

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

**ИННОВАЦИОННЫЙ ЕВРАЗИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
МАГИСТРАТУРА**

Кафедра «Прикладная биотехнология»

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

**СИМБИОТИЧЕСКИЕ И АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
МЕЖДУ НЕКОТОРЫМИ МИКРОБНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ ЗАКВАСОК,  
ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КИСЛОМОЛОЧНЫХ  
ПРОДУКТОВ, В ИСКУССТВЕННЫХ И ЕСТЕСТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ  
СУБСТРАТАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РЕЖИМА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

6N0701 «Биотехнология»

Исполнитель \_\_\_\_\_ Махашева Г.Б.

Научный руководитель

профессор \_\_\_\_\_ Никитин Е.Б.

Допущена к защите:

Зам. зав. кафедрой «ПБТ»

к.т.н., профессор \_\_\_\_\_ М.С. Омаров

(подпись, дата)

Павлодар, 2007

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация выполнена на семидесяти одной страницах, данные анализа результатов работы приводятся в виде пяти таблиц, количество использованных источников тридцать пять

Наиболее употребляемые в работе термины и терминосочетания – ключевые слова: рацион питания, симбиоз, антагонизм, процессы брожения, культуральные характеристики, молочнокислые микроорганизмы, закваска, кисломолочные продукты, культивирование микроорганизмов, молочнокислые бактерии, компонентный состав микробной клетки, культура клеток, фаги, штаммы, питательная среда, препараты, пробиотики, эубиотики, органолептика, хранение, режимы, микроскопическое исследование.

Целью наших исследований было изучение симбиотических и антагонистических взаимодействий между некоторыми микробными компонентами заквасок, предназначенных для производства кисломолочных продуктов, в искусственных и естественных питательных субстратах в зависимости от режима культивирования.

В качестве объекта исследования использовали сыр творожный пастеризованный. При выполнении практической части работы применялись микробиологические, физико-химические и др. методы исследования.

Анализируя полученные результаты выполненной работы, пришли к заключению, что 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.

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

Данные, подтверждающие полученные результаты в доступной нам литературе обнаружены не были.

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                                                                                                                                       | стр |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Введение                                                                                                                                                                                                                              | 4   |
| 1. Обзор литературы                                                                                                                                                                                                                   | 7   |
| 1.1 Общая характеристика процессов брожения                                                                                                                                                                                           | 7   |
| 1.2 Краткая характеристика молочнокислых микроорганизмов                                                                                                                                                                              | 14  |
| 1.3 Симбиотические и антагонистические свойства молочнокислых бактерий                                                                                                                                                                | 34  |
| 1.4 Использование эффекта антагонизма молочнокислых бактерий для лечения и профилактики кишечных заболеваний животных и человека                                                                                                      | 39  |
| 1.5 Основные препараты, действие которых основано на антагонизме гнилостных (патогенных) и молочнокислых бактерий                                                                                                                     | 49  |
| 2 Цель и задачи исследований                                                                                                                                                                                                          | 55  |
| 3 Материал и методы исследований                                                                                                                                                                                                      | 56  |
| 4 Собственные исследования                                                                                                                                                                                                            | 57  |
| 4.1 Схема проведения эксперимента                                                                                                                                                                                                     | 57  |
| 4.2 Полученные результаты                                                                                                                                                                                                             | 58  |
| 4.2.1 Определение количественного компонентного состава молочнокислых бактерий закваски, используемой при производстве сыра творожного пастеризованного в зависимости от режима производства продукта и количества внесённой закваски | 58  |
| 4.2.2 Определение взаимодействия между бифидумбактериями и дрожжами в искусственных питательных средах                                                                                                                                | 59  |
| 4.2.3 Определение взаимодействия между дрожжами и молочнокислыми стрептококками в искусственных питательных средах                                                                                                                    | 60  |
| 4.2.4 Определение взаимодействия между дрожжами и термофильными стрептококками в искусственных питательных средах                                                                                                                     | 61  |
| 4.2.5 Определение взаимодействия между собой бифидумбактерий, молочнокислых и термофильных стрептококков и дрожжей в искусственных питательных средах                                                                                 | 61  |
| 4.2.6 Использование питательных сред из непищевого сырья для микробиологических целей                                                                                                                                                 | 62  |
| 4.3 Обсуждение                                                                                                                                                                                                                        | 65  |
| 5 Выводы                                                                                                                                                                                                                              | 67  |
| 6 Практическое предложение                                                                                                                                                                                                            | 68  |
| 7 Список использованной литературы                                                                                                                                                                                                    |     |

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, по данным Министерства здравоохранения Республики Казахстан, насчитывается более 1794,5 тыс. человек пожилого возраста, что составляет 11,8% от общей численности населения, кроме того, за последние 10 лет средняя продолжительность жизни сократилась на 4,1 года вследствие ослабления защитных функций организма.

Одним из главных аспектов в снижении иммунологической системы организма пожилого человека является правильное сбалансированное питание, разработанное на основе физиологических норм потребления пищевых веществ и энергии [1].

В 2006 году потребление молочных продуктов населением Казахстана составило 278,7 кг в год, т.е. составляет 68,8% от научно обоснованной нормы потребления – 405 кг. Структура переработки молока требует также пересмотра с учетом рекомендуемых норм. Население обеспечивается молоком питьевым и жидким диетическими продуктами на 8,8% от нормы, маслом животным – на 20,5% и т.д. Данные проценты потребления взяты из расчета при потреблении в год питьевого молока и жидкого диетического продукта 164 кг, масла животного – 5,9 кг, сыра - 6,1 кг, сметаны – 6,6 кг, творога – 7,4 кг, мороженого 3 кг.

Кроме того, в Казахстане не вырабатываются продукты с лечебно-профилактическими свойствами для людей пожилого возраста и населения местностей с неблагоприятным радиационным фоном. Также не решена проблема обеспечения детей грудного, дошкольного и школьного и школьного возрастов детскими продуктами [2].

Специалистами Института питания РАМН при участии различных научно-исследовательских институтов и вузов медицинского профиля разрабатываются нормы физиологической потребности в пищевых веществах и энергии для различных групп населения, в том числе для лиц престарелого возраста.

Также разработаны и утверждены «Методические рекомендации по организации питания людей пожилого возраста». В них указывается, что в основу питания лиц пожилого и старческого возраста должны быть положены следующие основные принципы:

- энергетическая сбалансированность рациона питания по фактическим энергозатратам;
- антиатеросклеротическая направленность пищевых рационов;
- максимальное разнообразие питания и сбалансированность по всем основным незаменимым факторам; оптимальное обеспечение пищевых рационов веществами, стимулирующими активность ферментных систем в организме;

- использование в питании продуктов, обладающих достаточно легкой ферментной атакуемостью.

Резкое ухудшение экологической обстановки во всем мире, связанное с техническим прогрессом, а также недостаток или избыток отдельных компонентов пищи, привели к появлению новых и резкому увеличению числа известных болезней, связанных с неправильным питанием. Также для сохранения здоровья человека продукты питания должны обеспечивать улучшение обмена веществ, повышение сопротивляемости организма к неблагоприятным воздействиям внешней среды.

В результате развития в мире тенденции к профилактическому питанию все большее распространение получают функциональные молочнокислые продукты сбалансированного состава.

В настоящее время все больше распространение получают молочнокислые продукты с новыми качественными характеристиками (сырные, творожные и сливочные пасты, молочные пудинги, молочные соусы, кисели, йогурты и т.д.). Среди этих продуктов наиболее потребляемыми являются пастообразные молочные продукты, основными потребителями которых является пожилое и детское население республики [1].

Кисломолочные продукты полезны не только людям зрелого и пожилого возраста, но и детям. Они необходимы ослабевшим после болезни. Дело в том, что молочнокислые бактерии способны образовывать антибиотики (никозин, низин), витамины (группы В). Специфические вещества (лактолин, лактомин), выделенные молочнокислыми бактериями, обладают бактерицидным действием на патогенные микробы (возбудители туберкулеза, мастита, пневмонии и др.), поэтому использование кисломолочных продуктов при восстановительных процессах дает хорошие результаты.

Так, обоснована эффективность потребления кумыса и ацидофильно-дрожжевого молока - при лечении туберкулеза; ацидофилина - при лечении дизентерии, брюшного тифа, гастритов; кефира - при лечении нарушений функций желудочно-кишечного тракта, малокровия, атеросклероза; южной простокваши - при лечении болезней почек; ацидофильно-дрожжевого творога - при лечении хронической дизентерии у детей.

Таким образом, вопросы с изучением симбиотических и антагонистических взаимодействий между некоторыми микробными компонентами заквасок, предназначенных для производства кисломолочных продуктов, в искусственных и естественных питательных субстратах в зависимости от режима культивирования является актуальными и требует своего дальнейшего решения.

## **1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В процессе производства кисломолочных продуктов, особенно при разработке новых технологий их производства, очень важно знать все процессы брожения; качественные и количественные характеристики микробных компонентов заквасок, используемых в производстве. В зависимости от компонентного состава естественного питательного субстрата различные микробные компоненты могут взаимодействовать между собой как в форме симбиоза, так и в форме антагонизма. От этого во многом зависят как органолептические, так и вкусовые качества продукта. В связи с этим целью нашей работы явилось выяснение некоторых характеристик взаимоотношения между собой микроорганизмов – компонентов закваски, используемой при производстве сыра творожного пастеризованного как в естественном субстрате, так и в искусственных питательных средах при различных температурных и временных режимах культивирования.

### **1.1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ БРОЖЕНИЯ**

Производство многих молочных продуктов основано на различных видах брожения лактозы, а возбудителями брожения являются микроорганизмы (молочнокислые, пропионовокислые, уксуснокислые бактерии и дрожжи).

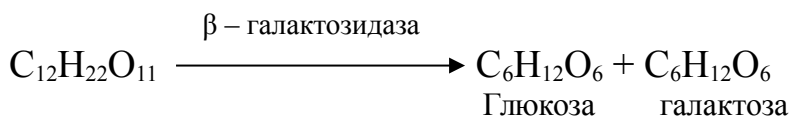
Разложение органических соединений (главным образом углеводов) в процессе жизнедеятельности микроорганизмов до простейших органических и неорганических веществ с освобождением энергии, происходящее без участия кислорода воздуха, называется брожением. Это – дыхание по анаэробному типу.

Количество освободившейся энергии при брожении во много раз меньше, чем при аэробном дыхании (при аэробном дыхании из каждой грамм-молекулы глюкозы образуется 688 ккал, а при брожении – 20-30 ккал). Поэтому микроорганизмы – возбудители брожений – разлагают огромные количества органических веществ и играют важную роль в круговороте углерода в природе.

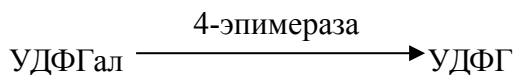
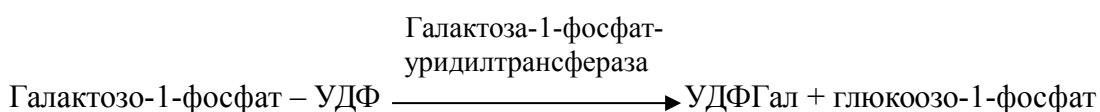
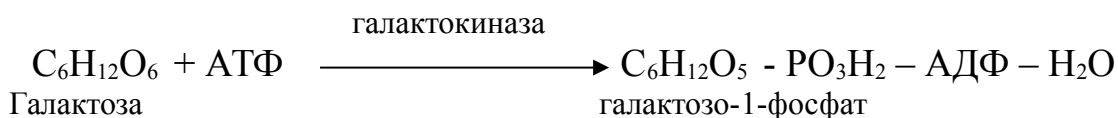
Начальный период различных брожений по своему химизму и по составу ферментов, принимающих в нем участие, одинаковый, а заключительный период и образующиеся конечные продукты распада – различны. Название каждого брожения определяется названием основного образующегося вещества.

В зависимости от специфики действия ферментов микроорганизмов и от условий, в которых это действие происходит, различают несколько типов брожения: молочнокислое, спиртовое, пропионовокислое, маслянокислое, ацетоно-бутиловое, брожение пектиновых веществ, брожение клетчатки. Молочнокислое, спиртовое и пропионовокислое брожение широко используют в молочной промышленности [3].

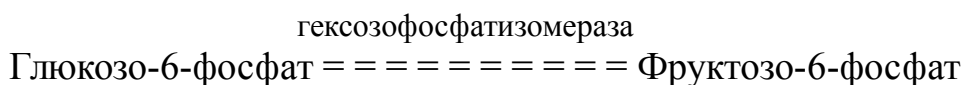
Начальным этапом всех типов брожения является расщепление молочного сахара на глюкозу и галактозу под действием фермента  $\beta$  – галактозидазы [4]



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



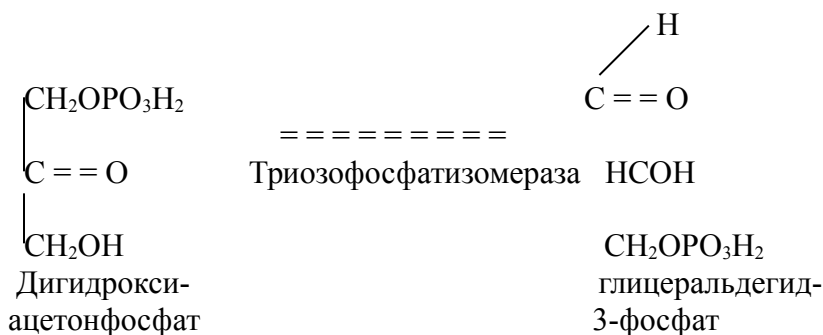
Следующая реакция – превращение глюкозо-6-фосфата под действием фермента гексозофосфатизомеразы во фруктозо-6-фосфат:



Затем образовавшийся фруктозо-6-фосфат вновь фосфорилируется за счет второй молекулы АТФ (аденозинтрифосфат) с участием фермента фосфофруктазы 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.

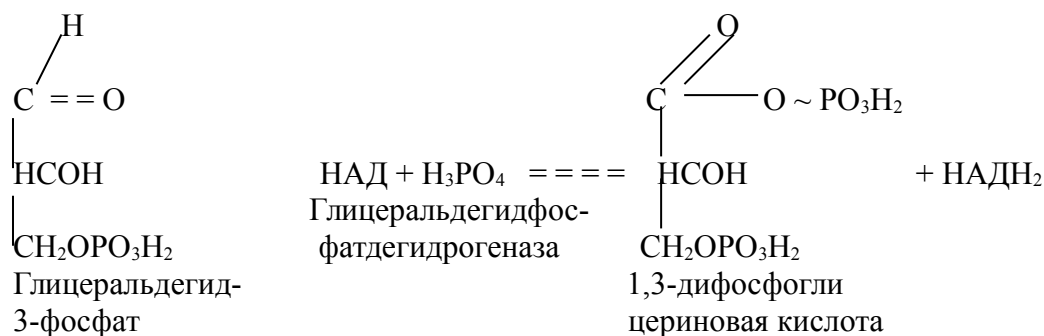
Затем протекает реакция изомеризации дигидроацетонфосфата в глицеральдегид-3-фосфат с участием фермента триозофосфатизомеразы:



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 глицеральдегидфосфат дегидрогеназы, кофермента НАД и неорганического фосфата подвергается своеобразному окислению с образованием 1,3-дифосфоглицериновой кислоты и восстановленной формы НАД (НАДН<sub>2</sub>). Реакция идет в несколько этапов. Суммарная реакция имеет следующий вид:

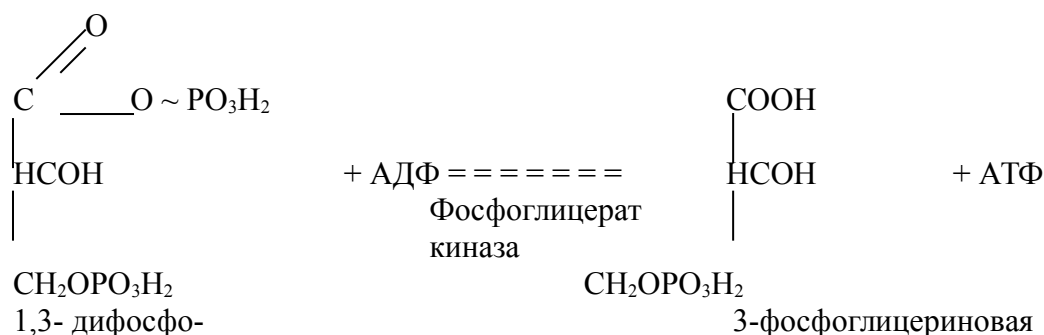


В присутствии неорганического фосфата НАД выступает как акцептор водорода, отщепляющегося от глицеральдегид-3-фосфата. В процессе образования НАДН<sub>2</sub> глицеральдегид-3-фосфат связывается с молекулой фермента за счет SH-групп последнего. Образовавшаяся связь богата энергией, но она не прочна и расщипляется под влиянием неорганического фосфата. При этом образуется 1,3-дифосфоглицериновая кислота – высокоэнергетическое соединение.

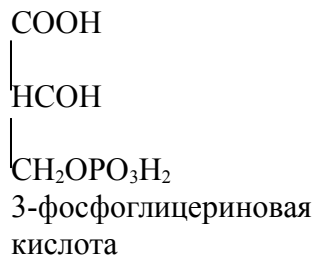
Затем происходит передача богатой энергией остатка фосфата в положении 1 на АДФ с образованием АТФ и 3-фосфоглицериновой кислоты:

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

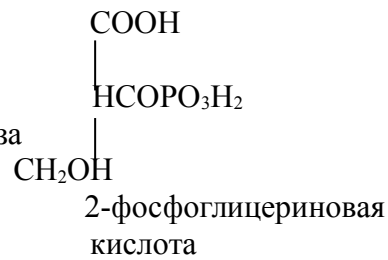
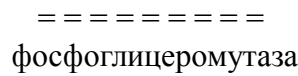
В следующей реакции происходит внутримолекулярный перенос остатка фосфатной группы и 3-фосфоглицериновая кислота превращается в 2-фосфоглицериновую кислоту. Реакция обратимая и протекает в присутствии ионов магния. Кофактором фермента является также 2,3-дифосфоглицериновая кислота:



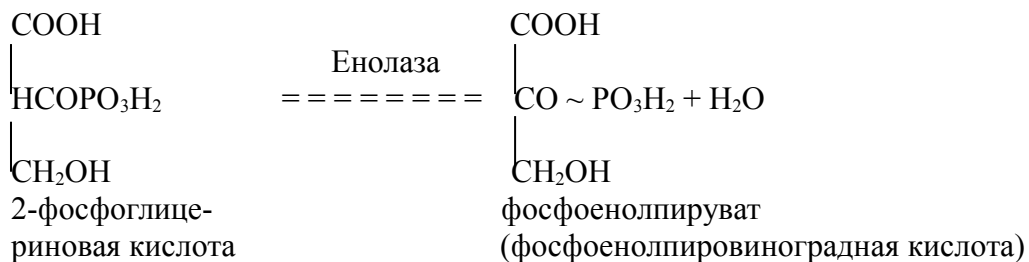
глицериновая кислота



кислота

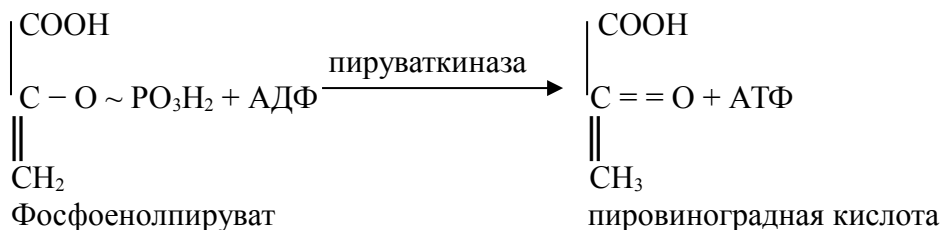


Затем 2-фосфоглицериновая кислота с отщеплением воды переходит в фосфоенолпировиноградную кислоту. При этом фосфатная связь в положении 2 становится высокоэнергетической при участии фермента енолазы:



Енолаза активируется катионами двухвалентного магния или марганца и ингибируется фторидом.

Затем происходит разрыв макроэнергетической 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:



Дальнейшие превращения пировиноградной кислоты могут идти в разных направлениях, которые определяются особенностями данного микроорганизма и условиями среды [5].

### 1.1.1 Молочнокислородное брожение

Молочнокислородное брожение нашло широкое применение в самых разнообразных областях практической деятельности человека: в молочной промышленности при производстве кисломолочных продуктов, сыров, кислосливочного масла; для промышленного получения молочной кислоты; для консервирования овощей и фруктов; для силосования кормов; для получения кислого теста в хлебопечении.

Типичное молочнокислородное брожение является одним из относительно простых брожений углеводов. Оно известно человеку с глубокой древности,

хотя причины этого процесса были выяснены намного позже Пастером (1857 г.). Пастер в 1879 г. получил чистую культуру одного из возбудителей молочнокислого брожения и назвал его *Str.Lactis*. В настоящее время описано большое количество видов молочнокислых бактерий, среди которых имеются стрептококки и палочки (лактобактерии).

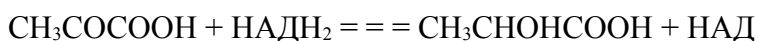
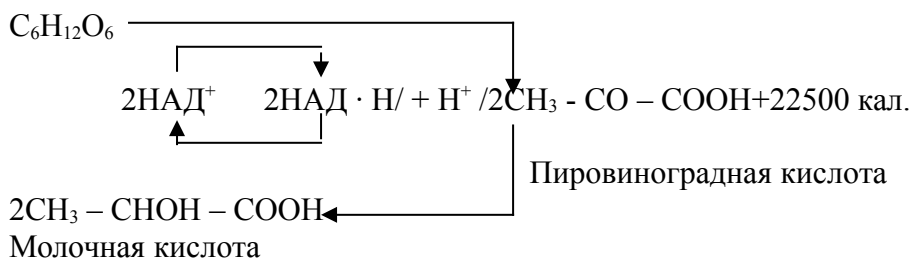
Возбудители молочнокислого брожения развиваются только при наличии углеводов, органических азотистых веществ и ростовых веществ.

Молочнокислое брожение делят на гомоферментативное и гетероферментативное в зависимости от характера образующихся при брожении продуктов [3].

### Гомоферментативное молочнокислое брожение

Гомоферментативное молочнокислое брожение (гомос - одинаковый). Гомоферментативное (типичное) молочнокислое брожение вызывают гомоферментативные молочнокислые бактерии (молочнокислые стрептококки *Str.lactis*, *Str.cremoris*, и др. термофильные и мезофильные молочнокислые палочки *Lbm.bulgaricum*, *Lbm.acidophilum*, *Lbm.casei* и др.). В результате этого брожения сахар расщепляется в основном на молочную кислоту. Гомоферментативные молочнокислые бактерии гидролизуют дисахариды (лактозу, мальтозу, сахарозу) на гексозы, которые подвергаются дальнейшему превращению до пировиноградной кислоты, восстанавливающейся в молочную кислоту. Из одной молекулы гексозы образуется две молекулы молочной кислоты и освобождается определенное количество энергии.

В заключительной реакции пировиноградная кислота восстанавливается до молочной кислоты под действием фермента лактатдегидрогеназы. Восстановителем является НАДН<sub>2</sub>:



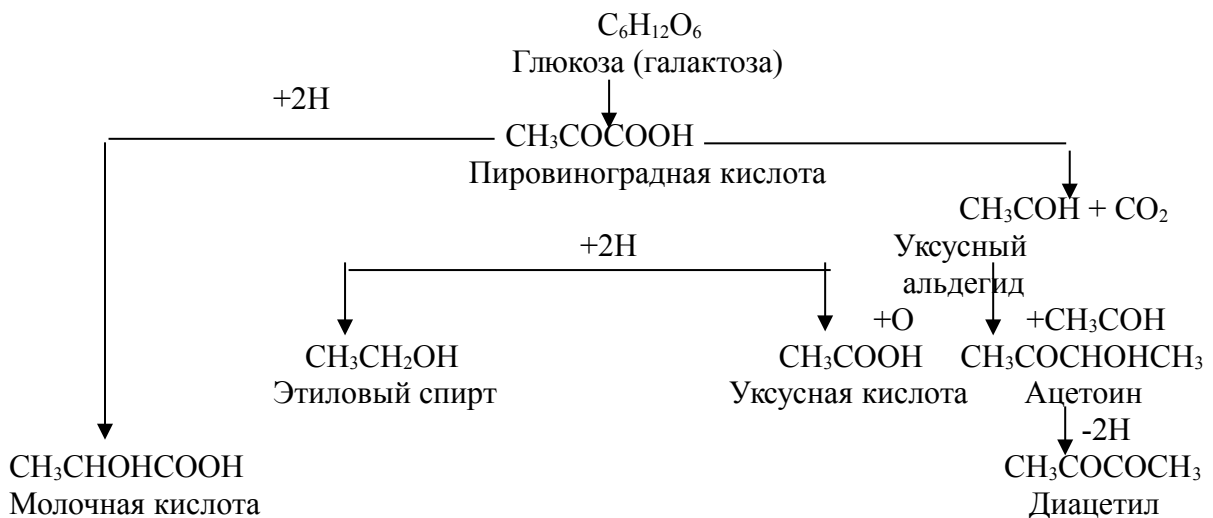
На 1 моль глюкозы образуется 2 моля молочной кислоты и 2 моля АТФ.

Молочная кислота является не единственным конечным продуктом гомоферментативного молочнокислого брожения. В качестве побочных продуктов могут образоваться 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 при этом виде брожения.

### Гетероферментативное молочнокислородное брожение.

Гетероферментативное молочнокислородное брожение (гетерос – иной, разный). Гетероферментативное молочнокислородное брожение вызывают гетероферментативные молочнокислородные бактерии (*Str.citrovorus*, *Str.paracitrovorus*, *Lbm.brevis*). Сбраживание сахара этими бактериями происходит довольно сложно и в результате его образуется не только молочная кислота, но и ряд других продуктов брожения (около 50 % глюкозы превращают в молочную кислоту, остальное количество – в этиловый спирт, уксусную кислоту, ацетон, диацетил и  $\text{CO}_2$ ). Схематически этот процесс можно представить следующим образом:



Как видно из схемы, при гетероферментативном брожении происходит расщепление некоторых молекул пировиноградной кислоты на уксусный альдегид и углекислый газ благодаря наличию в клетках гетероферментативных молочнокислородных бактерий фермента декарбоксилазы (этот фермент отсутствует у гомоферментативных бактерий).

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 последовательность реакций превращается в уксусную и молочную кислоты, вторая в уксусную кислоту. Таким образом, выход уксусной кислоты в 1,5 раза больше выхода молочной кислоты.

Содержащаяся в молоке лимонная кислота усиливает гетероферментативное молочнокислородное брожение, так как потребление цитратов

происходит одновременно с использованием лактозы. Обладают способностью сбрасывать лимонную кислоту гетероферментативные молочнокислые бактерии *Str.diacetilactis*, *Str.acetoinicus*, *Str.paracitrovorus*, *Str.citrovorus*, у которых имеется фермент цитритаза. Гомоферментативные молочнокислые бактерии, применяемые в молочной промышленности, лимонную кислоту не сбрасывают (у них нет цитратазы) табл. 3

Таблица 3

| Культура                  | Количество лимонной кислоты (в %) при длительности культивирования, сут |      |      |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------|------|
|                           | 0                                                                       | 1    | 2    |
| <i>Str.lactis</i>         | 0,20                                                                    | 0,19 | 0,19 |
| <i>Str.cremoris</i>       | 0,19                                                                    | -    | 0,19 |
| <i>Str.diacetilactis</i>  | 0,21                                                                    | 0    | 0    |
| <i>Str.paracitrovorus</i> | 0,19                                                                    | -    | 0,03 |

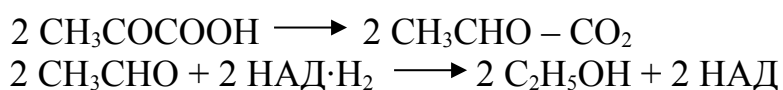
Некоторые продукты гетероферментативного брожения – этиловый спирт, уксусная кислота и в особенности диацетил – обладают ароматическими свойствами и обогащают вкусовой букет молочных продуктов, поэтому гетероферментативные бактерии называются ароматобразующими.

Процесс образования ароматобразующих веществ (диацетила) зависит от pH среды (у ароматобразующих стрептококков оптимальный pH около 5) и от окислительно-восстановительных условий среды (ароматические вещества лучше всего образуются при  $rH_2$ , равном 6), а при снижении потенциала до нуля образуются только молочная кислота и этиловый спирт. При многократном встряхивании (аэрации) сквашиваемого молока молочной кислоты образуется меньше, а диацетила больше. В анаэробных условиях ( $rH_2$  около 0) гетероферментативное брожение приближается к гомоферментативному.

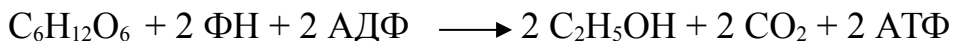
### 1.1.2 Спиртовое брожение

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 пируватдекарбаксилазы с образованием уксусного альдегида и  $CO_2$ . Уксусный альдегид далее выступает во взаимодействие с  $НАД \cdot H_2$ . 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 [4].

### 1.1.3 Синтез ароматических соединений

Ароматические соединения делятся на карбонильные соединения, карбоновые кислоты, лактоны, аминосоединения, спирты, эфиры, сернистые соединения и др.

К карбонильным соединениям относятся альдегиды, кетоны (ацетон, ацетоин, диацетил, бутанон-2 и др.), ароматические и пр. они придают определенный вкус и аромат молочным продуктам. Молочнокислые Бактерии образуют ацетальдегид в основном их углеводов, но предшественниками его могут быть аминокислоты, нуклеиновые кислоты, фосфолипиды. Главный источник – пируват и ацетилфосфат.

Предшественником ацетоина и диацетила является избыток пирувата, т.е.то количество, которое не используется клеткой в качестве акцептора водорода при брожениях.

Ароматобразующие молочнокислые бактерии избыток пирувата образуют их цитрата. Реакции идут в присутствии катионов двухвалентного магния или марганца [4].

## 1.2 Краткая характеристика молочнокислых микроорганизмов

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 транзиторной и не колонизируется в кишечнике. Поэтому последние годы все шире используется бифидо- и лактобактерии, являющиеся пробиотиками, т.е. биологическими препаратами, содержащими живые, ослабленные штаммы нормальной микрофлоры кишечника [6].

Деятельность бактерий, в первую очередь молочнокислых, некоторых грибов в сочетании с применяемой технологией приводит к получению продуктов с характерными свойствами. В то время как еще примерно 100 лет назад полагались на случайное присутствие желаемой микрофлоры, сегодняшнее производство молочных продуктов немыслимо без использования различных заквасок. Таблица 1 дает представление об основных заквасках, применяемых в молочной промышленности

Таблица 1 – Закваски (культуры) для молочной промышленности

| Вид закваски                                                               | Микроорганизмы                                                                                                                                                                                    | Продукт                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Бактериальные закваски<br>мезофильные закваски<br>молчнокислых<br>бактерий | <i>Streptococcus lactis</i><br><i>Sc.cremoris</i><br><i>Sc.diacetylactis</i><br>( <i>Leu.citrovorum</i> )<br><i>Leu.dextranicum</i>                                                               | Кислосливочное масло<br>Сычужный сыр Молодой сыр<br>Творог из обезжир.м-ка<br>Простокваша и пахта         |
| термофильные закваски<br>молчнокислых бактерий                             |                                                                                                                                                                                                   | Йогурт<br>Ацидофилин<br>Эмментальский сыр и др.<br>Кисломолочный творог                                   |
| Культуры, участвующие в<br>созревании сыра                                 | <i>Brevibacterium linens</i><br>(культура,<br>вырабатывающая<br>красную слизь)<br>Виды пропионовых<br>бактерий (культуры<br>пропионовокислых<br>бактерий)<br><i>Lb.casei</i> (казеи-<br>культура) | Кисломолочный сыр<br>Различные сорта<br>сычужного сыра<br>Эмментальский сыр<br><br>Твердый и ломтевой сыр |
| Грибковые культуры<br>культура рокфора                                     |                                                                                                                                                                                                   | Сыр рокфор<br>Сыр с типичной плесенью<br>и др.                                                            |
| Культура камамбера                                                         | <i>P.camamberti</i><br><i>P.candidum</i><br><i>P.caseicolum</i>                                                                                                                                   | Камамбер, бри<br>Невшатель<br>Кисломолочный сыр                                                           |

|                                                                        |                                                                                  |       |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Кефирная закваска<br>(смешанная<br>бактериально-грибковая<br>закваска) | Sc.lactis<br>Lb.caucasicus<br>Lb.brevis<br>Виды Torulopsis<br>Виды Saccharomyces | Кефир |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------|

Лишь немногие бактериальные закваски полностью выполняют функции сквашивания или созревания. Грибковые культуры также относятся к культурам, участвующим в созревании сыра, однако они отличаются от бактериальных заквасок. Огромное значение для заквасок в молочной промышленности имеют молочнокислые бактерии, их способность сквашивать и свертывать молоко. Закваски молочнокислых бактерий, состоящие из молочнокислых бактерий, особенно стрептококков, применяют как основные закваски для большинства ферментированных молочных продуктов [3].

### 1.2.1 Молочнокислые стрептококки

Молочнокислые стрептококки являются факультативными анаэробами, что способствует их размножению в разных субстратах и широкому распространению в природе. Они находятся на цветах, на листьях и на плодах растений, в кормах, в молочных и мясных продуктах, в кишечнике человека и животных.

Молочнокислые стрептококки разделяют на гомо- и гетероферментативные. Гомоферментативные стрептококки в процессе своей жизнедеятельности сбраживают 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.diacetilactis*, *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.

Наиболее значительные отличительные признаки родов *Streptococcus* и *Leuconostoc* приводятся в таблице 2 [3].

Таблица 2 – Отличительные признаки родов *Streptococcus* и *Leuconostoc*

| Показатель                  | <i>Streptococcus</i>                          | <i>Leuconostoc</i>                                |
|-----------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Расщепление                 | Гомоферментативное<br>Путь гексозодифосфатный | Гетероферментативное<br>Путь гексозомонофосфатный |
| NH <sub>3</sub> из аргинина | Варьирует                                     | Отсутствует                                       |

|                                   |             |             |
|-----------------------------------|-------------|-------------|
| Образование<br>газа из<br>глюкозы | Отсутствует | Наблюдается |
|-----------------------------------|-------------|-------------|

Многие виды молочнокислых стрептококков используют в составе заквасок при производстве кисломолочных продуктов, кислосливочного масла, сыров.

**Молочнокислый стрептококк *Streptococcus lactis*** – клетки его круглой формы располагаются в виде диплококков или в виде коротких цепочек. Активный кислотообразователь, образует ровный плотный сгусток колющейся консистенции при свертывании молока. Вкус и запах сквашенного молока чистый, кисломолочный. Сбраживает 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.

Оптимальная температура развития клеток 30° С. При этой температуре молоко свертывается через 4-7 ч (при внесении 0,5 мл 10-12 часовой культуры в 10 мл стерильного молока). Предельная кислотность в течении 7 сут, при оптимальной температуре, колеблется от 110 до 120° Т.

**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 (при внесении 0,5 мл в 10 мл молока активные штаммы свертывают молоко через 5-8 ч). Активный кислотообразователь, предельная кислотность не превышает 110-115° Т. По своим биохимическим свойствам *Str.cremoris* близок *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 роста сливочного стрептококка 25° С. При внесении 0,5 мл в 10 мл молока активные штаммы свертывают молоко через 5-8 ч,

**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, нужного

кисломолочного вкуса и запаха. Зачастую его комбинируют с болгарской, ацидофильной и другими молочнокислыми палочками.

По сравнению с мезофильными стрептококками термофильные лучше развиваются при повышенной температуре. Оптимальная температура их развития около 40-45° С, а оптимальная кислотность, образуемая этими стрептококками при оптимальной температуре культивирования, около 110-120° Т.

**Ароматобразующий стрептококк *Streptococcus diacetylactis*** – клетки его несколько мельче, чем у *Str.lactis*, *Str.cremoris*, и располагается в виде отдельных клеток, диплококков, цепочек разной длины. Сбраживает мальтозу, дикстрин, 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 [7,8].

**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 [8,9,10].

**Ароматобразующий стрептококк *Streptococcus citrovorus*, *Streptococcus paracitrovorus*** – клетки его мельче, чем клетки *Str.lactis*, *Str.cremoris* и располагается 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 ароматизующие стрептококки обогащают вкус и запах молочных продуктов [3].

### **1.2.2 Молочнокислые палочки**

Лактобактерии, также, 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°C 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*, *Lactobacterium bulgaricum*, *Lactobacterium acidophilum*, а ко второй – мезофильные палочки бета-бактерии, являющиеся слабыми кислотообразователями.

Лактобактерии подавляет 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°C и обсеменяющие пастеризованное и сухое молоко.

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

Оптимальная температура развития термобактерии 40-45°C. 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, не кислый сгусток ровный и плотный. Термобактерии неподвижны, спор и капсул не образуют, по Грамму красятся (грамположительные). Их клетки представляют довольно крупные палочки

(часто с зернами валютина), располагающиеся по одной клетке, в виде диплобактерий или цепочек.

**Lactobacterium acidophilum** – характеризуется способностью сбраживать мальтозу, сахарозу, салицин, а также зачастую и раффинозу, декстрин. Температура роста клеток 20-45<sup>0</sup> С, предельная кислотность 200-250<sup>0</sup> Т.

**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; грамположительные, с зернами валютина. Не образует каталазу, плохо сбраживает мальтозу и совсем не сбраживает декстрин. Оптимальная температура развития 45-53<sup>0</sup>С, минимальная -20-22<sup>0</sup>С. Погибает при 65<sup>0</sup>С в течении 30мин. Максимальная кислотность молока достигает 200-300<sup>0</sup> Т. Образует до 2 % молочной кислоты. При своем развитии нуждается в витаминах – никотиновой кислоте. Выделяет антибиотические вещества, не разжижает желатин, заметно не разлагает казеин [3].

**Lactobacterium helveticum** – сбраживает мальтозу, декстрин, развивается при температурах 22-50<sup>0</sup>С, некоторые расы могут развиваться при повышенных содержаниях поваренной соли (до 5 %); оказывать сильное действие на белок, вызывая его протеолиз с образованием различных растворимых фракций (растворимые пептиды, аминокислоты). Максимальная кислотность – 300-350<sup>0</sup> Т. Эта палочка характеризуется способностью сбраживать мальтозу и декстрин, но не сбраживает сахарозу, раффинозу, салицин.

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

**Lactobacterium jugurti** – образует в молоке высокую кислотность, не сбраживает мальтозу и декстрин [3].

**Стрептобактерии (мезофильные молочнокислые палочки).** Клетки этих бактерий мельче, чем клетки термобактерий, и часто располагаются в виде палочек. При развитии в молоке эти бактерии малоактивны; молоко сквашивают через 2-3 суток. После семисуточного культивирования предельная кислотность достигает 180-200<sup>0</sup>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*, играющую важную роль в сыроделии. Небольшое количество этих бактерий присутствует в составе остаточной микрофлоры пастеризованного молока. Поскольку стрептобактерии

могут развиваться в безуглеродной среде, они размножаются в сыре и достигают значительного количества после полного сбраживания лактозы.

***Lactobacterium casei*** – сбраживает значительное количество различных углеводов; может развиваться в безуглеродной среде, при содержании поваренной соли 5,5 %: играет положительную роль при созревании многих сыров, причем может размножаться в сырах после сбраживания лактозы. Предельная кислотность молока достигает 80-180° Т. 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 сыров. При развитии бактерий этого вида предельная кислотность молока достигает 180° Т. 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, мальтозу, раффинозу, арабинозу. На поверхности плотных питательных сред образуются круглые колонии, сходные с колониями молочнокислых стрептококков, глубинные колонии – S-формы. Бета-бактерии образуют аммиак из аргинина. В молочных продуктах встречаются *Betabacterium caucasicum* (в кефирных зернах и кефире) и *Betabacterium breve* [3].

**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 8-10 час, сгусток ровный, слизистый, или без слизи, без газа. Эти бактерии сбраживают лактозу, глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, леулезу, 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 [3].

**Микробактерии (род *Microbacterium*).** Часто обнаруживаемые в молоке и молочных продуктах микробактерии являются наиболее термостойкими из всех известных бесспорных бактерий. Некоторые их штаммы выдерживают нагревание до 80-85° С в течение 10 мин. Это может быть причиной обсеменения ими пастеризованного и сухого молока.

Микробактерии представляют собой мелкие палочки, неподвижные, бесспорные, грамположительные. Они имеют не правильную форму и при окрашивании метиленовым сильным кажутся зернистыми. Будучи аэробными, они хорошо растут на поверхности питательных сред и плохо – в глубине; развиваются при 15-35° С (оптимальная температура роста 30° С); в молоке образуют молочную кислоту. Микробактерии обнаруживают на посуде, в навозе, а также в молоке и в сливочном масле. При росте на агаре при 30° С в течении 3 дней образуют мелкие колонии.

### 1.2.3 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 дрожжей гибнут при 60-65 °С, а 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* (не сахаромицеты) слабо сбраживают сахара или вовсе их не сбраживают (*Mycoderma*).

Они дают при брожении этиловый спирт. CO<sub>2</sub>, 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 [11].

### 1.2.4 Пропионовокислые бактерии

**Пропионовокислые бактерии *Propionibacterium*** – это не спорогенные, неподвижные палочки, отличающиеся полиморфностью, прямые, изогнутые, ветвящиеся палочки средней величины, мелкие и даже кокковые бактерии;

хорошо развиваются без доступа воздуха, т.е. анаэробы. Оптимальная температура роста пропионовокислых бактерий 30-35<sup>0</sup> С. 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.

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 В<sub>12</sub> и обогащать им молочные продукты [3].

#### **1.2.5 Уксуснокислые бактерии**

**Уксуснокислые бактерии (Acetobacter).** На жидких подкисленных средах эти бактерии образуют пленку. Оптимальная температура развития 30<sup>0</sup> С. В молоке развиваются плохо и кислоты не образуют. В результате аэробного процесса (окисление этилового спирта) бактерии образуют уксусную кислоту. При выработке кефира уксуснокислые бактерии играют положительную роль при умеренном развитии, а при их развитии в простокваше, сметане, твороге они могут вызвать нежелательный запах и привкус уксусной кислоты, ослизнение.

#### **1.2.6 Маслянокислые бактерии**

**Маслянокислые бактерии (Clostr. amylobacter, Clostr. saccharobutyricum, Clostr. thyrobutyricum)** – крупные, анаэробные, споровые палочки. Эти бактерии сбраживают молочные сахар, молочную кислоту и ее соли с образованием масляной, уксусной, пропионовой, муравьиной кислот, небольшого количества этилового спирта и большого количества газов – водорода и углекислого газа. В результате газообразования маслянокислые бактерии вызывают порок – вспучивание сыров, а также неприятный запах масляной кислоты.

#### **1.2.7 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 pH до 4,1-3,8; оптимальная температура культивирования –  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ . В молоке развиваются очень медленно, могут вызвать его свертывание. Стимуляторами бифидобактерий являются олигосахариды, декстрин-мальтоза, кукурузный, ячменно-солодовой экстракты, гидролитический фермент – лизоцим (42, 306). Это анаэробные бактерии – *Bifidumbacterium bifidum*, *B.bifidus*, *B.infantis*, *B.longum*, *B.breve*, *B.adolescentis*. Являются основными представителями кишечной микрофлоры, совместно с аэробными лактобактериями (*L.acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum*, *L.salivores*, *L.cellobiosus*), играющие большую роль в поддержании здоровья человека и выполняющие ряд функций, имеющих важное значение для жизнедеятельности человека [12,13,14]:

- 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;

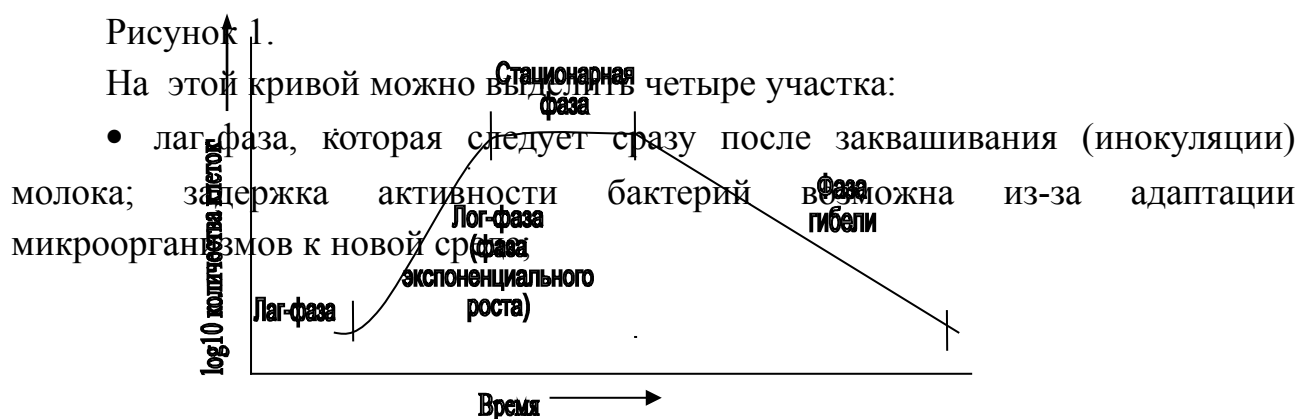
- Повышают иммунную реактивность организма: стимулируют лимфоидный аппарат, синтез иммуноглобулинов, увеличивают уровень пропердина и комплемента, увеличивают активность лизоцима и способствуют снижению проницаемости сосудистых тканевых барьеров для токсических продуктов патогенных микроорганизмов (наиболее характерно для бифидобактерий);
- Способствуют уничтожению атипичных клеток организма в результате активации иммунных процессов.

### 1.2.8 Культивирование микроорганизмов

Периодическое и непрерывное культивирование микроорганизмов

В молочной промышленности производство заквасок и кисломолочных продуктов основано на использовании микроорганизмов, культивируемых периодическим методом. Процессы культивирования молочнокислых бактерий подчиняются общим закономерностям роста. При периодическом культивировании молочнокислые бактерии, как и любые другие микроорганизмы, выращивают в замкнутом объеме питательной среды. При этом действующие на клетку многочисленные факторы непрерывно меняются по ходу развития культуры. Вначале микроорганизмы размножаются в условиях избытка питательных веществ, которые во время их интенсивного роста постепенно используются. Одновременно с этим в среде накапливаются продукты обмена. Они тормозят деятельность ферментов, участвующих в синтезе компонентов клеток. В соответствии с непрерывно происходящими в среде изменениями культура сама претерпевает ряд закономерных морфолого-биохимических изменений. Так, клетки, образовавшиеся в начале культивирования, отличаются от клеток, выросших позднее. Это ведет к гетерогенности культуры, меняющейся и развивающейся во времени. Диспропорция между статическим характером среды и динамическим характером роста культуры в процессе периодического культивирования выражается классической кривой роста, на которой различают ряд отдельных фаз, постепенно переходящих одна в другую (рис. 1) [15].

Кривая роста популяции жизнеспособных микроорганизмов



- лог-фаза (фаза экспоненциального роста), во время которой клетки демонстрируют максимальную активность, то есть минимальное время воспроизводства каждой популяции клеток при наличии оптимальных условий (питательных веществ и необходимой температуры);

- стационарная фаза – в определенной точке количество жизнеспособных клеток становится постоянным из-за недостатка питательных веществ и накопления метаболитов (например, молочной кислоты в молоке); процессы отмирания старых клеток и воспроизводства новых находятся в равновесии;

- фаза гибели – количество жизнеспособных клеток начинает уменьшаться (главным образом из-за неблагоприятных условий для их роста).

В условиях периодического культивирования рост микроорганизмов с максимальной удельной скоростью продолжается очень ограниченное время и замедляется, когда концентрация субстрата уменьшается, а содержание ингибирующих продуктов обмена возрастает. В отличие от периодического культивирования при непрерывном процессе концентрации питательных веществ и продуктов обмена поддерживают на заданном уровне, благодаря чему можно регулировать концентрацию микроорганизмов [16].

Процессы непрерывного культивирования микроорганизмов делятся по принципу управления на два типа – хеMOSTАТИЧЕСКИЙ и турБИДОСТАТИЧЕСКИЙ.

При хеMOSTАТИЧЕСКОМ культивировании удельная скорость роста микроорганизмов в культиваторе устанавливается автоматическим регулированием скорости разбавления, т.е. стабилизацией расхода питательной среды. При этом скорость разбавления рассчитана на заранее определенную величину, и микроорганизмы «сами выбирают» необходимую концентрацию в соответствии с их свойствами в этих условиях. Происходит автоматическое регулирование плотности популяции в зависимости от факторов, лимитирующих рост микроорганизмов.

При турБИДОСТАТИЧЕСКОМ культивировании удельная скорость роста в культиваторе регулируется путем автоматического регулирования концентрации биомассы. Это, в частности, позволяет поддерживать рост микробной популяции в экспоненциальной фазе с максимальной удельной скоростью роста.

Непрерывное культивирование молочнокислых бактерий при производстве бактериального концентрата, приготовлении закваски и выработке кисломолочных продуктов имеет большое преимущество по сравнению с периодическим. Оно позволяет максимально использовать способность молочнокислых бактерий интенсивно размножаться, значительно увеличивать

съем продукции с оборудования и производственных площадей, автоматизировать процесс производства и улучшать качество продукции [15].

Характеристика микроорганизмов и особенности их подбора для периодического и непрерывного культивирования

Важным показателем микроорганизмов заквасок и кисломолочных продуктов является урожайность бактериальных клеток. Этот показатель играет определяющую роль при производстве бактериальных концентратов. Для производства бактериальных концентратов отбирают высокоурожайные культуры молочнокислых бактерий. Урожайность культур *Str.lactis* на обезжиренном молоке через 16 ч. периодического культивирования при 25°C составляет  $(16-18) \cdot 10^8$  клеток в 1 мл, а на сывоточной среде, используемой при производстве бактериального концентрата, -  $(10-11) \cdot 10^8$  клеток в 1 мл. Среди культур *Str.lactis* встречаются штаммы с гомогенной и гетерогенной структурами популяций клеток. Культуры, обладающие гомогенной структурой, являются наиболее устойчивыми к сезонным изменениям качества молока и ценным для производства. Такие культуры – наиболее жизнеспособны в процессе непрерывного культивирования, при котором происходит автоселекция клеток в культуре. В закваску включают штаммы, не изменяющие активность кислотообразования или способные ее повышать при совместном культивировании, что указывает на сочетаемость штаммов.

При производстве бактериального концентрата, приготовлении заквасок для кисломолочных продуктов периодическим способом широкое применение имеют многоштаммовые закваски [17].

При подборе микрофлоры для непрерывного культивирования большое значение имеет удельная скорость роста штаммов, входящих в комбинацию. Штаммы должны минимально отличаться друг от друга по удельной скорости роста; при продолжительности непрерывного процесса до суток допускается разность в значениях удельных скоростей роста штаммов не более 20%. Составляя закваску для непрерывного способа культивирования, нужно более строго отбирать штаммы по отношению к вирулентному фагу, чем при периодическом способе культивирования. Это положение вызвано тем, что при культивировании мезофильных молочнокислых стрептококков даже на стерилизованном молоке наблюдались частые случаи явления бактериофагии. Объясняется это изменением в популяции культур мезофильных молочнокислых стрептококков соотношения фагорезистентных и фагочувствительных клеток в сторону увеличения последних. Таким образом, при отборе штаммов мезофильных молочнокислых стрептококков для непрерывного культивирования необходимо учитывать структуру их популяции,

удельную скорость роста, сочетаемость штаммов и использовать для непрерывного культивирования наиболее простые комбинации (закваски), состоящие из одного штамма каждого вида [18].

### **1.2.9 Питательные среды для культивирования микроорганизмов**

Интенсивность роста клеток и биохимическая активность молочнокислых бактерий во многом определяются питательной ценностью среды. Молочнокислые бактерии обладают ограниченной способностью синтеза многих биологически важных соединений. Это определяет их высокую требовательность к питательным веществам. При развитии молочнокислых бактерий в молоке или сывороточной среде основным источником энергии для них является лактоза, расщепляемая данными микроорганизмами под действием фермента лактозы на глюкозу и галактозу, которые затем сбраживаются до молочной кислоты. Для нормального роста и развития этих микроорганизмов необходимы также субстраты со сложными органическими формами азота: подобранными смесями аминокислот, ферментативными или кислотными гидролизатами белков и др. [19].

Стимуляция роста молочнокислых бактерий при обогащении среды различными естественными добавками, такими, как дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт, экстракты поджелудочной железы, печени, объясняется повышением содержания в среде аминокислот, пуриновых и пиримидиновых соединений, витаминов и других соединений. Молочнокислые бактерии культивируют на различных питательных средах. Применение полусинтетических питательных сред, состоящих из стандартных компонентов, позволяет получить высокий урожай клеток, но их промышленное применение очень дорого. Более дешевыми являются среды, содержащие в качестве основы обезжиренное молоко или сыворотку. В таких средах имеются необходимые для нормального развития микроорганизмов питательные вещества и их легко можно модифицировать. Однако применение обезжиренного молока имеет ряд недостатков. В нем мало небелкового азота, и поэтому азот, необходимый для развития культур, получают путем предварительного гидролиза обезжиренного молока ферментами или за счет разложения белков протеолитическими ферментами молочнокислых бактерий. Применение обезжиренного молока при производстве бактериального концентрата осложнено тем, что образующийся при сквашивании молока белковый сгусток мешает эффективному отделению клеток. Чтобы белки молока не осаждались с клетками молочнокислых бактерий, молоко перед отделением клеток нейтрализуют и добавляют лимоннокислый натрий. Однако такой прием не дает возможности полностью освободить микробную массу от белков молока [20].

Существенным недостатком питательных средств, составленных на основе обезжиренного молока, является то, что в этом случае из-за непрозрачности среды нельзя применять методы контроля концентрации микроорганизмов, основанные на оптических свойствах культуральной жидкости. Кроме того, не все виды и штаммы молочнокислых бактерий могут развиваться в обезжиренном молоке достаточно интенсивно [21].

Перспективной основой среды для накопления молочнокислых бактерий при производстве бактериальных концентратов является молочная сыворотка. Биологическая ценность молочной сыворотки обусловлена тем, что в нее переходит около 55% сухих веществ, в частности небелковые азотистые соединения, углеводы, минеральные соли, витамины. Перед использованием сыворотки для накопления молочнокислых бактерий ее осветляют, освобождая от большей части сывороточных белков. Затем, чтобы повысить выход микробной массы, ее обогащают стимуляторами роста и буферными солями. В качестве стимулятора роста используют кукурузный экстракт. Он содержит азотистые вещества (полипептиды, аминокислоты), витамины группы В (рибофлавин, пантотеновая кислота, пиридоксин) и минеральные вещества (калий, железо, магний, фосфор)[22].

Известно, что для нормального роста микроорганизмов необходимы многие элементы минерального питания. Так, наличие в питательной среде ионов  $Mn^{2+}$ ,  $K^{+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  увеличивает урожайность и кислотообразование ряда молочнокислых бактерий. Из всех этих элементов особое значение имеет марганец, стимулирующий рост молочнокислых бактерий. Благоприятное влияние на рост молочнокислых бактерий оказывают также добавленные в сыворотку буферные соли (натриевая соль лимонной, фосфорной и уксусной кислот). Одним из главных условий непрерывного культивирования является стерильность среды. При производстве кисломолочных продуктов непрерывным способом роль посторонней микрофлоры возрастает. Непрерывно поступая в культиватор, посторонние микроорганизмы как бы создают постоянное инфицирование процесса. Результаты микробиологических исследований подквашенного молока непрерывным способом показали, что характер взаимоотношения молочнокислых стрептококков и посторонней микрофлоры во многом зависит от заданных параметров процесса. Если соблюдается равенство скорости роста молочнокислых стрептококков и скорости разбавления молока в культиваторе, то в этом случае всегда устанавливается динамическое равновесие между молочнокислыми стрептококками и посторонними микроорганизмами. Эти исследования

показали возможность приготовления кисломолочных продуктов непрерывным способом на пастеризованном молоке [20].

### **1.2.10 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.

#### **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 отдельным штаммами *Str. Lactis* антибиотик низин подавляет развитие, т.е. является ингибитором многих бактерий, в том числе не только патогенных, или вызывающих пороки в молочных продуктах, например, маслянокислых бактерий, но и ароматобразующих молочнокислых стрептококков, молочнокислых палочек и многих штаммов *Str. Lactis*. Однако существуют 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 pH 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 °Т подавляется развитие бактерий группы кишечных палочек, которые также продуцируют молочную, уксусную и другие кислоты.

Исследование 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

антибиотической 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 pH. 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. Исследование 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 менее 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

Таблица 3

| № | 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 | $10^{-1}$                                                                                   | $3 \cdot 10^{-2}$ | -                    | $4,3 \cdot 10^{-2}$     | $4,5 \cdot 10^{-2}$ |
| 2 | С отвариванием сгустка                       | $3 \cdot 10^{-3}$                                                                           | $8 \cdot 10^{-3}$ | $6 \cdot 10^{-3}$    | $10^{-4}$               | $10^{-5}$           |
| 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          | $5 \cdot 10^{-3}$                                                                           | $8 \cdot 10^{-5}$ | $10^{-6}$            | $10^{-6}$               | $10^{-6}$           |

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 °С. В таблице 3 приведены данные способов производства творога и микробиологические показатели их [9, с.32-33, 3, с.127-128].

## **2 Синергизм и симбиоз**

Явление симбиоза и синергизма наблюдается между молочнокислыми бактериями.

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, 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 [8,9,10].

Симбиоз наблюдается также между молочнокислыми и уксуснокислыми бактериями, которые в чистой культуре плохо растут в молоке, а при совместном культивировании с молочнокислыми бактериями их рост значительно возрастает. Вместе с тем при совместном культивировании обоих видов бактерий увеличивается продолжительность жизнедеятельности молочнокислых бактерий. Объяснить явление симбиоза между этими видами бактерий можно тем, что некоторые молочнокислые бактерии выделяют в среду этиловый спирт, который уксуснокислые бактерии используют в качестве субстрата энергетического обмена (дыхания), а последние, частично разлагая казеин, обогащают среду необходимыми для молочнокислых бактерий азотистыми веществами и несколько снижают кислотность среды.

В симбиотических отношениях находятся также дрожжи и уксуснокислые бактерии. При культивировании кефирных грибков обе группы бактерий составляют обязательную микрофлору закваски и всегда сохраняются в ней. При посеве на плотные питательные среды с низким рН эти микроорганизмы часто образуют одну общую колонию и их крайне трудно разделить.

Кроме того, в симбиотических отношениях также находятся молочнокислые бактерии и плесени. Бактерии создают кислую среду, благоприятную среду для плесеней, но угнетающую развитие самих бактерий, а

плесени, разлагая белки, повышают pH продукта и обогащают среду продуктами белкового распада, что благоприятно сказывается на развитии молочнокислых бактерий.

Синергизм – содружественное действие двух или нескольких видов микробов. При развитии смешанной культуры *Str.thermophilus* и *Lbm.bulgaricum* в молоке кислотообразование происходит интенсивнее, чем при развитии каждой культуры в отдельности. Получение комбинированных заквасок из культур молочнокислых бактерий основано на явлении синергизма [23,24].

### **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 [23,14].

### **4 Паразитизм**

Взаимоотношение 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 [14].

### **1.3 Симбиотические и антагонистические взаимоотношения молочнокислых бактерий**

Среди множества микроорганизмов, имеющих практическое значение, ведущая роль принадлежит молочнокислым бактериям, средой обитания которых является почва, растительные, молочные и мясные продукты, кишечник человека и животных.

Особое значение молочнокислых бактерий определяется их физиолого-биохимическими, антибиотическими и пробиотическими свойствами. Так, симбиотические и антагонистические свойства молочнокислых бактерий стали стихийно применять в практике уже в глубокой древности. Консервирующее действие молочнокислого брожения использовали при заквашивании овощей, фруктов, силосовании кормов, засолах рыбы, в квашеных овощах хранили мясо.

Между молочнокислыми бактериями и дрожжами установлены симбиотические взаимоотношения. Симбиоз между ними широко распространен – в кефирном грибке и кефире, в кумысе, ацидифильно-дрожжевом молоке, самоквасных молочных продуктах. 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 мес.

Симбиоз наблюдается также между молочнокислыми и уксуснокислыми бактериями, которые в чистой культуре плохо растут в молоке, а при совместном культивировании с молочнокислыми бактериями их рост значительно возрастает. Вместе с тем при совместном культивировании обоих видов бактерий увеличивается продолжительность жизнедеятельности молочнокислых бактерий. Объяснить явление симбиоза между этими видами бактерий можно тем, что некоторые молочнокислые Бактерии выделяют в среду этиловый спирт, который уксуснокислые бактерии используют в качестве субстрата энергетического обмена (дыхания), а в последние, частично разлагая казеин, обогащают среду необходимыми для молочнокислых бактерий азотистыми веществами и несколько снижают кислотность среды.

Кроме того, в симбиотических отношениях также находятся молочнокислые бактерии и плесени. Бактерии создают кислую среду, благоприятную для плесеней, но угнетающую развитие самих бактерий, а плесени, разлагая белки, повышают рН продукта и обогащают среду

продуктами белкового распада, что благоприятно сказывается на развитии молочнокислых бактерий. Такой симбиоз используют в производстве плесневых сыров, а в других пищевых продуктах он причиняет вред и затрудняет борьбу с плесенью. Если сквашивание молока и других продуктов повышает их стойкость по отношению к многим группам бактерий, то в отношении плесеней и дрожжей кислые продукты наиболее уязвимы.

Антагонистическая активность молочнокислых бактерий складывается из действия продуцируемых ими бактериоцинов, а также кислот (молочной, уксусной, муравьиной и т.д.), спиртов, перекисей и других метаболитов, накапливаемых ими в процессе их роста и развития. В основе действия таких метаболитов – снижение pH и ингибирование вследствие этого роста бактерий, вызывающих порчу пищи, убивка определенных патогенов, детоксикация посредством ферментативной деградации вредных соединений растительного происхождения.

Широко известен пробиотический эффект молочнокислых бактерий, проявлением которого является оздоровление пищи, регуляция бактериальной колонизации пищеварительного тракта, нормализация пищеварения, влияние на процессы репарации слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и количества иммунокомпетентных клеток и периферической крови.

В связи с возрастающими потребностями биотехнологии, изменениями экологического и радиационного фонов, широкого применения в практике химических, цитостатических и гормональных средств возникает необходимость поиска новых, эффективных, безопасных культур продуцентов новых эубиотиков.

Ряд исследователей антагонистическую активность молочнокислых бактерий изучали по отношению к разным группам микроорганизмов. В качестве тест-культур использовали 1 штамм грамотрицательных бактерий – *Escherichia coli*, 5 штаммов грамположительных бактерий: *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium citreum*, *Mycobacterium rubrum*, *Sarcina flava*, *Staphylococcus aureus*, гриб *Penicillium granulatum* и три штамма дрожжей (*Candida crusei*, *Rhodotorula glutinis* и *Saccharomyces cerevisiae*).

Антибиотическую активность изучаемых молочнокислых бактерий определяли методом диффузии в агар с измерением зоны подавления роста тест культуры. Для подбора оптимальной (повышающей антагонистические свойства) культуральной среды молочнокислые бактерии выращивали на обезжиренном молоке, гидролизованном молоке и среде MRS в течение 18 часов. Для исключения бактерицидного действия кислотности во второй серии опытов в жидкие среды добавляли  $\text{CaCO}_3$ .

Одним из основных свойств молочнокислых бактерий, обуславливающих проявление антагонистической активности, является способность к накоплению органических кислот.

Наибольшей энергией кислотообразования обладают культуры *Lc. Lactis* subsp. *Lactis patar*, *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*. В целом, наиболее сильные кислотообразователи – молочнокислые бактерии р. *Lactobacillus*. Выявлено, что вид среды культивирования – обезжиренное молоко, гидролизованное молоко и среда MRS не оказывают значительного влияния на кислотообразующую способность молочнокислых бактерий. Однако, при росте на богатой питательной среде – MRS, содержащей больше сахаров, молочнокислые бактерии накапливают большее количество кислоты.

Гидролизованное и обезжиренное молоко являются менее подходящими средами для накопления молочной кислоты. Известно, что на антибиотическую активность существенное влияние оказывает состав среды, содержание источников азота и углерода.

Все культуры молочнокислых бактерий подавляют 5 и более тест-культур. Исследуемые штаммы активны как в отношении грамположительных бактерий, включая факультативно-анаэробные кокки *Staphylococcus aureus*, *Sarcina flava*, аэробные коринеформные бактерии *Mycobacterium citreum*, *Mycobacterium rubrum* и споровые *Bacillus subtilis*, так и грамотрицательных бактерий, таких как факультативно-аэробные палочки *E.coli*, дрожжи *Candida crusei* и *Rhodotorula glutinis*. Исследуемые штаммы не подавляют рост грибов *Penicillium granulatum* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Результаты исследований показывают, что при выращивании молочнокислых бактерий на различных средах – обезжиренном молоке, гидролизованном молоке и среде MRS изменяются их антагонистические свойства. Наряду с увеличением антибиотической активности, происходит изменение спектра антибиотического действия. Так, исследуемые штаммы молочнокислых бактерий подавляют рост *Mycobacterium rubrum*, *E.coli* и *Candida crusei* только при культивировании на среде MRS. Исключением является штамм *Lc. Lactis* subsp. *Lactis patar*. Он проявляет активность к *E.coli* при росте на любой из сред. Все исследуемые культуры, выращенные на средах MRS и гидролизованном молоке, хорошо подавляют рост споровой палочки *Bacillus subtilis*, тогда как при выращивании на обезжиренном молоке они мало активны по отношению к этой тест – культуре. Исследуемые штаммы молочнокислых бактерий подавляют рост *Mycobacterium rubrum*, *E.coli* и *Candida crusei* только при культивировании на среде MRS.

Исключением является штамм *Lc. Lactis subsp. Lactis patar*, который проявляет активность к *E.coli* при росте на любой из сред. Все исследуемые культуры, выращенные на средах MRS и гидролизованном молоке, хорошо подавляют рост споровой палочки *Bacillus subtilis*, тогда как при выращивании на обезжиренном молоке они мало активны к этой тест – культуре. Возможно, это объясняется тем, что на средах MRS и гидролизованном молоке лактобактерии продуцируют большее количество кислоты, которая усиливает действие других веществ, предположительно, бактериоцинов. Таким образом, в целом, наибольшие зоны подавления тест – культур наблюдаются для молочнокислых бактерий, выращенных на среде MRS.

Егоров Н.С. отмечает активный рост и увеличение выхода низина у *Str. Lactis* в средах содержащих: дрожжевой автолизат, пептонно-казеиновый гидролизат, аммонийные соли органических кислот, глюкозу. Всем этим требованиям отвечает среда MRS, являющаяся наиболее богатой питательной средой по сравнению с обезжиренным и гидролизированным молоком. В то же время, гидролизованное молоко отличается от обезжиренного молока наличием большого количества небелкового азота, глюкозы и других веществ, необходимых для развития культуры. Вероятно, этим и можно объяснить повышение степени антибиотической активности и расширение антимикробного спектра действия молочнокислых бактерий, выращенных на средах MRS и гидролизованном молоке.

При сравнении энергии кислотообразования культур с их антагонистической активностью, какой-либо прямой зависимости между этими свойствами не выявлено. Так, культура *Lactococcus lactis subsp. Lactis 12*, имея меньшую кислотность 93-99° Т, проявляет довольно высокую активность и широкий антимикробный спектр. А культуры *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*, накапливая высокую кислотность 212-2490Т, имеют и высокую антагонистическую активность, сравнимую с активностью *L. Lactis 12*.

Чтобы выяснить значимость кислотообразования для проявления антагонистических свойств культурами молочнокислых бактерий, а также выявить способность к продуцированию бактериоцинов, был проведен эксперимент по выращиванию культур на средах в присутствии нейтрализующего вещества –  $\text{CaCO}_3$ . При изучении их антагонистической активности, чашки с культурами после засева помещали предварительно в холодильник на 12 часов (для улучшения диффузии продуцируемых бактериоцинов), а затем в термостат. Результаты исследований показали, что антагонистическая активность при нейтрализации кислоты, заметно снижена.

Молочнокислые бактерии подавляют рост *Bacillus subtilis*, *Sarcina flava* и *E.coli* только при росте на среде MRS. Это связано по-видимому с тем что бактериоцины или другие метаболиты которые имеют хоть и не большой, но все же антибиотический эффект в отношении этих тест – культур требуют для своего синтеза богатый в качественном и количественном отношении комплекс веществ из аммонийных солей органических кислот, солей Mg, Mn, K, Na и дрожжевого автолизата. К тому же действие бактериоцинов значительно усиливается в кислой среде. Однако у культур *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus bulgaricus* антагонистическая активность является высокой в среде с нейтрализующим веществом. Это свидетельствует о возможной белковой природе их антибиотических веществ, для проявления максимального действия которых требуется нейтральная среда. Расширение антимикробного спектра культур *Lc.lactis patar* и *Lactobacillus acidophilus* в отношении дрожжей *Rhodotorula glutinis* связано с теми же причинами.

При нейтрализации кислотности многие молочнокислые культуры утрачивают способность подавлять такие тест – культуры как *Mycobacterium citreum*, *Sarcina flava* и *Staphylococcus aureus*. Антагонистический эффект в данном случае, видимо обусловлен только присутствием кислоты. При сравнении различных сред, используемых для проявления культурами лактобактерий антимикробных свойств в условиях нейтрализации кислотности среды, выявлено, что более подходящей является богатая питательная среда MRS.

Таким образом, нами показано, что в зависимости от состава культуральной среды у молочнокислых бактерий меняется антагонистическая активность и антимикробный спектр действия. В целом, наиболее высокая антагонистическая активность и широкий спектр действия проявляется у культур молочнокислых микроорганизмов, выращиваемых на среде MRS. Однако, для некоторых культур наиболее подходящими средами оказываются – гидролизованное или обезжиренное молоко.

Исследования по определению антимикробной активности молочнокислых бактерий при росте на различных средах позволили выявить индивидуальные особенности каждой культуры, что представляется значимым для дальнейшего изучения природы и механизма действия бактериоцинов. Знание антагонистических свойств каждой культуры, оптимальных условий для их максимального проявления необходимо учитывать при составлении рецептуры лечебно-диетических продуктов с заданными свойствами.

#### **1.4 Использование эффекта антагонизма молочнокислых бактерий для лечения и профилактики кишечных заболеваний животных и человека**

В настоящее время возросло внимание ученых к идее И. И. Мечникова о ведущей роли микробов, обитающих в организме человека и животных, в поддержании здоровья и возникновении болезней. В современных схемах лечения большинства заболеваний широко используются препараты биологического происхождения, содержащие живые штаммы нормальной микрофлоры кишечника — пробиотики.

Микрофлору желудочно-кишечного тракта относят к неспецифическим факторам защиты организма. Молочнокислые бактерии участвуют в формировании иммунного ответа: бифидо- и лактобактерии стимулируют лимфоидный аппарат, синтез иммуноглобулинов, интерферона, повышают активность лизоцима, способствуют уменьшению проницаемости сосудистых и тканевых барьеров для токсических продуктов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, препятствуют транслокации бактерий во внутренние органы и кровь. По существу, ни одна из функций организма не может быть реализованной без участия микрофлоры.

Основными функциями молочнокислых бактерий считают:

- колонизационная резистентность организма (активация иммунной системы, микробный антагонизм);
- детоксикационная (инактивация энтерокиназы, щелочной фосфатазы);
- ферментативная (гидролиз продуктов метаболизма белков, липидов, углеводов);
- синтетическая (синтез витаминов, гормонов, антибиотических и других веществ);
- пищеварительная (усиление физиологической активности желудочно-кишечного тракта);
- антианемическая (улучшение всасывания железа);
- антирахитическая (улучшает всасывание кальция, витамина D);
- иммунная (участие в синтезе иммуноглобулинов, интерферона).

Ведущая роль в формировании дисбактериоза принадлежит нарушению популяционного уровня молочнокислых бактерий: лактобацилл, бифидобактерий, молочнокислых стрептококков. Дисбиотическая микрофлора не способна выполнять в полном объеме физиологические функции, присущие нормальной кишечной флоре, прежде всего, противостоять колонизации экзогенными патогенными микроорганизмами.

Диарея — одно из основных проявлений кишечного дисбактериоза. При тяжелой степени выраженности в короткие сроки может привести к серьезным нарушениям микробного баланса, что может способствовать развитию тяжелых осложнений в дальнейшем. Поэтому лечение диареи должно быть не только симптоматическим, но и патогенетически обоснованным.

Кроме диеты и регидратации, в современные схемы лечения диарей входят препараты, способствующие стабилизации кишечной флоры - пробиотики.

Физиологичным действием при лечении диарейного синдрома обладает линекс. В отличие от других антидиарейных средств, линекс не блокирует перистальтику кишечника, а его бактерицидный эффект обусловлен высокой антагонистической активностью компонентов препарата.

Линекс быстро и эффективно восстанавливает нарушенную микрофлору кишечника и обеспечивает ее физиологические функции (антимикробную, пищеварительную, синтез витаминов), действуя при этом на патогенетическое звено развития болезни.

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 исключительно важную роль в поддержании нормальной жизнедеятельности человека. Однако в последние годы отмечается тенденция к росту патологических состояний, сопровождающихся нарушением микрoэкологического равновесия кишечника, что практически во всех случаях требует фармакологической коррекции. Впервые на существенную роль нормальной микрофлоры кишечника в жизнедеятельности человека, поддержании его здоровья указал в своих работах выдающийся русский учёный И.И. Мечников. Он считал, что молочно-кислая диета способствует снижению количества патогенных микроорганизмов, называя молочно-кислые продукты продуктами долголетия. И.И. Мечников впервые предложил поддерживать нормальную микрофлору кишечника на оптимальном уровне с помощью микробов и продуктов их жизнедеятельности. На протяжении ряда лет ведётся поиск оптимальных средств, направленных на профилактику возникновения дисбактериоза и увеличивающих сопротивляемость организма к неблагоприятным факторам внешней среды. С этой целью пытаются применять ферментированные с помощью бактерий кисло-молочные продукты, которые в настоящее время являются важным компонентом питания людей. Однако,

содержащиеся в этих продуктах микроорганизмы, как правило, являются транзиторными и не колонизируют в кишечнике. Постоянное усовершенствование технологий и рецептур, выпускаемых продуктов, привело к созданию биологически активных добавок к пище на основе эубиотиков, которые в современных условиях занимают ведущее место в профилактике и комплексной терапии целого ряда заболеваний.

Эубиотики (пробиотики) - биологические препараты, содержащие живые, ослабленные штаммы нормальной микрофлоры кишечника. В кишечнике находятся 400-500 различных видов микроорганизмов, наиболее важными из них являются лактобактерии (*Lactobacillus acidophilus*) и бифидумбактерии (*Bifidumbakterium bifidum*), составляющие основу облигатной (индигенной) флоры. К этой же группе относятся бактериоиды, клостридии, энтерококки и кишечная палочка. Видовой состав этих микроорганизмов у человека генетически детерминирован и содержание их в кишечнике относительно постоянно. При рождении у человека в кишечнике отсутствуют *Lactobacillus acidophilus*, но в дальнейшем происходит колонизация и быстрый их рост. *Bifidumbakterium bifidum* первыми обнаруживаются у новорожденных, находящихся на естественном вскармливании, попадая в стерильный кишечник с грудным молоком, позднее другие бактерии (*L. casei*, *L. fermentum*, *L. salivores*, *L. brevis*) начинают заселять кишечник новорожденного, но уже через соприкосновение с окружающим миром. В отличие от облигатной состав факультативной флоры кишечника меняется в зависимости от действия факторов внешней среды. Факультативная флора делится на добавочную и транзиторную, и представлена условно-патогенными микроорганизмами: стафилококками, стрептококками, клостридиями, протеем, дрожеподобными грибами и т.д.

Равновесие микрoэкологической системы кишечника зависит от соотношения различных частей микрофлоры.

Основными представителями кишечной микрофлоры являются аэробные лактобактерии (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. salivores*, *L. cellobiosus*) и анаэробные бифидобактерии (*Bifidumbakterium bifidum*, *B. bifidus*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*).

Кишечная микрофлора играет большую роль в поддержании здоровья человека (Hentges D.J., 1983; Mitsuoka T., 1988), выполняя ряд функций, имеющих важное значение для жизнедеятельности человека. Регулирует стабильность микробиоценоза и предотвращает заселение кишечника патогенными микроорганизмами, обеспечивая тем самым колонизационную резистентность кишечника. Способствует процессам ферментативного

переваривания белков, липидов, высокомолекулярных углеводов, нуклеиновых кислот, клетчатки. Участвует в синтезе витаминов группы В, К, аскорбиновой кислоты, повышая тем самым резистентность организма к неблагоприятным факторам внешней среды. Участвует в электролитном обмене. Регулирует метаболизм желчных кислот, холестерина. Участвует в детоксикации экзогенных и эндогенных субстратов, выступая в роли "естественного биосорбента", а также осуществляя микробную трансформацию токсических веществ. Синтезирует вещества с антибактериальной активностью. Стимулирует перистальтику кишечника, участвуя в образовании продуктов распада белков, и нормализуют эвакуацию кишечного содержимого. Участвует в синтезе незаменимых аминокислот (триптофан) и гистамина, способствуют лучшему усвоению солей кальция и витамина Д. Повышает иммунную реактивность организма: стимулирует лимфоидный аппарат, синтез иммуноглобулинов, увеличивает уровень пропердина и комплемента, увеличивают активность лизоцима и способствует снижению проницаемости сосудистых тканевых барьеров для токсических продуктов патогенных микроорганизмов (наиболее характерно для бифидобактерий). Способствует уничтожению атипичных клеток организма в результате активации иммунных процессов.

Изменение микробиоценоза кишечника сопровождается различными нарушениями жизненно важных функций организма, утяжелением течения хронических заболеваний

В настоящее время установлено, что исключительно важную роль в функционировании кишечника играют, прежде всего, бифидумбактерии и лактобактерии, которые исчезают в первую очередь при различных формах дисбактериоза. Поэтому важной вехой в развитии бактериотерапии дисбактериоза явилось создание лечебных препаратов на основе анаэробных бактерий. Первыми такими препаратами стали бифидумбактерин, созданный Гончаровой Г.И. и соавт. (1972) и лактобактерин, созданный Тарасовой И.Б. (1970). В результате многочисленных экспериментальных и клинических исследований было убедительно доказано, что с помощью аутоштаммов бифидумбактерий и лактобактерий происходит нормализация микробиоценоза кишечника при дисбактериозах различной этиологии и, в частности, после антибиотикотерапии. Для профилактики развития дисбактериоза в процессе терапии антибактериальными препаратами сотрудниками кафедры микробиологии Московской медицинской академии им. Н.И. Пирогова и Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.И. Габричевского был получен антибиотикорезистентный штамм бифидобактерии *Bolongum*

D4a200, проявивший высокую эффективность при восстановлении микрофлоры кишечника уже в процессе антибиотикотерапии.

В настоящее время в арсенале врача имеется ряд средств, регулирующих равновесие кишечной микрофлоры, созданных на основе живых микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности.

Лечебные препараты на основе анаэробных бактерий – бифидумбактерин и лактобактерин, 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 [25]:

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, и прежде всего - бифидо- и лактобактерий;

IV - препараты, содержащие монокультуры или комплекс микроорганизмов и субстанций, стимулирующих их приживание, рост и размножение;

V - препараты, содержащие генноинженерные 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.

Для того, чтобы перпараты-эубиотики могли оказать положительное влияние на организм прежде всего необходимо, чтобы, содержащиеся в них представители нормальной микрофлоры могли прижиться и заселить кишечник. Чтобы обеспечить успешную колонизацию бактерий в кишечнике, необходимо

сочетание целого ряда благоприятных факторов: определённый вид и штамм микроорганизмов, рост микроорганизмов и оптимальная диета.

Высококачественные коммерческие продукты, такие как кефир содержат микроорганизмы *L. bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* которые оказывают благоприятный эффект, но являются транзитными и не заселяют кишечник.

Препараты-эубиотики должны обладать способностью к выживанию и жизнедеятельности в условиях кишечного микроокружения и сохранять жизнеспособность бактерий в течение длительного срока хранения.

Для обеспечения соответствующего качества препаратов и молочно-кислых продуктов необходима соответствующая технология их производства, упаковывания и хранения. Например, *Lactobacillus acidophilus* легко повреждается в результате лиофилизации, воздушной сушке или конвенционного холодного хранения. Запредельные температуры при упаковке и хранение резко могут снизить качество продукта. Большинство зарубежных компаний, которые производят высококачественные продукты-эубиотики сталкиваются с многочисленными трудностями при их хранении, хотя и утверждают о высоком качестве своих продуктов и о высоком содержании в них *Lactobacillus*.

Проведённые учёными Вашингтонского университета исследования позволили сделать заключение: большинство из содержащих *Lactobacillus acidophilus* продуктов, которые поступали в продажу в 1990 году не содержали указанные на них *Lactobacillus* или содержали другие бактерии с сомнительными характеристиками (Hughes V.L., Hillier S.L., 1990). Murray M.T (1996) рекомендует применять продукты, содержащие DDS-штамм, открытый профессором M. Shahani, который более известен как суперштамм, так как он содержит более чем 200 штаммов *Lactobacillus*.

Следует также отметить, что распространители БАД к пище по системе многоуровневого маркетинга в России не гарантируют высокую сохранность БАД, содержащих эубиотики, поскольку не всегда могут обеспечить оптимальные условия их хранения. Препараты-эубиотики необходимо хранить в сухом тёмном месте при температуре от 2 до 80С. Поэтому распространение населению биологически активных добавок к пище, содержащих живые микроорганизмы, должно осуществляться через аптеки и специализированные магазины, торгующие диетическими продуктами.

#### *Применение в клинической практике.*

Учитывая многообразие функций лактобактерий и бифидумбактерий, применение эубиотиков должно значительно улучшать общее здоровье людей.

Однако, поскольку эубиотики оказывают специфические эффекты, в настоящее время рассматриваются несколько основных показаний для назначения эубиотиков: дисбактериозы различной этиологии и, в том числе, возникшие после проведения антибактериальной терапии, вагинальная грибковая инфекция, инфекция мочевого тракта, профилактика атеросклероза и новообразований кишечника.

#### *Нормализация микрофлоры кишечника.*

Эубиотики играют важную роль в профилактике и лечении заболеваний, особенно кишечных и вагинальных инфекций. В качестве нормальной флоры они ингибируют рост других микроорганизмов в результате конкуренции за источник питания, изменяют рН и содержание кислорода, тем самым снижая их уровень до состояния, при котором патогенная микрофлора погибает. Препятствуют повреждению слизистой оболочки кишечника патогенными микроорганизмами и продуцируют антимикробные факторы (Shahani K.M., Friend B.A., 1984).

Лактобактерии синтезируют широкий спектр веществ, которые ингибируют рост других бактерий. К этим веществам относятся конечные продукты метаболизма, такие как органические кислоты (молочная и уксусная), перекись водорода и соединения известные как бактериоцины: лизоцин, лектролин, низин, лактоцидин, ацидофилин. Бактериоцины - белки, которые продуцируются некоторыми микроорганизмами, и оказывают губительное действие на близко родственные микроорганизмы. В общем, бактериоцины имеют меньший спектр активности, чем антибиотики, но действие их более выражено.

Антимикробная активность лактобактерий, вероятно, может быть следствием продуцирования перекиси водорода. Кроме того, некоторые исследователи полагают, что антимикробная активность связана со стимуляцией иммунной системы.

Лактобактерии подавляют рост следующих бактерий:

*Bacillus subtilis*

*B. cereus*

*B. stearothermophilus*

*Candida albicans*

*Clostridium perfringes*

*Escherichia coli*

*Klebsiella pneumoniae*

*Lactobacillus bulgaricus*

*L. fermenti*

L. helveticus  
 L. lactis  
 L. leichmannii  
 L. plantarum  
 Proteus vulgaris  
 Pseudomonas aeruginosa  
 P. fluorescens  
 Salmonella typhosa  
 S. schottmuelleri  
 Shigella dysenteriae  
 S. paradysenteriae  
 Sarcina lutea  
 Serratia marcescens  
 Staphylococcus aureus  
 Streptococcus faecalis  
 S. lactis  
 Vibrio comma

Выраженным микробным антагонизмом обладают также бифидобактерии, которые в процессе жизнедеятельности образуют органические кислоты, что приводит к снижению pH среды кишечника, и препятствует размножению патогенной, гнилостной и газообразующей микрофлоры кишечника. Коррекция постантибактериальных осложнений

Эубиотики широко применяются для профилактики и лечения постантибиотиковой диареи, кандидоза или инфекции мочеполовых путей. Лактобактерии могут корректировать рост грамотрицательных микроорганизмов, которые часто обнаруживаются после назначения антибиотиков широкого спектра действия.

Смесь лактобактерий и бифидобактерий препятствуют снижению кишечной микрофлоры, вызванное ампициллином и нормализует кишечную экосистему. Снижение полезной микрофлоры или суперинфекция антибиотикоустойчивой флоры может быть предотвращено назначением продуктов, содержащих лактобактерии.

Необходимая доза - 15-20 миллионов микроорганизмов. Рекомендуется также применение антибиотикорезистентного штамма бифидобактерии Bolongum D4a200.

#### *Профилактика новообразований*

Многочисленными исследованиями было показано, что употребление кисло-молочных продуктов снижает риск возникновения рака толстого

кишечника. *Lactobacillus bulgaricus* - основные лактобактерии, которые используются для приготовления кефира, в некоторых исследованиях продемонстрировали выраженную профилактическую противоопухолевую активность. В клинических исследованиях было показано, что употребление лактобактерина и бифидумбактерина приводит к снижению активности бактериальных ферментов, связанных с формированием канцерогенных соединений кишечника

Препараты-эубиотики рекомендуется назначать больным со злокачественными новообразованиями кишечника в качестве дополнительных средств при химио- или лучевой терапии.

Следует провести границу между областью применения лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище, содержащих эубиотики.

Лекарственные препараты применяются для лечения дисбактериоза различной этиологии, кандидоза, инфекций моче-половой системы.

БАДы к пище следует применять с целью повышения резистентности организма, укрепления иммунной системы, профилактики развития дисбактериоза, атеросклероза, осложнений, возникающих при химиотерапии. Применение БАД к пище, содержащих нормальную микрофлору в качестве монотерапии дисбактериоза не допустимо.

Для того чтобы эубиотики могли колонизировать в кишечнике, для них должны быть созданы благоприятные условия. Питательной средой для сапрофитных бактерий являются фрукто-олигосахариды.

#### *Фрукто-олигосахариды (ФОС)*

Фрукто-олигосахариды - это короткоцепочные полисахариды, улучшающие рост сапрофитной микрофлоры. Они не всасываются в кишечнике человека, но перевариваются микрофлорой, в результате чего увеличивается количество лактобактерий и бифидобактерий и уменьшаются колонии патогенных микроорганизмов. Кроме того, ФОС улучшают синтез жирных кислот с короткой цепочкой (бутираты); улучшают функцию печени, снижают уровень холестерина в плазме; улучшают элиминацию токсических соединений.

Рекомендуемая доза для очищенных ФОС - 2000-3000 мг в сутки. Естественными пищевыми источниками ФОС являются иерусалимский артишок, репчатый лук, спаржа и чеснок. Однако, рассчитанное количество ФОС потребляемое с этими источниками составляет около 800 мг. Таким образом, пищевые добавки - ФОС - могут улучшить рост благоприятной микрофлоры, особенно бифидумбактерий.

Способствует размножению нормальной микрофлоры кишечника лактулоза (Нормазе) - полусинтетический дисахарид, состоящий из галактозы и

фруктозы, который не расщепляется в кишечнике, поскольку у человека отсутствует лактулаза - фермент, необходимый для расщепления лактулозы и в неизменном виде достигает поперечно-ободочной кишки. Препарат способствует размножению лактобактерий (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*) в кишечнике, которые расщепляют лактулозу с образованием основных метаболитов: низкомолекулярных жирных кислот (молочной, уксусной, масляной и пропионовой), водорода, диоксида углерода. Результатом этого является сдвиг pH кишечного содержимого в кислую сторону и усиление перистальтики. Кроме того, лактулоза, расщепляясь в толстой кишке, высвобождает ионы водорода, связывает свободный аммиак, уменьшает образование токсических азотсодержащих веществ в проксимальном отделе толстого кишечника и их абсорбцию, увеличивает диффузию аммиака из крови в кишечник и, соответственно, его выведение из организма. Оказывает слабительное действие, ускоряя тем самым выведение токсинов.

#### *Взаимодействия*

Антибиотики и алкоголь негативно влияют на колонии *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium bifidum*. Хотя нет очевидных данных, по мнению некоторых авторов, микроорганизмы, в частности лактобактерии, могут изменять активность некоторых антибиотиков и метаболизм сульфасалазина, левомецитина и фталозола.

Таким образом, в настоящее время рекомендуется широкое применение эубиотиков в качестве средств, повышающих неспецифическую сопротивляемость к неблагоприятным факторам окружающей среды, способствующих общему оздоровлению организма человека и предотвращающих возникновение ряда патологических состояний.

### **1.5 Основные препараты, действие которых основано на антагонизме гнилостных (патогенных) и молочнокислых бактерий**

В настоящее время в медицинской практике широко применяются официально зарегистрированные биологические лекарственные препараты созданные на основе ослабленных штаммов нормальной микрофлоры кишечника:

- Аципол
- Ацилакт
- Биоспорин
- Бактисубтил
- Бифидумбактерин
- Бифиформ
- Бификол

Колибактерин  
 Лактобактерин  
 Лайфпак Пробиотикс  
 Линекс  
 Нутрилин В  
 Тревис  
 Хилак форте  
 Флонивин  
 Энтерол

Биологически активные добавки к пище, содержащие эубиотики:

Ацидофилюс  
 Бебилайф  
 Вита Баланс 3000  
 Мальтидофилюс  
 Примадофилюс  
 Пробионик  
 Флорадофилус  
 Наринэ

Бактисубтил - препарат, содержащий чистую культуру *Bacillus* штамма IP 5832 с вегетативными спорами в количестве не менее 1 млрд. Нормализует физиологическое равновесие кишечной микрофлоры. Содержащиеся в препарате споры бактерий обладают устойчивостью к действию желудочного сока и в кишечнике прорастают в вегетативные формы. Вегетативные формы бактерий продуцируют ферменты, расщепляющие углеводы, жиры и белки, в результате чего образуется кислая среда, препятствующая процессам гниения. Препараты способствуют нормальному синтезу витаминов группы В и Р в кишечнике. Выпускается в капсулах.

Флонивин БС содержит чистую культуру бациллы штамма 1P5832 (109) с вегетативными спорами. Штаммы *Bacillus* IP5832 генетически резистентны ко всем видам сульфаниламидов, нистатину, большинству антибиотиков широкого спектра действия. Выпускается в капсулах.

Биоспорин содержит *Bacillus subtilis*, *Bacillus lichineformis*. Выпускается в капсулах.

Бифидумбактерин представляет собой лиофилизированную в среде культивирования микробную массу живых бифидобактерий, являющихся важнейшими симбионтами человека, доминирующих в микрофлоре здорового кишечника как детей, так и взрослых. В одной дозе препарата содержится не

менее 108 живых бифидобактерий. Выпускается в таблетках, капсулах, пакетах и во флаконах.

В настоящее время исследуется эффективность жидких бифидобактеринов. Зорин А.Ю. и др. (1998) показали, что эффективность этих препаратов при дисбиозах, превосходила эффективность сухих бифидобактеринов. При этом лечебный эффект на фоне терапии жидкими бифидобактеринами развивался через 1-2 месяца, тогда как применение сухих бифидобактеринов приводило к улучшению клинической и лабораторной симптоматики только через 3-6 месяцев. Это связано с тем, что жидкие биопрепараты, во-первых, содержат большее количество микробных тел ( $10^{11}$ - $10^{15}$  в 1 мл объёма по сравнению 108 в сухих препаратах), во-вторых, не содержат посторонней микрофлоры, и, в третьих, жизнеспособность микроорганизмов жидких препаратов оказалось значительно более высокой. То есть живые бифидобактерии полностью сохраняют свои физиологические свойства, вследствие чего они оказывают лечебный эффект за короткие отрезки времени. На основе живых бифидобактерий созданы также препараты Бифилиз сухой и Бифиформ. В состав бифилиза входит лизоцим, благодаря которому он обладает противовоспалительной активностью, кроме того, он стимулирует метаболические процессы и эритропоэз. В остальном, по фармакологическим свойствам и показаниям к применению эти препараты аналогичны бифидумбактерину.

Лайфпак Пробиотикс - содержит *Bifidobacterium bifidum* ( $5 \times 10^7$  микробных тел в 1 капсуле).

Бификол - сухой комплексный двухкомпонентный биологический препарат из живой бактериальной анаэробной и аэробной микрофлоры кишечника человека штаммов бифидобактерий (*Bifidobacterium bifidum* I) и кишечной палочки (*Escherichia coli* M-17). Бификол представляет собой лиофилизированную культуру совместно выращенных бактерий указанных штаммов. 1 доза препарата содержит: не менее  $10^7$  живых бифидобактерий и не менее  $10^7$  особей кишечной палочки М-17. Выпускается во флаконах. Колибактерин представляет собой лиофилизат живых бактерий антагонистически активного штамма кишечной палочки М-17, обладает антагонистической активностью по отношению к широкому спектру патогенных и условно патогенных микроорганизмов, тем самым нормализует физиологическое равновесие кишечной микрофлоры. Выпускается в ампулах и в таблетках.

Лактобактерин представляет собой лиофилизат живых лактобактерий. Лактобактерин является составной частью нормальной микрофлоры.

Создаваемая лактобактериями кислая среда способствует развитию в кишечнике бифидофлоры и другой нормальной микрофлоры, так как является оптимальной для этих бактерий, и тем самым сохраняет и регулирует физиологическое равновесие кишечной микрофлоры. Выпускается в ампулах, таблетках и свечах.

Аципол - представляет собой смесь живых ацидофильных лактобактерий и согретых кефирных грибов. Препарат обладает высокой биохимической кислотообразующей и антагонистической активностью. Прогретые кефирные грибки являются иммуномодулятором, стимулирующим защитные свойства организма. Выпускается во флаконах и таблетках.

Ацилакт - лиофилизат живых ацидофильных лактобактерий. Выпускается во флаконах.

Линекс - один из наиболее сбалансированных эубиотиков, в состав которого входят живые лиофилизированные бактерии: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis* v.liberorum, *Streptococcus faecium*. Эти бактерии являются представителями нормальной микрофлоры кишечника, устойчивы к антибиотикам и химиотерапевтическим средствам. Молочнокислые бактерии, продуцируя органические кислоты (молочная, уксусная, пропиленовая), создают в кишечнике кислую среду, которая является неблагоприятной для развития патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. В результате этого происходит нормализация физиологического равновесия кишечной микрофлоры. Кроме того молочно-кислые бактерии стабилизируют мембраны эпителиальных клеток кишечника, участвуют в резорбции моносахаридов и регулируют электролитное равновесие в кишечнике. Помимо эубиотического действия, комбинация микроорганизмов, входящих в препарат, обеспечивает также бактерицидное и антидиарейное действие. Выпускается в капсулах.

Нутролин В - содержит спорогенные лактобациллы и витамины В1, В2, В6, РР. Выпускается в виде капсул, таблеток и сиропа.

Тревис содержит *L. Acidophilus*, *L. Bulgaricus*, *B. Bifidum*, *Streptococcus thermophilus*. Выпускается в капсулах.

Хилак-форте - препарат в виде капель для приёма внутрь, содержащий стерильный концентрат продуктов обмена веществ субстанций для образования молочной кислоты с продуктами обмена веществ грамположительных и грамотрицательных симбионтов кишечной микрофлоры, а также аминокислоты, короткоцепочные летучие жирные кислоты, биосинтетическую молочную кислоту, молочно-солевой буфер, лактозу. В 1 мл Хилак-форте содержится - 100 млрд. микроорганизмов. Препарат способствует поддержанию рН в кишечнике в границах физиологической нормы, что приводит к

нормализации сапрофитной флоры кишечника и создаёт неблагоприятные условия для жизнедеятельности патогенных микроорганизмов. Под действием препарата нормализуется естественный синтез витаминов группы В и К. Содержащиеся в препарате короткоцепочные летучие жирные кислоты обеспечивают восстановление повреждённой микрофлоры кишечника при инфекционных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, повышают регенерирующую способность эпителиальных клеток кишечной стенки, восстанавливают нарушенный водно-электролитный баланс в просвете кишки.

Энтерол - содержит лиофилизированные сахаромикеты буларди (лечебные дрожжи). Оказывают противомикробное действие, являются антагонистами патогенных и условно-патогенных микроорганизмов: клостридий, стафилококков, кандид, а также лямблий. Повышает местную иммунную защиту в результате повышения иммуноглобулинов и, прежде всего, IgA. Оказывает антитоксическое действие, улучшает трофику слизистой оболочки кишечника. Выпускается в виде порошка в пакетиках и капсулах.

Эубиотики - биологически активные добавки к пище.

Ацидофилюс содержит высушенные холодом *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* на основе козьего молока или на основе морковного сока. Наполнители: диоксид кремния, растительные стеарины, мальтодекстрин. Выпускается в капсулах (60 и 100 шт. в упаковке).

Биобактон содержит лиофилизированную культуру ацидофильной палочки штамма 12Б, обладающего высокими антибиотическими и кислотообразующими свойствами. Выпускается во флаконах.

Бебилайф содержит высушенные холодом *B. infantis* на гипосенсибилизирующей основе мальтодекстрина. В одном грамме порошка содержится 4 млрд живых активных микроорганизмов. Форма выпуска - порошок, 71 г в упаковке

Мальтидофилюс содержит высушенные при низких температурах *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum* на основе мальтодекстрина. В одной капсуле или 1/8 чайной ложки порошка содержится свыше 3 млрд. живых активных микроорганизмов. Выпускается в капсулах (100 шт. в упаковке) и в виде порошка (71 г в упаковке).

Примадофилюс содержит смесь высушенных при низких температурах микроорганизмов (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. infantis*, *B. adolescentis*) на основе мальтодекстрина. В одной чайной ложке порошка и микрокапсуле содержится 1 млрд живых, активных микроорганизмов, в обычной капсуле содержится 2,8 млрд микробных тел. Выпускается в виде порошка (142 г в упаковке), капсул и микрокапсул (90 шт. в упаковке).

Пробионик содержит высушенные из замороженного состояния *B.infantis*, *B.adolescentis*, *B.longum*, *L.acidophilus*, а также сорбитол, манитол, фруктозу, фруктоолигосахарид и натуральный клубничный наполнитель. Выпускается в виде жевательных таблеток.

Препараты "Бебилайф", "Примадофилус", "Мальтидофилус", "Ацидофилус" можно принимать на фоне проводимого курса антибактериальных препаратов с условием, что биопрепарат дается не ранее, чем через 2 часа до или через два часа после введения антибиотиков.

Флорадофилус - смесь лиофильно высушенных микроорганизмов бифидобактерий *B. bifidum*, *B.longum*, лактобацилл *L acidophilus*, *L bulgaricus* и стрептококков *Streptococcus thermophilus*. Выпускается в капсулах, в одной дозе содержится 10 миллиардов жизнеспособных микроорганизмов.

Вита баланс 3000 - лиофильно высушенных молочно-кислых бактерий (*L acidophilus*) смешанные с морковным порошком. Одна капсула содержит не менее 5 млрд жизнеспособных клеток.

Наринэ - на основе штамма *L. acidophylus* 317/402 армянскими учёными разработан новый лечебно-диетический молочно-кислый продукт "Наринэ", рекомендуемый для широкого использования в клинике в комплексном лечении больных с кишечными инфекциями, вызванными условно-патогенными энтеробактериями. Большой вклад во внедрение этого продукта в г. Волгограде внесли сотрудники кафедры микробиологии Волгоградской медицинской академии под руководством профессора В.С. Крамарь.

Рекомендуется приём молочно-диетической смеси "Наринэ" по 400 мл в сутки в 3 приёма за 30 минут до еды. Данная смесь имеет отличные вкусовые качества, высокую энергетическую и питательную ценность. Побочные эффекты при её применении не наблюдались. "Наринэ" выпускается также в виде сухого вещества во флаконах по 0,3, 0,35 и 0,03 г. Применяется по тем же показаниям, что и лактобактерин, а также в комплексной терапии аллергических поражений кожи и слизистых, воспалительных заболеваний органов дыхания, моче-половой системы.

В настоящее время имеется большое количество молочно-кислых продуктов, содержащих эубиотики. В Волгограде широкое распространение получили такие продукты, содержащие бифидумбактерии - "Бифидок", "Биолакт", "Бифилин", различные йогурты и т.д.

#### Рекомендуемые дозы

Дозы коммерческих эубиотиков основываются на количестве живых организмов, Потребление от 1 до 10 миллионов жизнеспособных клеток *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidumbakterium bifidum* ежедневно является

оптимальной дозой для большинства людей. Большие дозы могут вызывать незначительные диспептические расстройства.

Суточная доза эубиотиков, применяемых в качестве БАД к пище в соответствии с методическими указаниями ("Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище", 1999) не должна превышать разовую терапевтическую дозу, аналогичного лекарственного препарата, содержащего тот же самый штамм микроорганизма.

Молочнокислые бактерии могут находиться в симбиозе или антагонизме не только с патогенными или условнопатогенными бактериями, но и между собой как в макроорганизме, так и в пищевых продуктах.

Изучение этих взаимодействий и легло в основу нашей работы.

## **2 ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Целью наших исследований было изучение симбиотических и антагонистических взаимодействий между некоторыми микробными компонентами заквасок, предназначенных для производства кисломолочных продуктов, в искусственных и естественных питательных субстратах в зависимости от режима культивирования.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Определить количественный компонентный состав молочнокислых бактерий закваски, используемой при производстве сыра творожного пастеризованного в зависимости от режима производства продукта и количества внесённой закваски.
2. Определить характер взаимодействия между бифидумбактериями и дрожжами в искусственных питательных средах.
3. Определить характер взаимодействия между дрожжами и молочнокислыми стрептококками в искусственных питательных средах.
4. Определить характер взаимодействия между дрожжами и термофильными стрептококками в искусственных питательных средах.
5. Определить характер взаимодействия между собой всех перечисленных микроорганизмов в искусственных питательных средах.

### **3. Материал и методы исследований**

В работе в качестве источника молочнокислых бактерий использовали сыр творожный пастеризованный, любезно предоставленный нам разработчиком технологии изготовления кандидатом технических наук Успенской М.Е.

Культуры молочнокислых бактерий выделялись из различных источников по общепринятым методам. В качестве искусственных питательных сред использовали мясопептонный агар (МПА) и молочно-сывороточный агар (МСА).

Морфологические свойства – форму, величину, расположение клеток, их подвижность, наличие или отсутствие спор, характер окрашивания метиленовой синью и по Граму изучали с помощью лабораторного микроскопа «Биолам» по общепринятым в лабораторной практике методикам. Также изучали макроморфологию, описывая характер, структуру и размеры колоний.

Культуральные и физиолого-биохимические свойства молочнокислых бактерий оценивали по общепринятым в лабораторной практике методам исследований.

Антагонистическую и симбиотическую активность молочнокислых бактерий определяли, оценивая количество микробных клеток разных видов при различных условиях культивирования в естественной и искусственных питательных средах.

Идентификацию молочнокислых бактерий проводили по результатам исследования свойств общепринятыми методами (Квасников Е.И., Нестеренко О.А., 1975).

## **4. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **4.1. Схема проведения эксперимента**

Основные этапы эксперимента состояли в следующем:

1. Определение количественного компонентного состава молочнокислых бактерий закваски, используемой при производстве сыра творожного пастеризованного в зависимости от режима производства продукта и количества внесённой закваски.
2. Определение взаимодействия между бифидумбактериями и дрожжами в искусственных питательных средах.
3. Определение взаимодействия между дрожжами и молочнокислыми стрептококками в искусственных питательных средах.
4. Определение взаимодействия между дрожжами и термофильными стрептококками в искусственных питательных средах.
5. Определение взаимодействия между собой всех перечисленных микроорганизмов в искусственных питательных средах.

## 4.2. Полученные результаты

### 4.2.1. Определение количественного компонентного состава молочнокислых бактерий закваски, используемой при производстве сыра творожного пастеризованного в зависимости от режима производства продукта и количества внесённой закваски

Результаты определения количественного компонентного состава молочнокислых бактерий закваски, используемой при производстве сыра творожного пастеризованного в зависимости от режима производства продукта и количества внесённой закваски представлены в таблице 4.1. (n=3).

Таблица 4.1. Компонентный состав бактерий закваски

| Наименование закваски | Срок хранения, сут.                       |                                        |                                     |                                     |                                    |                                    |                                       |                                    |                                       |                                       |
|-----------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|                       | Температура внесения, °C                  |                                        |                                     |                                     |                                    |                                    |                                       |                                    |                                       |                                       |
|                       | после внесения                            |                                        | 1 сут при 37 °C                     |                                     | 3 сут при 20-22°C                  |                                    | 4 сут при 4 °C                        |                                    | 6 сут при 4 °C                        |                                       |
|                       | 60-65                                     | 37                                     |                                     |                                     |                                    |                                    |                                       |                                    |                                       |                                       |
| без закваски          | роста нет                                 |                                        |                                     |                                     |                                    |                                    |                                       |                                    |                                       |                                       |
| комб                  | б: с<br>1:33;<br>1,03*<br>10 <sup>8</sup> | б:с<br>1:1;<br>4,7*1<br>0 <sup>6</sup> | б:стр<br>1:16;<br>4*10 <sup>8</sup> | б:стр<br>1:16;<br>4*10 <sup>8</sup> | б:стр<br>1:8;<br>8*10 <sup>7</sup> | б:стр<br>1:6;<br>5*10 <sup>7</sup> | б:стр<br>1:16;<br>2,8*10 <sup>8</sup> | б:стр<br>1:8;<br>8*10 <sup>7</sup> | б:стр<br>1:16;<br>2,4*10 <sup>8</sup> | б:стр<br>1:15;<br>2,6*10 <sup>8</sup> |
| биф Д                 | б:с                                       | 1:3;                                   | б:стр                               | б:кокк                              | б:стр                              | б:стр                              | б:стр                                 | б:стр                              | б:стр                                 | б:стр                                 |

|                                            |                                                    |                                                   |                                                                   |                                                                     |                                                                     |                                                                   |                                                                   |                                                                   |                                                                |                                                                |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
|                                            | 1:5;<br>1,76*<br>10 <sup>8</sup>                   | 1,92*<br>10 <sup>8</sup>                          | 1:6;<br>2*10 <sup>8</sup>                                         | и 1:5;<br>3*10 <sup>8</sup>                                         | 1:5;<br>3*10 <sup>7</sup>                                           | 1:4;<br>1,2*10 <sup>7</sup>                                       | 1:8;<br>2,4*10 <sup>8</sup>                                       | 1:6;<br>1,4*10 <sup>8</sup>                                       | 1:7;<br>4*10 <sup>8</sup>                                      | 1:7;<br>3*10 <sup>8</sup>                                      |
| закваска для<br>мелк сыров                 | бакт:<br>кокки<br>1:22;<br>4,7*1<br>0 <sup>6</sup> | кокки<br>1,9*1<br>0 <sup>6</sup>                  | бактер<br>ии:<br>кокки<br>1:18;<br>4*10 <sup>8</sup>              | бактер<br>ии:<br>кокки<br>1:16;<br>2,5*10 <sup>8</sup>              | бактер<br>ии:<br>кокки<br>1:14;<br>1,75*1<br>0 <sup>8</sup>         | бактер<br>ии:<br>кокки<br>1:14;<br>5,5*10 <sup>7</sup>            | более<br>10 <sup>9</sup>                                          | бактер<br>ии:<br>кокки<br>1:16;<br>1,8*10 <sup>8</sup>            | бактери<br>и: кокки<br>1:19;<br>2,2*10 <sup>8</sup>            | бактерии<br>: кокки<br>1:17;<br>2*10 <sup>8</sup>              |
| закваска с<br>высокой темп.<br>2 подогрева | кокки<br>1*10 <sup>6</sup>                         | бакт:<br>кокки<br>7:1;<br>1,2*1<br>0 <sup>6</sup> | бактер<br>ии:<br>кокки<br>1:8;<br>3*10 <sup>8</sup>               | бактер<br>ии:<br>кокки<br>1:5;<br>2*10 <sup>8</sup>                 | бактер<br>ии:<br>кокки<br>1:3;<br>2*10 <sup>6</sup>                 | роста<br>нет                                                      | бактер<br>ии:<br>кокки<br>1:5;<br>2*10 <sup>8</sup>               | бактер<br>ии:<br>кокки<br>1:4;<br>1*10 <sup>8</sup>               | более<br>10 <sup>9</sup>                                       | бактерии<br>: кокки<br>1:6;<br>3*10 <sup>8</sup>               |
| кеф. Грибки                                | роста<br>нет                                       | кокки<br>1*10 <sup>5</sup>                        | бактер<br>ии:кок<br>ки:<br>дрожж<br>и 1:3:2;<br>2*10 <sup>8</sup> | бактер<br>ии:кок<br>ки:<br>дрожж<br>и 1:1:4;<br>1,8*10 <sup>8</sup> | бактер<br>ии:кок<br>ки:<br>дрожж<br>и 1:2:4;<br>3,6*10 <sup>7</sup> | бактер<br>ии:кок<br>ки:<br>дрожж<br>и 0:1:4;<br>9*10 <sup>6</sup> | бактер<br>ии:кок<br>ки:<br>дрожж<br>и 1:1:4;<br>1*10 <sup>8</sup> | бактер<br>ии:кок<br>ки:<br>дрожж<br>и 1:2:3;<br>7*10 <sup>8</sup> | бактери<br>и:кокки:<br>дрожжи<br>1:2:4;<br>2,6*10 <sup>8</sup> | бактерии<br>:кокки:<br>дрожжи<br>1:1:4;<br>2,0*10 <sup>8</sup> |
| термоф. Стр.                               | роста<br>нет                                       | роста<br>нет                                      | 3*10 <sup>8</sup>                                                 | 1,5*10 <sup>8</sup>                                                 | роста<br>нет                                                        | роста<br>нет                                                      | 1*10 <sup>8</sup>                                                 | 1,3*10 <sup>7</sup>                                               | 4,5*10 <sup>8</sup>                                            | 3,8*10 <sup>8</sup>                                            |
| ацидоф. Пал.                               | Роста<br>нет                                       | роста<br>нет                                      | 4*10 <sup>8</sup>                                                 | 3*10 <sup>8</sup>                                                   | роста<br>нет                                                        | роста<br>нет                                                      | 3,4*10 <sup>7</sup>                                               | 1,6*10 <sup>7</sup>                                               | 4*10 <sup>8</sup>                                              | 2,4*10 <sup>8</sup>                                            |

Как видно из данных, представленных в таблице 4.1., при культивировании при различных температурах и сроках хранения в естественных питательных средах (сыре творожном пастеризованном) 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 (для мелких сыров, бифилакт Д, комбинированная).

#### **4.2.2. Определение взаимодействия между бифидумбактериями и дрожжами в искусственных питательных средах**

Дальнейшие исследования проводили, высевая продукт в соответствующем разведении на искусственных питательных средах.

Результаты определения характера взаимодействия между бифидумбактериями и дрожжами в искусственных питательных средах представлены в таблице 4.2. Микроорганизмы вносились в количественном отношении 1:1 (по 1000000 микробных клеток в 1 мл просеивного материала).

Таблица 4.2. Характер взаимодействия между бифидумбактериями и дрожжами (n=3).

| Культура микроорганизмов | Количественные показатели при хранении: |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|--------------------------|-----------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                          | (4±2)°C                                 |                     |                     | (20±2)°C            |                     |                     | (37±1)°C            |                     |                     |
|                          | 1 сут                                   | 3 сут               | 7 сут               | 1 сут               | 3 сут               | 7 сут               | 1 сут               | 3 сут               | 7 сут               |
| Бифидум-бактерии         | 1,3х10 <sup>7</sup>                     | 1,5х10 <sup>7</sup> | 1,1х10 <sup>7</sup> | 1,9х10 <sup>7</sup> | 2,4х10 <sup>7</sup> | 2,6х10 <sup>7</sup> | 2,8х10 <sup>7</sup> | 2,9х10 <sup>7</sup> | 3,4х10 <sup>7</sup> |
| Дрожжи                   | 2,4х10 <sup>7</sup>                     | 2,9х10 <sup>7</sup> | 3,6х10 <sup>7</sup> | 2,2х10 <sup>7</sup> | 2,0х10 <sup>7</sup> | 1,7х10 <sup>7</sup> | 1,6х10 <sup>7</sup> | 1,3х10 <sup>7</sup> | 1,2х10 <sup>7</sup> |

Как видно из данных, представленных в таблице 4.2., 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.

#### 4.2.3. Определение взаимодействия между дрожжами и молочнокислыми стрептококками в искусственных питательных средах

Результаты определения характера взаимодействия между молочнокислыми стрептококками и дрожжами в искусственных питательных средах представлены в таблице 4.3. Микроорганизмы вносились в количественном отношении 1:1 (по 1000000 микробных клеток в 1 мл просеивного материала).

Таблица 4.3. Характер взаимодействия между молочнокислыми стрептококками и дрожжами (n=3).

| Культура | Количественные показатели при хранении: |          |          |
|----------|-----------------------------------------|----------|----------|
|          | (4±2)°C                                 | (20±2)°C | (37±1)°C |

| <b>микроорга-<br/>низмов</b>      | 1 сут                   | 3 сут                   | 7 сут                   | 1 сут                   | 3 сут                   | 7 сут                   | 1 сут                   | 3<br>сут                | 7 сут                   |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Молочно-<br>кислый<br>стрептококк | 1,8х1<br>0 <sup>7</sup> | 1,4х1<br>0 <sup>7</sup> | 1,0х1<br>0 <sup>7</sup> | 1,7х1<br>0 <sup>7</sup> | 2,6х1<br>0 <sup>7</sup> | 3,4х1<br>0 <sup>7</sup> | 2,4х1<br>0 <sup>7</sup> | 2,8х<br>10 <sup>7</sup> | 3,7х<br>10 <sup>7</sup> |
| Дрожжи                            | 2,0х1<br>0 <sup>7</sup> | 2,4х1<br>0 <sup>7</sup> | 3,1х1<br>0 <sup>7</sup> | 2,4х1<br>0 <sup>7</sup> | 1,8х1<br>0 <sup>7</sup> | 1,5х1<br>0 <sup>7</sup> | 1,5х1<br>0 <sup>7</sup> | 1,2х<br>10 <sup>7</sup> | 0,9х<br>10 <sup>7</sup> |

Как видно из данных, представленных в таблице 4.3., симбиоз между молочнокислыми стрептококками и дрожжами находится в той же зависимости, что и между бифидумбактериями и дрожжами.

#### 4.2.4. Определение взаимодействия между дрожжами и термофильными стрептококками в искусственных питательных средах

Результаты определения характера взаимодействия между термофильными стрептококками и дрожжами в искусственных питательных средах представлены в таблице 4.4. Микроорганизмы вносились в количественном отношении 1:1 (по 1000000 микробных клеток в 1 мл просеивного материала).

Таблица 4.4. Характер взаимодействия между термофильными стрептококками и дрожжами (n=3).

| <b>Культура<br/>микроорга-<br/>низмов</b> | <b>Количественные показатели при хранении:</b> |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                           | <b>(4±2)°C</b>                                 |                         |                         | <b>(20±2)°C</b>         |                         |                         | <b>(37±1)°C</b>         |                         |                         |
|                                           | 1 сут                                          | 3 сут                   | 7 сут                   | 1 сут                   | 3 сут                   | 7 сут                   | 1 сут                   | 3<br>сут                | 7 сут                   |
| Термофиль-<br>ный<br>стрептококк          | Рос-<br>та<br>нет                              | Рос-<br>та<br>нет       | Рос-<br>та<br>нет       | 1,6х1<br>0 <sup>3</sup> | 2,1х1<br>0 <sup>3</sup> | 2,9х1<br>0 <sup>3</sup> | 1,6х1<br>0 <sup>7</sup> | 2,2х<br>10 <sup>7</sup> | 2,8х<br>10 <sup>7</sup> |
| Дрожжи                                    | 3,6х1<br>0 <sup>7</sup>                        | 4,2х1<br>0 <sup>7</sup> | 4,4х1<br>0 <sup>7</sup> | 2,1х1<br>0 <sup>7</sup> | 2,2х1<br>0 <sup>7</sup> | 2,0х1<br>0 <sup>7</sup> | 1,7х1<br>0 <sup>7</sup> | 0,9х<br>10 <sup>7</sup> | 0,6х<br>10 <sup>7</sup> |

Как видно из данных, представленных в таблице 4.4., 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.

#### 4.2.5. Определение взаимодействия между собой бифидумбактерий, молочнокислых и термофильных стрептококков и дрожжей в искусственных питательных средах

Результаты определения характера взаимодействия между бифидумбактериями, молочнокислыми и термофильными стрептококками и дрожжами в искусственных питательных средах представлены в таблице 4.5. Микроорганизмы вносились в количественном отношении 1:1 (по 1000000 микробных клеток в 1 мл просеивного материала).

Таблица 4.5. Характер взаимодействия между компонентами молочнокислой закваски (n=3).

| Культура микроорганизмов   | Количественные показатели при хранении: |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|----------------------------|-----------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                            | (4±2)°C                                 |                     |                     | (20±2)°C            |                     |                     | (37±1)°C            |                     |                     |
|                            | 1 сут                                   | 3 сут               | 7 сут               | 1 сут               | 3 сут               | 7 сут               | 1 сут               | 3 сут               | 7 сут               |
| Бифидум-бактерии           | 1,4x10 <sup>7</sup>                     | 1,1x10 <sup>7</sup> | 0,6x10 <sup>7</sup> | 2,1x10 <sup>7</sup> | 2,0x10 <sup>7</sup> | 2,0x10 <sup>7</sup> | 2,7x10 <sup>7</sup> | 2,5x10 <sup>7</sup> | 2,0x10 <sup>7</sup> |
| Молочно-кислый стрептококк | 2,2x10 <sup>7</sup>                     | 2,0x10 <sup>7</sup> | 2,0x10 <sup>7</sup> | 2,3x10 <sup>7</sup> | 2,7x10 <sup>7</sup> | 3,2x10 <sup>7</sup> | 2,4x10 <sup>7</sup> | 2,1x10 <sup>7</sup> | 1,6x10 <sup>7</sup> |
| Термофильный стрептококк   | Роста нет                               | Роста нет           | Роста нет           | 1,6x10 <sup>3</sup> | 1,8x10 <sup>3</sup> | 1,9x10 <sup>3</sup> | 1,8x10 <sup>7</sup> | 2,5x10 <sup>7</sup> | 3,3x10 <sup>7</sup> |
| Дрожжи                     | 1,2x10 <sup>7</sup>                     | 1,7x10 <sup>7</sup> | 2,2x10 <sup>7</sup> | 2,1x10 <sup>7</sup> | 2,2x10 <sup>7</sup> | 2,0x10 <sup>7</sup> | 1,7x10 <sup>7</sup> | 0,9x10 <sup>7</sup> | 0,6x10 <sup>7</sup> |

Как видно из данных, представленных в таблице 4.5., 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.

#### **4.2.6 Использование питательных сред из непищевого сырья для микробиологических целей**

В диагностике, профилактике и лечении большинства инфекционных заболеваний у людей и животных используют множество медицинских и ветеринарных иммунобиологических препаратов. К ним относятся диагностические препараты (бактериофаги, диагностикумы, иммунные сыворотки), лечебно-профилактические средства (вакцины, анатоксины, иммуноглобулины, бактериофаги).

Для производства этих препаратов в большинстве случаев используют питательные среды, основным ингредиентом которых служит белок чаще животного происхождения. В масштабах Казахстана на эти цели тратятся многие тонны мяса крупного рогатого скота.

Для замены дефицитного пищевого продукта – мяса сельскохозяйственных животных многими исследователями предлагалось применять отходы мясной, рыбной промышленности, растительное сырьё и т.д.

В лаборатории микробиологии и биотехнологии Инновационного Евразийского Университета были проведены исследования по получению питательных основ и сред из непищевого белкового сырья, а именно был использован мясокостный фарш тушек плотоядных зверей (собак) после снятия с них шкурок. Эти продукты не имеют пищевой ценности и их использование для биотехнологических целей позволило бы наладить безотходное экологически чистое производство.

На средах выращивали *Escherichia coli* K 802 pk NE 102 - продуцент эндоглюканазы. В качестве контроля использовали обычный мясо-пептонный агар.

Все образцы экспериментальных питательных основ, приготовленных из непищевого белкового сырья, по выходу конечного продукта принципиально не уступали контрольной среде, и после соответствующей доработки технологии могут быть использованы для конструирования питательных сред, используемых в биотехнологии.

Анализ результатов опыта показал, что замена белковых компонентов среды МПА на экстракт белков плотоядных животных привела к приросту биомассы кишечной палочки от 44 до 85%.

Кроме того, были проведены опыты по изучению ростовых характеристик различных микроорганизмов, применяемых в ветеринарной практике для производства биопрепаратов, а также с целью возможного применения питательных сред на основе непищевого белка в качестве диагностических – для выделения и идентификации бактерий. С этой целью были проведены эксперименты по культивированию музейных штаммов и клинических изолятов на плотной питательной среде, на основе гидролизата мяса плотоядных зверей.

Из анализа полученных данных следует, что в плотной питательной среде из гидролизата мяса плотоядных зверей в аналогичных условиях по сравнению с мясопептонным агаром увеличился выход биомассы кишечной палочки, сальмонеллы, пастереллы, сенной палочки.

На следующем этапе была оценена возможность использования гидролизатов из непищевого сырья для выращивания лактобактерий, применяемых в ветеринарии и в медицине. Следует отметить, что по питательным потребностям молочнокислые бактерии относятся к требовательным микроорганизмам. Из углеводов они могут использовать лишь моно- и дисахара, нуждаются в сложных органических соединениях азота, аминокислотах и витаминах. Для выделения и культивирования этих бактерий из жидких питательных сред чаще всего применяют среду МРС – 1, которая имеет достаточно сложный состав, куда входят дефицитные компоненты.

В этих экспериментах были использованы ту же питательную среду, в которой выращивали *L. plantarum* и *L. buchneri*.

Анализ результатов эксперимента показал, что проведённая замена питательной среды дала неравнозначные результаты. Наиболее выраженное увеличение концентрации живых клеток было отмечено у *L. plantarum*.

В дальнейшем была оценена возможность замены пищевых и дефицитных компонентов в прописи жидкой среды МРС–1 на ФГ мяса плотоядных зверей при выращивании молочнокислых бактерий. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование ФГ мяса пушных зверей в качестве белковой основы позволяет исключить из прописи среды МРС-1 пептон и экстракт печени. При этом ростовые свойства опытных жидких питательных сред остаются на уровне контрольной среды.

Одновременно в опытах было установлено, что для конструирования плотных питательных сред неэффективно использовать в качестве наполнителя желатин, в связи с его низкой температурой плавления.

На основании проведённых экспериментов можно сделать вывод о возможности конструирования питательных сред путём замены пищевых

дефицитных продуктов на непищевые белковые субстраты с целью их использования в микробиологии и биотехнологии.

#### 4.3. Обсуждение

В результате проведённых исследований было установлено, что при культивировании при различных температурах и сроках хранения в естественных питательных средах (сыре творожном пастеризованном) 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 (для мелких сыров, бифилакт Д, комбинированная).

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.

## 5. ВЫВОДЫ

На основании проведённых исследований можно сделать следующие выводы:

1. При культивировании при различных температурах и сроках хранения в естественных 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.

## **6. 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, а также учитывать данные о культуральных характеристиках компонентов закваски.

## 6. Список использованной литературы

1. Есеналинова Б.С., Исакова Б.Б., Смагулова З.Т., Шайхина А.В., Сергазина М.А., Мукажанова З.М. Медико-биологические создания продуктов для геродиетического питания на молочной основе. Пищевая пром-ть. Казахстана. 2006.-№1. 29с.
2. Курмангалиев С.Г. Некоторые направления комплексного подхода в развитии молочного кластера Казахстана. Пищевая пром-ть. Казахстана. 2006.-№3.
3. Полищук П.К., Дербинова Э.С., Казанцева Н.Н. Микробиология молока и молочных продуктов. М.: Пищевая пром-ть. 1978, с. 71-78.
4. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов. М.: Легк.и пищ.пром., с. 168-175.
5. Грачева И.М., Гаврилова Н.Н., Иванова Л.А. Техническая микробиология белковых препаратов, аминокислот и жиров. –М.: Пищевая пром-ть.1980.-448с
6. 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.
7. Майоров А.А. Разработка методов управления биосистемой сыра с целью совершенствования традиционных и создания новых технологий. //Автореф.дисс...докт.техн.наук-Кемерово.-1999.-61с.
8. Королева Н.С. Техническая микробиология цельномолочных продуктов.-М.: Пищевая пром-ть, 1975.-270с.

9. Королева Н.С., Кондратенко М.С. Симбиотические закваски термофильных бактерий в производстве кисломолочных продуктов.-М.: Пищевая промышленность; София.:Техника.-1978.- 168с.
10. Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Санитарная микробиология молока и молочных продуктов.- М.: Пищевая пром-ть. 1980.-256с.
11. Скородумова А.М. Дрожжи молока и молочных продуктов и их производственное значение.-М.: Пищевая пром-ть. 1969.-117с.
12. Fooks L.J., Fuller R., Gibson G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. // Inter.Dairy J.-1999.-v.9.-№1.-p.59-61.
13. Борисова Г.В. Использование бифидобактерий в производстве творога. // Известия ВУЗов. Пищевая технология.-№3.-с.61-63.
14. Collins M.D., Glenn R.G. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. //American J.Clinical Nutrition.-1999.-69(suppl.):1052 s-7s.
15. Брусиловский Л.П., Банникова Л.А., Вайнберг И.А. Управление процессами культивирования микроорганизмов заквасок и кисломолочных продуктов. М.: Легкая и Пищ. Пром-ть, 1982. 128с.
16. Висетур У. Э., Кристапсон М.Ж. Культивирование микроорганизмов. М.: Пищ. Пром-ть, 1980. 230с.
17. Королева Н.С. Техническая микробиология кисломолочных продуктов. М.: Пищ. Пром, 1966. С. 79-94.
18. Angeles A.G., Marth E.H. Journal of Milk and Food Technology. 1971. P. 34-52.
19. Macleod A., Fedio W.M., Ozimek L. Milchwissenschaft. 1995. P. 50-55.
20. Cilano L., Lion M., bossi M.G. Microbiology, Aliments, Nutrition. 1991. P. 9-24.
21. Коршунов В.М., Сеница Н.А., Гиноман Г.А. //Журн. Микробиол. - 1985. - №9. - 20-25.
22. Chandan R.C., Shahani K.M. In Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed. 1995. P. 385-418
23. Шаманова Г.П. Микробиологические и технологические подходы к производству ферментированных продуктов. //Молочная пром-ть.-1998,№3, с.85-87.
24. 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.

25. Сундукова М.Б., Семенихина В.Ф., Ганина В.И. Антибиотические свойства бифидобактерий. // Молочная пром-сть.-1985.№8.-с.36-38.
26. Квасников Е.И. Место и значение молочнокислых бактерий в биосфере. Микробиол. Журнал, 1992, т. 54, № 5. С. 3-10.
27. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: Наука, 1975. С. 23, 290-359.
28. Залашко М.В., Анисимова Н.И., Борткевич Л.Г. Антимикробные и иммуномоделирующие свойства *Lactobacillus acidophilus* Ke-10 // Прикладная биохимия и микробиология, 1997, т. 33, №3. С. 305-309.
29. Стоянова Л.Г., Аркадьева З.А. Сравнение способов хранения молочнокислых бактерий // Микробиология, 2000, т. 69, № 1. С. 98-104.
30. Инихов Г.С., Брио Н.П. Методы анализа молока и молочных продуктов. М.: Пищ. Пром-ть, 1971. С. 234-240.
31. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Изд-во МГУ, 1994. С. 199-201.
32. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. М.: Пищ. Пром-сть, 1975. С. 143.
33. Гончарова Г.И., Семёнова Л.П., Лянная А.М. и др. // Сб. тезисов докладов I Всесоюзного съезда микробиологов и эпидимиологов. - М., 1985. - С. 196-199.
34. Козлова Е.П., Семёнова Л.П., Гончарова Г.И. и др. //Педиатрия. - 1977. - №2. - С. 43-49.
35. Коршунов В.М., Пинегин Б.В., Иванова Н.П. и др. //Журн. Микробиол. - 1983. - №5. - С. 28-32.
36. Коршунов В.М., Синица Н.А., Гиноман Г.А. //Журн. Микробиол. - 1985. - №9. - 20-25.
37. Субботина М.Д., Тимченко В.Н., Мартынкин А.С. Орлова В.А. и др. Дисбактериоз кишечника у детей и микрoэкологические подходы к его коррекции. Метод. рекомендации - С.-Петб., 1997.
38. Недогода С.В., Смоленов И.В. Профилактика и лечение дисбактериоза у детей и взрослых: Метод. Рекомендации. - Волгоград, 1997.
39. Gibson G.R. et. al. //Gastroenterology. - 1995. - №108. - P. 975-982
40. Hentges D.J. / Health and Disease. - Academic Press, New York, 1983.
41. Hughes V.L., Hillier S.L.//Obstet. Gynecol. - 1990. - °75. - P. 244-248.
42. Shahani K.M., Friend B.A. // J. Appl. Nutr. - 1984.- °36. - P. 125-152.

