

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

ИННОВАЦИОННЫЙ ЕВРАЗИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

**ФАКУЛЬТЕТ МАГИСТЕРСКОГО И
ВТОРОГО ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ**

КАФЕДРА «ПРИКЛАДНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ»

УДК 637.146

На правах рукописи

ПЛАХОВА ВАЛЕРИЯ МИХАЙЛОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КИСЛОМОЛОЧНЫХ
БАКТЕРИЙ НА КОМБИНИРОВАННОЙ МОЛОЧНОЙ СРЕДЕ С
ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ**

Специальность 6N0701 – Биотехнология

Диссертация на соискание академической степени
магистра биотехнологии

Научный руководитель:

кандидат технических наук, профессор

В.А. Овсянникова

Павлодар 2010

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	9
Глава 1. СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЙ	
1.1 Молочные продукты как один из важнейших факторов обеспечения рациональной структуры питания.....	12
1.2 Функциональные продукты как основа рационального питания.....	15
1.3 Пробиотики, пребиотики и их функциональные свойства.....	20
1.4 Обогащение кисломолочных продуктов функциональными ингредиентами.....	24
Глава 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	
2.1 Объекты исследований.....	32
2.1.1 Бифидобактерии.....	32
2.1.2 Пропионовокислые бактерии.....	36
2.1.3 Расторопша.....	40
2.1.4 Спорыш.....	41
2.2 Схема эксперимента.....	44
2.3 Методы исследований культивирования бифидобактерий и пропионовокислых бактерий на молочной среде с добавлением растительных компонентов.....	45
2.3.1 Методы культивирования микроорганизмов.....	45
2.3.2 Методы идентификации микроорганизмов.....	47
2.4 Экспериментальные исследования.....	57
2.4 Результаты исследований.....	60

3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С ПРОБИОТИКО-ПРЕБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

3.1 Рецепт функционального кисломолочного продукта с растительными компонентами.....	68
3.2 Технологическая инструкция.....	71
3.3 Пищевая и биологическая ценность нового продукта.....	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	78
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	80

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Комплексный подход к оценке питания населения страны позволяет качественно и количественно оценить состояние питания различных групп населения, а также степень дефицита пищевых веществ среди различных групп населения. Наблюдается уменьшение потребления мясных и молочных продуктов, что приводит к снижению содержания белка. Одновременно происходит уменьшение потребления овощей и фруктов - важнейших источников аскорбиновой кислоты, каротиноидов и других эссенциальных микронутриентов и биологически активных веществ, а также пищевых волокон. Все это свидетельствует об ухудшении структуры питания населения страны.

При продолжающемся снижении объемов производства остаются актуальными задачи рационального использования молочного сырья, в том числе вторичного, поиска новых нетрадиционных источников пищевого сырья и создание широкой гаммы функциональных продуктов, обогащенных функциональными ингредиентами.

Функциональное питание – это часть ежедневного рациона человека или определенный продукт, который снижает риск какого-либо заболевания и благоприятно влияет на здоровье человека. Необходимость в функциональном питании возникла в силу целого ряда причин. Новую угрозу здоровью человека несет изменение образа жизни и пищевых привычек: повышенное потребление рафинированных продуктов, соли, насыщенных жиров, снижение в рационе количества фруктов, овощей, пищевых волокон и некоторых минералов, широкое использование антибиотиков в животноводстве. Кроме того, в последние десятилетия появились новые, так называемые эмерджентные инфекции (ВИЧ, лихорадка Эбола), увеличился риск развития внутрибольничных инфекций у пациентов соматических стационаров, поэтому и дети, и взрослые нуждаются в дополнительной профилактике и защите.

Функциональное питание включает:

- компоненты обычного рациона, содержащие естественные биологически активные ингредиенты (например, пищевые волокна);
- специально обогащенные биологически активные ингредиенты (пробиотики, антиоксиданты);
- синтезированные ингредиенты, введенные в продукты питания (пребиотики);
- все кисломолочные продукты.

С медико-биологической точки зрения для обогащения следует использовать те эссенциальные нутриенты, дефицит которых имеет место, достаточно широко распространен и безопасен для здоровья (витамин С, фолиевая кислота, кальций, белок, пищевые волокна, антиоксиданты, полифенолы, флавоноиды). Обогащать нутриентами следует продукты массового потребления, доступные для всех групп населения и регулярно

используемые в повседневном питании. Поэтому повышение функциональной эффективности традиционных кисломолочных продуктов наиболее целесообразно.

Таким образом, создание пищевых продуктов, в частности пробиотических кисломолочных продуктов, с направленным биологическим действием за счет пищевых добавок является актуальным направлением. Необходим поиск новых источников питания, в том числе за счет растениеводства и овощеводства. Интродукция новых нетрадиционных культур позволит расширить их ассортимент и сделать питание населения более полноценным и разнообразным за счет освоения новых видов этих культур. А использование нетрадиционного растительного сырья, содержащего полноценные комплексы питательных веществ, при производстве кисломолочных продуктов, возможно, позволит получать продукты с новыми потребительскими свойствами и увеличенным сроком годности.

В связи с вышеизложенным, научно-исследовательская работа, посвященная научному обоснованию и разработке технологии комбинированного молочного продукта с синбиотическим составом, является актуальной и своевременной.

В настоящей работе предложены результаты исследования комбинированной закваски на основе симбиоза бифидобактерий и пропионовокислых и технология разработки комбинированного кисломолочного продукта функционального назначения с применением растительного компонента расторопши, который содержит в своем составе большое количество аминокислот, витаминов и микроэлементов, что положительно отразится на работе печени, ЖКТ и всего организма человека.

Целью магистерской диссертации является разработка нового функционального кисломолочного продукта с растительными компонентами расторопши и спорыша.

Задачи магистерской диссертации:

1. изучить особенности микроорганизмов *Propionibacterium shermanii* и *Bifidobacterium bifidum*;
2. изучить свойства и химический состав растительных компонентов;
3. ознакомиться с методами культивирования, выделения чистой культуры, окраски и микроскопирования микроорганизмов;
4. изучить специфику роста исследуемых микроорганизмов при совместном культивировании на молочных питательных средах;
5. изучить особенности влияния растительных компонентов на свойства продукта.

Научная новизна работы. Установлены количественные и качественные закономерности взаимного влияния биологически активных компонентов растительного экстракта и молочной основы на

органолептические, физико-химические, микробиологические и реологические показатели готового продукта.

Научно обоснована возможность применения в качестве антиоксидантной и пребиотической добавки вытяжки из порошка расторопши и спорыша в производстве функциональных кисломолочных продуктов.

Практическая значимость работы. Результаты экспериментальных исследований явились научной основой для разработки технологии производства пробиотического кисломолочного продукта с добавлением порошка расторопши и спорыша.

ГЛАВА 1. СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЙ

1.1 Молочные продукты как один из важнейших факторов обеспечения рациональной структуры питания

Существует ряд пищевых продуктов, используемых в диетическом питании. Среди них большое место отводится молоку и молочным продуктам, особенно кисломолочным. Высокая питательная ценность молока обусловлена оптимальным содержанием в нем необходимых для питания человека белков, жиров, углеводов, минеральных веществ (Ca, P, K, Na, Mg, S) и витаминов в таком соотношении, при котором они хорошо используются организмом. Известно, что из всех форм кальция, содержащегося в пищевых продуктах, лучше всего усваивается кальций, находящийся в молоке.

Из составных частей молока первое место по значению в питании занимают белки. Коллоидное состояние белков определяет их легкую доступность и перевариваемость протеолитическими ферментами.

По данным Аллисона, перевариваемость казеина составляет 95%, сывороточных белков – 97%. Аминокислотный скор женского молока близок к 100%, коровьего молока – 95%. Белки коровьего молока особенно богаты лизином и треонином, лимитирующими являются серосодержащие — метионин и цистин.

Усвояемость молочного жира составляет 95%, в то время как усвояемость жира мяса - лишь 90%. Молочный жир содержит все жизненно важные жирные кислоты. Особенно ценно наличие в молочном жире полиненасыщенных жирных кислот (линолевой, линоленовой, арахидоновой), участвующих во внутриклеточном обмене, являющихся обязательным компонентом нервных клеток, регулирующих уровень холестерина в крови, повышающих эластичность сосудов. Причем линолевая и линоленовая относятся к числу незаменимых, не синтезирующихся в организме. Кроме того, в молочном жире содержатся витамины и жирорастворимые липоиды (лецитин). Во многих случаях потребность в витаминах А и Д покрывается за счет их содержания в молочном жире.

В молоке содержатся и углеводные компоненты, из которых 90% приходится на долю лактозы - источника энергии. Разлагаясь в кишечнике до молочной кислоты, лактоза способствует жизнедеятельности микрофлоры, тормозящей развитие гнилостных процессов.

Русским микробиологом И.И. Мечниковым почти сто лет назад была выдвинута концепция оздоровления человека и предупреждения старения организма путем включения в рацион кисломолочных продуктов, в первую очередь йогурта. По его мнению, продолжительность жизни людей может существенно возрасть при элиминации из кишечника с помощью антагонистически активных молочнокислых микроорганизмов гнилостной микрофлоры и прекращения всасывания в кровь ее токсичных метаболитов.

Известно, что рациональное питание предусматривает наилучшие количественные и качественные взаимосвязи основных пищевых веществ: белков, углеводов, жиров, витаминов и минеральных веществ [1].

Хронические заболевания, возникновение которых тесно связано с нарушением питания подразделяются на две группы: обусловленные недостатком продуктов питания и избыточным потреблением определенных пищевых веществ.

Характеристика питания сегодня, касающаяся практически всего населения – это избыточное потребление животных жиров, приводящее к появлению избыточной массы тела и ожирения — 55% взрослого населения старше 30 лет, а также дефицит полиненасыщенных жирных кислот.

Оба этих фактора способствуют развитию атеросклероза и таких заболеваний, как ишемическая болезнь сердца, инфаркты миокарда, гипертоническая болезнь, инсульты. Это важнейшая причина ранней и высокой смертности населения [2].

Последние пять лет возникла проблема дефицита полноценных животных белков, и микронутриентов (витамины, минеральные вещества, микроэлементы). Дефицит витамина С примерно у 80%, а в некоторых случаях 100% населения имеет независимо от уровня доходов. Дефицит кальция, связанный с резким (в 2 раза за последние шесть лет) уменьшением потребления молока и молочных продуктов. Дефицит железа и железодефицитной анемии вырос в связи с уменьшением потребления мяса и мясопродуктов. Наблюдается недостаток витаминов группы В.

Широко распространены патологические состояния, связанные с обильным питанием: избытком жиров, свободных сахаров и недостатком продуктов, содержащих сложные углеводы и полиненасыщенные жирные кислоты. Так, в возникновении сердечно-сосудистых заболеваний, важную роль играет избыточное потребление насыщенных жиров и недостаток полиненасыщенных жирных кислот.

Специалисты-экологи считают, что жизнь современного человека характеризуется нарастающим влиянием техногенных факторов. К ним относятся вещества химической природы (токсические вещества неорганической и органической природы, поступающие с пищей и водой, а также с вдыхаемым воздухом и т.д.), различные физические факторы (радиоактивное излучение, волновые воздействия и другие), а также биологической природы (микотоксины, экзотоксины и другие БАВ). Неблагоприятное воздействие экологических факторов на организм человека и животных, характеризует такой показатель, как продолжительность жизни, а также частота врожденных и приобретенных патологий, включая энзимопатии и иммунодефициты.

ФАО и ВОЗ рекомендуют увеличение потребности человека в белке на 15%, исходя из возможных средовых и стрессовых факторов.

Выявленные изменения в характере питания населения способствуют снижению умственной и физической работоспособности и резистентности организма к неблагоприятным факторам. Кроме того, резко снизилось

производство продуктов питания профилактической и лечебной направленности. Повысить адаптивные возможности организма и перевести его из состояния маладаптации в состояние здоровья способно полноценное оптимальное питание.

Известно, что сбалансированная диета должна содержать ограниченное количество жиров. Поэтому важно правильно выбрать их источник. Обычно в питании современного человека, несмотря на высокое общее потребление жиров, не хватает незаменимых жирных кислот. Ненасыщенные жирные кислоты проявляют антибиотическое действие на кислотоустойчивые бактерии. По-видимому, это действие основано на понижении ими жизнедеятельности микроорганизмов.

Для жизнедеятельности человеческого организма важное значение имеют ацилглицерины жиров, содержащие линолевую, линоленовую и арахидоновую жирные кислоты. Эти кислоты называют витамином F, или эссенциальными кислотами, т.е. существенно необходимыми для жизнедеятельности животных организмов [3].

Эссенциальные кислоты играют большую роль в обмене стеролов. При отсутствии или недостатке их в организме человека холестерол образует с насыщенными жирными кислотами сложные эфиры, практически не окисляющиеся при обмене веществ, накапливающиеся в крови и откладывающиеся на стенках артерий. Находясь в достаточном количестве эссенциальные жирные кислоты образуют сложные эфиры с холестеролом, легко окисляющиеся при обмене веществ до низкомолекулярных веществ, легко выводящихся из организма [4].

Исследования отечественных и зарубежных ученых показывают, что полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) необходимы для роста клеток, нормального состояния кожи, обмена холестерина. Установлена стимулирующая роль ПНЖК в отношении защитных механизмов организма, в частности, повышении его устойчивости к инфекционным заболеваниям.

По данным диетологов, сбалансированными могут считаться жиры, содержащие в своем составе: 30% насыщенных кислот, 50–60% мононенасыщенных, 10 – 20 полиненасыщенных жирных кислот. Для людей пожилого возраста и больных сердечно-сосудистыми заболеваниями содержание линолевой кислоты должно составлять около 40%, соотношение полиненасыщенных и насыщенных кислот приближаться к 2 : 1, соотношение линолевой и линоленовой кислот – 10 : 1.

В решении проблемы рационального питания одним из важнейших направлений является повышение биологической ценности молочных продуктов. Известно, что благодаря наличию молочной кислоты, кисломолочные продукты обладают не только высокой пищевой ценностью, но и диетическими свойствами.

Однако, кисломолочные продукты, даже высококачественные, в процессе хранения теряют свои первоначальные свойства, их консистенция и вкус ухудшаются довольно быстро. Причиной их быстрой порчи является развитие нежелательной микрофлоры, появляющейся в продукте в процессе

его производства и хранения. Добившись уничтожения всех нежелательных микроорганизмов или приостановив каким-либо образом процесс брожения, можно получить кисломолочные продукты, выдерживающие более длительный срок хранения [5].

Существующие в настоящее время различные способы сохранности кисломолочных продуктов, в частности, изготовление продуктов в асептических условиях, в среде инертных газов, применение тепловых режимов обработки (сушка), использование консервантов, не нашли широкого применения из-за дороговизны аппаратного оформления технологических процессов или из-за неприемлемости применения в молочных продуктах химических консервантов [1].

1.2 Функциональные продукты как основа сбалансированного питания

Функциональные продукты питания — это именно продукты питания, еда (а не БАДы, порошки, таблетки) натурального или искусственного происхождения, обладающие приятным вкусом и выраженным оздоровительным эффектом для человека, удобные в использовании, предназначенные для каждодневного систематического применения и прошедшие длительные клинические испытания, имеющие подтвержденную медицинскую документацию.

Концепция позитивного (здорового, функционального) питания впервые сформулирована в Японии в начале 80-х годов прошлого столетия, где приобрели большую популярность так называемые функциональные пищевые продукты. Под этим термином подразумевают продукты, предназначенные для систематического употребления в составе пищевых рационов всеми возрастными группами населения, снижающие риск развития заболеваний, связанных с питанием, сохраняющие и улучшающие здоровье за счет наличия в его составе физиологически функциональных пищевых ингредиентов.

Первым продуктом функционального назначения можно назвать ферментированный кисломолочный продукт на основе лактобацилл, появившийся в Японии в 1955 г.

Японские исследователи выделили три условия, определяющие функциональную пищу:

- это пища (а не капсула, таблетка или порошок), приготовленная из природных натуральных ингредиентов;
- ее можно и нужно употреблять в составе ежедневного рациона;
- при употреблении она обладает определенным действием, регулирующим определенные процессы в организме, например, усиление механизма биологической защиты, предупреждение определенного заболевания, контроль физического и душевного состояния, замедление процесса старения.

Эта группа получила название FOUSHU – Foods for specifid helth use. Требования к входящим в нее продуктам (в т.ч. с бифидобактериями, кальцием и соевыми белками) были определены национальным стандартом, введенным в 1991 г.

Вскоре в связи с усиливающимся интересом в ЕС была образована Европейская комиссия для действий в рамках «науки о функциональной пище» в Европе (FUFOSE). Задачей этой комиссии была разработка и утверждение научно обоснованного подхода к действиям, необходимым для поддержки развития производства пищевых продуктов, которые могут оказывать лечебное воздействие на определенные физиологические функции, а также могут улучшить здоровье и самочувствие и/или снизить риск заболеваний.

Д. Поттер выделил семь основных видов функциональных ингредиентов, придающих продуктам позитивного питания функциональные свойства:

1. пищевые волокна (растворимые и нерастворимые);
2. витамины (А, группа В, D и т.д.);
3. минеральные вещества (такие, как кальций, железо);
4. полиненасыщенные жиры (растительные масла, рыбий жир, омега-3-жирные кислоты);
5. антиоксиданты: бета-каротин и витамины (аскорбиновая кислота – витамин С и альфа-токоферол – витамин Е);
6. олигосахариды (как субстрат для полезных бактерий);
7. группа, включающая микроэлементы, лактобактерии, бифидобактерии – пробиотики.

В последнее время этот список заметно расширился. На европейской конференции по технологии нутрицевтиков только в качестве ингредиентов для производства продуктов функционального питания выделено уже 54 позиции, в том числе молочнокислые бактерии и различные закваски, а собственно категорий функционального питания – 20, в т.ч. молочные продукты.

Место позитивного питания исследователи определяют, как среднее между обычным рационом и питанием диетическим. Помимо потребительских свойств функциональные продукты обладают свойствами физиологического воздействия, основными видами которого признаны: позитивное воздействие на метаболизм различных субстратов (сохранение энергетического баланса, поддержание массы тела, уровень глюкозы, инсулина и др.); защита против соединений, обладающих оксидантной активностью; позитивное воздействие на сердечно-сосудистую систему; физиологию желудочно-кишечного тракта; состояние кишечной микрофлоры; состояние иммунной системы.

В настоящее время во всех развитых странах мира вопросы здорового питания возведены в ранг государственной политики. Доказано, что правильное питание обеспечивает рост и развитие детей, способствует профилактике заболеваний, повышению работоспособности и продлению

жизни людей, создавая при этом условия для адекватной адаптации их к окружающей среде [6].

Медицинские исследования показали, что в последние годы в питании населения наблюдается снижение потребления пищевых источников энергии и белка (особенно у групп населения с низкими доходами). Одновременно выявлено много людей, страдающих ожирением, что является следствием нарушения обмена веществ. Средняя продолжительность жизни сократилась: сегодня у мужчин она составляет 57 лет, у женщин – 72 года. Заметно увеличилось количество «заболеваний пожилого возраста», предпосылки к которым накапливаются в течение всей жизни человека: сердечно-сосудистые заболевания, рак, диабет, инсульт, катаракта и глаукома, остеопороз, некоторые болезни мозга и нервной системы, например болезнь Паркинсона и т.д. Особое беспокойство вызывают сердечно-сосудистые и онкологические заболевания.

Ведущим направлением в области питания является создание ассортимента продуктов, способствующих улучшению здоровья при ежедневном употреблении в составе рациона и получивших название «функциональных» благодаря наличию в них функциональных ингредиентов [7].

Основные группы функциональных ингредиентов и их воздействие на человеческий организм представлены в табл. 1

Основные группы обогащающих ингредиентов	Физиологическое воздействие на организм человека
Пищевые волокна	Позитивное воздействие на метаболизм различных субстратов (сохранение энергетического баланса, поддержание уровня глюкозы, инсулина в крови и др.)
Витамины, минеральные вещества	Защита против соединений, обладающих оксидантной активностью
Полиненасыщенные жирные кислоты	Позитивное воздействие на сердечно-сосудистую систему
Бифидобактерии и др. молочнокислые бактерии	Позитивное воздействие на физиологию желудочно-кишечного тракта
Олигосахариды, сахароспирты	Позитивное воздействие на состояние кишечной микрофлоры
Фосфолипиды	Физиологическое воздействие на состояние иммунной системы
Аминокислоты, пептиды, протеины	
Спирты, органические кислоты	
Гликозиды	
Изопреноиды, антиоксиданты	

При обогащении традиционных продуктов функциональными ингредиентами необходимо учитывать их сочетаемость в плане химического взаимодействия в самом продукте и их биоусвояемость при попадании в пищеварительный тракт.

Исходя из представлений об особенностях состава и свойств функциональных продуктов по сравнению с традиционными, с учетом технологической специфики их получения, можно выделить условно три основные категории функциональных продуктов.

К первой категории относятся традиционные продукты, содержащие в нативном виде значительные количества функционального ингредиента или их группы. Это такие продукты, масса которых, исключая воду и соль, по меньшей мере, на 95% состоит из органических соединений. В технологиях таких продуктов исключается применение антибиотиков, гормонов роста, пестицидов, методов биоинженерии или ионизирующей радиации.

Ко второй категории относятся традиционные продукты, в которых технологически понижено содержание вредных для здоровья компонентов. В перечень таких ингредиентов включены холестерин, животные жиры с высоким содержанием предельных жирных кислот, гидрогенизированные масла, содержащие трансизомерные жирные кислоты, низкомолекулярные углеводы (сахароза), натрий, источником которого служит поваренная соль.

Получение функциональных продуктов этой категории возможно при избирательном извлечении или разрушении таких ингредиентов. В связи с этим известна селективная экстракция, некоторые виды ферментативной обработки пищевого сырья.

Технологическим приемом модификации жировых продуктов, в которых понижено содержание животных жиров, холестерина или гидрогенизированных жиров, является частичная или полная замена вредных для здоровья ингредиентов более ценными жировыми компонентами. Например, технологически проводят полную замену их растительными маслами или частичное замещение с использованием метода эльгирования на нежировую, в частности водную или молочную фазу.

Изменение традиционного состава, происходящее вследствие замены одних ингредиентов другими, отражается на потребительских свойствах вновь создаваемых продуктов, в связи с чем модификация традиционного продукта в функциональный сводится не только к замене ингредиентов, а представляет собой сложный процесс конструирования продукта, обладающего восстановленными традиционными потребительскими и новыми, определяющими полезность продукта, функциональными свойствами.

Вредно для здоровья повышенное содержание натрия в продуктах. Так, например, снижение его содержания возможно путем замены части хлорида натрия на соли калия. Сохранение традиционного вкуса в этом случае связано с правильным выбором соотношения солей.

К третьей категории функциональных продуктов относятся обогащенные пищевые продукты, получаемые добавлением к традиционным

пищевым продуктам одного или нескольких физиологически функциональных ингредиентов с целью предотвращения или исправления их дефицита, имеющегося в организме человека.

Для производства ФП используется высокотехнологичное производство, экологически чистый и генетически не модифицированный материал.

Функциональные продукты должны содержать не менее 30% суточной дозы биологически активных веществ, к которым относятся:

- молочнокислые бактерии и пробиотики;
- витамины;
- олигосахариды;
- эйкосапентаноиковую кислоту;
- пищевые волокна;
- биофлавоноиды;
- антиоксиданты;
- полиненасыщенные жирные кислоты;
- минералы;
- незаменимые аминокислоты;
- пептиды;
- протеины;
- холины;
- гликозиды.

Ныне существующие виды функциональных продуктов:

- каши;
- супы;
- хлебо-булочные изделия;
- напитки и коктейли;
- спортивное питание.

В соответствии с СанПиН во всех случаях обогащения пищевых продуктов функциональными ингредиентами на этикетке должны приводиться сведения об их составе и количестве с учетом естественного содержания в продукте.

В настоящее время продукты функционального питания составляют не более 3% известных пищевых продуктов. Однако специалисты в области питания и медицины считают, что в ближайшие 20 лет их доля достигнет до 30% всего продуктового рынка.

Освоение сбалансированного питания имеет место и в Казахстане. К числу функциональных продуктов на отечественном рынке можно отнести продукты на основе зерновых, кисломолочные продукты с бифидобактериями, лактулозой, масложировую продукцию [8].

1.3 Пробиотики, пребиотики и их функциональные свойства

В последние годы в отечественной и зарубежной научной литературе все чаще встречается информация о пользе пробиотических и пребиотических продуктов питания.

Пробиотики — это живые микроорганизмы или ферментированные ими продукты, которые относятся к нормальным обитателям кишечника здорового человека и оказывающие благотворный эффект на здоровье человека, в большей степени реализующийся в желудочно-кишечном тракте.

Пробиотические микроорганизмы, стимулирующие развитие нормальной микрофлоры человека — бифидо- и лактобактерии — представляют собой важный компонент функциональных продуктов. Впервые это было установлено российским ученым И.И.Мечниковым, удостоенным за это открытие Нобелевской премии.

Полезные микроорганизмы активизируют иммунную систему, защищают нас от экспансии патогенных и условно-патогенных бактерий, обезвреживают токсины, выводят из организма тяжелые металлы, радионуклиды, синтезируют витамины, нормализуют минеральный обмен.

На сегодняшний день к пробиотикам с доказанной эффективностью воздействия относят: *Bifidobacterium lactis* B1, BB12, *Bifidobacterium longum* BB536 и *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 (LGG). Колонии лакто- и бифидобактерий практически полностью покрывают слизистую оболочку кишечника, являясь своего рода огромной биопленкой. Защитные действия нормальной кишечной микрофлоры хорошо известны: она снижает риск развития инфекционных заболеваний и аллергической патологии, стабилизирует барьерные функции слизистой оболочки пищеварительного тракта, облегчает процессы пищеварения и, по некоторым данным, способствует реализации противоопухолевой защиты. Показано, что бифидобактерии способны увеличивать экспрессию белка клаудина, тем самым уменьшая возможность непосредственного взаимодействия аллергена с дендритной клеткой.

Препараты-пробиотики на основе этих микроорганизмов широко используются в качестве питательных добавок, а также в йогуртах и других молочных продуктах. Микроорганизмы, входящие в состав пробиотиков, не патогенны, не токсичны, содержатся в достаточном количестве, сохраняют жизнеспособность при прохождении через желудочно-кишечный тракт и хранении. Пробиотики не считаются лекарственными препаратами и рассматриваются как средства, полезно влияющие на состояние здоровья людей.

В человеческом организме насчитывается огромное количество микроорганизмов. (Например, в кишечнике содержится до 10^{12} микроорганизмов в 1 см^3). Места обитания микроорганизмов — на слизистых покровах человека, причем микроорганизм прикрепляется только к определенным рецепторам. Количество таких рецепторов ограничено, поэтому микроорганизмы, поступающие с пробиотиками, занимают

только то количество рецепторов, которые свободны. Остальные микроорганизмы пробиотика не прикрепляются к эпителию кишечника, остаются в просвете кишки и через определенное время выводятся из организма. Таким образом, при приеме пробиотика не может быть передозировки препарата, а его длительные прием не вызывает «эффекта замены» и других негативных последствий.

Известно, что под действием экологических факторов, неправильного и недостаточного питания, антибиотикотерапии, инфекционных и неинфекционных заболеваний, иммунодефицитных состояний может изменяться количественный и качественный состав микрофлоры человека. Это, в свою очередь, приводит к развитию заболеваний желудочно-кишечного тракта, нарушению обмена веществ (гиповитаминозы, анемии, гипотрофия). Применение пробиотических продуктов во многих случаях альтернативно антибиотикам. Во всем мире пробиотические продукты питания применяются как профилактические и лечебные средства при дисбиотических нарушениях, вызванных неблагоприятным воздействием среды обитания на организм.

Пробиотики могут включаться в рацион в качестве диетических добавок в виде лиофилизированных порошков, содержащих бифидобактерии, лактобактерии и их комбинации, используются без назначения врача для восстановления микробиоценоза кишечника, для поддержания хорошего состояния здоровья, поэтому разрешение на производство и применение пробиотиков в качестве диетических добавок не требуется.

В настоящее время пробиотики применяются широко и источники поступления их в организм человека разнообразны. Особое место среди них для обеспечения пробиотического эффекта занимают лечебные кисломолочные продукты [9].

Обогащенные кисломолочные продукты – это новый шаг в развитии пищевой промышленности. Не секрет, что горожане, испытывают недостаток в некоторых видах питательных веществ, необходимых для здоровья – пищевых волокнах, витаминах. Биокисломолочные продукты питания являются функциональными продуктами питания, которые содержат биологически активные вещества, улучшающие здоровье. Регулярное использование пробиотических кисломолочных продуктов способствует нормализации микрофлоры кишечника, тем самым усиливает иммунитет, предотвращает развитие аллергии, оказывает противоопухолевое воздействие. Однако, положительный эффект употребления в пищу биокисломолочных продуктов не всегда оправдывает наши ожидания.

Многочисленными клиническими испытаниями было показано, что пробиотики стимулируют иммунную систему независимо от того, что явилось причиной иммунодефицита. Причем пробиотики нормализуют разные уровни иммунной системы – как местный иммунитет слизистых, так и гуморальный или общий иммунитет. Кроме того, у бактерий, содержащихся в пробиотиках, есть еще одно оружие для борьбы с вирусами

– ферменты ДНКазы и РНКазы. Так, например, в вирусологии для выращивания вирусов в питательную среду добавляют антибактериальные препараты – для того, чтобы исключить заражение культуры бактериями. В противном случае бактерии убивают вирусы.

Сегодня одной из причин развития гастрита и язвенных поражений желудка и двенадцатиперстной кишки является заражение специфическим микроорганизмом – хеликобактером (*Helicobacter pylori*). Соответственно лечение таких заболеваний предусматривает использование препаратов с антибактериальной активностью, то есть антибиотиков. Однако даже использование сильных антибиотиков в терапии хеликобактерзависимых заболеваний не приводит к полному уничтожению хеликобактера, в то же время столь мощная антибактериальная терапия нарушает микробиоценоз человека и приводит к дисбиозу кишечника и других слизистых. Поэтому при лечении хеликобактерзависимых заболеваний (гастрит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки) показано применение пробиотиков как минимум по двум причинам:

- использование пробиотиков в схеме лечения вышеназванных заболеваний увеличивает эффективность эрадикации хеликобактера;
- использование пробиотиков на стадии антибактериальной терапии предупреждает развитие дисбактериоза различных слизистых человека [10].

Установлено, что помимо пробиотиков для поддержания нормальной микрофлоры необходимы и пребиотики. Они служат питанием для «дружественных» организму человека микроорганизмов. Механизм пробиотического действия основан на том, что микрофлора человека, представлена в кишечнике бифидобактериями, а они вырабатывают ферменты типа гидролаз. Эти ферменты расщепляют пребиотики, и полученная таким образом энергия используется бифидобактериями для роста и размножения. Кроме того, в этом процессе образуются органические кислоты. Именно они понижают кислотность среды и тем самым препятствуют развитию патогенных микроорганизмов, которые не обладают ферментами для переработки пребиотиков. Последние стимулируют и активизируют метаболические реакции полезных представителей микрофлоры человека.

К пребиотикам относятся неперевариваемые ингредиенты пищи, способствующие улучшению здоровья за счет избирательной стимуляции роста и метаболической активности одной или нескольких групп бактерий, обитающих в толстой кишке. Пребиотики есть в молочных продуктах, кукурузных хлопьях, крупах, хлебе, капусте, фруктах, луке, цикории, чесноке, фасоли, горохе, артишоке, аспарагусе, бананах и многих других продуктах питания. Вместе с тем жители городов испытывают ежедневный дефицит в пребиотиках. Именно этим дефицитом объясняется распространенность таких заболеваний как дисбактериоз, детский диатез, атопический дерматит, артриты, иммунодефицит [11].

Согласно определению, данному G.Gibson и M.Roberfroid, и ставшему уже классическим, к пребиотикам относятся углеводы, которые обладают одновременно двумя важными свойствами:

- не перевариваются и не всасываются в верхних отделах пищеварительного тракта;
- селективно ферментируются микрофлорой толстой кишки, вызывая активный рост полезных микроорганизмов.

Ключевым моментом в характеристике пребиотиков является их избирательное стимулирование полезных для человеческого организма представителями кишечной микрофлоры, к которым в первую очередь относятся бифидобактерии и лактобациллы.

Ингредиенты питания, отвечающие этим требованиям, являются низкомолекулярными углеводами. Свойства пребиотиков наиболее выражены во фруктозоолигосахаридах (ФОС), инулине, галактоолигосахаридах (ГОС), лактулозе, лактитоле.

Таблица 2. Сравнительная таблица пробиотиков и пребиотиков.

Пробиотики	Пребиотики
Использование	
Для заселение кишечника чужеродной микрофлорой	Для стимуляция роста собственной микрофлоры
Состав препаратов	
Содержат живые клетки нормофлоры кишечника: бифидобактерии, лактобациллы.	Содержат вещества, являющиеся нутрицевтиками (пищей) для полезной микрофлоры кишечника
Стратегия лечения	
Инфицируют (заселяют) кишечник экзогенной (чужеродной) микрофлорой	Стимулируют рост индигенной (собственной) микрофлоры кишечника
Проходимость	
Только 5-10% живых бактерий, содержащихся в пробиотиках, достигает толстой кишки.	Не перевариваются в верхних разделах ЖКТ и в неизменном виде достигают толстой кишки
Хранение	

Нужно хранить в темном, прохладном месте: количество живых бактерий в пробиотиках зависит от условий и срока хранения	Представляют собой углеводы (сахара), условия и сроки хранения которых почти не влияют на их бифидогенные свойства.
Селективность	
Из 500 видов нормофлоры кишечника, препараты-пробиотики содержат только 1-2 штамма полезных бактерий.	Будучи пищевым субстратом нормофлоры кишечника, стимулируют всю популяцию полезных бактерий.

Распространены препараты, биологически активные добавки, пробиотические продукты смешанного состава – комплексы пробиотиков, в том числе мультиштаммовых, с различными так называемыми пребиотическими веществами. Такие препараты называют «синбиотики». Действие синбиотиков основано на синергизме комбинации пробиотиков и пребиотиков, за счет которого наиболее эффективно не только имплантируются вводимые микроорганизмы – пробиотики в желудочно-кишечный тракт человека, но и стимулируется его собственная микрофлора. В синбиотики могут включаться пищевые волокна, иммуномодуляторы, ферменты, микроэлементы, растительные добавки [6,7].

1.4 Обогащение кисломолочных продуктов функциональными ингредиентами

Питание – один из важнейших факторов, определяющих здоровье нации в целом и наше здоровье в частности. Продукты питания должны не только удовлетворять физиологические потребности организма человека в питательных веществах и энергии, но и выполнять профилактические и лечебные функции.

В настоящее время сформировано единое мнение об использовании пищевых добавок: они не являются необходимыми, но без них выбор пищевых продуктов был бы намного беднее, а процесс приготовления пищи непосредственно из исходных сырьевых продуктов более кропотливым и продолжительным. Без пищевых добавок почти исчезли бы из ассортимента заготовки, полуфабрикаты и блюда быстрого приготовления, а отдельные изделия стали бы не такими красивыми и выразительными.

Согласно определению ВОЗ, пищевые добавки – это природные соединения и химические вещества, которые сами по себе обычно не употребляются в пищу, но в ограниченных количествах преднамеренно вводятся в продовольственные товары.

Цели введения пищевых добавок:

- совершенствование технологии подготовки, изготовления, упаковывания, транспортирования, хранения сырья и продуктов;
- ускорение сроков изготовления пищевых продуктов;
- сохранение природных качеств пищевого продукта;
- улучшение внешнего вида и органолептических свойств пищевых продуктов;
- увеличение стабильности продуктов при хранении.

Причины использования пищевых добавок:

1. предохранение жиров, витаминов и ароматических веществ с помощью антиокислителей от преждевременного разложения, при котором могут образовываться канцерогенные продукты;
2. сохранение благодаря консервантам содержимого открытых упаковок (бутылки с кетчупом, баночки с майонезом, пакета с нарезанным хлебом, тубы с горчицей, бутылки с напитками) от развития микроорганизмов и тем самым от образования высокотоксичных ядов;
3. современные методы торговли в условиях необходимости перевоза продуктов питания, в том числе скоропортящихся и быстро черствеющих, на большие расстояния, что определило необходимость применения добавок, увеличивающих сроки сохранения их качества;
4. быстро меняющиеся индивидуальные представления современного потребителя о продуктах питания, включающие вкус и привлекательный внешний вид, невысокую стоимость, удобство использования; удовлетворение таких потребностей связано с использованием, например, ароматизаторов, красителей и т.п.;
5. создание новых видов пищи, отвечающей современным требованиям науки о питании (низкокалорийные продукты, имитаторы мясных, молочных и рыбных продуктов), что связано с использованием пищевых добавок, регулирующих консистенцию пищевых продуктов;
6. совершенствование технологии получения традиционных и новых продуктов питания. Число пищевых добавок, применяемых в производстве пищевых продуктов в разных странах, достигает сегодня 500, не считая комбинированных добавок, отдельных душистых веществ и ароматизаторов.

В настоящее время используют множество различных добавок при производстве молочных продуктов.

Витаминная ценность молока и молочных продуктов существенно колеблется в зависимости от сезона и условий года, в частности, из-за отсутствия недостатка в зимнее время зеленых кормов. Значительны потери витаминов при сепарировании, нормализации, пастеризации, стерилизации, сушке и восстановлении молока и т. д. Надежным путем, гарантирующим эффективное решение этой проблемы, является включение в рацион специализированных пищевых продуктов, обогащенных этими ценными биологически активными пищевыми веществами до уровня, соответствующего физиологическим потребностям человека. Пищевые продукты, обогащенные витаминами и минеральными веществами, входят в

обширную группу продуктов функционального назначения, т.е. обогащенных функциональными, физиологически полезными пищевыми ингредиентами, улучшающими здоровье человека. При разработке технологии и производстве необходимо руководствоваться основными принципами, сформулированными зарубежными и отечественными учеными с учетом основополагающих данных современной науки о роли питания и отдельных пищевых веществ в поддержании здоровья и жизнедеятельности человека, потребности организма в отдельных пищевых веществах и энергии, реальной структуре питания и фактической обеспеченности витаминами, макро- и микроэлементами населения страны, также с учетом многолетнего опыта по этому вопросу:

Принцип первый. Для обогащения пищевых продуктов следует использовать те микронутриенты, дефицит которых реально имеет место, достаточно широко распространен и небезопасен для здоровья. Это, прежде всего, витамины группы В, фолиевая кислота, каротин, из минеральных веществ – йод, железо и кальций.

Принцип второй. Обогащать витаминами и минеральными веществами следует, прежде всего, продукты массового потребления, доступные для всех групп детского и взрослого населения и регулярно используемые в ежедневном питании. К ним в первую очередь относятся мука и хлебобулочные изделия, молоко, кисломолочные продукты, соль, сахар, напитки, продукты детского питания.

Принцип третий. Добавляемые витамины и минеральные вещества не должны ухудшать потребительские свойства продуктов: уменьшать содержание и усвояемость других имеющихся в них пищевых веществ, существенно изменять вкус, аромат, свежесть, сокращать срок их хранения.

Принцип четвертый. Необходимо учитывать возможность химического взаимодействия обогащающих добавок между собой и с компонентами обогащаемого продукта и выбирать такие их сочетания, формы, способы и стадии внесения, которые обеспечивают их максимальную сохранность в процессе производства и хранения.

Принцип пятый. Рекомендуемое, т.е. гарантируемое производителем содержание витаминов и минеральных веществ в обогащенном ими продукте питания должно быть достаточным для удовлетворения не менее 15% (оптимально – 25-50%) средней суточной потребности в этих микронутриентах при обычном уровне потребления обогащенного продукта.

Принцип шестой. Количество витаминов и минеральных веществ, дополнительно вносимых в обогащаемые ими продукты, должно быть рассчитано с учетом их возможного естественного содержания в исходном продукте или сырье, используемом для его изготовления, а также потерь в процессе производства и хранения с тем, чтобы обеспечить содержание этих минеральных веществ на уровне не ниже регламентируемого в течение всего срока годности обогащенного продукта.

Принцип седьмой. Регламентируемое содержание витаминов и минеральных веществ в обогащаемых ими продуктах должно быть указано

на индивидуальной упаковке и строго контролироваться как производителем, так и органами государственного надзора.

Принцип восьмой. Эффективность обогащенных продуктов должна быть убедительно подтверждена апробацией на репрезентативных группах людей, демонстрирующей не только их полную безопасность и приемлемые качества, но также хорошую усвояемость, способность существенно улучшать обеспеченность организма витаминами и минеральными веществами и связанные с этими веществами показатели здоровья.

Следует учесть, что производство комбинированных продуктов по возможности не должно отличаться от производства продуктов традиционных технологий, они не должны отпугивать потенциальных потребителей непривычными органолептическими показателями. Неизменной при их создании остается задача обеспечения максимального воспроизведения потребительских свойств традиционного аналога.

Создание продуктов, обогащенных пищевыми волокнами, актуальная задача пищевой индустрии. Длительное время пищевые волокна считали ненужными балластными веществами, которые стремились удалить из готовых продуктов. В результате фактическое потребление пищевых волокон населением снизилось в 2 – 3 раза по сравнению с нормой. Вместо 30 – 35 г в сутки среднестатистический человек съедает их не более 10 – 15 г. Исследованиями современной медицины установлено, что недостаток пищевых волокон в пище приводит к нарушению динамического баланса внутренней среды человека и является фактором риска многих заболеваний, в том числе гастроэнтерологических. Дефицит алиментарного кальция в рационе питания также является одним из факторов развития микробиологических нарушений в кишечнике. Известно, что биоусвояемость кальция из кисломолочных продуктов выше, чем из молока, поскольку при снижении pH среды происходят разрушение казеинатфосфатного белкового комплекса и переход кальция в более доступную, ионизированную, форму. Комбинация кисломолочного продукта (источника белка и кальция) с полисахаридами растительного происхождения, стимулирующими рост и активацию полезной микрофлоры организма человека пищевыми волокнами, предполагает усиление благоприятного эффекта на микрофлору, всасывание кальция, а также на состояние желудочно-кишечного тракта в целом [6,12].

Существующие данные об эффекте введения пищевых волокон в кисломолочные продукты позволили сделать следующие общие выводы:

- дополнительное введение пищевых волокон в кисломолочные продукты не изменяет их органолептических свойств и хорошо оценивается потребителями;
- эти продукты на фоне диетотерапии с повышенным содержанием пищевых волокон хорошо переносятся больными с заболеваниями органов пищеварения;
- использование кисломолочных продуктов с пищевыми волокнами способствует улучшению общего состояния больных и

уменьшению у них клинических проявлений с синдромом раздраженного кишечника и сопутствующими заболеваниями органов пищеварения;

- применение кисломолочных продуктов на фоне диетотерапии приводит к сокращению продолжительности транзита содержимого по желудочно-кишечному тракту и восстановлению нормальной эвакуаторной функции толстой кишки у 80% больных (в группе сравнения – у 40%);

- использование кисломолочных продуктов на фоне диетотерапии способствует снижению уровня общего холестерина в сыворотке крови;

- на фоне приема кисломолочных продуктов с пищевыми волокнами отмечены положительная динамика в состоянии кишечного микробиоценоза и снижение степени выраженности дисбиотических отклонений;

- эти продукты могут быть рекомендованы в качестве средства, улучшающего функцию органов пищеварения, способствующего регуляции моторно-эвакуаторной функции толстой кишки и поддержанию нормального кишечного микробиоценоза.

В настоящее время ассортимент молочных продуктов, отвечающих современным медико-биологическим и физиологическим нормам, предназначенных для категории детей школьного возраста, практически не сформирован. В сложившейся структуре питания, как взрослого, так и детского населения выявлен недостаток животного белка и микронутриентов – витаминов и минеральных веществ. В связи с этим актуальной является разработка для школьников специализированных продуктов, обогащенных защитными факторами, обладающих иммуномодулирующими свойствами и отвечающих требованиям функционального питания. Все продукты позитивного питания должны содержать ингредиенты, придающие им функциональные свойства. К таким ингредиентам относятся минеральные вещества, витамины, некоторые виды полезных микроорганизмов (бифидобактерии, ацидофильная палочка и т.д.), олигосахариды, пищевые волокна и т.д.

Разработаны кисломолочные продукты, являющиеся средством профилактики преждевременного старения. По сравнению с другими напитками они содержат больше полноценных белков, углеводов, минеральных солей, витаминов С и Е. Одной из первоочередных задач профилактического питания является создание диетических кисломолочных продуктов с использованием натуральных биокорректоров с целью изменения химического состава продуктов и повышения в них незаменимых веществ, таких как аминокислоты, витамины, минеральные и другие вещества. Перспективное направление – использование в качестве биологически активных добавок сырья растительного происхождения, компенсирующего недостаток в организме тех или иных веществ и способствующего выделению из организма избыточного количества нежелательных элементов, накопившихся в результате неправильного обмена. В связи с этим особое внимание привлекают полисолодовые

экстракты, которые содержат полноценный белок, легкоусвояемые углеводы (моно- и полисахариды), пищевые волокна, минеральные соединения.

Следует отметить, что полисолодовые экстракты обладают бакретицидным действием, что позволяет увеличить срок хранения готового продукта без использования консервантов. Некоторые производители молочной продукции для производства кисломолочных продуктов начали использовать ацидофильные закваски и олигосахарид хитозана. Это новый продукт функционального назначения, получаемый путем ферментативного расщепления высокомолекулярного хитозана, который характеризуется высокой биологической активностью, оказывает влияние на процессы обмена веществ и не токсичен. Он рекомендован к применению при атеросклерозе, сахарном диабете, гипертонии, онкологических и других заболеваниях.

Болезни, вызванные употреблением алкоголя, – серьезная проблема здравоохранения. В настоящее время, согласно мировой статистике, смертность в связи с алкогольной интоксикацией занимает 3-е место. Считается, что в общей медицинской практике от 20 до 40% больных имеют расстройства, вызванные алкоголизацией, и не менее чем в 20% случаев у больных, обратившихся к любому врачу, может предполагаться алкоголизм.

Исследование биоптатов и материала аутопсии показало, что при употреблении алкоголя печень поражается в 80% случаев, поджелудочная железа – в 50%, почки – в 30%. Выявлены и общие для всех органов морфологические признаки. Наиболее подвержены патологическому действию алкоголя печень, поджелудочная железа, желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). Для лечения пораженных алкоголем органов применяют комплекс препаратов, среди которых наибольшую роль играет силимарин.

Силимарин представляет собой экстракт расторопши пятнистой (*Silibum marianum*) и используется уже сотни лет для лечения заболеваний печени. В конце шестидесятых и в семидесятые годы силимарин часто применяли при лечении серьезных отравлений гепатотоксичными грибами и получали превосходные результаты. Было показано, что этот препарат обладает сильным антиоксидантным действием и защищает ткань печени, нейтрализуя такие опасные молекулы, как гидроксильный радикал, радикал супероксида и ион гипохлорида. Тем самым силимарин препятствует повреждению клеточных мембран и генетического материала гепатоцитов. Силимарин также повышает концентрацию глутатиона и тормозит рост опухолей.

Исследования на больных вирусным гепатитом показали, что силимарин нормализует уровень печеночных ферментов в крови, быстро снижает концентрацию билирубина и сокращает срок пребывания пациента в клинике. Более того, было показано, что силимарин является эффективным антидотом при отравлениях толуолом и ксилолом, а также при передозировке лекарств. У больных с хроническими заболеваниями печени, вызванными алкоголизмом и другими причинами, снижался уровень печеночных ферментов в крови и проколлагена III, а так же улучшалась гистологическая

картина печеночной ткани, при ежедневном приеме силимарина. Следовательно, силимарин является эффективным препаратом при лечении тяжелых патологий печени.

Мочекаменная болезнь является одним из широко распространенных урологических заболеваний, нередко склонных к тяжелому течению и рецидивам. Мочекаменная болезнь встречается у детей, у взрослых, наиболее часто поражая людей в самый активный период их жизни, а также у лиц пожилого возраста. В связи с широкой распространенностью, особенностями развития и течения мочекаменной болезни остается одной из актуальных проблем современной медицины, тем более, что за последние десятилетия отмечена тенденция к увеличению частоты этого заболевания, связанная с ростом влияния ряда неблагоприятных факторов окружающей среды на организм человека.

Распространению мочекаменной болезни способствуют условия современной жизни: гиподинамия, ведущая к нарушению фосфорно-кальциевого обмена, характер питания (обилие белка в пище), что позволило назвать это заболевание обмена веществ в организме болезнью цивилизации. К возникновению данного недуга предрасполагают также такие факторы, как возраст, пол, раса, климатические, географические и жилищные условия, профессия и наследуемые генетические особенности. Причинами образования камней могут быть и факторы местного характера: инфекция мочевых путей, анатомические и патологические изменения в верхних мочевых путях, приводящие к затруднению нормального оттока мочи из почек, обменные и сосудистые нарушения в организме и почке.

Острый простой гастрит встречается особенно часто. Причинами развития острого простого (катарального) гастрита являются пренебрежительное отношение к питанию, употребление большого количества крепких алкогольных напитков, в том числе пива, а также инфекции, применение некоторых лекарственных препаратов (анальгин, аспирин, антибиотики, сульфаниламиды и др.), пищевая аллергия.

Последствия артериальной гипертонии уносят больше жизней, чем СПИД, раковые заболевания и туберкулез, вместе взятые. Симптомы начинающейся гипертонической болезни во многом совпадают с признаками обычного переутомления. Поэтому около половины больных впервые слышат о своем диагнозе лишь от врача «Скорой помощи». Хорошо известно, что артериальная гипертония (гипертоническая болезнь) представляет собой одно из наиболее широко распространенных сердечно-сосудистых заболеваний. Гипертонической болезнью страдает каждый пятый житель нашей планеты.

Научная медицина справляется с этими болезнями хирургическими методами и препаратами когда уже проявились признаки заболевания. Это дает эффект определенное количество времени, но потом случается рецидив.

Мало кто знает, что обычный сорняк, именуемый в простонародье спорыш или птичий горец, обладает многими свойствами для лечения и профилактики вышеперечисленных болезней. И если в научной медицине он

применяется только в качестве противовоспалительного, вяжущего, кровоостанавливающего и мочегонного средства, то в народной медицине он нашел широкое применение в качестве лечебного и профилактического средства. С глубокой древности спорыш используют при нарушениях водно-солевого обмена и обмена веществ, при воспалениях в полости рта и слизистой оболочке губ, при желчекаменной и мочекаменной болезнях, при авитаминозах, при воспалении легких, сильных бронхитах и плевритах, при всех видах гастритов, при поносах, при стенокардии, радикулитах и невралгиях, при дизентерии, при тромбофлебитах, при диабете, для лечения длительно не заживающих ран и язв.

В последнее время горец птичий применяют при лечении опухолей различного происхождения; он входит в состав сбора Здренко, используемого для лечения злокачественных новообразований; является составной частью сборов, применяемых при лечении простуды, язвенной болезни желудка, головной боли, заболеваний почек, печени.

Таким образом, в XXI веке производится множество традиционных молочных продуктов с разнообразными функциональными добавками, которые предупреждают болезни, старение организма, обладают тонизирующим действием, что в конечном итоге способствуют здоровому образу жизни человека.

Данная информация была использована для обоснования выбора компонентов для создания нового функционального кисломолочного продукта лечебно-профилактического действия. Проведя анализ данных, в качестве закваски были выбраны бифидобактерии *Bifidobacterium bifidum*, как нативная микрофлора организма человека, и пропионовокислые бактерии *Propionibacterium shermanii*, как важный продуцент витаминов группы В.

В качестве растительных компонентов были выбраны расторопша и спорыш. Расторопша является действующим лечебным средством при заболеваниях печени, увеличивает способность печени очищать организм от токсинов и содержит редкое биологически активное вещество силимарин. Спорыш обладает противовоспалительными, антимикробными, противогнилостными и мочегонными свойствами. Он способствует отхождению плотных, каменистых образований при мочекаменной болезни, а также содержит флавоноид авикулярин, который используется как активное кровоостанавливающее средство. Расторопша и спорыш употребляются исключительно в виде водных экстрактов.

Исходя из свойств выбранных компонентов, разрабатываемый продукт должен обладать повышенной биологической и пищевой ценностью и оказывать благотворное влияние на работу почек, печени и желудочно-кишечного тракта.

Глава 2. ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА. МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследований

В данной научно-исследовательской работе объектами исследования являются бифидобактерии и пропионовокислые бактерии, которые широко используются в промышленности, особенно для приготовления кисломолочных продуктов.

Также в качестве объектов исследования выступают, в виде сухих порошков, растительные добавки таких представителей флоры, как Расторопша пятнистая или чертополох молочный (*Silybum Marianum*) и Спорыш или птичий горец (*Polygonum aviculare*).

2.1.1 Бифидобактерии.

Бифидобактерии относятся к семейству Actinomycetaceae, роду *Bifidobacterium*, который включает более 20 видов. Типовым видом является *Bifidobacterium bifidum*.

Бифидобактерии представляют собой чрезвычайно вариабельные мелкие палочки – прямые, изогнутые, разветвленные, раздвоенные V- или Y-формы, булабовидные, лопатовидные. Грамположительные, спор и капсул не образуют (рис. 1).

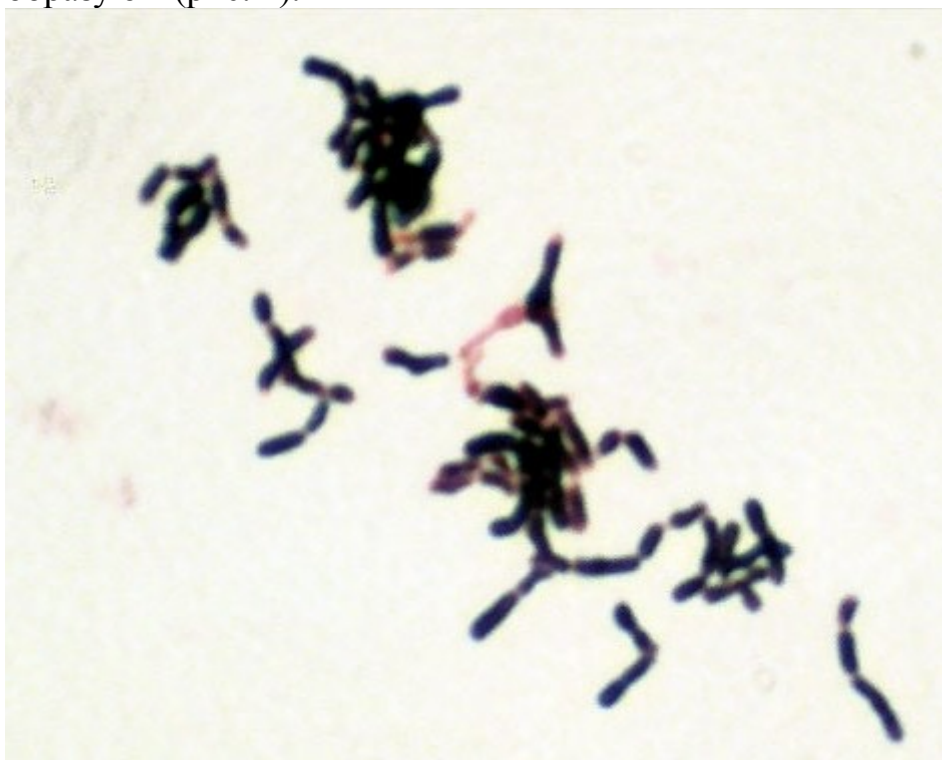


Рис. 1.
Bifidobacterium
bifidum,
окрашенные по
Грамму

По отношению к кислороду бифидобактерии являются строгими анаэробами, однако в процессе культивирования они приобретают способность развиваться в присутствии небольшого количества кислорода.

Оптимальной является температура 36 – 38⁰С, температурные пределы роста 20 – 50⁰С. Оптимальное значение активной кислотности 6 – 7.

Бифидобактерии культивируют на молоке, гидролизованном молоке или на гидролизате казеина, а также на печеночном бульоне с добавлением ростовых веществ (дрожжевого автолизата, кукурузного экстракта, цистеина и др.).

Большинство штаммов бифидобактерий не сквашивают молоко или сквашивают его через 4 суток и более. Однако в процессе культивирования биохимическая активность этих бактерий повышается, и свертывание молока происходит через 24 – 36 часов.

Бифидобактерии сбраживают глюкозу, галактозу, фруктозу, лактозу и др. При сбраживании глюкозы образуются уксусная, молочная кислоты, небольшое количество муравьиной и янтарной кислот.

Бифидобактерии являются преобладающим компонентом кишечной микрофлоры, составляя в среднем до 90% общего числа микроорганизмов. Именно бифидофлоре отводится ведущая роль в нормализации микробиоценоза кишечника, улучшении процессов всасывания и гидролиза жиров, белкового и минерального обмена, поддержании неспецифической резистентности организма.

Многие исследователи подчеркивают высокую антагонистическую активность бифидобактерий по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам [17,18].

Rouland и Grasso обнаружили, что бифидобактерии разрушают канцерогенные N-нитрозамины. Данные, полученные Tohyama, свидетельствуют о том, что бифидобактерии не только подавляют развитие патогенных представителей кишечной микрофлоры, но и обезвреживают токсические метаболиты, образуемые ими в кишечнике. Лянной А. М. была выявлена способность бифидобактерий в процессе жизнедеятельности продуцировать жирные кислоты (в основном уксусную, муравьиную) и L(+) молочную кислоту. Многие авторы связывают с этим способность бифидобактерий к защите пищеварительного тракта организма-хозяина от развития острых и хронических кишечных инфекций [19].

В 1935 г. впервые была обнаружена витаминообразующая функция бифидобактерий. Впоследствии эти свойства были подтверждены рядом исследователей. Бифидобактерии синтезируют витамины группы В (В₁, В₂, В₆, В₁₂), фолиевую кислоту, витамин К и др.

По данным некоторых авторов, различные виды бифидобактерий обладают способностью продуцировать летучие кислоты, накапливать различные ароматические вещества, такие как формальдегид, ацетальдегид, бутанон-2 и др.

Одним из показателей биохимической активности бифидобактерий является их протеолитическая активность. Установлено, что большинство штаммов бифидобактерий обладает в молоке приблизительно такой же протеолитической активностью, как и *Str.lactis*. В процессе жизнедеятельности бифидобактерий в большом количестве накапливаются

и такие аминокислоты, как лизин, аргинин, глютаминовая кислота, валин, метионин, лейцин, тирозин. Есть сведения о том, что в молоке, сквашенном бифидобактериями, на долю незаменимых аминокислот приходится 40% [20].

Чистые культуры бифидобактерий характеризуются следующими свойствами: это грамположительные, анаэробные, бесспорные, неподвижные палочки, не разжижающие желатину. Они сбраживают глюкозу с образованием уксусной и молочной кислот без выделения газа, снижают pH до значения 4,1–3,8, оптимальная температура культивирования 37 – 38 °С, а биокинетическая зона роста составляет 20 – 45 °С. Микроб не патогенен для человека и животных. При первичном выделении все виды бифидобактерий являются анаэробами. Однако при лабораторном культивировании эти микроорганизмы приобретают способность развиваться в присутствии некоторого количества кислорода, а в высокопитательных средах могут расти и в полностью аэробных условиях (рис. 2).



Рис. 2. Колонии бифидобактерий при культивировании на селективной твердой питательной среде.

Таким образом, анаэробные организмы, относящиеся к актиномицетной линии, представляют особую физиологическую категорию устойчивых к кислороду или аэротолерантных анаэробов.

Все микроорганизмы нуждаются для своего роста в определенных питательных веществах, которые необходимы для построения клеточного материала, для активности ферментов, для работы транспортных веществ. Кроме того, питательные вещества должны поставлять организму материал, используемый для генерирования биологически полезной энергии.

Для развития молочнокислых бактерий в питательной среде необходимы азотистые вещества и витамины. Белки молока являются для молочнокислых бактерий источником питания микробов. Кроме того, они оказывают определенное защитное действие в результате нейтрализации молочной кислоты.

Аминокислоты служат для некоторых бактерий источником энергии, однако они необходимы всем микроорганизмам для синтеза клеточного белка и некоторых других веществ. Известны микроорганизмы, для которых необходимо присутствие в среде одной или нескольких аминокислот, обычно входящих в белок в качестве структурных единиц. Специфическая потребность в определенной кислоте может меняться в зависимости от состава среды [21].

Установлена высокая потребность бифидобактерий как в веществах пептидной природы, так и в аминокислотах. Из аминокислот им чаще всего требуется лизин, пролин, аланин, аспаргиновая и глутаминовая кислоты.

Микроорганизмы испытывают потребность в различных витаминах, прежде всего в тех, которые необходимы для обмена веществ и которые они не в состоянии синтезировать сами. Известно, что минеральный состав среды в сильной степени влияет на рост бифидобактерий. Для роста в синтетических средах бифидобактерии требуют железо, магний, фосфаты, хлориды калия и натрия. Особую роль в их жизнедеятельности выполняет натрий, ускоряющий развитие бифидобактерий. Исключение натрия из среды или замена его заметно ингибируют развитие и приводят к изменению морфологии этих микроорганизмов. Не менее важное значение имеет магний. Изменение содержания этого элемента приводит к существенному нарушению процессов клеточного синтеза и роста. Магний наряду с натрием и калием играет важную роль в функциональной деятельности мембран бифидобактерий, регулируя транспорт веществ.

Для развития бактерий большое значение имеет наличие в среде углеводов, которые они расщепляют до простых соединений. Особенности процесса расщепления углеводов бактериями определяется наличием и относительным количеством различных сахаров в среде, а также обычно присущей микроорганизмам большой специфичностью. Существуют различные способы повышения активности бифидобактерий в молоке. Большую роль при этом играют вещества, стимулирующие рост бифидобактерий, применение которых позволяет вырабатывать продукты на основе коровьего молока [22].

В литературе имеются сведения об использовании различных стимуляторов роста бифидобактерий в молоке. Из растительных стимуляторов применяют обезжиренную сою, экстракт картофеля, тростникового сахара, кукурузного экстракта, морковного сока; в качестве ростовых веществ – аминокислоты, аминсахара, соли железа, сорбит.

Стимулирующей активностью обладают различные производные пантотеновой кислоты, в том числе сам витамин. А.Г. Моисеенко констатировал, что бифидобактерии, подобно молочнокислым бактериям, обнаруживают абсолютную зависимость от производных пантотеновой кислоты [23].

2.1.2 Пропионовокислые бактерии.

Пропионовокислые бактерии относятся к семейству *Propionibacteriaceae*, роду *Propionibacterium*, который включает 8 видов. В молочной промышленности, в частности, в сыроделии, наиболее часто используют *Propionibacterium shermanii*.

Пропионовокислые бактерии представляют собой мелкие неподвижные, не образующие спор и капсул полиморфные палочки. Клетки могут быть кокковидными, удлинёнными, раздвоенными или разветвленными. Располагаются одиночно, попарно, короткими цепочками, в виде букв V или Y или в виде китайских иероглифов (рис. 3).

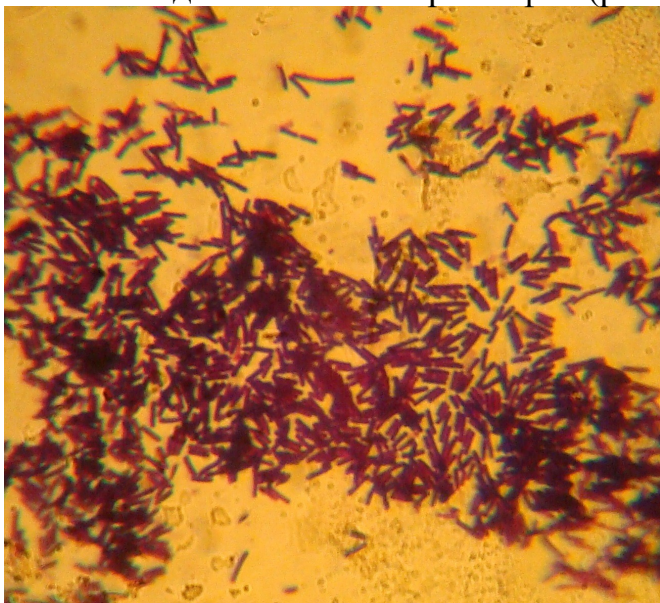


Рис. 3. Микроорганизмы *Propionibacterium shermanii*, окрашенные по Грамму.

Пропионовокислые бактерии являются возбудителями пропионовокислого брожения – процесса сбраживания моносахаров, молочной и яблочной кислот, глицерина, пептонов и других веществ в пропионовую и уксусную кислоты, диоксид углерода и воду.

Пропионовокислые бактерии являются факультативными анаэробами: они могут развиваться в аэробных и анаэробных условиях, хотя большинство штаммов лучше растут в строго анаэробных условиях. Оптимальный рост наблюдается при температуре 30 – 37°C и pH около 7. Для своего роста требуют наличия в среде витаминов (пантотеновой кислоты, тиамина и биотина), белков, аминокислот, но могут развиваться и на средах с внесением неорганических соединений азота (например, солей аммония). В молоке пропионовокислые бактерии развиваются медленно и свертывают его через 5 – 7 дней [25].

В последнее время изучена и исследована большая группа бактерий рода *Propioni*. Микроорганизмы этой группы относятся к облигатной микрофлоре крупных видов сыров. Первыми исследователями и открывателями этих микроорганизмов были Орла-Енсен и Фройденрайх.

Пропионовокислые бактерии являются обособленной группой микроорганизмов, давно привлекающих к себе внимание во всем мире.

Эти бактерии способны к синтезу и сверхсинтезу ряда практически важных веществ: большого числа аминокислот, значительного количества жирных кислот, липидов, фосфолипидов и ферментов.

Пропионовокислые бактерии характеризуются как грамположительные, каталазоположительные, неспорообразующие, неподвижные, факультативно анаэробные и аэротолерантные палочковидные бактерии. Это аэротолерантные и микрофильные бактерии, хотя есть штаммы, предпочитающие аэробные условия. Палочковидные клетки бактерий склонны к плеоморфизму. Рудиментарное ветвление наблюдается в аэробных условиях или в анаэробных при низких значениях pH. Колонии обычно влажные, округлые или в виде гречишного зерна, блестящие, маслянистые. Цвет колоний кремовый, желтый, оранжевый, красный, коричневый. Пропионовокислые бактерии отличаются под микроскопом от других по своеобразному «полисадному» расположению клеток, иногда образующих короткие изогнутые цепочки и «иероглифы» вследствие деления с защелкиванием. Клетки бактерий неровные, с округлыми концами, в отдельных случаях покрыты слизью и образуют слизистые тяжи [26,27].

Пропионовокислые бактерии растут в пределах температур (15-40°C), хотя есть данные, что рост происходит при более низкой температуре до (-10°C). Оптимальная температура развития классических пропионовокислых бактерий составляет (30±1)°C. Оптимальная величина pH роста пропионовых бактерий 6,5-7,0, максимальная – 8,0, минимальная – 4,6. Пропионовокислые бактерии устойчивы к действию желчных кислот и выдерживают низкую (pH 2,0) кислотность желудка. Они ингибируют активность p-глюкуронидазы, азаредуктазы и нитроредуктазы – ферментов, образуемых кишечной микрофлорой и вовлекаемых в образование мутагенов, канцерогенов и промоторов роста опухолей.

Таксонометрическим признаком рода служит также состав клеточных фосфолипидов. Для рода *Propionibacterium* основной фосфолипид представлен мономанозидом глицерил фосфорилмиоинозита. Фосфолипиды у пропионовокислых бактерий составляют около 10% от общего количества липидов.

Все изученные виды пропионовых бактерий содержат однотипный главный гликолипид, что является важным таксономическим признаком рода [28].

Пропионовокислые бактерии в значительных количествах синтезируют полифосфаты (ПФ). Начало роста данных микроорганизмов сопровождается накоплением высокомолекулярных полифосфатов.

Содержание кислоторастворимых фосфатов очень мало (менее 20 мкг/г биомассы), и основной тип полифосфатов представлен высокомолекулярными (кислотонерастворимыми) соединениями, которые содержат от 70 до 500 остатков фосфорной кислоты. Менее полимерные полифосфаты находятся внутри клетки, более полимерные – в

цитоплазматической мембране и принимают участие в переносе сахаров в клетку через мембрану.

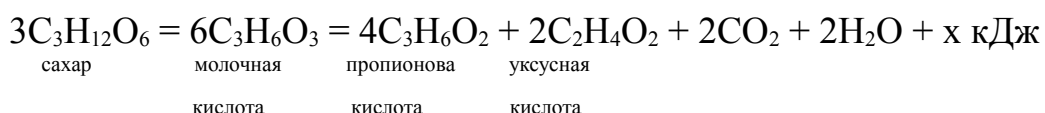
Пропионовокислые бактерии являются факультативными анаэробами, но вариабельными по аэротолерантности. Большинство культур растет в той или иной степени на воздухе, хотя много штаммов наиболее быстро растут в строго анаэробных условиях.

Пропионобактерии являются хемоорганотрофами. Продукты ферментации включают большие количества пропионовой и уксусной кислот и меньшие – изовалериановой, муравьиной, янтарной, молочной кислот и диоксида углерода. Пропионовая кислота оказывает ингибирующее действие на рост плесневых грибов [29].

Пропионовокислые бактерии – возбудители пропионовокислого брожения, при котором углеводы ферментируются с образованием главных продуктов брожения – пропионовой кислоты и ее солей – пропионатов.

Под пропионовокислым брожением подразумевают биохимический процесс превращения бактериями сахара, молочную кислоту и ее солей в пропионовую кислоту. В этом брожении, кроме пропионовой кислоты, образуются и такие продукты, как уксусная кислота, углекислый газ, янтарная кислота, ацетон и диацетил. Другие летучие ароматические соединения – диметилсульфид, ацетальдегид, пропионовый альдегид, этанол и пропанол.

Пропионовокислое брожение выражается следующим уравнением:



Химизм данного брожения подобен типичному молочнокислому брожению с той разницей, что образовавшаяся молочная кислота в этом брожении – не конечный продукт, а промежуточный. От других типов брожения пропионовокислое отличается высоким выходом АТФ, участием некоторых уникальных ферментов и реакций.

Пропионовокислым бактериям свойственен бродильный тип метаболизма: они расщепляют сахара по пути Эмбдена-Мейергоффа до пропионата, ацетата, CO_2 и сукцината. Химизм пропионовокислого брожения хорошо изучен и описан.

Ключевую реакцию брожения – превращение α -метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА катализирует кофермент B_{12} (Ado Cbl).

Пропионовокислые бактерии являются неплохим источником супероксиддисмутазы пероксидазы (СОД), поэтому они известны своим выраженным антимутагенным действием. Поскольку в естественных условиях микроорганизмы постоянно подвергаются действию мутагенов, у них сформировался эндогенный и экзогенный защитные механизмы: у всех живых существ образуются молекулы, способные к осуществлению антимутагенеза. Антимутагены пропионовокислых бактерий повышают

активность ферментативных систем, участвующих в детоксификации поступающих в клетку веществ, оказывая влияние на окислительно-восстановительный потенциал организма – эти процессы приводят к снижению мутаций [30,31].

Антимутагенность пропионовых бактерий против азиды Na (NaN_3) была впервые обнаружена Л.И. Воробьевой. Она выявила, что экстракты клеток классических пропионовокислых бактерий проявляют эффективное антимутагенное действие. Воробьевой было показано, что они выделяют в среду вещества, такие как СОД и другие белки-ферменты, проявляющие антимутагенную активность.

Экстракты клеток классических пропионовокислых бактерий проявляют высокую эффективность антимутагенного действия. Кроме супероксиддисмутазы в клеточном экстракте пропионовых бактерий присутствуют и другие белки с антимутагенной активностью. Пока можно твердо говорить, что обследованные штаммы обладают антимутагенностью против NaN_3 и что антимутагены имеют пептидную (белковую) природу и, скорее всего, являются ферментами. Установление факта антимутагенности культуральной жидкости и клеточного экстракта пропионовокислых бактерий открыло новые, ранее не известные у них свойства, обуславливающие защиту клетки от внешних и эндогенных мутагенов.

Пропионовокислые бактерии способны синтезировать витамин B_{12} и обогащать ими продукты [32,33].

Под влиянием пропионовокислых бактерий и их антигенов заметно повышается противовирусная и антибактериальная защита организма хозяина. В костном мозге при введении бактерий усиливаются пролиферация предшественников моноцитов и их высвобождение в циркулирующую кровь.

У пропионовокислых бактерий обнаружено не только стимулирующее действие на переваривающую способность макрофагов печени и селезенки, но и на их бактерицидное действие в отношении *Salmonella typhimurium* и *Listeria monocytogenes*.

Пропионовокислые бактерии нашли широкое применение в сыроделии, при производстве кисломолочных продуктов.

Из литературных данных следует, что высокая антагонистическая активность по отношению к патогенной и условнопатогенной микрофлоре, способность расти при низких температурах, продуцировать свободные жирные кислоты, аминокислоты, витамины, ферменты свидетельствуют о перспективности использования пропионовокислых бактерий как стартовых культур [35].

2.1.3 Расторопша

Расторопша пятнистая, или чертополох молочный (*Silybum Marianum*) – лекарственное и декоративное растение семейства астровых.

Родом расторопша с берегов Средиземного моря, откуда она и распространилась по всему земному шару.

Расторопша - однолетнее или двулетнее высокорослое растение (около 1,5м) с пёстрыми декоративными листьями. Прикорневые листья расторопши очень крупные (длиной 50см и более, шириной около 30см), продолговато-овальные, волнистые, с выемчатым краем и длинными колючками (посадив колючую расторопшу вдоль забора, получите двойную непролазную изгородь). Поверхность листьев расторопши тёмно-зелёная, глянцевая, покрытая узором из бело-перламутровых пятен. Расторопша украшает сад своими нарядными листьями весь сезон, а с середины лета до поздней осени растение ещё и постоянно цветёт [36].

Трубчатые цветки (малиново-лиловые или фиолетовые), собранные в круглые корзинки до 6см в диаметре, венчают концы побегов расторопши. В каждой корзинке образуется множество крупных семян. Плод расторопши – чёрно-жёлтая семянка с «хохолком» из волосков на конце (рис. 4).



Рис. 4. Расторопша пятнистая (*Silybum Marianum*)

Расторопша - засухоустойчивое и холодостойкое, нетребовательное к уходу растение; вырастить её несложно. Расторопша растёт быстро: к середине лета растение достигает максимальных размеров, зацветают корзинки на центральных стеблях. Цветение новых и новых раскрывающихся корзинок на побегах продолжается непрерывно, до самых морозов. Семена расторопши созревают с конца августа неравномерно, поэтому их сбор проводят в несколько сроков до октября. К уборке семян приступают, когда обёртки корзинок засыхают: корзинки срезаются, подсушиваются и из них вымолачивают семена. Сухие семена хранятся в мешочках в проветриваемом помещении (их всхожесть сохраняется до трёх лет) [37,38].

Корни расторопши для лечебных целей выкапывают осенью, промывают холодной водой и сушат при температуре 40-50 градусов. Можно хранить их один год.

Расторопша не поражается вредителями и болезнями.

В прошлом столетии в Мюнхенском институте фармацевтики был определён биохимический состав расторопши пятнистой. Оказалось, что она содержит редкое биологически активное вещество силимарин, а также многие другие лекарственные составляющие (всего около 200 ценных компонентов). Семена расторопши пятнистой содержат жирное масло (до 32%), эфирное масло (0,08%), смолы, слизь, биогенные амины (тирамин, гистамин), флаваноллигнаны (2,8-3,8%) – силибин, силидианин, таксифолин, силихристин; макроэлементы (мг/г): калий – 9,2, кальций – 16,6, магний – 4,2, железо – 0,08; микроэлементы (мкг/г): марганец – 0,1, медь – 1,16, цинк – 0,71, хром – 0,15, селен – 22,9, йод – 0,09, бор – 22,4 и др.

Расторопша считается сильным целебным растением по лечению болезней печени: цирроза, желтухи, поражений её от алкоголя, лекарств, токсинов, радиации. Применяется расторопша и при лечении холецистита, воспаления желчных протоков и желчекаменной болезни, болезни селезёнки, щитовидки, крови, отложения солей, расширения вен, отёков, водянки, ожирения, радикулита и суставных болей, геморроя, аллергических заболеваний [38,39].

В народной фитотерапии отвар корней расторопши применяют при зубной боли в виде полосканий, при поносе, задержке мочи, радикулите и судорогах.

Сок из листьев расторопши пьют при запорах, воспалении толстой кишки и слизистой оболочки желудка.

Мука из семян расторопши снижает показатель уровня сахара в крови, очищает даже сильно зашлакованную кровь, помогает излечить варикоз.

Не только больным, но и здоровым людям полезна расторопша: её употребление увеличивает способность печени очищать организм от токсинов.

Очень важное свойство расторопши – она не имеет противопоказаний и побочных действий.

Можно применять расторопшу в виде сухого порошка семян по 1 чайной ложке 3-4 раза в день до еды, запивая тёплой водой [40,41].

2.1.4 Спорыш

Эта травка застилает деревенские улицы полевые дороги берега рек, дворы, парки, стадионы. В народе ее называют куроедом, гусятником, птичьей гречихой. Но самое известное и распространенное название – спорыш (*Polygonum aviculare*).

Растение однолетнее. Прямостоячий ветвистый стебель. Невзрачные зеленые цветки сидят по 1-5 штук в пазухах листьев. Цветет с мая по

сентябрь. А осенью появляются у растения плоды - маленькие черные трехгранные орешки (рис. 5).

Поразительна у этой травы зависимость от условий произрастания. На скудных почвах она становится совсем маленькой, а на богатых - поднимается, образует плотный зеленый ковер. По краям старопахотных земель может так разрастись, что одно растение покажется целой куртиной.



Рис. 5. Птичий горец или спорыш (*Polygonum aviculare*).

Встречается спорыш практически по всей территории нашей страны. И лекарственные свойства, и терапевтический диапазон спорыша весьма широки [42].

С глубокой древности применяла народная медицина спорыш как вяжущее и кровоостанавливающее средство при поносах, язве желудка, болезнях печени, почек и мочевого пузыря. В некоторых странах настоями спорыша лечат туберкулез. В Болгарии кашлица из свежей травы применяется для лечения плохо заживающих ран.

В лечебных целях используют практически всю надземную часть растения. Собирают траву во время цветения. Скашивают спорыш косой или срезают серпом верхушки, стараясь не срезать грубых нижних листьев. Сушат на чердаках под железной крышей или под навесами с хорошей вентиляцией, раскладывая тонким слоем на бумаге и перемешивая. Хранят траву в бумажных пакетах в сухом прохладном помещении - до 3 лет [43,44].

Трава спорыша - кладовая ценных биологически активных веществ. В ней содержатся флавоноиды, витамины С, Е, К, провитамин А. Также содержит флавоноид авикулярин, аскорбиновую кислоту - до 0,9% на сухую массу, каротин, кремниевую кислоту и много ее растворимых соединений,

смолы, горечь, слизь, жиры, сахара, дубильные вещества - 0,35% и следы эфирного масла.

Препараты растения обладают вяжущими свойствами, вызывают сокращение матки, повышают скорость свертывания крови, обладают противовоспалительным, антимикробным, противогнилостным и мочегонным свойствами, уменьшают кровоточивость слизистых оболочек, умеренно снижают кровяное давление, ускоряют заживление ран, повышают иммунитет, увеличивают выведение из организма натрия и хлора, уменьшают кристаллизацию минеральных солей в мочевыводящих путях.

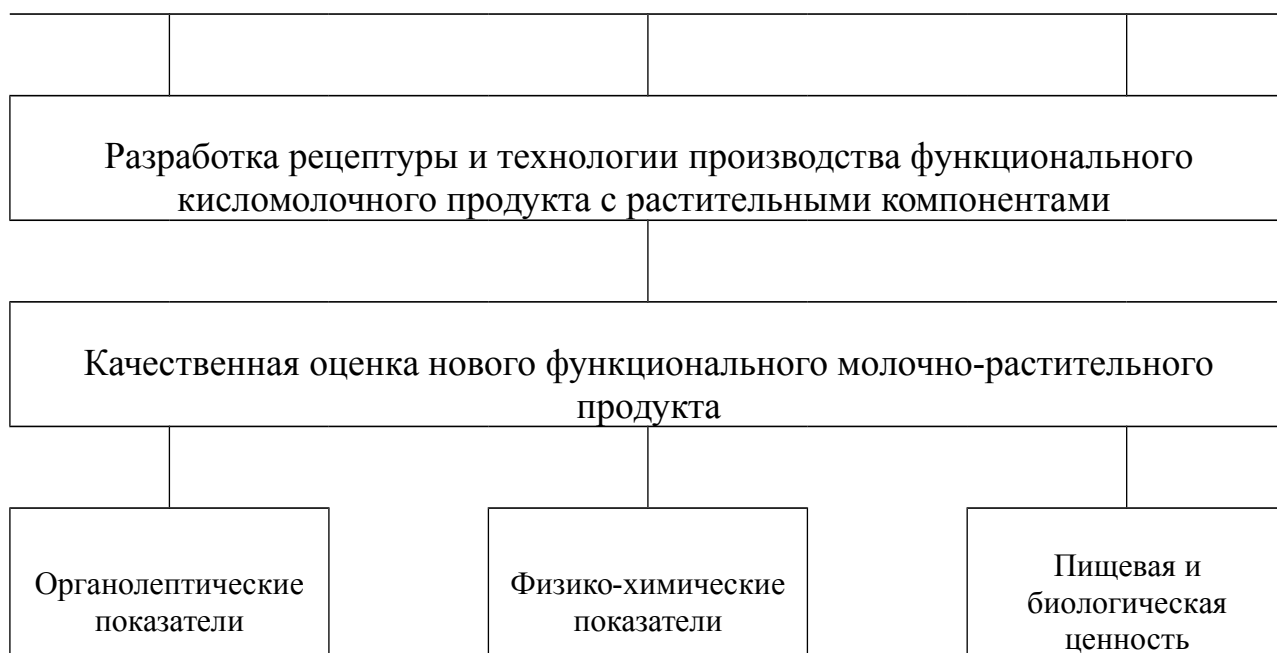
Препараты применяют как мочегонное, противовоспалительное, кровоостанавливающее средство. Они способствуют отхождению плотных, каменистых образований при мочекаменной болезни. Настои и отвары спорыша применяют при туберкулезе почек и легких, при кровотечениях после родов. Отвары рекомендуют для полосканий при воспалении полости рта и слизистой оболочки губ. Особенно эффективен спорыш при лечении нарушений солевого обмена. Эссенцию из свежей травы используют в гомеопатии [45,46].

В медицине применяется настой из травы при болезнях печени, почек, мочевого пузыря, почечных камнях, гастрите, язве желудка, геморрое, плеврите, туберкулезе легких (полагают, что растворимая кремневая кислота укрепляет легочную ткань). Галеновые препараты спорыша препятствуют образованию мочевых камней, обладают противовоспалительными антимикробным действием, уменьшают проницаемость стенок сосудов, повышают свертываемость крови, снижают давление и углубляют дыхание.

Настой травы горца птичьего применяют в качестве маточного кровоостанавливающего средства [47].

2.2 Схема эксперимента.





2.3 Методы исследований культивирования бифидобактерий и пропионовокислых бактерий на молочной среде с добавлением растительных компонентов.

2.3.1 Методы культивирования микроорганизмов.

Организация любого микробиологического процесса синтеза практически важных веществ начинается с изучения физиологии продуцента.

Необходимо изучить характер питания продуцента, а также влияние внешних факторов на состояние клеток и популяций. Вопросы эти выясняются путем оптимизации исследуемого процесса. Основой для этого является культивирование микроорганизмов в контролируемых и управляемых условиях.

Оптимизация давно существующих промышленных процессов начиналась с эмпирического подбора условий методом «проб и ошибок». При большой затрате времени и труда в конечном итоге устанавливали состав сред и режим культивирования, наиболее приемлемые экономически и, которые в дальнейшем также эмпирически возможно совершенствовать при ведении процесса в промышленном масштабе.

Долгое время не существовало иного способа культивирования микроорганизмов в лаборатории, кроме периодического: засев — размножение продуцента — съем выросшей культуры и выделение нужного продукта из клеток или из среды.

В промышленности с давних пор существовали и другие способы культивирования микроорганизмов: непрерывно-проточный метод получения этилового спирта из мелассы и проточный метод получения уксуса из спирта при помощи бактерий, иммобилизованных на твердой фазе — древесных стружках. Эти методы пришли в лабораторную практику на десятилетия

позже, когда появились новые технические возможности и новые взгляды на проблемы культивирования микроорганизмов [48].

Важной составной частью биотехнологии является генетическая инженерия. Родившись в начале 70-х годов, она добилась сегодня больших успехов. Методы генной инженерии преобразуют клетки бактерий, дрожжей и млекопитающих в "фабрики" для масштабного производства любого белка. Это дает возможность детально анализировать структуру и функции белков и использовать их в качестве лекарственных средств.

В настоящее время кишечная палочка (*E. coli*) стала поставщиком таких важных гормонов как инсулин и соматотропин. Ранее инсулин получали из клеток поджелудочной железы животных, поэтому стоимость его была очень высока. Для получения 100 г кристаллического инсулина требуется 800-1000 кг поджелудочной железы, а одна железа коровы весит 200 - 250 грамм. Это делало инсулин дорогим и труднодоступным для широкого круга диабетиков. В 1978 году исследователи из компании "Генентек" впервые получили инсулин в специально сконструированном штамме кишечной палочки. Инсулин состоит из двух полипептидных цепей А и В длиной 20 и 30 аминокислот. При соединении их дисульфидными связями образуется нативный двухцепочечный инсулин. Было показано, что он не содержит белков *E. coli*, эндотоксинов и других примесей, не дает побочных эффектов, как инсулин животных, а по биологической активности от него не отличается. Впоследствии в клетках *E. coli* был осуществлен синтез проинсулина, для чего на матрице РНК с помощью обратной транскриптазы синтезировали ее ДНК-копию. После очистки полученного проинсулина его расщепили и получили нативный инсулин, при этом этапы экстракции и выделения гормона были сведены к минимуму. Из 1000 литров культуральной жидкости можно получать до 200 граммов гормона, что эквивалентно количеству инсулина, выделяемого из 1600 кг поджелудочной железы свиньи или коровы.

Соматотропин - гормон роста человека, секретируемый гипофизом. Недостаток этого гормона приводит к гипофизарной карликовости. Если вводить соматотропин в дозах 10 мг на кг веса три раза в неделю, то за год ребенок, страдающий от его недостатка, может подрасти на 6 см. Ранее его получали из трупного материала, из одного трупа: 4 - 6 мг соматотропина в пересчете на конечный фармацевтический препарат. Таким образом, доступные количества гормона были ограничены, кроме того, гормон, получаемый этим способом, был неоднороден и мог содержать медленно развивающиеся вирусы. Компания "Genentec" в 1980 году разработала технологию производства соматотропина с помощью бактерий, который был лишен перечисленных недостатков. В 1982 году гормон роста человека был получен в культуре *E. coli* и животных клеток в институте Пастера во Франции, а с 1984 года начато промышленное производство инсулина и в СССР. При производстве интерферона используют как *E. coli*, *S. cerevisiae* (дрожжи), так и культуру фибробластов или трансформированных

лейкоцитов. Аналогичными методами получают также безопасные и дешевые вакцины.

На технологии рекомбинантных ДНК основано получение высокоспецифичных ДНК-зондов, с помощью которых изучают экспрессию генов в тканях, локализацию генов в хромосомах, выявляют гены, обладающие родственными функциями (например, у человека и курицы). ДНК-зонды также используются в диагностике различных заболеваний.

Технология рекомбинантных ДНК сделала возможным нетрадиционный подход "белок-ген", получивший название "обратная генетика". При таком подходе из клетки выделяют белок, клонируют ген этого белка, модифицируют его, создавая мутантный ген, кодирующий измененную форму белка. Полученный ген вводят в клетку. Если он экспрессируется, несущая его клетка и ее потомки будут синтезировать измененный белок. Таким образом можно исправлять дефектные гены и лечить наследственные заболевания.

Если гибридную ДНК ввести в оплодотворенную яйцеклетку, могут быть получены трансгенные организмы, экспрессирующие мутантный ген и передающие его потомкам. Генетическая трансформация животных позволяет установить роль отдельных генов и их белковых продуктов как в регуляции активности других генов, так и при различных патологических процессах. С помощью генетической инженерии созданы линии животных, устойчивых к вирусным заболеваниям, а также породы животных с полезными для человека признаками. Например, микроинъекция рекомбинантной ДНК, содержащей ген соматотропина быка в зиготу кролика позволила получить трансгенное животное с гиперпродукцией этого гормона. Полученные животные обладали ярко выраженной акромегалией.

Сейчас даже трудно предсказать все возможности, которые будут реализованы в ближайшие несколько десятков лет. К числу производственных относятся ПС, используемые при промышленном изготовлении медицинских биологических препаратов и контроле их качества. Среды для производства бактериальных препаратов в отличие от диагностических сред не должны содержать вредных для человека примесей и оказывать отрицательного влияния на процесс производства (не препятствуя, в частности, удалению из изготавливаемых препаратов продуктов микробного метаболизма, балластных органических и минеральных веществ).

По консистенции различают жидкие, плотные и полужидкие среды. Плотные и полужидкие ПС готовят из жидких посредством прибавления к ним агара или (реже) желатина. Агар-агар — полисахарид, получаемый из определенных сортов морских водорослей. Агар обычно вносят в концентрации 1—2% (при изготовлении полужидких сред — 0,2—0,4%), желатин — 10—15%. При t° 25—30° желатиновые среды плавятся, поэтому микроорганизмы на них выращивают преимущественно при комнатной температуре. В качестве плотных сред применяют также свернутую

сыворотку крови, свернутые яйца, картофель и среды, содержащие 1,5% силикагеля.

Признание идеи о том, что клетки тканей высших животных можно выделить из организма и затем создать условия для роста и воспроизводства их *in vitro*, датируется первым десятилетием XX века. После того как стало известно, что подобные процессы реальны, наступил второй этап работ, начало которому положила демонстрация возможности выращивания и репродукции в таких клетках фильтрующихся инфекционных агентов—вирусов. Третий этап истории начинается со времени, когда была показана практическая возможность получения в клетках животных больших количеств вирусного материала для применения в вакцинных препаратах, и простирается до времени, когда: 1) стало возможным вставить в клетки специфические экзогенно полученные гены и получить их экспрессию и 2) подтверждена возможность выращивания в культуре из одиночной клетки целой популяции. Когда такие популяции получали из клетки, выделявшей в окружающую среду антитела, то все молекулы антител в надосадочной жидкости были одинаковыми. Причины и следствия этих двух феноменов в настоящее время интенсивно исследуются и они знаменуют собой начало четвертого этапа работ в данной области.

Чтобы показать способность клеток животных расти и делиться в культуре, потребовалось овладеть рядом подходов и методик. Особенности их приведены ниже.

1. Методики получения клеток, свободных от экзогенных прокариотов и грибов.

2. Методики разработки среды, в которых рост «вырезанных из ткани» или изолированных клеток не подавляется.

3. Методики наблюдения за клетками в динамике их развития.

4. Методики непрерывного культивирования культур клеток животных *in vitro* и поддержания их свободными от других биологических агентов.

Научную основу для разработки этих методик составляет представление о клетке как основном структурном элементе живых организмов животного и растительного происхождения. Идея о том, что клетки тканей животных можно выделить из организма и затем создать условия для роста и воспроизводства их *in vitro* возникла на базе концепции, принадлежащей Клоду Бернару. Он предположил, что не только живые организмы способны сохранять постоянство внутренних условий, вне зависимости от изменений в окружающей среде. Клетка вне организма животного тоже будет стремиться поддерживать свои внутренние условия. Если различия между внутренними и внешними условиями будут незначительными, то высока вероятность роста и деления клетки. Такое понимание явления приводит к необходимости разработки сред, способных поддерживать и стимулировать рост клеток вне организма.

Чуть позже, в 1885 году, У. Ру (W. Roux) показал возможность сохранения вне организма живых тканей на практике. Он сохранял в жизнеспособном состоянии оболочку куриного эмбриона в теплом

физиологическом растворе. Впоследствии он стал автором, активно публиковавшимся по проблемам эмбриологии *in vitro*. Позднее, в 1897 г., Лёб (Loeb) поддерживал в жизнеспособном состоянии клетки крови и соединительной ткани в пробирках с сывороткой и плазмой крови. Льюнгрен (1898) показал возможность поддержания эксплантатов кожи человека в жизнеспособном состоянии в кислой среде с сохранением способности к реимплантации. Дополнительные эксперименты были проведены Джолли (1903), наблюдавшим деление клетки в висячей капле, содержащей лейкоциты саламандры, а Биб и Эвинг (1906) подтвердили это при пересадке лимфосаркомной ткани собаки.

Продолжая работы Ру, Росс Харрисон усовершенствовал методику «висячей капли». Он использовал небольшие кусочки ткани, отторгнутые от медуллярного сосуда лягушки к внедренные в ее лимфатический тромб, и выдерживал их в виде капли на нижней стороне покровного стекла, расположенного поверх углубления в предметном стекле. В 1907 г. ему удалось наблюдать с помощью такой «камеры» рост нервных клеток в течение нескольких недель; он установил, что скорость роста этих клеток составляет 20 мкм за 25 мин. В то время как эксперименты Харрисона были направлены на то, чтобы получить ответы на вопросы, относящиеся к физиологии нервных клеток лягушки, методика, которой он пользовался, была применена Барроузом для других клеток тканей теплокровных животных. Этот исследователь в 1910 г. вместо лимфатического тромба использовал тромб плазмы курицы.

В 1913 г. Алексис Каррель применил плазму крови, обогащенную экстрактом эмбриона. Добавка такого экстракта ускоряла рост тканей. Примененная методика обеспечивала значительно большую вероятность успеха, чем та, которую использовали Левис (1911) и Рид (1908 г.). Рид готовила культуры клеток из костного мозга морской свинки и пыталась выращивать эксплантаты на среде определенного химического состава. Работа Карреля привлекла большое внимание, так как она была опубликована под интригующим названием — культивирование «бессмертных» клеток. Инкубация клеток сердца куриного эмбриона была начала 17 января 1912 г. Пересев клеток продолжил Эблинг, как он сам заявлял, работая с ними 34 года. Поскольку Каррель был хирургом и весьма сведущим в вопросах асептики, он смог внести существенный вклад в культивирование клеток животных *in vitro*. В то же время организация и технические условия проводимых экспериментов были очень громоздкими. Ассистенты Карреля были одеты в длиннополые резиновые халаты темного цвета с капюшонами для полного прикрытия головы. Процедуры были длительными и отягощенными многими деталями. В результате тех требований, которые выдвигались автором в отношении сложных мер предосторожности для предотвращения контаминации, вокруг данного предмета создавалась атмосфера таинственности и исключительности, что скорее тормозило прогресс, чем способствовало ему. Тем не менее им было достигнуто многое. В частности, даже при отсутствии антибиотиков он добился успеха в

пересадке клеток, используя хирургическую технику для отторжения отдельных колоний и переноса их в новые условия роста. Каррель также продемонстрировал своим коллегам научное значение тех наблюдений, которые могут быть сделаны в процессе пересадки клеток.

В ходе проделанных работ был внесен ряд поправок в рецептуру среды культивирования. В частности, Тирод модифицировал раствор Рингера и в дополнение к куриной сыворотке и эмбриональному экстракту стал использовать коагулят фибрина. Для наблюдения за делящимися клетками животных Канти в 1928 г. разработал метод кинофотомикрографии. В этот же период был разработан дополнительный и очень существенный подход в технике работы с клетками. Имеется в виду применение трипсина для высвобождения клеток из тканевой матрицы, в которой они находятся. Однако эта методика не находила признания до тех пор, пока в 1937 г. Симмс и Стилман использовали ее для пассирования клеток между культурами плазмы. Эта методика дает возможность успешно применять в культурах индивидуальные клетки, а не ткани.

Первые клоны клеток в культуре из одиночной клетки были получены Эрлом с сотрудниками в 1948 году. Игл (1955) систематически исследовал пищевые потребности клеток в условиях. До тех пор пока в 1961 г. Хейфлик и Мурхед не выделили линию диплоидных клеток человека (НДС) WI-38, считалось, что один раз установившаяся клеточная линия имеет неограниченное время жизни. Относительно линии WI-38 было показано, что период ее существования в культуре ограничивается приблизительно 50 удваиваниями популяции. Перед отмиранием популяции для клеток этой линии характерен феномен старения. Однако при отмирании эти клетки оставались диплоидными и не имели признаков злокачественных изменений. Клетки, выделенные из раковых опухолей или трансформированные в ходе культивирования, характеризуются «бессмертностью» и коррелируют с гетероплоидностью. Первые суспензионные культуры клеток животных, как правило, основывались на клетках злокачественных тканей. Это — клетки HeLa, выделенные из раковой опухоли шейки матки человека. Перевиваемая линия карциномы шейки матки была выделена еще в 1952 году Джемс с сотрудниками, она используется и в настоящее время во многих лабораториях мира.

Последующий этап в истории культивирования диплоидных клеток человека связан с установлением факта, что они являются генетически стабильными и свободными от всех известных латентных и онкогенных вирусов. Поэтому линии диплоидных клеток человека разрешено применять для получения продуктов, предназначенных для людей. Эта догма остается действующей и в настоящее время, хотя новейшие открытия отчетливо показали присутствие в клетках, выделенных из нормальных тканей, потенциальных онкогенов, идентичных тем, которые найдены в таких известных онкогенных вирусах, как вирус саркомы Рауса и вирус саркомы Молони. Раус еще в 1910 году индуцировал опухоль, используя профильтрованный экстракт куриной опухоли. Эта опухоль была

индуцирована РНК-вирусом (вирус саркомы Рауса). Позднее было установлено, что ряд вирусов способен индуцировать возникновение опухолей, такие вирусы были названы онкогенными.

По составу ПС делят на простые и сложные.

Простые ПС обеспечивают питательные потребности большинства патогенных микроорганизмов (мясопептонный бульон, мясопептонный агар, бульон и агар Хоттингера, питательный желатин, пептонная вода и др.).

К сложным относят специальные среды для микробов, которые не растут на простых ПС. Такие среды готовят, прибавляя к простым средам кровь, сыворотку, углеводы и другие вещества, необходимые для размножения того или иного микроорганизма. Сложными ПС являются и дифференциально-диагностические среды, например среды Гисса с углеводами и индикатором, применяемые для определения видовой принадлежности исследуемого микроба по его ферментативной активности.

Некоторые сложные среды, так называемые селективные, или элективные, используют для целенаправленного выделения одного или нескольких видов микроорганизмов путем создания оптимальных условий их выращивания и угнетения роста сопутствующей микрофлоры. Например, висмут-сульфитный агар — строго селективная среда для выделения сальмонелл, агар и среда Левина — слабоселективные среды для выделения энтеробактерий [50].

2.3.2 Методы идентификации микроорганизмов.

Чистой культурой называют такую культуру, которая содержит микроорганизмы одного вида. Выделение чистых культур бактерий — обязательный этап бактериологического исследования в лабораторной диагностике инфекционных болезней, в изучении микробной загрязненности различных объектов окружающей среды, и, в целом, при любой работе с микроорганизмами. Исследуемый материал обычно содержит ассоциации микробов.

Выделение чистой культуры позволяет изучить морфологические, культуральные, биохимические, антигенные и другие признаки, по совокупности которых определяется видовая и типовая принадлежность возбудителя, то есть производится его идентификация.

Для идентификации бактерий широко используют окраску по Грамму, которая сразу разделяет бактерии на две большие группы и отличает их от эукариотов. Некоторые организмы лучше всего идентифицируются с помощью других методов крашения, например, кислотоустойчивые бактерии (*Mycobacteria*, *Nocardia*) лучше всего идентифицируются с помощью крашения за Зелий-Нельсеном или подобных методик. Другие организмы может быть нужно идентифицировать с помощью возделывания их в специальной среде, или другими, например, серологическими методами.

Методы культур позволяют выявить рост только определенного вида или группы бактерий, ограничивая рост других бактерий в образце. Часто эти

методы разрабатываются для специфических образцов. Образцы, которые по обыкновению стерильные, например, кровь, моча или спинная жидкость, культивируются при условиях, созданных, чтобы вырастить все возможные организмы. Как только безвредный организм будет изолирован, он может быть охарактеризован окрашиванием, за своей морфологией и метаболизмом (например, аэроб или анаэроб) и гемолитическими свойствами.

Как с классификацией бактерий, для отождествления бактерий все больше используются молекулярные методы. Диагностика с помощью таких, основанных на ДНК, методов, например, полимеразной цепной реакции, наращивая популярность благодаря ее специфичности и скорости, сравнительно с методами, основанными на культуре.

Окраска по Грамму.

Метод Грамма — метод окраски микроорганизмов для исследования, позволяющий дифференцировать бактерии по биохимическим свойствам их клеточной стенки. Предложен в 1884 году датским врачом Г. К. Граммом.

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

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

Грамотрицательные Гр(–) микроорганизмы образуют с основными красителями и йодом легко разрушающееся под действием спирта соединение. В результате микробы обесцвечиваются, а затем окрашиваются фуксином, приобретая красный цвет.

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

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

Различают физический способ фиксации, в основу которого положено воздействие высокой температуры на микробную клетку, и химические способы, предусматривающие применение химических средств, вызывающих коагуляцию белков цитоплазмы.

Физический способ фиксации. Предметное стекло с препаратом берут пинцетом или I и II пальцами правой руки за ребра мазком кверху и плавным

движением проводят 2—3 раза над верхней частью пламени горелки. Весь процесс фиксации должен занимать не более 2 с.

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

Химический способ фиксации. Для фиксации мазков применяют метиловый спирт, ацетон, смесь Никифорова (смесь этилового спирта 96% и наркозного эфира в соотношении 1:1), жидкость Карнуа (этилового спирта 96% — 60%, хлороформа 30%, ледяной уксусной кислоты 10%), спирт-формол (40% формалин 5 мл, этиловый спирт 96° - 95 мл). Предметное стекло с высушенным мазком погружают в склянку с фиксирующим веществом на 10—15 минут и затем высушивают на воздухе. Применяется также фиксация в парах 40% формалина в течение нескольких секунд.

Процесс окрашивания мазков. На фиксированный мазок наливают один из основных красителей на 2—3 минуты. Во избежание осадков окрашивают через фильтровальную бумагу. Сливают краску, аккуратно удаляют фильтровальную бумагу. Мазок заливают раствором Люголя или йодистым раствором по Грамму (водный раствор йодида калия и кристаллического йода в соотношении 2:1) на 1—2 минуты до почернения препарата.

1. Раствор сливают, мазок прополаскивают 96° этиловым спиртом или ацетоном, наливая и сливая его, пока мазок не обесцветится и стекающая жидкость не станет чистой (приблизительно 20—40—60 секунд).

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

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

4. Промывают в проточной воде и высушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопия. При изучении морфологии микробных клеток используют различные виды микроскопии, поскольку глаз человека устроен так, что не может отчетливо разглядеть мелкие предметы.

Невооруженным глазом рассматриваются предметы чаще всего с расстояния так называемого лучшего видения ~ 250 мм. При нормальной остроте зрения глаз может на этом расстоянии различать детали размером не менее 0,15 мм. Размеры микробных клеток могут быть менее 0,1 мм. Для наблюдения более мелких деталей необходимо использование специальных средств. Такими средствами являются лупа и микроскоп [50,51].

Приготовление препаратов для микроскопирования. Для этого капля пробы помещается на предметное стекло и накрывается покровным стеклом. Предметное стекло представляет собой стеклянную пластинку размером 76x26 мм и толщиной не более 1,1 мм. Покровные стекла тонкие (толщина 0,15-0,17 мм), квадратные и небольших размеров (18x18 или 24x24 мм). Новые предметные и покровные стекла кипятят в мыльной дистиллированной воде 10 – 20 минут, затем промывают водопроводной

водой, ополаскивают дистиллированной водой, сушат или протирают полотняной тканью. Предметные и покровные стекла хранят сухими в закрытой посуде или в 95%-ном спирте.

Перед приготовлением препаратов микробиологический стол протирают от пыли ватным тампоном, смоченным спиртом. Руки моют и также протирают спиртом. Предметные и покровные стекла достают из спирта пинцетом, протирают чистой мягкой тканью или фильтровальной бумагой и досушивают в пламени спиртовки.

Приготовление препаратов живых микроорганизмов. Для определения формы микроорганизмов, их подвижности, физиологического состояния готовят препараты живых микроорганизмов и ведут прижизненное наблюдение.

1. Приготовление препарата для наблюдения в раздавленной капле.

На чистое предметное стекло стерильной петлей помещают каплю исследуемой жидкости и накрывают покровным стеклом. При опускании покровного стекла на каплю следует прикоснуться ребром его к краю капли и, постепенно наклоняя, опустить. Иногда под стеклом остаются пузырьки воздуха. Если пузырьки воздуха единичные, то они не мешают микрокопированию и ими можно воспользоваться при отыскании мелких микроорганизмов в поле зрения микроскопа. Если пузырьков воздуха много, то препарат следует переделать. Капля должна быть небольшой, чтобы жидкость не выступала за края покровного стекла. Излишек жидкости, вышедшей из-под покровного стекла, удаляют полосками фильтровальной бумаги.

Если рассматривают культуру, выросшую на плотной питательной среде, то на чистое предметное стекло наносят каплю водопроводной воды и в нее вводят иглой небольшое количество исследуемой культуры. Приготовленный препарат рассматривают под микроскопом.

2. Приготовление препарата для наблюдения в висячей капле.

Для этого используют предметное стекло со специальным углублением, с луночкой. Висячей каплей удобнее пользоваться для наблюдения-подвижности микроорганизмов, размножения, прорастания спор. Препарат готовят так: в центр покровного стекла помещают небольшую каплю жидкости с микроорганизмами, покровное стекло с каплей культуры накрывают предметным стеклом с лункой, предварительно смазав ее края тонким слоем вазелина, предметное стекло осторожно прижимают к покровному и быстро перевертывают препарат.

Приготовление препаратов для изучения клеточных структур. Микроорганизмы можно наблюдать в неокрашенном виде и с прижизненной окраской. Для этого используют малоцентрированные растворы различных красок, которые не оказывают на микроорганизмы губительного действия, дифференцированно окрашивают содержимое клетки и способствуют более точному изучению формы клеточных структур. Для прижизненной окраски дрожжей и бактерий применяют нейтральную красную, метиленовую синюю, нейтральную фиолетовую, зеленый янус,

эозин и эритрозин в очень незначительных концентрациях— от 0,001 до 0,0001%. Окрашенный препарат готовят введением под покровное стекло небольшой капли раствора красителя или микроорганизмы вносят в каплю краски на предметном стекле, после чего каплю накрывают покровным стеклом.

Препараты убитых микроорганизмов. Такими препаратами пользуются в тех случаях, когда необходимо рассмотреть детали строения клеток (ядро, включения, споры), произвести подсчет микроорганизмов и т. д. Для этого микроорганизмы фиксируют на предметном стекле и окрашивают. Приготовление препарата состоит из ряда операций.

Каплю с микроорганизмами петлей распределяют возможно более тонким слоем на обезжиренном предметном стекле площадью около 4 см². Можно приготовить мазок, пользуясь стеклом со шлифованным краем, которое для распределения капли передвигают вдоль предметного стекла. Затем препарат высушивают при комнатной температуре. Для ускорения высушивания препарат мазком вверх осторожно прогревают над пламенем горелки. Следующая важная операция — фиксация, целью которой является убить микроорганизмы и закрепить их на стекле. Существует много способов фиксации. Простейшим из них является фиксация пламенем. Для этого препарат медленно 3—4 раза проводят над верхней частью пламени горелки таким образом, чтобы сильно нагреть нижнюю поверхность стекла, чем и достигается фиксация.

Для фиксации микроорганизмов также широко применяют растворы различных химических веществ:

1. этиловый спирт (96%) в течение 5—20 мин;
2. смесь равных объемов этилового спирта и эфира — 5 мин;
3. метиловый спирт — 5 мин;
4. смесь формалина (5 мл) со спиртом (95 мл) — 2 мин и др.

На фиксированный препарат наносят раствор какого-либо красителя в зависимости от цели исследования.

Прямое флуорохромирование — это непосредственная окраска живых или фиксированных микроорганизмов флуоресцирующими красителями, такими, как берберин-сульфат, акридин оранжевый, ауорофосфин, нейтральная красная, примулин и др. Они объединяются по двум признакам:

1. по способности ярко люминесцировать в сине-фиолетовых или ультрафиолетовых лучах;
2. по избирательному связыванию с определенными тканевыми или клеточными элементами.

При окраске для наблюдений за формой микроорганизмов применяют водно-спиртовые растворы метиленовой синей или метиленовой фиолетовой (насыщенный спиртовой раствор, разведенный в 5—10 раз водой). Окрашивание длится 3—5 мин. после чего краску сливают, препарат промывают легкой струей дистиллированной или водопроводной воды и высушивают. На сухой мазок наносят каплю воды, накрывают стеклом и

микроскопируют. Если для исследования пользуются иммерсионной системой, то иммерсионное масло наносят непосредственно на сухой мазок.

Окраска клеточных включений. Каплю исследуемой жидкости смешивают на предметном стекле с каплей, водного раствора красителя, накрывают покровным стеклом и через 5 мин микроскопируют. При прижизненной окраске волютин чаще всего образует зерна в вакуолях. При окраске нейтральной красной и метиленовой синей (растворы 1 : 5000) волютин в вакуолях клеток дрожжей выпадает в виде ярко окрашенных красных или синих шариков. При окраске фиксированного препарата метиленовым синим волютиновые зерна приобретают фиолетовый или фиолетово-красный цвет, а цитоплазма клетки окрашивается в голубой.

Хорошо окрашиваются также включения молочнокислых бактерий—палочек. Для наблюдений живых микроорганизмов готовят 0,01%-ные и 0,001%-ные водные растворы красок. Для этого 10 мг сухой краски растворяют в 1 л дистиллированной воды. Для окраски фиксированных препаратов готовят растворы в соотношении 1 : 40 (1 мл насыщенного спиртового раствора краски смешивают с 40 мл воды). Гликоген почти всегда содержится в клетках микроорганизмов в виде включений или в растворенном состоянии в цитоплазме. Характерной для него является окраска йодом в красно-бурый цвет. Для обнаружения гликогена на фиксированных препаратах используют крепкий раствор йода (7 г йода + 20 г йодистого калия + 100 мл дистиллированной воды). Препарат рекомендуется предварительно обезжирить, можно при фиксировании в смеси спирта с эфиром 1 : 2.

Для прижизненного окрашивания микроорганизмов, используют раствор Люголя (0,33 г йода кристаллического + 0,66 г йодистого калия + 100 мл воды дистиллированной). Сначала в 10 мл воды растворяют йодистый калий, затем — йод и доливают водой до 100 мл.

Жир в клетках микроорганизмов чаще всего встречается в виде липопротеидных телец. Для окраски жира используют раствор 0,1 г судана (судан III) в 20 мл 95%-ного спирта или в концентрированной молочной кислоте. К капле густой суспензии микроорганизмов на предметном стекле добавляют каплю 40%-ного формалина и оставляют на 5 мин. К фиксированному таким образом препарату прибавляют каплю раствора метиленовой синей (1 : 40) и оставляют на 10 мин. Затем добавляют каплю свежеприготовленной смеси равных объемов спиртового раствора Судана и воды. Плазма окрашивается в синий цвет, капли жира в розовый, а вакуоли остаются бесцветными.

Сера может быть, в клетках в виде полужидких маслянистых капель, сильно преломляющих свет. Чтобы убедиться, что клетки дрожжей содержат элементарную серу, их следует высушить, затем растворить капли серы в сероуглероде или безводном спирте, или в растворе гидроксида калия и соды (в последней при нагревании). Обработав препарат высокой температурой, затем в течение 1 мин концентрированной пикриновой кислотой, после

промывания водой можно наблюдать кристаллизацию серы в виде одноклиномерных кристаллов, чаще расположенных вне клеток [51].

Биохимические методы идентификации бактерий.

Способность к ферментации углеводов у бактерий оценивают по изменению окраски среды вследствие образования органических кислот (соответственно, происходит уменьшение pH), вызывающих изменение окраски индикатора.

Для определения сахаролитической активности применяют среды Хисса: в их состав входят 1% пептонная вода (или МПБ), индикатор Андраде и один из углеводов. При расщеплении углевода происходит изменение цвета среды с жёлтого на красный. Поскольку бактерии различают по способности ферментировать те или иные углеводы, то ряды пробирок приобретают пёстрый вид. Поэтому этот набор сред и называют «пёстрый» (или цветной) ряд. Также для определения способности микроорганизмов ферментировать углеводы с образованием кислоты и газа в сосуды со средами вносят стеклянные поплавки (запаянные с одного конца короткие трубочки), всплывающие после наполнения их газом.

Некоторые бактерии проявляют протеолитическую активность, выделяя протеазы, катализирующие расщепление белков. Наличие протеолитических ферментов из группы коллагеназ определяют при посеве уколом в МПЖ. При положительном результате наблюдают его разжижение в виде воронки либо послойно сверху вниз. Способность к расщеплению белков и аминокислот также можно оценивать по изменению окраски среды, так как образующиеся продукты — аммиак, индол и сероводород — сдвигают pH в щелочную сторону, вызывая изменение окраски индикатора.

Для определения способности к образованию NH_3 проводят посев в МПБ, и между его поверхностью и пробкой закрепляют полоску лакмусовой бумаги. При положительном результате бумажка синееет. Образование индола и H_2S . Обычно для определения способности к образованию индола и сероводорода также проводят посев в МПБ, между его поверхностью и пробкой закрепляют бумажки: в первом случае пропитанные раствором щавелевой кислоты (при образовании индола бумажка краснеет), во втором — раствором ацетата свинца (при образовании H_2S бумажка чернеет). Также используют специальные среды, содержащие индикаторы (например, среда Клиглера), либо их вносят непосредственно в среду после регистрации видимого роста бактерий [48,50].

2.4 Экспериментальные исследования.

Экспериментальная часть исследований проводилась в лаборатории кафедры «Прикладная биотехнология» при Инновационном Евразийском университете. Основными этапами проведения эксперимента являются:

1. Выбор цели эксперимента;
2. Выбор исходных данных;

3. Планирование;
4. Выбор оборудования;
5. Проведение эксперимента;
6. Обработка результатов;
7. Анализ результатов.

Выбор цели эксперимента. Значение выбора цели всегда является очень значимой и существенной задачей при проведении эксперимента и сказывается на всех последующих этапах и аспектах планирования и анализа эксперимента. В первом приближении, имеется в виду упрощенный эксперимент, когда целью эксперимента является оценка состояния технологического процесса как физической системы, находящейся в n -числе состояний, максимальная полученная информация I может быть определена как:

$$I = \lg 2n; \quad (6.1)$$

Затраты на эксперимент в этом случае зависят от числа состояний системы, то есть технологического процесса. При исследовании систем с множеством различных факторов, влияющих на процесс работы системы, механизмы работы которых далеко не полностью известны, эксперимент может расчленяться на ряд более простых экспериментов, проводимых при определенных уровнях одних факторов с целью изучения влияния других. Общий результат оценивается не непосредственно, а по совокупности параметров, полученных после обработки данных. Такой эксперимент требует внушительных затрат времени, вовлечения значительных технических и материально-финансовых средств.

Основные разновидности эксперимента по характеру цели его проведения следующие:

1. выяснение механизма явления - построение математической модели явления, процесса;
2. уточняющий - уточнение параметров математической модели процесса;
3. экстремальный - определение условий ведения процесса, удовлетворяющего некоторым критериям оптимальности;
4. сравнительный - обоснование выбора из ряда возможных процедуры или метода проведения эксперимента;
5. отсеивающий - оценка факторов и исключение из модели процесса несущественных;
6. контрольный - оценка соответствия параметров продукции заданным требованиям на нее.

Выбор исходных данных заключается в выборе набора варьируемых (или учитываемых) факторов и отклика, в выборе модели или семейства моделей, потенциально пригодных для описания исследуемого объекта или процесса. При этом определяется возможность измерения отклика, точность измерения. Если отклик неизмерим, то следует определить, из каких измеренных выходных переменных он может быть определён путём обработки. Оцениваются также диапазоны варьирования факторов,

определяются условия влияния факторов на отклик и отсеиваются те, которыми можно пренебречь, и те, которые следует стабилизировать и т.д.

Планирование является основным этапом работы. При планировании определяется:

1. последовательность проведения опытов;
2. число повторных опытов или объём выборки экспериментальных образцов;
3. определяется количество и конкретные значения уровней факторов;
4. оценивается точность задания уровней факторов.

Полное число возможных вариантов опытов определяется как:

$$N = P^k; (6.2)$$

где k – число факторов, P – число уровней, на которых варьируется каждый фактор. Например, если число уровней 5 при числе факторов тоже 5, то для перебора всех вариантов нужно провести 3125 опытов, а при 10 факторах и 4 уровнях число опытов превысит миллион.

На стадии планирования формируются требования к характеристикам используемого оборудования и приборов, определяются способы обработки результатов, разрабатываются методики измерения факторов и отклика. Весь процесс планирования должен проводиться под знаком эффективности, то есть сравниваться то, что необходимо получить с тем, чем располагаем.

Выбор оборудования (измерительных приборов, устройств задания влияющих факторов, материалов, комплектации и т.п.) связан с учётом требований к диапазонам варьируемых факторов в процессе эксперимента, интервалов между уровнями внутри диапазонов, к быстродействию (динамике проведения процесса) и т. п. Точность используемых приборов и оборудования должна соответствовать требуемой достоверности ведения процесса и не всегда должно быть стремление к максимальной точности, чтобы не повысить затраты на более дорогое оборудование или временные затраты на проведение повторных опытов.

Проведение эксперимента осуществляется в соответствии с разработанным планом. Набор значений уровней факторов и откликов документируются, может проводиться первичная обработка данных. В основном осуществляются автоматизированное управление экспериментом с использованием средств вычислительной и техники, а в последнее время ПЭВМ.

Обработка результатов связана с построением функции преобразования исследуемого объекта, оценкой её параметров, оценкой погрешности или коррекцией результатов эксперимента, построением спектральных, корреляционных характеристик исследуемых процессов. Значения откликов при этом должны быть адекватны данным алгоритма обработки.

Анализ результатов проводится с целью интерпретации и принятия решений по соответствию исследуемого процесса реальному технологическому процессу. При этом могут быть решения о прекращении

эксперимента ,либо продолжении, изменении направления ведения и объёма эксперимента, приёмки и отбраковки продукции и т.п.

К выбору вида модели.

Наличие и полнота априорной информации об объекте или техпроцессе определяют выбранную модель для описания ведения процесса. В большинстве случаев при отсутствии априорной информации используют простейшую линейную модель, а именно:

$$Y = a_0 + a_1x_1 + \dots + a_kx_k ; (6.3)$$

где $x_1, \dots, x_k$ - учитываемые факторы,

$a_0, a_1, \dots, a_k$ –параметры модели ,подлежащие определению в процессе эксперимента.

При учёте эффектов взаимодействия факторов, когда результирующий эффект от действия двух или нескольких факторов в отдельности не равен сумме эффектов от действия каждого фактора ,то используется модель:

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum b_{ij} x_i x_j x_0 + \dots (6.4)$$

а для $k=2$ имеем :

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2$$

Большое число закономерностей в различных областях техники , технологий и науки описываются следующим соотношением:

$$Y = a_0 x_1^{a_1} x_2^{a_2} \dots x_k^{a_k} (6.5)$$

Данная модель после логарифмирования легко сводится к линейной модели:

$$\ln y = \ln a_0 + a_1 \ln x_1 + \dots + a_k \ln x_k (6.6)$$

Или

$$Y = A_0 + a_1X_1 + \dots + a_kX_k (6.7)$$

где $Y = \ln y, X_k = \ln x_k, A_0 = \ln a_0$

Кроме рассмотренных используются и другие модели описания результатов экспериментальных исследований технологических процессов. Для представления данных в областях экстремумов используются модели второго порядка ,реже модели более высоких порядков.

Размерность модели. Установление степени детализации описания исследуемого объекта, процесса, определяется выбором размерности модели и состоит в определении числа факторов ,варьируемых в процессе эксперимента и входящих в модель. При исследовании технологических процессов в микроэлектронике, в системах автоматизации и контроля технологических параметров простой перечень всех потенциально влияющих факторов может оказаться достаточно огромным. Поэтому планирование и проведение эксперимента с учётом всех факторов приводит к значительным, порою необоснованным затратам времени и средств при низкой эффективности. В связи с этим первым критерием отбора переменных служит критерий здравого смысла, основанный на априорном анализе изучаемых явлений или объектов, аналогичных существующим до настоящего времени и особенностей задач ,стоящих перед экспериментом. На следующем этапе приближенную оценку значимости факторов можно

провести путём постановки серии однофакторных экспериментов, в каждом из которых варьируется лишь один фактор, а все остальные занимают нижние уровни диапазонов их изменения. В простейшем случае варьируют факторы только на двух уровнях, соответствующих максимальному и минимальному значениям диапазонов их изменения. В результате этих экспериментов определяются выборочные значения коэффициентов влияния β_i по каждому i – му фактору. Зная дисперсии значений факторов σ^2_i , можно оценить вклад, вносимый каждым фактором в общую дисперсию результата:

$$D_i = \beta_i^2 \sigma^2_i \quad (6.8)$$

Тогда относительное значение вклада каждого i – го фактора в общую дисперсию D :

$$D_i / \beta_i^2 \sigma^2_i$$

Экспериментатор принимает решение об учёте или отбрасывании соответствующего фактора. Такой приём используется при решении линейных задач. Однако следует заметить, что при построении автоматических систем контроля, в состав которых входят различные датчики и электронные преобразователи, практически всегда имеем дело с линейными, а вернее квазилинейными задачами.

Отбор значимых или доминирующих факторов можно провести путём анализа так называемых диаграмм рассеяния. Для построения диаграмм рассеяния проводят многофакторный эксперимент, каждый фактор которого варьируют в двух уровнях, причём значения уровней факторов устанавливается случайным образом. Результаты эксперимента представляют в виде следующей таблицы.

В таблице общее число опытов $n = 2^k$, где k – число факторов. Если число факторов $K \geq 5$, то число опытов можно сократить до 2^{k-1} или даже до 2^{k-2} .

Для этого по оси абсцисс отмечаем верхние и нижние уровни каждого фактора. Затем для каждого фактора наносим на диаграмму все n экспериментальных точек; при этом экспериментальные точки оказываются разделенными на две совокупности, соответствующие верхнему и нижнему значениям фактора. Относительное смещение этих двух совокупностей является мерой влияния соответствующего фактора.

Количественное значение смещения проще всего оценить по разнице медиан или среднего значения, причём медиану определяют как значение параметра, относительно которого располагается одинаковое количество экспериментальных точек. Следовательно медиану можно определить непосредственно по диаграмме. Если имеется существенное различие в значениях медиан, то влияние соответствующего фактора существенно и его следует отнести к категории значимых.

По диаграмме, показанной на Рис.5.1 к значимым факторам можно отнести факторы А и С; факторы В, Е и F незначимы, их влияние пренебрежимо мало. Фактор D можно отнести как к значимым, так и несущественным, экспериментатор принимает соответствующее решение,

исходя из характера задачи и собственного опыта. В сомнительных случаях фактор целесообразно отнести к категории значимых, а уточнение провести на более поздних стадиях ,используя регрессионный анализ результатов эксперимента.

Обоснованное уменьшение числа учитываемых факторов приводит к более дешевому и компактному эксперименту, позволяющему получить тот же объём полезных знаний ,данных .В тоже время необоснованное исключение существенных факторов приводит к увеличению дисперсии результатов ,а в ряде случаев и к неправильной интерпретации полученных данных.

Определение объёма экспериментальных данных. Объём определяется общим числом опытов ,проводимых в процессе эксперимента. Объём испытаний зависит от размерности модели ,которая определяет число параметров ,подлежащих определению по результатам эксперимента. Для К-факторной модели нужен минимум К+1 опыт по числу оцениваемых параметров. Объём испытаний зависит также от требуемой достоверности получаемых оценок параметров, что связано либо с многократным повторением экспериментов либо с увеличением числа экспериментальных образцов. Например ,если среднеквадратичная погрешность измерения отклика составляет 1%,а требуется определить значение отклика с погрешностью 0.1%,то при фиксированных условиях эксперимента нужно произвести $1/(0.1)^2 = 100$ повторных опытов с последующим усреднением результатов.В других случаях возможно потребуется параллельно испытывать 100 экспериментальных образцов.

2.5 Результаты исследований.

Первый этап исследования включал в себя получение штамма *Bifidobacterium adolescentis* ДВА-3 выделенного из содержимого кишечника здорового взрослого человека, размножается в различных питательных средах с накоплением производственной биомассы с высокой концентрацией бифидобактерий. Штамм *Bifidobacterium adolescentis* ДВА-3 обладает кислотообразующей активностью, антагонистической активностью в отношении к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, заквашивает молоко. Изобретение обеспечивает нормализацию микробиоценозов организма человека, в т.ч. желудочно-кишечного и мочеполового трактов, кожных и слизистых покровов, а также расширяет арсенал аналогичных средств. 2 табл.

Изобретение относится к пищевой, косметической, биотехнологической и медицинской промышленности, в частности, используется для приготовления кисломолочных, ферментированных и неферментированных пищевых продуктов, гигиенических и косметических средств, биологически активных добавок и бактериальных препаратов.

В связи с неблагоприятными экологическими условиями, стрессами, длительной антибактериальной, лучевой и химиотерапией, дисбиозами, возникающими вследствие перенесенных заболеваний, увеличивается количество людей, страдающих нарушениями нормальной микрофлоры организма. Для лечения и профилактики этих нарушений все большее внимание уделяется как препаратам, обладающим пробиотическим действием, так и пищевым продуктам, содержащим бифидобактерии.

В кишечнике человека, в основном, встречаются 5 видов бифидобактерий - *B.bifidum*, *B.longum*, *B.adolescentis*, *B.breve* и *B.infantis*. Из них с наибольшей частотой в биоценозе обнаруживаются виды *B.bifidum* и *B.longum*. Вид *B.adolescentis* чаще встречается у взрослых людей, а виды *B.breve* и *B.infantis* - преимущественно у детей грудного возраста

Качество лечебных продуктов и препаратов во многом обусловлено свойствами штамма-продуцента - его специфической активностью и технологичностью. Большой ассортимент биологически активных и технологичных штаммов бифидобактерий делает возможной разработку новых моно- и комплексных продуктов лечебного питания и бакпрепаратов, способных обеспечивать высокую колонизационную резистентность кишечника человека, восстановить его нормальную микрофлору и снизить заболеваемость различными кишечными инфекциями.

Задачей настоящего изобретения является получение штамма микроорганизмов вида *B.adolescentis* ДВА-3 с высокой биологической активностью, устойчивостью к условиям внешней среды, обладающего стабилизирующим кислотообразованием во всем температурном диапазоне развития клеток, сквашивающего молоко и размножающегося на искусственных питательных средах различного состава.

Штамм *Bifidobacterium adolescentis* ДВА-3 выделен из содержимого кишечника здорового взрослого человека и депонирован в музее микроорганизмов ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора под №206.

Заявляемый штамм может быть использован при производстве кисломолочной продукции, ферментированных пищевых продуктов, например квас, пиво и т.п., неферментированных пищевых продуктов, например соки, напитки и т.п., заквасок для приготовления кисломолочной продукции и биологически активных добавок к пище. Штамм *Bifidobacterium adolescentis* ДВА-3 может использоваться также для производства гигиенических и косметических средств, например кремов, лосьонов, салфеток, мыла, присыпок, тампонов, питательных масок, гелей, женских прокладок, косметического молочка, различных пудр и т.д.

Кроме того, штамм *Bifidobacterium adolescentis* ДВА-3 может быть использован при производстве бактериальных препаратов, в виде свечей, пероральных и других средств.

Техническим результатом заявленного изобретения является получение штамма *Bifidobacterium adolescentis* ДВА-3, который может быть использован в качестве биологически активного вещества в составе кисломолочных,

ферментированных и неферментированных пищевых продуктов, заквасок, гигиенических и косметических средств, биологически активных добавок и бактериальных препаратов. Штамм *Bifidobacterium adolescentis* ДВА-3 обладает биологически и технологически значимыми свойствами, такими как кислотообразующая активность, способность наращивать микробную биомассу в различных питательных средах. Штамм *Bifidobacterium adolescentis* ДВА-3 антагонистически активен по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Это позволит использовать его в качестве биологически активного компонента в составе различных пробиотических средств, обеспечивающих нормализацию микробиоценозов организма человека, в т.ч. желудочно-кишечного и мочеполового трактов, кожных и слизистых покровов, и расширит арсенал аналогичных средств.

Культурально-морфологические свойства штамма

Клетки представляют собой гр+ полиморфные палочки с бифуркацией или утолщением на 1-2 концах, в жидких питательных средах растут по всей высоте объема, кроме зоны аэробноза. Отдельно выросшие колонии на печеночной питательной среде имеют кометообразную форму колоний. Логарифмическая фаза роста заканчивается к 16-24 часам культивирования.

Физико-биохимические свойства штамма.

Беспоровый, неподвижный анаэроб. Оптимальная температура выращивания 37-39 градусов по Цельсию. Каталазу не образует, желатину не разжижает. Сбраживает глюкозу с образованием уксусной и L+ молочной кислот без образования газа, закисляя среду выращивания до pH 4,5-3,9. Ферментирует лактозу, арабинозу, ксилозу, целлобиозу, инулин, маннит, галактозу, салицин, вариабельно-маннозу, не сбраживает сорбит, инозит. Штамм сквашивает молоко к 12-24 ч культивирования.

Штамм *Bifidobacterium adolescentis* ДВА-3 обладает антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре (Таблица 1).

Таблица 1

Антагонистическая активность штамма <i>B. adolescentis</i> ДВА-3					
Штамм м	Зона задержки роста тест-культур мм / M±t				
	Sh. sonnei	Sh.flexneri	E.coli	S.aureus	P
<i>B. adolescentis</i> ДВА-3	12±1,8	8±1,4	10±1,6	20±1,8	1

Штамм активно наращивает микробную массу при росте на гидролизатно-молочной питательной среде (ГМ), Бифидум-среде (БФ), продуцируя кислоты (Таблица 2).

Таблица 2

Накопление микробной массы (КОЕ /мл lg 10) и активность кислотообразования (в градусах Тернера) штамма <i>B.adolescentis</i> ДВА-3 в динамике развития						
ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА	ВРЕМЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ					
	12 ч		24 ч		48 ч	
	КОЕ	Т°	КОЕ	Т°	КОЕ	Т°
ГМ	8,2	92	8,8	108	7,8	146
БФ	8,0	78	8,2	96	7,2	132

Штамм максимально накапливает микробную массу к 12-24 часам культивирования, достигая в 1 мл lg 8-9 микробных клеток, продуцируя кислоты.

Таким образом, предлагаемый штамм *B.adolescentis* ДВА-3 технологичен, поскольку размножается в питательных средах с накоплением производственной биомассы с высокой концентрацией бифидобактерий; обладает кислотообразующей активностью, способен заквашивать молоко.

Кисломолочные, ферментированные, неферментированные пищевые продукты, гигиенические, косметические средства, биологически активные добавки и бактериальные препараты, содержащие штамм *B.adolescentis* ДВА-3, могут найти применение в пищевой, медицинской, биотехнологической и косметической промышленности.

Способность штамма *B.adolescentis* ДВА-3 наращивать биомассу в различных питательных средах, кислотообразующая активность, антагонистическая активность по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, а также другие полезные для организма человека свойства, характерные для вида *B.adolescentis*, делают возможным использование штамма в составе различных корректирующих средств лечебно-профилактического назначения.

Пример 1. Использование штамма *B.adolescentis* ДВА-3 в составе биологически активных добавок.

1 пассаж: лиофилизированный штамм *B.adolescentis* ДВА-3 в количестве 0.1 г сухой биомассы вносят в пробирки с питательной средой и титруют методом десятикратных разведений до 10⁻⁹. Инкубируют при температуре 37-38 градусов по Цельсию до образования видимого роста в последних разведениях.

2 пассаж: выросшую культуру из 10⁻⁷⁻⁹ разведений в объеме до 10% вносят в питательную среду и культивируют при температуре 37-38 градусов по Цельсию в течение 12-24 ч до образования густого роста с видимой зоной аэриоза.

3 пассаж: полученную биомассу в количестве до 10% объема вносят в среду накопления и культивируют 12-24 ч при 37-38 градусов по Цельсию до получения биомассы с содержанием живых бифидобактерий не менее 108/мл.

В результате получают биологически активную добавку, которая представляет собой жидкий концентрат с высоким, не менее 108/мл, содержанием бифидобактерий.

Пример 2. Использование штамма *B.adolescentis* ДВА-3 для приготовления ферментированных и неферментированных пищевых продуктов.

1 пассаж: лиофилизированный штамм *B.adolescentis* ДВА-3 в количестве 0.1 г сухой биомассы вносят в пробирки с питательной средой и титруют методом десятикратных разведений до 10⁻⁹. Инкубируют при 37-38 градусов по Цельсию до образования видимого роста в последних разведениях.

2 пассаж: выросшую культуру из 10⁻⁷⁻⁹ разведений в объеме до 10% вносят в питательную среду и культивируют при температуре 37-38 градусов по Цельсию в течение 12-24 ч до образования густого роста с хорошо видимой зоной аэробноза.

3 пассаж: полученную биомассу в количестве до 10% объема вносят в среду накопления и культивируют 12-24 ч при 37-38 градусов по Цельсию до получения биомассы с содержанием живых бифидобактерий не менее 108/мл.

Получение ферментированного или неферментированного пищевого продукта: выросшую биомассу вносят в пищевое сырье (молоко, соки, пиво, квас и пр.) в количестве до 10% от объема, перемешивают и разливают в емкости. В результате получают продукт с концентрацией живых бифидобактерий не менее 106/мл.

Пример 3. Использование штамма *B.adolescentis* ДВА-3 для приготовления кисломолочного продукта.

1 пассаж: лиофилизированный штамм вносят в среду культивирования и титруют методом десятикратных разведений до 10⁻⁹. Инкубируют при 37-38 градусов по Цельсию до образования видимого роста в последних разведениях. Или сухую лиофилизированную биомассу бифидобактерий вносят в количестве 1-2 дозы в пробирку с 30 мл питательной среды. Культивируют при температуре 37-38 градусов по Цельсию до получения биомассы с содержанием живых бифидобактерий не менее 107/мл.

2 пассаж: выросшую культуру штамма *B.adolescentis* ДВА-3 из последних разведений или из пробирки с выросшей биомассой вносят в среду накопления объемом до 10% и культивируют при температуре 37-38 градусов по Цельсию до получения биомассы с содержанием бифидобактерий не менее 108/мл.

3 пассаж: полученную биомассу штамма *B.adolescentis* ДВА-3 в объеме до 10% вносят в стерильное молоко, культивируют до образования сгустка (кисломолочный продукт). Количество пассажей №2 может быть увеличено в зависимости от объема производства.

Пример 4. Использование штамма *B.adolescentis* ДВА-3 для получения бактериальных препаратов.

Культуру штамма 1-го или 2-го пассажа (пример 1) вносят в питательную среду, культивируют при температуре 37-38 градусов по Цельсию до получения биомассы бифидобактерий с содержанием живых клеток не менее 10⁸ в 1 мл. К полученной биомассе добавляют защитные среды высушивания (сахарозо-желатиновая среда, обезжиренное молоко). Полученную суспензию разливают в ампулы, флаконы и другие емкости, замораживают при температуре минус 35-45 градусов по Цельсию и лиофилизируют из замороженного состояния в вакуум-сушильных аппаратах. Полученный препарат содержит не менее 10⁷ живых клеток бифидобактерий. Данное содержание бифидобактерий согласуется с научно-технической документацией на аналогичный бифидосодержащий препарат - "Бифидумбактерин сухой" и является достаточным для использования полученного средства в качестве препарата - эубиотика.

Пример 5. Использование штамма *B.adolescentis* ДВА-3 для получения гигиенических и косметических средств.

Культуру штамма 1-го или 2-го пассажа (пример 1) вносят в питательную среду, культивируют при температуре 37-38 градусов по Цельсию до получения биомассы бифидобактерий с содержанием живых клеток не менее 10⁸ в 1 мл.

Полученную биомассу бифидобактерий штамма *B.adolescentis* ДВА-3 вводят в состав гигиенического или косметического средства.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что в соответствии с поставленной целью задачами исследований было повышение титра бифидобактерий и сохранения их активности на протяжении трех месяцев, а также повышение биологической ценности «жидкого концентрата бифидобактерий».

Усовершенствование рецептуры и технологии производства БАД проводилось как в отношении увеличения биологической и ферментативной активности бифидобактерий, так и в отношении оптимизации среды культивирования для повышения ее ростовых свойств.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С ПРОБИОТИКО-ПРЕБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

3.1 Рецептатура функционального кисломолочного продукта с растительными компонентами.

Наши исследования показали, что на основе известных штаммов бифидобактерий *B.bifidum* № 791, *B.bifidum* ЛВА-3, *B.bifidum* № 1 невозможно создать консорциумы с высокой биологической и ферментативной активностью. Данные штаммы обладают низкой скоростью роста в молочных средах, а при их совместном культивировании происходит постепенное вытеснение сначала штамма *B.bifidum* № 1, а затем и *B.bifidum* ЛВА-3. Создание консорциума путем отдельного культивирования штаммов и затем объединения биомасс бифидобактерий усложняет технологию и не дает значимого эффекта [7]. Поэтому совершенствование рецептуры «жидкого концентрата бифидобактерий» базировалось на выведении нового штамма бифидобактерий с высокой скоростью роста в молоке.

В качестве прототипа для селекции нового штамма был выбран штамм *B.bifidum* 791, широко используемый для производства фармакопейных пробиотиков. Селекция нового штамма была проведена методом поочередного культивирования в различных молочных питательных средах и в среде Блаурокка без применения мутагенов. Полученный штамм *B.bifidum* 791/БАГ обладает на 15-17 % более высокой скоростью роста в молоке и на 30-35 % более высокой кислотоустойчивостью по сравнению со штаммом-прототипом. В молоке штамм утилизирует практически все свободные аминокислоты, а прототип - только 4 аминокислоты [4].

В кишечнике здорового человека одновременно существует несколько видов бифидобактерий, из которых *B.bifidum* и *B.longum* характерны для любого возраста. Поэтому для создания консорциума бифидобактерий был исследован ряд штаммов, относящихся к данным видам. Наиболее технологичными оказались два штамма - *B.longum* ДВА-13 и *B.bifidum* 8-3, их характеристики представлены в табл.1.

Таблица 1.

Характеристики штаммов в молочной среде

Штамм	Время культивирования (час)	Кислотность, (°T)				Титр бифидобактерий (КОЕ/см ³), при хранении			
		Нач.	3 сут.	6 сут.	9 сут.	Нач.	3 сут.	6 сут.	9 сут.
<i>B. bifidum</i> 791 БАГ	7-18	20	25	30	30	$\cdot 10^{11}$	$\cdot 10^{11}$	$\cdot 10^{10}$	$\cdot 10^{10}$

B. bifidum 8-3	1 8-19	1 15	1 15	1 17	1 17	2 .10 ¹¹	9 .10 ¹⁰	4 .10 ¹⁰	8 .10 ⁹
B. longum ДВА-13	1 8-19	1 25	1 25	1 27	1 35	6 .10 ¹⁰	3 .10 ¹⁰	1 .10 ¹⁰	7 .10 ⁹

Приведенные в табл.1 штаммы легли в основу создания консорциума бифидобактерий для производства БАД «жидкий концентрат бифидобактерий».

В количественном выражении доля B. Bifidum 791/БАГ составляет (80-90)%, доля B.bifidum 8-3 и B.longum ДВА-13 соответственно (10-20)% в равном соотношении. В таблице 7 приведены исследования по сохранности консорциума штаммов, полученных при выращивании на обезжиренном молоке с различным содержанием СОМО (сухой обезжиренный молочный остаток) в молочной среде.

Таблица 2

Влияние СОМО молока на сохранность консорциума штаммов

СОМО молочной основы	Время сквашивания (час)	Кислотность, (°Т)				Титр бифидобактерий (КОЕ\см ³), при хранении			
		Н	3	6	9	Н	3	6	9
		ач.	0 сут.	0 сут.	0 сут.	ач.	0 сут.	0 сут.	0 сут.
8	22	15	17	20	20	3 .10 ⁹	2 .10 ⁹	1 .10 ⁸	6 .10 ⁷
10	20	20	25	30	30	1 .10 ¹⁰	2 .10 ⁹	1 .10 ⁹	4 .10 ⁸
12	18	30	40	50	50	3 .10 ¹¹	9 .10 ¹⁰	4 .10 ¹⁰	8 .10 ⁹
13	17	30	35	37	40	7 .10 ¹¹	3 .10 ¹¹	8 .10 ¹⁰	2 .10 ¹⁰

При разработке молочной питательной среды главными условиями являлись – повышение начального титра и сохранение жизнеспособности бифидобактерий, которая зависит от степени нейтрализации кислых продуктов метаболизма. Как показали наши исследования, нейтрализация 10 % раствором NaHCO₃ культуральной жидкости от pH = 5.6 до pH = 7.0, позволяла сохранять титр бифидобактерий на протяжении более 120 дней. Однако этот прием приводит к связыванию свободных аминокислот и биологически активных веществ, резко снижая биологическую ценность БАД. Поэтому для сохранения титра бифидобактерий был использован прием повышения буферной емкости питательной среды.

Во-первых, в молочной среде искусственно увеличивали в 1.3 –1.5 раза концентрацию СОМО (до 13 %) несением сухого обезжиренного молока, увеличивая тем самым содержание казеина и лактозы в 1.3-1.5 раза. Высокое содержание казеина образует буферную систему, сдерживая нарастание кислотности при росте биомассы, а увеличение содержания лактозы на 25-30% повышает титр бифидобактерий в 5-7 раз. Во-вторых, для получения комплексного БАД, содержащего повышенное количество витаминов и незаменимых аминокислот, в молочную основу дополнительно вносили источники витаминов, азотистых оснований и аминокислот: кукурузный экстракт, гидролизат молочных белков, среду Блаурокка и автолизат пекарских дрожжей.

Результаты этих исследований позволили разработать эффективный состав молочной питательной среды, которая обладает высокой урожайностью и сохранностью биомассы бифидобактерий на протяжении 3 месяцев (табл. 1) [8, 9]. Кроме того, состав среды обеспечивает в конечном продукте - «концентрате бифидобактерий» высокое содержание незаменимых аминокислот (табл. 2), а также витаминов группы В (табл.3).

Таблица 2

Незаменимые аминокислоты	Содержание (мг/л)	Заменимые аминокислоты	Содержание (мг/л)
1. Треонин	13.11	1. Серин	7.72
2. Валин	34.67	2. Глутаминовая кислота	14.88
3. Метионин	12.87	3. Пролин	27.47
4. Изолейцин	15.51	4. Глицин	2.71
5. Лейцин	56.20	5. Аланин	27.37
6. Фенилаланин	38.0	6. Цистин	0
7. Триптофан	-	7. Тирозин	51.10
8. Лизин	32.38	8. Гистидин	45.04
9. Глутамин	6.83	9. Аспарагинов	0.4
		10. Аргинин	32.13
	50,09 %	ая кислота	49,91 %
	(209.57)	ИТОГО	(208.82)
ИТОГО			

Таблица 3

Наименование витаминов	Содержание в 100 г продукта, мг	Потребность взрослого человека, мг/сут.
В ₁ (тиамин)	0.60	0,60
В ₂ (рибофлавин)	0.68	0,80
В ₆ (пиридоксин)	0.58	0,70
РР (ниацин)	11,4	6.60
С (аскорбиновая кислота)	1.70	80.0

В результате этих работ была разработана новая рецептура и технология производства БАД "жидкий концентрат бифидобактерий", который в настоящий момент является комплексным препаратом на основе консорциума живых активных штаммов бифидобактерий видов *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum* с добавлением автолизата пекарских дрожжей, ферментативного гидролизата белков молока, содержащих витамины группы В, С и РР, а также незаменимые аминокислоты.

Многочисленные медико-биологические и микробиологические исследования [10-15] свидетельствуют, что бифидобактерии в процессе жизнедеятельности препятствуют размножению патогенной, гнилостной и газообразующей флоры. Бифидобактерии обладают детоксикационными качествами, во-первых, ингибируя бактериальные ферменты - глюкоксидазу, азоредуктазу и нитроредуктазу, которые способны конвертировать проканцерогены в канцерогены, а во-вторых, аккумулируя значительное количество соединений металлов, фенолов и формальдегидов, которые способны вызывать изменения в иммунной системе. Бифидобактерии участвуют в абсорбции солей железа и кальция, проявляют антиаллергическое действие, препятствуя микробному декарбоксилированию гистидина и повышению количества гистамина. Бифидобактерии обладают иммуностимулирующим действием, принимая участие в активации лимфоидных органов ЖКТ и создании общего пула иммуноглобулинов, повышая активность макрофагов и лизоцима. В норме поддержание и стимулирование иммунного ответа в ЖКТ работает как саморегулируемая система.

БАД «жидкий концентрат бифидобактерий» использовался для коррекции нормофлоры кишечника у больных различного профиля, была показана его эффективность в комплексной терапии инфекционных заболеваний, при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, иммунной системы, печени, а также эндокринной патологии. Эффективность применения БАД подтверждены данными клинических исследований, проведенных в различных клиниках г. Новосибирска, Москвы, Челябинска, Владивостока на больных гастроэнтерологического профиля, инфекционных больных, больных сахарным диабетом, недоношенных детях.

«Жидкий концентрат бифидобактерий» назначался в суточной дозе по 2-3 мл 3 раза в день, длительность курса составляла в зависимости от тяжести заболевания – от 14 до 21 дня. На протяжении курса оценивались жалобы, объективные данные, лабораторные показатели.

Показанием к назначению препарата явилось наличие дисбактериоза, который был выявлен по результатам бактериологических исследований у всех больных, а также наличие диспепсии, жалоб на боли в животе и метеоризм.

После проведенного лечения в 85-90 % случаев наблюдался положительный эффект, заключающийся в значительном повышении титра бифидобактерий, в 75-80 % случаях наблюдалось восстановление бифидофлоры до нормы. Достаточно высок процент больных со снижением (75%) и даже с полным исчезновением (25%) лактозонегативных бактерий в кишечнике. Были купированы болевой и диспепсический синдромы, практически исчезли явления метеоризма. Кроме того, произошло изменение показателей крови: повышение гемоглобина крови на 1-16 ед. отмечено у 70%, у 30 % испытуемых произошло понижение в среднем на 2-4 ед. После курсов приема БАД «жидкий концентрат бифидобактерий» наблюдалось положительная динамика изменения объективных клинических данных и субъективных жалоб. Боли в животе, метеоризм, тошнота, диспепсия полностью исчезали после 3-х недельного приема «жидкого концентрата бифидобактерий» практически у всех обследуемых.

3.2 Технологическая инструкция

Технологическая инструкция по производству функционального кисломолочного продукта.

ВВЕДЕНИЕ.

Данная технологическая инструкция предназначена для производства функционального кисломолочного продукта на предприятиях пищевой промышленности.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗГОТОВЛЯЕМОЙ ПРОДУКЦИИ.

Функциональные продукты питания — продукты питания натурального или искусственного происхождения, обладающие приятным вкусом и выраженным оздоровительным эффектом для человека, удобные в использовании, предназначенные для каждодневного систематического применения и прошедшие длительные клинические испытания, имеющие подтверждённую медицинскую документацию.

Данный кисломолочный продукт, вырабатываемый из нормализованного по содержанию жира и сухих веществ молока, сквашенного закваской, приготовленной на чистых культурах

бифидобактерий и пропионовокислых бактерий, с добавлением экстракта расторопши и спорыша без добавления плодово-ягодных сиропов, ароматизаторов, наполнителей, и красителей.

1.1. Органолептические показатели.

ВКУС И ЗАПАХ.

- чистые кисломолочные с лёгким фруктовым оттенком; вкус чистый кисломолочный, освежающий.

ЦВЕТ

- от белого до кремового.

КОНСИСТЕНЦИЯ.

- однородная, без отстоя жира, в меру вязкая, допускается хлопьевидная консистенция.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИСХОДНОГО СЫРЬЯ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ.

Общая схема технологического процесса:

1. Приемка сырья
2. Охлаждение, резервирование
3. Подогрев
4. Очистка, нормализация
5. Подогрев
6. Гомогенизация
7. Пастеризация
8. Охлаждение до температуры заквашивания
9. Заквашивание
10. Сквашивание
11. Охлаждение
12. Созревание (или без созревания)
13. Охлаждение
14. Розлив
15. Хранение до реализации

Описание общих операций технологического процесса.

Приёмка молока осуществляется согласно ГОСТ Р 52054-2003. Молоко охлаждается до 4°C с целью предотвращения развития микрофлоры и порчи молока. Резервирование молока не должно продолжаться более 12 часов. Перед очисткой молоко подогревают до 40...45°C. Нормализация молока по массовой доли жира осуществляется в потоке или смешением. Нормализованное молоко гомогенизируют с целью исключения отстоя жира, получения продукта с однородной консистенцией. Пастеризация проводится при температуре 90...95 °C с выдержкой от 2 до 8 мин. Пастеризованную нормализованную смесь охлаждают до температуры заквашивания. Заквашивание осуществляется специально подобранными заквасками из термофильных или мезофильных молочнокислых бактерий, бифидобактерий. В зависимости от вида продукта и закваски продолжительность сквашивания составляет 4...12 часов, температура сквашивания - 20...43°C.

Для кефира, в состав которого входят дрожжи, необходимо дополнительное созревание в течение 12-14 часов, в течение которых происходит формирование специфического вкуса продукта. Готовый продукт охлаждают и направляют на розлив.

Соблюдение следующих рекомендаций поможет Вам обеспечить надлежащее качество Ваших продуктов:

1. Закваски прямого внесения могут быть использованы для заквашивания нормализованной смеси в емкости, где осуществляется приготовление продукта.

Нормализованная смесь должна быть подготовлена согласно технологической инструкции на конкретный вид продукта. Сухая бактериальная культура вносится в охлажденную до температуры заквашивания смесь. Рекомендуется вносить сухую закваску при заполнении молоком на 1/3-1/2 часть от общего объема емкости. Смесь тщательно перемешивают и оставляют в покое при температуре сквашивания до образования сгустка.

2. Для оптимального использования свойств заквасочных микроорганизмов рекомендуется активизировать сухую бактериальную культуру.

Для этого сухую закваску растворяют в 3-5 л стерилизованного или пастеризованного при температуре $(95 \pm 2)^\circ\text{C}$ с выдержкой 20-30 сек и охлажденного до температуры $25-30^\circ\text{C}$ молока.

Сухую закваску вносят в молоко в условиях стерильного бокса или приближенных к ним.

Не рекомендуется хранить активизированную закваску до использования более 15-20 минут.

Сухую или активизированную закваску вносят в нормализованную смесь, подготовленную согласно технологической инструкции на конкретный вид продукта. Бактериальная культура вносится в смесь, охлажденную до температуры заквашивания. Рекомендуется вносить закваску при заполнении молоком на 1/3-1/2 часть от общего объема емкости. Смесь тщательно перемешивают и оставляют в покое при температуре сквашивания до образования сгустка.

Внимание:

Перед вскрытием пакет с сухой закваской протирают спиртом и вскрывают профламбированными ножницами.

3. Сквашивание молока нельзя прекращать до тех пор, пока кислотность не достигнет $65-75^\circ\text{T}$ в зависимости от вида продукта.

Производство кисломолочных продуктов термостатным способом

Схема технологического процесса:

1. Приемка сырья
2. Охлаждение, резервирование
3. Подогрев
4. Очистка, нормализация
5. Подогрев
6. Гомогенизация (не является обязательной при данном способе производства)
7. Пастеризация
8. Охлаждение до температуры заквашивания

9. Заквашивание 10. Перемешивание
11. Розлив в потребительскую тару 12. Сквашивание в термостатной камере
13. Охлаждение 14. Созревание (или без созревания)
15. Хранение до реализации

Описание технологического процесса.

Молоко после пастеризации охлаждается до температуры заквашивания, поступает в резервуар вместе с закваской. Смесь тщательно перемешивается мешалкой 15-20 мин. и поступает на линию розлива. Время розлива одного резервуара не должно превышать 30 мин.

Разлитая и укупоренная заквашенная смесь поступает в термостатную камеру, температура воздуха в которой поддерживается на уровне температуры сквашивания определенного кисломолочного продукта.

Окончание сквашивания определяется по кислотности и плотности сгустка. Упакованный продукт поступает в холодильную камеру с температурой 6...8°C, где охлаждается при этой температуре. При необходимости продукт здесь же и созревает.

Технология производства простокваши, ряженки, варенца

Вырабатывается резервуарным и термостатным способами из пастеризованного молока, стерилизованного, топленого молока заквашенного чистыми культурами молочнокислых бактерий.

1. Тепловая обработка нормализованной смеси

- для простокваши: 85-87°C 10 мин

- для ряженки 95-99°C 3-5 час

- для варенца 95-99°C 40-80 мин

2. Охлаждение до температуры заквашивания 41-45°C

3. Заквашивание

для простокваши, ряженки: чистые культуры болгарской палочки и термофильного стрептококка

JOINTEC D Упаковка (4 дозы) на 2000 л.

JOINTEC E Упаковка (4 дозы) на 2000 л.

JOINTEC MY Упаковка (4 дозы) на 2000 л.

JOINTEC 203 Упаковка (4 дозы) на 2000 л.

JOINTEC YS Упаковка (4 дозы) на 1000 л.

4. Перемешивание, охлаждение, созревание

перемешивание 30-40 мин, охлаждение до 4±20°C, длительность созревания 9-13ч.

3.3 Пищевая и биологическая ценность нового продукта.

Новый функциональный продукт, выработанный из молока, обладает повышенной пищевой и биологической ценностью, так как в качестве закваски использовали бифидобактерии и пропионовокислые бактерии.

Пищевые продукты различны по химическому составу, перевариваемости, характеру воздействия на организм человека, что надо

учитывать при построении лечебных диет и выборе оптимальных способов кулинарной обработки продуктов. Продукты питания характеризует их пищевая, биологическая и энергетическая ценность. Пищевая ценность — общее понятие, включающее энергоценность продуктов, содержание в них пищевых веществ и степень их усвоения организмом, органолептические достоинства, доброкачественность (безвредность). Более высока пищевая ценность продуктов, химический состав которых в большей степени соответствует принципам сбалансированного и адекватного питания, а также продуктов — источников незаменимых пищевых веществ. Энергетическая ценность определяется количеством энергии, которую дают пищевые вещества продукта: белки, жиры, усвояемые углеводы, органические кислоты. Биологическая ценность отражает прежде всего качество белков в продукте, их аминокислотный состав, перевариваемость и усвояемость организмом. В более широком смысле в это понятие включают содержание в продукте других жизненно важных веществ (витамины, микроэлементы, незаменимые жирные кислоты и др.).

Различные продукты отличаются по своей пищевой ценности, однако среди них нет вредных или исключительно полезных. Продукты полезны при соблюдении принципов сбалансированного, адекватного питания, но могут оказать вред при нарушении указанных принципов. Это положение сохраняет свою силу в лечебном питании, хотя в зависимости от заболевания одни продукты в диетах на короткий или продолжительный срок ограничивают, исключают или допускают после особой кулинарной обработки, а другие считают более предпочтительными.

Только широкий продуктовый набор обеспечивает организм всеми пищевыми веществами. Расстройства питания организма часто связаны с недостатком или избытком одних продуктов в ущерб другим. Учет этого особенно важен при составлении меню лечебного питания. Можно сравнивать различные продукты по биологической ценности, кулинарным достоинствам и другим показателям, но не противопоставлять их. При многих заболеваниях не рекомендуется баранина, так как она содержит тугоплавкие жиры. Однако в тех республиках, где баранина является основным видом потребляемого с детства мяса, можно использовать нежирную баранину и в лечебном питании.

Многие пищевые продукты, в частности после соответствующей кулинарной обработки, обладают теми или иными лечебными (диетическими) свойствами применительно к отдельным заболеваниям. Однако это не дает основания называть их диетическими продуктами. Диетические продукты — специализированные продукты, предназначенные для замены в питании больных людей запрещенных по медицинским показаниям традиционных продуктов и отличающиеся от них химическим составом или физическими свойствами.

Выделяют 7 групп диетических продуктов:

- 1) продукты, обеспечивающие механическое и химическое щажение органов пищеварения и используемые при заболеваниях желудочно-

кишечного тракта, челюстно-лицевых травмах, нарушении акта жевания и глотания, в послеоперационном периоде. Эти продукты имеют высокую степень измельчения, в них мало экстрактивных веществ, натрия хлорида (поваренной соли), пищевых волокон, нет специй. К таким продуктам относятся мука тонкого помола из круп, гомогенизированные (особо протертые) консервы из освобожденных от несъедобной и трудноперевариваемой части овощей, фруктов, мяса, рыбы, сухие растворимые в воде концентраты высокой питательной ценности (энпиты, инпитан, оволакт и т. д.) и др.;

2) продукты с низким содержанием натрия (бессолевые), применяемые при некоторых заболеваниях сердечно-сосудистой системы, почек, печени и др. В эту группу включены также солезаменители (санасол и др.), которые используются для улучшения вкуса бессолевой пищи;

3) продукты безбелковые или с исключением определенных белков и аминокислот, например заменители хлеба, макаронных изделий, круп, приготовленные без белка из различных видов крахмала и применяемые при хронической недостаточности почек и других заболеваниях;

4) продукты с измененным составом углеводов — сниженным их содержанием, заменой сахара на подслащающие вещества, безлактозные молочные продукты, заменители сахара (сластилин, сахарин, фруктоза и др.). Эти продукты применяют при сахарном диабете, ожирении и других заболеваниях;

5) продукты с пониженным количеством жиров и (или) улучшенным их составом (кисломолочные продукты и коровье масло, обогащенные растительными маслами, и др.), используемые при заболеваниях с нарушением жирового обмена — атеросклерозе, ожирении и др.;

6) продукты пониженной энергоценности за счет уменьшения содержания в них жиров или углеводов, с наполнителями (пищевые волокна, метил целлюлоза и др.);

7) прочие диетические продукты, обогащенные полноценным белком, йодом, железом, витаминами, лецитином.

Некоторые диетические продукты одновременно являются продуктами детского питания, например, гомогенизированные консервы.

Качество продуктов — это совокупность свойств, обуславливающих пригодность данной продукции к удовлетворению определенных потребностей в соответствии с назначением.

Препараты применяют как мочегонное, противовоспалительное, кровоостанавливающее средство. Они способствуют отхождению плотных, каменистых образований при мочекаменной болезни. Особенно эффективен спорыш при лечении нарушений солевого обмена. Эссенцию из свежей травы используют в гомеопатии.

ВЫВОДЫ

Ведущим фактором, занимающим особое место в первичной профилактике большинства заболеваний и определяющим здоровье как детского, так и взрослого населения, является питание, точнее – степень его соответствия физиологическим потребностям организма.

Важнейшими нарушениями в системе питания населения Казахстана являются:

1. избыточное потребление животных жиров;
2. дефицит полноценных (животных) белков, витаминов, полиненасыщенных жирных кислот, минеральных веществ (кальция, железа), микроэлементов (селена, цинка, йода, фтора), и пищевых волокон.

С ухудшением экологической обстановки связано загрязнение пищевых продуктов радионуклидами, токсическими элементами, нитросоединениями, пестицидами, антибиотиками. Это, в конечном счете, приводит к загрязнению внутренней среды организма этими веществами со всеми вытекающими отсюда отрицательными последствиями.

В связи с этим разработана комбинированная кисломолочная продукция функционального назначения с применением растительного компонента из смеси спорыша и расторопши, который содержит в своем составе большое количество аминокислот, витаминов и микроэлементов, что положительно отразится на работе печени, ЖКТ и всего организма человека.

В ходе исследований были изучены особенности микроорганизмов *Propionibacterium shermanii* и *Bifidobacterium bifidum*. Выявлено, что сокультивирование данных микроорганизмов даёт требуемый результат при внесении их в молоко в равных частях. Оптимальной температурой культивирования является 37 °С.

Также были изучены свойства и химический состав растительных компонентов, в данном случае расторопши и спорыша. Так, расторопша считается сильным целебным растением по лечению болезней печени, а спорыш используется как вяжущее и кровоостанавливающее средство, увеличивает выведение из организма натрия и хлора, уменьшает кристаллизацию минеральных солей в мочевыводящих путях.

Было выявлено антибактериальное действие растительного компонента на комбинированную закваску, что позволило в дальнейшем увеличить срок хранения продукта до 5 суток без применения пастеризации, что соответственно значительно лучше сохраняет заданные свойства продукта.

По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. При выращивании чистых культур *Bifidobacterium bifidum* и *Propionibacterium shermanii* на молочной среде, проявляются их особенности к образованию сгустка.
2. Растительные компоненты являются легкодоступными в силу своей неприхотливости к условиям произрастания и высокой скорости роста и размножения. В совокупности спорыш и расторопша благотворно действуют

на работу печени, почек, ЖКТ и обладают кровевосстанавливающим действием.

3. Так как при окраске и микроскопировании бифидобактерии и пропионовокислые бактерии обнаруживают сходную морфологическую форму, то единственным способом выделения чистой культуры является культивирование микроорганизмов на селективных средах при оптимальных для определенной культуры условиях.

4. При сокультивировании микроорганизмов в молочной среде при оптимальных условиях проявляются симбиотические взаимодействия между компонентами микробных заквасок.

5. Благодаря наличию флавоноидов выбранные растительные компоненты являются безопасными природными консервантами.

Создание функциональных продуктов – новое поле исследований, лежащее на стыке биотехнологии и товароведения пищевых продуктов.

Полученный продукт полностью соответствует термину функциональный, так как обладает не только повышенной пищевой и биологической ценностью, но и является лечебно-профилактическим.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Королева Н.С. Техническая микробиология цельномолочных продуктов – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 270 с.
2. Шендеров Б.А. Медицинская микробиология и функциональное питание: Пребиотики и функциональное питание. – М.: Изд. Грантъ – 2001.
3. Диетология: Руководство. 2-е изд./ Под ред. А.Ю. Барановского.- СПб:Питер, 2006. – 960с.
4. Гаврилова Н.Б., Пасько О.В. Современная технология комбинированных продуктов на молочной основе для специализированного питания. Аналитический обзор – Омск. Изд: ОмГАУ, 2003. – 107 с.
5. Квасников Е.И., Григоров Ю.Г., Коваленко Н.К. и др. Молочнокислые бактерии пищеварительного тракта и питание долгожителей Абхазии. — Микроб, журн., т.46, №3., 1984.
6. Шиллер Г.Г., Молочников В.В., Заяц Н.Г. Комбинированные молочные продукты. – М. ЦНИИТЭИММП, 1984. – 36 с.
7. Шабров А.В., Дадали В.А., Макаров В.Г. Биохимические основы действия микрокомпонентов пищи – М.: Аввалон, 2003. – 184с.
8. Шендеров Б.А., Манвелова М.А. Функциональное питание и пробиотики: микробиологические аспекты. М.: “Агар”, 1997, 23 с.
9. Петров Л.Н., Вербицкая Н.Б., Добрица В.П. и др. Бактериальные пробиотики: биотехнология, клиника, алгоритмы выбора. СПб: ФГУП Гос. НИИ ОЧБ, 2008. – 136 с.
10. Хамагаева И.С., Ханхалаева И.А., Заиграева Л.И. Монография Использование пробиотических культур для производства колбасных изделий. – Улан-Удэ: Изд. ВСГТУ, 2006. – 204 с.
11. Аркадьева З.А. Биологические науки. – 1983. – 105с.
12. Грудзинская Э.Е. Новый кисломолочный продукт. Молочная и мясная промышленность, 1988. – №6.
13. Цыб А.Ф., Розиев Р.А., Бевз Н.И., Черняев С.И., Черняева М.Н. Продукты с нетрадиционными биологически активными добавками. Ж. Молочная промышленность. № 11 – 1999.
14. Алексеева Н.Ю., Аристова В.П., Патратий А.А. Состав и свойства молока как сырья для кисломолочных продуктов: Справочник. – М.: Агропромиздат, 1986. – 239 с.
15. Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Санитарная микробиология молока и молочных продуктов. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 250с.
16. Шендеров Б.А. Микрофлора человека и животных и ее функции. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т.1. – М.; Грантъ. – 1998. – 420 с.
17. Абрамов Н.А., Мурашова А.О.. Бифидумбактерин и другие пробиотики в комплексной методике лечения дисбактериозов. Журнал “Здравоохранение”. – 2000. – 197с.

18. Гончарова Г.И. Бифидофлора человека и необходимость ее оптимизации. Бифидобактерии и их использование в клинике, медицинской промышленности и сельском хозяйстве М. – 1986.
19. Григорьев А.В., Бондаренко В.М., Абрамов Н.А. и др. Разработка и клиническая оценка пробиотика бифидумбактерина форте. Журн. Микробиология №3. – 1997.
20. Воробьев А.А. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии – М.: Медицинское информационное агентство – 2003.
21. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Гордеева С.В., Андриященко С.В. Антагонистическая активность бифидофлоры кишечного биотопа в норме и при дисбиозах. Медицинская наука и образование Урала, №3. – 2009.
22. А. В. Молокеев, В. И. Байбаков, Т. Л. Карих, Р.М. Ильина БАД «Жидкий концентрат бифидобактерий» п. Кольцово, 2001.
23. Гончарова Г.И. Бифидобактерии и их использование в клинике, медицинской промышленности и сельском хозяйстве. - М., 1986 – 207с.
24. Куваева И.Б. Обмен веществ организма и кишечная флора. М. 1976.
25. Хамагаева И.С., Качанина Л.М., Тумурова С.М. Монография Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий. – Улан-Удэ: Изд. ВСГУТУ, 2006.– 172 с.
26. Алексеева М.А. и др. Физиолого-биохимические особенности пропионовокислых кокков. Микробиология. – 1973. – 467 с.
27. Белоусова Н.Н. Применение пропионовокислых бактерий в производстве молочных продуктов: Обзор. – М.: ЦИН-ТИПпищепром, 1961 – 106 с.
28. Богданов В.М. Приготовление заквасок пропионовокислых бактерий. Молочная промышленность №1. – 1960.
29. Бонарцева Г.А. и др. Об аэробном метаболизме пропионовокислых бактерий. Микробиология. – 1973. – 771 с.
30. Воробьева Л.И. Наиполезнейшие из анаэробов. Пропионовокислые бактерии для биотехнологии. Химия и жизнь №5, – 1984.
31. Грудзинская Э.Е., Семенихина В.Ф., Седунова Н.В., Дубинин А.В., Иванов А.Ф. Кисломолочный продукт «Тонус» для диетотерапии. Молочная и мясная промышленность №4, – 1988.
32. Грудзинская Э.Е. Обогащение молочных продуктов витамином В₁₂. Молочная промышленность №6, – 1965.
33. Климовский И.И., Алексеева К.П. Влияние молочнокислых бактерий и их культуральной среды на развитие пропионовокислых бактерий. Молочная промышленность №4. – 1964.
34. Метаболизм микроорганизмов. Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1986. –252 с.
35. Хоштеттлер А. Влияние введения чистых культур пропионовокислых бактерий на молочнокислое брожение в эментальском

сыре. Schweiz Milchztg. – 1978.

36. Абдухамидов Н. А., Адодина Н. И., Алимбаева П. К. и др. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений. М.: ГУГК, – 1976.

37. Цаприлова, С.В. Расторопша пятнистая: химический состав, стандартизация, применение.. Вестник фармации № 3, Вып. 41. – 2008.

38. Самигуллина, Л.И. Иммуностропные свойства препаратов расторопши пятнистой: автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00. Башк. гос. мед. ун-т. – Уфа, 2002. – 23с.

39. Щекатихина А.С. Получение биологически активных веществ из семян расторопши пятнистой (*Silibum marianum* (L.)) Труды БГУ. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2008.

40. Питкевич Э.С. Расторопша пятнистая – *Silybum marianum* (L.). Проблемы здоровья и экологии № 4. – 2008.

41. Corchete P. *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the source of silymarin. Bioactive molecules and medicinal plants / K.G. Ramawat, J.M. Merillon. – Springer Berlin Heidelberg, 2008.

42. Трескунов К.А. Записки фитотерапевта. Наблюдения и размышления о лечении травами. Кн.1 М. «Демидург-Арт», – 2002

43. Кашеев А. К. Дикорастущие съедобные растения в нашем питании. М.: Пищевая промышленность, – 1980.

44. Черепнин В. Л. Пищевые растения Сибири. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, – 1987.

45. Петков В. и др. Современная фармакотерапия. София. Мед. и физк. – 1986.

46. Иорданов Д. Николов П. Бойчинов А. Фитотерапия. Лечение лекарственными травами. София. Мед. и физк. – 1968.

47. Соколов С.Я. Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям. Фитотерапия. – М. Мед, – 1988

48. Биргер М.О, Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. – М.: Медицина, 1982. – 456 с.

49. Совершенствование способов приготовления заквасок и методов микробиологического контроля в молочной промышленности. Сб. научн. трудов под ред. В.Ф. Семенихиной – М., 1989.

50. Техническая микробиология пищевых продуктов. Под ред. А.Я. Понкратова. – М.: Пищевая промышленность, 1968. – 743 с.

51. Хамагаева И.С., асс. Раднаева Р.Б. Товароведение и экспертиза молочных товаров. Методические указания к выполнению лабораторных работ.– Улан-Удэ: Изд. ВСГТУ, 2007. - 90 с.

52. Инихов Г.С., Брио Н.Н. Методы анализа молока и молочных продуктов. – М.: Пищевая промышленность, 1971. – 422с.

53. Уголев А.М. Теория адекватного питания и трофология. – СПб: Наука, 1991. – 272 с.

ГЛОССАРИЙ И СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Безопасность пищевых продуктов - соответствие продуктов питания техническим, санитарным, ветеринарным, фитосанитарным стандартам, нормам, правилам и требованиям, гарантирующих их безопасность для жизни и здоровья людей.

Пищевая ценность продукта - совокупность свойств пищевого продукта, удовлетворяющих физиологические потребности человека в необходимых веществах и энергии.

Качество пищевых продуктов - совокупность характеристик пищевых продуктов, определяющие их потребительские свойства.

Патогенная микрофлора - микроорганизмы способные вызывать заболевания людей, животных и растений.

Пищевые продукты - продукты, используемые человеком в пищу в натуральном или переработанном виде.

Пищевые добавки - натуральные и искусственные вещества и их соединения, специально вводимые в пищевые продукты в процессе их изготовления в целях придания им определенных свойств и (или) сохранения их качества.

Пробиотические продукты - пищевые продукты, изготовленные с добавлением живых культур пробиотических микроорганизмов и пребиотиков.

Пробиотические микроорганизмы - живые непатогенные и нетоксигенные микроорганизмы - представители защитных групп нормального кишечного микробиоценоза человека и природных симбиотических ассоциаций, благотворно влияющие на организм человека путем поддержания нормального состава и биологической активности микроорганизмов пищеварительного тракта (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* и другие).

Пребиотики - пищевые вещества, избирательно стимулирующие рост и (или) биологическую активность защитной микрофлоры кишечника и способствующие поддержанию ее нормального состава и биологической активности.

Санитарно-показательные микроорганизмы - индикаторные микроорганизмы, свидетельствующие о возможном фекальном загрязнении и

потенциальной опасности присутствия в пищевых продуктах возбудителей инфекционных заболеваний.

Условно-патогенная микрофлора - микроорганизмы, которые в обычных условиях обитания в организме человека или животных не вызывают инфекционного процесса, но могут стать причиной заболевания.

Функциональные продукты питания — продукты питания натурального или искусственного происхождения, обладающие приятным вкусом и выраженным оздоровительным эффектом для человека, удобные в использовании, предназначенные для каждодневного систематического применения и прошедшие длительные клинические испытания, имеющие подтверждённую медицинскую документацию.

Список сокращений, используемых в работе:

ФП – функциональные продукты питания

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ПС – питательная среда

P.shermanii – *Propionibacterium shermanii*

B.bifidum – *Bifidobacterium bifidum*

МПА – мясопептонный агар

ФАО – продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (Food and Agriculture Organization – FAO)

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения ООН (World Health Organization – WHO)

Нормативные ссылки

В данной диссертации были использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 13928-84 Молоко и сливки заготавливаемые. Правила приемки, методы отбора проб и подготовка их к анализу.

ГОСТ 26668-85 Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов.

ГОСТ 3624-92 Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности.

ГОСТ 3626-73 Молоко и молочные продукты. Методы определения влаги и сухого вещества.

ГОСТ 3627-81 Молочные продукты. Методы определения хлористого натрия.

ГОСТ 3628-78 Продукты молочные. Методы определения сахара.

ГОСТ 5867-90 Молоко и молочные продукты. Методы определения жира.

ГОСТ 1770-74Е Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки.

ГОСТ 26670-91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.

ГОСТ 26781 Методы определения pH.

ГОСТ 4517-87 Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе.

ГОСТ 4919.2-77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов.

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 17206-96 Агар микробиологический. Технические условия.

ГОСТ 29112-91 Среды питательные плотные. Общие технические условия.

СанПиН № 4.01.071.03 «Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».

СанПиН 1.2.006 Санитарные правила по безопасности работы с микроорганизмами.