

**Т.Н. Евстигнеева, Т.А. Кудрявцева**  
**СЕЛЕКЦИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ**  
**МИКРООРГАНИЗМОВ**



**Санкт-Петербург**  
**2017**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Т.Н. Евстигнеева, Т.А. Кудрявцева  
**СЕЛЕКЦИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ  
МИКРООРГАНИЗМОВ**  
Учебное пособие



Санкт-Петербург

2017

**Евстигнеева Т.Н., Кудрявцева Т.А.** Селекция промышленных штаммов микроорганизмов: Учеб.-метод. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2017. – 59 с.

Представлены методические указания к самостоятельной работе магистрантов, выполнению лабораторных работ по дисциплине «Селекция промышленных штаммов микроорганизмов», варианты контрольной работы для магистрантов заочной формы обучения.

Предназначено для магистрантов направления 19.04.01, обучающихся по программе магистерской подготовки «Биотехнология продуктов питания функционального назначения» очной и заочной форм обучения.

**Рекомендовано к печати Советом факультета пищевых биотехнологий и инженерии, протокол № 5 от 20 января 2017 г.**



**Университет ИТМО** – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 – 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2017

© Евстигнеева Т.Н., Кудрявцева Т.А., 2017

## **ВВЕДЕНИЕ**

Дисциплина «Селекция промышленных штаммов микроорганизмов» относится к вариативной части дисциплин подготовки магистрантов по направлению 19.04.01 Биотехнология. Дисциплина реализуется на факультете пищевых биотехнологий и инженерии Университета ИТМО кафедрой прикладной биотехнологии.

Содержание дисциплины включает спектр вопросов, касающихся роли заквасок в биотехнологических процессах, получения чистых культур заквасочных микроорганизмов, современных методов их селекции и принципов подбора штаммов для составления бакзаквасок, обеспечивающих активные биотехнологические процессы производства пищевых продуктов; способов улучшения производственно-ценных свойств заквасочной микрофлоры; контроля качества бакзаквасок.

## **ОРГАНИЗАЦИЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ**

Самостоятельная работа студентов является важной и неотъемлемой частью учебного процесса. Это планируемая работа студентов, выполняемая по заданию и при методическом руководстве преподавателя, но без его непосредственного участия. Задачами самостоятельной работы студентов являются:

- систематизация и закрепление полученных теоретических знаний и практических умений студентов;
- углубление и расширение теоретических знаний;
- развитие познавательных способностей и активности студентов: творческой инициативы, самостоятельности ответственности и организованности;
- развитие исследовательских умений.

В самостоятельной работе по изучению дисциплины студент должен руководствоваться настоящим учебным пособием. В нем приведено содержание отдельных разделов изучаемой дисциплины, а также указан объем материала, который должен быть отражен в лекциях и закреплен на лабораторных работах и практических занятиях. По каждой теме имеются ссылки на литературные источники, приведены вопросы для самопроверки. Приведены варианты контрольной работы для студентов заочной формы обучения.

## Раздел 1. Роль и основные функции микроорганизмов в биотехнологии пищевых продуктов

Биохимические основы технологии пищевых продуктов с использованием промышленных микроорганизмов.

Виды микроорганизмов, используемых в отраслях пищевой промышленности.

Основные производственно-ценные свойства заквасочной микрофлоры.

Самостоятельная работа студентов – 8 ч:

– работа по теме с литературой – [1,2,3,4,5,6], лекционными материалами, Интернет-ресурсами;

– подготовка к лабораторной работе № 1 «Исследование биотехнологических свойств промышленных микроорганизмов», оформление отчета.

### Вопросы для самопроверки

1. Приведите примеры использования промышленных микроорганизмов при производстве продуктов питания.

2. Укажите виды микроорганизмов, используемых в различных отраслях пищевой промышленности.

3. Роль заквасочной микрофлоры в формировании качества различных молочных продуктов.

4. Основные производственно-ценные свойства бактериальных заквасок.

## Раздел 2. Селекция промышленных микроорганизмов для пищевых производств

Источники и методы выделения микроорганизмов для использования в пищевой промышленности.

Принципиальная схема получения чистых культур микроорганизмов.

Оценка свойств получаемых чистых культур и бактериальных заквасок для получения продукции высокого качества.

Принципы и методы подбора штаммов в состав бактериальных заквасок.

Способы сохранения промышленных микроорганизмов.

Контроль качества и безопасности бактериальных заквасок перед поставкой на пищевые производства.

Самостоятельная работа студентов – 32 ч:

– работа по теме с литературой – [1,2,3,4,7,8,9], лекционными материалами Интернет-ресурсами;

– подготовка к лабораторной работе № 2 «Определение симбиотических свойств микроорганизмов для получения многоштаммовых бактериальных заквасок», оформление отчета;

– подготовка к лабораторной работе № 3 «Определение устойчивости штаммов чистых культур к бактериофагу», оформление отчета;

– подготовка к лабораторной работе № 4 «Оценка стойкости заквасочных культур к неблагоприятным факторам культивирования», оформление отчета;

– подготовка к лабораторной работе № 5 «Ознакомление с видовым составом и свойствами бактериальных заквасок, содержащих пробиотические микроорганизмы», оформление отчета;

– подготовка к лабораторной работе № 6 «Применение микрофлоры настоя чайного гриба при производстве кисломолочных продуктов», оформление отчета;

– подготовка к практическому занятию № 1 «Особенности селекции штаммов в состав заквасок для производства кисломолочных продуктов функционального назначения»;

– подготовка к практическому занятию № 2 «Использование нетрадиционных источников получения заквасочной микрофлоры для производства кисломолочных продуктов»;

– подготовка к практическому занятию № 3 «Явление бактериофагии в биотехнологии кисломолочных продуктов»;

– подготовка к практическому занятию № 4 «Изменчивость биотехнологических свойств культур молочнокислых бактерий»;

– подготовка к практическому занятию № 5 «Методология получения бактериальных заквасок и бакконцентратов со стабильными свойствами»;

– подготовка к практическому занятию № 6 «Особенности контроля качества бактериальных заквасок, содержащих бифидобактерии».

### **Вопросы для самопроверки**

1. Укажите источники чистых культур микроорганизмов для составления бактериальных заквасок.
2. Схема селекции различных видов молочнокислых микроорганизмов из природных источников.
3. Схема селекции бифидобактерий из природных источников.
4. Какие виды бактериальных заквасок применяют при производстве ферментированных молочных продуктов?
5. Способы применения бактериальных концентратов.
6. По каким показателям оценивают качество заквасок?
7. Особенности подбора пробиотических микроорганизмов в состав бактериальных заквасок.
8. Методы определения антагонистической активности молочнокислых бактерий.
9. Методы оценки устойчивости заквасочной микрофлоры к неблагоприятным факторам культивирования.
10. Причины изменчивости свойств культур молочнокислых бактерий.
11. Приведите примеры использования нетрадиционных источников получения заквасочной микрофлоры для производства кисломолочных продуктов.

### **Раздел 3. Совершенствование методов селекции заквасочной микрофлоры для пищевых производств**

Способы улучшения производственно-ценных свойств микроорганизмов. Сущность способа применения мутагенного воздействия усиления биотехнологических свойств заквасочных микроорганизмов.

Получение улучшенных форм микроорганизмов способом адаптации к режимам культивирования.

Направленное изменение свойств микроорганизмов с помощью генной инженерии.

Самостоятельная работа студентов – 17 ч:

- работа по теме с литературой – [1,2,7], лекционными материалами, Интернет-ресурсами;
- подготовка к практическому занятию № 7 «Получение производственно-ценных штаммов молочнокислых бактерий путем воздействия мутагенных факторов»;
- подготовка к практическому занятию № 8 «Направленное изменение свойств микроорганизмов с помощью геной инженерии»;
- выполнение реферата.

### **Вопросы для самопроверки**

1. Укажите способы улучшения производственно-ценных свойств микроорганизмов.
2. В чем сущность применения мутагенного воздействия для усиления биотехнологических свойств заквасочных микроорганизмов?
3. Какие химические мутагены Вам известны?
4. Какие физические факторы используются для мутагенного воздействия на заквасочные микроорганизмы?
5. Приведите примеры изменения свойств микроорганизмов в результате мутагенного воздействия.
6. В чем состоит методика получения улучшенных форм микроорганизмов способом адаптации к режимам культивирования?
7. Какова методика направленного изменения свойств микроорганизмов с помощью геной инженерии?

### **Подготовка и защита реферата**

Трудоемкость подготовки реферата – 5 часов. Объем реферата – не менее 15 страниц. Обязательно использование не менее семи отечественных и не менее трех иностранных источников, опубликованных за последние 10 лет. Обязательно использование электронных баз данных.

Процедура защиты реферата: устная презентация результатов с последующим групповым обсуждением.

По представлении на кафедру реферата, устной презентации на семинаре за работу студента начисляются баллы в зависимости от следующих критериев:

- соответствие содержания заявленной теме, отсутствие в тексте отступлений от темы;
- логичность и последовательность в изложении материала;
- способность к работе с литературными источниками, справочной и энциклопедической литературой, Интернет-ресурсами;
- владение иностранными языками, использование иностранных источников;
- способность к анализу и обобщению информационного материала, степень полноты обзора состояния вопроса;
- наличие авторской аннотации к реферату;
- правильность оформления (соответствие стандарту, структурная упорядоченность, ссылки, цитаты, таблицы и т.д.);
- соблюдение объема, шрифтов, интервалов (соответствие оформления правилам компьютерного набора текста);
- владение материалом, правильность ответов на заданные вопросы, способность к изложению собственных мыслей.

### **Примерные темы рефератов**

1. Современные принципы выбора пробиотиков.
2. Источники и методы выделения микроорганизмов для использования в пищевой промышленности.
3. Получение улучшенных форм микроорганизмов способом адаптации к режимам культивирования.
4. Механизмы положительного эффекта на организм человека пробиотиков и продуктов функционального питания на основе микроорганизмов.
5. Принципы и способы получения мутантных штаммов микроорганизмов.
6. Селекция штаммов-продуцентов важнейших ферментов.
7. Метод гибридизации и его использование для создания продуцентов на основе бактерий, грибов и дрожжей.
8. Направленное изменение свойств микроорганизмов с помощью генной инженерии.
9. Биотехнологические свойства пропионовокислых и бифидобактерий и перспективы их использования в мясной промышленности.

10. Использование нетрадиционных источников получения заквасочной микрофлоры для производства кисломолочных продуктов.

11. Виды микроорганизмов, используемых в отраслях пищевой промышленности. Основные производственно-ценные свойства заквасочной микрофлоры.

12. Способы улучшения производственно-ценных свойств микроорганизмов.

13. Методы селекции продуцентов аминокислот.

14. Явление бактериофагии в биотехнологии кисломолочных продуктов.

15. Способы применения бактериальных концентратов при производстве ферментированных молочных продуктов.

## МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ

Каждая работа начинается с рассмотрения ее цели и теоретической части изучаемой темы. Затем дается перечень необходимого оборудования, приборов, материалов, приводятся задания и порядок выполнения лабораторной работы, краткое ее содержание, методы исследования и требования к оформлению. Список рекомендуемой литературы приведен в конце методических указаний.

К работам в лаборатории студентов допускают после их ознакомления с правилами безопасности (с общими – в начале семестра и с частными – перед каждым занятием).

Допуск к выполнению лабораторной работы происходит при условии положительной оценки ответов студентов на устные вопросы, охватывающие тему лабораторной работы. Полнота ответов студентов оценивается в баллах.

Студенты, не подготовившиеся к занятию, к выполнению задания не допускаются и выполняют его вне расписания после повторной проверки готовности.

Отчет по лабораторной работе представляется в рукописном или печатном виде в формате, предусмотренном шаблоном отчета по лабораторной работе (приложение). Защита отчета проходит в форме доклада студента по выполненной работе и ответов на вопросы преподавателя.

Студент получает максимальное количество баллов при оформлении отчета в соответствии с требованиями и правильных ответах на заданные вопросы.

Основанием для снижения количества баллов является:

- небрежное выполнение отчета;
- низкое качество графического материала (отсутствие указания единиц измерения на графиках и т.д.).

Отчет не может быть принят и подлежит доработке в случае отсутствия в нем:

- необходимых разделов;
- необходимого графического материала;
- выводов по результатам работы.

## Правила техники безопасности при работе в лаборатории

1. Перед началом занятий необходимо надеть белые халаты.
2. На рабочем месте не следует держать никаких посторонних предметов. Сумки и пакеты укладывают в специально отведенное для них место.
3. Категорически запрещается пить воду из химической посуды, а также пробовать на вкус химические реактивы.
4. Не включать и не выключать без разрешения преподавателя рубильники и приборы. Следить за состоянием изоляции проводов, электроарматуры и оборудования.
5. Горячие и раскаленные предметы ставить только на асбестовую сетку или иную термостойкую прокладку.
6. При работе с крепкими кислотами и щелочами необходимо:
  - а) при отмеривании и переливании кислоты и щелочи надевать защитные очки, резиновые перчатки и поверх халата прорезиненный фартук;
  - б) не втягивать кислоту пипеткой в рот, использовать для отмеривания кислоты дозаторы или резиновую грушу;
  - в) при закрытии жиромеров пробками и при встряхивании заворачивать их в салфетки;
  - г) при ввертывании в жиромер резиновой пробки, а также при отсчете показателя содержания жира жиромер держать за расширенную часть, завернутую в салфетку;
  - д) вынимая пробки из жиромеров, держать приборы отверстиями в сторону от себя и от окружающих;
  - е) отработанные кислоты и щелочи сливать через воронку в специальные бутылки.
7. При попадании на руки или лицо кислоты пораженные места сразу же промыть чистой водой, залить слабым раствором соды и снова чистой водой. Если кислота попала на одежду, ее нейтрализуют содой, а затем смывают водой.
8. Если жиромер в центрифуге разбился, необходимо немедленно промыть диск содовым раствором, чистой водой и протереть его насухо.
9. Горящие спиртовки, горелки должны находиться на расстоянии не ближе трех метров от воспламеняющихся веществ.

10. При воспламенении горючих жидкостей (бензин, эфир, спирт и др.) следует быстро погасить горелки, выключить электроннагревательные приборы и принять меры к тушению пожара.

11. По окончании работы привести в порядок рабочее место (вымыть посуду, поставить на рабочее место реактивы, приборы и т. п.).

## **Лабораторная работа № 1**

### **ИССЛЕДОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Цель работы:** усвоить требования к заквасочной микрофлоре, обеспечивающие получение высококачественных кисломолочных продуктов, а также практически ознакомиться с методами, характеризующими биотехнологические свойства культур.

Поскольку качество изготавливаемой в промышленности продукции в значительной мере определяется свойствами заквасок, чрезвычайно важным является проведение целенаправленного подбора штаммов в состав бактериальных заквасок.

Микроорганизмы в биотехнологических процессах выполняют следующие основные функции: изменяют физико-химические показатели исходного сырья; осуществляют биохимические превращения исходных компонентов в соединения, обуславливающие органолептические показатели кисломолочных продуктов; их пищевую, в том числе и биологическую, ценность; пробиотические свойства; ингибирование развития технически вредной и патогенной микрофлоры.

Штаммы, применяемые в биотехнологии продуктов, должны обладать определенным комплексом свойств.

К основным биотехнологическим свойствам промышленно-ценных штаммов относят: способность хорошо развиваться на питательных средах и накапливать высокое количество клеток, активность сквашивания (способность образовывать сгусток на молоке

за определенный период времени), энергию и предел кислотообразования, влагоудерживающую способность сгустка, устойчивость к бактериофагам, антагонистическую активность, способность формировать требуемые органолептические показатели.

Образование продуктов жизнедеятельности микроорганизмов зависит от рода, вида и свойств конкретного штамма бактерий, которые могут проявляться при благоприятных условиях культивирования.

Важными составляющими характеристиками бакзаквасок являются показатели – энергия и предел кислотообразования. Под **энергией кислотообразования** подразумевается скорость продуцирования кислоты, которая может быть измерена суммарным приростом титруемой кислотности в единицу времени. Более точную характеристику биохимического процесса (операции «сбраживание») можно получить, если параллельно с определением кислотности проводить количественный учет заквасочной микрофлоры. Однако методически это длительно и сложно, поэтому для практических целей используют способ, который характеризует интенсивность кислотообразования по продолжительности сквашивания, т. е. по промежутку времени от момента внесения бактериальной закваски до момента образования молочного сгустка (активность закваски). Этот показатель обратно пропорционален энергии кислотообразования. Чем больше энергия кислотообразования, тем меньше продолжительность сквашивания молока.

Другим важным свойством, характеризующим процесс молочнокислого брожения с количественной стороны, служит показатель – **предел кислотообразования**. Он характеризуется величиной титруемой кислотности, достигаемой при культивировании микроорганизмов при оптимальной температуре их развития в течение трех суток. Этот показатель зависит, с одной стороны, от удельной скорости роста клеток микроорганизмов, а с другой – от их массовой долговечности.

Настоящая лабораторная работа предполагает ознакомление с сущностью методов исследования биотехнологических свойств заквасочной микрофлоры, предназначенной для получения кисломолочных продуктов.

Часть методов используется при отборе штаммов в состав подобных заквасок. Такие исследования проводятся в специальных ла-

бораториях (фирмах), занимающихся получением и поставкой бакзаквасок на производство.

Другая часть методов используется для определения свойств микроорганизмов, ответственных за формирование требуемых показателей качества продукции (вкус, запах, консистенция, физико-химические, микробиологические). Эти методы применяются как при получении бакзаквасок, так и для контроля их качества на производстве.

**Задание.** Получить характеристику биотехнологических свойств бактериальных заквасок.

Необходимо исследовать следующие основные свойства заквасок:

- органолептическая оценка (внешний вид, вкус, запах, консистенция);
- предел кислотообразования;
- энергия кислотообразования;
- активность по продолжительности сквашивания;
- содержание заквасочной микрофлоры, групповой состав и бактериальная чистота по микроскопическому препарату;
- титруемая кислотность;
- способность к ароматобразованию;
- вязкость;
- влагоудерживающая способность полученных сгустков.

По результатам комплексного исследования испытуемых заквасок следует сделать выводы по работе.

### **Сырье, оборудование, приборы**

Для проведения работы используют следующее сырье:

- молоко цельное по ГОСТ 31449 кислотностью не более 18 °Т, с содержанием соматических клеток не более 500 тыс/см<sup>3</sup>;
- молоко коровье обезжиренное кислотностью не более 18 °Т, плотностью не менее 1030 кг/м<sup>3</sup>, с содержанием соматических клеток не более 500 тыс/см<sup>3</sup>;
- свежеприготовленные бактериальные закваски на чистых культурах лактобактерий (2–3 вида заквасок).

Для выполнения лабораторной работы также используют:

- термостаты, микроскоп биологический, вискозиметр, центрифугу, водяную баню, термометры и др.;
- реактивы и аппаратуру для определения показателей качества заквасок (титруемой кислотности, вязкости, влагоудерживающих свойств), наличия ароматобразующих бактерий; а также все необходимое для приготовления микроскопического препарата;
- набор лабораторной посуды и инвентаря: колбы, пробирки мерные, стеклянные палочки и др.

### **Порядок выполнения работы**

После получения задания и указаний преподавателя следует четко продумать план выполнения исследований. Целесообразно первоначально приступить к выполнению анализов, требующих больших затрат по времени. В данной работе к таковым относится определение активности испытуемых заквасок по продолжительности сквашивания.

Свежеприготовленные испытуемые закваски оцениваются по внешнему виду, органолептическим показателям, кислотности, а также по составу и количеству клеток путем приготовления и просмотра микроскопического препарата под микроскопом. При этом следует руководствоваться требованиями к качеству заквасок, предписанными действующей в отрасли нормативной документацией («Технологическая инструкция по приготовлению и применению заквасок и бактериальных концентратов для кисломолочных продуктов на предприятиях молочной промышленности»).

Подготовку сырья для определения активности, энергии и предела кислотообразования испытуемых заквасок следует проводить одновременно в одной емкости, в объеме, суммарно соответствующем массе сырья для трех анализов. Молоко пастеризуют при температуре 92–95 °С в течение 30 мин; охлаждают до температуры заквашивания, соответствующей виду испытуемой закваски, разливают в подготовленные стерильные промаркированные баночки и вносят испытуемые закваски в количестве 5 % от объема сырья (по четыре баночки для каждого вида закваски). Затем баночки с заквашенным молоком помещают в термостат с требуемой температурой, размещая их в три группы по виду анализа, и термостатируют.

В первой группе каждый вид закваски представлен в двух параллельных образцах. Один предназначен для определения динамики кислотонакопления, а другой – для получения характеристики образцуемого сгустка.

Для определения **интенсивности кислотонакопления** отбирают пробы для определения титруемой кислотности (из образцов первой группы) после заквашивания, затем через 2 ч термостатирования и далее через каждые 30 мин до момента образования сгустка.

Для более точного определения момента окончания сквашивания к концу процесса интервалы между отбором проб целесообразно сократить до 10–15 мин. Продолжительность сквашивания фиксируют в отчете о лабораторной работе.

В готовых сгустках (из параллельных образцов каждого вида закваски) оценивают внешний вид, вкус и запах, консистенцию, влагоудерживающую способность, наличие ароматобразования и микроскопическую картину.

Для изучения **энергии кислотообразования** пробы на анализ кислотности отбирают из второго ряда образцов через 24 ч сквашивания. Перед отбором пробы следует оценить внешний вид полученного сгустка, затем перемешать 5–7 раз и далее отобрать пробу и выполнить анализ.

Для определения **предела кислотообразования** образцы третьего ряда выдерживают в термостате до трех суток культивирования. Оценку показателей проводят так же, как и при определении энергии кислотообразования.

**Органолептическая оценка.** Сначала оценивают качество закваски по плотности сгустка, а затем перемешивают стерильной палочкой и определяют структуру и аромат исследуемого образца. Полученные данные записывают в таблицу.

**Микроскопическая картина закваски.** Для приготовления препаратов из штаммов готовой закваски на чистое предметное стекло наносят предварительно прокаленной петлей небольшую каплю закваски и распределяют на площади 1–2 см<sup>2</sup>, стараясь сделать мазок возможно более тонким. Препарат высушивают на воздухе или при слабом нагревании над пламенем горелки. Далее проводят окрашивание спирто-водным раствором метиленовой сини. Фиксированный мазок заливают краской и выдерживают в течение 0,5–1,0 мин. После окрашивания смывают краску водой, фильтровальной бумагой уда-

ляют с препарата основную часть воды и окончательно высушивают его над пламенем горелки. Подготовленный таким образом препарат исследуют под микроскопом с иммерсионной системой, устанавливают величину и характер расположения клеток и делают зарисовку микроскопической картины закваски.

**Титруемую кислотность закваски** определяют по ГОСТ 3624. В колбу вместимостью от 100 до 250 мл вносят 20 мл дистиллированной воды и 10 мл закваски, переносят остатки продукта из пипетки в колбу путем промывания пипетки полученной смесью 3–4 раза. Добавляют три капли фенолфталеина. Смесью тщательно перемешивают и титруют раствором гидроксида натрия молярной концентрации 0,1 моль/л до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин. Кислотность, в градусах Тернера ( $^{\circ}\text{T}$ ), находят умножением на 10 объема (мл) раствора гидроксида натрия, затраченного на нейтрализацию кислот, содержащихся в 10 мл закваски.

**Вязкость закваски** определяют по продолжительности истечения образца из пипетки вместимостью 100 мл либо с помощью прибора ВКЗ-4 при температуре 20  $^{\circ}\text{C}$ .

**Влагоудерживающие свойства** изучают следующим образом: 10 мл исследуемой закваски помещают в мерную пробирку и центрифугируют в течение 30 мин, отмечая через каждые 5 мин объем выделившейся сыворотки. По результатам исследования строят график, откладывая по оси абсцисс продолжительность центрифугирования, по оси ординат – объем выделившейся сыворотки (%). Делают вывод о способности сгустков удерживать сыворотку.

**Определение ароматобразующих бактерий в закваске** проводят по методикам, разработанным лабораторией бактериальных заквасок ВНИИМСа. Наличие в закваске ароматобразующих бактерий можно быстро и достаточно точно определить по продуктам их жизнедеятельности – углекислоте и ацетону с диацетилом.

**Образование углекислого газа.** В пробирку диаметром 15 мм наливают 20 мл закваски, отмечают уровень и помещают ее в водяную баню с холодной водой. Температуру воды доводят до 90  $^{\circ}\text{C}$  и, не вынимая пробирку из воды, отмечают уровень поднятия сгустка. Если закваска содержит углекислоту, то сгусток становится губчатым и приподнимается над сывороткой на 0,6–3 см и более. При отсутствии углекислоты он совсем не приподнимается либо припод-

нимается незначительно (на 0,3–0,5 см) и не имеет ясно выраженной губчатости.

**Определение ацетона с диацетилом.** Закваску фильтруют через бумажный фильтр. Три капли фильтрата смешивают в фарфоровой чашке с тремя каплями 40 %-го раствора КОН. Если в закваске имеется нужное количество ароматических веществ (ацетон, диацетил), то через 10–15 мин появляется ясно выраженное розовое окрашивание. Более позднее розовое окрашивание (через 30 мин и более) во внимание не принимают.

Для упрощения метода вместо фильтрата закваски можно использовать сыворотку, полученную в пробирке при определении углекислоты.

Когда в закваске обнаруживается углекислота, но не обнаруживается ацетон и диацетил, или наоборот, то такие закваски при всех прочих хороших показателях (продолжительности свертывания, микроскопическому препарату, органолептических свойствах) возможно использовать в производстве, так как эти недостатки могут быть следствием неполноценности молока.

### **Порядок оформления работы**

1. Привести данные, характеризующие биотехнологические показатели испытуемых заквасок в виде таблиц, форма которых представлена в табл. 1, 2, 3.

2. Зарисовать микроскопические картины препаратов исходных заквасок и молочных сгустков.

3. Провести анализ полученных результатов и сделать выводы о соответствии испытуемых культур требованиям, предъявляемым к закваскам для получения кисломолочных продуктов.

Таблица 1

**Характеристика исходных свежеприготовленных заквасок**

Индекс закваски	Показатели			
	Органолептические	Микроскопический препарат	Титруемая кислотность, °Т	Вязкость, с

Таблица 2

**Биотехнологические свойства заквасочной микрофлоры**

Индекс закваски	Показатели				
	Активность сквашивания, ч	Предел кислотобразования, °Т	Энергия кислотобразования, °Т	Влагоудерживающая способность, %	Способность к ароматобразованию

Таблица 3

**Органолептические и физико-химические показатели качества кисломолочного продукта**

Индекс закваски	Показатели качества				
	Вкус и запах	Внешний вид, консистенция	Микроскопический препарат	Титруемая кислотность, °Т	Вязкость, с

## Лабораторная работа № 2

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МНОГОШТАММОВЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАКВАСОК

**Цель работы:** приобретение практических навыков по подбору культур микроорганизмов в состав многоштаммовых бактериальных заквасок для производства кисломолочных продуктов.

Производство кисломолочных продуктов основано на применении одно- и многовидовых многоштаммовых заквасок.

Состав микрофлоры заквасок для различных кисломолочных продуктов определен в ТУ 9229-369-00419785-04 («Закваски, бактериальные концентраты, дрожжи и тест-культуры. Технические условия»).

При подборе состава заквасок очень важно исследовать сочетаемость штаммов бактерий между собой.

Между микроорганизмами, входящими в состав заквасок, складываются определенные взаимоотношения. Одни штаммы молочнокислых бактерий могут подавлять развитие других, некоторые, напротив, стимулируют развитие друг друга. Следовательно, прежде, чем составлять комбинированную закваску из отдельных штаммов, необходимо проверить их сочетаемость и установить отсутствие антагонизма между ними.

Так, при изучении взаимодействий микрофлоры йогурта было установлено, что при совместном развитии в молоке культур болгарской палочки и термофильного стрептококка накопление молочной кислоты происходит быстрее, чем при развитии каждой культуры в отдельности. Это объясняется тем, что молочнокислые стрептококки, обладая более высокой скоростью роста, снижают окислительно-восстановительный потенциал среды до значения, благоприятного для развития молочнокислых палочек. С другой стороны, молочнокислые палочки, обладая более высокой протеолитической активностью, накапливают в молоке аминокислоты, необходимые для развития молочнокислых стрептококков.

Антагонистические взаимоотношения между молочнокислыми бактериями обусловлены образованием некоторыми из них специфических антибиотических веществ (низина, диплококцина и др.).

**Задание.** Исследовать штаммы молочнокислых микроорганизмов на сочетаемость и наличие среди них штаммов-антагонистов.

### **Сырье, оборудование, приборы**

Для проведения работы используют следующее сырье:

- свежеприготовленные бактериальные закваски на чистых культурах лактобактерий (2–3 вида одноштабмовых заквасок).
- стерилизованное обезжиренное молоко в колбах по 50 мл;
- стерилизованное обезжиренное молоко с метиленовым голубым (0,01 %) в пробирках по 10 мл.

Для выполнения лабораторной работы также используют:

- термостаты, водяную баню, термометры и др.;
- реактивы и аппаратуру для определения титруемой кислотности;
- набор лабораторной посуды и инвентаря: колбы, пробирки, воронки, бумажные фильтры.

### **Порядок выполнения работы**

В соответствии с указанием преподавателя относительно количества анализируемых культур проводят исследования по изучению их сочетаемости и наличия штаммов-антагонистов.

**Определение сочетаемости штаммов** (методика ВНИМИ). В кипяченое молоко (100 мл) при соответствующей температуре (на 2–3 °С выше оптимальной температуры роста) добавляют исследуемую комбинацию культур (3 %). Одновременно в другие порции молока добавляют культуры, входящие в комбинацию. Все пробы заквашенного молока термостатируют при оптимальной температуре роста данного вида культур – мезофильные лактококки при (26±1) °С, термофильные стрептококки и болгарская палочка при (40±1) °С, ацидофильная палочка при (38±1) °С. Отмечают продолжительность образования сгустка. После этого пробы оставляют при

комнатной температуре на 1–2 ч, затем их выдерживают при 3–5 °С в течение 16–18 ч. На следующий день проводят дегустацию.

Сочетаемость штаммов молочнокислых бактерий определяют по продолжительности свертывания молока комбинацией по сравнению с продолжительностью свертывания каждой культурой, входящей в ее состав (при равных органолептических показателях).

**Выявление штаммов-антагонистов** (по методике Т.Г. Романович). Испытуемые культуры (1–2 капли) засевают в стерильное обезжиренное молоко (50 мл) и термостатируют при оптимальной температуре роста культуры в течение 48 ч. Затем сгустки фильтруют через бумажный фильтр, фильтрат прогревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, после чего быстро охлаждают. Фильтрат от каждой культуры (по 1 мл) вносят в пробирки, содержащие по 10 мл стерильного обезжиренного молока с метиленовым голубым.

Затем в каждую пробирку добавляют по 3 капли испытуемой культуры в возрасте 16–18 ч, выращенной на стерильном обезжиренном молоке. Содержимое пробирок хорошо перемешивают встряхиванием и помещают в термостат при соответствующей температуре – мезофильные лактококки при  $(30 \pm 1)$  °С, термофильные стрептококки и палочки при  $(40 \pm 1)$  °С. Одновременно в пробирку, содержащую стерильное обезжиренное молоко с метиленовым голубым, вносят испытуемые культуры и термостатируют их при соответствующей температуре. Эти пробы являются контрольными.

Через 2 ч термостатирования начинают наблюдать за восстановлением метиленового голубого, отмечая продолжительность его восстановления в опытной и контрольной пробах. Если в молоке с фильтратом (опытная проба) отмечается замедление восстановления метиленового голубого по сравнению с контролем, то этот фильтрат содержит антибиотические вещества, а его культура является антагонистом.

В ходе выполнения лабораторной работы студенты должны:

- ознакомиться с сущностью и порядком проведения исследований;
- выполнить исследования в соответствии с приведенными методиками;
- провести учет результатов;
- оформить отчет по результатам лабораторной работы.

## Лабораторная работа № 3

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММОВ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР К БАКТЕРИОФАГУ

**Цель работы:** приобретение практических навыков по определению устойчивости чистых культур микроорганизмов к бактериофагу.

Бактериофаги (греч. phagos – пожирающий) – это вирусы, паразитирующие на бактериях, приводящие к лизису клеток и выходу огромного количества новых фагов в окружающую среду.

Фаги обнаруживаются во всех объектах окружающей среды, в которых обитают бактерии, актиномицеты, грибы. Найдены они и в воде, почве, молоке, в различных выделениях человека и животных. Обнаружены вирусы грибов – микрофаги, некоторых водорослей, так, цианофаги – паразиты сине-зеленых водорослей.

Где присутствуют бактерии, там и присутствуют гомологичные (соответствующие бактерии, то есть клетки определённого вида бактерий) к ним бактериофаги.

Фаги способны размножаться только в живых клетках. Бактериофаги делят на вирулентные, вызывающие лизис клетки с образованием новых частиц, и умеренные, которые проникают в клетку и остаются в ней в латентной форме.

Цикл размножения вирулентного бактериофага в клетке хозяина, завершающийся ее лизисом, называется литическим циклом.

Явление бактериофагии впервые в молочной промышленности было отмечено в 1933 году Whitehead N.R. Изучением этого явления занимались отечественные и зарубежные ученые.

Одной из важнейших микробиологических причин снижения активности молочнокислого процесса при производстве кисломолочных продуктов является поражение микрофлоры заквасок бактериофагами, которые широко распространены на предприятиях молочной промышленности.

Скорость размножения бактериофагов настолько велика, что при благоприятных условиях (большое обсеменение бактериофагами исходного сырья, наличие фагочувствительных культур, плохое санитарно-гигиеническое состояние производства и др.) количество

бактериофагов в молоке через два часа может увеличиться от 1 до 200000 частиц, тогда как количество клеток полезной микрофлоры за этот же период возрастает лишь в 16 раз. Возможность быстрого размножения бактериофагов приводит к их чрезвычайно быстрому накоплению в производственных цехах предприятий.

Установлено, что важным источником фага при производстве кисломолочных продуктов являются лизогенные культуры. Бактериофаги не всегда уничтожают своих хозяев, они могут находиться внутри клеток бактерий и не репродуцироваться (профаги). При этом профаги так встраиваются в генетический аппарат клетки, не принося ей вреда, что становится возможным одновременное деление клетки-хозяина и профага. Такие бактериофаги называются умеренными. Вновь образовавшиеся клетки бактерий также не лизируются, и это состояние сожителства клетки и профага может сохраняться на протяжении многих поколений бактерий. Клетки, несущие в себе профаг, называют лизогенными, а цикл их развития – лизогенным циклом.

Попавший в клетку хозяина бактериофаг может погибнуть или под влиянием внешних индуцирующих воздействий вновь стать вирулентным, размножиться и включаться в нормальный инфекционный цикл развития. Существенных различий в морфологии умеренных и вирулентных штаммов не установлено. Спектр литического действия вирулентных фагов значительно шире, чем умеренных.

Учеными установлено, что при воздействии неблагоприятных факторов на клетку (недостаток питательных веществ, действие низких и высоких температур, действие УФ-излучения, антибиотиков и химических веществ) фаги могут возобновить нормальный цикл развития и привести к лизису культур. Существуют штаммы, которые могут освобождаться от бактериофага самопроизвольно. Этим объясняется постоянное присутствие в культурах лизогенных бактерий и свободных бактериофагов. Иногда воспроизводство фагов приводит к появлению так называемых дефектных фагов, т.е. неспособных превращаться в инфекционный фаг.

Лизогенные штаммы молочнокислых бактерий являются постоянным местом обитания бактериофагов (профагов) и основным источником попадания их на производство. В дальнейшем в производственных условиях происходит размножение вирулентного свободного фага, главными источниками которого являются молоко и полуфабрика-

ты, закваска, кисломолочные продукты, оборудование, воздух, сыворо-  
ротка.

В целях предотвращения развития бактериофагов на предпри-  
ятиях было предложено использовать многовидовые многостаммо-  
вые закваски, которые рекомендовалось постоянно менять, т.е. про-  
водить ротацию заквасок. Сообщалось, что бактериофаги термо-  
фильных стрептококков являются видоспецифичными и не лизируют  
культуры мезофильных бактерий. Культуры термофильного стрепто-  
кокка более устойчивы к действию бактериофага, чем мезофильные  
лактококки.

Результаты исследований зарубежных и отечественных уче-  
ных свидетельствуют о том, что чем крупнее предприятие и больше  
объем перерабатываемого молока, тем больше опасность фаголизиса.  
Это объясняют тем, что на крупных предприятиях ежедневно может  
циркулировать до  $10^{16}$  частиц бактериофагов, что в свою очередь со-  
здаст уникальные условия для возможных мутаций и обмена генети-  
ческой информацией между фагами и бактериями. В результате к  
каждому новому штамму бактерий, используемому на предприятии,  
через какое-то время все равно появляются фаги-гомологи. Сообщи-  
лось, что от 5 до 15 % случаев нарушений технологических процес-  
сов при производстве ферментированных продуктов объясняется  
действием бактериофагов на микрофлору применяемых культур, что  
безусловно приносит огромные экономические потери.

Из литературы известно, что ионы кальция оказывают активи-  
рующее действие на бактериофаги молочнокислых бактерий. Это яв-  
ление ученые объясняют тем, что частицы фага и бактерии имеют  
одинаковый отрицательный электрический заряд, и в отсутствие  
ионов кальция они взаимно отталкиваются, а при увеличении кон-  
центрации ионов  $Ca^{+2}$ , которые сообщают клетке положительный за-  
ряд, адсорбция фага усиливается. Таким образом, повышенное со-  
держание в молоке кальция создает благоприятные условия для ад-  
сорбции фагов на фагочувствительных клетках молочнокислых бак-  
терий, а значит и фаголизиса.

Исследовали термоустойчивость фагов, выделенных с пред-  
приятий молочной промышленности. Для этого проводили тепловую  
обработку молока, в котором находились фаги, при следующих ре-  
жимах: температуре 74–78 °С и выдержке 15–20 с; 85–87 °С и вы-

держке 7–10 мин; 92–95 °С и выдержке 20–30 мин (режим пастеризации молока для заквасок).

Установлено, что при температуре 74–78 °С, обычно применяемой при производстве пастеризованного молока и творога, титр фага снижается незначительно – в десятки-сотни раз. При температуре 85–87 °С, применяемой при получении кисломолочных продуктов, содержание фагов уменьшается в сотни-десятки тысяч раз. При температуре 92–95 °С наблюдалась практически полная инактивация фагов, но это не исключало возможности попадания фагов с оборудования, с водой при ополаскивании оборудования и из воздуха. Полученные результаты показали, что бактериофаги отличаются друг от друга по термоустойчивости, но все выдерживают действие довольно высоких температур.

Следовательно, рекомендуемые режимы пастеризации молока при производстве кисломолочных продуктов не обеспечивает инактивацию бактериофагов, присутствующих в сыром молоке. Чем большее количество частиц фага находится в сыром молоке, тем больше их остается в пастеризованной смеси. Таким образом, производство кисломолочных продуктов всегда происходит в условиях фаговой инфекции. Поэтому в случае применения заквасок, чувствительных к данным бактериофагам, может наблюдаться нарушение процесса сквашивания кисломолочных продуктов. Режимы, применяемые при производстве заквасок, обеспечивают достаточно высокую инактивацию фагов.

Тепловая инактивация фагов объясняется тем, что в раствор из фагов выделяется нуклеиновая кислота, а частицы фагов без нуклеиновой кислоты не способны адсорбироваться на бактериях. Тепловая инактивация зависит от свойств самих фагов, среды, температуры и продолжительности выдержки, исходного количества (титра) фага в 1 см<sup>3</sup> исследуемого образца.

При высушивании бактериофаг молочнокислых стрептококков не изменяется и сохраняет свою активность годами. Низкие температуры благоприятствуют устойчивости фагов.

Обнаружение бактериофагов в больших количествах в творожной и подсырной сыворотке свидетельствует о том, что они устойчивы к действию низких величин рН. В литературе имеются сведения об инактивации бактериофагов лишь при рН менее 2,5. Бактериофаги могут вызывать лизис культур в довольно широких преде-

лах рН (от 3,5 до 11,6), но оптимальной для фаголизиса лактококков является величина рН 6,5–7,0.

При температуре 20–30 °С фаги обычно устойчивы в пределах рН 4,0–8,0, а при температуре от 2 °С до 10 °С они более устойчивы и диапазон их действия увеличивается с рН от 3,0 до 10,0.

Важными факторами, влияющими на накопление и развитие бактериофагов в питательной среде, являются не только внешние условия, но и главным образом взаимодействие фагов и бактерий.

В зависимости от фагорезистентности культур, входящих в состав заквасок, а также литической способности бактериофагов и изменчивости их свойств может происходить различное по интенсивности развитие фаговой инфекции в производственных условиях. В этой связи особое значение приобретает получение устойчивых культур к действию фагов и их использование для составления заквасок, применяемых при производстве молочных продуктов. Применение фагорезистентных культур и заквасок способствует снижению риска распространения фаговой инфекции в биотехнологических процессах. Поэтому ученые проводят исследования, направленные на изучение механизмов фагорезистентности используемых культур в производстве. В литературе имеются сведения о том, что механизм фагорезистентности бактериальных культур – это сложнейшее явление, обусловленное одновременным действием нескольких факторов: утратой способности адсорбировать фаг, наличием в клетке специфических эндонуклеаз, мутационными изменениями в микробной клетке. Применение генетических методов исследований позволило ученым предположить, что фагорезистентность культур может контролироваться многими генами, имеющими разную специфичность.

В нашей стране чаще всего наблюдают замедление или полную остановку процессов сквашивания при производстве творога, сметаны, сыра, хотя в последние годы всё чаще отмечают нарушение биотехнологических процессов и при производстве ряженки, йогурта. Косвенными показателями фаголизиса на предприятии могут служить: увеличение продолжительности свертывания молока, которое чаще всего наблюдается не сразу после внесения заквасок или бактериальных концентратов, а через 3–10 ч; низкая титруемая кислотность в конечный период сквашивания заквасок или продукта; невыраженный вкус закваски или продукта (снижение газо- и ароматобобразова-

ния) и др. Создание благоприятных условий для развития молочнокислых бактерий (продолжительное резервирование сырого молока, хранение молока при оптимальной температуре для развития определенных видов микроорганизмов и др.) способствуют и накоплению бактериофагов. Кроме того, отмечается резкое увеличение нарушений биотехнологических процессов при производстве кисломолочных продуктов в весенний период года, когда наблюдается ухудшение состава молока и, как правило, снижение активности культур, входящих в состав заквасок и бактериальных концентратов.

Основными условиями, способствующими размножению бактериофага, являются непрерывное ведение технологического процесса, кислая реакция среды, добавление  $\text{CaCl}_2$ , разбрызгивание сыворотки, перемешивание.

Основными условиями для подавления развития бактериофага служат внесение сычужного фермента, обработка УФ-лучами, а также гипохлорита кальция и хлорной извести.

Одним из важнейших путей предотвращения фаголиза на производстве является использование фагоустойчивых культур и заквасок. В некоторых зарубежных странах применяют монокультуры, которые подбирают для каждого предприятия с учетом бактериофагов, выделенных с данного производства. Применение фагоустойчивых одноштабмовых заквасок (монокультур) возможно при высокой санитарно-гигиенической культуре производства, применении асептических линий, очистке воздуха от вирусов, а также постоянном контроле фагового фона и систематическом выделении фагов, циркулирующих на предприятии, с последующим подбором фагоустойчивых штаммов к этим фагам. В биотехнологии кисломолочных продуктов в нашей стране до настоящего времени все перечисленные выше условия пока не выполняются. Поэтому монокультуры у нас в стране практически нельзя применять, следует использовать многоштабмовые закваски на основе микроорганизмов, устойчивых к большому количеству типов бактериофагов.

Кроме того, основными путями предупреждения развития бактериофага являются: смена заквасок; исключение из заквасок лизогенных штаммов; применение питательных сред, тормозящих развитие бактериофагов, исключение из сред кальция и др.; регулярная мойка и дезинфекция оборудования, дезинфекция стен помещений растворами хлорной извести.

**Задание.** Исследовать штаммы молочнокислых микроорганизмов на устойчивость к бактериофагу.

### **Сырье, оборудование, приборы**

Для проведения работы используют следующее сырье:

– свежеприготовленные бактериальные закваски на чистых культурах мезофильных лактококков;

– фильтрат бактериофага мезофильных лактококков;

– стерильное гидролизованное молоко в колбах по 5 мл.

Для выполнения лабораторной работы также используют:

– термостаты, пипетки, бактериальную петлю.

### **Порядок выполнения работы**

В данной лабораторной работе используют методику исследования отношения штаммов к поливалентному бактериофагу мезофильных лактококков (по Д.А. Яковлеву).

Метод основан на определении роста исследуемого штамма по мутности клеточной суспензии, выращенной в стерильном гидролизованном молоке (разведенном водой 1 : 3, рН 6,8–7,0) с фильтратом бактериофага, в сравнении с контролем (без фильтрата).

Для получения фильтрата бактериофага в стерильное гидролизованное молоко (100 мл) вносят чувствительные культуры (2 мл) и фильтрат фага (1 мл), термостатируют его при температуре  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 18 ч. Полученный фильтрат бактериофага освобождают от бактериальных клеток, центрифугируя в металлических стаканчиках при частоте вращения  $837\text{ с}^{-1}$ .

Определяют титр бактериофага по чувствительной тест-культуре, который должен быть не менее  $10^8$ . Бактериофаг хранят в холодильнике при температуре  $3\text{--}5^\circ\text{C}$  в течение 1,5–2 мес.

При проведении лабораторной работы в стерильное гидролизованное молоко (5 мл) вносят исследуемую культуру (1 петля) и бактериофаг (1 капля), в контрольную колбу со стерильным гидролизанным молоком вносят только культуру. Пробы термостатируют при  $30^\circ\text{C}$  в течение 24 ч, наблюдая за ростом культуры по мутности клеточной суспензии по сравнению с контрольной пробой.

Если в течение всего периода наблюдения (через 6, 9 и 24 ч) не отмечается роста культуры в пробе с бактериофагом, а в контроле наблюдается хороший рост, то исследуемую культуру считают чувствительной к бактериофагу и бракуют.

Если же в указанный период наблюдения в пробе с бактериофагом, так же как и в контроле, отмечается хороший рост культуры, то исследуемая культура является устойчивой к бактериофагу.

Если в конце наблюдения (через 24 ч) в пробе с бактериофагом наблюдается слабый рост культуры, а в контроле – хороший рост, то культура слабочувствительна к бактериофагу, ее также бракуют.

В ходе выполнения лабораторной работы студенты должны:

- ознакомиться с сущностью и порядком проведения исследований;
- выполнить исследования в соответствии с приведенной методикой;
- провести учет результатов;
- оформить отчет по результатам лабораторной работы.

## **Лабораторная работа № 4**

### **ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ФАКТОРАМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

**Цель работы:** приобретение практических навыков по изучению устойчивости заквасочных культур для производства кисломолочных продуктов к неблагоприятным факторам культивирования.

Многочисленными исследованиями ученых показано, что направленность биотехнологического процесса и показатели готовых продуктов или препаратов главным образом обусловлены составом питательной среды и свойствами микроорганизмов, используемых для их получения.

Штаммы, применяемые в биотехнологии продуктов и препаратов, должны обладать определенным комплексом свойств. Лечебные и профилактические свойства кисломолочных продуктов и препара-

тов объясняются наличием в них не только достаточного количества клеток бактерий, но и метаболитами их жизнедеятельности, которые образуются в результате развития микроорганизмов.

Вещества, синтезируемые микроорганизмами, выполняют разную роль: одни необходимы для развития самих клеток, другие выполняют функции в управлении биотехнологическим процессом, третьи важны для формирования органолептических показателей кисломолочных продуктов, четвертые обуславливают лечебные или профилактические свойства конечных продуктов, а некоторые выполняют одновременно несколько функций.

Лечебное действие штаммов определяется следующими свойствами: нетоксичность; устойчивость к веществам, присутствующим в желудочно-кишечном тракте (фенолу, желчи, поваренной соли, различным уровням кислотности); адгезивная способность; устойчивость к антибиотикам; антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам; продуцирование ферментов, витаминов, полисахаридов и др.

Характеристика штаммов по отношению к веществам, содержащимся в желудочно-кишечном тракте человека, косвенно обуславливает их способность сохранять жизнеспособность в организме человека.

**Задание.** Исследовать штаммы молочнокислых микроорганизмов по показателям, характеризующим их свойство сохранять активность при неблагоприятных условиях культивирования.

### **Сырье, оборудование, приборы**

Для проведения работы используются штаммы мезофильных лактококков, термофильного молочнокислого стрептококка и термофильных молочнокислых палочек.

Для выполнения лабораторной работы также используют:

– гидролизованное молоко с содержанием желчи 20, 30 и 40 % в пробирках по 10 мл;

– гидролизованное молоко с содержанием NaCl 2, 4 и 6,5 % в пробирках по 10 мл;

– мясопептонный бульон с 2 % дрожжевого автолизата с рН 8,3; 9,2 и 9,6 в пробирках по 10 мл;

– стерильный раствор фенола концентрацией 8 и 10 %;

- пенициллин;
- стерилизованное молоко в пробирках по 10 мл;
- пастеризованное молоко;
- раствор метиленового голубого для окраски препаратов;
- набор лабораторной посуды и инвентаря: микроскоп биологический, термостаты, спиртовка, термометры, пипетки стерильные градуированные на 1 мл, стеклянные палочки и др.

## **Методы исследования**

**Устойчивость молочнокислых палочек к фенолу.** К 10 мл стерилизованного обезжиренного молока добавляют 0,5 мл 8 %-го раствора фенола. Пробирки с молоком и фенолом тщательно встряхивают, засевают исследуемым штаммом термофильных молочнокислых палочек (1 капля) и помещают в термостат, где выдерживают до 48 ч при температуре 37 °С.

Образование сгустка в молоке через 24 ч указывает на высокую устойчивость выделенного штамма к фенолу. Штаммы, свертывающие молоко менее чем за 48 ч, являются также устойчивыми к фенолу. Штаммы, не свертывающие молоко в течение 48 ч, выбраковывают.

**Устойчивость мезофильных лактококков к фенолу.** Для определения устойчивости мезофильных лактококков отбирают две пробы свежего пастеризованного молока по 100 мл, в которые вносят по 2 мл исследуемого штамма. Кроме того, в одну пробу добавляют 2 мл 10 %-го раствора фенола.

Пробы термостатируют при температуре 30 °С в течение 6 ч, после чего в обеих пробах определяют титруемую кислотность. По разности в кислотности первой и второй проб судят об отношении штаммов к фенолу. Устойчивые к фенолу (0,2 %) штаммы имеют разницу в кислотности в пределах 4–10 °Т, а чувствительные – 36–46 °Т.

**Устойчивость мезофильных лактококков к пенициллину.** Для определения устойчивости мезофильных лактококков к пенициллину отбирают две пробы свежего пастеризованного молока по 100 мл, в которые вносят по 2 мл исследуемого штамма. Кроме того, в одну пробу добавляют пенициллин из расчета 0,05 МЕ/мл. Пробы термостатируют при температуре 30 °С в течение 6 ч. По разности

в кислотности первой и второй проб судят об отношении штаммов к пенициллину. Устойчивые штаммы имеют разницу в кислотности до 10 °Т, а чувствительные – более 30 °Т.

**Устойчивость молочнокислых бактерий к желчи.** В гидролизованное молоко, содержащее желчь (рН 6,8–7,0), засевают исследуемую культуру (1 петля на 8–10 мл среды).

Мезофильные лактококки высевают на среду с 20, 30 и 40 % желчи; термофильные стрептококки – на среду с 20 и 30 % желчи. Термофильные молочнокислые палочки испытывают на среде, содержащей 20 и 40 % желчи. Посевы выдерживают в термостате при температуре 30 °С (при исследовании мезофильных лактококков) или при 40–42 °С (при исследовании термофильных молочнокислых бактерий) в течение 48 ч. Рост или отсутствие роста культуры отмечают визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности. Посевы также контролируют выборочно по микроскопическому препарату.

**Устойчивость молочнокислых бактерий к поваренной соли.** Исследуемую культуру засевают в количестве 1 петли на 8–10 мл гидролизованного молока (рН 6,8–7,0) с различным содержанием соли.

Штаммы мезофильных лактококков высевают в среду, содержащую 2, 4 и 6,5 % NaCl, штаммы термофильных стрептококков и термофильных молочнокислых палочек – на среду с 2 и 4 % NaCl.

Посевы выдерживают в термостате при температуре 30 °С (при исследовании мезофильных лактококков) или при 40–42 °С (при исследовании термофильных молочнокислых бактерий) в течение 48 ч. Рост или отсутствие роста культуры отмечают визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности. Посевы также контролируют выборочно по микроскопическому препарату.

**Устойчивость молочнокислых бактерий к щелочной реакции среды.** В мясопептонный бульон с 2 % дрожжевого автолизата с определенным рН засевают исследуемую культуру (1 петля на 8–10 мл среды). Мезофильные лактококки засевают в среды с рН 9,2 и 9,6). Термофильные молочнокислые палочки испытывают на среде с рН 8,3.

Посевы выдерживают в термостате при температуре 30 °С (при исследовании мезофильных лактококков) или при 40–42 °С (при

исследовании термофильных молочнокислых палочек) в течение 48 ч. Рост или отсутствие роста культуры отмечают визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности. Посевы также контролируют выборочно по микроскопическому препарату.

### **Порядок выполнения работы**

В ходе выполнения лабораторной работы студенты должны:

- ознакомиться с сущностью и порядком проведения исследования;
- провести высеив штаммов микроорганизмов в питательные среды;
- провести термостатирование пробирок и колб с засеянной культурой;
- провести учет результатов;
- сделать вывод об устойчивости исследованных заквасочных культур к неблагоприятным факторам культивирования;
- оформить отчет по результатам лабораторной работы.

### **Лабораторная работа № 5**

#### **ОЗНАКОМЛЕНИЕ С ВИДОВЫМ СОСТАВОМ И СВОЙСТВАМИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАКВАСОК, СОДЕРЖАЩИХ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ**

**Цель работы:** ознакомиться с видовым составом и свойствами бактериальных заквасок, содержащих пробиотические микроорганизмы, предназначенных для производства различных видов кисломолочных продуктов, закрепить теоретические знания принципов подбора штаммов в состав заквасок.

Производство кисломолочных продуктов основано на использовании заквасок (традиционных и прямого внесения), бактериальных концентратов, содержащих в своем составе микроорганизмы различных видов. Главное назначение кисломолочных продуктов – поддержание хорошего состояния здоровья у людей различных возрастных групп.

В настоящее время постоянно расширяется ассортимент кисломолочных продуктов, содержащих в своем составе представителей нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека, которые способствуют повышению иммунитета, поддержанию нормального микробиологического климата в организме человека, т. е. обладающих пробиотическими свойствами.

Кисломолочные продукты способствуют более высокой усвояемости кальция; усиливают секрецию пищеварительных соков и желчеотделения; усиливают желудочную секрецию и выделение панкреатического сока; повышают выведение мочевины и других продуктов азотистого обмена; подавляют рост нежелательной микрофлоры за счет бактерицидного действия молочной кислоты и антибиотических веществ, продуцируемых некоторыми видами молочнокислых бактерий и бифидобактериями; благоприятно воздействуют на моторику кишечника; способствуют снижению сыровоточного холестерина; тонизируют нервную систему. Установлено, что кисломолочные продукты с пробиотическими свойствами оказывают стимулирующее влияние на иммунитет, снижают риск возникновения злокачественных новообразований, в частности рака толстой кишки и молочной железы, способствуют выведению токсичных веществ из организма.

Видовой и штаммовый состав используемой микрофлоры очень разнообразен: мезофильные лактококки, термофильные стрептококки, лактобациллы, бифидобактерии, пропионовокислые микроорганизмы.

Вовлечение в производство микроорганизмов различных видов можно объяснить тем, что ученые стремятся стабилизировать протекание технологического процесса получения продуктов с заданными показателями качества и безопасности; усилить пробиотические свойства за счет биологически активных веществ, синтезируемых специально подобранными штаммами бактерий; улучшить органолептические показатели продуктов; повысить их биологическую ценность; расширить ассортимент.

Традиционные кисломолочные продукты, такие как творог, сметана, ряженка, простокваша и др., вырабатываются с применением мезофильных молочнокислых бактерий (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*) и термофильных молочнокислых

стрептококков. Эти продукты обладают диетическими свойствами, выступают в роли поставщиков питательных веществ, хорошо усвояемых организмом человека.

Среди кисломолочных продуктов, выпускаемых с давних пор, наиболее выраженным пробиотическим действием обладают продукты, содержащие термофильные молочнокислые палочки (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*). Помимо указанных видов в настоящее время в состав заквасок вводят термофильные молочнокислые палочки *L.plantarum*, *L.casei*, *L.reuteri*.

Бифидобактерии являются доминирующими представителями полезной микрофлоры, поэтому все большее внимание уделяется разработке и производству кисломолочных продуктов с бифидобактериями.

Применение бифидобактерий в качестве заквасочных культур в биотехнологии кисломолочных продуктов открыло большие перспективы в повышении биологической ценности молочных продуктов.

В отличие от молочнокислых бактерий бифидобактерии образуют сгусток в молоке через более длительное время, причем биохимическая активность бифидобактерий в молоке или в других питательных средах зависит от вида и свойств конкретного штамма. Наиболее часто при производстве кисломолочных продуктов используют следующие виды микроорганизмов рода *Bifidobacterium*: *B.bifidum*, *B.adolescentis*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.longum*.

Исследования по использованию бифидобактерий для молочных продуктов проводятся в различных направлениях: выделение новых штаммов бифидобактерий; получение кислородоустойчивых штаммов бифидобактерий; подбор и разработка специальных стимуляторов роста бифидобактерий в молоке; внесение фермента  $\beta$ -галактозидазы, расщепляющего лактозу; создание бактериальных концентратов, которыми можно обогащать уже готовые кисломолочные продукты. Большое распространение получило направление по использованию бифидобактерий в сочетании с молочнокислыми бактериями.

Все более широкое применение при производстве кисломолочных продуктов находят пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium acnes*; *Propionibacterium freudenreichii*). Развиваясь в моло-

ке, они сбрасывают молочный сахар до пропионовой и уксусной кислот, а выделенные ими ферменты подвергают распаду белки до образования пептидов и аминокислот. Накопление в продукте летучих жирных кислот, свободных форм азота связывают с образованием специфического аромата, вкуса кисломолочных продуктов.

Доказано, что жидкие культуры пропионовокислых бактерий способны проявлять антиоксидантный эффект. Они вырабатывают антиоксидательные ферменты: каталазу, пероксидазу и супероксиддисмутазу. Из серосодержащих аминокислот пептидов молока образуют диметилсульфид, обладающий антимуtagenным действием.

Пропионовокислые бактерии синтезируют витамин В<sub>12</sub>, стимулируют рост бифидобактерий, обладают мощными иммуномодулирующими свойствами, способны снижать генотоксическое действие ряда химических соединений и УФ лучей. Кроме того, они продуцируют экзополисахариды – высокомолекулярные углеводы, которые образуют в молоке вязкие сгустки.

Получение готовых продуктов с заданным комплексом свойств во многом определяется составом и свойствами применяемых микроорганизмов. В этой связи необходимо постоянно выделять новые штаммы и проводить подбор культур микроорганизмов в соответствии с определенными требованиями, характеризующими их технологичность, а также свойства, обуславливающие их лечебное действие.

Одним из важнейших свойств различных видов молочнокислых бактерий является их возможность ферментировать молочный сахар – лактозу с образованием молочной кислоты (гомоферментативное брожение) или молочной кислоты, ароматических веществ, углекислого газа и других ценных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов (гетероферментативное брожение).

Процессы гомо- и гетероферментативного брожения зависят от вида культур, включаемых в состав заквасок и бактериальных концентратов. При этом молочнокислые бактерии снижают рН, что ведет к образованию сгустка в молоке; обуславливают органолептические свойства продукта (вкус, запах, аромат и консистенцию) и биологическую ценность продукта.

Другим важным свойством молочнокислых бактерий является их способность продуцировать ароматические вещества, что придает продуктам специфический вкус и аромат. Формирование

вкуса и аромата во многом зависит не только от вида применяемых бактерий в составе заквасок, но и от свойств конкретного штамма. В создании вкуса кисломолочных продуктов принимает целый ряд веществ: диацетил, ацетоин, летучие кислоты, диоксид углерода, некоторые эфиры, ацетальдегид и другие продукты метаболизма молочнокислых ароматобразующих бактерий.

При производстве кисломолочных продуктов довольно часто наблюдается невыраженность вкуса из-за отсутствия аромата. При создании заквасок для кисломолочных продуктов, органолептические показатели которых формируются при участии молочнокислых ароматобразующих бактерий, следует отбирать штаммы, наиболее стабильно продуцирующие ароматические вещества.

К микроорганизмам, используемым для создания бактериальных заквасок и препаратов на основе пробиотиков, предъявляется ряд специфических требований:

1. Штаммы должны быть выделены из организма человека. Установлено, что бифидобактерии, проходя через желудочно-кишечный тракт, могут колонизироваться на стенках кишечника. Адгезия происходит специфично для того макроорганизма, из которого они были выделены, и является очень важной характеристикой для положительного действия, оказываемого бифидобактериями и лактобациллами на организм человека. Предполагается, что адгезия осуществляется с помощью протеинов, полисахаридов клеточных стенок к специфическим рецепторам клеток в кишечнике. Поэтому штаммы бифидобактерий и лактобактерий, применяемые в качестве пробиотических элементов в кисломолочных продуктах и препаратов для людей, должны быть выделены именно от человека.

2. Должны быть непатогенными и нетоксичными.

3. Должны обладать выраженной антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

Установлено, что штаммы, относящиеся к одному виду, могут отличаться друг от друга по антагонистической активности.

Сообщается, что получены штаммы *Lactococcus lactis subsp. lactis*, способные продуцировать антибиотик низин. Штаммы *Lactococcus lactis subsp. cremoris* продуцируют диплококцин; *Lactobacillus acidophilus* – ацидолин, лактоцидин, лактобациллин; *Lactobacillus bulgaricus* – болгарин.

Известно, что наибольшее антагонистическое действие на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы оказывают молочнокислые палочки и бифидобактерии. Молочнокислые палочки и бифидобактерии проявляют антагонизм по отношению к ряду возбудителей желудочно-кишечных заболеваний: могут в значительной степени подавлять развитие гнилостных бактерий, стафилококков, энтерококков, палочек протей, патогенных и энтеропатогенных кишечных палочек, сальмонелл, грибов рода *Candida*.

4. Должны обладать полезным воздействием на организм человека, подтвержденным лабораторными исследованиями и клиническими наблюдениями.

5. При длительном использовании они не должны вызывать побочных эффектов.

6. Должны обладать колонизационным потенциалом, т. е. сохраняться в пищеварительном тракте до достижения положительного действия (быть устойчивы к низким значениям рН, фенолу, желчным кислотам, NaCl, антимикробным соединениям, продуцируемым эндогенной микрофлорой; хорошо адгезироваться к эпителию соответствующих слизистых оболочек).

Установлено, что естественной формой существования в природе любых микроорганизмов является иммобилизованное состояние. Это означает, что 99,9 % бактерий в природе обитает в виде фиксированных к различным поверхностям микроколоний. Прикрепление микробных клеток к твердым поверхностям происходит в три этапа: на первом – за счет слабых взаимодействий осуществляется обратимая адгезия; второй этап заключается в неспецифической адгезии в связи с возникновением водородных и ионных связей; на третьем этапе происходит образование усиливающего адгезию внеклеточного материала (полисахаридов). Первые два этапа быстрые, третий – медленный, зависящий от биосинтетического потенциала микроорганизмов.

7. Должны быть устойчивы к антибиотикам. Установлено, что совместное применение антибиотиков и антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов способствует эффективному восстановлению нормальной микрофлоры кишечника уже в процессе антибиотикотерапии.

Антибиотикоустойчивость природных штаммов микроорганизмов является свойством, которое передается по наследству, а зна-

чит, зависит от генотипа и его устойчивости. В то же время для некоторых штаммов бактерий антибиотики могут выступать в качестве неблагоприятного фактора, который приводит к изменениям свойств бактерий. Устойчивость бактерий к антибиотикам является характеристическим признаком конкретного штамма микроорганизма.

8. Должны накапливать биомассу с высоким количеством жизнеспособных клеток: не менее  $1 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^9$  КОЕ в  $1 \text{ см}^3$ .

9. Штаммы молочнокислых бактерий должны продуцировать преимущественно L(+)-изомер молочной кислоты.

Известно, что различные виды молочнокислых бактерий образуют из лактозы два оптических изомера L(+) и D(-) с преобладанием того или иного, а также рацемическую (оптически недействительную) DL-форму молочной кислоты.

Научными исследованиями установлены различия в физиологической роли оптических изомеров молочной кислоты в организме человека. L(+)-молочная кислота, поступающая с кисломолочными продуктами, легко ассимилируется организмом, тогда как D(-)-молочная кислота гораздо хуже переносится организмом человека, так как она сначала преобразуется под действием фермента дегидрогеназы и только после этого ассимилируется организмом человека. Причем скорость окисления D(-)-молочной кислоты существенно ниже, чем у L(+)-молочной кислоты. DL-молочная кислота является индифферентной для организма.

Установлено, что ферментные системы детей до шестимесячного возраста не обеспечивают рационального включения в обмен веществ D(-)-молочной кислоты. Повышенное содержание D(-)-молочной кислоты может вызвать аллергию как у детей, так и у взрослых, а в ряде случаев привести к нарушению кислотно-щелочного равновесия, снижению pH при абсолютном или относительном избытке кислот, т. е. к развитию ацидоза кишечника.

По мнению некоторых авторов, L(+)-молочная кислота играет важную роль в процессе обмена веществ, а также в синтезе некоторых веществ.

Соотношение двух форм молочной кислоты в смеси может быть различно для отдельных штаммов даже одного вида бактерий. Соотношение L(+) и D(-)-изомеров молочной кислоты можно регулировать правильным подбором штаммов. Поэтому при отборе штаммов для пробиотических продуктов и препаратов следует учитывать кон-

фигурацию молочной кислоты, образуемой бактериями в процессе развития.

10. Должны обладать стабильными характеристиками как в клиническом, так и в технологическом плане.

11. Должны обладать высокой скоростью роста и размножения в условиях, близких к таковым в кишечном тракте; при их культивировании на питательных средах для накопления биомассы следует создавать условия, максимально приближающиеся к условиям микроокружения просвета кишечника.

12. Должны иметь четкую физиолого-биохимическую и генетическую маркировку как для исключения фальсификации, так и для периодического контроля идентичности исходных пробиотических штаммов и производственных культур в процессе их эксплуатации.

13. Целесообразно включать в состав заквасок с бифидобактериями лактазопродуктивные штаммы этих бактерий.

Известно, что часть людей страдает непереносимостью лактозы, связанной с генетически обусловленным дефицитом лактазы. Лактаза, или  $\beta$ -галактозидаза, – фермент, расщепляющий лактозу в верхней части кишечника на глюкозу и галактозу, которые затем всасываются в кровь. При недостатке или отсутствии данного фермента гидролиз лактозы не происходит, она достигает толстого кишечника в нативном состоянии, где расщепляется под действием кишечной микрофлоры до образования органических кислот и углекислого газа. Накопление этих соединений способствует повышению осмотического давления, притоку в толстый кишечник жидкости, вызывая такие симптомы, как диарея, рвота, боли в животе.

Лактазная недостаточность бывает врожденной или развивается в результате острых хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта, а также длительного лечения антибиотиками. Установлено, что бифидобактерии обладают крайне низкой  $\beta$ -галактозидазной активностью, что является одной из причин их слабого развития в молоке.

Имеются сведения, что активизация роста бифидобактерий в молоке путем введения фермента  $\beta$ -галактозидазы или за счет высокой  $\beta$ -галактозидазной активности других заквасочных культур связана с повышением собственной  $\beta$ -галактозидазной активности бифидобактерий. В таких условиях бифидобактерии приобретают способность накапливать из лактозы необходимые для своего роста

соединения – глюкозу и олигосахариды. В этой связи культивирование бифидобактерий в молоке совместно с термофильным стрептококком, обладающим высокой  $\beta$ -галактозидазной активностью, приводит к положительному эффекту при получении кисломолочных продуктов с пробиотическими свойствами.

Таким образом, виды и штаммы бактерий, из которых создаются закваски, являются одним из важных факторов, определяющих качество и безопасность кисломолочных продуктов с пробиотическими свойствами.

**Задание.** Изучить свойства бактериальных заквасок, сделать вывод о том, для производства каких кисломолочных продуктов они предназначены.

### **Сырье, оборудование, приборы**

Для проведения работы используют следующее сырье:

- жидкие закваски для различных видов кисломолочных продуктов, приготовленные на пастеризованном и (или) стерилизованном молоке;
- молоко цельное по ГОСТ 31449 кислотностью не более 18 °Т;
- молоко коровье обезжиренное кислотностью не более 18 °Т, плотностью не менее 1030 кг/м<sup>3</sup>.

Для выполнения лабораторной работы также используют:

- термостаты, микроскоп биологический, рН-метр, вискозиметр, центрифугу, водяную баню, термометры и др.;
- реактивы и аппаратуру для определения показателей качества заквасок (титруемой кислотности, вязкости, влагоудерживающих свойств), наличия ароматобразующих бактерий; а также все необходимое для приготовления микроскопического препарата;
- набор лабораторной посуды и инвентаря: колбы, пробирки мерные, стеклянные палочки и др.

## Порядок выполнения работы

Студенты должны исследовать показатели заквасок, перечисленные ниже.

– **Органолептическая оценка.** Сначала оценивают качество закваски по плотности сгустка, а затем перемешивают стерильной палочкой и определяют структуру и аромат исследуемого образца. Полученные данные записывают в таблицу.

– **Интенсивность кислотообразования.** Две пробы молока по 100 мл предварительно пастеризуют при температуре 95 °С с выдержкой 20–30 мин и охлаждают до температуры 30 и 40 °С. В охлажденное молоко вносят по 5 мл закваски (5 % от массы заквашиваемого молока) и тщательно перемешивают, после чего помещают в термостат при соответствующей температуре сквашивания (30 и 40 °С). Пробы исследуют каждый час на протяжении 4–5 часов, измеряя их титруемую кислотность. Для более точного наблюдения за процессом кислотообразования необходимо ставить параллельные пробы образцов. Полученные данные представляют в виде графика зависимости титруемой кислотности от продолжительности сквашивания. Необходимо сделать вывод об оптимальной температуре сквашивания для каждой исследуемой закваски.

– **Микроскопическая картина закваски.**

– **Титруемая кислотность закваски.**

– **Вязкость закваски.**

– **Влагоудерживающие свойства.**

– **Образование углекислого газа.**

– **Определение ацетона с диацетилом.**

Методы исследования указанных биотехнологических свойств заквасок изложены в лабораторной работе № 1.

## Порядок оформления работы

1. Данные, характеризующие закваски по органолептическим, физико-химическим и микробиологическим показателям, оформить в виде таблицы.

2. Сделать зарисовки микробиологических препаратов заквасок.

3. Начертить графики, характеризующие интенсивность кислотообразования и влагоудерживающие свойства заквасок.

4. Пользуясь полученными данными, сделать вывод о качестве заквасок, определить, для выработки каких продуктов они предназначены.

## Лабораторная работа № 6

### ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ НАСТОЯ ЧАЙНОГО ГРИБА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

*Цель работы:* получить знания о методике приготовления настоя чайного гриба, исследовать возможность применения его при производстве творожных продуктов.

Одним из важных направлений селекции микроорганизмов, обладающих высокой биологической активностью и лечебными свойствами, является селекция из нетрадиционных для молочнокислых бактерий источников. В последней трети XX века большое внимание было уделено селекции таких микроорганизмов, как бифидобактерии, пропионовокислые бактерии и др., которые раньше не использовались при производстве традиционных кисломолочных продуктов. Это направление стало весьма актуальным, поскольку значительно ухудшилось состояние здоровья населения и возникла необходимость расширения объемов производства лечебно-диетических продуктов.

Лечебные свойства кисломолочных продуктов во многом зависят от количества и качества антибиотических веществ, образующихся в продуктах в процессе их приготовления, и определяются в значительной степени видовым составом и активностью используемых заквасок.

Культуры, входящие в состав заквасок, выделяются из различных источников. В этом плане особый интерес представляет чайный гриб, настой которого издавна использовался для лечения различных заболеваний.

Многочисленными исследованиями установлено, что чайный гриб является симбиозом дрожжевых грибов и уксуснокислых бактерий. Тело гриба представляет собой толстую, хрящевато-слизистую расслаивающуюся пленку грязновато-белого цвета, гладкую сверху и волокнисто-лохматую снизу. Гриб размножается легко простым отделением кусочка пленки, который помещают в питательную среду, где он довольно быстро размножается.

Научное название чайного гриба – медузомицет – обусловлено сходством с медузой.

Дрожжи, занимающие нижнюю часть тела гриба, перерабатывают содержащийся в растворе сахар на спирт и углекислый газ, тем самым подготавливая питательную среду для уксуснокислых бактерий, которые склеены между собой особым веществом и образуют верхнюю плотную часть гриба.

Состав уксуснокислых бактерий неодинаков, поэтому вырабатываемые ими вещества неоднородны. Одни из них окисляют образованный дрожжами этиловый спирт в уксусную кислоту, другие превращают сахарозу в глюкозу и фруктозу и окисляют моносахара до глюконовых кислот. Образовавшиеся кислоты используются дрожжами для синтеза витаминов, необходимых для развития уксуснокислых бактерий. В результате совместной жизнедеятельности дрожжевых грибов и уксуснокислых бактерий готовый настой чайного гриба обладает кисловатым вкусом и шипучестью.

Установлено, что в состав напитка чайного гриба входят вещества, жизненно необходимые для организма человека: витамины (С, группы В, Р и D); органические кислоты (уксусная, глюкуроновая, щавелевая, молочная, лимонная); ферменты (каталаза, амилаза, протеаза, липаза). Кроме того, в нем присутствуют антибиотики, подавляющие развитие стафилококков, стрептококков и других бактерий.

Наиболее благотворное влияние на организм оказывает глюкуроновая кислота, обладающая дезинтоксикационным действием. Молочная кислота уничтожает вредную микрофлору кишечника и нормализует его функции.

Препараты, приготовленные из настоя чайного гриба, обладают антибактериальной активностью, которую они не теряют при длительном хранении, а также антибиотическими свойствами. Они могут быть с успехом использованы как стимуляторы роста животных, ин-

гибиторы жизнедеятельности различных микроорганизмов и для лечения многих заболеваний.

Проведены исследования по использованию микрофлоры чайного гриба для сквашивания молока. Изучены качественный и количественный состав микрофлоры настоя чайного гриба, его физико-химические и биохимические свойства в процессе культивирования. Рекомендовано в качестве закваски использовать настой чайного гриба после 8–10-дневного культивирования при комнатной температуре (20 °С). Настой имеет кисло-сладкий освежающий вкус, титруемую кислотность 95–110 °Т, рН 2,8–3,0; обладает антибактериальной активностью по отношению к условно-патогенной и патогенной микрофлоре.

Кисломолочные сгустки, полученные с использованием в качестве закваски настоя чайного гриба, обладают лечебными свойствами и проявляют более высокую антибактериальную активность по отношению к условно-патогенной и патогенной микрофлоре по сравнению с кефирной закваской. Отмечено полное отмирание бактерий группы кишечной палочки через 24 ч при дозе инфицирования  $10^7$  в 1 см<sup>3</sup>, стафилококков – через 48 ч при дозе инфицирования  $10^5$  в 1 см<sup>3</sup>. Установлено, что антибактериальная активность сохраняется при последующих пересадках, что позволило использовать молоко, сквашенное настоем чайного гриба, в качестве закваски. При этом наблюдалось существенное сокращение процесса сквашивания (5–6 ч против 10–12 ч).

Определены параметры культивирования чайного гриба в молоке и разработана технология заквасок, обеспечивающая получение кисломолочных продуктов хорошего качества.

**Задание 1.** Приготовить настой чайного гриба. Оценить физико-химические и органолептические показатели настоя в процессе его культивирования.

### **Порядок выполнения работы**

Обязательные компоненты жидкости, в которой развивается грибок, – настой чая, который служит источником азотистых веществ для дрожжей и уксуснокислых бактерий, и сахара – источник угле-

рода. Заблаговременно, тщательно соблюдая чистоту, следует приготовить настой чайного гриба в следующей последовательности.

1. Вскипятить 1 л воды, добавить в воду одну чайную ложку сухого чая.

2. Через 15–20 мин, когда раствор настоится, добавить в него 50 г сахарного песка, тщательно перемешать, остудить до температуры 25–30 °С.

3. Подготовленный раствор отфильтровать через капроновое или металлическое ситечко непосредственно в подготовленную банку (объемом 2–3 литра).

4. Внести в подготовленный чайный раствор слой чайного гриба, отделенного от уже растущего и используемого в качестве маточной культуры чайного гриба.

Культивирование проводить при комнатной температуре (20–25 °С), накрыв банку с грибом салфеткой, в течение 8–10 дней.

На 3-й, 5-й и 7-й день культивирования следует отбирать по 50 мл чайного настоя, помещать его в стерильную колбу со шлифованной крышкой и хранить в холодильнике для последующего исследования. В образцах настоя чайного гриба определить рН, титруемую кислотность, оценить органолептические показатели.

В виде таблицы (табл. 8) записать, как в процессе культивирования менялись физико-химические и органолептические показатели настоя чайного гриба.

Таблица 8

**Результаты анализа физико-химических и органолептических показателей  
настоя чайного гриба**

Продолжительность культивирования, сутки	рН	Титруемая кислотность, °Т	Органолептическая оценка
3			
5			
7			
10			

Приготовить микроскопический препарат готового чайного настоя и зарисовать его.

**Задание 2.** Изучить влияние вида бактериальной закваски на свойства сгустка и творога, интенсивность отделения сыворотки из сгустка, физико-химические показатели сыворотки.

### **Оборудование, приборы и материалы**

Для приготовления опытных образцов применяют следующее сырье:

- молоко коровье, соответствующее ГОСТ 31449;
- молоко обезжиренное, соответствующее ГОСТ 31658;
- закваску для творога;
- настой чайного гриба.

Для выполнения работы используют:

- реактивы и аппаратуру для определения титруемой кислотности; плотности;
- прибор Элекс-7 для определения массовой доли влаги в пищевых продуктах;
- стеклянные емкости вместимостью 1 л, воронки, лавсановые мешки, термометры, термостат;
- приборы и реактивы для приготовления микроскопического препарата.

### **Методы исследования**

Определяют следующие физико-химические показатели творога и сыворотки стандартными и общепринятыми методами:

- **температуру** – по ГОСТ 26754;
- **титруемую кислотность творога** – по ГОСТ 3624. В фарфоровую ступку вносят 5 г продукта, тщательно перемешивают и растирают пестиком. Затем прибавляют небольшими порциями 50 мл воды, нагретой до температуры 35–40 °С, и три капли фенолфталеина. Смесь перемешивают и титруют раствором щелочи до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин;
- **титруемую кислотность сыворотки** – по ГОСТ 3624. Метод аналогичен определению данного показателя в молоке без добавления дистиллированной воды;

– **массовую долю сухих веществ в сыворотке**– путем перевода значения плотности, измеренной по ГОСТ 3625, в соответствии с табл.9.

Таблица 9

**Перевод значения плотности творожной сыворотки в массовую долю сухих веществ**

Плотность, кг/м <sup>3</sup>	Массовая доля сухих веществ в сыворотке, %
1020	5,40
1021	5,60
1022	5,70
1023	5,90
1024	6,10
1025	6,20
1026	6,30
1027	6,50
1028	6,80
1029	7,00
1030	7,25

– **массовую долю влаги в твороге** – по ГОСТ 3626. Метод основан на выпаривании влаги из тонкослойного образца продукта, находящегося между нагретыми до рабочей температуры плитами нагревательного устройства. В качестве нагревательного устройства применяют прибор Элекс-7.

Для определения массовой доли влаги в продукте предварительно подготавливают одно- или двухслойные пакеты из газетной бумаги: квадрат со стороной 150 мм складывают по диагонали, загибают углы и края примерно на 15 мм. Пакет вкладывают в листок пергамента несколько большего размера, чем пакет, не загибая краев. Готовые пакеты высушивают в приборе в течение 3 мин при температуре 150–152 °С, после чего их охлаждают и хранят в эксикаторе.

Подготовленный пакет взвешивают с погрешностью не более 0,01 г, отвешивают в него с такой же погрешностью 5 г творога, распределяя его равномерно по всей внутренней поверхности пакета. Пакет с навеской закрывают, помещают в прибор между плитами, нагретыми до температуры 150–152 °С, и выдерживают 5 мин. В начале сушки во избежание разрыва пакета верхнюю плиту прибора приподнимают и поддерживают в таком положении до прекращения

обильного выделения паров. Затем плиту опускают и продолжают высушивание. Пакеты с высушенными пробами охлаждают в эксикаторе 3–5 мин и взвешивают. Массовую долю влаги в твороге ( $V$ , %) вычисляют по формуле:

$$V = (M - M_1) \cdot 100/5,$$

где  $M$  – масса пакета с навеской до высушивания, г;  $M_1$  – масса пакета с навеской после высушивания, г; 5 – масса навески продукта, г.

### **Порядок выполнения работы**

Заданное количество цельного молока пастеризуют при температуре  $(78 \pm 2)$  °С с выдержкой 20 с, охлаждают до 40 °С, разливают в стеклянные емкости по 0,5 л. В молоко вносят по 1 % бактериальной закваски: в емкость № 1 – традиционную закваску для творога, в емкость № 2 – настой чайного гриба.

После перемешивания содержимого образцы заквашенного молока помещают в термостаты: образец № 1 – с температурой 30 °С, образец № 2 – с температурой 35 °С, где они должны находиться до образования сгустка. Оценивают свойства сгустка (внешний вид, титруемая кислотность).

Затем в мерные цилиндры с воронками кладут лавсановые мешочки. Полученные образцы сквашенного молока нарезают таким образом, чтобы на поверхности сгустка получились квадраты со стороной 1 см. Выдержав образцы в покое в течение 30 мин, переносят сгустки в лавсановые мешочки. Отмечают время начала фильтрации сыворотки и через каждые 5 мин записывают ее количество в мерных цилиндрах.

После прекращения самопроизвольного отделения сыворотки творог, находящийся в лавсановых мешочках, подпрессовывают, извлекают из них и оценивают по органолептическим и физико-химическим показателям (определяют массовую долю влаги, титруемую кислотность). Кроме того, определяют массовую долю сухих веществ в сыворотке.

## Порядок оформления работы

Составить технологическую схему производства творога кислотным способом.

Результаты наблюдений за процессом синерезиса творожных сгустков представить по форме, представленной в табл. 10, а также в графическом виде.

Таблица 10

**Динамика отделения сыворотки из творожных сгустков**

№ образца	Вид закваски	Продолжительность наблюдения, мин											
		1	2	3	4	5	10	15	20	25	30	35	40
		Количество выделившейся сыворотки, мл											
1	Творожная закваска												
2	Настой чайного гриба												

Данные по определению показателей качества творога привести по форме, представленной в табл. 11.

Таблица 11

**Характеристика образцов сгустка, творога и сыворотки**

№ образца	Титруемая кислотность, °Т			Массовая доля, %		Органолептические показатели творога	
	сгустка	творога	сыворотки	влаги в твороге	сухих веществ в сыворотке	Вкус и аромат	Консистенция
1							
2							

В заключение отчета сделать выводы по работе в целом.

## **ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ ЗАОЧНОЙ ФОРМЫ ОБУЧЕНИЯ**

При изучении дисциплины «Селекция промышленных штаммов микроорганизмов» студентам заочной формы обучения следует руководствоваться учебной программой и вопросами для самопроверки. Более основательному изучению курса будут способствовать установочные и заключительные лекции по основным разделам.

Каждым студентом-заочником должен быть выполнен курс лабораторных работ и практических занятий согласно программе. Студент представляет реферат (темы рефератов указаны выше), а также контрольную работу, номер варианта которой выбирается по последней цифре номера зачетной книжки студента. Варианты контрольной работы по дисциплине «Селекция промышленных штаммов микроорганизмов» приведены ниже.

### **ВАРИАНТЫ КОНТРОЛЬНОЙ РАБОТЫ**

#### **Вариант 1**

1. Биохимические основы технологии ферментированных молочных продуктов с использованием промышленных микроорганизмов.
2. Особенности подбора пробиотических микроорганизмов в состав бактериальных заквасок.

#### **Вариант 2**

1. Виды микроорганизмов, используемых в отраслях пищевой промышленности.
2. Методы оценки устойчивости заквасочной микрофлоры к неблагоприятным факторам культивирования.

#### **Вариант 3**

1. Роль пробиотических микроорганизмов в технологии инновационных мясопродуктов.
2. Источники и методы выделения микроорганизмов для использования в пищевой промышленности.

#### **Вариант 4**

1. Виды бактериальных заквасок, применяемых при производстве ферментированных молочных продуктов.
2. Способы улучшения производственно-ценных свойств микроорганизмов.

#### **Вариант 5**

1. Оценка свойств получаемых чистых культур и бактериальных заквасок для получения продукции высокого качества.
2. Получение улучшенных форм микроорганизмов способом адаптации к режимам культивирования.

#### **Вариант 6**

1. Основные виды пробиотических микроорганизмов.
2. Применение мутагенного воздействия для усиления биотехнологических свойств заквасочных микроорганизмов.

#### **Вариант 7**

1. Способы сохранения промышленных микроорганизмов.
2. Принципиальная схема получения бактериальных заквасок.

#### **Вариант 8**

1. Антагонистическая активность заквасочной микрофлоры.
2. Биохимические основы технологии хлебопечения.

#### **Вариант 9**

1. Изменчивость свойств культур молочнокислых бактерий.
2. Контроль качества заквасок.

#### **Вариант 10**

1. Направленное изменение свойств микроорганизмов с помощью генной инженерии.
2. Схема селекции различных видов молочнокислых микроорганизмов из природных источников.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф.** Микробиологические основы молочного производства. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.
2. **Красникова Л.В.** Микробиология продуктов животного происхождения: Учеб. пособие. – СПб.: Троицкий мост, 2016. – 296 с.
3. **Красникова Л.В., Гунькова П.И., Маркелова В.В.** Микробиология молока и молочных продуктов: Лабораторный практикум: Учеб.-метод. пособие. СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 85 с.
4. **Красникова Л.В., Гунькова П.И.** Общая и пищевая микробиология: Учеб. пособие. Часть I. – СПб.: Университет ИТМО, 2016. – 134 с.
5. **Еремина И.А., Лузина Н.И., Кригер О.В.** Микробиология продуктов растительного происхождения. Учеб. пособие/. Кемеровский технологический институт пищевой промышленности.– Кемерово, 2003.– 87 с.
6. Микробиология пива /Под ред. Ф.Дж. Приста, Й. Кэмпбелла. – СПб.: Профессия, 2005. – 368 с.
7. **Ганина В.И.** Пробиотики. Назначение, свойства и основы биотехнологии: Монография. М.: МГУПБ, 2001. – 169 с.
8. **Красникова Л.В.** Микробиология: Учеб. пособие. – СПб.: Троицкий мост, 2012. – 296 с.
9. Технические условия. Закваски, бактериальные концентраты, дрожжи и тест-культуры. ТУ 9229-369-00419785-04.

### Интернет-ресурс

#### *Электронные библиотечные системы:*

1. Электронные ресурсы открытого доступа библиотеки Университета ИТМО:  
[http://lib.ifmo.ru/free\\_res/Free\\_Electronic\\_Resources.htm](http://lib.ifmo.ru/free_res/Free_Electronic_Resources.htm).
2. Электронный каталог ИХиБТ Университета ИТМО:  
[http://lib.ifmo.ru/cat\\_ihbt/cat\\_ihbt.htm](http://lib.ifmo.ru/cat_ihbt/cat_ihbt.htm).
3. Научная электронная библиотека: <http://elibrary.ru>.
4. Библиотека. Единое окно доступа к образовательным ресурсам: <http://window.edu.ru>.
5. Российская электронная библиотека: <http://www.elbib.ru>.

6. Публичная Интернет-библиотека: <http://www.public.ru>.

7. Электронная библиотека издательства «Лань»:  
<http://e.lanbook.com/>

*Электронные ресурсы:*

1. Все ГОСТы – [vsegost.com](http://vsegost.com).

2. Электронные книги по пищевой промышленности –

<http://mppnik.ru/>

<http://www.twirpx.com/files/food/quality/>

3. Сайт ИнтерКонсалт – <http://www.iksystems.ru>

4. Ресурс для скачивания: <http://www.ukazka.ru/product-book7>

**Приложение**  
Форма отчета по лабораторной работе

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ, МЕХАНИКИ И ОПТИКИ

Кафедра прикладной биотехнологии

Учебная группа \_\_\_\_\_

Ф.И.О. студента \_\_\_\_\_

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ г.

**О Т Ч Е Т**

по лабораторной работе

\_\_\_\_\_  
(наименование работы)

**Перечень используемого оборудования, приборов и сырья**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Задание**

## Полученные результаты

## Выводы

Работу выполнил

«\_\_» \_\_\_\_\_ г.

(подпись)

Работу принял

«\_\_» \_\_\_\_\_ г.

(подпись)

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Организация самостоятельной работы студентов.....	3
Методические указания к лабораторным работам.....	10
Правила техники безопасности при работе в лаборатории.....	11
Лабораторная работа № 1. Исследование биотехнологических свойств промышленных микроорганизмов.....	12
Лабораторная работа № 2. Определение симбиотических свойств микроорганизмов для получения многоштаммовых бактериальных заквасок.....	20
Лабораторная работа № 3. Определение устойчивости штаммов чистых культур к бактериофагу .....	23
Лабораторная работа № 4. Оценка устойчивости заквасочных культур к неблагоприятным факторам культивирования.....	30
Лабораторная работа № 5. Ознакомление с видовым составом и свойствами бактериальных заквасок, содержащих пробиотические микроорганизмы.....	34
Лабораторная работа № 6. Применение микрофлоры настоя чайного гриба при производстве кисломолочных продуктов.....	44
Особенности организации самостоятельной работы студентов заочной формы обучения.....	52
Варианты контрольной работы.....	53
Список литературы.....	55
Приложение.....	56

**Миссия университета** – генерация передовых знаний, внедрение инновационных разработок и подготовка элитных кадров, способных действовать в условиях быстро меняющегося мира и обеспечивать опережающее развитие науки, технологий и других областей для содействия решению актуальных задач.

---

### **КАФЕДРА ПРИКЛАДНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Кафедра технологии молока и молочных продуктов была организована в 1931 году и является одной из старейших выпускающих кафедр университета. С 2007 года – кафедра технологии молока и пищевой биотехнологии, а в настоящее время кафедра прикладной биотехнологии. Создание кафедры связано с именем известного ученого в области молочного дела профессора Семена Васильевича Паращука, руководившего кафедрой со дня ее основания до 1949 года. В настоящее время кафедрой руководит профессор Л.А. Забодалова.

История кафедры, ее традиции и достижения неразрывно связаны с именами высококвалифицированных преподавателей и ученых, замечательных людей, преданных своему делу, работавших на кафедре в различные периоды времени. Это профессора С.В. Паращук, М.С. Коваленко, М.М. Казанский, А.М. Маслов, А.Д. Грищенко, Г.В. Твердохлеб; доценты А.И. Желтаков, Н.Г. Алексеев, А.Н. Королев, Н.А. Новоселов, А.И. Воробьев, Г.М. Паткуль, В.В. Глазачев, А.К. Аввакумов, В.Л. Гуляев; старшие преподаватели Л.А. Качтова, В.Д. Гудков и др. Имена и труды многих из них известны не только в нашей стране, но и за рубежом.

В настоящее время на кафедре сформировался высокопрофессиональный педагогический коллектив, достойно продолжающий дело, начатое 86 лет назад. Сотрудники кафедры, понимая всю важность подготовки квалифицированных специалистов для перерабатывающих отраслей промышленности и, в первую очередь, для молочной, выполняли и выполняют большую учебно-методическую работу по созданию учебной литературы, разработке новых учебных планов и программ, созданию технической базы для проведения лабораторных и практических занятий, внедрению современных технологий обучения, воспитанию обучающейся молодежи.

Евстигнеева Татьяна Николаевна  
Кудрявцева Татьяна Алексеевна

**Селекция промышленных штаммов  
микроорганизмов**

**Учебно-методическое пособие**

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел  
Университета ИТМО  
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49