

Занятие семинарского типа № 13

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Получение препаратов нормофлоры биотехнологическими методами

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Общие проблемы микроэкологии человека

Микрофлора человека составляет основу его микроэкологии, организм человека населяют примерно 500 видов бактерий, не считая вирусов, простейших, грибов. Нормальную флору принято рассматривать как совокупность микробиоценозов различных частей тела, контактирующих с внешней средой. Совокупность микробиоценозов обозначается как нормобиоценоз или эубиоз. Для здорового человека характерно состояние равновесия микроэкологии организма. В организме человека обитает $10^{14} - 10^{16}$ бактерий, т.е. бактериальных клеток значительно больше, чем клеток самого организма. Они составляют своеобразный «экстракорпоральный» (хорошо организованный) орган. Этот «орган», как и любой орган человека, имеет свои функции, критерии, показатели функционального состояния, т.е. нормы и отклонения от нее.

Велика защитная роль нормофлоры в обеспечении здоровья, поэтому нарушение равновесия между отдельными видами микроорганизмов в местах их постоянного обитания за счет более интенсивного размножения или гибели какого-либо вида может повлечь нарушение гомеостаза с соответствующими последствиями патологического характера. Дисбиотические состояния приводят к изменениям количественного и качественного состава нормофлоры человека.

Микроорганизмы индигенные (постоянные) и транзиторные (случайные), с которыми человек встречается в течение жизни, можно условно разделить на 4 группы:

- ✓ микроорганизмы, не способные к длительному пребыванию в организме человека, нахождение которых в нем носит случайный характер;
- ✓ постоянные представители микрофлоры, приносящие несомненную пользу (бифидо-, лакто- и колибактерин);
- ✓ условно-патогенные представители нормофлоры, которые при определенных условиях могут стать патогенными (стафилококки);
- ✓ микроорганизмы – возбудители инфекционных заболеваний.

Рассматривая микрофлору желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) даже практически здорового человека, нельзя говорить об абсолютной норме.

Изучение состава нормальной микрофлоры кишечника привлекает особое внимание исследователей, т.к. бактерии ЖКТ играют важную роль в различных процессах жизнедеятельности человека.

Микрофлора содержится в мочеполовой системе, на коже, слизистых оболочках глаз, дыхательных путей и ЖКТ. Эта симбиотическая микрофлора, представляет собой микроорганизмы аутофлоры организма.

Состав аутофлоры относительно постоянен, несмотря на влияние многочисленных факторов, оказывающих временное воздействие на микрофлору человека, не вызывая существенных изменений в биоценозе.

Характер расселения микроорганизмов зависит не только от физиологических особенностей, но и от морфологического строения клеток. В толстой кишке моторная активность и количество воды не высоко, поэтому в ней преобладают «оседлые» виды микробиоты. Концентрирование подвижных видов бактерий происходит преимущественно в разных отделах тонкого кишечника, для которого характерна высокая

перистальтическая (моторная) активность, приводящая к высокой скорости прохождения содержимого.

В выборе бактериями экологической ниши важна способность некоторых из них к различным формам перемещения (таксиса), присущим подвижным видам микроорганизмов. Такие виды снабжены специальными устройствами – жгутиками и т.п.

Кишечные бактерии представляют собой сложную ассоциацию микроорганизмов, влияющих на жизнедеятельность друг друга и находящихся во взаимосвязи с организмом человека.

Распределение микроорганизмов в ЖКТ неравномерно: каждому из отделов свойственна своя, относительно постоянная микрофлора.

Видовой состав микрофлоры полости рта представлен аэробными и анаэробными микроорганизмами. В желудке и тонкой кишке содержится небольшое количество микрофлоры. Это обусловлено бактерицидным действием хлористоводородной кислоты и желудочного сока. В желудке присутствуют микроорганизмы, хорошо переносящие кислотную среду: сарцины, стафилококки, молочнокислые бактерии. В тонкой кишке содержится еще меньшее количество микроорганизмов, преимущественно энтерококки, а также аэрогенесбактерии, кишечные палочки, ацидофильные палочки и другие виды микрофлоры. К факторам, обеспечивающим стерильность тонкой кишки, относят бактерицидное действие хлористоводородной кислоты, желудочного сока и желчи, асептические свойства слюны, микробный антагонизм ацидофильной флоры илеоцекального отдела. Появление микроорганизмов в верхнем отделе тонкой кишки приводит к нарушению физиологического состояния данного отдела пищеварительного тракта.

Наиболее богата микрофлорой толстая кишка: 30 % сухой массы фекалий составляют микроорганизмы. Состав микрофлоры толстой кишки разнообразен, несмотря на относительное видовое и количественное постоянство. Установлено, что в микрофлоре толстой кишки взрослых людей анаэробные бактерии (бифидобактерии, бактероиды, различные споровые формы) составляют около 90 % общего количества микроорганизмов. Аэробные бактерии, представленные кишечными палочками, лактобациллами и др., составляют в среднем 1–4 %, остаточная микрофлора (стафилококки, клостридии, протей и дрожжеподобные грибы) – 0,01–0,001 % общего количества микроорганизмов.

В испражнениях человека в небольшом количестве постоянно присутствуют микробы рода *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*, *Cl. putrificum*.

Состав нормальной кишечной микрофлоры характеризуется определенными соотношениями между ее отдельными представителями и доминированием анаэробных бактерий при незначительной аэробной микрофлоре. Количество беспоровых анаэробных бактерий, в том числе бифидобактерий, превышает иногда в 1000 раз численность аэробных бактерий.

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* являются участниками микробных ассоциаций кожи, слизистых оболочек и особенно кишечника. Частота их выделения у здоровых лиц колеблется в пределах 5–50 %. При исследованиях кишечной микрофлоры у здоровых людей чаще встречаются грибы рода *Candida krusei* и *Candida albicans*, реже – рода *Candida torpicalis* и др. В ЖКТ могут обнаруживаться разные виды грибов (кандида, геотрихум, пенициллы, аспергилы и др.). Количество выросших колоний широко варьируется от единичных до сплошного роста. Кроме того, в кишечнике здорового человека могут находиться стафилококки в небольшом количестве.

Бактерии рода протей обнаруживаются в кишечнике в небольших количествах так же, как и дрожжеподобные грибы, стафилококки и другие условно-патогенные микроорганизмы. Бактерии рода протей у здоровых людей могут обнаруживаться в количестве 3–8 %.

Лактозонегативные эшерихии обнаруживаются в кале здоровых людей в 4–13 % случаев. В кишечнике в небольшом количестве могут содержаться синегнойная палочка и другие условно-патогенные микроорганизмы. В организме наряду с микробной микрофлорой существует нормальная вирусная симбиотическая микрофлора. Так, с открытием методов выращивания вирусов в культуре тканей появилось множество работ о нахождении в кишечнике человека и животных условно-патогенных вирусов.

Облигатными микроорганизмами в содержимом толстой кишки являются бифидобактерии, бактероиды, лактобактерии, кетанобактерии, энтерококки. При изучении кишечной микрофлоры большое внимание уделяется бифидобактериям, которые признаются сапрофитами. Ранее их рассматривали как основную флору толстой кишки младенцев, вскармливаемых молоком матери. В настоящее время установлено их количественное доминирование и у взрослых людей. У лиц пожилого возраста бифидобактерии высеваются реже. По данным большинства исследователей, содержание этой группы микроорганизмов у взрослых людей стабильно и соответствует в среднем 1 млрд. в 1 г кала.

Молочнокислые бактерии (*Lactobacteriaceae*) относятся к грамположительным истинным бактериям, имеющим округлую форму (*Streptococcus*, *Diplococcus*) или палочковидную (*Lactobacterium*) форму. Молочнокислые кокки и многие бактерии располагаются в виде коротких или длинных цепочек. И те, и другие не образуют спор, неподвижны, анаэробны. Молочнокислые бактерии в кишечнике человека занимают одно из ведущих мест по своей численности среди других представителей бактериальной флоры. Бесспорно, что эти микроорганизмы играют первостепенную роль в симбиотических взаимоотношениях нормальной микрофлоры кишечника с макроорганизмом.

В процессе сбраживания сахара одни молочнокислые бактерии образуют в качестве главного продукта молочную кислоту, поэтому их называют гомоферментными (одноферментными), другие – гетероферментными, продуцирующими в качестве основных продуктов молочную и уксусную кислоты, этанол, двуокись углерода и некоторые летучие вещества типа эфиров. Гомоферментные бактерии включают *S. lactis*, *S. cremoris*, *Lactobacterium casei*, *L. lactus* и др. К гетероферментным относят ароматобразующие бактерии (*S. citrovorus*, *S. acetonicus*), а также представителей бактерии из групп *Betabacterium*, *Coliaerogenes* и некоторые другие (*S. faecalis*, *S. bovis* и др.). Имеются молочнокислые бактерии, развивающиеся при оптимальной температуре 25–35 °С (мезофилы), *S. lactis*, *S. fovis*, *L. casei*, ароматообразующие бактерии; при 40–45 °С (термофилы) – *L. lactis*, *L. helveticum*.

Кроме бифидобактерий, в содержимом толстой кишки в составе облигатной микрофлоры обнаруживаются бактероиды, наличие которых возможно и в полости рта здоровых людей. Среднее количество бактероидов в толстой кишке взрослых здоровых людей составляет, как и бифидобактерий, 1 млрд в 1 г фекалий. Бактероиды представляют собой грамотрицательные палочки, не образующие спор, растущие в условиях строго анаэробноза.

Значительная роль в поддержании нормального биоценоза в кишечнике принадлежит лактобактериям. Эта группа бактерий обнаруживается в содержимом толстой кишки. Из кишечника здорового человека чаще высеваются грамположительные палочки, расположенные поодиночно или короткими цепочками, неподвижные, не образующие спор.

При определении состава микрофлоры у здоровых людей О. Braun с соавт. выявили кетанобактерии, которые по количеству не уступали содержанию бифидобактерий и бактероидов. Их обнаружили и в тонкой кишке. Ученые предполагают, что значение кетанобактерий для организма человека сходно с таковым у лактобактерий. Кетанобактерии являются строго анаэробными, неподвижными грамположительными палочками.

Кроме того, в толстой кишке обнаруживаются различные простейшие. Так, из амёб часто встречаются *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba nana*. Кроме того, в толстой кишке часто вегетируют *Chilomastix mesnile* и *Trichomonas*.

Однако, следует указать, что нормальная микрофлора вообще и кишечная в частности непостоянна. Она подвергается изменениям в зависимости от питания, возраста, условий жизни человека и т.п. Так, в кишечнике грудных детей преобладающим микроорганизмом является молочнокислая анаэробная палочка *B. bifidus*, количество которой достигает 80–90 %. В процессе роста при переходе на смешанное питание содержание молочнокислых микроорганизмов в кишечнике уменьшается.

2. Функции кишечной микрофлоры

Нормальная микрофлора выполняет и регулирует многие функции организма, которые можно уподобить работе лаборатории, осуществляющей многие сотни биохимических процессов. Биомасса микроорганизмов, заселяющих кишечник взрослого человека, составляет 2,5–3 кг. В процессе их жизнедеятельности образуются органические кислоты, снижающее рН среды толстой кишки до 5,3–5,8, лизоцим и другие антибиотикоподобные вещества, обуславливающие антагонистическую активность этих бактерий по отношению к патогенной, гнилостной и газообразующей микрофлоре. В результате значительно снижается хроническое отравление продуктами гнилостного распада в кишечнике (индол, фенол, скатол). Представители нормофлоры в кишечнике конкурируют с патогенной флорой за аргинин, аспарагиновую кислоту, серин, за область обитания - экологической ниши. Так, бифидо- и лактобактерии регулируют количественный и качественный состав нормальной микрофлоры кишечника, сдерживая рост и размножение в нем патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Кроме того, А. Nissle в 1916 г. установил различную степень антагонистической активности отдельных штаммов кишечной палочки по отношению к разным микроорганизмам, в том числе и патогенным. В 1930 г А. Nissle предложил для нормализации кишечной микрофлоры применять мутафлор (препарат, содержащий живую культуру полноценных в антагонистическом отношении штаммов кишечной палочки). Перетц Л.Г. в 1955 г. установил, что кишечная палочка здоровых людей является одним из основных микроорганизмов кишечника и играет положительную роль, благодаря сильным антагонистическим свойствам, т.к. в основе антагонизма лежит действие продуктов обмена кишечных палочек и особых субстанций типа эндотоксинов, называемых *колицинами*, оказывающих бактерицидное действие на чувствительные бактерии. Различая кишечные палочки по степени антагонистической активности, ученый выделил высокоактивный штамм *E. coli M17*, который используется для нормализации микрофлоры при дисбактериозах. При этом Наличие в толстой кишке малоактивных в антагонистическом отношении штаммов кишечной палочки служит показателем дисбактериоза кишечника. Антагонистические свойства кишечной палочки уменьшаются при ее рентгеновском облучении. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что кишечная палочка является признанным антагонистом с широким диапазоном действия, а ее антагонистические свойства проявляются в отношении возбудителей дизентерии, сибирской язвы, брюшного тифа и т.п.

Антагонистическую функцию рассматривают в качестве основной функции микробиоты. Защитный слизистый барьер является продуктом совместной деятельности организма и микрофлоры. У разных живых организмов толщина данного слоя существенно варьируется. Его состав также весьма неоднороден. Однако, его химической основой являются полисахариды и гликопротеиды. Именно слизистый барьер является, подчас непреодолимым препятствием для патогенных микроорганизмов, способствуя их адгезии на поверхности клеток-мишеней. В слизистом слое постоянно действует и в зависимости от ситуации может дополнительно функционировать многофакторная «эшелонированная» система защиты, включающая в себя как неспецифические факторы

(физико-химические – рН, редокс-потенциал, вязкость, химические – низкомолекулярные метаболиты микробиоты), так и специализированные системы защиты, в которых участвуют нейтрофилы и другие фагоцитирующие клетки, в частности, эпителиоциты.

Важна ферментопродуцирующая роль микрофлоры кишечника, имеющая значение в процессах пищеварения и метаболизма. Бактериальные протеазы гидролизуют белки и пептиды, последние под действием бактериоидов гидролизуются до аминокислот и пептидных остатков. Одним из свойств нормофлоры является метаболизм азот- и углеродсодержащих соединений за счет микробных ферментов. Метаболизм мочевины в кишечнике происходит за счет микробных уреаз. Микрофлора кишечника участвует в деградации липидов и в их синтезе. Нормальная микрофлора принимает участие в рециркуляции желчных кислот и активно влияет на холестериновый и билирубиновый метаболизм. Бактерии кишечника участвуют непосредственно в биохимических процессах разложения желчных кислот и образования в толстой кишке стерхобилина, копростерина, дезоксихолевой кислоты. Кислоты и газы, образующиеся при нормальных процессах ферментации, протекающих с участием микроорганизмов, благоприятно влияют на обмен веществ, перистальтику и топографию кишки, процессы всасывания и образования кала. При отклонении от нормы нарушается функциональное состояние толстой кишки. Подтверждением этого служит повышенное выделение ферментов с фекалиями, в частности энтерокиназы (до 600 ЕД/г), в то время как у здоровых людей энтерокиназа в фекалиях отсутствует или обнаруживаются ее следовые количества (до 20 ЕД/г). Бифидо- и лактобактерии, бактериоиды, эубактерии способствуют всасыванию кальция, витамина D, железа.

Эшерихии, бифидо-, лакто- и эубактерии выполняют витаминообразующую функцию (участвуют в синтезе и всасывании витаминов К, группы В, тиамин, биотин, цианкобаламина, фолиевой и никотиновой кислот). При этом потребность человека в биотине и фолиевой кислоте может полностью удовлетворяться за счет их синтеза кишечными бактериями. По способности синтезировать витамины кишечная палочка превосходит все остальные бактерии кишечной микрофлоры. Она синтезирует 9 витаминов: тиамин, рибофлавин, никотиновую и пантотеновую кислоты, пиридоксин, биотин, фолиевую кислоту, цианобаламин и витамин К, а витамин С синтезируют бифидобактерии. Витамины, синтезируемые бактериями кишечника, служат дополнительными источниками витаминов для организма человека. Их синтез, главным образом, происходит в тонкой кишке.

Кроме того, кишечная микрофлора способствует синтезу незаменимых аминокислот, лучшему усвоению солей кальция, витамина D. Метаболиты бифидо- и лактобактерий препятствуют микробному декарбоксилированию пищевого гистидина и повышению качества гистамина, т.е. обладают антианемическим, антирахитическим, антиаллергическим действием. Лактобактерии образуют молочную кислоту, продуцируют лизоцим, лизин, ацидофилин и др. Кишечная палочка способствует синтезу иммуноглобулинов, что препятствует развитию инфекции, вырабатывает канцеролитические вещества.

Большое значение имеет продуцирование анаэробами биологически активных соединений – летучих жирных кислот (ЛЖК), принимающих участие в рециркуляции и абсорбции ионов натрия, калия, кальция, магния, цинка, хлора, воды. При этом энергетическая потребность организма на 50–75 % обеспечивается ЛЖК микробного происхождения, которые всасываются в системный кровоток. Более того, установлено, что пропионовая кислота является одним из основных исходных субстратов глюконеогенеза, а уксусная и масляная кислоты – липогенеза. В организме человека большая часть ЛЖК (более 98 %) утилизируется эпителием толстого кишечника, так что их концентрация в портальном кровотоке примерно в 500 раз, а в периферической крови в 1000 раз меньше, чем в содержимом кишечника. Рост концентрации некоторых низкомолекулярных метаболитов микробиоты в кровяном русле человека, вероятно,

следует отнести к патофизиологическим проявлениям. В частности, при определенных патологиях ЖКТ наблюдается синдром гепатической энцефалопатии, когда на фоне повышенной проницаемости слизистого эпителия толстой кишки, рост концентрации ЛЖК в центральной кровотоке делает гематоэнцефалический барьер проницаемым для токсических метаболитов, таких как фенолы, аммиак, меркаптаны.

Кишечная микрофлора способна разлагать белки до конечных продуктов распада (индол, фенол, скатол), утилизировать непереваренные пищевые субстраты, образуя органические кислоты, аминокислоты и другие соединения, которые нормализуют обмен веществ в организме. Микрофлора кишечника, в конечном счете, поддерживает водный, электролитный и кислотно-щелочной балансы организма.

Нормальная микрофлора кишечника играет важную роль в формировании и функционировании иммунной системы. В опытах на животных установлено, что пероральное введение бифидо- и лактобактерий повышает устойчивость к различным инфекциям, что позволяет говорить об иммунопотенцирующей способности эубиотиков. Иммуностимулирующий эффект под воздействием нормофлоры проявляется усилением фагоцитарной активности макрофагов, моноцитов, синтезом цитокинов, стимуляцией клеточных иммунных механизмов защиты. Однако иммунизирующее действие нормальной микрофлоры не является специфическим. По-видимому, иммунитет вырабатывается как в процессе эволюции, так и в течение жизни. Иммунитет за счет нормальной микрофлоры, очевидно, вырабатывается не только против условно-патогенных, но и против патогенных бактерий. Механизм образования такого иммунитета можно себе представить, если учесть, что в кишечнике встречаются кишечные и лактозонегативные эшерихии, имеющие общие антигенные комплексы с паратифозными, дизентерийными бактериями, сальмонеллами и др. Иммунизация организма осуществляется при проникновении в кровь и лимфатические пути как продуктов микробного распада, так и самих бактерий. Комплекс антигенов кишечных бактерий является оптимумом для созревания систем, участвующих в иммунной реакции. Кишечные бактерии и продукты их разрушения постоянно проникают в кишечную стенку, где захватываются макрофагами и вызывают образование антител.

Нормальная микрофлора способствует пролиферации плазматических клеток. Бифидобактерии стимулируют синтез антител, лактобактерии повышают активность фагоцитов и лимфоцитов. Бактериальные модулины бифидо- и лактобактерий стимулируют лимфоидный аппарат, синтез иммуноглобулинов, интерферона, увеличивают уровень комплемента, повышают активность лизоцима, способствуют уменьшению проницаемости сосудисто-тканевых барьеров для токсичных продуктов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, препятствуют транслокации бактерий во внутренние органы и кровь, уменьшают воспалительные процессы слизистой кишечника.

Анаэробные бактерии вырабатывают БАВ, как β -аланин, 5-аминовалериановая и γ -аминомасляная кислоты, а также медиаторы, влияющие на функцию ЖКТ, печени, сердечно-сосудистой системы, кроветворение и обменные процессы. Продукты жизнедеятельности нормальной микрофлоры кишечника (в том числе пропеоновые бактерии) оказывают регулирующее действие на вегетативную нервную систему.

Микрофлора совместно с неперевариваемыми полисахаридами представляет собой своеобразный энтеросорбент с огромной адсорбционной емкостью, поэтому большая часть токсинов выводится из организма вместе с кишечным содержимым, даже не вступая в непосредственный контакт со слизистой. Другая часть токсичных метаболитов вовлекается в дальнейший метаболизм и утилизируется микрофлорой для собственных нужд. Так, меркаптаны и дисульфиды используются для синтеза важнейших окислительно-восстановительных ферментов анаэробов – ферредоксинов, содержащих железосерные кластеры; аммиак включается в цикл орнитин – мочевины, и используется для синтеза глутамина, нейромедиаторов и т.п. Эти примеры можно было бы продолжить,

но главный вывод очевиден – низкомолекулярные токсины посредством физико-химических и метаболических механизмов не допускаются во внутреннюю среду организма при нормальном состоянии микрофлоры. Однако при нарушении нормальных равновесных отношений микробиоты и хозяина возникают сдвиги, которые обычно обозначаются термином «дисбактериоз». В этом состоянии происходит изменение нормальных отношений между анаэробной и аэробной частями микробиоты, что приводит к возникновению условий для активации аппарата вирулентности микробиоты, следовательно, становится возможной атака организма инфекционными агентами.

Кишечная микрофлора представляет собой типичный биоценоз, в котором все представители оказывают взаимное влияние друг на друга. Этот симбиоз влияет на скорость роста микроорганизмов, его витаминный баланс, эффективность усвоения пищи, устойчивость к инфекции, токсичным веществам и другим неблагоприятным факторам. В неблагоприятных условиях, вызванных различными воздействиями на организм (стресс и т.п.) или на микробиоту (антибиотикотерапия), симбиоз может превращаться в отношения взаимной агрессии. При этом оба участника обладают достаточным потенциалом, чтобы нанести друг другу существенный ущерб или «расчистить дорогу» для внедрения в организм патогенных микроорганизмов. В частности, эпителий может вырабатывать бактериостатические и бактерицидные ферменты (лизоцим, лактоферрин), в него начинают проникать активированные фагоцитирующие клетки (нейтрофилы). В свою очередь, это вызывает ответ в форме активации «ударного» ферментативного аппарата бактерий (нейраминидазы, гиалуронидазы), высвобождение эндотоксина и синтез прочих атрибутов вирулентности.

В свою очередь, общее количество бактерий и соотношение их отдельных видов зависит от химического состава содержимого кишечника, реакции среды, окислительно-восстановительного потенциала, наличия бактерицидных веществ в организме и др. Кроме того, к факторам, влияющим на разнообразие и плотность микрофлоры в различных отделах ЖКТ относятся моторика (нормальное строение кишечника, его нервно-мышечного аппарата, отсутствие дивертикулов тонкой кишки, дефектов илеоцекального клапана, стрик-спаек и т.д.) кишечника и отсутствие возможных влияний на этот процесс, реализуемых функциональными расстройствами (замедление прохождения химуса через толстую кишку) или заболеваниями (гастродуоденит, сахарный диабет, склеродермия, язвенный некротический колит и др.).

Положительными функциями нормальной микрофлоры кишечника являются:

- ✓ колонизационная резистентность;
- ✓ синтетическая функция (способность бактерий продуцировать витамины, гормоны, антибиотики);
- ✓ поддержание высокого уровня содержания лизоцима, секреторных иммуномодулинов, интерферона, важных для иммунологической резистентности;
- ✓ детоксикация экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов;
- ✓ обменная функция (участие бактерий в метаболизме белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот, солей, желчных кислот и других жизненно важных веществ);
- ✓ пищеварительная функция (морфокинетическое влияние на слизистые оболочки, абсорбцию абиотических компонентов, транзит нутриентов, газовый состав, мышечный тонус кишечника, перистальтику кишечника, эвакуацию кишечного содержимого).

Таким образом, нормальная кишечная микрофлора важную неспецифическую защитную функцию, способствует поддержанию постоянства биохимической, биологической среды пищевого тракта.

3. Дисбактериоз

3.1. Понятие о дисбактериозе

Нормальная кишечная микрофлора может быть только при нормальном физиологическом состоянии организма. Однако, как только в организме происходят патологические изменения, то изменяется состав и свойства кишечной микрофлоры, нарушаются ее функции.

Изменения в микрофлоре кишечника, наступающие под влиянием разных факторов, обозначают общим термином «дисбактериоз», впервые введенном А. Nissle в 1916 г. А. Nissle под термином «дисбактериоз» первоначально понимал изменение только кишечной палочки. Он указывал, что в кишечнике человека существуют «полноценные виды» кишечной палочки, обладающий сильным антагонистическим эффектом по отношению к другим бактериям и «неполноценные виды», у которых эти свойства выражены слабо. Исследуя кишечную микрофлору, ученый пришел к выводу, что у здоровых людей в кишечнике находится кишечная палочка с выраженными антагонистическими свойствами, тогда как у лиц, страдающих колитами и другими кишечными заболеваниями, она отсутствует или обнаруживаются ее штаммы, лишенные антагонистических свойств.

В дальнейшем под термином «дисбактериоз» стали понимать более глубокие изменения всей кишечной микрофлоры. Так, Перетц Л.Г. (1962 г.) определил дисбактериоз как патологическое состояние кишечной микрофлоры, которое характеризуется уменьшением общего количества типичных кишечных палочек, снижением их антагонистической и ферментативной активности, наличием лактозонегативных эшерихий, появлением кишечных палочек, дающих гемолиз на кровяном агаре, увеличением гнилостных, гноеродных, спорозоносных и других видов микроорганизмов. Билибин А.Ф. (1970 г.) трактует дисбактериоз как состояние срыва адаптации, нарушение защитных и компенсаторных механизмов организма.

Дисбиоз представляет собой состояние экосистемы, при котором нарушается функционирование всех ее составных частей – организма человека, его микрофлоры и окружающей среды, а также механизмов их взаимодействия, что ведет к возникновению заболевания. Под дисбактериозом кишечника понимают качественные и количественные изменения нормофлоры человека, характерной для данного биотипа, влекущие за собой выраженные клинические реакции микроорганизма или являющиеся следствием каких-либо патологических процессов в организме.

Дисбактериоз кишечника следует рассматривать как симптомокомплекс, но не как заболевание. Совершенно очевидно, что дисбактериоз кишечника всегда вторичен и опосредован основным заболеванием. Именно этим объясняется отсутствие такого диагноза как «дисбиоз» или «дисбактериоз кишечника» в Международном классификаторе заболеваний человек (МКБ – 10), принятом в нашей стране, как и во всем мире.

3.2. Негативные проявления дисбактериоза

Развитию дисбактериоза благоприятствуют следующие факторы: ферментативная недостаточность, резкое изменение привычного образа жизни, голодание, авитаминоз, истощение организма в связи со злокачественными образованиями, хирургическими операциями в брюшной полости, ожоговой болезнью, активная терапия гормонами, лучевое воздействие, аллергизация организма, применение химиопрепаратов и антибиотиков, уменьшение иммунологической реактивности организма.

Кроме того, дисбактериоз кишечника встречается и у здоровых людей в результате неполноценной диеты, неправильного режима питания, авитаминозом в разные периоды года и другими неблагоприятными факторами.

Нарушение микрофлоры кишечника приводит к расстройству его всасывающей функции, сопровождающейся бактериальным заселением тонкой кишки. Особенно большое значение всасывающая функция тонкой кишки имеет в детском возрасте, т.к. от ее состояния зависит поступление пластического и энергетического материала во внутреннюю среду растущего организма.

Заселение тонкой кишки посторонней микрофлорой оказывает вредное влияние на белковый, углеводный, витаминный обмены. В результате нарушения процессов всасывания и усвоения пищевых продуктов на фоне кишечного дисбактериоза происходит резкое снижение резистентности организма. При этом уменьшаются уровни содержания иммуноглобулинов, секреторного иммуноглобулина А и лизоцима в сыворотке крови.

Биоценотические взаимоотношения между патогенными бактериями и нормальной кишечной микрофлорой является одним из важных факторов, влияющих на развитие хронических заболеваний кишечника, но механизмы микробного антагонизма как защитного фактора изучены недостаточно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при дисбактериозе основная масса кишечных палочек антагонистически негативна, что способствует усиленному росту условно-патогенных микроорганизмов.

При кишечном дисбактериозе наблюдается обильный рост стафилококков, протей, дрожжеподобных грибов рода *Candida* и резкое уменьшение количества бифидобактерий и лактобактерий.

В 1982 г. Мартынов А.И. с соавт. изучали микрофлору толстой и тонкой кишки, создавая модель дисбактериоза кишечника, при введении различных антибиотиков. При этом отмечалось увеличение числа условно-патогенных микроорганизмов в толстой кишке и обсеменение ими тонкой кишки, где в норме энтеробактерии отсутствуют. Из тонкой кишки полностью исчезали лактобациллы и бифидобактерии. Даже спустя 9 суток после отмены антибиотиков не происходило восстановления нормального биоценоза.

Развитие дисбактериоза и миграция микрофлоры в вышележащие отделы кишечника не только поддерживают воспалительные изменения, но и разрушают процессы переваривания и адсорбции пищевых продуктов.

Неблагоприятное воздействие продуктов бактериального метаболизма, в том числе токсинов бактерий, а также уменьшение активности пищеварительных ферментов нарушает усвоение ряда пищевых веществ, в том числе и витаминов.

Дисбактериоз кишечника является одним из факторов, вызывающих аллергическую перестройку организма и угнетение местных тканевых защитных механизмов, на фоне которых проявляется патогенное действие сальмонелл.

3.3. Факторы, обуславливающие развитие дисбактериоза кишечника

В основе развития дисбактериоза могут лежать различные причины, но ведущим фактором является снижение защитных механизмов в результате основного заболевания или в связи со снижением специфического иммунитета к нему.

Чаще всего дисбактериоз кишечника наблюдается у лиц пожилого возраста, что можно объяснить значительным уменьшением сопротивляемости организма. Старение организма человека сопровождается глубокими изменениями микрофлоры кишечного тракта и свойств населяющих его микроорганизмов. Значительное количество гнилостной и гноеродной микрофлоры, ослабление ферментативной активности кишечной палочки, появление у нее патогенных свойств являются основными неблагоприятными факторами.

Дисбактериоз кишечника может развиваться и у детей, что очевидно связано с несовершенством защитных реакций детского организма.

Кроме того, развитие дисбактериоза кишечника возможно при различных воспалительных изменениях слизистой и подслизистой оболочек толстой кишки, сопровождающих основное заболевание. Эти воспалительные процессы приводят к нарушению сопротивляемости кишечного эпителия, уменьшению его барьерной функции и клиническому проявлению дисбактериоза.

К местным факторам, ведущим к дисбактериозу кишечника, следует отнести поражение слизистой оболочки и последующее уменьшение барьерных функции эпителия, возникшие в результате непосредственного воздействия антибиотиков, особенно при пероральном применении. Антибиотики, повреждая эпителий ЖКТ, создают благоприятные условия для проникновения и развития микроорганизмов. Отрицательное воздействие антибиотиков на слизистую оболочку ЖКТ усиливается в случае, когда защитная функция покровного эпителия ослаблена предшествующими кишечными инфекциями.

Определенную роль в клиническом проявлении дисбактериоза кишечника играет сенсibilизация организма, наступившая в результате применения антибиотиков и сульфаниламидов. Большинство антибиотиков, соединяясь с белками, приобретают антигенные свойства и сенсibilизируют организм больного. В развитии аллергических реакций большое значение имеет количество и концентрация введенного лекарственного препарата, продолжительность и способ лечения, повторные курсы применения антибиотиков. При этом у больных с резко выраженными признаками сенсibilизации нередко при первом введении антибиотика наблюдаются тяжелые аллергические и другие проявления лекарственной болезни.

Большое значение при дисбактериозе кишечника, обусловленного антибиотикотерапией, имеют нарушение обменных процессов в организме больного. Особенно часто наблюдается недостаточность витаминов вследствие нарушения их синтеза, изменения углеводного, белкового и жирового обмена.

При лечении больных антибиотиками наряду с изменением состава кишечной микрофлоры отмечается нарушение витаминного баланса. Так, установлено, что синтез витаминов группы В в кишечнике нарушается за счет подавления антибиотиками микроорганизмов, осуществляющих данный синтез. В кишечнике остаются те виды бактерий, которые одновременно нечувствительны к антибиотику и к недостатку витаминов.

Состав микрофлоры может изменяться под влиянием разных факторов, ослабляющих защитные механизмы организма. Дисбактериоз может иметь место при освоении новых условий обитания, при экологически неблагоприятной обстановке. Несомненное влияние на организм оказывает изменение климатографических условий в связи со строительством гигантских электростанций и водохранилищ, орошение пустынь, осушение болот и т.п. Под влиянием перечисленных факторов происходят отчетливые изменения гуморального и клеточных факторов естественного иммунитета, биосинтеза антител, аллергической и аутоаллергической реактивности организма.

3.4. Лечение дисбактериоза

Тактика лечения зависит от степени выраженности дисбактериоза и предполагает, как правило, комплексный подход, включающий:

- ✓ устранение избыточного бактериального обсеменения тонкой кишки, восстановление нормальной микробной флоры;
- ✓ улучшение кишечного пищеварения и всасывания;
- ✓ восстановление нормальной моторики кишечника;
- ✓ стимуляция реактивности организма.

В терапии дисбактериоза кишечника важную роль играет нормализация режима питания, охранительный психоэмоциональный режим, разъяснительные беседы с больным. Выбор лекарственных препаратов – сложная задача врача-гастроэнтеролога при функциональных заболеваниях ЖКТ.

В настоящее время БАВ, применяемые для улучшения функционирования пищеварительного тракта, регуляции микробиоценоза ЖКТ, профилактики и лечения некоторых специфических инфекционных заболеваний подразделяют на: диетические

добавки, функциональное питание, пробиотики, пребиотики, синбиотики, бактериофаги, биотерапевтические агенты.

По литературным данным, первые три подгруппы объединяются в общую группу пробиотики. Применение пробиотиков и пребиотиков приводит к одному и тому же результату – увеличению числа молочнокислых бактерий, естественных обитателей кишечника. В этой связи, данные препараты в первую очередь должны назначаться детям грудного возраста, пожилым людям и тем, кто находится на стационарном лечении.

Пробиотики – живые микроорганизмы: молочнокислые бактерии, чаще бифидо- или лактобактерии, иногда дрожжи, которые относятся к нормальным обитателям кишечника здорового человека. Термин «пробиотики» впервые ввели в научную литературу в 1965 г. Lilley и Stillwell для обозначения соединений микробного происхождения, которые в отличие от антибиотиков, не убивали, а стимулировали рост микроорганизмов. Механизм положительного влияния пробиотиков включает:

- ✓ подавление микробных патогенов за счет продукции антибактериальных веществ, конкуренции за лимитируемые питательные вещества и сайты адгезии на кишечной стенке;
- ✓ влияние на ферментативную активность кишечных микроорганизмов;
- ✓ стимуляцию иммунной системы микроорганизма.

Препараты-пробиотики используются в качестве питательных добавок, а также в йогуртах и других молочных продуктах. Микроорганизмы, входящие в состав пробиотиков, непатогенны, нетоксичны, содержатся в достаточном количестве, сохраняют жизнеспособность при прохождении через ЖКТ и в процессе хранения. Пробиотики, в основном, не считаются лекарственными препаратами и рассматриваются как средства, благоприятно влияющие на состояние здоровья человека. Они могут включаться в питание в качестве диетических добавок (в виде лиофилизированных порошков, содержащих бифидобактерии, лактобактерии и их комбинации), используемых без назначения врача для восстановления микробиоценоза кишечника. В этой связи, разрешение на производство и применение пробиотиков в качестве диетических добавок от государственных структур, контролирующих создание лекарственных препаратов (В США – это Food and Drug Administration (FDA), в России – Фармакологический комитет и Комитет медицинских и иммунобиологических препаратов МЗ РФ) не требуется. Препаратами данной группы являются бифидумбактерин, бификол, бифиформ, лактобактерин, бактисубтил, линекс, энтерол и др. Весьма перспективно создание с помощью гнетической инженерии рекомбинантных пробиотиков, характеризующихся одновременно антибактериальными и противовирусными свойствами.

Пребиотики. Для того, чтобы компонент пищи был классифицирован как пребиотик, он не должен подвергаться гидролизу пищеварительными ферментами человека, не должен адсорбироваться в верхних отделах пищеварительного тракта, однако должен являться селективным субстратом для роста и/или метаболической активации одного вида или определенной группы микроорганизмов, заселяющих толстый кишечник, приводя к нормализации их соотношения. Ингредиенты питания, которые отвечают этим требованиям, являются низкомолекулярными углеводами. Свойства пребиотиков наиболее выражены во фруктозо-олигосахаридах, инулине, галакто-олигосахаридах, лактулозе, лактитоле. Пребиотики находятся в молочных продуктах, кукурузных хлопьях, крупах, хлебе, луке репчатом, цикории полевым, чесноке, фасоли, горохе, артишоке, аспарагусе, бананах и др. На жизнедеятельность микрофлоры кишечника человека в среднем расходуется до 10 % поступившей энергии и 20 % объема принятой пищи.

Смесь пробиотиков и пребиотиков объединяют в группу синбиотиков, оказывающих положительный эффект на здоровье организма, улучшая выживаемость и приживаемость в кишечнике живых бактериальных добавок и избирательно стимулируя рост и активацию метаболизма лактобактерий и бифидобактерий. К ним, как правило, относятся

биологически активные добавки, входящие в состав функционального питания, обогащенные одним или несколькими штаммами представителей родов *Lactobacillus* и/или *Bifidobacterium*. В РФ известны 3 препарата: 1) биовестин-лакто, сордержащий бифидогенные факторы и биомассу *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *L. plantarum*; 2) мальтидофилос, содержащий мальтодекстрин и биомассу *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*; 3) бифидо-бак, включающий фруктоолигосахариды из топинамбура и комплекс из бифидобактерий и лактобацилл, ламиналакт, содержащий аминокислоты, пектины, морскую капусту и энтерококки.

Кроме приведенной выше классификации биопрепаратов, применяемых для нормализации состояния кишечной микрофлоры при дисбактериозе, различают еще один вид их классификации:

а) монопрепараты – препараты, содержащие только один штамм бактерий: колибактерин, лактобактерин, бифидумбактерин и т.п.;

б) ассоциированные препараты – препараты, содержащие два и более штамма бактерий: бификол – двухкомплексный препарат, содержащий штамм кишечной палочки М₁₇ и бифидобактерии. За рубежом применяют такие ассоциированные препараты, как омнифлора, нормофлора и др., содержащие до 5–6 разных штаммов микроорганизмов.

4. Производство препаратов нормофлоры

Необходимым условием массового производства препаратов пробиотиков является сохранение их стабильности в течение длительного времени. Бактерийные препараты, содержащие живые микроорганизмы, относятся к наименее стойким, их активность снижается за счет гибели клеток. Микроорганизмы, имея низкий уровень биологической организации, сохраняют жизнеспособность практически при полной потере воды, при этом в них обратимо замедляются или прекращаются обменные процессы. Для увеличения сроков жизнеспособности бактерий показана сублимационная сушка, проходящая в условиях низкой температуры и глубокого вакуума (незначительной концентрации кислорода).

По причине гигроскопичности укупорку сухих биопрепаратов проводят под вакуумом или в токе инертного газа.

К факторам, оказывающим влияние на выживаемость микроорганизмов в препаратах сухих пробиотиков при хранении, следует отнести:

- ✓ регламентированное содержание остаточной влаги;
- ✓ наличие защитных сред;
- ✓ хранение сухих препаратов в атмосфере, не содержащей кислород.

В целях защиты пробиотиков от кислой среды желудка на таблетированные и капсулированные формы наносят ацидорезистентные покрытия или проводят иммобилизацию бактерий на сорбенте.

Производство должно быть организовано в соответствии с правилами GMP.

Штаммы микроорганизмов, использующихся в технологии препаратов пробиотиков, должны обладать следующими свойствами:

✓ эффективной антагонистической активностью, обеспечиваемой, в свою очередь, синтезом органических кислот, которые штамм должен активно продуцировать. При выделении штаммов бифидобактерий важным антагонистическим началом продуктов метаболизма являются муравьиная и молочная кислоты. Желательно также, чтобы эти штаммы продуцировали пероксиды и антибиотикоподобные вещества;

✓ эффективной способностью прикрепляться к эпителию кишечника, если речь идет о пристеночных микроорганизмах;

✓ не гидролизовать кишечную слизь, которая обладает протективным действием. Некоторые микроорганизмы продуцируют мукополисахариды, которые разрушают (гидролизуют) эту слизь;

- ✓ не повреждать клетки кишечного эпителия (холециты).

Отобранные штаммы обязательно проверяют на патогенность и токсичность *in vitro* на культуре клеток холецитов, на чувствительных животных. Побочные эффекты от приема пробиотиков не должны проявляться даже при избыточных дозах. Для проверки препарат вводят в организм чувствительных животных в больших количествах, иногда до нескольких граммов на килограмм веса.

Штаммы должны быть технологичны, т.е. хорошо расти и размножаться на искусственных питательных средах. Их обрабатывают методом лиофилизации: замораживают до низких температур, а затем высушивают при низком давлении. Следовательно, отобранные штаммы должны быть криорезистентны и выдерживать процедуру высушивания. Штаммы, удовлетворяющие всем этим требованиям, поступают в контрольный институт, откуда их передают в фармацевтическое производство с соответствующими документами, в которых отражены их характеристики. В заводских лабораториях штаммы высеивают на искусственные питательные среды, проверяют их соответствие паспортным данным (род, вид, биологические свойства). После этого их используют для получения препаратов пробиотиков. В условиях промышленного производства эти штаммы рассеивают и получают отдельные колонии, которые затем пересеивают на агаризованные или жидкие питательные среды (например, молочнокислые бактерии хорошо растут в обезжиренном молоке).

Бифидобактерии, лактобациллы и энтерококки – ауксотрофы, т.е. для своего роста они нуждаются в ряде питательных веществ и микроэлементов, не могут сами синтезировать аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины: их должна содержать питательная среда. Для культивирования этих бактерий используют такое сырье, которое разрешено к применению в пищевой промышленности, т.к. препарат, выращенный на этих средах, впоследствии используется для внутреннего применения.

Источником аминокислот обычно служит белок молока (казеин), который гидролизуют с помощью ферментов (трипсина и пепсина) и получают, соответственно, триптол и пептол. В качестве источника витаминов, а также пиримидиновых и пуриновых оснований используют дрожжевой экстракт, который получают из дрожжей рода *Saccharomyces* (пивных или пекарских). В качестве микроэлементов используют соли магния, марганца, цинка, которые добавляют в питательную среду для культивирования молочнокислых бактерий. Источником энергии, как правило, служит лактоза или глюкоза.

Обычно молочнокислые бактерии культивируют от 8 до 16 ч (довольно непродолжительная ферментация). Собирают штаммы в той фазе роста, при которой выживание клеток культуры будет наиболее длительным, что в свою очередь, при дальнейшем получении препарата, обеспечивает его длительное хранение. Все это определяется экспериментальным путем и часто ноу-хау фирмы-производителя. Выбирают, как правило, конец логарифмической фазы или начало стационарной, в зависимости от культуры продуцента. После завершения процесса культивирования получают бактериальную суспензию, содержащую в 1 мл 10^9 и более клеток. Эти клетки собирают, используя поточные центрифуги или сепараторы, в которых образуется масса, похожая на сметану со специфическим запахом кислого молока (напоминает прессованные дрожжи). Раствор криопротекторов (веществ белковой природы – обезжиренное молоко или желатин; углеводы – лактоза, сахароза) добавляют в проточную массу и получают густую суспензию клеток, которую разливают в ампулы. Затем их замораживают в жидком азоте и подвергают лиофильной сушке. Сухая масса приобретает пузырчатый вид. Ее измельчают и определяют титр, в соответствии с которым вносят в стеклянные или пластмассовые флаконы, или смешивают с культурой другого штамма. В последнем случае получают несколько видов микроорганизмов симбионтов.

Форма выпуска – флаконы (бифидумбактерин), ампулы (бификол, содержащий бифидобактерии и кишечную палочку), капсулы («Нутролин В» (Индия), содержащий штаммы лактобацилл) или пакетики (бифидумбактерин фирмы «Партнер», Россия).

4.1. Общая схема технологического процесса производства пробиотиков

Стадии биотехнологического процесса получения биопрепаратов для нормализации состояния кишечной микрофлоры при дисбактериозе, выпускаемых в виде лиофилизированной массы в ампулах или флаконах для перорального применения:

1. Подготовка производственных помещений, оборудования, посуды, персонала, вентиляционной системы – проводят в соответствии с требованиями инструкций, регламентирующих условия работы со стерильными лекарственными средствами.

2. Подготовка и стерилизация питательных сред (концентрированной, производственной и защитной среды высушивания). Предварительные работы включают:

- ✓ качественный подбор необходимых для данной культуры веществ;
- ✓ оценку влияния отдельных компонентов на выход целевого продукта;
- ✓ определение оптимального соотношения составляющих и удешевление сред.

3. Выращивание маточных (до 6 пассажей) и производственных культур. Вначале выращивают маточную культуру из специального штамма при температуре 37 °С, используя различные питательные среды. Производственную культуру выращивают методом глубинного культивирования в биореакторах, установленных в боксах. Биореакторы оснащены магнитной мешалкой и паровой рубашкой.

4. Розлив жидкого полуфабриката во флаконы. Розлив микробной суспензии в ампулы и флаконы проводят на аппаратах розлива и запайки ампул. Заполненные ампулы и флаконы поступают на сублимацию.

5. Сублимационная сушка. Ампулы помещают в морозильные камеры под углом 75°. Содержимое ампул замораживают при температуре -40 °С, выдерживают при этой температуре 18–24 ч, подвергая сублимации.

6. Укупорка. Ампулы с сухой микробной массой запаивают (флаконы укупоривают) с газовой защитой.

7. Маркировка и упаковка. Ампулы маркируют и упаковывают в пачки по 10 штук.

8. Контроль качества готовой лекарственной формы.

Выпуск биопрепаратов в виде лиофилизированной массы в ампулах или флаконах отличается рядом недостатков: бактерии не защищены от воздействия желудочного сока, следовательно, коли- и бифидобактерии погибают в кислой среде желудка, происходит быстрая гибель бактерий после вскрытия ампул и разведения ее содержимого водой, т.к. в ампуле содержится несколько доз и ампула рассчитана на несколько приемов. Кроме того, данная лекарственная форма неудобна в применении, т.к. существует возможность попадания осколков стекла при вскрытии ампулы.

Кроме того, были разработаны капсулированная и дражированная форма биопрепаратов. Однако, их существенным недостатком является очень маленький срок хранения.

Наиболее перспективной лекарственной формой для биопрепаратов являются таблетки. Для получения таблетированной лекарственной формы бактериальную суспензию разливают в металлические кассеты и подвергают лиофильной сушке. Получаемая при этом масса очень гигроскопична. Для устранения данного недостатка к ней добавляют различные вспомогательные вещества (маннит, лактозу и т.п.). Высушенную биомассу со вспомогательными веществами гранулируют (протирают через сито), добавляют стеарат кальция или магния и таблетуют методом прямого прессования.

С целью защиты таблеток от воздействия влаги в процессе хранения разработано прессованное и пленочное покрытия на основе ацетилфталилцеллюлозы для защиты

бактерий от кислой среды желудочного сока. Это же покрытие защищает таблетки от влияния атмосферной влаги.

Дальнейшее совершенствование таблеток связано с разработкой технологии таблеток на основе концентрированной суспензии, минуя стадию лиофильной сушки, как наиболее энергоемкой и длительной стадии процесса (36–48 ч). При этом полученные таблетки отвечали всем требованиям нормативно-технической документации, но были нестабильны в процессе хранения. В этой связи предложено проводить иммобилизацию бактерий, и уже на основе микрогранулированного препарата получать таблетки. На данный способ приготовления препарата для бактериотерапии получен патент.

В настоящее время также разработана технология получения суппозиториев лактобактерина из лиофильно высушенной биомассы или на основе концентрированной суспензии. Данная лекарственная форма нашла широкое применение в гинекологической практике.

4.2. Частная технология препаратов нормофлоры

Лактобактерин. Для производства лактобактерина применяют штамм лактобактерий *Lactobacillus plantarum*, который относится к роду *Lactobacilloccus*. Лактобактерии представляют собой грамположительные палочки длиной 0,7–3,0 мкм; растут в атмосфере CO₂, N₂, O₂.

Лактобактерин сухой (*Lactobacterium siccuum*) получают по общей схеме для бактериальных препаратов.

Технология лактобактерина:

1. Приготовление и стерилизация питательных сред

1.1. Приготовление гидролизованного молока (к прокипяченному обезжиренному молоку с рН 7,7±0,1 добавляют панкреатин и хлороформ, выдерживают при 40±2 °С 72 ч, затем фильтруют, разводят вдвое водой для инъекций, разливают в бутылки и стерилизуют).

1.2. Приготовление дрожжевого аутолизата (хлебопекарные дрожжи разводят в бутылках водой для инъекций и стерилизуют).

1.3. Приготовление среды МРС (к гидролизованному молоку добавляют дрожжевой аутолизат и навески следующих веществ: марганца и магния сернокислого, аммония лимоннокислого, глюкозы и др.).

1.4. Приготовление гидролизата казеина (в реакторе готовят раствор казеина, устанавливают необходимое значение рН, добавляют хлороформ, выдерживают 5 суток при температуре 45 °С, затем фильтруют в бутылки и стерилизуют).

1.5. Приготовление казеиново-дрожжевой среды.

1.6. Приготовление защитных высушивания (желатин, сахароза, молоко, натрий лимоннокислый и вода).

2. Получение маточной культуры: 6 пассажей в пробирках, чашках Петри, флаконах и бутылках – в течение 9 суток.

3. Выращивание производственной культуры: в биореакторах с жидкой питательной средой в течение 8–12 ч при температуре 37 °С; в 1 мл микробной суспензии производственного штамма должно быть не менее 6 млрд. живых микробных клеток; к полученной микробной суспензии добавляют защитные среды высушивания – сахарозно-желатозную или обрат молока.

4. Розлив лактобактерина в ампулы: доза зависит от концентрации живых микробных клеток.

5. Лиофильная (сублимационная) сушка

5.1. Замораживание ампул с лактобактерином, расположенных наклонно под углом 75°, в течение 18–24 ч в холодильной камере до -40 °С.

5.2. Лиофилизация (сублимирование) – сушка в условиях глубокого вакуума, длительность сублимации 68–70 ч.

6. Запайка ампул: в режиме газовой защиты – в атмосфере азота.

7. Контроль качества

7.1. Описание: кристаллическая или пористая масса желтовато-белого цвета, кисло-молочного запаха и вкуса. Определяют органолептически.

7.2. Подлинность определяется наличием характерных морфологических, культуральных и биохимических свойств в производственных штаммах лактобацилл.

7.3. Показатель pH растворенного препарата должен составлять $5,5 \pm 0,5$.

Остаточная влажность лактобактерина в ампулах или флаконах не должна превышать 3,5 %, в таблетках 5 %.

7.5. Растворимость. Сухой препарат должен растворяться в воде, очищенной и добавленной из расчета 1 мл на 1 дозу, в течение 5 мин. образовывать гомогенную взвесь, желтовато-бежевого цвета. Определяют визуально.

7.6. Бактериальная контаминация проверяется бактериоскопически и бактериологически.

Бактериоскопически – путем просмотра мазков, приготовленных из взвеси растворенного препарата и окрашенных по Граму. В мазках должны быть клетки, характерные для лактобацилл (грамположительные).

Бактериологически – путем посева на питательные среды и инкубации в течение 2 суток не должно содержаться колоний. Если обнаружили рост хотя бы в одной пробирке или чашке, производят повторный посев удвоенного количества образцов.

В случаях повторного роста серию препарата бракуют. Препарат сухой не должен быть контаминирован посторонней микрофлорой. Препарат в таблетках не должен содержать патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; допускается наличие микроорганизмов сапрофитов в количестве не более 300 на 1 таблетку.

7.7. Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвредным для белых мышей при введении его внутрь в количестве одной дозы. Наблюдение за мышами осуществляется в течение 5 суток. В случае гибели за этот срок хотя бы одной мыши контроль повторяют на удвоенном количестве животных. Если мыши не погибнут, препарат считают выдержавшим испытание; в противном случае данную серию препарата бракуют.

7.8. Специфическая активность. По количеству жизнеспособных клеток лактобацилл в 1 дозе препарата и активность кислотообразования.

7.8.1. Определение количества живых лактобацилл в 1 дозе. Для определения количества живых лактобацилл в одной дозе препарата от каждой серии испытывают не менее 3 образцов. Содержимое флакона после разведений высевают по 0,1 мл микробной суспензии на 4 чашки Петри. После 44 ч инкубации при температуре 37 °С производят подсчет выросших колоний и вычисляют содержание живых бактерий в 1 дозе препарата.

7.8.2. Определение активности кислотообразования проводят титриметрическим методом при выращивании бифидобактерий в модифицированной печеночной среде. Каждую пробу титруют раствором натрия гидроксида 0,1 моль/л в присутствии индикатора фенолфталеина до появления слабо-розового окрашивания. В одной дозе препарата (1 таблетка) при выпуске должно содержаться не менее $2 \cdot 10^9$ живых лактобацилл. Показатель активности кислотообразования лактобактерина, выраженный в градусах Тернера (ТО), должен быть не менее 200.

7.9. Определение компонентов стабилизирующей среды высушивания и других веществ, входящих в состав препарата.

8. Маркировка и упаковка. При производстве таблеток лактобактерина микробную суспензию сушат в кассетах. Сухую микробную массу (СММ) протирают через металлическое сито в бутылки с азотом. Таблеточную массу готовят в шаровой мельнице с добавлением к СММ вспомогательных веществ (лактозы, аэросила, кальция стеарата). В таблеточной массе определяют количество живых лактобактерий и рассчитывают массу таблетки. Таблетирование ведут методом прямого прессования в асептических условиях

при строгом соблюдении влажности воздуха (не более 50 % при 18 °С). Таблетки передают на фасовку во флаконы. Препарат должен находиться в вакууме, атмосфере азота или стерильного воздуха. С целью защиты бактериальных препаратов от агрессивной кислой среды желудка создаются таблетки с ацидорезистентным покрытием, капсулированные формы, иммобилизованные на сорбенте бактерии. Предприняты попытки создания микрокапсулированных форм пробиотиков.

Продолжительность процесса производства лактобактерина в ампулах и таблетках составляет соответственно 42 и 66 суток.

Хранят препарат в сухом, темном месте при температуре 5 ± 3 °С.

Сок годности 12 и 6 месяцев. Срок годности равен 12 месяцам, если в одной дозе при выпуске содержится 4 млрд. и более живых лактобацилл; 6 – при содержании от 2 до 3,9 млрд. К концу срока годности должно содержаться 1 млрд. живых лактобацилл.

4.3. Номенклатура препаратов нормофлоры

Последние годы характеризуются значительным увеличением количества пробиотиков за счет как модернизации и улучшения свойств старых препаратов, так и появления новых, в том числе поликомпонентных, содержащих новые штаммы микроорганизмов, а также различные БАВ. Это позволило классифицировать группу пробиотиков на несколько составляющих подгрупп:

1. Многокомпонентные: бифидосодержащие (бифидумбактерин, состоящий из штаммов вида *B. brevis*, бифидин, содержащий штаммы вида *B. adolescentis* М-42) и лактосодержащие (биобактон, состоящий из ацидофильных лактобактерий) биопрепараты, а также биопрепараты из апатогенных представителей рода *Bacillus* (споробактерин).

2. Поликомпонентные: бифилонг, ацилак, аципол, биоспорин, линекс (трехкомпонентный препарат из ацидофильных лактобактерий, бифидобактерий инфантис и фекального стрептококка), бифилак, бификол, бифиформ, бифилонг, линекс.

3. Комбинированные: бифидумбактерин форте, кипацид (лактобактерии и комплексный иммуноглобулин), бифилиз (препарат с лизоцимом), биофлор жидкий с экстрактом сои, овощей и прополиса.

4. Бактерии, иммобилизованные на сорбенте: бифидумбактерин форте.

5. Бифидо- и лактосодержащие пищевые продукты: бифилакт, бифидок и др.

Бактисубтил (*Bactisubtile*) – препарат на основе устойчивых к действию желудочного сока спор бактерий, прорастание которых происходит в кишечнике. Вегетативные формы бактерий высвобождают ферменты, расщепляющие углеводы, жиры, белки; в результате образуется кислая среда, угнетающая процессы гниения. Препарат препятствует нарушению синтеза в кишечнике витаминов группы В и Р. Форма выпуска – капсул.

Бифидумбактерин в порошке (*Bifidum bacterium in pulveris*) представляет собой лиофилизированную микробную массу живых антагонистически активных штаммов *Bifidumbacterium bifidum*. Препарат обладает антибактериальной активностью в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных бактерий, восстанавливает микрофлору кишечника, нормализует деятельность ЖКТ, обладает иммунорегулирующими свойствами. Его назначают при дисбактериозе у детей и взрослых. Выпускается в виде таблеток, во флаконах, пакетах и ампулах.

Бификол сухой (*Bificolium siccum*) представляет собой микробную массу живых антагонистически активных штаммов *Bifidumbacterium bifidum* и *E. coli*. Препарат применяется для лечения больных хроническими колитами разной этиологии на фоне дисбактериоза у детей и взрослых. Форма выпуска – флаконы и таблетки.

Бифилиз (*Bifilys*) в 1 мл содержит 5 млн. живых бифидобактерий, органические кислоты, легкоусвояемый белок, лизоцим. Препарат показан при острых кишечных заболеваниях вируснобактериальной природы.

Бифилонг сухой (*Bifilong siccum*) представляет собой микробную массу живых антагонистически активных двух штаммов *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum*. В виде лиофилизата выпускается в ампулах и флаконах. Препарат применяется для лечения острых и хронических заболеваний кишечника, профилактики и лечения дисбактериоза у детей и взрослых.

Биовестин – экологически чистая эмульсия живых бифидумбактерий (активнее сухого бифидумбактерина). Препарат назначают при диатезах и иммунодефицитах с первых дней жизни.

Лактобактерин в порошке (*Lactobacterinum in pulvis*) – сухая микробная масса живых антагонистически активных двух штаммов *Lactobacterinum acidophilus*. Форма выпуска – ампулы.

Аципол сухой содержит штаммы *Lactobacterinum acidophilus* и полисахарида кефирных грибов. Препарат рекомендован детям с первых дней жизни и взрослым для коррекции дисбиотических изменений в кишечнике.

Линекс (*Linex*) содержит *Lactobacterinum acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *E. faecalis*. Препарат поддерживает физиологическое равновесие кишечной микрофлоры.

Колибактерин сухой – лиофилизированная микробная масса живых бактерий *E. coli*. Препарат применяется для лечения детей и взрослых, страдающих хроническим колитом. Форма выпуска – флаконы, ампулы и таблетки.

Споробактерин сухой – микробная масса живых бактерий *Bacillus subtilis*. Биопрепарат применяется для лечения хирургических инфекций мягких тканей, остеомиелита, дисбактериозов. Выпускается в виде лиофилизированной массы в ампулах.

Энтерол-250 (*Enterol-250*) применяется в качестве активного компонента, содержит лиофилизированные дрожжи *Saccharomyces boulardii*, механизм действия которых принципиально отличается от механизма действия других бактериальных препаратов. *Saccharomyces boulardii*, обладают генетически обусловленной устойчивостью к антибиотикам и поэтому при проведении антибактериальной терапии сохраняют свою активность. Они не колонизируют пищеварительный тракт, клетки дрожжей элиминируются с калом в течение нескольких дней после завершения курса терапии. Таким образом, *Saccharomyces boulardii* действуют как «временная» кишечная микрофлора, способная сохранять или восстанавливать равновесие экосистемы кишечника.

Концентрат «Наринэ» – лиофилизированная в среде культивирования микробная масса живого штамма *Lactobacillus acidophilus* новорожденных детей Армении с добавлением защитной среды сахаро-желатино-молочной. Препарат выпускается в виде порошка кремового цвета, кисломолочного вкуса, во флаконах и пакетах.

Пребиотики

Лактулоза (*Lactulose*) – синтетический дисахарид. Под влиянием препарата увеличивается количество лактобактерий, что приводит к повышению кислотности в просвете толстого кишечника; наряду с этим увеличивается объем каловых масс и появляется слабительный эффект без влияния на слизистую оболочку и гладкую мускулатуру кишечника. Лактулоза уменьшает образование и всасывание азотсодержащих токсичных веществ в проксимальном отделе толстого кишечника, не уменьшает абсорбцию витаминов, не вызывает привыкания. Форма выпуска – сироп, состоящий из лактулозы, галактозы, лактозы.

Пантотенат кальция утилизируется бифидобактериями и способствует увеличению их массы.

Памба (парааминобензойная кислота) способствует росту бифидо- и лактобактерий, кишечных палочек.

Хилак-форте – концентрат метаболизма бактерий. Препарат способствует восстановлению нормофлоры.

Нормазе (лактолоза) – синтетический дисахарид, понижает рН в толстом кишечнике, снижает концентрацию гнилостных бактерий, стимулирует перистальтику и рост бифидобактерий.

Лизоцим (Lysocim) – мукополисахаридаза, фермент белковой природы. Препарат оказывает бактериолитическое действие, разрушает полисахариды микробной клетки, подавляет рост грамположительных бактерий, стимулирует неспецифическую реактивность организма, оказывает противовоспалительное и муколитическое действие.

5. Общая характеристика кисломолочных продуктов

Кроме вышеперечисленных препаратов для восстановления нормального кишечного биоценоза также возможно использование кисломолочных продуктов.

В числе самых верных союзников человека можно назвать молочнокислые микроорганизмы. И.И. Мечников возлагал большие надежды в борьбе со старением и болезнями именно на них, непримиримых противников гнилостной микрофлоры кишечника.

Кисломолочные продукты незаменимы в диетическом и лечебном питании.

Приготовление всех кисломолочных продуктов основано на использовании микробиологических процессов. Многие кисломолочные продукты изготавливаются путем введения в молоко молочнокислых микроорганизмов и дрожжей.

Большая часть палочковидных молочнокислых микроорганизмов является термофилами. Предельно низкая температура их размножения 25–28 °С, а температурный оптимум их развития – 40–45 °С. При этом термостабильность молочнокислых микроорганизмов невысока, большая их часть теряет жизнеспособность уже при температуре 63–65 °С при продолжительности воздействия 10–30 мин. Отдельные расы могут обладать большей устойчивостью. На их термостойкость существенное влияние оказывают свойства питательной среды. Так, в молоке, благодаря защитным свойствам казеина и особенностям физико-химического состояния жира, они выдерживают температуру на 2–5 °С выше, чем в водных растворах и бульонах.

Большая часть молочнокислых микроорганизмов являются факультативными анаэробами. Кислотостойкость и предел кислотообразования у отдельных рас микроорганизмов различны.

Все молочнокислые микроорганизмы для своего роста и развития нуждаются в факторах роста (витамины и т.п.), при отсутствии или недостатке которых культуры резко меняют свои свойства и постепенно вырождаются. При этом их способность к кислотообразованию резко снижается.

Многие расы молочнокислых микроорганизмов обладают свойствами синтезировать витамины. Этим объясняется лучший рост и развитие данной группы при введении в молоко комбинированных заквасок, состоящих из разных рас молочнокислых микроорганизмов или их сочетание с дрожжами, также способными к синтезу витаминов и антибиотикоподобных веществ. В комбинированных заквасках одни расы могут быть поставщиками факторов роста для других. Стабильность микрофлоры кефирного грибка, способность его микроорганизмов длительное время сохранять активность зависит от взаимного обслуживания прижившихся в субстрате грибка различных рас микроорганизмов и дрожжей.

Кисломолочные продукты усиливают деятельность пищеварительных желез. В таких продуктах не разрушаются водорастворимые витамины даже при длительном хранении, что имеет место во всех несквашенных молочных продуктах, особенно при воздействии света.

В заквашенном молоке при накоплении кислоты происходит постепенное набухание казеина, что способствует его лучшему перевариванию.

Кроме того, сам факт образования молочной кислоты в активной форме способствует снижению жизнедеятельности посторонней микрофлоры (условно-патогенной, патогенной).

5.1. Закваски

Впервые бактериальные закваски начали применять в маслоделии в 1860 г. Вначале использовали сквашенное молоко, пахту из-под кисломолочного масла и кислые сливки. Первые опыты по использованию чистых культур молочнокислых бактерий в маслоделии были проведены в Дании. С этого времени чистые культуры стали широко применяться и в других странах. В России пионером в этой области был С.А. Саверин, который разработал методы изготовления сухих чистых культур и внедрил их в маслодельную промышленность. В этой области также работали наши крупные ученые С.А. Королев, А.Ф. Войткевич, С.В. Парашуп и др.

Применение чистых культур способствовало повышению качества масла. Однако микрофлора (*Str. lactis*) применяемых заквасок не обеспечивала полноценного вкуса кисломолочного масла, поэтому в состав заквасок стали вводить ароматобразующие бактерии (*Str. citrovorus*, *Str. paracitrovorus*, *Str. diacetylactis*).

Микрофлора заквасок для масла, творога, сметаны и обыкновенной простокваши

Закваски высокого качества помимо быстрого сквашивания молока должны обладать способностью образовывать диацетил, летучие кислоты, эфиры, являющиеся составной частью аромата продуктов.

Микрофлора закваски должна обладать слабой редуцирующей способностью, т.е. не восстанавливать быстро диацетил и ацетоин (вещество, лишенное аромата). Это относится как к активным кислотообразователям, так и к ароматобразующим бактериям.

Микрофлора заквасок для масла должна состоять из активных кислотообразователей (*Str. cremoris* и *Str. lactis*) и синтезирующих диацетил ароматобразующих бактерий (*Str. diacetylactis*), при определенной величине окислительно-восстановительного потенциала (rH_{2-6}). Накопление ароматических веществ в закваске происходит после достижения определенной кислотности (70–80 °Т) при температуре 23–25 °С. При совместном культивировании с активными кислотообразователями (*Str. lactis*, *Str. cremoris*) развитие ароматобразующих бактерий протекает более энергично за счет накопления растворимых азотистых соединений и факторов роста. Так, по данным Нурмико, *Str. lactis* превращает фолиевую кислоту в фолиниевую, которая стимулирует развитие ароматобразующих бактерий. Последние более устойчивы к кислоте, чем молочнокислые стрептококки, поэтому в зрелой закваске их обнаруживается в значительно большем количестве. В закваске хорошего качества ароматобразующих бактерий содержится 5–10 % от общей микрофлоры. Количество диацетила в закваске обычно равняется нескольким мг в 1 л. По результатам исследований Мора и Вельма в заквасках с кислотностью 73–81 °Т (при температуре сквашивания 21 °С) количество диацетила варьируется от 1,53 до 2,5 мг/л. Хотя качественный состав микрофлоры заквасок для масел, творога и сметаны одинаков, все же закваска для творога должна образовывать плотный сгусток с колющейся консистенцией, тогда как для сметаны и масла – должна способствовать образованию густой консистенцией.

Закваски для южной простокваши, ацидофильного молока и ацидофилина

При приготовлении данных заквасок кисломолочных продуктов применяют закваски, содержащие термофильные молочнокислые палочки – болгарскую (южная простокваша) и ацидофильную (ацидофильное молоко, ацидофилин). Кроме того, в состав южной простокваши (южного напитка, йогурта) должны входить термофильные микроорганизмы (молчнокислые стрептококки).

Приготовление заквасок в лабораторных условиях

Применяются сухие и жидкие закваски. При этом жидкие закваски представляют собой чистые культуры молочнокислых бактерий, находящихся в активном состоянии – это их преимущество. Однако, наличие молочной кислоты сокращает срок их практической годности (до 20 суток), поэтому такие закваски применяют на предприятиях с располагающимися рядом лабораториям.

В сухих заквасках клетки молочнокислых бактерий находятся в неактивном состоянии, поэтому их необходимо перевести в активное состояние. Вторым недостатком является наличие в них, хотя и в небольшом количестве, посторонней микрофлоры. Их преимущество заключается в удлинении срока действия до 2–3 месяцев.

Жидкие закваски готовят на свежем, чистом, высококачественном молоке, полученном от коров одной молочнотоварной фермы. Молоко обезжиривают, стерилизуют при 1 атм. в течение 10 мин. При установлении оптимальной температуры для развития молочнокислых бактерий молоко заквашивают 1–2 % чистых культур.

Если закваску готовят из смеси молочнокислых стрептококков, то активных кислотообразователей вводят в 2 раза меньше, чем ароматобразующих бактерий. После заквашивания молоко стерильно разливают по 25–30 мл, затем помещают в термостат при оптимальной температуре для развития микрофлоры закваски. После образования сгустка флаконы с закваской охлаждают до температуры не выше 10 °С.

Сухие закваски. Известны следующие способы их приготовления :

- ✓ высушивание отпрессованного и измельченного сгустка, сквашенного чистыми культурами молока, путем смешивания крахмалом;
- ✓ высушивание отпрессованного и измельченного сгустка в сушильном шкафу при температуре около 40 °С током нагретого воздуха или под вакуумом;
- ✓ высушивание сквашенного молока на распылительной сушке;
- ✓ высушивание сквашенного молока методом сублимации (под вакуумом в замороженном состоянии).

Сохраняемость бактерий в сухих заквасках зависит от их кислотности, влажности, наличия воздуха и температуры хранения. Перед сушкой следует снизить кислотность сквашенного молока до исходной (влажность сухой закваски не должна превышать 5 %). Хранение заквасок под вакуумом или в атмосфере азота и при низкой положительной температуре в значительной степени увеличивает срок их годности.

Обычно сухие закваски содержат небольшое количество посторонней микрофлоры, попадающей во время их приготовления. Посторонняя микрофлора плохо развивается в молоке, поэтому при наличии в нем энергичных рас молочнокислых бактерий при первых же пересадках она подавляется молочной кислотой, образующейся в процессе сквашивания.

Активность заквасок можно повысить путем пропускания молочной сыворотки, в которой были выращены молочнокислые бактерии, через суперцентрифугу при 20000 об/мин. Бактериальные клетки отходят к стенкам барабана. В полученном таким путем концентрате содержатся сотни миллиардов клеток в 1 г. При высушивании концентрата получается закваска с высокой активностью и более длительным сроком хранения.

Микробиология кисломолочных продуктов

Кисломолочные продукты (сметана, творог, простокваша, кефир и др.) имеют высокую усвояемость, повышенную стойкость, простоту технологии, вследствие этого получили широкое распространение. Они имеют высокие вкусовые качества и обладают лечебными свойствами, быстрее, по сравнению с цельным молоком, подавляют развитие гнилостной микрофлоры. Особенно ценное свойство кисломолочных продуктов заключается в том, что они помогают организму быстрее устранить вредное влияние на микрофлору кишечника антибиотиков, применяемых при лечении заболеваний. В 1 мл кисломолочного продукта содержится до 1–2 млрд. клеток микроорганизмов; естественно,

что легкоусвояемые организмом вещества, входящие в состав клеток (углеводы, липиды, белки, аминокислоты, нуклеиновые кислоты и растворимые в воде витамины) оказывают положительное влияние на больной организм. При желудочно-кишечных заболеваниях часть микрофлоры кисломолочных продуктов может проникать в кишечник и оказывать отрицательное влияние на вредную (в особенности гнилостную).

Кисломолочные продукты, приготовленные на заквасках мезофильных молочнокислых бактерий

Для получения обыкновенной простокваши молоко, пастеризованное при 85–90 °С в течение 10–15 мин. и охлажденное до 30 °С, заквашивают 5 % закваски, содержащей чистые культуры мезофильных молочнокислых стрептококков (*Str. lactis*, *Str. cremoris*) и ароматобразующие бактерии. При этих условиях молоко сквашивается через 6–8 ч; после образования сгустка простоквашу (при кислотности не ниже 75 °Т) направляют в помещение с температурой близкой к 0 °С (но не выше 8 °С) для набухания белков. Готовая простокваша имеет ровный сгусток и слабокислый вкус (кислотность 85–110 °Т).

Для улучшения консистенции простокваши молоко заквашивают двумя заквасками: 1) смесью молочнокислых стрептококков (5,0–7,5 %); 2) болгарской палочки (0,5–1,0 %) при температуре 38 °С.

Несмотря на повышенную температуру сквашивания, преобладающую микрофлору составляют молочнокислые стрептококки, а ее вкус ее остается близким к простокваше обыкновенной.

Для приготовления творога и сметаны применяют ту же закваску, что и для простокваши обыкновенной (т.е. смесь мезофильных молочнокислых стрептококков). Отличие в свойствах молочнокислых стрептококков заключается в том, что для приготовления сметаны, используют расы *Str. lactis*, образующие вязкую сметанообразующую консистенцию, тогда как для приготовления простокваши и творога применяют расы, образующие при сквашивании молока ровный плотный сгусток. Для улучшения вкуса и аромата в закваску вводят ароматобразующие бактерии. Использование при выработке творога заквасок мезофильных и термофильных молочнокислых стрептококков (в отношении 1: 1) позволяет при повышенной температуре сквашивания (38–40 °С) значительно сократить продолжительность технологического процесса. Одновременно с этим наблюдается более интенсивное отделение сыворотки, ускоряющее процесс отпрессовки творога до стандартной влажности.

Для приготовления любительской сметаны, консистенция которой близка к маслу, используют пастеризованные при 92 °С в течение 5 мин. сливки жирностью 44 %, затем охлаждают до 50 °С, гомогенизируют при этой температуре и избыточном давлении 100 атм. Затем добавляют 10 % закваски, содержащей равное количество мезофильных и термофильных молочнокислых стрептококков. Сквашивание происходит при комнатной температуре до кислотности 55–60 °Т.

В указанных кисломолочных продуктах может встречаться посторонняя микрофлора – дрожжи, кишечная палочка и плесневые грибы (*Endomyces lactis* и *Penicillium glaucum*). При быстром потреблении простокваши посторонняя микрофлора обычно оказывает заметного влияния на ее качество, а при сильном обсеменении молока продукт может приобретать порочные свойства. В сметане и твороге при длительном хранении влияние посторонней микрофлоры может проявляться сильнее. Так, например, при развитии дрожжей, сбраживающих молочный сахар, наблюдается сильное газообразование; в продукте ощущается спиртовой запах; плесневые грибы разлагают жир и вызывают прогорклый вкус. Следует по возможности сокращать время образования сгустка, усиливать отделение сыворотки и быстро творог.

Кефир

Кефир готовят на естественной закваске – кефирных грибках, представляющих собой симбиоз различных микроорганизмов. По одним данным, основу кефирного грибка составляет мезофильный палочковидный микроб, по другим – вторым элементом микрофлоры кефирного грибка являются дрожжи. При исследовании производственных штаммов кефирных грибков установлено, кроме мезофильных молочнокислых палочек (бета бактерий и стрептобактерий) и дрожжей, наличие молочнокислых стрептококков и уксуснокислых бактерий. По-видимому, впервые кефирные грибки образовались при длительном приготовлении кефира в одном и том же сосуде, что позволило получить такой стойкий симбиоз.

Сухие кефирные грибки предварительно переводят в активное состояние. Для набухания их помещают на 12 ч в свежeproкипяченную и охлажденную до температуры 30 °С воду. После набухания грибки тщательно промывают и вновь заливают теплой (30 °С) прокипяченной водой. В этих условиях грибки выдерживают 2 суток (воду меняют 2–3 раза в сутки). Хорошие кефирные грибки за это время должны набухнуть и часть их должна всплыть.

Хорошие результаты получают также при помещении сухих грибков в теплую прокипяченную воду на 7–8 ч, меняя ее 2–3 раза. После заливают грибки теплым пастеризованным молоком. Если получены набухшие грибки, то их помещают на сито, предварительно обработанное кипятком или раствором хлорной извести, и тщательно промывают водой (без наличия остаточного хлора). Промытые грибки заливают цельным или обезжиренным молоком, пастеризованным при температуре 92 °С в течение 30 мин. и охлажденным до 25 °С (в количестве 2 л на 100 г грибков). Молоко с грибками выдерживают при температуре 20–22 °С до сквашивания, после чего сливают через сито, а грибок вновь заливают пастеризованным при температуре 92 °С в течение 30 мин. и охлажденным до 20 °С цельным или обезжиренным молоком. Молоко с грибками выдерживают при температуре 18 °С до сквашивания.

Подобные пересадки повторяют до восстановления активности грибков, признаком чего может служить частичное всплывание их на поверхность в процессе сквашивания – обычно для этого достаточно 3–4 пересадки.

Сквашенное молоко, слитое в чистую посуду с грибков, восстановивших свою активность, можно использовать как закваску при производстве кефира или хранить при температуре 8–10 °С до употребления. В производственных условиях грибки через 5 суток промывают водопроводной водой. Для предохранения кефирных грибков от загрязнения культивировать их надо в изолированном помещении, где установлены бактерицидные лампы, которые включают на 1,5–2 ч 2 раза в день. Стены, потолок и все оборудование 2 раза в неделю протирают раствором хлорной извести, содержащей 200 мг/л активного хлора. Молоко, применяемое для культивирования грибков и получения закваски, пастеризуют при непрерывном помешивании в специальных закрытых ушатах с мешалкой при температуре 92 °С в течение 30 мин.

Приготовление кефира. В процессе приготовления кефира принимает участие молочнокислое и спиртовое брожение: первое вызывается мезофильными молочнокислыми стрептококками и палочками, второе – дрожжами, и в меньшей степени ароматообразующими бактериями.

Для приготовления кефира пастеризованное молоко заквашивается производственной закваской, которую готовят путем сквашивания пастеризованного молока материнской закваской, т.е. сквашенным молоком, слитым с кефирных грибков. Закваску вносят в сквашенное молоко в количестве 5 % объема. Ее желательно применять выдержанную при температуре 10–12 °С в течение 24–30 ч, когда развиваются все элементы микрофлоры. Сквашивание кефира правильнее вести при пониженной температуре (20–22 °С или ниже). Более высокая температура (28–30 °С) приводит к вытеснению молочнокислыми стрептококками молочнокислых палочек и дрожжей.

Большое влияние на спиртовое брожение в кефире оказывает температура его созревания (10–12 °С). При этой температуре дрожжи развиваются в достаточном количестве, а молочнокислое брожение резко замедляется.

Консистенция кефира улучшается путем гомогенизации молока (при избыточном давлении 150 атм.) – она становится более густой и однородной.

В зависимости от длительности созревания различают слабый (однодневный), средний (двухдневный) и крепкий (трехдневный) кефир.

В слабом кефире кислотность 90 °Т, содержание спирта 0,2 %; в среднем – соответственно 105 °Т и 0,4 %; в крепком – 120 °Т и 0,6 %.

Для приготовления кефира на чистых культурах используют закваску: молочнокислые стрептококки (*Str. lactis*, *Str. cremoris*) и ароматобразующие бактерии, молочнокислые палочки (бета-бактерии и стрептобактерии), дрожжи, сбраживающие молочный сахар. Среди молочнокислых стрептококков (*Str. lactis*) следует отбирать для закваски такие расы, которые не оказывают подавляющее действие на развитие дрожжей.

Болгарская простокваша (йогурт)

Является кисломолочным продуктом, широко распространенным в Болгарии, Греции, Турции; близким к ней по способу приготовления являются южная простокваша, мацун (Армения), мацони (Грузия), даги (Индия).

Болгарскую простоквашу готовят из молока, пастеризованного при температуре 85–90 °С. Если пастеризацию проводят с выдержкой, то получают продукт с более плотной консистенцией. Подобные результаты получаются также при добавлении сухого молока. Значительно улучшается консистенция простокваши при применении гомогенизации молока. В состав закваски для болгарской простокваши входят термофильный молочнокислый стрептококк и болгарская палочка. Чистые культуры этих микроорганизмов обычно менее активны, чем смешанные. Усилению энергии кислотообразования в смеси этих возбудителей Пэтте объясняет накоплением аминокислот, которые активируют жизнедеятельность термофильного молочнокислого стрептококка. Среди аминокислот большое значение имеет валин, отщепление которого от казеина вызывается болгарской палочкой.

При заквашивании молока 5 % закваски, содержащей смесь термофильного стрептококка и болгарской палочки, свертывание наступает через 2,5–3 ч (при температуре сквашивания 40–42 °С). Готовая простокваша после охлаждения имеет плотный сгусток сметанообразную консистенцию; вкус – чистый, кисловатый.

Положительным свойством болгарской простокваши является способность удерживать сыворотку даже при длительном хранении.

Соотношение между элементами микрофлоры закваски оказывает влияние на вкус простокваши; при преобладании стрептококка он не очень кислый, а при преобладании палочек – бывает кислым. Предполагая, что в закваске молочнокислые бактерии содержатся приблизительно в равном соотношении, менее кислый вкус простокваши можно получить с помощью температуры сквашивания (если ее поддерживать на уровне около 40 °С). При ее повышении до 45 °С и выше простокваша получается более кислой. То же самое получается с повышением процента вносимой закваски из-за увеличения количества молочнокислых палочек.

Приготовление простокваши с использованием термофильных молочнокислых бактерий, помимо улучшения вкуса продукта, значительно ускоряет процесс сквашивания (до 2,5–3 ч вместо 5–6 ч при сквашивании обычным методом). Это позволяет удвоить выход простокваши на той же производственной площади.

Одной из разновидностей йогурта является биоурт, в состав закваски которого входит ацидофильная палочка и *Str. lactis*, выделенный из норвежского кислого молока тэтте.

Опыт приготовления болгарской простокваши позволяет сделать следующие выводы:

- ✓ закваски термофильного стрептококка и болгарской палочки следует готовить отдельно;
- ✓ для получения продукта с умеренной кислотностью следует вносить значительно больше закваски стрептококка (на 1 часть закваски палочек 9 (иногда и более) частей термофильного стрептококка);
- ✓ температура сквашивания молока должна быть в пределах 40–42 °С;
- ✓ соотношение между молочнокислыми стрептококками и палочками в готовом продукте должно быть 3:1.

Следует иметь в виду, что указанные условия рекомендуются для приготовления простокваши, которую предпочитают жители центральной полосы. Жителям юга нравится несколько более кислая простокваша. Количество вносимой закваски позволяет регулировать соотношение между микрофлорой закваски: с повышением процента вносимой закваски увеличивается количество молочнокислых палочек, и вкус простокваши становится более кислым.

Кисломолочный напиток «Снежок»

Состав микрофлоры этого кисломолочного напитка сходен с микрофлорой болгарской простокваши. Для его приготовления в молоко вносят 7 % сахара; смесь пастеризуют при температуре 85–92 °С, гомогенизируют под избыточным давлением 175 атм. и выдерживают 10 мин.

Далее смесь охлаждают (летом – до 42–45 °С, зимой – до 50 °С) и заквашивают 5 % закваски (4 % термофильного стрептококка и 1 % болгарской палочки). Сквашивание молока продолжается обычно не более 2,5–3 ч, кислотность готового продукта не должна превышать 80 °Т. Сгусток размешивают и охлаждают до 8–10 °С, добавляют фруктовый сироп. После этого напиток снова размешивают и разливают в бутылки.

Ацидофильная простокваша

Продукт очень близкий к болгарской простокваше и отличается тем, что в состав закваски вводят ацидофильную палочку вместо болгарской.

Ацидофильная палочка обладает большой способностью приживаться в кишечнике, и ее следует применять при изготовлении диетических кисломолочных продуктов.

Качественный состав микрофлоры кишечника, хотя и обладает большим разнообразием, но в большом количестве постоянно встречаются только отдельные группы микроорганизмов. Это облигатная микрофлора кишечника. К данной группе могут быть отнесены:

- 1) *Lactobacterium bifidum*, составляющий основную группу микроорганизмов кишечного содержимого детей, находящихся на грудном вскармливании;
- 2) бактерии группы кишечной палочки;
- 3) молочнокислые стрептококки кишечного происхождения (энтерококки);
- 4) *Lactobacterium acidophilum*. Нормальная микрофлора кишечника не является случайной; ее роль – защитная (против вредной гнилостной микрофлоры).

Она иммунизирует стенки кишечника, делая их устойчивыми к токсинами патогенных бактерий. Описаны случаи подавления кишечной микрофлоры антибиотиками (дисбактериоз). Доказано, что ряд микроорганизмов кишечника являются продуцентами ряда витаминов.

Усиленное применение витаминов антибиотиков при лечении желудочно-кишечных заболеваний может подавлять развитие нормальной кишечной микрофлоры. В этих случаях целесообразно вводить в состав микрофлоры заквасок, помимо ацидофильной

палочки, молочнокислые стрептококки кишечного происхождения (энтерококки). Это позволяет полнее восстановить в кишечнике больного микрофлору здорового организма.

Ацидофильную простоквашу приготавливают на закваске, содержащей в равных количествах ацидофильную палочку и молочнокислые стрептококки.

Некоторые расы ацидофильных палочек вызывают образование в продукте тягучей консистенции и металлического вкуса. В этой связи необходимо применять расы ацидофильной палочки (или их смесь), образующие в молоке плотный, колющийся сгусток и сообщающие продукту вкус, близкий вкусу болгарской простокваши.

Ацидофильное молоко

Отличается от ацидофильной простокваши тем, что его микрофлора состоит только из ацидофильных палочек, вследствие чего повышается его лечебное действие. Для того, чтобы избежать образования тягучей консистенции продукта, следует комбинировать слизистые расы с неслизистыми (в соотношении 1: 5). В этом случае продукт приобретает сметанообразную консистенцию. Ацидофильное молоко широко применяется в медицине и животноводстве в качестве профилактического и лекарственного средства при желудочно-кишечных заболеваниях.