содержащий комплекс активных культур, позволил добиться получения высокоэффективных КНМП нового поколения для лечебно-профилактического, геродиетического и диетического питания различных категорий населения, особенно в зонах экологического бедствия и экологически неблагоприятных регионах. Установлена антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам ассоциаций БАД «Бифидобак» и «Ацидобак» [39].

Выявленные закономерности процессов ферментации представлены в уравнениях и найдены коэффициентах детерминации и свидетельствуют о высокой адекватности исследований :

$$y_1 = - 1,1944 x^3 + 17,536 x^2 - 62,698 x + 86,357 \quad R^2 = 0,9727$$

$$y_2 = - 1,1667 x^3 + 16,929 x^2 - 61,19 x + 85,571 \quad R^2 = 0,971$$

$$y_3 = - 1,1389 x^3 + 15,69 x^2 - 49,766 x + 66,357 \quad R^2 = 0,9657$$

$$y_4 = - 1,0278 x^3 + 14,286 x^2 - 41,972 x + 54,429 \quad R^2 = 0,9907$$

$$y_5 = 0,5278 x^3 - 6 x^2 + 35,615 x - 27,286 \quad R^2 = 0,984$$

1.6 Методы культивирования микроорганизмов, используемых в производстве кисломолочных продуктов

Существует два метода культивирования микроорганизмов:

- Поверхностный метод культивирования. Для этого метода используют плотные питательные среды.

- Глубинный метод культивирования. При этом методе отдельные микроорганизмы, или небольшие их агрегаты культивируют в жидкой среде во взвешенном состоянии. Для этого используют перемешивание среды и ее аэрацию [40].

1.6.1 Питательные среды

Питательные среды являются основой бактериологических исследований. Они служат для выделения из исследуемого материала чистых культур микробов, для изучения их свойств. На питательных средах создаются оптимальные условия для размножения микроорганизмов. В состав сред должны входить вещества, необходимые для построения всех компонентов цитоплазмы, т.е. все источники роста живого организма.

В лабораторных или производственных условиях бактерии выращивают (культивируют) на средах, которые должны удовлетворять потребности бактерий в питательных веществах, иметь адекватное значение величины рН, изотоничность и быть стерильными, а по возможности и прозрачными. Специфичность большинства питательных сред определяют соединения углерода и азота, но так как конструктивные и энергетические процессы микроорганизмов разнообразны, неодинаковы и их потребности в питательных веществах.

Питательные среды принято делить на несколько групп: среды которые отличаются по составу и происхождению, физическому состоянию или консистенции и функциональному или целевому назначению. По происхождению среды бывают *естественными (натуральными)* и *искусственными (синтетическими)*. К естественным средам относят те, в состав которых входят продукты растительного или животного происхождения. Они содержат все компоненты, необходимые для роста и развития бактерий, но имеют непостоянный химический состав, то есть они нестабильны. Поэтому такие питательные среды не пригодны для изучения метаболизма бактерий, а используются, в основном, для накопления биомассы, поддержания культур бактерий в жизнеспособном состоянии и для диагностических целей, например, для выделений чистых культур бактерий. К естественным средам относятся

молоко, кровь и сыворотка крови, отвары и экстракты из природных субстратов, пептонная и мясная вода, мясо-пептонные бульон и агар, дрожжевые экстракты, картофельные, яичные и желчесодержащие среды. Синтетические (искусственные) среды имеют определенный химический состав и точное количественное содержание питательных веществ. Их используют для изучения метаболизма бактерий, исследования физиологии и биохимии микроорганизмов. Примером синтетической среды могут служить среды Козера и Симмонса, используемые для изучения способности бактерий утилизировать цитраты. В состав этих сред, наряду с другими солями, входят цитрат натрия и индикатор. В практике микробиологии, как правило, используются комбинированные питательные среды, в которых сочетаются естественные компоненты с неорганическими солями. Примерами таких сред являются агар Цейсслера, в состав которого входит МПА, кровь и сахар, среды Гисса, содержащие пептон, агар, один из сахаров и индикатор, среда Раппопорта, состоящая из желчного бульона, глюкозы и индикатора.

Среды можно по составу разделить так же на *простые* и *сложные*. К простым относятся мясная и пептонная вода, мясо-пептонные бульон и агар. Добавление к таким средам одного или нескольких ингредиентов - углеводов, крови, сыворотки и других составляющих делают их сложными. По физическому состоянию питательные среды могут быть *жидкими*, *полужидкими*, *плотными* или *твердыми*, *сыпучими* или *сухими*. Жидкие среды представлены, как правило, водными растворами необходимых для жизни веществ. Их используют для накопления биомассы, обогащения культур бактерий, изучения метаболизма. Полужидкие и плотные питательные среды получают из жидких, добавляя к ним агар или желатину. Концентрация агара для полужидких сред 0,5-0,7%, а для плотных 1,5-2%. Полисахарид агар получают из некоторых видов морских водорослей, его высушивают и хранят в виде пластин или порошка. Бактерии не используют агар в качестве субстрата и поэтому состав плотной питательной среды зависит от состава жидкой среды, к которой добавлен агар. Агар плавится примерно при температуре 100 °С и застывает при 40° С. Агаризированные среды разливают в пробирки или чашки Петри в расплавленном состоянии, а затем охлаждают. Для уплотнения сред иногда используют желатину, добавляя ее к жидким средам в 10-20% концентрации. Применение желатины ограничено тем, что она разжижается протеолитическими ферментами бактерий и ее применяют, в основном, в питательных средах для диагностических целей. Для уплотнения сред используют, кроме того, селикогель и каррагенан, получаемый из красных морских водорослей. Пластины геля, пропитанные питательной средой, используют для культивирования бактерий-автотрофов. Сухие питательные среды представляют смеси составляющих питательных

сред определенного состава. Перед использованием их растворяют в воде в соответствии с инструкцией, указанной на этикетке, устанавливают необходимое значение рН и стерилизуют. Применение сухих питательных сред облегчает работу по приготовлению сложных сред в лабораториях. По целевому назначению питательные среды делят на несколько групп:

- основные или универсальные простые среды, например, МПА, МПБ; на них могут расти многие виды неприхотливых микроорганизмов;

- специальные или сложные среды используют для культивирования тех бактерий, которые не могут расти на основных простых средах; в состав специальных сред вводят, например, углеводы для роста стрептококков, желчь для культивирования сальмонелл, дефибринированную кровь для дифтерийной палочки [41].

Требования, предъявляемые к питательным средам:

- Питательные среды должны содержать необходимые для питания микробов питательные вещества;

- Иметь реакцию рН, оптимальную для выращиваемого вида микроба;

- Питательные среды должны иметь достаточную влажность и вязкость, т.к. микробы питаются по законам диффузии и осмоса;

- Обладать изотоничностью и иметь определенный окислительно-восстановительный потенциал (gH_2);

- Питательные среды должны быть стерильными, обеспечивая тем самым возможность выращивания чистых культур.

Питательный агар, а также основные дифференциально-диагностические среды выпускаются в настоящее время в виде сухих препаратов, содержащих все необходимые составные части. К таким порошкам нужно добавить только воду и сварить, а затем, после разливки, простерилизовать.

Агар-Агар (от малайского *агар-агар* — водоросли) — продукт (смесь полисахаридов агарозы и агаропектина), получаемый путем экстрагирования из красных (филофора) и бурых водорослей (*Gracilaria*, *Gelidium*, *Ceramium* и др.), произрастающих в Белом море и Тихом океане, и образующий в водных растворах плотный студень.

Агар представляет собой желтовато-белый порошок или пластинки. Содержит около 1,5-4 % минеральных солей, 10—20 % воды и 70—80 % полисахаридов, в составе которых выявлены D- и L-галактозы, 3,6-ангидрогалактозы, пентозы, D-глюконовая и пировиноградная кислоты. Из агара экстрагированы агароза и амилопектин.

Агар-агар не растворим в холодной воде. Он полностью растворяется только при температурах от 95 до 100 градусов. Горячий раствор является

прозрачным и ограниченно вязким. При охлаждении до температур 35—40 градусов он становится чистым и крепким гелем, который является термообратимым. При нагревании до 85—95 градусов он опять становится жидким раствором, снова превращающимся в гель при 35-40 градусах.

Агар (агар-агар) содержит 50-80% агарозы - линейного полисахарида. построенного из строго чередующихся остатков 3-О-замещенной β -D-галактопиранозы (изредка 6-О-метил β -D-галактопиранозы) и 4-О-замещенной 3,6-ангидро α -L-галактопиранозы (см. формулу). Агарозе сопутствует "агаропектин"-фракция кислых полисахаридов, углеводный скелет которых построен по тому же типу, но регулярность структуры замаскирована несколькими способами:

1. остатками пировиноградной кислоты, образующими циклические ацетали с группами OH в положениях 4 и 6 некоторых остатков β -D-галактозы;
2. остатками серной кислоты, связанными эфирной связью с разл. группами OH;
3. заменой части остатков 3,6-ангидро α -L-галактозы остатками 6-сульфата- α -L-галактозы.

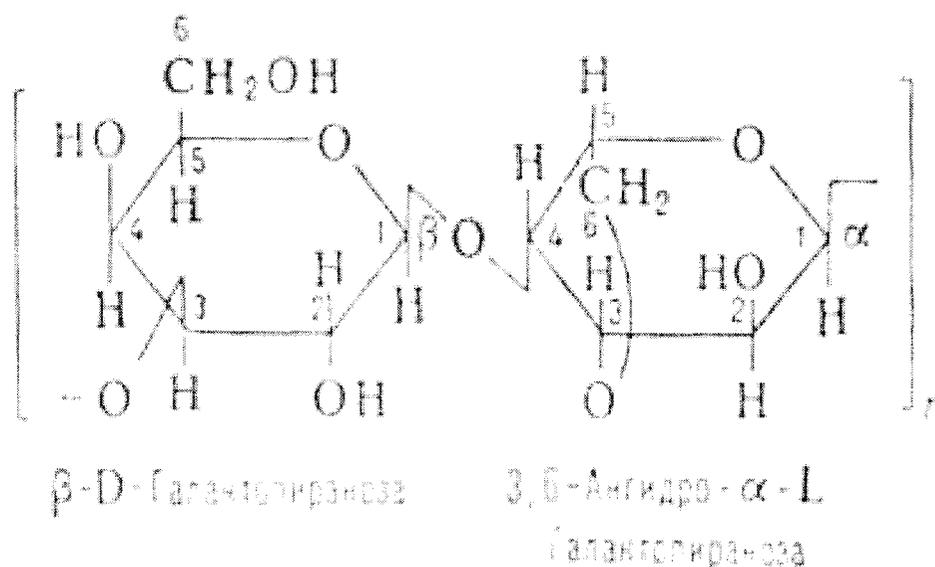


Рисунок 3 – Строение агарозы – линейного полисахарида

Агар используют при приготовлении плотных бактериальных сред, применяемых для культивирования и диагностики бактерий, а также как желирующее вещество в пищевой (особенно в кондитерской) промышленности. Агароза-носитель в гель-хроматографии, аффинной хроматографии, гелевом электрофорезе, иммунодиффузии и иммуноэлектрофорезе.

Мировое произ-во агар превышает 4500 т/год (1980), в т.ч. в Японии более 2000 т/год [42].

1.6.2 Выделение чистой культуры

Чистой культурой микроорганизмов называют культуру одного вида, выращенного как потомство одной клетки. Методы выделения чистых культур м/организмов основаны на изоляции одной микробной клетки от массы м/организмов и последующем выращивании потомства этой клетки на питательных средах изолированно от других видов.

Наиболее распространенным способом выделения чистых культур является посев смеси микробов на плотные питательные смеси с целью получения отдельных колоний культур, которые считают результатом развития одной клетки. Для посева чаще используют агаризованные среды в чашках Петри. Основной задачей метода является разведение концентрации м/организмов в исследуемом материале с таким расчетом, чтобы при посеве его на питательную среду выросли изолированные колонии.

Существуют два основных метода разведения исследуемого материала:

- 1) на поверхности плотной питательной среды;
- 2) предварительное разведение материала в физиологическом растворе.

Метод на поверхности плотной среды используется для выделения чистых культур аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов. С этой целью для посева берут ряд чашек Петри с плотной средой. В первую чашку наносят исследуемый материал и распределяют его по поверхности шпателем. Затем производят посев последовательно на поверхность Среды в остальных чашках. Количество материала, внесенного в среду, при этом последовательно убывает. Метод предварительного разведения используется для выделения чистых культур микроорганизмов как аэробных, так и анаэробных. Готовят разведение материалов 10-100 раз и более и производят посев разведений, пользуясь поверхностным или глубинным методом. Выделение чистых культур строгих анаэробов требует условий выращивания без доступа кислорода.

1. Морфологические свойства – форма клеток, размеры, подвижность, способность к образованию спор, возраст культуры и др.
2. Культурные свойства микроорганизмов устанавливают по особенностям роста на питательных средах. На жидких питательных средах отмечают: характер распределения культуры в жидкости (равномерное, придонное или поверхностное), мутность сред, вид пленки, осадка. На плотных питательных средах исследуют характер колоний. Различают поверхностные и глубинные колонии. Отмечают форму, профиль, блеск и цвет.
3. Физиологические свойства микроорганизмов обусловлены ферментативной

активностью: отношение к кислороду (тип дыхания), тип роста (рост у дна пробирки, рост шляпкой вверх, рост равномерный по всей длине укола).
4. Протеолитические свойства (способность расщеплять белковые вещества) определяют по выделению из питательной Среды газо-продуктов расщепления белка [43].

Чистой культурой называют такую культуру, которая содержит микроорганизмы одного вида. Выделение чистых культур бактерий - обязательный этап бактериологического исследования в лабораторной диагностике инфекционных болезней, в изучении микробной загрязненности различных объектов окружающей среды, и, в целом, при любой работе с микроорганизмами. Исследуемый материал (гной, мокрота, фекалии, кровь и другой материал от больных; вода, почва, воздух, пищевые продукты, трупы животных и человека, переносчики) обычно содержит ассоциации микробов. Выделение чистой культуры позволяет изучить морфологические, культуральные, биохимические, антигенные и другие признаки, по совокупности которых определяется видовая и типовая принадлежность возбудителя, то есть производится его идентификация. Для выделения чистых культур микроорганизмов используют методы, которые можно разделить на несколько групп.

- Метод Пастера - последовательное разведение исследуемого материала в жидкой питательной среде до концентрации одной клетки в объеме (имеет историческое значение).

- Метод Коха («пластинчатые разводки») - последовательное разведение исследуемого материала в расплавленном агаре (температура 48-50 ° С), с последующим разливом в чашки Петри, где агар застывает. Высевы делают, как правило, из трех-четырех последних разведений, где бактерий становится мало и, в дальнейшем, при росте на чашках Петри появляются изолированные колонии, образующиеся из одной исходной материнской клетки. Из изолированных колоний в глубине агара получают чистую культуру бактерий пересевом на свежие среды [21].

- Метод Шукевича - применяется для получения чистой культуры протей и других микроорганизмов обладающих «ползущим» ростом. Посев исследуемого материала производят в конденсационную воду у основания скошенного агара. Подвижные микробы (протей) способны подниматься вверх по скошенному агару, неподвижные формы остаются расти внизу на месте посева. Пересевая верхние края культуры можно получить чистую культуру.

- Метод Дригальского - широко применяется в бактериологической практике, при этом исследуемый материал разводят в пробирке стерильным физиологическим раствором или бульоном. Одну каплю материала вносят в первую чашку и стерильным стеклянным

шпателем распределяют по поверхности среды. Затем этим же шпателем (не прожигая его в пламени горелки) делают такой же посев во второй и третьей чашках. С каждым посевом бактерий на шпателе остается все меньше и меньше и, при посеве на третью чашку, бактерии будут распределяться по поверхности питательной среды отдельно друг от друга. Через 1-7 сут выдерживания чашек в термостате (в зависимости от скорости роста микроорганизмов) на третьей чашке каждая бактерия дает клон клеток, образуя изолированную колонию, которую пересевают на скошенный агар с целью накопления чистой культуры.

- **Метод Вейнберга.** Особые трудности возникают при выделении чистых культур облигатных анаэробов. Если контакт с молекулярным кислородом не вызывает сразу же гибели клеток, то посев производят по методу Дригальского, но после этого чашки сразу помещают в анаэрогат. Однако чаще пользуются методом разведения. Сущность его заключается в том, что разведения исследуемого материала проводят в расплавленной и охлажденной до 45-50 °С агаризированной питательной среде. Делают 6-10 последовательных разведений, затем среду в пробирках быстро охлаждают и заливают поверхность слоем смеси парафина и вазелинового масла, чтобы помешать проникновению воздуха в толщу питательной среды. Иногда питательную среду после посева и перемешивания переносят в стерильные трубки Бурри или капиллярные пипетки Пастера, концы которых запаивают. При удачном разведении в пробирках, трубках Бурри, пипетках Пастера вырастают изолированные колонии анаэробов. Чтобы изолированные колонии хорошо были видны, используют осветленные питательные среды. Для извлечения изолированных колоний анаэробов, пробирку слегка нагревают, вращая ее над пламенем, при этом агар, прилегающий к стенкам, плавится и содержимое пробирки в виде агарового столбика выскальзывает в стерильную чашку Петри. Столбик агара разрезают стерильным пинцетом и извлекают колонии петлей. Извлеченные колонии помещают в жидкую среду, благоприятную для развития выделяемых микроорганизмов (например, среду Китта-Тароцци). Агаризированную среду из трубки Бурри выдувают, пропуская газ через ватную пробку.

- **Метод Хангейта** - когда хотят получить изолированные колонии бактерий с особенно высокой чувствительностью к кислороду (строго аэробы) используют метод вращающихся пробирок Хангейта. Для этого расплавленную агаризированную среду засевают бактериями при постоянном токе через пробирку инертного газа, освобожденного от примеси кислорода. Затем пробирку закрывают резиновой пробкой и помещают горизонтально в зажим, вращающий пробирку, среда при этом

равномерно распределяется по стенкам пробирки и застывает тонким слоем. Применение тонкого слоя в пробирке, заполненной газовой смесью, позволяет получить изолированные колонии, хорошо видимые невооруженным глазом.

- Выделение отдельных клеток с помощью микроманипулятора. Микроманипулятор - прибор, позволяющий с помощью специальной микропипетки или микропетли извлекать одну клетку из суспензии. Эту операцию контролируют под микроскопом. На предметном столике микроскопа устанавливают влажную камеру, в которую помещают препарат «висячая капля». В держателях операционных штативов закрепляют микропипетки (микропетли), перемещение которых в поле зрения микроскопа осуществляется с микронной точностью благодаря системе винтов и рычагов. Исследователь, глядя в микроскоп, извлекает отдельные клетки микропипетками и переносит их в пробирки со стерильной жидкой средой для получения клона клеток [44].

1.7 Приготовление бактериальных препаратов и методы окраски бактерий

Для работы с микроорганизмами требуется определенная обстановка. На рабочем лабораторном столе должны быть спиртовка или газовая горелка, бактериологическая петля, предметные и покровные стекла, набор красок, микроскоп, салфетка, кедровое масло, пинцет, полоскательница с мостиком, сосуд с водой, песочные часы, карандаш по стеклу, фильтровальная бумага.

Для изучения формы микробной клетки и некоторых ее структур препарат (мазок) из материала, содержащего исследуемый вид микроба, окрашивают.

Большинство микробов быстро и хорошо окрашивается растворами анилиновых красок, некоторые виды бактерий плохо или совсем не окрашиваются этими красками. Для окраски таких видов требуется протравливание веществами, разрушающими оболочку клетки. Протравливание осуществляют перед окраской препарата или в момент приготовления растворов красок.

При работе с трудноокрашиваемыми микробами препарат иногда в процессе окрашивания подогревают пламенем горелки [45].

1.7.1 Приготовление бактериальных препаратов

Препарат - мазок для окрашивания готовится в несколько этапов:

- 1) приготовление препарата;

- 2) высушивание;
- 3) фиксация;
- 4) окраска.

Для приготовления препарата используют предметное стекло — тонкую стеклянную пластинку размером 76x26 мм с хорошо отшлифованными краями. При микрокопировании применяют покровные стекла толщиной 0,15—0,17 мм и размером 18X18, 20X20, 18X24 мм. Стекла должны быть чистыми, обезжиренными, подготавливаются заранее.

При достаточном обезжиривании капля воды равномерно расплывается по поверхности стекла, не образуя выпуклых участков.

Можно пользоваться следующим способом очистки стекол: стекла, бывшие в употреблении, выдерживают в течение 1—2 ч в концентрированной серной кислоте, затем промывают водой, кипятят в 2%-ном растворе соды или мыльной воде, тщательно ополаскивают водой и протирают мягкой чистой тканью. Можно пользоваться и другим способом: предметные и покровные стекла в течение 5—10 мин обрабатывают горячим (80—90° С) 10%-ным раствором NaOH или KOH, после чего ополаскивают водой, переносят в 96-градусный спирт и хранят в нём до использования.

Новые стекла сначала промывают в воде, затем в равной смеси спирта и эфира. Обработанные предметные стекла хранят в банке с притертой пробкой в сухом виде, в спирте или равной смеси спирта и эфира. Вынутые из спирта предметные стекла перед употреблением обжигают на горелке.

Покровные стекла обрабатывают спиртом, вытирают чистой мягкой тканью и хранят в коробочке или бюксе.

Чистые стекла берут пинцетом, так как пальцы оставляют на них жирные пятна. Если стекла находятся в жидкой среде, их перед употреблением обсушивают фильтровальной бумагой и слегка обжигают над пламенем горелки. При длительном употреблении стекла мутнеют и становятся непригодными для работы [46].

Препарат-мазок готовится при помощи бактериологических петель или пастеровских пипеток. Бактериологическую петлю готовят из платиновой или нихромовой проволоки длиной 5—7 см и толщиной 0,5 мм и припаивают к ней стеклянную ручку или вставляют ее в металлическую — петледержатель. Такая проволока легко стерилизуется на пламени и быстро остывает. Пастеровские пипетки выполняют из стеклянных трубок диаметром 3—6 мм.

Для приготовления препарата-мазка исследуемую культуру микроба осторожно распределяют равномерно тонким слоем на предметном стекле. При приготовлении мазка из культур, выросших на плотных средах, поступают следующим образом. На чистое предметное стекло стерильной пипеткой или бактериологической петлей наносят каплю водопроводной воды,

или физиологического раствора. Пробирку с культурой, из которой необходимо приготовить мазок, в наклонном положении помещают на указательном и среднем пальцах правой руки и сверху прижимают большим пальцем так, чтобы хорошо была видна вся поверхность питательной среды с выросшими на ней микроорганизмами. Прежде чем взять материал из культуры, необходимо прокалить бактериологическую петлю в пламени горелки до покраснения. При этом петля должна находиться в вертикальном положении, чтобы пламя охватывало не только всю петлю, но и часть иглодержателя. При работе петлю или пипетку держат в правой руке, как карандаш при письме. Зажав пробку между мизинцем и ладонью правой руки (в ней же находится подготовленная петля), вынимают ее из пробирки и держат концом вниз, не допуская соприкосновения с рукой той части пробки, которая находилась в пробирке. Открытый конец пробирки обжигают на пламени и отводят несколько к себе, затем вводят в пробирку петлю (еще раз проведенную через пламя), охлаждают прикосновением к стенке пробирки и набирают небольшое количество материала, слегка прикасаясь к культуре и не царапая среды петлей. После взятия материала пробирку тотчас закрывают той же ватной пробкой, а перед этим края пробирки и конец ватной пробки обжигают на пламени горелки. Взятый материал эмульгируют в имеющейся на предметном стекле капле и равномерно тонким слоем петлей распределяют по поверхности (1,5-Х2 см) [47].

Если культура выращена на жидкой питательной среде, то стерильную петлю опускают в жидкость, захватывают каплю и растирают ее на предметном стекле. На обратной стороне стекла обводят восковым карандашом место, где приготовлен мазок. Это облегчает в дальнейшем нахождение его.

После этого петлю прокаливают, с тем чтобы убить оставшиеся на ней микроорганизмы, и кладут на место.

Для приготовления мазка можно пользоваться и стеклянной пипеткой. Пастеровскую пипетку предварительно проводят над пламенем горелки, затем пинцетом над прокаленным пламенем горелки обламывают тонкий запаянный конец пипетки и набирают материал. Исползованную пипетку опускают в сосуд с дезинфицирующим раствором (5%-ным раствором фенола).

Препарат-мазок из зубного налета готовят следующим образом. На предметное стекло наносят бактериологической петлей каплю физиологического раствора или водопроводной воды, затем осторожно снимают зубной налет спичкой (без серной головки), растирают в капле и тонким слоем распределяют по поверхности стекла. Мазок подсушивают на воздухе, фиксируют и окрашивают.

Высушивание приготовленного препарата производится на воздухе или в термостате. Подогревать препарат не рекомендуется, так как при быстрой

потере влаги происходит грубое свертывание белков и клетки теряют естественную форму. При высушивании препарат предохраняют от мух, накрывая стеклянным колпаком [48].

Фиксация высушенного препарата преследует несколько целей: обеспечить лучшее прилипание микробных клеток к стеклу, убить микроорганизмы (мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые). Фиксация препарата производится над пламенем спиртовки или газовой горелки. Предметное стекло берут за уголки большим и указательным пальцем и медленно проводят, держа стороной с нанесенным препаратом вверх через пламя не менее трех раз. В общей сложности мазок должен подвергаться действию пламени не более 2 с. Длительная фиксация может изменить структуру микробных клеток и их форму; недостаточно зафиксированный мазок смывается со стекла при последующей обработке.

Для фиксации можно использовать различные химические вещества. В абсолютном спирте мазки выдерживают 15—30 мин, в смеси равных объемов спирта и эфира — 2—5 мин, в метиловом и амиловом спирте — 5 мин. Фиксация производится путем погружения мазка в кювету с одним из указанных веществ или наливания последних на мазок [49].

1.7.2 Метод простой окраски

При простом методе окраски используется один какой-нибудь красящий раствор, чаще всего фуксин Пфейффера или метиленовый синий.

Техника окраски. На фиксированный препарат помещают пипеткой несколько капель красящего раствора так, чтобы покрыть всю поверхность мазка. Фуксином Пфейффера красят 1—2 мин, метиленовым синим 3—5 мин. Затем краску смывают водой, а мазок просушивают между листочками фильтровальной бумаги или на воздухе [50].

1.7.3 Сложные методы окраски микроорганизмов

Сложные методы окраски применяют с целью диагностики и выявления отличительных структур микробов в случаях, когда последние не окрашиваются простым способом. К сложным методам относятся, например, окраска по Граму, окраска спор, капсул и др.

Окраска по Граму. Универсальный дифференциально-диагностический метод окраски. Этот метод окраски микроорганизмов для исследования, позволяющий дифференцировать бактерии по биохимическим свойствам их клеточной стенки. Предложен в 1884 году датским врачом Г. К. Грамом. По отношению к окраске по Граму все виды микробов принято делить на две группы: грамположительные и грамотрицательные

[51].

По Грамму бактерии окрашивают основными красителями — генциановым или метиловым фиолетовым и др., затем краситель фиксируют раствором йода. При последующем промывании окрашенного препарата спиртом те виды бактерий, которые оказываются прочно окрашенными, называют грамположительными бактериями (обозначаются Грам (+)), — в отличие от грамотрицательных (Грамм (-)), которые при промывке обесцвечиваются. Окраска по Грамму имеет большое значение в систематике бактерий, а также для микробиологической диагностики инфекционных заболеваний.

Грамположительные кокковые и спорноносные формы бактерий, а также дрожжей, они окрашиваются в иссиня-чёрный (тёмно-синий) цвет.

Грамотрицательны многие неспороносные бактерии, они окрашиваются в красный цвет, ядра клеток приобретают ярко-красный цвет, цитоплазма — розовый [52].

Метод окраски по Грамму основан на использовании способности магниевых солей рибонуклеиновой кислоты, содержащихся в цитоплазме целого ряда микробов (грамположительных), вступать в реакцию с генцианвиолетом и йодом и образовывать стойкое соединение, не разрушающееся при последующем воздействии спирта. Грамотрицательные микробы, имеющие иной состав цитоплазмы, прочного соединения с генцианвиолетом не образуют и при обработке спиртом обесцвечиваются, а при дополнительной окраске водным раствором фуксина окрашиваются в розово-красный цвет [53].

Техника проведения окраски: окраска по Грамму относится к сложному способу окраски, когда на мазок воздействуют двумя красителями, из которых один является основным, а другой — дополнительным. Кроме красящих веществ при сложных способах окраски применяют обесцвечивающие вещества: спирт, кислоты и др.

Для окраски по Грамму чаще используют красители трифенилметановой группы: генциановый, метиловый фиолетовый или кристаллвиолет. Грамположительные Грамм (+) микроорганизмы дают прочное соединение с указанными красителями и йодом. При этом они не обесцвечиваются при воздействии на них спиртом, вследствие чего при дополнительной окраске фуксином Грамм (+) микроорганизмы не изменяют первоначально принятый фиолетовый цвет.

Грамотрицательные Грамм (-) микроорганизмы образуют с основными красителями и йодом легко разрушающееся под действием спирта соединение. В результате микробы обесцвечиваются, и затем окрашиваются фуксином, приобретая красный цвет [54].

Подготовка материала для окраски: исследуемый материал распределяют тонким слоем по поверхности хорошо обезжиренного предметного стекла. Приготовленный мазок высушивают на воздухе и после полного высыхания фиксируют. Гистологические срезы готовят по рутинной методике, фиксируя кусочки тканей в формалине и заливая в парафин.

Фиксация мазка.

При фиксировании мазок закрепляется на поверхности предметного стекла, и поэтому при последующей окраске препарата микробные клетки не смываются. Кроме того, убитые микробные клетки окрашиваются лучше, чем живые [55].

Физический способ фиксации.

Предметное стекло с препаратом берут пинцетом или I и II пальцами правой руки за рёбра мазком кверху и плавным движением проводят 2—3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации должен занимать не более 2 с.

Надёжность фиксации проверяют следующим приёмом: свободную от мазка поверхность предметного стекла прикладывают к тыльной поверхности левой кисти. При правильном фиксировании мазка стекло должно быть горячим, но не вызывать ощущения ожога (70—80 °С) [56].

1. На фиксированный мазок наливают один из основных красителей на 2—3 минуты. Во избежание осадков окрашивают через фильтровальную бумагу.
2. Сливают краску, аккуратно удаляют фильтровальную бумагу. Мазок заливают на 1—2 мин раствором Люголя или йодистым раствором по Граму (водный раствор йодида калия и кристаллического йода в соотношении 2:1) на 1—2 минуты до почернения препарата.
3. Раствор сливают, мазок прополаскивают 96° этиловым спиртом или ацетоном, наливая и сливая его, пока и мазок не обесцветится и стекающая жидкость не станет чистой (приблизительно 20—40—60 секунд).

4. Тщательно промывают стекла в проточной или дистиллированной воде 1—2 мин.

5. Для выявления грамотрицательной группы бактерий препараты дополнительно окрашивают фуксином или сафранином (2—5 мин).

Промывают в проточной воде и высушивают фильтровальной бумагой.

Грамположительные микробы окрашиваются в темно-фиолетовый, почти черный цвет, грамотрицательные — в розово-красный [57].

1.8 Микроскоп и микроскопические методы исследования

1.8.1 Световая микроскопия

Для обнаружения и исследования микроорганизмов применяют микроскопы. Световые микроскопы предназначены для изучения микроорганизмов, которые имеют размеры не менее 0,2 мкм (бактерии, простейшие и т. п.), а электронные для изучения более мелких микроорганизмов (вирусы) и мельчайших структур бактерий.

В зависимости от среды, которая находится между объективом и препаратом, различают «сухие» объективы малого и среднего увеличения (до 40 х) и иммерсионные с максимальной апертурой и увеличением (90—100 х). «Сухой» объектив - это такой объектив, между фронтальной линзой которого и препаратом, находится воздух [58].

Особенностью иммерсионных объективов является то, что между фронтальной линзой такого объектива и препаратом помещают иммерсионную жидкость, имеющую показатель преломления такой же, как стекло (или близкий к нему), что обеспечивает увеличение числовой апертуры и разрешающей способности объектива. В качестве иммерсионной жидкости для объективов водной иммерсии используют дистиллированную воду, а для объективов масляной иммерсии—кедровое масло или специальное синтетическое иммерсионное масло. Использование синтетического иммерсионного масла предпочтительнее, поскольку его параметры более точно нормируются, и оно в отличие от кедрового, не засыхает на поверхности фронтальной линзы объектива. Для объективов, работающих в ультрафиолетовой области спектра, в качестве иммерсионной жидкости используют глицерин. Ни в коем случае нельзя пользоваться суррогатами иммерсионного масла и, в частности, вазелиновым маслом [59].

Изображение, полученное с помощью линз, обладает различными недостатками: сферической и хроматической абберациями, кривизной поля изображения и др. В объективах, состоящих из нескольких линз, эти недостатки в той или иной мере исправлены. В зависимости от степени исправления этих недостатков различают объективы ахроматы и более сложные апохроматы. Соответственно объективы, в которых исправлена кривизна поля изображения, называются планахроматами и планапохроматами. Использование этих объективов позволяет получить резкое изображение по всему полю, тогда как изображение, полученное с помощью обычных объективов, не имеет одинаковой резкости в центре и на краях поля зрения. Все характеристики объектива обычно выгравированы на его оправе: собственное увеличение, апертура, тип объектива (АПО - апохромат и т. п.); объективы водной

иммерсии имеют обозначение ВИ и белое кольцо вокруг оправы в нижней ее части, объективы масляной иммерсии—обозначение МИ и черное кольцо. Все объективы рассчитаны для работы с покровным стеклом толщиной 0,17мм [60].

Анализ вышеприведенных данных позволяет сделать вывод, что при производстве молочных продуктов следует тщательно подбирать комбинированные виды бактериальных заквасок с учетом их свойств, симбиотических и синергетических характеристик для создания продуктов высокого качества. В связи с этим нами был проведен комплекс исследований процессов культивирования молочнокислых бактерий, рост и развитие их в искусственных питательных средах.

ГЛАВА 2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Для исследований были выбраны концентраты заквасок производства Угличской экспериментальной биофабрики:

1. ЛДБПк БК – Углич - №7К – концентрат лиофилизированный молочнокислых бактерий (для ускорения созревания сыров);
2. БФБ(л) Бифилакт – Б – концентрат бактериальный лиофилизированный для ферментированных молочных продуктов (для обогащения продуктов бифидобактериями);
3. ППШ БК – Углич – Про – концентрат бактерий лиофилизированный для ферментированных молочных продуктов (пропионовокислые бактерии).

Первым этапом исследования было освежение музейного штамма заквасок. Для этого было применено предварительное разведение материала в физиологическом растворе: 1/5 части заквасок развести в 2 мл стерильного физиологического раствора с последующим высевом на плотные питательные среды (МПА, СА).

Вторым этапом исследований является культивирование на плотных питательных средах – мясо-пептонный агар и сывороточный агар.

Для нашего исследования мы применяли питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (грим-агар).

МПА готовили следующим образом: препарат в количестве 39,5г. размещивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 3 мин. до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в стерильные флаконы и стерилизуют автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин. Среду охлаждают до температуры 45-50°C, разливают в чашки Петри слоем 3-4мм. После застывания среды, соблюдая правила асептики, чашки подсушивают при t (37+1)°C в течение 40-60 мин. Готовая среда в чашках прозрачная или слегка опалесцирующая, желтого цвета [61].

Выше приведена стандартная методика приготовления МПА из расчета на 1 литр дистиллированной воды. Для нашего исследования мы готовили среду по стандартной рецептуре, но из расчета на 100 мл дистиллированной воды. Т.е. к 100 мл дистиллированной воды мы добавляли 3,9 г питательного агара. В результате у нас получилось 5 чашек Петри со стерильной средой МПА.

Готовая стерильная среда, разлитая в чашки Петри, имеет:

- желтый цвет, прозрачная или слегка опалесцирует (не более 5 единиц по стандарту мутности ОСО 42-28-85-86);

- рН $7,3 \pm 0,2$;
- температуру застудневания от 30 до 37 °С;
- температуру плавления студня среды не менее 80 °С [62].

Способ приготовления СА: препарат в количестве 7,5 г размешивают в 100мл дистиллированной воды, кипятят 3мин. до полного расплавления агара, добавляют 400мл. заранее приготовленной молочной сыворотки, подвергают действию текучего пара в течение 30 минут, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в стерильные флаконы и стерилизуют автоклавированием в течение 30 мин. Среду охлаждают до температуры 45-50°С, разливают в чашки Петри слоем 3-4 мм. После застывания среды, соблюдая правила асептики, чашки подсушивают при $t (37+1)^\circ\text{C}$ в течение 40-60 мин. Готовая среда в чашках мутного белого цвета [63].

Для нашего исследования мы готовили среду из расчета на 20 мл дистиллированной воды добавляли 80 мл молочной сыворотки и 1,5 г питательного агара.

Посев музейного штамма производился в строго асептических условиях при помощи бактерицидной петли на плотную питательную среду: МПА (мясо-пептонный агар) и СА (сывороточный агар).

Культивирование в термостате на ТПС длилось 4 суток при температуре 37°С.

Третьим этапом нашего исследования является пересев образцов с твердых питательных сред и посев оригинала на жидкие питательные среды (МПБ,СБ).

Способ приготовления МПБ: препарат в количестве 20 г размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2мин. до полного расплавления агара, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в стерильные пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре 121°С в течение 15 мин, охлаждают. Готовая среда в пробирках прозрачная или слегка опалесцирующая желтого цвета [64].

Для нашего исследования мы готовили среду из расчета 2г. питательного бульона на 100мл. дистиллированной воды.

Способ приготовления СБ незначительно отличается от МПБ: препарат в количестве 2г. размешивают в 80мл дистиллированной воды, стерильно добавляют 20мл предварительно подготовленной молочной сыворотки, кипятят 2мин. до полного расплавления агара, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в стерильные пробирки по 5 см³ и стерилизуют автоклавированием при температуре 121°С в течение 15 мин, охлаждают. Готовая среда в пробирках мутноватого белого цвета.

Посев оригинала и пересев с плотных питательных сред производился в строго асептических условиях на жидкую питательную среду: МПБ (мясо-пептонный бульон) и СБ (сывороточный бульон).

Культивирование в термостате на ЖПС длилось 2 суток при температуре 37°C.

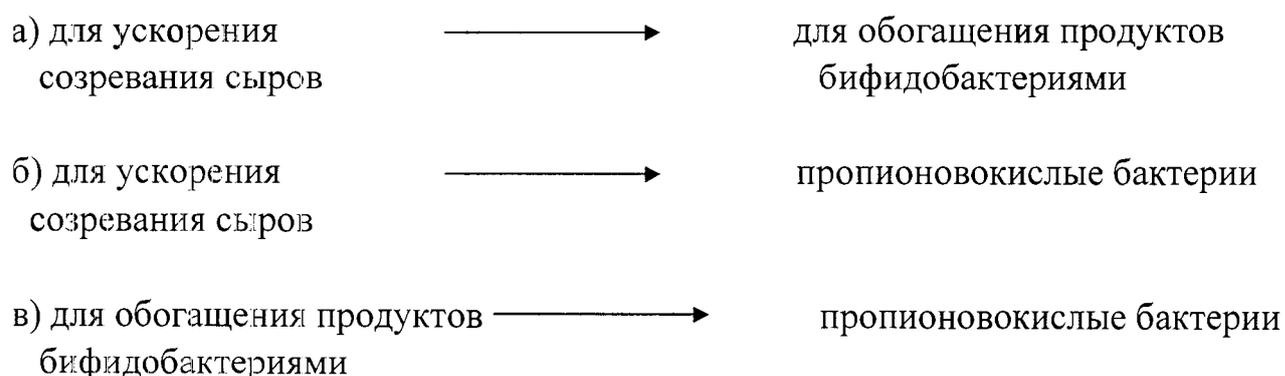
Четвертым этапом нашего исследования является изучение сокультивирования микроорганизмов, выбранных нами заквасок.

С этой целью мы делаем пересев чистой культуры с ТПС на МПБ.

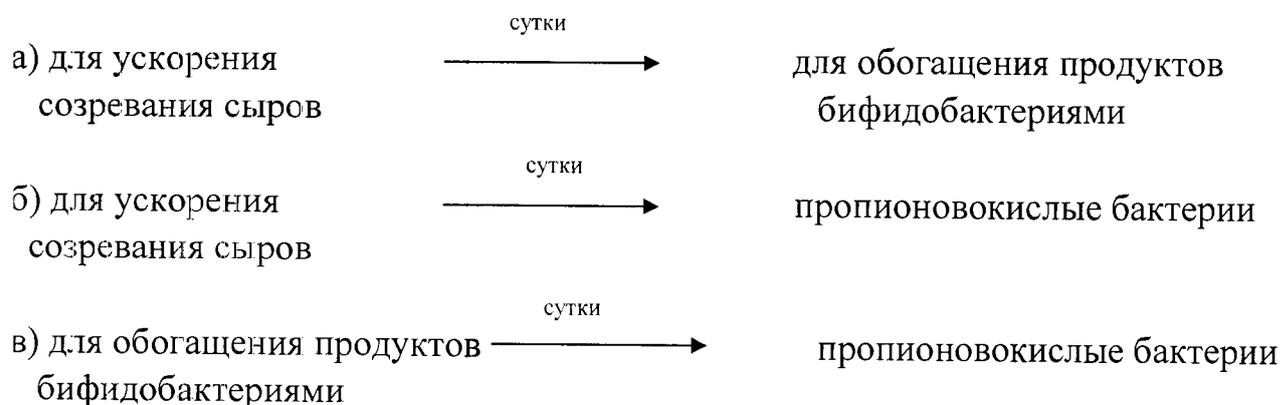
Этот этап подразделяется на три пункта:

1. Одновременный посев;
2. Последовательный посев;
3. Обратный посев.

1. При одновременном посеве две культуры вносятся одновременно и культивируют сутки. Схематично это можно изобразить следующим образом:



2. При последовательном посеве две культуры вносятся последовательно через сутки. Культивирование также длилось в течение суток. Схематично это можно изобразить следующим образом:



3. При обратном последовательном посеве две культуры вносятся последовательно через сутки, но в обратном порядке. Культивирование также длилось в течение суток. Схематично это можно изобразить следующим

образом:

- а) для обогащения продуктов бифидобактериями $\xrightarrow{\text{сутки}}$ для ускорения созревания сыров
- б) пропионовокислые бактерии $\xrightarrow{\text{сутки}}$ для ускорения созревания сыров
- в) пропионовокислые бактерии $\xrightarrow{\text{сутки}}$ для обогащения продуктов бифидобактериями

Четвертым этапом нашего исследования является приготовление препаратов для окраски и микроскопирования.

Для окраски мы использовали метод Грамма.

2.2 Цели и задачи

Цель магистерской диссертации – изучение особенностей сокультивирования микроорганизмов, используемых в производстве кисломолочных продуктов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи исследований**:

- ознакомиться с видами микроорганизмов, используемых в производстве кисломолочных продуктов;
- исследовать основы процесса брожения;
- ознакомиться с существующими методами культивирования, выделения чистой культуры, окраски и микроскопирования;
- изучить взаимоотношения между микроорганизмами при совместном культивировании на искусственных и естественных питательных средах;
- исследовать основные свойства молочнокислых бактерий в процессе их культивирования и сокультивирования на различных питательных средах.

2.3 Полученные результаты и их интерпретация

На первом этапе нашего исследования производился посев освеженного музейного штамма заквасок бактериальных концентратов Угличской экспериментальной биофабрики в строго асептических условиях на плотную питательную среду: МПА (мясо-пептонный агар) и СА (сывороточный агар).

Культивирование в термостате на ТПС длилось 4 суток при температуре

37⁰С.

В результате в образцах посевов на СА характерного роста не обнаружено (см.фотографии приложения А).

Образцы на МПА показали результат, представленный в табл.18, столбец 2; (см.фотографии приложения А).

Таблица 18 - Результаты освежения микроорганизмов заквасок на твёрдых питательных средах

Обозначение образца	Визуальное описание роста	Микроскопирование
1	2	3
1А (для ускорения созревания сыров)	Активный рост по всей поверхности среды	Активный характерный рост бактерий; диплококки, стрептококки, палочковидные формы в виде полых капсул
2А (для обогащения продуктов бифидобактериями)	Точечный рост	Активный палочковидный рост, диплококки
3А (пропионовокислые бактерии)	Точечный и штрихообразный рост	Активный рост, палочки крупные, скопления; диплококки

На данном этапе можно сделать вывод о том, что наиболее подходящей питательной средой для культивирования данных видов микроорганизмов является МПА, т.к. наблюдается наиболее активный рост характерных форм.

Следующим этапом нашего исследования является пересев образцов с твердых питательных сред (МПА) и посев оригинала освеженного музейного штамма на жидкие питательные среды (МПБ,СБ).

Посев производился в строго асептических условиях. Культивирование в термостате на ЖПС длилось 2 суток при температуре 37⁰С и дало следующий результат (см.таблицы 19-20, фотографии приложения А).

Таблица 19 - Результаты культивирования микроорганизмов заквасок на жидких питательных средах (МПБ, СБ)

Обозначение образца	Визуальное описание роста	Микроскопирование
1	2	3
СБ-20 (для обогащения продуктов бифидобактериями)	Помутнение среды, незначительный осадок серого цвета	Характерный рост бифидобактерий (наблюдаются признаки разрушения)
СБ-30 (пропионовокислые бактерии)	Помутнение среды, осадок желтоватого цвета	В основном мелкие клетки, незначительное количество крупных пропионовокислых бактерий
МПБ-20 (для обогащения продуктов бифидобактериями)	Незначительное количество белого осадка, рост на поверхности в виде налета светло-бежевого цвета	Диплококки, кокки, мелкие бифидобактерии с переходом в крупные
МПБ-30 (пропионовокислые бактерии)	Белый осадок, рост на поверхности в виде налета желтого цвета	Мелкие пропионовокислые бактерии

При проведении исследования на основе полученных данных был сделан вывод о том, что на образцах посева на СБ и пересевов с СА значительного характерного роста не наблюдается. Исходя из этого эти образцы при дальнейших исследованиях не принимаем во внимание.

Дальнейшим этапом нашего исследования является изучение сокультивирования микроорганизмов, выбранных нами заквасок.

С этой целью мы делаем 3 вида пересевов чистой культуры: одновременный, последовательный, обратный с МПА на МПБ. Результаты приведены в таблицах 21-23, а также на фотографиях (см.приложение А).

Таблица 20 – Результат культивирования микроорганизмов заквасок при пересеве образцов с ТПС (МПА) на ЖПС (МПБ)

Обозначение образца	Визуальное описание роста	Микроскопирование
1	2	3
МПБ-1А (для ускорения созревания сыров)	Наблюдается незначительное количество хлопьевидного осадка серого цвета, поверхностный пленочный рост коллоидного типа	Грамположительные палочковидные бактерии, т.ж. диплококки, тетракокки
МПБ-2А (для обогащения продуктов бифидобактериями)	Наблюдается обильный, мелко дисперсный осадок	Характерный активный рост бифидобактерий
МПБ-3А (пропионовокислые бактерии)	Наблюдается незначительное количество осадка коллоидного типа, поверхностный рост в виде плотной белой пленки	Активный рост, палочковидные бактерии

Таблица 21 - Пересевы на МПБ. Одновременный посев

для ускорения созревания сыров	для обогащения продуктов бифидобактериями	пропионовокислые бактерии
для ускорения созревания сыров	<u>Виз:</u> Незначительный белый осадок, поверхностный рост в виде тонкой пленки белого цвета. <u>М-е:</u> палочки (мелкие), местами ветвистые колонии, соединенные тонкими нитями - бифидобактерии	<u>Виз:</u> Осадок отсутствует, пленка более плотная (махровая) <u>М-е:</u> палочки, скопления неправильной формы, ветвистые колонии – пропионовокислые бактерии

Продолжение таблицы 21

<p>для обогащения продуктов бифидобактериями</p>	<p>Виз: Незначительный белый осадок, поверхностный рост в виде тонкой пленки белого цвета. М-е: палочки (мелкие), местами бифидобактерии</p>		<p>Виз: Незначительное помутнение среды, мелкие флоккулы, хлопьевидный осадок. М-е: мелкие кокки, диплококки, стрептококки, бифидобактерии</p>
<p>пропионовокислые бактерии</p>	<p>Виз: Осадок отсутствует, пленка более плотная (махровая) М-е: палочки, скопления неправильной формы, ветвистые колонии – пропионовокислые бактерии</p>	<p>Виз: Незначительное помутнение среды, мелкие флоккулы, хлопьевидный осадок. М-е: мелкие кокки, диплококки, стрептококки, бифидобактерии</p>	

Таблица 22 - Пересевы на МПБ. Последовательный посев

	для ускорения созревания сыров	для обогащения продуктов бифидобактериями	пропионовокислые бактерии
для ускорения созревания сыров		<p>Виз: незначительный осадок, поверхностный рост в виде пористой слизистой пленки</p> <p>М-е: характерных форм не обнаружено, объекты в виде капель; бифидобактерии</p>	<p>Виз: незначительный осадок, поверхностный рост в виде пленки (махровая сверху и слизистая внизу)</p> <p>М-е: диплококки, стрептококки, много мелких палочковидных бактерий, палочковидные споровые формы</p>
для обогащения продуктов бифидобактериями	<p>Виз: незначительный осадок, поверхностный рост в виде пористой слизистой пленки</p> <p>М-е: характерных форм не обнаружено, объекты в виде капель; бифидобактерии</p>		<p>Виз: помутнение среды, флоккулы, хлопьевидный осадок, незначительный поверхностный рост</p> <p>М-е: крупные и мелкие длинные палочковидные бактерии, делящиеся крупные и мелкие диплококки, мелкие кокки</p>

Продолжение таблицы 22

<p>пропионово-кислые бактерии</p>	<p>Виз: незначительный осадок, поверхностный рост в виде пленки (махровая сверху и слизистая внизу) М-е: диплококки, стрептококки, много мелких палочковидных бактерий, палочковидные споровые формы</p>	<p>Виз: помутнение среды, флоккулы, хлопьевидный осадок, незначительный поверхностный рост М-е: крупные и мелкие длинные палочковидные бактерии, делящиеся крупные и мелкие диплококки, мелкие кокки</p>	
--	--	--	--

Таблица 23 - Пересевы на ЖПС (МПБ). Последовательный обратный посев

	для ускорения созревания сыров	для обогащения продуктов бифидобактериями	пропионово-кислые бактерии
<p>для ускорения созревания сыров</p>		<p>Виз: осадок (сплошная масса), пристеночный рост, помутнение среды, поверхностный рост в виде слизистой пленки М-е: булавовидные бактерии, встречаются кокковые формы (скопления), редко встречаются палочки, бифидобактерии</p>	<p>Виз: осадок, пристеночный рост, помутнение среды, флоккулы, поверхностный рост М-е: присутствуют взрослые пропионовокислые бактерии, овальные со жгутом формы</p>

Продолжение таблицы 23

<p>для обогащения продуктов бифидобактериями</p>	<p>Виз: осадок (сплошная масса), пристеночный рост, помутнение среды, поверхностный рост в виде слизистой пленки М-е: булабовидные бактерии, встречаются кокковые формы (скопления), редко встречаются палочки, бифидобактерии</p>		<p>Виз: осадок, пристеночный рост, помутнение среды, флоккулы, поверхностный рост в виде островков М-е: встречаются палочки, молодые клетки кокковой формы, присутствуют зрелые пропионовокислые бактерии</p>
<p>пропионово-кислые бактерии</p>	<p>Виз: осадок, пристеночный рост, помутнение среды, флоккулы, поверхностный рост в виде пленки (махровой) М-е: присутствуют взрослые клетки пропионовокислые бактерии, овальные со жгутом формы</p>	<p>Виз: осадок, пристеночный рост, помутнение среды, флоккулы, поверхностный рост в виде островков М-е: встречаются палочки, молодые клетки кокковой формы, присутствуют зрелые пропионово-кислые бактерии</p>	

При проведении исследования на основе полученных данных были сделаны следующие выводы.

1. Одновременный посев:

- а) при сокультивировании закваски для ускорения созревания сыров с закваской для обогащения продуктов бифидобактериями наблюдается активный рост бифидобактерий, а следовательно подавление роста закваски для ускорения созревания сыров;

б) при сокультивировании закваски для ускорения созревания сыров с пропионовокислыми бактериями наблюдается рост пропионовокислых бактерий, а следовательно подавление роста закваски для ускорения созревания сыров;

в) при сокультивировании закваски для обогащения продуктов бифидобактериями с пропионовокислыми бактериями наблюдается активный рост пропионовокислых бактерий, а следовательно подавление роста закваски для обогащения продуктов бифидобактериями.

2. Последовательный посев (через сутки):

а) при сокультивировании закваски для ускорения созревания сыров с закваской для обогащения продуктов бифидобактериями характерных форм не обнаружено. Можно предположить, что сокультивирование этих бактерий невозможно;

б) при сокультивировании закваски для ускорения созревания сыров с пропионовокислыми бактериями наблюдается рост закваски для ускорения созревания сыров, а следовательно подавление роста пропионовокислых бактерий;

в) при сокультивировании закваски для обогащения продуктов бифидобактериями с пропионовокислыми бактериями наблюдается активный рост бифидобактерий, а следовательно подавление роста пропионовокислых бактерий.

3. Обратный посев (через сутки):

а) при сокультивировании закваски для обогащения продуктов бифидобактериями с закваской для ускорения созревания сыров наблюдается рост бифидобактерий на стадии отмирания, а следовательно подавление роста закваски для ускорения созревания сыров;

б) при сокультивировании пропионовокислых бактерий с закваской для ускорения созревания сыров наблюдается рост пропионовокислых бактерий, а следовательно подавление роста закваски для ускорения созревания сыров;

в) при сокультивировании пропионовокислых бактерий с закваской для обогащения продуктов бифидобактериями наблюдается активный рост бифидобактерий, а следовательно подавление роста пропионовокислых бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из всех представителей микрофлоры молока и молочных продуктов молочнокислые бактерии проявляют наиболее высокую требовательность к наличию отдельных веществ для питания, особенно к ее белковому и аминокислотному, а также витаминному составу. Так как молочнокислое брожение является ведущим при производстве кисломолочных продуктов, то основное внимание должно быть уделено удовлетворению потребностей в питании именно молочнокислых бактерий [65].

Среди микроорганизмов молока распространены следующие виды взаимоотношений: симбиоз, антагонизм и паразитизм. Симбиотические взаимоотношения характеризуются взаимной пользой, которую получают два или более микроорганизмов при совместном развитии. Возможно, что при этом один микроорганизм вырабатывает вещества (аминокислоты, витамины), без которых на данной среде не может жить другой, а этот последний потребляет продукты обмена, угнетающие развитие первого. Возможны также случаи, когда каждый из симбионтов вырабатывает какое-то вещество, необходимое для другого. В понятие симбиоза входят также синергизм и комменсализм. О синергизме говорят, когда два вида, развиваясь в среде, вызывают в ней такие изменения, которые не может вызвать каждый из видов, развиваясь отдельно. Случай, когда один вид микроорганизмов живет за счет продуктов обмена другого или стимулируется ими, не давая ничего другому виду, рассматриваются как комменсализм ("комменсал" в буквальном смысле — питающийся с одного стола). Разновидностью комменсализма когда один вид микробов подготавливает благоприятные условия для последующего развития другого, является метабиоз. Под антагонизмом понимают взаимную борьбу между двумя или несколькими микроорганизмами. Причинами антагонистической действия могут быть: конкуренция в потреблении необходимого питательного или ростового вещества; накопление продуктов обмена например молочной кислоты; изменение рН или окислительно-восстановительного потенциала в неблагоприятную сторону; выделена специфических антибиотических веществ, которые оказывают прямое или косвенное воздействие на обмен веществ других видов, или задерживают их рост, либо приводят к полной гибели. Как крайнюю степень антагонизма можно рассматривать паразитизм, при котором один организм развивается за счет живого вещества другого и приводит к его гибели. Следует учитывать, что характер взаимоотношений в большой степени зависит от состава среды, в которой развиваются микроорганизмы, температуры, соотношения между микроорганизмами и другие факторов. Характер взаимоотношений можно установить только после тщательного и разностороннего исследования [66].

В процессе наших исследований было установлено, что в процессе совместного культивирования микроорганизмов – компонентов заквасок между ними происходят взаимодействия, характеризующиеся различными видами взаимного воздействия микроорганизмов друг на друга.

В результате проведённых исследований было установлено, что при культивировании при различных температурах и сроках хранения в искусственных питательных средах проявляются симбиотические и антагонистические взаимодействия между отдельными компонентами микробных заквасок. Так, при внесении закваски с высокой температурой подогрева, в первые дни хранения бактерии постепенно подавляют развитие кокковых форм молочнокислых бактерий, что, вероятно, связано с выделением в окружающую среду палочковидными микроорганизмами антибиотических веществ. Однако, начиная с 4 суток культивирования при температуре камеры холодильника постепенно начинают превалировать шаровидные формы микроорганизмов. Это можно объяснить явлением автоантагонизма бактерий, а также тем, что кокковые формы молочнокислых бактерий более активно накапливают молочную кислоту, которая также губительно действует на палочковидные формы.

Совпадающие результаты были получены и при исследовании других заквасок.

При культивировании молочнокислых бактерий на искусственных питательных средах было установлено, что симбиоз между бифидумбактериями и дрожжами находится в зависимости от температуры хранения. Дрожжи, обладая большей психрофильностью, более активно размножаются при пониженных температурах. Бифидумбактерии при комнатной температуре и температуре термостата находят наилучшие условия для роста и размножения и, выделяя в питательную среду бактериостатические вещества, сдерживают развитие дрожжей. Совпадающие результаты были получены и при изучении характера взаимоотношений между дрожжами и молочнокислыми стрептококками.

Симбиоз между термофильными стрептококками и дрожжами находится также в зависимости температуры и срока культивирования. При температуре камеры холодильника термофильные стрептококки не развиваются, что позволяет дрожжам использовать всю питательную среду для активного размножения. При комнатной температуре начинается медленное развитие термофильных стрептококков, а при температуре термостата они начинают активно размножаться, выделять вещества, антагонистически действующие на дрожжи.

Симбиоз между бифидумбактериями, молочнокислыми и термофильными стрептококками и дрожжами также находится в зависимости температуры и срока культивирования. При этом молочнокислые стрептококки

при совместном культивировании с термофильными превалируют при комнатной температуре, а при температуре термостата начинают подавляться ростом термофильных стрептококков. Взаимодействие в комплексе со стрептококками бифидумбактерий и дрожжей находится в соответствии с ранее полученными закономерностями при изучении симбиотических взаимоотношений отдельных пар микроорганизмов.

Данных, подтверждающих или опровергающих полученные нами результаты в доступной нам литературе обнаружено не было, в связи с этим считаем, что полученные нами результаты имеют определённое научное и практическое значение.

ВЫВОДЫ

На основании проведённых исследований можно сделать следующие выводы:

1. При культивировании при различных температурах и сроках хранения в искусственных питательных средах проявляются симбиотические и антагонистические взаимодействия между отдельными компонентами микробных заквасок.
2. В первые дни хранения бактерии постепенно подавляют развитие кокковых форм молочнокислых бактерий, что связано с выделением в окружающую среду палочковидными микроорганизмами антибиотических веществ.
3. Начиная с 4 суток культивирования при температуре камеры холодильника постепенно начинают превалировать шаровидные формы микроорганизмов, что в основном можно объяснить явлением автоантагонизма бактерий.
4. Симбиотические взаимоотношения между бифидумбактериями, молочнокислыми и термофильными стрептококками и дрожжами находятся в зависимости от температуры и срока совместного культивирования.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРЕДЛОЖЕНИЕ

1. При разработке технологии приготовления кисломолочных продуктов, отработке оптимальных и предельно допустимых режимов их хранения учитывать данные о характере симбиотических и антагонистических взаимоотношений компонентов микробных заквасок между собой.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том 3.:Пребиотики и функциональное питание.- М.: Изд. Грантъ.-2001.
2. Гаврилова Н.Н. Создание и производство новых пробиотиков на основе бактериальных культур.//Дисс... докт.биол.наук.-Алматы.-1993.-320 с.
3. Калиева Н.М., Сейдаханов А.С. Витавская А.В., Баймуханова Д.Б. Повышение пробиотических свойств молочнокислых заквасок при производстве хлеба./Сб.мат-лов МНТК «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и другие функциональные продукты питания. Современное состояние, перспективы».-М.-2-4.06.2004.-с.103-104.
4. Королев С.А. Основы технической микробиологии молочного дела. - М.: Пищевая промышленность, 1974.-344 с.
5. Майоров А.А. Разработка методов управления биосистемой сыра с целью совершенствования традиционных и создания новых технологий. //Автореф. дисс... докт.техн.наук-Кемерово.-1999.- 61с.
6. Состав и свойства молока как сырья для молочных продуктов: Справочник./Алексеева Н.Ю., Аристова В.П., Патратий А.А. и др.: под ред. И.Костина.-М.:Агропромиздат.-1986.-239 с.
7. Гаврилова Н.Б., Пасько О.В. Современная технология комбинированных продуктов на молочной основе для специализированного питания. Аналит. обзор – Омск: изд. ОмГАУ, 2003. С. 107.
8. Королева Н.С., Пятницына И.Н., Лозовецкая В.Т. Подбор заквасок для производства кисломолочных напитков // Мол.пром. 2000. № 7. – С. 19-21.
9. Красникова Л.В., Кострова И.В. Роль микрофлоры закваски в повышении качества молочных продуктов: Обзор. инф. – М.: АгроНИИТЭММП, 2000. – С. 36.
10. Королева Н.С. Техническая микробиология цельномолочных продуктов.-М.:Пищевая промышленность. 1975.-270 с.
11. Королева Н.С. Кондратенко М.С. Симбиотические закваски термофильных бактерий в производстве кисломолочных продуктов.- М.:Пищевая пром-сть; София.: Техника.- 1978.- 168 с.
12. Королева Н.С, Семенихина В.Ф. Санитарная микробиология молока и молочных продуктов.- М.: Пищевая промышленность. 1980.-256 с.
13. Полищук П.К., Дербинова Э.С, Казанцева Н.Н. Микробиология молока и молочных продуктов.-М.: Пищевая пром-сть, 1978.- 240 с.
14. Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства. – М.: Агропромиздат, 1999. С. 400.
15. Крусъ Г.Н., Храмцов А.Г., Волокитина З.В., Карпычев С.В. Технология молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 2006. – С. 455.

16. Скородумова А.М. Дрожжи молока и молочных продуктов и их производственное значение.- М. «Пищ.пром-сть»,-1969,117 с.
17. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии: в 3-х томах.-М.:Мир.-1981.
18. <http://www.icj.ru>
19. Бифидобактерии и их использование в молочной промышленности. /Красникова Л.В., Салахова И.В., Шаробайко В.И и др. //№: АгроНИИТЭИММП.-1992.-32 с.
20. Грачева И.М., Гаврилова Н.Н., Иванова Л.А. Техническая микробиология белковых препаратов, аминокислот и жиров.-М.: Пищевая пром-сть, 1980.-448 с.
21. Борисова Г.В. Использование бифидобактерий в производстве творога. //Известия ВУЗов. Пищевая технология.-1987.-№3.-с.61-63.
22. Collins M. David, Glenn R. Gibson Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut.//American J.Clinical Nutrition.-1999.-69(suppl.): 1052 s-7s/
23. Антибиотические свойства бифидобактерий. //Сундукова М.Б., Семенихина В.Ф., Ганина В.И. и др. //Молочная пром-сть.-1985.-№8.-с.36-38.
24. Технология молока и молочных продуктов. /Дьяченко П.Ф., Коваленко М.С., Грищенко А.Д., Чеботарев А.И./- М.: Пищевая пром-сть.-1974.-447 с.
25. Шалыгина А.М., Енальева Л.В. Кисломолочные продукты с оптимальным составом.// Молочная пром-сть.- 2001.- №3.-с.55-56.
26. Тулемисова К.А., Дудикова Г.Н., Тулемисова Ж.К. Микробиологические аспекты качества и безопасности сырья и продуктов питания. //Хранение и переработка сельхозсырья.-2002.-№7.-20-22.
27. Шаманова П.П. Микробиологические и биотехнологические подходы к производству ферментных препаратов. // Молочная пром-сть.-1998, №4, с. 13-14.
28. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов.- М.: Легк. И пищ.пром., 1987 - 344 с.
29. Тепел А. Химия и физика молока.- М.: Пищевая промышленность, 1979.- 622 с.
30. Технология молока и молочных продуктов. /Твердохлеб Г.В., Далаян З.Х., Чекулаева Л.В., Шиллер Г.Г. – М.: Агропромиздат, 1991. – 463 с.
31. Храмцов А.Г., Нестеренко П.Г. Безотходная технология в молочной промышленности. -М.: Агропромиздат. 1989.- 279 с.
32. Шилер Г.Г. Молочников В.В.. Заяц Н.Г.. Кубанская Д.М. Комбинированные молочные продукты.- М.-ЦНИИТЭИММП, 1984.- 36 с.
33. Akalin A.S. L (+), D(-) lactic acid contents and a profiles of bioghurt, bifighurt. biogarde im comparison with yoghurt. //Dairy Sc.Abstacts.-1997.-v.59.-№5.-p.342.
34. Донченко Л.В., Надыкта В.Д. Безотходность пищевой продукции. –

- М.: Пищепромиздат, 2001. – с. 343.
35. Функциональные продукты. / Сборник докладов МНТК, 4-5.12.2001. – М.: ВНИИМП. – 295 с.
 36. Крусь Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов.-М.: Колос.-2000.-368 с.
 37. Пищевая химия / Нечаев А.П., Траубенберг С.Е., Кочеткова А.А., Колпакова В.В. и др. Под ред. Нечаева А.П. – СПб.: ГИОРД, 2001. – 592 с.
 38. Покровский В.И., Романенко Г.А., Княжев В.А. и др. Политика здорового питания. Федеральный и региональный уровни. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 344 с.
 39. Литвинова Е.В. Функциональные антимуутагенные молочнобелковые продукты.//Хранение и переработка сельхозсырья.-2003.-№5.-с.91.
 40. Антипова Л.В. и др. Прикладная биотехнология. УИРС для специальности 270900: учебное пособия для вузов. – СПб: ГИОРД, 2003. – 288с.
 41. Биотехнология микроорганизмов: Опорные конспекты лекций/ Сост. Т.И. Урюмцева, Е.Ф. Красноперова. – Павлодар: Павлодарский ун-т., 2005. – 74с.
 42. Биотехнология: Эл.учебник. – М.: Новый диск, 2004.
 43. Биюков В.В. Основы промышленной биотехнологии.: Учеб.пособие для вузов. – М.: Колос, 2004. – 296 с.: ил.
 44. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М.: Мир, 2002. – 589 с.: ил.
 45. Микробиология/ О.Г. Сидоренко, Е.Г. Борисенко, А.А. Ванькова и др. – М.: ИНФРА – М, 2005. – 287 с.: ил.
 46. Никитин Е.Б. Основы биотехнологии: учеб.пособие для студентов биологических спец. Павлодар: Павлодарский ун-т, 2004. – 168 с.
 47. Практикум по микробиологии: учеб.пособие для вузов/ А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.И. Захарчук и др. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
 48. Блинов И.П. Основы биотехнологии. — СПб., 1995.
 49. Биотехнология/ Под ред. Л.А.Баена. — М., 1988.
 50. Основы биотехнологии: Учеб, пособие для высш. пел. учеб. Заведений Т.А.Егорова, СМ. Клунова, Е.А.Живухина. — М.; Издательский центр «Академия», 2003. — 208 с.
 51. Прескотт С., Дэн С. Техническая микробиология. – М., 1952.
 52. Деймен А., Соломон Н. Промышленная микробиология. – М.,1984.
 53. Воробьева Л. И. Техническая микробиогия. – М., 1987.
 54. Воробева Л. И. Промышленная микробиология. – М., 1989.
 55. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М., 1978.
 56. Слюсаренко Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых продуктов: Учеб. пособие для вузов. – 3-е изд. перераб. и доп. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 208 с.

57. Большой практикум по цитогенетике: Метод. указание/ Е.Д. Есырева, К.К. Шулембаева, К.Н. Нысанбаева. – Алматы: Казак университеті, 2002. – 32 с.
58. Бакулина Н.А., Караева Э.Л. Микробиология: Учебник для мед. училищ.- 2-е изд., перераб. и доп.- М.: Медицина, 1980. – 448 с.: ил.
59. Мишустин Е.Н. Микробиология: CD-ROM: Учебник для студентов агроном. спец.- М., 1999.
60. Теппер Е. Практикум по микробиологии: CD-ROM. Учеб. Пособие. – М., 1999.
61. <http://www.farmfarmfarm.boom.ru>
62. http://www.chemport.ru/chemical_encyclopedia_artide_16.html
63. <http://www.biomedm.ru/1659.html>
64. Семенихина В.Ф., Рожкова И.В., Сундукова М.Б. Кисломолочные продукты нового поколения. //Молочная пром-сть.- 1999, № 7. с.29-30.
65. Ганина В.И. Современные подходы к идентификации микроорганизмов, используемых для пробиотиков и продуктов профилактического назначения.//Доклады Всерос. Межд.конф. «Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека».-М.-1999.-с.85-87.
66. <http://www.kodomo.cmm.msu.ru>