

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
( Н И У « Б е л Г У » )**

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

**Кафедра биотехнологии и микробиологии**

**ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ ЙОГУРТОВ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ  
МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

**Выпускная квалификационная работа**  
студентки очной формы обучения  
направления подготовки 19.03.01 Биотехнология  
4 курса группы 07001316  
Новомлинской Веры Николаевны

**Научный руководитель**  
к.б.н. старший преподаватель  
кафедры биотехнологии и  
микробиологии,  
Серикова Н.В.

**БЕЛГОРОД 2017**

## ОГЛАВЛЕНИЕ.

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	6
1.1. Молочнокислые пробиотические культуры и их применение в производстве.....	6
1.2. Морфофизиологическая характеристика молочнокислых бактерий.....	10
.....	
1.3. Аутоэкология молочнокислых микроорганизмов.....	21
1.4. Технологические характеристики молочнокислых микроорганизмов.....	30
.....	
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	40
2.1. Объекты исследования.....	40
2.2. Условия исследования, оборудование.....	42
2.3. Статистический метод обработки полученных данных.....	46
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	48
3.1. Влияние различных сахаров и их концентраций на нарастание биомассы бифидобактерии в жидкой питательной среде.....	48
3.2. Влияние кислот и рН среды на рост колоний бифидобактерий.....	50
3.3. Статистический анализ эксперимента.....	52
ВЫВОДЫ.....	54
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	55

## ВВЕДЕНИЕ

Для здоровья человека и поддержания активной жизнедеятельности важным является сбалансированное питание высокого качества, которое необходимо как для нормального функционирования организма в целом, так и для создания устойчивости к воздействию вредных факторов окружающей среды. Важную роль при этом играют молочнокислые пробиотические бактерии. Бифидобактерии входят в группу классических пробиотиков – микроорганизмов кишечного происхождения, регулярный приём которых оказывает благоприятное действие на жизнедеятельность организма человека [34].

Большое значение для пищевой промышленности имеют молочнокислые и пробиотические микроорганизмы, поскольку занимают ключевую позицию в производстве молочнокислых продуктов (простокваши, кефира, йогурта, ацидофилина).

Разнообразные технологические решения в области масштабного промышленного производства и применения натуральных йогуртов и других молочнокислых продуктов – биокорректоров открывают новые этапы научно-технического прогресса не только в нашей стране, но и для всего мирового сообщества. Такая биопродукция обладает высокой конкурентной способностью на мировом рынке благодаря стопроцентной натуральности, гарантии безвредности, высокой биологической и социально-экономической значимости, а также довольно низкой себестоимости [14].

В настоящее время наметилась тенденция в разработке и внедрении кисломолочных продуктов с широким спектром заквасочной микрофлоры, продукты метаболизма которой играют важную роль в профилактике различных заболеваний. Перспективным является конструирование новых функциональных продуктов на основе молочного сырья. Разработка технологий их получения для населения, проживающего в регионах с неблагоприятной экологической обстановкой, а также лиц, предрасположенных к заболеваниям желудочно-кишечного тракта.

Известно, что в толстом кишечнике человека обитают одни из наиболее полезных молочнокислых пробиотических бактерий - бифидобактерии и лактобактерии. Бифидобактерии вырабатывают некоторые ферменты из класса гидролаз, расщепляющие лактоз содержащие вещества, выделяя при этом энергию для их роста и размножения и органические кислоты, в частности молочную, препятствующие развитию многих патогенных микроорганизмов. Функциональные продукты питания, предназначенные для различных групп населения, способствуют сохранению здоровья людей за счет сбалансированного состава пищевых веществ, продуцируемых этими микроорганизмами. Самыми важными и популярными пробиотическими культурами, из которых состоят многие препараты и молочные продукты, являются лактобактерии и бифидобактерии [5].

Положительное влияние на жизнедеятельность человека пробиотиков, содержащих эти микроорганизмы, может быть использовано в промышленных условиях для производства биомассы клеток с последующим использованием молочнокислых бактерий в соответствующих пищевых производствах [52].

Микроорганизмы широко применяются в различных пищевых и производствах, в частности в заквасках кисломолочных продуктов, в том числе и в йогуртовых. В производственных условиях заквасочные культуры подвергаются воздействию различных физико-химических факторов производства и отдельных компонентов изготавливаемой продукции, что вынуждает их к необходимости выработке соответствующих защитных механизмов и адаптации к окружающей среде [22, 54].

Среди наиболее важных факторов, влияющих на эффективность пробиотических штаммов, многие авторы отмечают необходимость сохранения жизнеспособности клеток при прохождении желудочно-кишечного тракта и устойчивость к кислотному стрессу [14].

Актуальность данной работы заключается в важности установления влияния различных компонентов йогурта на жизнедеятельность

молочнокислых бактерий, их адаптацию и увеличение биомассы в технологической среде. Исследование и результаты выполненного эксперимента актуальны не только для данной работы, но и для различных производств, заинтересованных в улучшении качества выпускаемых ими кисломолочной продукции, содержащие, в качестве закваски молочнокислые микроорганизмы. Наполнители не должны затруднять нормальный рост и развитие микроорганизмов [59].

Учитывая вышесказанное цель нашей работы – изучить влияние широко применяемых компонентов йогуртов – кислот и сахаров на вид *Bifidobacterium longum*.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- провести анализ отечественный и зарубежных литературных данных по изучаемой проблеме и определить физиолого-биохимические аспекты вида *B. longum*;

- выявить влияние концентраций различных сахаров, как одного из самых частых наполнителей йогурта, на накопление биомассы *B. longum*;

- проанализировать действие различных пищевых кислот и уровня pH среды на рост колоний *B. longum*.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.

### 1.1. Молочнокислые пробиотические культуры и их применение в производстве.

Современные технологии производства пищевых продуктов включают использование различных продуктов включающих пробиотические микроорганизмы, благотворно влияющие на организм человека. Часто они содержат добавки для улучшения технологических параметров продуктов, а также сенсорных и текстурных характеристик. Исключением не стал и такой популярный на сегодняшний момент кисломолочный продукт как йогурт [5] .

Его применение довольно широко от употребления в пищу и до использования в косметологии. К сожалению, на сегодняшний момент, не все йогурты, представленные на полках магазинов, реально способны принести пользу нашему организму. Многие из йогуртов проходят дополнительную термическую обработку, что бы увеличить срок хранения, но данная процедура зачастую делает их бесполезными для здоровья. Помощь организму может принести только тот кисломолочный продукт, который содержит живые микроорганизмы [40,8].

Йогурт – это кисломолочный продукт, который содержит в своем составе высоко обезжиренные вещества молока, производится путем сквашивания молока специально подобранными культурами – болгарской палочкой и термофильным стрептококками. В готовом продукте на конец срока годности содержание бактерий должно составлять не менее  $10^7$  КОЕ в 1 грамме продукта.

В состав йогурта могут входить дополнительные компоненты, полисахариды и белки, использующиеся в пищевой и фармацевтической отраслях промышленности, которые выполняют следующие функции:

гелеобразования, суспендирования, стабилизации пены, загущения, предотвращения кристаллизации льда, регулирования аромата и кислотности, эмульгирования [35,9].

Для кисломолочных продуктов в современной пищевой промышленности используются.

Антиокислители, антиоксиданты или ингибиторы окисления – это такие вещества, которые замедляют процессы окисления пищевых продуктов. Они защищают имеющиеся в продукте жиры и жиросодержащие вещества, содержащиеся в производимом изделии от прогоркания, сохраняя фрукты, овощи и продукты их переработки от потемнения, замедляют ферментативное окисление конечного кисломолочного изделия [31, 45].

Гелеобразователи, желеобразователи, желирующие вещества – это вещества способные образовывать гели. Гелеобразователи не являются эмульгаторами. В их молекулах отсутствуют липофильные и гидрофильные группы, однако некоторые гелеобразователи стабилизируют эмульсии. В первую очередь это относится к альгинатам, поэтому их обычно используют в кисломолочных продуктах, подвергаемых пастеризации.

Загустители – это вещества, увеличивающие вязкость пищевых продуктов, загущающие их. Загустители улучшают и сохраняют структуру пищевого продукта, позволяют получать продукты с нужной консистенцией, которая положительно влияет на вкусовое восприятие. На этикетках чаще всего пишут под названием E1422 – это дикрахмаладипат ацетилованный.

Консерванты – вещества, подавляющие развитие микроорганизмов.

Красители – вещества, восстанавливающие природную окраску, утраченную в процессе обработки и хранения, повышающие интенсивность природной окраски, окрашивающие бесцветные продукты

Наполнители – это инертные вещества, применяемые в производстве низкокалорийных продуктов [21, 32].

Подкислители, кислоты – вещества, вызывающие кислый вкус пищевого продукта.

В йогуртах и йогуртовых продуктах процесс подкисления делают мягким, но устойчивым, способствующим росту и развитию бактерий. Подкислители выступают как действенные факторы, избирательно активирующие развитие молочнокислых микроорганизмов и бифидобактерий, они угнетают рост условно-патогенной и патогенной микрофлоры.

Усилители, модификаторы вкуса и аромата усиливают восприятие вкуса и аромата путём стимулирования окончаний вкусовых нервов, хотя сами усилители могут не иметь ни собственного запаха, ни вкуса.

Эмульгаторы ( E<sub>471</sub> моно- и диглицериды пищевых жирных кислот) – это вещества, делающие возможным или облегчающие получение эмульсий и стабилизирующие последние [42,15].

Все бактерии, которые входят в состав закваски для молочнокислых продуктов, и йогуртов в том числе, по-разному могут реагировать на изменение окружающей их среды. Например, для придания особого вкусового качества и регулирования кислотности в йогуртах применяют кислоты, которые в свою очередь снижают рН среды. Показатели кислотности среды рН может изменяться в довольно широких пределах. Концентрация водородных ионов может влиять на ионное состояние, на доступность для клетки многих метаболитов, которые в незаряженном состоянии легче проникают через мембрану бактерий.

Однако если рН не соответствует оптимальной величине, то многие бактерии не развиваются должным образом, так как активная кислотность оказывает влияние на тонус ферментов клетки и проницаемость их цитоплазматической мембраны [5, 13].

Многие микроорганизмы, которые образуют продукты обмена и выделяют их в среду, способны изменять реакцию среды. При температуре 25°C *Streptococcus lactis* за счет образования молочной кислоты снижает показатель рН примерно до 4,5.



Молочнокислые бактерии относятся к ацидофильным микроорганизмам. Они могут расти в средах с низким значением рН от 5,5 до 8,8, некоторые — при рН 2,9—3,2.

Лактобациллы достигают оптимального развития при низком значении рН и пониженном содержании кислорода. Рост штамма *L. plantarum* наблюдался при значениях рН 4,0–9,0, штамма *L. casei* – при рН 4,0–7,0, штамма *L. lactis* – при 6,0–8,0 [30, 18].

При термообработке йогуртов в высоких температурах может произойти гибель пробиотических молочнокислых микроорганизмов, чтобы это предотвратить необходимо знать пределы роста и размножения используемых в данном изделии бактерий.

Все температурные оптимумы развития молочнокислых микроорганизмов можно определить их термоустойчивостью ферментов и клеточных структур, содержащих белки. Среди используемых молочнокислых бактерий, входящих в состав закваски для йогурта, можно отметить мезофилов таких как *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*.

Необходимо так же помнить, что сильное повышение температуры для данного вида бактерий может привести к нежизнеспособности их клеток.

Гибель бактерий наступает не сразу, а на протяжении некоторого времени. Микроорганизмы могут также испытывать «тепловой удар» в случае, если температурные пределы превышены не сильно и воздействие такой температуры на бактерии было недлительным.

Денатурация клеточных белков связана с механизмом губительного действия высоких температур на клеточные структуры бактерий.

На денатурацию белков, влияет температура и содержание в них воды, чем больше воды в белке, тем ниже температура распада белка.

Старые обезвоженные клетки, не богатые свободной водой, погибают при нагревании медленнее, чем молодые клетки.

Следует также среди молочнокислых бактерий отметить и теплолюбивых - термофилов *Lactobacillus delbrutkii*, *Streptococcus thermo-*

*philes*, их главное отличие от других микроорганизмов – обладание термоустойчивостью.

Термоустойчивость – это когда микроорганизмы могут выдерживать длительное нагревание температуры, которая превышает температурный максимум их роста и развития.

Гибель таких микроорганизмов наступает при определённых температурных значениях и также зависит от вида микроорганизма. При нагревании в течение 20 минут бактерий во влажной среде в температурных пределах 70-80 °С начинают погибать молодые вегетативные клетки многих микроорганизмов.

Большая устойчивость к высокой температуре термофильных микроорганизмов связана с белками и ферментами содержащих их клеток, также зависит от содержания влаги. Скорость синтеза структур клеток термофилов намного выше скорости их разрушения.

Устойчивость спор бактерий к высоким температурам связана с маленьким содержанием в их свободной воды, оболочкой, имеющей много слоев, в состав которой входит кальциевая соль дипликоновой кислоты.

Молочнокислые микроорганизмы намного устойчивее к низким температурам, несмотря на их размножение и биохимическую активность микроорганизмов.

При повышении температуры клетки начинают интенсивно размножаться.

Причинами гибели микроорганизмов при действии низких температур являются нарушение обмена веществ; повышение осмотического давления среды вследствие вымораживания воды; в клетках могут образоваться кристаллики льда, разрушающие клеточную стенку [26, 30].

## 1.2. Морфофизиологическая характеристика молочнокислых бактерий.

Молочнокислые бактерии являются прокариотами, как и все прокариоты, они не имеют ядра. Носителем наследственной информации выступает спиральная нить ДНК, которая локализуется в цитоплазме. Внутренне содержимое защищает от внутренней среды оболочка и тонкая цитоплазматическая мембрана.

Эти бактерии относятся к семейству *Lactobacillaceae*, оно включает три рода: *Streptococcus*, *Leuconostoc* и *Lactobacillus*. Бактерии рода *Lactobacillus* не нуждаются в лактозе для углеводного обмена. Они сами не могут синтезировать витамины и аминокислоты эти микроорганизмы также не встречаются ни в почве, ни в воде. Естественная среда обитания этих бактерий – растения и их остатки. Их можно встретить как в кишечнике, так и на коже и слизистых оболочках человека и животных. Молоко для семейства *Lactobacillaceae* является самой оптимальной средой их обитания и выращивания [43].

Виды рода *Streptococcus* являются гомоферментативными, то есть они сбраживают более 90 % сахара в молочную кислоту и лишь незначительную его часть – в уксусную кислоту и спирт. В роду молочнокислых стрептококков различают несколько групп.

Группа молочных бактерий: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetilactis*.

Группа Viridans: *Streptococcus thermophilus*.

Группа энтерококков: *Streptococcus faecalis* var. *faecalis*, *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*, *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*, *Streptococcus faecium*, (*Streptococcus durans*), *Streptococcus bovis*. Патогенные стрептококки (*Streptococcus agalactiae*) [1,7,30].

Первый микроорганизм, который был выделен в чистую культуру, является *Streptococcus lactis*. В большинстве случаев он встречается на поверхности растений. Вместе с пылью и мелкими растительными частицами попадает на доильное оборудование и аппараты, затем в молоко.

*Streptococcus lactis*, в основном, встречается в виде коротких цепочек от двух до шести звеньев.

Штаммы, не образующие слизи и ароматические вещества с неприятным запахом, в основном это многие дикие штаммы, входят в состав заквасок. Оптимальной температурой развития для *Streptococcus lactis* является 30°C. Некоторые штаммы могут размножаться и при низких температурах (ниже 8°C), но этот процесс проходит медленнее, чем при оптимальной температуре.

Сливочный стрептококк *Streptococcus cremoris*. Стрептококк в непрощедшем обработке молоке встречается не так часто, как *Streptococcus lactis*, от которого он отличается морфологически и физиобиохимически, так как образует довольно длинные цепочки. 20–25°C является оптимальной температурой развития для *Streptococcus cremoris*. При температурах 10–18 °C *Streptococcus cremoris* в большинстве случаев образует слизь и неприятный запах. В странах, которые находятся на севере, данный стрептококк используется для приготовления особого кислого молока. В заквасках молочнокислых бактерий сливочный стрептококк вместе в сочетании с *Streptococcus lactis* способствует образованию более густой консистенции конечного изделия [37].

Ароматобразующий стрептококк *Streptococcus diacetylactis* продуцирует фермент цитритазу, которая расщепляет цитраты с образованием диоксида углерода и ароматических веществ – ацетона и диацетила.

*Streptococcus diacetylactis* – сравнительно слабый кислотообразователь, имеет слабую энергию кислотообразования, предельная кислотность в молоке достигается через 16 часов.

Сгусток молока содержит пузырьки газа – диоксида углерода. Его образование может быть необходимым или нежелательным. С другой стороны, оно не должно быть настолько сильным, чтобы обуславливать

пороки рисунка сыра. В кисломолочных продуктах присутствие диоксида углерода улучшает вкус [33].

Газообразование немного сильнее при использовании в качестве питательной среды цельного молока, по сравнению с обезжиренным.

Оптимальной температурой ароматообразования для *Streptococcus diacetilactis* является 25°C. Эта бактерия в качестве заквасочного микроорганизма используется при производстве молочных продуктов, в которых желательна сильная кислотная и ароматообразующая способность, например для приготовления масла, творога, сметаны, простокваши и разных сортов свежего сыра [4].

Род *Lactobacillus* в молочной промышленности возглавляют грамположительные молочнокислые палочки.

*Lactobacillus bulgaricus* он же *Thermobacterium bulgaricum*. В большинстве случаев образует довольно длинные палочки и является гомоферментативной бактерией. Совместно с *Streptococcus thermophilus* или в сочетании с окисляющей в большей степени *Lactobacillus jughurti* применяется для изготовления кисломолочного продукта - йогурта. Иногда *Lactobacillus bulgaricus* используют в составе бактерий молочнокислой закваски для приготовления многих молочнокислых продуктов. *Lactobacillus bulgaricus* используют также при производстве твердых сыров [36,27].

40–45°C является оптимальной температурой развития данной бактерии. *Lactobacillus lactis* он же *Thermobacterium lactis* образует довольно длинные нити, состоит из палочек размером 1,0 - 9,0x0,5-1,2 мкм . Находится в кишечнике человека и животных. *Thermobacterium lactis* можно обнаружить на доильном оборудовании и аппаратах и в отличие от других видов лактобацилл, она присутствует в сыром молоке. *Lactobacillus lactis* похожа на *Lactobacillus caucasicus*, которая в основном находится в кефире. Она принимает участие в созревании твердых сыров. Идеальной температурой развития *Lactobacillus caucasicus* находится в пределах 38-40 °C. *Lactobacillus helveticus* или *Thermobacterium helveticum* встречается в

неподвергшемся обработке молоке, в сычуге или в сычужном ферменте крупного рогатого скота, в основном телят. *Lactobacillus helveticus* используется совместно с *Streptococcus thermophilus* для изготовления и созревания некоторых видов швейцарских сыров, благодаря своим протеолитическим эндоферментам.

*Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium bifidum*. (это разные виды) Находятся в больших количествах в кишечнике детей и взрослых при преимущественно молочном питании. Часто *Lactobacillus acidophilus* обнаруживают и в кишечнике крупного рогатого скота, зачастую у телят [29,39].

Следует отметить из других встречающихся в молоке и молочных продуктах лактобацилл: *Lactobacillus casei* или *Streptobacterium casei* – сильно протеолитическая, *Lactobacillus brevis* или *Betabacterium breve*, *Lactobacillus fermenti* или *Betabacterium longum*.

Виды рода *Leuconostoc* зачастую находятся на растениях и морфологически схожи со стрептококками.

Одним из основных свойств молочнокислых бактерий, по которому их объединяют в отдельную группу молочнокислых микроорганизмов, является способность этих бактерий образовывать в качестве продукта брожения молочную кислоту от 1 до 3,6 %.

Сбраживание углеводов по типу молочнокислого брожения, как правило, совпадает с рядом других отличий. Почти все молочнокислые бактерии грамположительные, факультативные анаэробы. Среди молочнокислых микроорганизмов есть мезофилы, которые предпочитают температуру порядка 30°C; термофилы (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*), оптимальной температурой размножения для которых является 40–50 °C [32, 27].

Морфология бактерий и форма колоний.

По форме и морфологии клеток все молочнокислые бактерии – палочковидные и коккообразные. Размеры их колеблются у различных видов.

Бактерии рода *Streptococcus* – округлые или овальные клетки, диаметр которых составляет от 0,5 – 0,6 до 1 мкм, они расположены либо единично, либо парами или цепочками разной длины.

Микроорганизмы рода *Leuconostoc* являются удлинёнными или слегка яйцевидными, диаметр которых варьирует от 0,5 до 0,8 мкм, а длина до 1,6 мкм. Иногда эти бактерии имеют палочковидную форму длиной до 1-3 мкм, располагаются преимущественно цепочками, которые не образуют кучкообразных скоплений клеток [17, 28].

Бактерии *Leuconostoc cremoris* имеет клетки, которые выстраиваются в длинные двойные цепочки. У некоторых лейконостоков на их морфологию клеток влияют условия выращивания бактерий. При культивировании их в молоке большинство штаммов образуют клетки, похожие на кокки, которые находятся в скоплении в коротких цепочках. При культивировании в мясном бульоне зачастую клетки лейконостоков удлиняются и принимают вид палочек, проявляясь морфологически ближе к лактобактериям, чем к стрептококкам [10, 39].

Более различны по форме палочковидные молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*, они варьируют от коротких кокков до длинных, нитевидных палочек. Например, бактерии вида *Lactobacillus plantarum* имеют прямые немного с закруглёнными концами палочки разной длины – от 0,6 – 1,2 до 3,0-7,0 мкм, располагаются единично или цепочками. Микроорганизмы вида *Lactobacillus casei* имеют короткие или относительно длинные, тонкие палочки, порою частично извитые, располагаются диплобациллами или цепочками, притом длина отдельных палочковидных или клеток в виде цепочек определяется средой, на которой их вырастили.

Типична форма клеток видов термофильных молочнокислых бактерий рода *Thermobacterium*. Микроорганизмы растут в виде длинных, зачастую очень толстых палочек, иногда нитевидных и длинных цепочек [16].

Длина клеток зависит у различных культур одного и того же вида молочнокислых бактерий от состава среды, присутствия или отсутствия

кислорода, способа инкубации бактерий. Например, стрептококки *Streptococcus cremoris*. *Str. bovis* могут вытягиваться в длину и напоминать форму в виде палочек, а палочкообразные бактерии – образуют цепочки похожие на кокки типичный пример *Str. casei* [40, 21].

В некоторых культурах *Str. cremoris* и *Str. lactis*, которые вырастили в термостате на среде с добавлением 2% молочного порошка, можно обнаружить длинные нитеобразные клетки. Возможно, это связано с уменьшением аутолитических ферментов, которые участвуют в процессе расхождения клеток в ходе их деления.

Бактерии *Str. citrovorus*, *str. paracitrovorus* *str. diacetylactis* имеют клетки намного меньшего размера, чем у *str. lactis* они располагаются в виде скоплений или отдельных клеток, преимущественно диплококков и цепочек.

При посеве их на твердые питательные среды, бактерии могут образовывать сходные со *Str. lactis* и *Str. cremoris* круглые, каплевидные, с ровно очерченным краем поверхностные колонии; глубинные колонии — лодочкообразные, зачастую с ровным краем. У некоторых из бактерий, например, *Str. diacetylactis*, образующих диацетил, на твердой среде с 3% агара глубинные колонии имеют разветвленную форму, сходную с колониями молочнокислых палочек.

*Streptococcus liquefaciens* имеют каплевидные, блестящие клетки, размер которых варьирует от 1 до 2 мм, в основном это диплококки или цепочки. При высадке их на твердую питательную среду образуют чечевице подобную глубинную форму колонии [24, 37].

Огромное влияние оказывает на морфологию клеток их истончение и грануляцию при культивировании молочнокислых бактерий следующие показатели: среды с высокой кислотностью (рН 3,7), значительное содержание соли (до 6%), температуры, которые превышают оптимальные (45°C вместо 18°C). Такие же по морфологии длинные или тонкие, гранулированные палочки выделяются в основном из бродящих овощей их рассолов, винных продуктов, различного вида сула или томатов.



Условия роста изменяют первоначальные морфологические и физиологические свойства молочнокислых бактерий, что можно даже опытные микробиологи могут попутать один и тот же вид. При микроскопировании ученые часто затрудняются, куда стоит отнести тот или иной штамм молочнокислых бактерий – к коккам или палочкам, так как по длине их отличить практически невозможно [8, 11, 27].

Исследователи противоречиво описывали форму и морфологию колоний разных видов молочнокислых бактерий. Многие авторы утверждают, что на средах, содержащих агар-агар или желатин, образуются мелкие колонии без выраженного поверхностного роста, если это истинные молочнокислые бактерии. Но и здесь есть свои исключения, например, виды рода *Streptococcus*, которые могут образовывать мелкие, но поверхностные колонии.

Однако, при прибавлении в культуральную среду веществ, которые обладают восстановительными свойствами, например, 0,2 % цистеина, приводит к образованию молочнокислых бактерий, в основном палочек, к типичным поверхностным шероховатым формам колоний.

Многие исследователи приводят описание поверхностных колоний почти всех видов коккообразных и палочковидных молочнокислых бактерий. Шероховатые колонии в основном образуют термофильные молочнокислые палочки; гладкие формы колоний зачастую образуют мезофильные бактерии, причем эти формы колоний коррелируют с другими признаками микроорганизмов их способностью расти при определенной температуре и образовывать длинные, нередко нитевидные или же короткие клетки [12, 35].

В условиях стресса, вызванного высокой клеточной плотностью или истощением источников питания, молочнокислые бактерии образуют цистоподобные клетки, обладающие всеми признаками покоящихся форм. При расसेве на плотных средах полученных покоящихся клеток молочнокислых бактерий было отмечено изменение диссоциативного спектра выросшей популяции по морфологическим признакам колоний. У *Lactobacil-*

*lus acidophilus* уже на 10 сутки хранения покоящихся форм, образующихся в автолизующихся плотных клеточных суспензиях, было отмечено существенное возрастание доли минорного диссоцианта S-типа, особенно в вариантах сгущения в 20 раз. В опытных образцах, хранившихся 25 и более суток, преобладали колонии S-типа. При хранении в среде роста индекс диссоциации был намного ниже: доля S-диссоцианта составила 6 и 30% на 10 и 25 сутки хранения. Изменение диссоциативного спектра популяции является адаптивным механизмом, обуславливающим проявление различных фенотипов для возможности селективного отбора их вариантов устойчивых в данных условиях, и, таким образом, выживания вида. Это обеспечивается различающимися свойствами диссоциантов. Известно, что минорный S-диссоциант у *Lactobacillus acidophilus* обладал более высокими максимальной удельной скоростью роста и уровнем накопления биомассы, чем доминантный R-вариант [23, 41].

*Bifidobacterium bifidum* — анаэробные грамположительные бактерии, которые относятся к роду *Bifidobacterium* [23].

Имеет три подвида: *Bifidobacterium bifidum infantis*, *Bifidobacterium bifidum longum*, *Bifidobacterium bifidum suis*. По современной классификации род *Bifidobacterium* входит в семейство *Bifidobacteriaceae*, порядок *Bifidobacteriales*, класс *Actinobacteria*, тип *Actinobacteria*, царство Бактерии. *B. bifidum* принимает участие в биосинтезе витаминов. Данную культуру выращивают, создавая анаэробные условия или понижая окислительно-восстановительный потенциал среды. Хорошо растет на молоке, гидролизованном молоке и на гидролизате казеина. Наилучшей средой для выращивания является печеночный бульон с добавлением ростовых факторов таких как: дрожжевой автолизат, кукурузный экстракт, цистеина. На твердых питательных средах бифидобактерии образуют блестящие колонии светло-серого цвета. Размеры колоний достигают от 0,7 до 1,4 мм [2].

*B.bifidum* является хемоорганотрофами, которые активно сбраживают такие источники углерода как сахароза, галактоза, фруктоза, мальтоза, мелибиози, рафиноза, лактоза и другие сахара. Конечными продуктами брожения являются в основном уксусная и молочная кислота в молярном соотношении 3:2. Образуются также побочные вещества муравьиная и янтарная кислоты, в том числе и этанол. Бактерии *B.bifidum* масляную, пропионовую кислоты и CO<sub>2</sub> не образуют [12, 40].

Бифидобактерии, которые не продуцируют каталазу, не образуют индол и сероводород, не восстанавливают нитраты, не разжижают желатин. Они не производят фенол, не образуют аммиак из аргинина. При развитии лакмусовой молоке вызывают частичное или полное восстановление. Цитраты как источник энергии бифидобактерии не используют.

Физиология молочнокислых микроорганизмов.

Все истинные молочнокислые микроорганизмы обладают высокой бродильной способностью. Как правило, источником энергии для бактерий служит молочнокислое брожение. Молчнокислое брожение – это процесс анаэробного окисления углеводов, конечным продуктом при таком брожении выступает молочная кислота. Название данного процесса происходит от наименования конечного продукта – молочной кислоты. Для молочнокислых микроорганизмов этот процесс является основным путем катаболизма углеводов и одним из основных источников энергии, которая выражается в виде АТФ. Белки, которые содержатся в молоке, являются наилучшим источником азотистого питания для изучаемых бактерий, которые могут расщеплять молочный сахар, превращая его в молочную кислоту, и тем самым повышают кислотность среды, при этом молоко свертывается и образует плотный однородный по консистенции сгусток [13, 26].

Данный тип брожения, при котором конечным продуктом является молочная кислота, осуществляется с помощью молочнокислых бактерий, они

подразделяются в зависимости от характера брожения на две большие группы.

Молочнокислое брожение бывает 2 типов гомоферментативное и гетероферментативное.

При гомоферментативном молочнокислом брожении из углеводов образуется только главный продукт - молочная кислота. Химизм данного процесса выглядит следующим образом:



К гомоферментативным молочнокислым бактериям относятся следующие роды молочнокислых стрептококков: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, а также некоторые виды молочнокислых палочек: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus ptantarum* [40].

При гетероферментативном брожении конечными продуктами являются не только молочная кислота, но и другие продукты: уксусная кислота, этиловый спирт, янтарная кислота, диоксид углерода, водород. Суммарное уравнение процесса имеет вид:



Гетероферментативный тип брожения вызывают молочнокислые бактерии рода *Streptococcus* такие как *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus acetoinicus*; бактерии рода *Lactobacillus*: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, а также бактерии рода *Leuconostoc*: *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc cremoris* [16, 24].

Превращение глюкозы начинается с пентозофосфатного пути с образованием рибулозо-5-фосфата. Он под действием фермента эпимеразы превращается в ксилулозо-5-фосфат, происходит все в реакции, которая катализируется пентозофосфаткетотазой, параллельно идет расщепление на 3-фосфоглицерилловый альдегид и ацетилфосфат.

Далее идет процесс превращения 3-фосфоглицерилового альдегида в гомоферментативном молочнокислом брожении. Из этого ацетилфосфата у микроорганизмов образуется ацетат, в ходе реакции идет синтез АТФ, у некоторых других идет восстановление этанола через образование промежуточного продукта реакции - ацетил-КоА и ацетальдегида.

При гомоферментативном брожении из одного моля сброженной глюкозы происходит образование двух молей АТФ, а при гетероферментативном – один моль АТФ.

Помимо глюкозы молочнокислые бактерии сбраживают и другие сахара. Например, некоторые гомо- и гетероферментативные виды бактерий интенсивно сбраживают пентозсахара, иногда этот процесс происходит активнее, чем при брожении глюкозы. Пентозсодержащие сахара превращаются в D-ксилоулозо-5-фосфат, далее расщепляющийся при участии фосфокетолазы – ключевого фермента гетероферментативного брожения – на ацетилфосфат и 3-фосфоглицериловый альдегид, которые в итоге дают молочную и янтарную кислоты [27,36].

Гетероферментативные и многие гомоферментативные молочнокислые микроорганизмы сбраживают фруктозу, так как у них присутствует маннитдегидрогеназа, осуществляющая восстановление фруктозы до маннита. Конечные продукты брожения фруктозы – лактат, ацетат, маннит и углекислый газ.

Многие молочнокислые микроорганизмы сбраживают лимонную кислоту с образованием, помимо других побочных продуктов, диацетила.

Виды рода *Leuconostoc* сбраживают сахара гетероферментативно, это значит, что наряду с незначительным количеством молочной кислоты они образуют уксусную кислоту [19,32].

### 1.3. Аутэкология молочнокислых микроорганизмов.

Все взаимоотношения между молочнокислыми бактериями, как и с другими микроорганизмами, могут быть симбиотическими либо антагонистическими. Разные виды молочнокислых микроорганизмов могут вступать как между собой, так и между другими видами бактерий в различные взаимоотношения [1, 5].

При разработке закваски селекция штаммов молочнокислых бактерий является первым этапом. По вкусовым и микробиологическим критериям готового молочнокислого продукта проводится селекция пробиотических культур. Отбирают штаммы молочнокислых бактерий и заквасочных культур в несколько этапов:

- выделение в чистую культуру бактерий, определение с помощью молекулярно-биологических и микробиологических методов видовой принадлежности микроорганизмов;
- приобретение паспорта культур штаммов;
- производят отбор наиболее удачных промышленных штаммов, которые обладают ценными и пробиотическими свойствами, для конечного выпуска готовых продуктов общего и функционального назначения;
- изготовление заквасок [33].

Главным принципом следующего этапа при формировании закваски является сочетаемость тех скоплений бактерий, которые ее составляют. Микроорганизмы в молоке должны создавать при совместном их культивировании симбиотические или безразличные взаимоотношения. Иногда при добавлении множества бактерий в закваску приводит к нежелательным результатам, опытные микробиологи не советуют смешивать различные закваски. Что бы избежать отрицательные последствия необходимо тщательно изучать физиолого-биохимические и культуральные свойства микроорганизмов. Например, при наблюдении дефицита в среде ростовых факторов молочнокислые микроорганизмы могут расти в

ассоциациях, которые включают до шести компонентов, а могут пагубно влиять друг на друга [35].

В течение логарифмической фазы роста бактерий, выделения витаминов и аминокислот в среду тесно связано с динамичностью роста культур. Данное явление объясняется тем, что некоторые виды культур молочнокислых микроорганизмов выделяют в среду некоторые ростовые вещества и взаимно дополняют потребности в них друг друга.

Проводились наблюдения о благотворном действии одних молочнокислых микроорганизмов на другие. По некоторым данным, энергия смешанной культуры молочнокислых бактерий и энергия кислотообразования *Str. lactis* и *Lactobacillus casei* (или — *Lactobacillus helveticum*) зачастую бывает выше энергии каждой из составляющих ее культур, а повышение числа клеток обоих микроорганизмов в смешанной культуре только увеличивает это явление.

Позднее, в других опытах было отмечено, что выделенные клеточные экстракты из культур *Str. lactis* оказывают стимулирующее действие на рост молочнокислых бактерий [21].

При изучении микрофлоры йогурта установлено, что при развитии в молоке совместной культуры *Str. thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricum* процесс кислотообразования происходит интенсивнее, чем при развитии каждой культуры отдельно.

Некоторые ученые в своих опытах отмечали, что молочнокислые стрептококки как бы подготавливают условия для развития молочнокислых палочек, потому что они снижают окислительно-восстановительный потенциал до той величины, которая является благоприятной для развития молочнокислых палочек [28].

Известно, что некоторые молочнокислые палочки вырабатывают ростовое вещество, которое обладает водорастворимыми и термостабильными свойствами, оно необходимо для молочнокислых стрептококков, они его продуцировать сами не могут.

Так как, все стрептококки нуждаются в аминокислоте – валине, то вероятнее всего, что это ростовое вещество, выделяемое молочнокислыми палочками ее и содержит.

Проводились опыты, которые выявили стимулирующее действие отдельных видов молочнокислых бактерий — *Str. faecalis* и *Str. arabinosus*, молочнокислых палочек *Lactobacillus casei* и *Leuc. citrovorum*. Симбиотические отношения, наблюдаемые между этими микроорганизмами, основаны на снабжении ими друг друга необходимыми для роста и развития веществами [19,38].

Исследователи молочнокислых бактерий обнаружили, что стрептококки являются слабыми кислотообразователями и они оказывают стимулирующее действие на сильных кислотообразователей. Однако, таким стимулирующим действием обладают не только живые культуры бактерий, но и их фильтраты. Установлено, что в смешанной культуре *Str. lactis* и *Lactobacillus casei* образование пептидов одним видом бактерий, стимулирует рост и кислотообразование другим. Палочки вырабатывают вещества, стимулирующие рост только в присутствии стрептококков [30, 34].

Некоторыми микробиологами была показана возможность получения симбиозов из *Str. lactis* и *Str. cremoris* при составлении двухштабмовых заквасок для сыра и многоштабмовых для составления заквасок для кисломолочных продуктов. При этом достигается повышение кислотообразования на 30- 50% в смешанных комбинациях по сравнению с чистыми культурами. Предполагают, что этот эффект обуславливается тем, что между микроорганизмами происходит сложный обмен продуктами. Взаимная закономерность их совместной жизнедеятельности, которую отмечают большинство исследователей, состоит в том, что культуры со слабой протеолитической активностью стимулируются культурами с более высокой протеолитической активностью [26].



Между молочнокислыми бактериями антагонистические взаимоотношения обуславливаются, главным образом, выделением специфических антибиотических веществ.

Некоторые штаммы *Str. lactis* вырабатывают антибиотическое вещество - низин, полипептидная природа которого впервые была отмечена в 1933 году. Полипептиды вырабатываемые разными штаммами, несколько отличаются по химическому составу, поэтому их принято называть низинами. Они могут оказывать антибиотическое действие на все стрептококки (в том числе и на молочнокислые), включая серологические группы С и D, пневмококки, коринебактерии, актиномицеты, молочнокислые палочки, клостридии и другие спорообразующие бактерии.

В сыром молоке, при наличии большого количества стрептококков, которые вводили с закваской при выработке швейцарского сыра, они образуют низин и тем самым наблюдалось подавление молочнокислых палочек [40].

Имеются некоторые культуры молочнокислых микроорганизмов, чувствительных и малочувствительных к продуктам обмена антагонистов. У штаммов *Str. thermophilus* выявлена способность выделять фермент низиназу, разрушающий низин. Возможно, что этим в какой-то степени объясняется нечувствительность отдельных культур к низину.

При недостаточно правильном учете наличия внутривидового антагонизма у молочнокислых стрептококков может привести к превращению из многоштаммовой закваски в одноштаммовую [23].

Однако, некоторые штаммы молочнокислых стрептококков в смешанной культуре с другими бактериями того же вида становятся преобладающими, даже если они не продуцируют антибиотики. Предполагают, что это может быть связано с различиями в энергии размножения и кислотообразования. Возможно, это связано с различиями в устойчивости к конечным продуктам брожения и в потребности в

питательных веществах. Известно, что *Str. cremoris* способны вытеснять *Str. lactis* из смешанной закваски [24, 36].

Микробиологи получили закваску, которая состоит из *Str. diacetylactis* и *Str. cremoris*, имеющего способность выделять антибиотическое вещество типа низена. Это антибиотическое вещество имело свойство подавлять в разработанной закваске развитие всех микроорганизмов, кроме *Str. diacetylactis*. Доказано свойство некоторых культур *Str. diacetylactis* вырабатывать вещества антибиотического характера, которые имеют свойство подавлять развитие посторонних бактерий. Выявлена их способность становиться преобладающим видом в этих заквасках, состоящих из *Str. lactis*, *Str. cremoris* и *Str. diacetylactis*.

Получены мутанты сверх продуценты *Str. diacetylactis*, неспособные вырабатывать вещество диацетил, но сохраняющие способность вытеснять развитие бактерий, которые вызывают порчу пищевых изделий. Очень высокая энергия кислотообразования молочнокислых бактерий может способствовать улучшению аромата и вкуса, особенно при создании условий с низким рН. Такое сочетание бактерий изучалось при производстве ацидофильной простокваши, получаемый конечный продукт имел прекрасный вкус и аромат [36].

Установлено, это образование диацетела в совместимой культуре *Str. diacetylactis* с закваской для йогуртов при 43° С. И при температуре сквашивания и созревания 30—32° С образование диацетела увеличивалось содержание его [5, 6, 40].

Изменчивость как адаптационный фактор.

В ответ на изменения окружающей среды, которые связаны с уменьшением питательных веществ, источников энергии, пространственных возможностей или с иными воздействиями как ухудшение физико-химических условий, ингибиторные агенты, бактерии способны включать механизмы адаптации, которые выработали в ходе эволюции. Основными

приспособлениями являются покоящиеся формы, в виде которых популяция бактерий переживает неблагоприятные для роста условия [19].

Известно, что адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям – исчерпанию источников питания, сверхкритической клеточной плотности популяции или воздействию антибиотиков – включает: образование цистоподобных покоящихся клеток, предназначенных для переживания и сохранения вида; реализацию внутривидовой фенотипической вариабельности, что проявляется при рассеивании цистоподобных покоящихся клеток на плотные среды развитием колоний не доминантного типа. У *Lactobacillus plantarum* покоящиеся клетки, длительно сохраняющие пролиферативную способность и терморезистентность, образовывались в сгущенных в 10 и 20 раз суспензиях клеток стационарной фазы роста. Популяция четырехмесячных переживающих клеток была представлена двумя типами: цистоподобными покоящимися клетками и L-формами. Покоящиеся цистоподобные покоящиеся клетки *L. lactis* образовывались: в постстационарных культурах, выросших в условиях лимита глюкозы; при суспендировании стационарных клеток в голодной среде без глюкозы. Полученные популяции цистоподобных покоящихся клеток, хранившиеся в разное время, отличались по способности к фенотипической диссоциации, в результате которой в обоих вариантах обнаружено изменение популяционного спектра [23, 40, 1].

При изучении механизмов адаптации молочнокислых бактерий их культуры подвергли стрессовым воздействиям, с которыми бактерии наиболее часто сталкиваются в среде обитания. В адаптационном ответе оценивали сохранение жизнеспособности клеток молочнокислых бактерий в течение длительного времени от 1 до 12 месяцев, образование метаболически неактивных покоящихся форм, а также изменение диссоциативного спектра популяции переживающих клеток [23].

В серии экспериментов, где имитировали стрессовые условия, возникающие в среде роста микроорганизмов при исчерпании источников

питания или нехватке жизненного пространства ввиду высокой клеточной плотности, происходит спонтанный автолиз части клеточной популяции. За счет выхода из автолизирующихся клеток аутоиндукторов анабиоза повышается их внеклеточная концентрация, что, в свою очередь, индуцирует процессы образования покоящихся форм из оставшихся интактными клеток. Такая ситуация моделировалась искусственным сгущением клеточных суспензий молочнокислых бактерий в 10, 20, 30 раз с последующим хранением в течение 4 месяцев в средах различного состава (в среде роста с и без  $\text{CaCl}_2$  0,02%; в фосфатном буфере с  $\text{SiO}_2$  0,09%). В автолизирующихся клеточных суспензиях *L. plantarum* число жизнеспособных клеток снижалось на три порядка в течение первых двух месяцев хранения с дальнейшей стабилизацией на уровне 0,03-0,09% от первоначального значения, что зависело, в том числе, от среды, в которой хранили клетки. Микроскопические наблюдения показали, что на фоне лизиса клеток части популяции, клетки другой части сохраняли интактность и через месяц хранения до 50% из них приобретали кратковременное снижение своей возбудимости, что является одним из морфологических признаков покоящейся формы. С помощью электронной микроскопии можно установить, что популяция переживающих клеток 1-4 месяц хранения представлена двумя типами, имеющими существенные отличия в ультраструктурной организации от вегетативных форм. У покоящихся форм по мере их хранения клеточная стенка уплотнялась и утолщалась; увеличивалось периплазматическое пространство, электронно-прозрачное или заполненное плотными гранулами; цитоплазма приобретала гетерогенную и комковатую структуру; наблюдалась компактизация нуклеотида. По совокупности характеристик ультратонкого строения такие клетки относятся к цистоподобным покоящимся формам [5, 20, 25].

Еще один тип переживающих клеток был представлен L-формами, лишенными клеточной стенки, с интактной цитоплазматической мембраной, комковатой цитоплазмой и слабо компактизованным нуклеотидом.

Полученные в длительно хранящихся около 4 месяцев автолизующих суспензиях переживающие клетки не проявляли метаболической активности и обладали высокой устойчивостью к действию повышенных температур. Термообработка при 60°C, в течение 15 минут вегетативных клеток стационарной фазы роста и постстационарной культуры клеток приводила к гибели, тогда как переживающие клетки опытных вариантов сохраняли жизнеспособность на уровне 0,8 – 8,0% [12, 38].

Сходная картина наблюдалась в сгущенных в 10 и 20 раз в среде роста клеточных суспензиях молочнокислых микроорганизмов рода *L. acidophilus*. Через 1 месяц хранения регистрировали падение числа колониеобразующих единиц на 2 порядка с дальнейшей стабилизацией численности жизнеспособных клеток, составляющей через 4 месяца 1,0 и 1,5% от первоначального значения соответственно [18, 16].

При электронно-микроскопических исследованиях сгущенных суспензий *L. acidophilus*, которые хранились 4 месяца, также были выявлены клетки с уплотненной и утолщенной клеточной стенкой, гетерогенной текстурой цитоплазмы, более компактизованными по сравнению с вегетативными клетками нуклеотидом. Клетки второго типа отличались существенно меньшими размерами и более электронно-плотной цитоплазмой. Переживающие клетки 4-месячных суспензий *L. acidophilus*, так же как и *L. plantarum*, характеризовались повышенной устойчивостью к стрессовым воздействиям – терморезистентностью [17, 32].

Покоящиеся формы молочнокислых микроорганизмов как адаптивный ответ на неблагоприятные условия были получены в экспериментах, когда бактерии выращивали на направленно модифицированных средах с дисбалансом углерода больше, чем азота. Для *L. acidophilus* – при пятикратном снижении количества азота, для *L. lactis* – при пятикратном снижении количества глюкозы в среде, а также при перенесении клеток стационарной фазы в голодную среду с полным отсутствием глюкозы. Дисбаланс углерод-азот в питательной среде вызывает

стимуляцию биосинтеза ауторегуляторов с функцией аутоиндукторов анабиоза, повышение уровня которых индуцирует образование покоящихся форм [12].

Известно, что в 1-4 месячных постстационарных культурах *L. acidophilus*, выращенных на среде с лимитом азота, и *L. lactis* – на среде с лимитом глюкозы или инкубированных в голодной безглюкозовой среде, сохранялось достаточно высокое число жизнеспособных клеток (КОЕ) – около 1-10% от их численности в стационарной фазе. Численность КОЕ в эти же сроки инкубации в контрольных культурах *L. acidophilus* снижалась на 5-6 порядков, а в культурах *L. lactis* падала до единиц КОЕ уже на 15 сутки хранения. Через месяц инкубации переживающие клетки молочнокислых микроорганизмов в опытных вариантах приобретали рефрактерность, а их ультраструктура становилась сходной с покоящейся формой бактерий, полученных в сгущенных клеточных суспензиях. Особенности тонкого строения, термоустойчивость и отсутствие метаболической активности позволили охарактеризовать эти клетки как покоящиеся формы.

В условиях стресса, вызванного высокой клеточной плотностью или истощением источников питания, некоторые молочнокислые микроорганизмы образуют цистоподобные клетки, обладающие всеми признаками покоящихся форм [1].

При рассеве на плотных средах полученных покоящихся клеток некоторых родов молочнокислых микроорганизмов отмечают изменение диссоциативного спектра выросшей популяции по морфологическим признакам колоний. У *L. acidophilus* уже на 10 сутки хранения покоящихся форм, образующихся в автолизирующихся плотных клеточных суспензиях, отмечают существенное возрастание доли минорного диссоцианта S-типа, особенно в вариантах сгущения в 20 раз. В опытных образцах, хранившихся 25 и более суток, преобладали колонии S-типа. В контроле, где хранение происходило в среде роста, индекс диссоциации был намного ниже: доля S-диссоцианта составила 6 и 30% на 10 и 25 сутки хранения. Изменение

диссоциативного спектра популяции является адаптивным механизмом, обуславливающим проявление различных фенотипов для возможности селективного отбора их вариантов, устойчивых в данных условиях и выживания вида [3].

#### 1.4. Технологические характеристики молочнокислых микроорганизмов.

Питательная среда обеспечивает необходимые условия для проведения процесса культивирования. Она обеспечивает жизнедеятельность, рост, развитие, накопление биомассы. Микробиологи называют питательной средой такую среду, которая содержит различные соединения сложного или простого состава, и применяют ее для размножения микроорганизмов в лабораторных или промышленных условиях. Необходимым компонентом для питательной среды является вода, так как только в водной среде протекают процессы жизнедеятельности, помимо этого вода является растворителем для большинства химических соединений и обеспечивает растворение питательных веществ микробной клетки. Также в состав питательной среды входят различные органические и неорганические вещества, такие как углерод, азот, фосфор и другие минеральные вещества, витамины и прочие [5].

Роль этих элементов в составе питательной среды различна и, несомненно, важна, и каждый вид микроорганизмов очень избирателен к питательным веществам среды. В качестве источника углерода чаще используют сахара (глюкоза, лактоза, сахароза), так как они являются легкодоступными. Еще в качестве источника углерода используют многоатомные спирты (глицерин, манит), полисахариды (целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал). Азот является важным фактором роста многих микроорганизмов, он содержится в форме неорганических солей или кислот, а также в форме органических соединений, таких как аминокислоты,

мочевина. Фосфор является необходимым элементом клетки, так как обеспечивает нормальное течение энергетического обмена и других процессов в клетке.

В среду фосфор вносят в виде солей фосфорной кислоты. В присутствии витаминов и микроэлементов практически все микроорганизмы растут лучше, но вносить их в состав сред нужно в микродозах, иначе они будут проявлять ингибирующее действие на микробные клетки [15].

Питательные среды должны обладать оптимальными физико-химическими свойствами: рН, вязкостью, влажностью, осмотическими свойствами. Из-за большого разнообразия питательных сред нет единой классификации [56].

При исследованиях широко применяют натуральные (естественные) среды. Они состоят из продуктов растительного или животного происхождения и имеют неопределенный химический состав. К натуральным средам относят овощные или фруктовые соки, животные ткани, кровь, молоко, яйца, желчь, сыворотку крови, отвары и экстракты, полученные из различных природных субстратов – мяса, различных частей растений, почвы. На натуральных средах хорошо развивается большинство микроорганизмов, так как в таких средах, как правило, имеются все компоненты, которые необходимы для их роста и развития. Но у этих сред имеется существенный минус, они имеют сложный непостоянный химический состав и мало пригодны для изучения физиологии, обмена веществ микроорганизмов, так как в значительной степени не позволяют учесть потребление компонентов среды и образование продуктов обмена по ходу развития. Натуральные среды в основном используются для поддержания культур микроорганизмов, накопления их биомассы и диагностических целей. В качестве примера натуральных сред неопределенного состава, относят мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА), картофельные среды и многие другие [23].



Также к числу натуральных сред относят полусинтетические среды, в состав которых, помимо компонентов с известной химической природой входят и соединения неопределенного состава. Полусинтетические среды используют для получения витаминов, аминокислот, антибиотиков и др. Примерами полусинтетических сред служат мясо-пептонный бульон с глюкозой, среда Эндо, среда Сабуро и т.д. [5].

Полусинтетическими средами также являются среды, состоящие из компонентов с известным химическим составом, такие как нитраты, углеводы, фосфаты и другие, но и в незначительных количествах содержащие компоненты неопределенного состава, такие как кукурузный экстракт, дрожжевой автолизат, гидролизат козеина, которые являются факторами роста [23].

Питательные среды являются синтетическими, если содержат только химически чистые соединения в точно указанных концентрациях, т.е. состав их полностью известен. У таких сред имеются свои достоинства и недостатки. Достоинством являются стандартность сред и воспроизводимость с высокой степенью точности. Эти среды наиболее удобны для исследования обмена веществ микроорганизмов [41].

При разработке синтетических сред необходимо знать потребности микроорганизмов в источниках питания и основные особенности их обмена веществ. В настоящее время существует огромное количество синтетических сред, которые по своим свойствам и качествам не уступают натуральным средам неопределенного состава. Синтетические среды могут состоять из большого набора компонентов, а могут иметь простой состав. Однако только для немногих патогенных бактерий имеются синтетические среды. Их применяют, главным образом, для экспериментального изучения метаболизма микроорганизмов, реже для аналитических целей, диагностики и хранения культур [40].

Питательные среды общего назначения используют для выращивания многих видов микроорганизмов, их используют в качестве основы для

приготовления специальных питательных сред. К ним относятся, например, мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), бульон Хоттингера, агар Хоттингера, сусло жидкое, сусло-агар и др [4].

Чтобы обеспечить нормальный рост и развитие молочнокислых бактерий, необходимы субстраты, содержащие сложные органические формы азота они подбираются различными смесями аминокислот, ферментативными или кислотными гидролизатами некоторых белков мяса, лактальбумина, казеина, различных сортов муки (соевой, фасолевой, виковой), являющимися источниками необходимых пептонов, пептидов, смесей аминокислот [8].

Молочнокислые микроорганизмы нуждаются в полном и готовом наборе аминокислот, углерода, в витаминах группы В<sub>12</sub>, в некоторых компонентах нуклеиновых кислот, что и определяет их широкое распространение в природе. Помимо углерода клетки бактерий в ходе роста и размножения испытывают необходимость в источниках органического фосфора, некоторых макро- и микроэлементов. Все вещества этого рода должны находиться в питательных средах в виде солей, исключением являются только те среды, где фосфор может усваиваться растущими культурами из органических источников, например автолизатов или гидролизатов микробного и животного происхождения [41].

Довольно большое число молочнокислых микроорганизмов не способны синтезировать некоторые сложные органические формы азота и поэтому они нуждаются для своего роста и развития в присутствии этих компонентов в среде; лишь только некоторые из молочнокислых микроорганизмов используют минеральные соединения азота для синтеза ряда органических соединений. Например, иногда в питательной среде присутствуют минимальные количества важных аминокислот, эти бактерии для синтеза отдельных аминокислот и иных азотсодержащих веществ, значительных компонентов клетки потребляют аммиак. Например, рост

*Lactobacillus helveticus* стимулируется аммонийными солями даже в некоторых сложных по своему составу питательных средах [20].

Молочнокислые микроорганизмы по своим потребностям в источниках азота условно делятся на три главные группы:

1) бактерии, которым необходим в сложный комплекс аминокислот (род *Thermobacterium*);

2) бактерии, которые хорошо развиваются на цистеине и аммонийных солях (род *Streptobacterium*);

3) бактерии, развивающиеся на аммонийных солях в качестве единственного источника азота (род *Streptococcus*) [12, 36].

В подавляющем большинстве случаев в промышленных средах для культивирования заранее содержатся все необходимые элементы питания.

Среды, используемые для выращивания микроорганизмов в промышленности очень разнообразны. Это разнообразие, прежде всего, зависит от типа питания бактерий, что позволяет руководствоваться выбором наиболее оптимального сырья для синтеза продуктов. Множество исследований показывает, что наилучшей питательной основой для культивирования молочнокислых микроорганизмов является среда из гидролизованного молока, время инкубации составляет 72 часа. Глюкоза в данном субстрате выступает в качестве источника углерода, а дрожжевой экстракт – фактором роста [28, 31].

Существует множество сред, среди которых следует отметить селективные для культивирования бифидобактерий. Поскольку род *Bifidobacterium* включает большое разнообразие всевозможных видов, отличающихся огромной гетерогенностью по отношению устойчивости к антибиотикам и другим ингибиторам, подавляющих рост бактерии. Это производит сложность для разработки одной среды, которая бы обладала высокой селективностью и хорошей степенью размножения. В промышленности могут использовать неселективные питательные среды. Основной такой средой, имеющей широкое применение при выделении и

контроле производства пробиотических препаратов, молочнокислых продуктов, можно отнести полужидкую печеночно-цистеиновую среду Блаурокка [36, 50].

Все известные молочнокислые бактерии очень требовательны к различным стимуляторам роста, в связи с этой проблемой были предложены питательные среды для культивирования термофильных, мезофильных стрептококком и ацидофильной палочки. Зачастую в качестве углерода используются органические кислоты, различные углеводы. Молочнокислые бактерии на обычных средах не растут, а размножаются только с добавлением различных сортов муки, аминокислот, гидролизатов белков мяса.

Отмечено исключительное влияние добавление моркови, картофеля, дрожжевого автолизата и некоторых пептидов на рост микроорганизмов. Положительно влияет и добавление жирных кислот в среду на развитие молочнокислых микроорганизмов.

Для культивирования микроорганизмов – анаэробов необходимо использовать компоненты для придания среде твердости. Для этих целей применяют агар – агар, пектин [60] .

Чтобы снизить затраты было придумано альтернативное решение замены агара на полисахариды, имеющих способность к гелеобразованию, зачастую они растительного происхождения.

Сложными питательными потребностями отличаются бактерии рода *Lactobacillus*. Для их развития и размножения требуются вещества, которые входят в состав бактериальной клетки, к таким веществам можно отнести аминокислоты, нуклеиновые кислоты, некоторые полисахариды [58].

Так как многие молочнокислые палочки не синтезируют органические формы азота, необходимые для их роста, то требуется его дополнительное внесение в питательный субстрат [15, 54].

Добавление к питательному субстрату различных веществ и соединений можно объяснить высокой требовательностью к различным

витаминам лактобацилл. Питательная среда должна соответствовать потребностям молочнокислых бактерий в источниках углерода, энергии и содержать вещества, которые необходимы микроорганизмам для построения их метаболизма [59].

Из этого следует, что получение в промышленных масштабах бактериального концентрата молочнокислых микроорганизмов является сложным процессом, на который влияет огромное количество различных нюансов, он связан с решением ряда проблем со стороны науки и техники, одной из частей которых является подходящая для культивирования питательная среда [25].

При использовании молока как питательной среды для накопления бактериальных клеток молочнокислых микроорганизмов использовать без дополнительной обработки нельзя. В ходе процесса культивирования происходит коагуляция белков, которая затрудняет отделение клеток. В связи с этой проблемой проводилось много исследований по использованию для накопления биомассы бактерий в жидкой среде, которая состояла бы из стандартных компонентов, а также молочной сыворотки с прибавлением факторов роста. Одним из таких стимуляторов роста многими авторами было предложено использовать различные автолизаты, экстракты и микроэлементы [23].

Еще одной не мало важной проблемой перед производителями йогуртов стоит отбор штаммов по производственно ценным свойствам – это важный аспект разработки функционального пробиотического продукта.

Бактерии пробиотиков должны иметь устойчивость к технологическим режимам производства, используемым в технологии приготовления кисломолочных изделий, они должны обладать большой выживаемостью так как они проходят через желудочно–кишечный тракт, это позволяет живым клеткам молочнокислых бактерий выполнять огромную роль в кишечнике людей. Многие эти бифидобактерии, которые добавляются в молочные изделия, не оказывают данного пробиотического действия и вследствие чего

гибель под воздействием кислорода воздуха, сильно низкого значения рН и в данном процессе и в процессе, идущем после сквашивания или хранения продукта и хлористоводородной кислоты в желудке людей [47].

Высокая выживаемость некоторых бифидобактерий при низких значениях рН молокосодержащих продуктов и желудочного сока очень различается. Имеются доказательства по изменению содержания клеток бифидобактерий в процессе брожения и хранения молокосодержащего продукта - йогурта при 3–7 °С. Для научного исследования отбирались штаммы бифидобактерий – *B. adolscensis* МС–45, *B. longum* В–379М, *B. bifidum* 771, которые используются при производстве кисломолочных и молокосодержащих изделий. Эту закваску бифидобактерий и молочнокислых микроорганизмов изготавливали на стерильном молоке с некоторым добавлением ростовых факторов и их вносили в количестве 6 % в одно и то же время совместно с внесением закваски молочнокислых микроорганизмов [57].

Также на жизнеспособность молочнокислых бактерий в процессе приготовления и хранения кисломолочного изделия может оказывать и влияние рН условий среды. При значении рН продукта 4,7 через 14 суток количество клеток бактерий закваски снизилось на два порядка, а при значениях рН 4,3 – на три. Большинство этих видов бифидобактерий чувствительны к рН значениям меньше 4,6. С практической точки зрения данный показатель должен поддерживаться на уровне рН больше 4,6. Если эти условия не соблюдать популяция заквасочных бактерий будет снижаться. Для совместного выращивания с бифидобактериями необходимо использовать закваски молочнокислых микроорганизмов, которые бы обладали низкими свойствами к установлению низких значений рН. Доказано, что количество клеток бифидобактерий снижалось менее интенсивно в случае при внесении заквасочных бифидобактерий в сгусток молочного продукта после брожения молочнокислыми бактериями по сравнению с их одновременными внесениями [46].

Это можно объяснить тем, что в данном процессе сквашивания происходит адаптация бактерий к кислоте. Начальное содержание клеток бифидобактерий сохранялось в течение семи суток. И при необходимости более длительного хранения изделия до 14 суток, начальное количество клеток бифидобактерий может быть на порядок выше требуемого соответствующей нормативной документацией [50].

Огромное значение при подборе культур заквасочных микроорганизмов для кисломолочных изделий и препаратов имеет устойчивость к антибиотикам. Совместное применение антибиотиков и антибиотикоустойчивых заквасок способствует наилучшему восстановлению нормальной микрофлоры кишечника человека в процессе антибиотикотерапии. Данная устойчивость к антибиотикам пробиотических штаммов передается по наследству, и зависит от генотипа. Изучение некоторых свойств *B. adlescentis* МС-45 выявило выживаемость клеток к целому ряду антибиотико содержащих веществ: ампицилину, бисиптолу, гентомицину, нестатину, эритромицину [49, 51].

Антагонистическую активность молочнокислых микроорганизмов *B. adlescentis* МС-42, *B. bifidum* 1 определяли опытным путем методом развивающихся совместных популяций в сравнении с ростом штаммов в культура, содержащих один вид бактерий. Штамм *B. adlescentis* МС-45 обладал высокой антагонистической активностью по отношению к *Staph. aureus* 210р, *Sh. flexner* 170, *Sh. flexner* 337, *Sh. sone* 174b, *Proteus vulgaris* F-35, *Proteus mirabilis* F-16, *E. coli* O-47 [55].

Самыми большими показателями в опыте по ростовой и кислотообразующей активностью обладал штамм *B. adlescentis* МС-45, это определяет его пригодность для промышленного производства кисломолочных изделий [48].

Технология приготовления кисломолочных продуктов с бифидобактериями происходит несколькими путями:

- при создании изделия, содержащего одну монокультуру бифидобактерий зачастую используются одно-, двух- или трехштабмовые закваски. Количество клеток микроорганизмов в готовом продукте достигает до  $10^9$  КОЕ на грамм;

- при обогащении молочного изделия жидкой культурой пробиотических бифидобактерий, которые бы выращивались на стерильном молоке с ростовыми факторами, или бактериальными концентратами, которые вносятся в молоко в момент его заквашивания одновременно с молочнокислыми микроорганизмами [53].

К первой группе молочнокислых изделий относятся «Бифилинн» для детского питания «Бифилинн-М» и «Бифилинн-Д». Молочнокислые продукты получают совместно с использованием фактора роста бифидобактерий, которые вносятся в пастеризованное либо стерилизованное молоко. При этом количество клеток микроорганизмов в  $1 \text{ см}^3$  готовой продукции –  $10^9$ – $10^{10}$ , рН 4,5–4,6 [15, 54].

Многие клинические испытания «Бифелина», проведенные разными Российскими государственными медицинскими университетами на базе Российской клинической детской больницы, доказали огромную эффективность использования готового молочнокислого продукта для лечения детей при инсулинзависимом сахарном диабете [44].

Ко второй группе кисломолочных продуктов относятся «Бифилин-лакто», «Бифитонн», «Бифитонничик», кефир, сметана, ряженка, «Актифилинн» [13, 15].

Для производства крупномасштабного производства кисломолочных изделий с микроорганизмами разработано производство сухих и замороженных пробиотических бактериальных концентратов, которые выпускаются в больших масштабах. Молочнокислые продукты с бифидобактериями производятся на заводах России, Белоруссии, Казахстана, Молдавии [56].



## ГЛАВА 2 . МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

### 2.1. Объекты исследования.

Объектом исследования работы являлись бактерии, широко используемые в пищевой и фармацевтической отраслях пищевой промышленности – бифидобактерии. Для получения рабочей культуры использовали сухой препарат «Бифидумбактерин» (производитель Микроген НПО ФГУП (Аллерген), Россия), в состав средства которого входят: микробная масса, содержащая живые бифидобактерии; бифидогенный фактор и лактоза [13, 12].

В настоящее время известно 24 вида бифидобактерий, которые объединяют в состав рода *Bifidobacterium*. Эти микроорганизмы относятся к семейству *Actinomycetaceae*, а типовым видом является *Bifidobacterium longum* [9].

Морфологическая характеристика вида. Клетки бифидобактерий прямые или разветвленные, раздвоенные или изогнутые, Y- или V-формы, булабовидные, лопатовидные. Они, как правило, располагаются по одному, парами, цепочками или розетками. Размер клеток варьирует от 0,5-1,3 до 1,5-8 мкм. Все бифидобактерии грамположительные, не образующие спор и капсул, неподвижные. Каждый вид имеет свои особенности по форме, расположению и размеру клеток (рисунок 1).

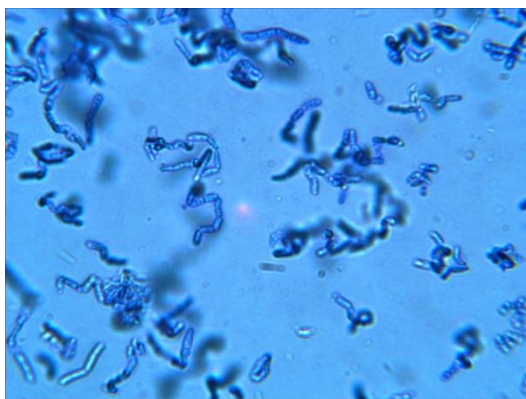


Рис. 1. *B. longum*, окраска метиленовым синим.

При выращивании культур бифидобактерий на печеночном агаре или молоке ветвление зачастую исчезает, появляется много гранулированных форм, которые иногда можно принять за кокки.

Среди штаммов, выделенных из кишечника взрослых людей, преобладают палочковидные и булавовидные формы. Ветвящиеся палочки чаще встречаются у детей грудного возраста. Все виды бифидобактерии являются строгими анаэробами. При лабораторном культивировании эти микроорганизмы приобретают способность развиваться в присутствии некоторого количества кислорода, а в высокопитательных средах – расти в полностью аэробных условиях [11, 8].

Оптимальной является температура 37 - 41° С. Оптимальное значение рН 6-7, при рН ниже 4,5 и выше 8,5 рост микроорганизмов прекращается.

Для размножения бифидобактерий, как и других молочнокислых бактерий необходимо множество факторов роста. Они нуждаются в биотине, пантотеновой кислоте, цистеине, рибофлавине, пуриновых и пиримидиновых основаниях, пептидах и многих других веществ. Необходимыми микроэлементами являются: Fe, Mg, P, K, Cl, Na, Mn [27].

Бифидобактерии культивируют, создавая анаэробные условия или снижая окислительно-восстановительный потенциал среды, на молоке, гидролизованном молоке и гидролизате казеина, а также на печеночном бульоне с добавлением ростовых факторов.

В коровьем молоке бифидобактерии развиваются медленнее, так как оно не является естественной средой их обитания. Еще одной из немаловажных причин плохого роста бифидобактерий в молоке служит растворенный в нем кислород [9].

Рост бифидобактерий в коровьем молоке стимулирует гидролизованное молоко, так же экстракты дрожжей и увеличение соотношения белка лактозы, добавление гидролизатов казеина.

На твердых питательных средах *B. longum* образует колонии небольших размеров (рисунок 2). Диаметр колоний варьирует от 2 до 5 мм,

края ровные, блестящие, выпуклые, белого иногда светло-серого цвета, шероховатых колонии не наблюдаются [7,10].



Рис. 2. Колония *B. longum*.

На жидких питательных средах *B. longum* растет в виде равномерного помутнения, выпадения гомогенного или зернистого осадка. Пленок на поверхности среды не образует.

## 2.2. Условия исследования, оборудование.

При изучении влияния компонентов йогурта – сахаров и кислот на молочнокислые микроорганизмы мы использовали микробиологические среды для их культивирования. Для выращивания культуры бактерий была выбрана распространённая для выделения и культивирования бактерий рода *Bifidobacterium* среда - гидрализатно-молочная среда (ГМС). Её часто используют при проведении различных лабораторных опытов. Данная питательная среда состоит из основы, которая содержит следующие компоненты: L-цистеин солянокислый, D-лактозу, гидролизаты молочных белков, аутолизат дрожжей, натрия хлорид. Панкреатический гидролизат обратного молока в составе данной выступает в качестве гидролизата молочных

белков, а ферментативный аутолизат дрожжей используют в качестве ростового фактора. Содержание аминного азота в питательной среде составляет 260-300 мг [6].

В количественном соотношении компонентов среды: панкреатический гидролизат обратного молока - 5,0-7,0 мг; цистеин солянокислый - 0,001-0,003 мг; D(-)-лактоза - 0,03-0,09 мг; натрий хлористый - 0,01-0,05; ферментативный аутолизат дрожжей - 1,0-2,0 мг.

Для определения накопления биомассы бактерий использовали жидкую питательную среду ГМК-1 - кукурузно-лактозную среду в полужидком виде, для размножения бифидобактерий в готовили 1 % твердую питательную среду ГМС -1.

Среда ГМС- 1 включает в себя: гидролизат обезжиренного молока ферментативного сухого в виде мелкодисперсного гигроскопического порошка бело-серого цвета - 33 г;

агаризованный раствор минеральных компонентов:

- марганец сернокислый - 0.1 г;
- магний сернокислый - 0.4 г;
- калий фосфорнокислый двузамещенный - 4 г;
- цистеин - 0.4 г;
- глюкоза - 40 г;
- пептон - 20 г;
- аутолизат дрожжей пекарских - 0.1 л;
- натрий уксуснокислый - 10 г;
- аммоний лимоннокислый двузамещенный - 4 г;
- агар микробиологический - 2 г;
- вода дистиллированная - до 1 л [5].

В ходе исследований использовалось следующее оборудование: сушильный шкаф, рН-метр, электрическая плита, термостат, микроскоп, весы электронные аналитические, шприцы-дозаторы, пробирки, спектрофотометр Siemens MicroScan Turbidity Meter, ламинарные боксы.

## Методы исследований.

Для количественного и качественного определения, выделения в чистую культуру и дальнейшего изучения биохимических свойств бифидобактерий и обработки полученных результатов по объекту в ходе эксперимента данной работы применяли следующие стандартные общепринятые химические, микробиологические, физико-химические методы:

- микроскопический;
- экспериментальный, для исследования свойств биообъекта;
- метод диско-диффузный;
- нефелометрический;
- статистический, для обработки полученных цифровых данных.

Данные обрабатывались программой Microsoft Office Excel 2007.

Экспериментальное исследование свойств биообъекта состояло из двух опытов. В ходе исследования влияние сахаров на рост модельной культуры применяли полужидкую агаризованную среду ГМК – 1, во втором опыте по установлению влияния кислот на рост колоний использовали среду ГМС.

Исследование по определению устойчивости *B. longum* к разным концентрациям кислот проводили диско-диффузным методом на твердой питательной среде ГМС. Устойчивость бактерий к кислотам и их концентрации определяли по величине зоны ингибирования роста колоний вокруг дисков с этими растворами. Этот метод основан на способности растворов кислот диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара.

Исследуемую бактериальную культуру *B. longum* засеивали газоном на чашки Петри. На засеянную поверхность пинцетом помещали на одинаковом расстоянии друг от друга бумажные диски, смоченные в растворах кислот разной концентрации. Использовали растворы лимонной и уксусной кислот с

pH 4,3, 4,5, 4,8, а также растворы лимонного сока с теми же показателями pH. В качестве контроля брали дистиллированную воду с pH 6,9. Посевы инкубировали при 37° С в течении 24 часов. По диаметру зон задержки роста *B. longum* делали выводы о чувствительности к кислотам определенного значения pH раствора.

Для опыта по определению роста культуры бактерий *B. longum* на жидкой питательной среде с добавлением разных концентраций использовали модельную питательную среду - кукурузно-лактозная ГМК-1.

Инкубацию культуры проводили в термостате при температуре 37 °С в течение 50 часов. Отбор проб проводили с помощью дозатора в пробирки по 3 мл каждые 2 - 3 часа.

Накопление биомассы культуры определяли нефелометрически, путем изменения оптической плотности среды с бактериальной суспензией, с помощью спектрофотометра Siemens MicroScan Turbidity Meter, по оптической плотности. В качестве дополнительных исследуемых сахаров - использовали глюкозу и фруктозу 1% и 3%. Основным источником углеводного питания для бактерий была лактоза в составе среды ГМК-1. Пробы из исследованных образцов отбирались в ламинарном шкафу.

Эксперимент проводили в трех повторностях. По вариантам опыта к среде ГМК - 1 добавляли сахара в следующих концентрациях: 1) фруктозу в концентрации 1%, 2) глюкозу в концентрации - 1%, 3) фруктозу в концентрации 3%, 4) глюкозу в концентрации - 3%. В качестве контроля использовали среду ГМК1 без добавок сахара. Все опыты обрабатывались статистически.

Колбы с питательными средами автоклавировали при 115°С в течение 20-30 минут.

Перед началом культивирования лактобактерий необходимо провести их активацию, для этого лиофилизат бактерий растворяли в стерильной воде. Постановку опытов проводили с соблюдением условий стерильности, в вытяжном шкафу, вблизи пламени спиртовки, предварительно обработав

рабочий стол и руки 70 %-ым спиртом. Посуда, используемая при посеве, предварительно стерилизовалась в сушильном шкафу.

Для исследования чистоты культуры и ее морфологии использовали метод микроскопирования [4].

Изучая микроорганизмы прижизненно, контролировали можно чистоту культуры в среде. Препараты делали с помощью метода раздавленной капли применяемого для изучения живых объектов.

Приготовление микропрепаратов делали так же и по стандартной методике приготовления фиксированного препарата [35].

### 2.3. Статистический метод обработки полученных данных.

Достоверность полученных данных проверяли с помощью дисперсионного однофакторного метода вариационной статистики для опыта по влиянию сахаров на молочнокислые бактерии [3].

Дисперсионный однофакторный анализ – один из методов статистической оценки, который определяет степень надежности проявления зависимости изучаемого признака от одного или нескольких факторов [2].

Сущность дисперсионного анализа заключается в расчленении общей дисперсии изучаемого признака на отдельные компоненты, обусловленные влиянием конкретных факторов, и проверке гипотез о значимости влияния этих факторов на исследуемый признак. Сравнивая, некоторые компоненты дисперсии друг с другом, и с посредством  $F$  — критерия Фишера, можно определить, какая доля общей вариативности результативного признака обусловлена действием регулируемых факторов [12].

Схему выполнения дисперсионного анализа можно представить в виде следующих этапов:

- 1) определение и разложения вариации;
- 2) определение числа степеней свободы вариации;
- 3) вычисление дисперсий и их соотношений;

4) анализ дисперсий и их соотношений;

5) оценка достоверности различий между средним арифметическим и формулирование выводов по проверке нулевой гипотезы.

Использовали следующие формулы:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n}$$
 формула среднего арифметического, где

$x_i$  – значения переменной,  $n$  – количество значений.

Определение числа степеней свободы и критерия Фишера

$$df_{\text{факт.}} = c - 1$$

$$df_{\text{общ.}} = N - 1$$

$$df_{\text{сл.}} = df_{\text{общ.}} - df_{\text{факт.}}$$

$$F_{\text{эмп.}} = MS_{\text{факт.}} / MS_{\text{сл.}}$$
 где

$df$  – число степеней свободы;

$c$  – количество условий фактора;

$MS$  – «средний квадрат» (математическое ожидание суммы квадратов);

$N$  – общее количество индивидуальных значений.

Определить по таблицам критические значения  $F$  и сопоставить с ним полученное эмпирическое значение, при котором гипотеза отклоняется в случае, если  $F_{\text{эмп.}} \geq F_{\text{кр.}}$  [1].



### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОСУЖДЕНИЕ.

#### 3.1. Влияние различных сахаров и их концентраций на нарастание биомассы бифидобактерии в жидкой питательной среде.

Данные опыта по динамике роста биомассы *B. longum in vitro* на жидких средах с добавлением разных концентраций сахаров показали, что микроорганизмы хорошо растут на всех вариантах испытанных сред. Накопление биомассы микробных клеток в изученных опытах представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Оптическая плотность модельной питательной среды с добавлением разных концентраций сахаров.

Время, час	Оптическая плотность бактериальной суспензии, ед.				
	Контроль,	Фруктоза 1%,	Глюкоза 1%,	Фруктоза 3%,	Глюкоза 3%,
0	0,067	0,077	0,053	0,077	0,077
15	0,073	0,113	0,083	0,120	0,120
17	0,093	0,153	0,120	0,133	0,167
19	0,103	0,180	0,130	0,173	0,200
21	0,110	0,200	0,147	0,187	0,220
23	0,120	0,203	0,150	0,203	0,233
24	0,127	0,213	0,153	0,206	0,237
26	0,130	0,226	0,160	0,213	0,240
41	<b>0,149</b>	0,232	0,184	0,246	0,271
43	0,149	<b>0,233</b>	<b>0,185</b>	0,251	0,274
45	0,149	0,233	0,185	<b>0,261</b>	0,275
47	0,149	0,233	0,185	0,261	<b>0,276</b>
48	0,149	0,233	0,185	0,261	0,276
50	0,149	0,233	0,185	0,265	0,276

Из таблицы видно, что добавление сахаров положительно влияет на рост и развитие бифидобактерий в жидкой питательной среде по сравнению с контролем. Максимальное накопление культуры происходит на 41 -47 час культивации, когда происходит расходование питательных веществ в среде. После достижения максимальной биомассы бактерий дальнейшего роста не происходило, что мы наблюдали по прекращению увеличения оптической плотности.

Полученные результаты не противоречат литературным данным, согласно которым бифидобактерии потребляют глюкозу, галактозу, дисахара, большое число олигосахаров [3,4].

Анализ графика показывает (рис 1.), что с 15 по 41 час культивации происходило наиболее интенсивное накопление биомассы.

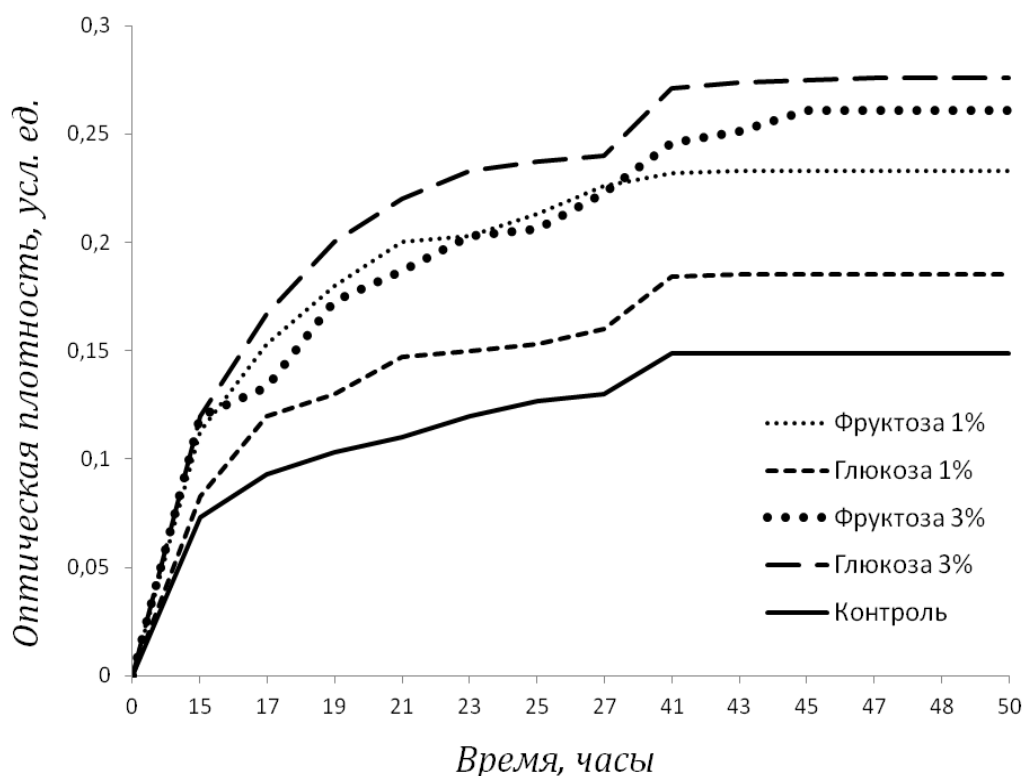


Рис. 3. Динамика роста культуры бактерий *B. longum* на жидкой питательной среде с добавлением разных концентраций сахаров.

Динамика роста культуры бактерий показала, что добавление в среду 3% глюкозы способствовало наилучшему накоплению бактерий *B. longum*, что дало больший прирост биомассы на 46% относительно контроля. Отмечено,

что при добавлении 1% фруктозы прирост биомассы составил на 20,6%, чем при добавлении 1% глюкозы. Однако влияние добавления в концентрации 1% и 3% не имеет достоверного различия в начале культивирования фруктозы, и лишь после 40 часов роста культуры оптическая плотность среды с добавлением 3% фруктозы оказалась выше на 5,4%. Максимальное накопление в среде бактерий отмечалось в случае добавления 1% глюкозы и 1% фруктозы на 43 часу культивирования, затем рост прекращался, так как бактерии исчерпали источник роста - углеводы.

### 3.2. Влияние кислот и pH среды на рост колоний бифидобактерий.

Нами была экспериментально установлена чувствительность молочнокислых микроорганизмов *B. longum* к различным пищевым кислотам и pH растворов. В опыте использовали растворы лимонного сока, лимонной и уксусной кислот. Результаты исследования представлены на рис. 4 и в таблице №2.

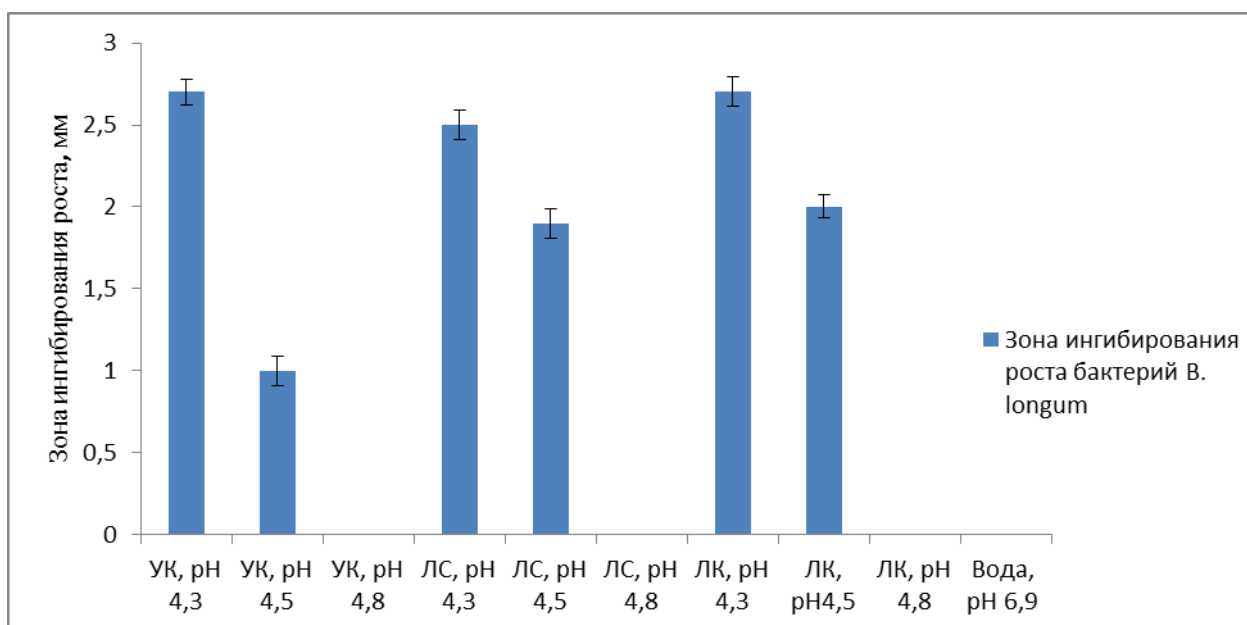


Рис. 4. Зона ингибирования роста колоний бактерий *B. longum* при воздействии растворами кислот (УК – уксусная кислота, ЛС – лимонный сок, ЛК – лимонная кислота).

Среднее значение зоны подавления роста колоний бактерий в вариантах с растворами лимонного сока и лимонной кислотой рН 4,5 составил 1,9 мм и 2 мм соответственно и 1 мм в варианте с раствором уксусной кислоты. При этом раствор лимонного сока оказывал действие равнозначное влиянию лимонной кислоты, что не подтверждает более



Рис. 5. Зона ингибирования рН 4,3, *B. longum*. мягкого его влияния на рост бактерий.

Из рисунка видно, что при рН раствора 4,3 (рис. 5) отмечено максимальное ингибирование роста колоний вокруг дисков.

В вариантах с использованием лимонной и уксусной кислот зона ингибирования достигала 2,7 мм, вариант с раствором лимонного сока с рН

рН раствора диска	Наличие зоны ингибирования	Размер зоны ингибирования, мм	Вид зоны
-------------------	----------------------------	-------------------------------	----------

4,3 показал несколько меньший размер зоны ингибирования – 2,5 мм.

Таблица № 2.

Влияние на рост и развитие различных кислот на бактерии *B. longum*.

Уксусная кислота			
4,3	+	2,7	Неравномерное удаление от дисков
4,5	+	1	Неравномерное удаление от дисков
4,8	-	-	Рост колонии на дисках с раствором
Лимонный сок			
4,3	+	2,5	Неравномерное удаление от дисков
4,5	+	1,9	Неравномерное удаление от дисков
4,8	-	-	Рост колонии на дисках с раствором
Лимонная кислота			
4,3	+	2,7	Неравномерное удаление от дисков
4,5	+	2	Неравномерное удаление от дисков
4,8	-	-	Рост колонии на дисках с раствором
Контроль			
6,9	-	-	Рост колонии на дисках с раствором

При использовании растворов кислот и лимонного сока с рН 4,8 и в контроле, где брали дистиллированную воду (рН 6,9) зона ингибирования роста колоний не была выявлена. В этих вариантах наблюдали рост колонии на дисках с раствором.

Из таблицы видно, что добавление растворов с рН <4,5 значительно подавляет рост и развитие колоний бифидобактерий на твердой агаризованной питательной среде по сравнению с контролем.

### 3.3. Статистический анализ полученных данных.

Статистическая обработка данных показала, что фактический критерий Стьюдента составил 4,81, 2,36, 4,58, 5,45 для опытов с добавлением фруктозы 1%, глюкозы 1%, фруктозы 3%, глюкозы 3%, соответственно (см. таблицу № 3). При этом  $t_{0,95} = 2,35$  и  $t_{0,99} = 3,18$ . Поскольку критерий Стьюдента фактический больше  $t_{0,95}$  и  $t_{0,99}$ , следовательно, данные достоверны на уровне вероятности ( $P < 0,05$ ).

Таблица № 3.

Статистическая обработка данных опыта по влиянию сахаров на рост *B. longum*.

Название статистической функции	Фруктоза 1%	Глюкоза 1%	Фруктоза 3%	Глюкоза 3%	Контроль
Х <sub>ср.</sub> Средняя	0,19728571	0,1503571	0,2045	0,22442857	0,122643
D дисперсия	0,02605355	0,0239676	0,04228224	0,03601126	0,020778
ошибка средней	0,00722595	0,0066474	0,01172698	0,00998773	0,005763
Tфакт.	4,81	2,03	4,58	5,45	

Статистическая обработка данных по опыту с кислотами показала, что фактический критерий Стьюдента составил 4,81, 4,53, 4,80, 4,74, 4,82, 4,83 для опытов с добавлением уксусной кислоты рН 4,3, лимонного сока рН 4,3, лимонного сока рН 4,3, этих компонентов с рН 4,5 соответственно (см. таблицу № 4). При этом  $t_{0,95} = 2,35$  и  $t_{0,99} = 3,18$ . Поскольку критерий Стьюдента фактический больше  $t_{0,95}$  и  $t_{0,99}$ , следовательно, данные достоверны на уровне вероятности ( $P < 0,05$ ).

Таблица № 4.

Статистическая обработка опыта по влиянию кислот на рост колоний *B. longum*.

Название статистической функции	Уксусная кислота рН 4,3	Лимонный сок рН 4,3	Лимонная кислота рН 4,3	Уксусная кислота рН 4,5	Лимонный сок рН 4,5	Лимонная кислота рН 4,5	Контроль
Х <sub>ср.</sub> Средняя	2,71	2,5	2,5	0,98	1,83	2,02	0,11236
D дисперсия	0,07	0,08	0,08	0,07	0,08	0,06	0,24584
ошибка средней	0,02	0,02	0,028868	0,02	0,02	0,02	0,00548
Tфакт.	4,81	4,53	4,80	4,74	4,82	4,83	

## ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных исследований, установлено, что в литературным данным наиболее часто встречающимися наполнителями в составе кисломолочных продуктов являются сахара, фруктовые наполнители и органические кислоты. Их влияние на заквасочную культуру молочнокислых пробиотических бактерий не всегда может быть положительным, и довольно часто мало изучено.
2. Нами установлено, что наиболее эффективное накопление биомассы клеток бифидобактерий в полужидкой среде при добавлении концентраций различных сахаров, происходит при добавлении 3% глюкозы и 3% фруктозы в среду при этом наблюдается высокий уровень активности бактерий и значительное накопление их биомассы. Необходимо отметить, что содержание 1% фруктозы в среде почти не уступает по нарастанию биомассы, чем в вариантах с 3% глюкозой и 3% фруктозой. Это показывает, что в три раза более выгодно экономически использовать фруктозу, по сравнению с глюкозой.
3. Исследование влияния пищевых кислот и различного уровня рН культивирование бактерий *Bifidobacterium* на твердой питательной среде, показало, что критический уровень кислотности среды для исследованного штамма *B. longum* к растворам лимонного сока, лимонной и уксусной кислот составляет рН 4,3. При понижении кислотности, ингибирование бактерий уменьшается, и их рост становится более выраженным. Кислотность среды 4,8 не препятствует росту колоний *B. longum*. Выраженной зависимости от вида исследуемой кислоты нами отмечено не было. Разница в вариантах между растворами лимонного сока, лимонной и уксусной кислот с рН 4,3 незначительна.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ананьева Н.В. Изучение процесса культивирования молочнокислых палочек на питательных средах различного состава / Н.В. Ананьева // Переработка молока. – 2007. – №2. – 221 с.
2. Антипова Л.В. Прикладная биотехнология: учебное пособие / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, А.И. Жаренов. – Воронеж, 2000. – 332 с.
3. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности: учебное пособие / Л.А. Банникова. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 255 с.
4. Бадретдинова З. А., Канарский А. В. Влияние углеводов цикория на накопление биомассы *Bifidobacterium bifidum*. - Вестник технологического университета. 2015. Т.18, №13. – с. 202-204.
5. Беспоместных К.В. Исследование биохимических, морфологических и свойства штаммов бактерий рода *Lactobacillus* / К.В. Беспоместных, А.Г. Галстян, Е.В. Короткая // Техника и технология пищевых производств. – 2011. – №2. – 198 с.
6. Бондаренко В.М. Пробиотики и механизмы их лечебного действия / В.М. Бондаренко, Р.П. Чуприна, Ж.И. Альдушева // Эксперименты клининга, гастроэнтерологии. – 2000. – №3. – 387с.
7. Бондаренко, В.М. Иммуностимулирующее действие лактобактерий, используемых в качестве основы препаратов пробиотиков // Микробиология, эпидемиология и иммунобиология. 1998. – №5. – 109 с.
8. Божко О.Ю., Шуваева Г.П., Корнеева О.С. Изучение пребиотических свойств заменителя сахара изомальтулозы в условиях *in vitro* // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 5.
9. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина. 2005. 367 с.
10. Бывайлова Е. А. Разработка технологии обогащенного ацидофильного продукта с повышенной биологической ценностью и



пребиотическими свойствами. Автореф. дис. канд. техн. наук.: 05.18.04. – пос. Персиановский, 2014. – 18 с.

11. Глушанова Н.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования *in vitro* / Н.А. Глушанова, Б.А. Шендеров // Микробиология. – 2005. - №2. – 153 с.

12. Ганина В.И. Пробиотики. Назначение, свойства и основы биотехнологии: Монография. М.: МГУПБ, 2001. 122 с

13. Гончарова Г.И. Бифидофлора человека и необходимость ее оптимизации.- В кн. Бифидобактерии и их использование в клинике, медицинской промышленности и сельском хозяйстве. ( ред. Никитин ). М., 2005.- 488 с.

14. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов: учебник / К.К. Горбатова. – М.: Колос, 1997. – 288 с.

15. Гореликова Г.А. Основы современной пищевой биотехнологии: учебное пособие / Г.А. Гореликова. – Кемерово, 2004. – 100 с.

16. Гиринович, О. О тенденциях в пищевой промышленности [Текст] / О. Гиринович // Молочная промышленность – 2008. –№3. – С. 77.

17. Гринвич А.Г. Молочные бактерии: Монография/ А.Г. Гриневич.- Минск: Высшая школа, 2008, 164 с.

18. Держинская И.С. Питательные среды для выделения и культивирования молочнокислых микроорганизмов: учебное пособие / И.С. Держинская. – Астрахан. гос. техн. ун-т. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2008. – 348 с.

19. Елинов Н.П. Основы биотехнологии: Учебник для студентов институтов, аспирантов и практических работников. – СПб.: Наука, 1995. – 600 с.

20. Емельяненко В.А., Королюк А.М. Зависимость жизнедеятельности бифидобактерий от кислотности среды культивирования // Наука и современность. – 2010, –№ 2-1. – с 23-28.

21. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н – 8-е изд., испр. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2014 – 445 с.
22. Еремина И.А. , Кригер О.В./ Общая микробиология: учебное пособие Кемеровский технологический институт пищевой промышленности Кемерово, 2002.- 112 с.
23. Квасников Е.И., Нестеренко О.А.: «Наука», 1975, Молочнокислые бактерии и пути их использования - 254 с.
24. Конькова Н.К. Пути усовершенствования питательных сред, используемых в технологии производства медицинских и ветеринарных пробиотиков / Автореф. дисс. канд. биол. наук. – Н. Новгород, 2002. – 21 с.
25. Крючкова, В.В. Функциональный ацидофильный продукт на основе растительных компонентов [Текст] / В.В. Крючкова, Е.А. Бывайлова, Г.Д. Фирсова, А.В. Черкашин // Пищевая промышленность №11. – 2012. – С. 54- 56
26. Кусь Г.Н. Методы исследования молока и молочных продуктов: учебник для вузов / Г.Н. Кусь, А.М. Шалыгина, З.В. Волокитина. – М.: Колос, 2000. – 368 с.
27. Лянная А.М., Интизаров М.М., Донских Е.Е. Биологические и экологические особенности рода *Bifidobacterium*.- В кн.: Бифидобактерии и их использование в клинике, медицинской промышленности и сельском хозяйстве (ред. Никитин). М., 2006.- 875 с.
28. Лысенко, Ю.А. Подбор оптимальной питательной среды для культивирования, концентрирования и высушивания клеток *Lactobacillus acidophilus*/ Ю.А. Лысенко, А.В. Лунева // КубГАУ. – 2014. - №102(8). – С. 2-3.
29. Младзиевская Ю.А. Совершенствование биотехнологического производства и методов контроля качества пробиотиков на основе бифидобактерий и лактобацилл: автореф. дисс. ... канд. биол. н. / Ю.А. Младзиевская. – СПб., 2005. – 22 с.

30. Манвелова М.А., Плясунова Н.Г., Чешева В.В. Лечебно-диетические кисломолочные продукты питания.- В кн.: Медицинские аспекты микробной экологии (ред. Б.А.Шендеров). М.,1992. т.6.- 169 с.

31. Марьин В.А. Исследование схем последовательности фаз роста периодической культуры бифидобактерий или лактобактерий / В.А. Марьин, Д.В. Харитонов // Техника и технология пищевых производств. – 2010. – №4. – 103 с.

32. Мирошникова Е.П. Микробиология молока и молочных продуктов: электронное учебное пособие – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2005. – 135 с.

33. Нетрусов А.И., Котова, И.Б.. – микробиология учебник для студ. высших учебных заведений: издательский центр «Академия». 2006 -352 с.

34. Новомлинская В.Н., Серикова Н.В. Зависимость устойчивости бифидобактерий от pH среды в условиях *in vitro* [Электронный ресурс]. Вопросы науки и образования. – № 6 (7) –2017 URL: <http://scientificpublication.ru/h/arkhiv-zhurnala-voprosy-nauki-i-obrazovaniya.html>

35. Овсянников Ю. С. Изучение биологических свойств лактобактерий / Ю. С. Овсянников, В. Е. Романов, И. В. Дармов // Современные научные тенденции в животноводстве. Ч. 2. Ветеринарная медицина: Сб. статей Межд. научно-практической конференции, посвящённой 100- летию со дня рождения П. Г. Петского. – Киров, 2009. - С. 194-197.

36. Овсянников Ю. С. Оценка биологических свойств культур лактобактерий и сенной палочки /Ю. С. Овсянников //Ветеринарная медицина№ 1-2. – 54 с.

37. Остроумов Л.А. Питательные среды для бифидобактерий / Л.А. Остроумов, А.Ю. Просеков, М.Г. Курбанова, О.В. Козлова // Молочная промышленность. – 2010. – №1. – 121 с.

38. Палладина О.К. Биология возбудителей молочнокислого брожения. – Л.: Пищепромиздат, 2006.-120 с.
39. Панова Н.В. Разработка нового стимулятора роста микроорганизмов и изучение его влияния на их биологические свойства на примере некоторых вакцинных штаммов бактерий: дис...канд.биол. наук: 03.00.23, 03.00.07 / Н.В.Панова. – Ставрополь, 2006. – 173 с.
40. Перфильев Г. Д. Бактериальные закваски и концентраты в биотехнологии сыроделия. Научные и практические аспекты // Сб. материалов международного специализированного научно-практического семинара «Бактериальные закваски и биологические средства, применяемые в производстве ферментированных молочных продуктов в России». – Углич, 2005. – С. 9-14.
41. Полищук П.К. Микробиология молока и молочных продуктов: учебник, П.К. Полищук, Э.С. Дербинова, Н.Н. Казанцева. – М.: Пищевая промышленность, 2001. 236 с.
42. Рамонова Э.В. Характеристика штаммов лактобактерий / Э.В. Рамонова Р.Г. Кабисов, Б.Г. Цугкиев // Молочная промышленность. – 2009. – №2. – 43 с.
43. Раскошная Т.А. Питательные среды для культивирования ацидофильной молочной палочки / Т.А. Раскошная, В.Ф. Семенихина // Молочная промышленность. – 2010. – №11. – 139 с.
44. Сборник инструкций по селекции молочнокислых бактерий и подбору заквасок для молочнокислых продуктов. М.: ВНИМИ, 2009. 145 с.
45. Светлакова Е.В., Ожередова Н.А., Веревкина М.Н., Кононов А.Н. использование молочнокислых бактерий в биотехнологических процессах // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3 – 158 с.
46. Серебренников В.М., Кисриева Ю.С., Загустина Н.А. и др. Образование диацетила и ацетоина производственными штаммами лактококков в различных условиях выращивания //Прикладная биохимия и микробиология.-2003.-Т.34, №3.-280 с.

47. Сиротин А.А. Практикум по биологии. – Белгород.: Изд. БелГУ. 2003. с 6 – 9.
48. Скородумова А.М. Практическое руководство по технической микробиологии молока и молочных продуктов: / А.М. Скородумова. – М.: Пищепромиздат, 2006. 306 с.
49. Сорокина Н. П. Ассортимент бактериальных концентратов «Экспериментальной биофабрики» ВНИИМС // Сб. материалов международного специализированного научно-практического семинара «Бактериальные закваски и биологические средства, применяемые в производстве ферментированных молочных продуктов в России». – Углич, 2005. – с.76-79.
50. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов / П.П. Степаненко. – М.: Лира, 2002. – 413 с.
51. Технология получения посевных культур лактобактерий / И.В. Тихонов, Ю. С. Овсянников, В. Г. Комоско и др. // Ветеринарная медицина.- 2009.- № 1-2. – 54 с.
52. Функ И.А., Иркитова А.Н. Биотехнологический потенциал бифидобактерий // Acta Biologica Sibirica. – 2016. – Т. 2. № 4. – С. 67-79.
53. Харченко Н.В. Выделение бифидобактерий и изучение их пробиотических свойств при длительном хранении.
54. Шурыгин А.Я, Злищева Э.И. Использование молочнокислых микроорганизмов и продуктов их метаболизма.- Краснодар: Совет. Кубань, 2007. -297 с.
55. Garro Marisa S., De Valdez Graciela F., Oliver Guillermo, de Giori Graciela S. Purification of  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus fermentum* // J.Biotechnol. 1996. - 45, № 2. – 109 P.
56. Goderska K. Comparison of the growth of *Lactobacillus Acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics Goderska K., Nowak J., Czarnecki Z. // Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. - № 7(2), 2008. – P.5-20

57. Vlasenko V.V., Kryzhak L.M. Forming of probiotic properties of yogurt by using of syrup based on extracts of Echinacea Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. 2014. Т. 16. № 2-4 (59). С. 26-32.

58. Laere, K.M. Transglycosidase activity of *Bifidiobacterium adolescentis* DSM 20083 galactosidase / K.M. Laere et al // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1999. - V. 52. -P. 681–688

59. Tower, W.L. The mechanism of evolution *Leptinotarsie Coptn* / W.L. Tower // *Inst. Publ.* – 1918. – № 263. – 384 p.

60. Zhang, S. Toxic Effects of Ag(I) and Hg(II) on *Candida albicans* and *C.maltosa*: a Flow Cytometric Evaluation / S. Zhang, A.Jr. Crow // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2001. – № 9. – P. 4030 – 4035.