МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

ИНСТИТУТ ХОЛОДА И БИОТЕХНОЛОГИЙ

Л.В. Красникова, П.И. Гунькова, В.В. Маркелова

МИКРОБИОЛОГИЯ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Лабораторный практикум

Учебно-методическое пособие

Санкт-Петербург
2013

УДК 579.2:637.5(076.5)

Красникова Л.В., Гунькова П.И., Маркелова В.В. Микробиология молока и молочных продуктов: Лабораторный практикум: Учеб.-метод. пособие. – СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 85 с.

Лабораторный практикум подготовлен в соответствии с рабочей программой по микробиологии молока и молочных продуктов. Содержит сведения об основных группах микроорганизмов, используемых в технологии молочных продуктов, о микробиологическом исследовании сырого и пастеризованного молока, заквасок и готовых молочных продуктов.

Предназначен для студентов, обучающихся по специальности 260303 Технология молока и молочных продуктов, и бакалавров направления 260200 Продукты питания животного происхождения.

Рецензент: кандидат техн. наук, проф. Т.А. Кудрявцева

Рекомендовано к печати редакционно-издательским советом Института холода и биотехнологий

В 2009 году Университет стал победителем многоэтапного конкурса, в результате которого определены 12 ведущих университетов России, которым присвоена категория «Национальный исследовательский университет». Министерством образования и науки Российской Федерации была утверждена программа его развития на 2009–2018 годы. В 2011 году Университет получил наименование «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики».

© Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 2013

© Красникова Л.В., Гунькова П.И., Маркелова В.В., 2013

ТЕМА 1. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

1. Молочнокислые бактерии

Молочнокислые бактерии объединены в одну группу по их способности сбраживать углеводы с образованием преимущественно молочной кислоты. Наряду с основным метаболитом, эти бактерии накапливают и другие продукты: уксусную кислоту, этанол, диоксид углерода, ароматические вещества (ацетальдегид, диацетил) и т. д.

Молочнокислые бактерии в основном неподвижны, по Граму красятся положительно, спор не образуют. В молодых культурах некоторые штаммы образуют слизистую капсулу.

По отношению к кислороду молочнокислые бактерии являются факультативными анаэробами. Молочнокислые бактерии – единственная группа микроорганизмов, лишенных каталазы, но способных расти в присутствии кислорода воздуха. Функцию каталазы выполняет фермент пероксидаза. У молочнокислых бактерий отсутствуют гемсодержащие ферменты, поэтому энергию они получают только в процессе молочнокислого брожения, которое условно разделяют на гомоферментативное и гетероферментативное. При гомоферментативном брожении основным метаболитом является молочная кислота; при гетероферментативном брожении кроме молочной кислоты образуются также диоксид углерода, этанол и (или) уксусная кислота.

Температурный диапазон жизнедеятельности лактобактерий довольно широк: мезофильные виды растут при оптимальной температуре 25–32 °С; минимальной температурой для них является 10 °С. Для термофильных видов оптимальная температура роста колеблется в пределах 38–45 °С, а минимальная – 20–22 °С. Имеются сведения, что некоторые молочнокислые бактерии способны расти при температуре 3–5 °С.

Клетки молочнокислых бактерий имеют шаровидную или палочковидную форму.

А. Шаровидные молочнокислые бактерии относятся к семейству *Streptococcaceae*, объединяющему роды *Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus* и *Leuconostoc*.

Lactococcus lactis subspecies lactis (молочнокислый стрептококк, сокращенно *Lac. lactis*). Клетки сферические или овальные размером (0,5–1,2)×(0,5–1,5) мкм, соединенные попарно (диплококки) или в виде коротких цепочек (рис. 1, а). Оптимальная температура развития составляет 28–32 °С.

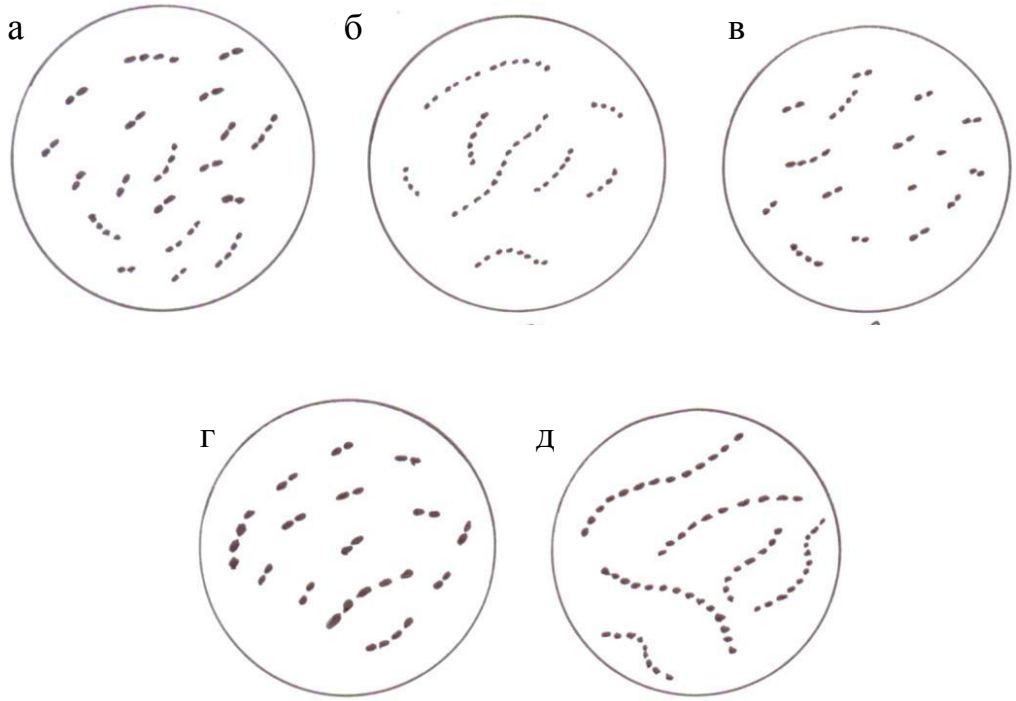


Рис. 1. Молочнокислые стрептококки и лейконостоки:
а – *Lac. lactis*; б – *Lac. cremoris*; в – *Lac. diacetilactis*;
г – *S. thermophilus*; д – *Leuc. cremoris*

Активные штаммы этого вида свертывают молоко за 4–6 ч, образуя ровный плотный сгусток. Предельная кислотность (через 5–7 суток развития в молоке) достигает 125 °Т. *Lac. lactis ssp. lactis* восстанавливает и свертывает лакмусовое молоко, разлагает аргинин с образованием аммиака, не растет в средах с 6,5 % NaCl и в щелочной среде с pH 9,5. Штаммы этого вида входят в состав заквасок для кисломолочных напитков, творога, сметаны, кислосливочного масла, сыров с низкой температурой второго нагревания.

Отдельные штаммы *Lac. lactis* синтезируют бактериоцин низин, обладающий антагонистической активностью по отношению к большинству грамположительных бактерий (стафилококков, микрококков, бацилл, клостридий, лактобактерий и др.). Низин используется в консервной промышленности для подавления развития спорообразующих бактерий.

Lactococcus lactis ssp. cremoris (сливочный стрептококк – *Lac. cremoris*). Клетки шаровидные, располагаются в виде коротких и длинных цепочек (см. рис. 1, б). Оптимальная температура роста 25–30 °С. Молоко свертывает за 6–8 ч, образуя плотный сгусток слегка вязкой или сметанообразной консистенции, что обусловлено способностью сливочного стрептококка синтезировать полисахариды. Предельная кислотность в молоке не превышает 110–115 °Т.

Штаммы этого вида не образуют аммиак из аргинина, не растут в средах с 4 % NaCl и pH 9,5. Сливочный стрептококк используется в закваскахдля сметаны, кислосливочного масла и других кисломолочных продуктов.

Некоторые штаммы этого подвида синтезируют бактериоцин лактококцин.

Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis (ароматобразующий стрептококк – *Lac. diacetylactis*). Клетки расположены чаще всего в виде диплококков и коротких цепочек (см. рис. 1, в). Оптимальная температура роста 25–30 °С. Имеет довольно слабую кислотообразующую активность – молоко свертывает за 16–18 ч, предельная кислотность не превышает 70–100 °Т. Сгусток молока плотный, часто с наличием пузырьков газа (CO_2), имеет приятный специфический запах, обусловленный накоплением диацетила. Штаммы этого вида расщепляют лактозу и цитраты с образованием диоксида углерода, диацетила и ацетоина. В утилизации цитратов участвуют два фермента – цитратпермеаза, транспортирующая цитрат в клетку через цитоплазматическую мембрану, и цитратлиаза, расщепляющая цитрат на ацетат и оксалоацетат.

Ароматобразующий стрептококк широко используется в закваскахдля большинства ферментированных молочных продуктов.

Streptococcus salivarius ssp. thermophilus (термофильный стрептококк – *S. thermophilus*). Клетки имеют овальную или шаровидную форму, диаметр 0,7–1,0 мкм, часто соединены в длинные цепочки (см. рис. 1, г). Активные штаммы свертывают молоко за 3,5–4 ч

при оптимальной температуре 40–42 °С. Температурный диапазон роста составляет 20–50 °С. Предельная кислотность в молоке не превышает 100–115 °Т. Термофильный стрептококк чувствителен к содержанию в среде NaCl и антибиотиков: он не растет в среде с содержанием 4 % NaCl и 0,01 МЕ/см^3 пенициллина.

Термофильный стрептококк вводят в состав заквасок для производства ряженки, варенца, йогурта, сыров с высокой температурой второго нагревания.

Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris (*Leuc. cremoris*). Клетки шаровидные или линзовидные размером (0,5–0,7)×(0,7–1,2) мкм, соединены попарно или в короткие цепочки (см. рис. 1, д). Оптимальная температура роста составляет 22–25 °С, минимальная – около 5 °С. Молоко не свертывает, так как обладает низкой протеиназной активностью. Лейконостоки способны расти в молоке при добавлении в него ростовых факторов (дрожжевого или кукурузного экстракта). Предельная кислотность не превышает 40–50 °Т. После снижения pH среды до 5,0–4,5 образует диацетил, поэтому данный вид используют в многовидовых закваскаx для производства сыров и кисло-сливочного масла в сочетании с *Lac. lactis* и *Lac. cremoris.*

Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum (*Leuc. dextranicum*). Данный вид морфологически схож с *Leuc. cremoris*. Свертывает молоко при оптимальной температуре 22–25 °С в течение трех–четырех суток. Предельная кислотность составляет 70–80 °Т.

Размножение лейконостоков стимулирует добавление в среду марганца, что приводит также к повышенному синтезу метаболитов: диацетила, уксусной кислоты, диоксида углерода.

Лейконостоки входят в состав естественной микрофлоры кефирного грибка и играют большую роль в формировании его вкуса и запаха.

Многие штаммы *Leuc. dextranicum* синтезируют из сахарозы полисахарид декстран, образующий слизь.

***Pediococcus cerevisiae*.** Кокки располагаются тетрадами, парами, редко встречаются одиночные клетки. Оптимальная температура роста составляет 22–25 °С, при температуре 35 °С рост прекращается. Тип брожения – гомоферментативный, приводит к образованию *DL*-молочной кислоты (обычно преобладает *L*(+)-изомер). Факультативные анаэробы или микроаэрофилы.

Часто встречаются в испорченном пиве, в молочных продуктах обнаруживаются редко. Педиококки включают в состав заквасок для производства сырокопченых колбас.

Б. Палочковидные молочнокислые бактерии относят к семейству *Lactobacillaceae*, роду *Lactobacillus*, который включает три подрода: *Thermobacterium* (термобактерии), *Streptobacterium* (стрептобактерии) и *Betabacterium* (бетабактерии) (по Орла-Йенсену).

По типу брожения лактобациллы распределены на три группы:

I – облигатно-гомоферментативные (термобактерии) – 15 видов;

II – факультативно-гетероферментативные (стрептобактерии) – 11 видов;

III – облигатно-гетероферментативные (бетабактерии) – 18 видов.

В молочной промышленности используют следующие виды лактобацилл.

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus (болгарская палочка, или *L. bulgaricus).* Форма клеток в молоке – длинные и короткие палочки размером (5–20)×(0,8–1,0) мкм (рис. 2, а). При окрашивании препаратов из молока метиленовым синим в клетках часто наблюдаются зерна полифосфатов, иногда неравномерно окрашенные участки цитоплазмы. Оптимальная температура роста составляет 40–45 °С. Молоко свертывает за 4–6 ч. Предельная кислотность молока достигает 200–350 °Т. Сгусток молока может иметь колющуюся или сильновязкую, слизистую консистенцию. Штаммы болгарской палочки образуют ацетальдегид, придающий сгустку характерный фруктовый запах.

Штаммы болгарской палочки входят в состав заквасок для производства йогурта, простокваши «Южной», «Болгарской», «Мечниковской».

Lactobacillus acidophilus (ацидофильная палочка). Форма клеток в молоке – длинные и короткие палочки размером 3–40 мкм и толщиной 1,0–1,5 мкм. У некоторых штаммов так же, как и у болгарской палочки, в клетках наблюдается «зернистость» (зерна полифосфатов) (см. рис. 2, б). Оптимальная температура роста составляет 37–38 °С. Молоко свертывает за 5–8 ч, предельная кислотность молока 260–280 °Т. Некоторые штаммы образуют слизистый сгусток.

Ацидофильная палочка является нормальным представителем кишечной микрофлоры человека и теплокровных животных. Поэтому она устойчива к щелочной реакции среды (pH 8,3); наличию в среде фенола (0,3–0,4 %) и желчи (20 %).

Ацидофильная палочка обладает высокой антагонистической активностью по отношению к гнилостной, условно-патогенной и патогенной микрофлоре. Она продуцирует два бактериоцина – ацидофилин и лактоцидин. В связи с этим *L. acidophilus* относят к ценным пробиотическим культурам.

Молочнокислые палочки данного вида применяют для приготовления ацидофилина, ацидофильного молока, детских кисломолочных продуктов.

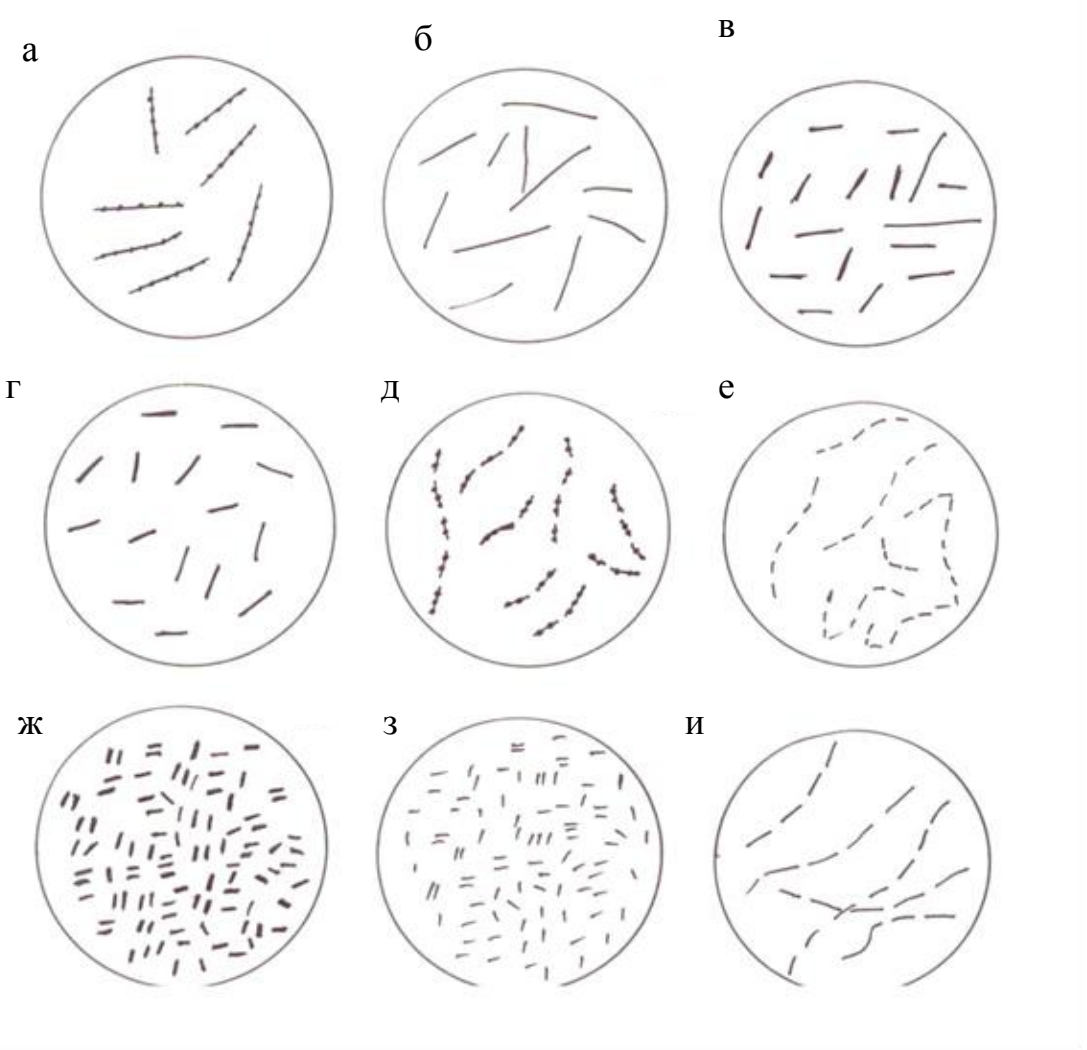


Рис. 2. Молочнокислые палочки:
а – *L. bulgaricus*; б – *L. acidophilus*; в – *L. lactis*; г – *L. helveticus*;
д – *L. rhamnosus*; е – *L. plantarum*; ж – *L. fermentum*; *з* – *L. brevis*; и – *L. casei*

Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis (молочнокислая палочка – *L. lactis).* По морфологическим и биохимическим признакам она схожа с болгарской палочкой (см. рис. 2, в). Оптимальная температура роста составляет 40–42 °С; предельная кислотность молока,

сквашенного *L. lactis*, – 160–200 °Т. Используется в производстве сыров с высокой температурой второго нагревания.

Lactobacillus helveticus (швейцарская палочка). Палочки имеют длину 2–6 мкм и толщину 1,0–1,5 мкм; располагаются одиночно или короткими цепочками (см. рис. 2, г). Оптимальная температура их роста равна 42–45 °С. Молоко свертывает за 5–6 ч, предельная кислотность составляет 300–350 °Т. Штаммы *L. helveticus* можно выделить из сычуга телят. Данный вид используется в закваскаx для сыров с высокой температурой второго нагревания.

Lactobacillus casei ssp. casei (*L. casei*). Палочки с прямоугольными концами размером (0,7–1,1)×(2–4) мкм, располагающиеся чаще всего цепочками (см. рис. 2, д). Оптимальная температура роста составляет 28–32 °С , при температуре 45 °С рост прекращается.

Lactobacillus casei ssp. rhamnosus (*L. rhamnosus*). Растут в молоке в виде коротких или длинных палочек толщиной 1,5 мкм, соединенных в цепочки. Часто обнаруживается зернистость клеток. Оптимальная температура роста составляет около 30 °С. В отличие от *L. casei* способны расти при температуре 45 °С, размножаться в среде с содержанием 6 % NaCl и 20 % желчи. По сравнению с мезофильными лактококками протеолитическая активность *L. rhamnosus* в два раза выше. Предельная кислотность в молоке равна 80–180 °Т. Используются в закваскаx для производства следующих видов сыров: эммeнтальского, эдам, честер и др. Встречаются в разных видах сыров в качестве сопутствующей микрофлоры.

Lactobacillus plantarum. Палочки разной длины, соединенные в длинные и короткие цепочки (см. рис. 2, е). Оптимальная температура составляет около 30 °С, предельная кислотность при развитии в молоке достигает 180 °Т. Играет положительную роль при созревании сыров, так как может размножаться после сбраживания лактозы заквасочной микрофлорой и при концентрации NaCl до 6 %. *L. plantarum* используется в составе заквасок для приготовления силоса, квашеной капусты. Этот вид образует пероксид водорода и синтезирует бактериоцин плантарицин – вещество, подавляющее рост маслянокислых бактерий и кишечной микрофлоры.

Lactobacillus brevis. Мелкие палочки с закругленными концами размером (0,7–1,0)×(2–4) мкм (см. рис. 2, ж).

Lactobacillus fermentum – толстые короткие палочки длиной 0,5–0,9 мкм.

Lactobacillus buchneri **–** палочки с закругленными концами размером (0,7–1,0)×(2–4) мкм

Палочки видов *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri* относятся к подроду *Betabakterium.* Они включены в группу облигатно-гетероферментативных молочнокислых бактерий. Бета-бактерии не сверты-вают молоко, однако при добавлении к нему дрожжевого автолизата образуют сгусток, предельная кислотность которого может дости-гать 150–160 °Т.

Сбраживают глюкозу с образованием молочной кислоты, CO_2, этанола и незначительного количества летучих кислот. Образуют *DL*-изомеры молочной кислоты.

Бета-бактерии участвуют в созревании сыров с низкой темпе-ратурой второго нагревания, способствуя формированию рисунка и запаха сыра. Они также встречаются в строме кефирного грибка.

2. Бифидобактерии

Бифидобактерии включены в семейство *Actinomycetaceae,* род *Bifidobacterium*; *я*вляются представителями нормальной микрофлоры кишечника человека и животных; обладают высокой антагонисти-ческой активностью по отношению к патогенным и условно-пато-генным микроорганизмам.

Морфология. Форма клеток – мелкие, иногда ветвящиеся палочки Y- или V-формы, прямые или изогнутые, булавовидные или лопатовидные (рис. 3). Микробные клетки располагаются одиночно, парами, палисадом или розетками, редко – цепочками. Размер клеток составляет (0,5–1,3)×(1,5–8) мкм. Бифидобактерии по Граму красятся положительно, не образуют эндоспор, неподвижны. Некоторые штам-мы способны образовывать микрокапсулу.

Бифидобактерии являются строгими анаэробами. Оптимальная температура их роста 36–40 °С, температурные пределы роста 20–50 °С. Оптимальное значение pH среды 6–7; при pH ниже 4,5 рост бифидобактерий приостанавливается. В коровьем молоке бифидо-бактерии размножаются медленно, поскольку оно не является естест-

венной средой их обитания. Для культивирования бифидобактерий в лабораторных условиях используют печеночно-цистеиновую среду Блаурока или гидролизатно-молочную среду (ГМС). После лабораторного культивирования они способны свертывать молоко через 10–12 ч. Предельная кислотность молока достигает 120–130 °Т.

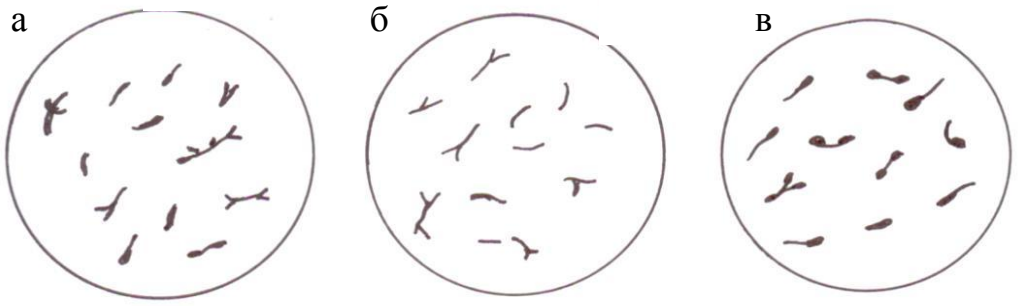


Рис. 3. Бифидобактерии:
а – *B. bifidum*; б – *B. longum*; в – *B. adolescentis*

Бифидобактерии сбраживают углеводы с образованием молочной и уксусной кислот. Штаммы бифидобактерий используют для производства детских, лечебных, и диетических кисломолочных продуктов (биойогурта, бифидокефира, бифилакта и др.).

3. Пропионовокислые бактерии

Пропионовокислые бактерии относятся к семейству *Propionibacteriaceae*, роду *Propionibacterium*. Типовой вид этого рода – *Propionibacterium freudenreichii*.

Propionibacterium freudenreichii – мелкие, неподвижные, неспорообразующие, грамположительные полиморфные палочки размером (0,5–0,8)×(1–5) мкм. Клетки бывают кокковидными, удлиненными, раздвоенными или разветвленными (встречаются булавовидные формы); располагаются одиночно, парами, в виде букв V или Y.

Факультативные анаэробы. Максимальный рост наблюдается при температуре 30–37 ° С и значении pH около 7,0.

В молоке пропионовокислые бактерии развиваются медленно и свертывают его через 5–7 дней. Предельная кислотность молока может достигать 160–170 °Т.

Пропионовокислые бактерии используют в сыроделии при производстве сыров с высокой температурой второго нагревания. После окончания молочнокислого брожения в сырах начинается стадия развития пропионовокислых бактерий. Последние в ходе пропионовокислого брожения накапливают пропионовую и уксусную кислоты и диоксид углерода. Летучие кислоты придают сырам специфический вкус и запах, а диоксид углерода формирует рисунок сыра.

4. Уксуснокислые бактерии

Уксуснокислые бактерии (ацетобактерии) относятся к роду *Acetobacter*, включающему семь видов. Типовой вид – *Acetobacter aceti*. ***Acetobacter aceti*** – мелкие грамотрицательные подвижные палочки размером (0,6–0,8)×(1,0–3,0) мкм. Встречаются нитевидные, эллипсовидные или имеющие вздутие формы. Располагаются одиночно или цепочками. Спор и капсул не образуют.

Строгие аэробы. Окисляют спирты в соответствующие кислоты (например, этанол в уксусную кислоту). Оптимальная температура развития 30 °С, оптимум pH 5,4–6,3. Колонии бактерий вырастают только на поверхности питательной среды, на жидких питательных средах они образуют пленку. В молоке развиваются плохо и кислоты не образуют. При доступе воздуха уксуснокислые бактерии окисляют спирт в уксусную кислоту.

Уксуснокислые бактерии входят в состав кефирных грибков. В производстве кефира они играют положительную роль при умеренном развитии; их развитие в сметане, твороге, простокваше может вызвать появление нежелательного запаха и привкуса уксусной кислоты, а также ослизнение продукта.

5. Дрожжи

Дрожжи играют в молочной промышленности двоякую роль: одни виды принимают участие в производстве ферментированных молочных продуктов в качестве биологических агентов, вызывающих спиртовое брожение; другие виды способствуют порче молочных продуктов.

Дрожжи, присутствующие в молочных продуктах, условно подразделяют на три группы:

– дрожжи, сбраживающие лактозу. К ним относятся спорогенные (спорообразующие) дрожжи видов *Saccharomyces lactis, Zygosaccharomyces lactis, Kluyveromyces fragilis, Debaryomyces* и аспорогенные (неспорообразующие) дрожжи видов *Torulopsis kefir, Torulopsis sphaerica, Candida pseudotropicalis var. lactosa* и др.;

– дрожжи, не сбраживающие лактозу, но ферментирующие моносахара. Такие дрожжи могут размножаться в молоке и молочных продуктах совместно с молочнокислыми бактериями, расщепляющими лактозу на глюкозу и галактозу;

– дрожжи, не ферментирующие лактозу и другие сахара, но вызывающие их окисление. Они не образуют спор и не способны к спиртовому брожению. В первую очередь к ним относятся дрожжи рода *Candida.*

Лактозосбраживающие дрожжи используют в производстве таких продуктов смешанного брожения, как кумыс, тан, айран, мацони, курунга и др. В этих продуктах они формируют специфический вкус, синтезируют витамины, стимулируют рост молочнокислых бактерий.

Некоторые штаммы дрожжей, размножающихся в молочных продуктах, обладают антагонистической активностью по отношению к возбудителю туберкулеза, а также к некоторым условно-патогенным микроорганизмам.

Отдельные виды дрожжей участвуют в созревании сыров, находясь в составе микрофлоры сырной слизи.

Дрожжи, попадающие в молочные продукты из внешних источников (так называемые «дикие дрожжи), могут стать причиной следующих видов порчи.

1. Пигментация – появление цветных колоний на поверхности масла, сыра, творога. Образовывать колонии розового, желтого, черного цветов способны дрожжи рода *Rodotorula* (рис. 4).

2. Вспучивание творога, сметаны, йогурта, а также сыров на ранней стадии их созревания. Такой вид порчи обусловлен образованием диоксида углерода при спиртовом брожении, вызываемом дрожжами. Среди дрожжей, вызывающих порчу йогурта, выделены следующие виды: *Torulopsis candida, Kluyveromyces fragilis, Debaryomyces hansenii, Candida crusei, Saccharomyces cerevisiae* (рис. 5).

а б

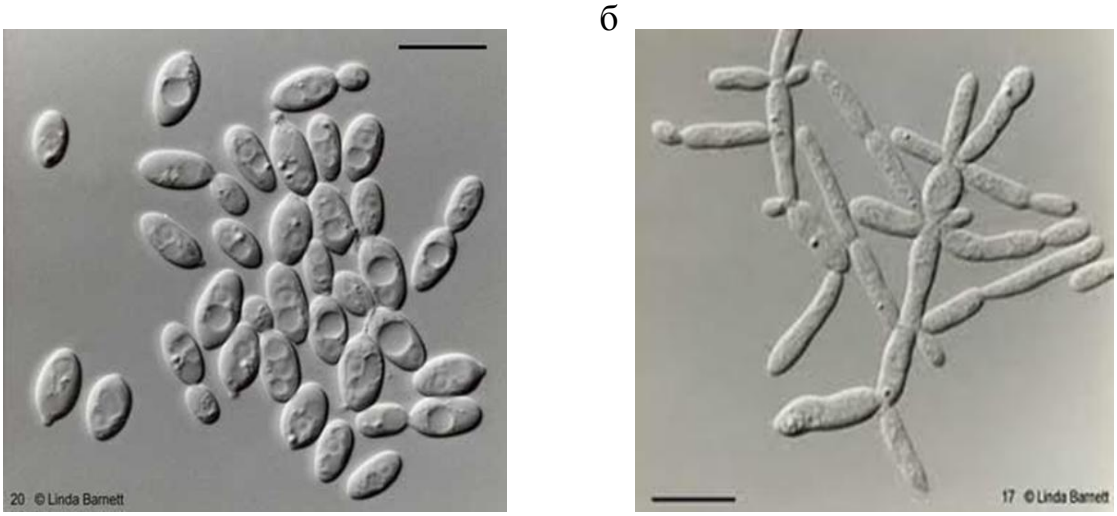
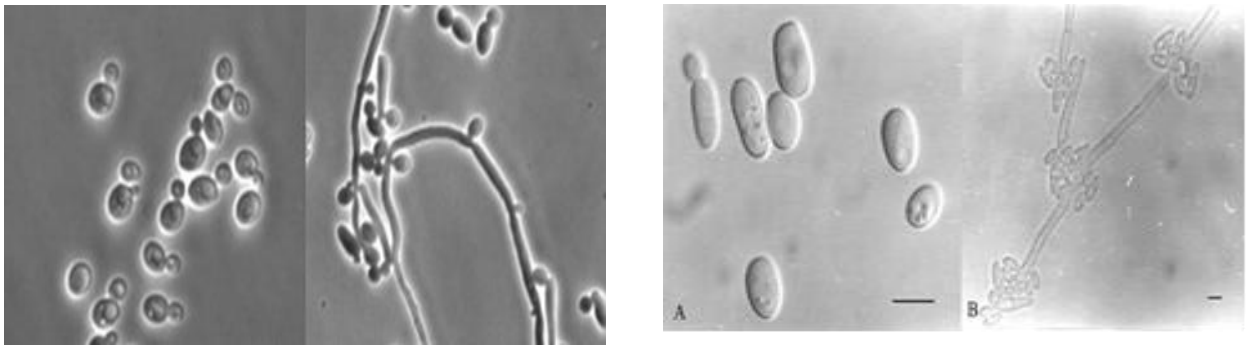


Рис. 4. Дрожжи рода *Rodotorula*:
а – *Rodotorula rubra*; б – *Rhodotorula mucilaginosa*

а б



в г

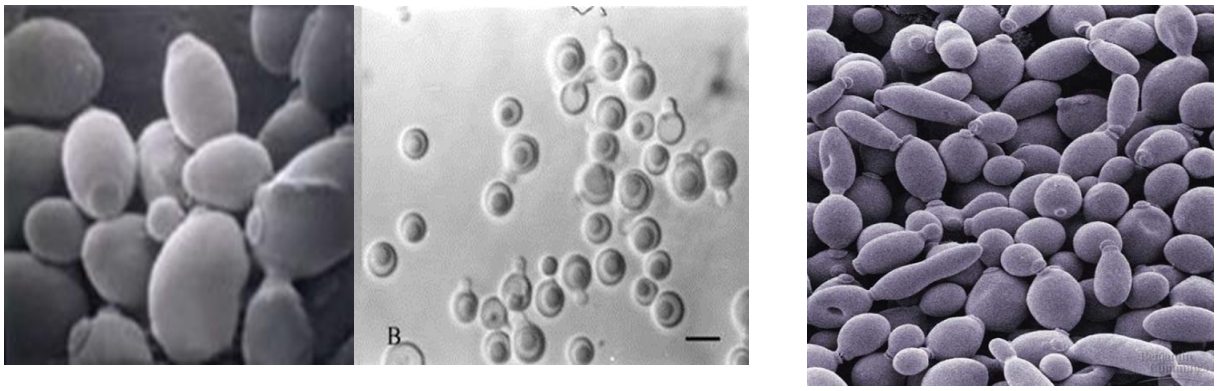


Рис. 5. Дрожжи, вызывающие порчу йогурта:
а – *Torulopsis candida*; б – *Kluyveromyces fragilis*;
в – *Candida crusei*; г – *Saccharomyces cerevisiae*

3. Бомбаж сгущенного молока с сахаром. Такой вид порчи вызывают дрожжи, сбраживающие сахарозу.

4. Прогоркание, осаливание, появление неприятного запаха в жиросодержащих продуктах при их холодильном хранении вызывают дрожжи *Yarrowia lipolytica*, обладающие липолитической активностью (рис. 6).

Рис. 6. Дрожжи *Yarrowia lipolytica*

Задание по теме:

1. Приготовить фиксированные окрашенные препараты чистых культур молочнокислых бактерий. Рассмотреть препараты под микроскопом, используя иммерсионный объектив. Зарисовать микроскопическую картину разных видов молочнокислых бактерий и привести их описание.

2. Приготовить фиксированные окрашенные препараты культурных и «диких» дрожжей. Рассмотреть препараты под микроскопом с объективом 90х и зарисовать микроскопическую картину.

ТЕМА 2. МИКРОБИОЛОГИЯ ЗАКВАСОК

Закваскаами, или стартовыми культурами, называют монокультуры или комбинации культур микроорганизмов, используемые для приготовления ферментированных молочных продуктов, кислосливочного масла и сыров. В качестве заквасок чаще всего используют молочнокислые бактерии; иногда в состав заквасок включают пропионовокислые, уксуснокислые бактерии или бифидобактерии.

Закваски бывают одноштаммовыми, состоящими только из одного штамма микроорганизма, многоштаммовыми, состоящими из нескольких штаммов одного вида микроорганизма, и многовидовыми (смешанными), в состав которых входят несколько штаммов разных видов микроорганизмов. Исключение составляет кефирная закваска, которая готовится на кефирных грибках, представляющих собой естественный симбиоз различных микроорганизмов.

Закваски различают следующим образом:

– маточные (или лабораторные), приготавливаемые на биофабриках;

– материнские (первичные), получаемые при пересеве маточной закваски;

– промежуточные (вторичные), получаемые путем пересева материнской закваски;

– производственные (третичные), которые готовятся на основе материнских или промежуточных заквасок.

Материнскую и иногда промежуточную закваски готовят на стерилизованном молоке, вторичную и третичную закваски – на пастеризованном молоке.

В производственных условиях используют жидкие закваски, получаемые из маточных путем нескольких пересадок. В последние годы находят широкое применение замороженные и сухие закваски прямого внесения, представляющие собой замороженную или высушенную сублимационным методом биомассу молочнокислых и других групп бактерий.

Основные характеристики заквасок для некоторых ферментированных молочных продуктов приведены в прил. 1.

1. Определение пригодности молока для закваски

Молоко, используемое для приготовления заквасок, не должно содержать ингибиторов роста молочнокислых бактерий.

Пригодность молока для заквасок определяют пробами с резазурином или метиленовым синим.

Проба с резазурином. В чистую стерильную пробирку наливают 10 $см^3$ исследуемого молока и закрывают стерильной резиновой пробкой. Одновременно проводят контрольный анализ, для чего в пробирку наливают 10 $см^3$ восстановленного препарата СКИВ.

Пробирки с исследуемым молоком и контрольной пробой нагревают на водяной бане до температуры (87 ± 2) °С и выдерживают 10 мин, затем охлаждают до температуры (47 ± 1) °С. После этого в пробирки стерильной пипеткой вносят 0,3 $см^3$ рабочей тест-культуры (*Streptococcus thermophilus*). Содержимое пробирок тщательно перемешивают трехкратным перевертыванием. Затем пробирки выдерживают в течение 1 ч 15 мин при температуре (46 ± 1) °С в редуктазнике или водяной бане.

По истечении 1 ч 15 мин в пробирки с исследуемым молоком и контрольной пробой вносят по 1 $см^3$ основного раствора резазурина. Содержимое пробирок перемешивают путем двукратного перевертывания. Пробирки снова помещают в редуктазник и выдерживают еще 10 мин при температуре (46 ± 1) °С.

Если молоко пригодно для закваски, содержимое пробирок будет иметь розовый или белый цвет.

Проба с метиленовым синим. Перед проведением анализа готовят смесь следующего состава: 20 $см^3$ водного раствора пептона; 3,5 $см^3$ односуточной культуры термофильного стрептококка и 0,1 $см^3$ водного раствора метиленового синего. Смесь хорошо перемешивают.

В чистую стерильную пробирку наливают 10 $см^3$ исследуемого молока, закрывают (неплотно) стерильной резиновой пробкой. Пробирку с исследуемым молоком нагревают на водяной бане до температуры (87 ± 2) °С с выдержкой 10 мин, затем охлаждают до температуры (43 ± 2) °С. После этого в пробирку стерильной пипеткой вносят 2 $см^3$ приготовленной смеси (описанной выше), перемешивают (пробирку трехкратно перевертывают) и выдерживают на водяной бане при температуре 41–42 °С в течение 2 ч.

Если молоко пригодно для закваски, метиленовый синий обесцвечивается.

2. Проверка эффективности пастеризации молока для закваски

Для приготовления производственной закваски молоко пастеризуют при температуре (95 ± 2) °С с выдержкой (30 ± 5) мин. Во время выдержки молоко должно перемешиваться для равномерного прогрева всей массы. При неправильно проведенной

пастеризации в молоке могут оставаться посторонние микроорганизмы (энтерококки и термоустойчивые молочнокислые палочки).

Эффективность пастеризации молока определяют по методу Королевой следующим образом. После пастеризации отбирают пробы молока в стерильную посуду и выдерживают их в термостате при температуре 40–45 °С в течение 24–48 ч. После этого отмечают характер сгустка в пробах и готовят микроскопические препараты сгустков, окрашивая их метиленовым синим.

В зависимости от результатов исследования можно сделать следующее заключение:

– если сгусток довольно плотный, а в микроскопическом препарате обнаруживается значительное количество кокков, значит, пастеризация проведена при температуре ниже 90 °С, т. е. нарушен температурный режим пастеризации молока для закваски;

– если сгусток слабый, а в микроскопическом препарате обнаруживаются зернистые и незернистые палочки, значит, пастеризация проведена при недостаточной выдержке или молоко плохо перемешивалось;

– если сгусток рваный, произошла пептонизация молока, а в микроскопическом препарате обнаруживается большое количество споровых палочек, значит, пастеризация проведена правильно.

3. Общие правила приготовления заквасок для различных молочных продуктов

Приготовление закваски проводят в боксе при микробиологической лаборатории или в специальных помещениях для приготовления производственной закваски (заквасочных). В помещениях, где готовят закваску, необходимо строго поддерживать чистоту: пол и стены необходимо ежедневно протирать раствором хлорной извести, воздух стерилизовать бактерицидными лампами. Рабочий стол в боксе обрабатывают ватным тампоном, смоченным спиртом.

Лица, готовящие закваску, должны работать в чистой спецодежде и обуви, используемой только для этих целей.

Для приготовления закваски в подготовленное стерилизованное или пастеризованное молоко вносят от 0,5 до 3 % посевного материала от массы заквашиваемого молока.

4. Контроль качества заквасок

Качество закваски проверяют ежедневно по ее активности, содержанию продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, а также по микробиологическим и органолептическим показателям (рис. 7).

Активность закваски определяют по продолжительности сквашивания пастеризованного молока при внесении в него 5 % закваски. Для закваски на основе молочнокислых стрептококков продолжительность сквашивания молока не должна превышать 7 ч, а для закваски на основе молочнокислых палочек – 6 ч.

Контроль по микробиологическим показателям включает в себя микроскопию препарата закваски, определение наличия бактерий группы кишечной палочки (БГКП), споровых бактерий и бактериофага.

Контроль закваски по микроскопическому препарату проводят ежедневно, при этом просматривают не менее 10 полей зрения, проверяя чистоту закваски и соотношение между ее компонентами. Если возникает сомнение в микробиологической чистоте закваски, а при микроскопировании не удается обнаружить посторонних микроорганизмов, делают посев первых четырех–пяти разведений закваски в стерильное молоко и после инкубации просматривают микроскопические препараты сгустков.

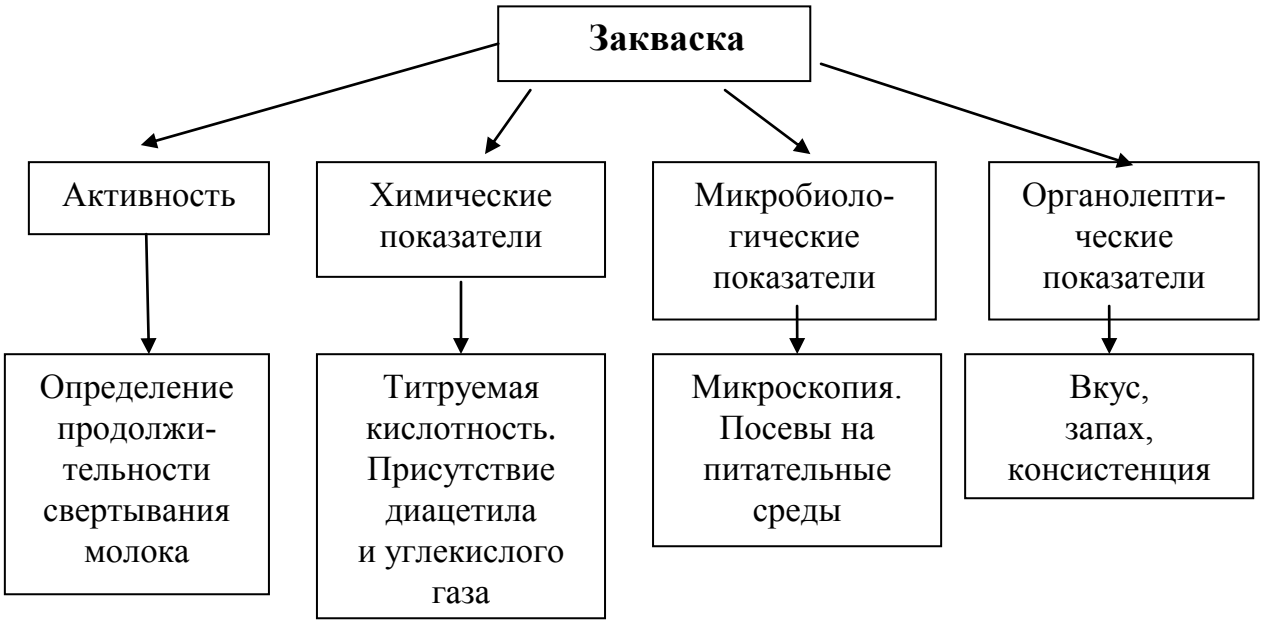


Рис. 7. Контроль качества заквасок

Наличие БГКП в закваске устанавливают путем посева ее в среду Кесслера. Они должны отсутствовать в 3 $см^3$ закваски для кефира и в 10 $см^3$ закваски для остальных продуктов.

Присутствие споровых бактерий определяют следующим образом. В две пробирки со стерильным молоком заливают по 1 $см^3$ закваски (в одну пробирку добавляют кусочек парафина) и прогревают их на водяной бане при температуре 85 °С с выдержкой 10 мин. Затем пробирки охлаждают и выдерживают в термостате при температуре 30 °С в течение двух суток. При развитии споровых анаэробных бактерий парафиновая пробка поднимается.

В молоке при развитии споровых аэробных и анаэробных бактерий может наблюдаться пептонизация, в микроскопическом препарате видны утолщенные палочки, иногда со спорами.

Для определения присутствия бактериофага к 10 $см^3$ стерильного обезжиренного молока добавляют 0,5 $см^3$ рабочего раствора метиленового синего и одну каплю закваски. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и выдерживают при температуре 37 °С, наблюдая за восстановлением индикатора. Если после восстановления метиленового синего снова будет наблюдаться посинение молока (через 4–5 ч), то это указывает на наличие в закваске бактериофага.

К химическим показателям относятся титруемая кислотность, присутствие в закваске CO_2 и диацетила. Титруемую кислотность закваски определяют стандартным методом: в колбочку на 100 $см^3$ вносят 10 $см^3$ закваски, 20 $см^3$ дистиллированной воды, три капли фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором NaOH до появления розового окрашивания. Если кислотность закваски мезофильных стрептококков превышает допустимую (90 °Т), то ее следует проверить на наличие термоустойчивых молочнокислых палочек – возбудителей порока молочных продуктов «излишняя кислотность».

Углекислота и четырехуглеродные соединения являются продуктами жизнедеятельности ароматобразующих бактерий *Lac. diacetylactis* и лейконостоков. Присутствие в закваске этих веществ свидетельствует о нормальном развитии ароматобразующих культур.

Определение диоксида углерода. Производственную закваску хорошо перемешивают, отбирают 20 $см^3$ в пробирку диаметром 15 мм и, отметив уровень закваски, ставят пробирку в водяную баню с холодной водой. Воду нагревают до 90 °С и, не вынимая пробирки из

воды, отмечают уровень поднятия сгустка. Если закваска содержит углекислоту, то сгусток становится губчатым и приподнимается над сывороткой на 0,6–3 см и более. При отсутствии углекислоты сгусток совсем не поднимается или даже опускается на дно.

Определение наличия диацетила с ацетоином. Закваску перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. К трем каплям фильтрата прибавляют три капли 40 %-го раствора КОН и тщательно перемешивают. Отмечают время появления розового окрашивания. Если окрашивание появилось до истечения 10 мин, то считают, что в закваске присутствует диацетил.

Органолептические показатели. Качество каждой партии закваски перед выдачей в цех оценивают по органолептическим показателям: вкусу и запаху, характеру сгустка и консистенции закваски. Закваска должна иметь ровный плотный сгусток, требуемую для данного продукта консистенцию, чистый кисломолочный вкус и выраженный аромат.

5. Приготовление закваски для кефира

Для производства кефира используется закваска, приготовленная на кефирных грибках. В состав микрофлоры кефирных грибков входят следующие группы микроорганизмов:

– молочнокислые и ароматобразующие лактококки;

– гомо- и гетероферментативные молочнокислые палочки;

– лейконостоки;

– дрожжи;

– уксуснокислые бактерии.

Для ознакомления с микрофлорой кефирного грибка кусочек его тщательно растирают между двумя предметными стеклами. Препарат фиксируют в пламени горелки и окрашивают метиленовым синим. В препарате преобладают палочки стромы грибка, видны скопления дрожжевых клеток, кокки встречаются редко (рис. 8, а).

В препарате грибковой закваски преобладают мезофильные молочнокислые стрептококки, часто встречаются скопления дрожжей, в каждом поле зрения имеются короткие молочнокислые палочки (см. рис. 8, б).

В микроскопическом препарате производственной кефирной закваски преобладают диплококки и короткие цепочки кокков,

палочки встречаются реже, чем в грибковой закваске, дрожжи обнаруживаются не в каждом поле зрения (см. рис. 8, в).

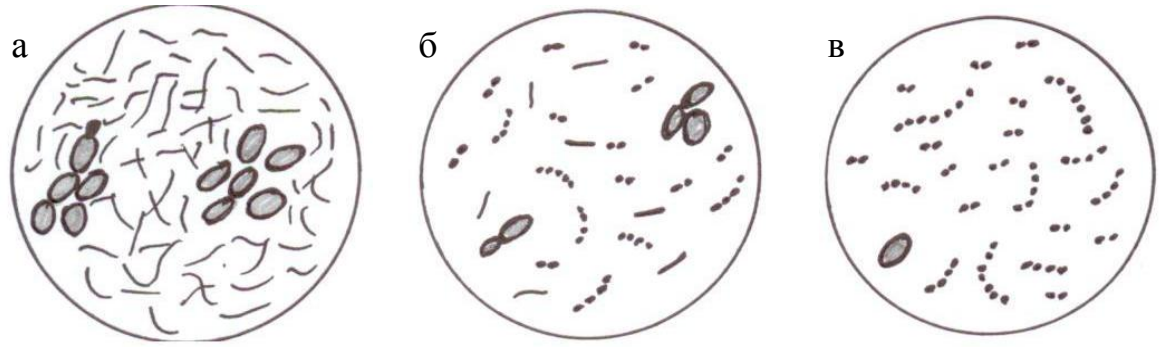


Рис. 8. Микроскопическая картина:
а – стромы кефирного грибка; б – грибковой закваски;
в – кефирной производственной закваски

Задание по теме:

1. Определить пригодность молока для закваски.
2. Провести проверку эффективности пастеризации молока для закваски.
3. Приготовить закваску для какого-нибудь молочного продукта, пользуясь табл. 1, приведенный в разд. 3.
4. Исследовать приготовленную закваску, пользуясь схемой контроля заквасок (см. рис. 7). Полученные данные представить в виде таблицы. Дать заключение о пригодности закваски для использования в производстве.
5. Приготовить микроскопические препараты кефирного грибка, грибковой и производственной закваски, рассмотреть их под микроскопом и зарисовать. Указать, какие группы микроорганизмов преобладают, а какие из них встречаются редко.

ТЕМА 3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРОГО МОЛОКА

1. Отбор проб молока

Пробы для микробиологического исследования отбирают в стерильную посуду с помощью стерильных приспособлений. Объединенную пробу объемом 500 $см^3$ составляют из точечных проб, отобранных из каждой фляги или цистерны после органолептической оценки молока и рассортировки его по кислотности.

2. Проба на редуктазу

Редуктазная проба является косвенным методом определения количества бактерий в молоке. Метод основан на восстановлении индикатора (метиленового синего или резазурина) окислительно-восстановительными ферментами микроорганизмов, выделяемыми в молоко. По продолжительности изменения окраски молока оценивают степень его контаминации посторонними микроорганизмами.

Редуктазная проба с метиленовым синим

В стерильную большую пробирку наливают 1 $см^3$ рабочего раствора метиленового синего и 20 $см^3$ исследуемого молока. Пробирку закрывают резиновой пробкой и ее содержимое смешивают путем медленного трехкратного переворачивания пробирки. Пробирку помещают в редуктазник или водяную баню с температурой воды (37 ± 1) °С. Вода в редуктазнике или водяной бане после погружения пробирки с молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше. Момент погружения пробирок в редуктазник считают началом анализа. Наблюдение за изменением окраски ведут через 40 мин; 2,5 и 3,5 ч с начала проведения анализа. Окончанием анализа считают момент обесцвечивания окраски молока, при этом остающийся небольшой кольцеобразный окрашенный слой вверху (шириной не более 1 см) или небольшая окрашенная часть внизу пробирки (высотой не более 1 см) в расчет не принимаются. Появление окрашивания молока в этих пробирках при встряхивании не учитывают (табл. 1).

Редуктазная проба с резазурином

Пробу с резазурином следует проводить не ранее чем через 2 ч после доения.

В пробирку наливают 1 $см^3$ рабочего раствора резазурина и 10 $см^3$ исследуемого молока, закрывают резиновой пробкой и смешивают путем медленного трехкратного перевертывания пробирки. Дальнейшая последовательность анализа такая же, как и в пробе с метиленовым синим. Пробирка с молоком и резазурином на протяжении анализа должна быть защищена от прямых солнечных лучей (редуктазник следует плотно закрыть крышкой).

Наблюдение за изменением окраски проводят через 1 и 1,5 ч. По истечении 1 ч пробирку вынимают из редуктазника. Если молоко имеет серо-сиреневую окраску, пробирку оставляют в редуктазнике еще на 30 мин.

Таблица 1

Оценка степени обсемененности молока микроорганизмами по продолжительности изменения окраски молока с метиленовым синим или резазурином

Класс	Проба с метиленовым синим	Проба с резазурином		Ориентировочное количество бактерий в 1 $см^3$ молока, КОЕ
	Продолжительность обесцвечивания метиленового синего, ч	Продолжительность изменения, цвета ч	Окраска молока	
Высший	Более 3,5	1,5	Серо-сиреневая до сиреневой	До 300 тыс.
I	3,5	1,0	То же	От 300 до 500 тыс.
II	2,5	1,0	Сиреневая с розовым оттенком	От 500 тыс. до 4 млн
III	40 мин	1,0	Бледно-розовая или белая	От 4 до 20 млн

В зависимости от продолжительности изменения цвета молоко относят к одному их четырех классов, указанных в табл. 1.

3. Определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

Метод основан на способности мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов размножаться на плотном питательном агаре при температуре (30 ± 1) °С в течение 72 ч. Количество засеваемого продукта устанавливают с учетом наиболее вероятного микробного обсеменения.

При исследовании сырого молока в питательную среду засевают его разведения от 10^{-4} до 10^{-6} см^3. По 1 см^3 каждого разведения засевают в две чашки Петри с заранее маркированной крышкой и заливают 10–15 см^3 расплавленного и остуженного до 40–45 °С мясопептонного агара (МПА). Сразу после заливки агара содержимое чашки Петри тщательно перемешивают путем легкого покачивания для равномерного распределения посевного материала. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и ставят в таком виде в термостат с температурой (30 ± 1) °С на 72 ч.

Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке, поместив ее вверх дном на темном фоне, пользуясь лупой с увеличением в 4–10 раз. При большом числе колоний и равномерном их распределении в питательном агаре дно чашки Петри делят на четыре и более одинаковых секторов, подсчитывают число колоний в двух–трех секторах, но не менее чем на 1/3 поверхности чашки, находят среднее арифметическое число колоний и умножают на общее количество секторов всей чашки.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 см^3 молока X вычисляют по формуле

$$X = n \cdot 10^m,$$

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри; m – число десятикратных разведений.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое, полученное по всем чашкам.

4. Определение бактерий группы кишечных палочек

В настоящее время к БГКП относят следующие роды из семейства *Enterobacteriaceae: Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella, Serratia.*

Бактерии группы кишечных палочек представляют собой мелкие грамотрицательные палочки, в основном подвижные (кроме бактерий рода *Klebsiella*), не образующие эндоспор и капсул. Они не обладают оксидазной активностью, ферментируют лактозу и глюкозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 ºС. Исследование на присутствие БГКП в молочных продуктах проводят в несколько этапов.

Определение бродильного титра. Метод основан на способности БГКП сбраживать в питательной среде лактозу с образованием кислоты и газа при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. В молочной промышленности для определения бродильного титра используют среду Кесслера, в которую в качестве углевода вносят лактозу; в качестве вещества, ингибирующего рост других групп бактерий, – бычью желчь, а в качестве индикатора – генцианвиолет.

Бродильный титр в сыром молоке определяют следующим образом. В пять пробирок со средой Кесслера вносят по 1 $см^3$ соответствующего разведения молока (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}) и ставят их в термостат при температуре (37 ± 1) ºС на 18–24 ч. По окончании инкубации пробирки просматривают. При отсутствии газообразования в поплавке в пробирке с наименьшим из засеваемых объемов дают заключение об отсутствии в продукте БГКП. При наличии газообразования в поплавке в пробирке с наименьшим из засеваемых объемов считается, что БГКП обнаружены в этом количестве.

Пересев БГКП на среду Эндо. Для подтверждения принадлежности бактерий, вызвавших брожение в среде Кесслера, материал из забродивших пробирок пересевают на среду Эндо. С этой целью дно чашки Петри с застывшей средой Эндо делят карандашом по стеклу на 4 или 8 секторов. Из пробирок со средой Кесслера берут петлей немного жидкости и проводят ею расширяющимся зигзагом штрих по поверхности агара, начиная от центра сектора к краю чашки. Для получения изолированных колоний петлю не отрывают от поверхности агара. Чашки Петри переворачивают вверх дном и ставят в термостат при температуре (37 ± 1) °С. После 24 ч инкубации определяют характер выросших колоний. На среде Эндо БГКП образуют блестящие красные или розовые колонии с металлическим блеском или без него.

Окрашивание препаратов из характерных колоний по Граму. Не менее чем из пяти колоний готовят мазки и окрашивают их по Граму. Бактерии группы кишечных палочек – грамотрицательные, неспорообразующие.

Микробиологические показатели сырого молока приведены в табл. 1 прил. 2.

5. Групповой количественный учет микроорганизмов в сыром молоке

В целях детального исследования микрофлоры сырого молока проводят определение основных групп микроорганизмов, наиболее часто встречающихся в молоке. При этом для учета отдельных групп микроорганизмов используют различные элективные питательные среды или особые условия культивирования.

Количественный учет молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии, размножаясь в сыром молоке, накапливают молочную кислоту, что приводит к повышению титруемой кислотности молока и ухудшению его технологических свойств. Для определения количества молочнокислых бактерий делают посев разведений сырого молока в чашки Петри, в которые перед стерилизацией вносят по 0,5 г тонко измельченного мела. После этого чашки заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50 °С агаром с гидролизованным молоком. После застывания агара чашки переворачивают вверх дном и ставят в термостат с температурой (35 ± 1) °С на 36–48 ч. После инкубации подсчитывают количество колоний молочнокислых бактерий по зонам просветления вокруг них, которые появляются за счет образования растворимого лактата кальция.

Количественный учет протеолитических бактерий

Протеолитические бактерии разлагают белки молока с образованием пептонов и пептидов, поэтому присутствие их в молоке и молочных продуктах крайне нежелательно. Они вызывают появление в молочных продуктах горького вкуса.

Метод определения протеолитических бактерий основан на их способности расщеплять белки под действием протеолитических ферментов. Для определения количества протеолитических бактерий производят посев по 1 $см^3$ каждого из выбранных разведений молока в стерильные чашки Петри, которые затем заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50 °С молочным агаром.

После застывания агара чашки с посевами выдерживают в термостате при температуре (30 ± 1) °С в течение 36–48 ч, а затем подсчитывают количество колоний протеолитических бактерий по зонам просветления вокруг них, образующихся вследствие разложения молочного белка.

К наиболее распространенным протеолитическим бактериям относятся псевдомонады, палочки протея, большинство спорообразующих бактерий.

Количественный учет маслянокислых бактерий

Маслянокислые бактерии при развитии в молочных продуктах вызывают такие пороки, как вспучивание, неприятный вкус и запах (вследствие накопления масляной и уксусной кислот и CO_2).

Учет маслянокислых бактерий производят методом предельных разведений, высевая разведения исследуемого продукта в пробирки со стерильным молоком и парафином. После посева пробирки нагревают в водяной бане при температуре 85 °С в течение 10 мин, охлаждают до 30 °С и выдерживают в термостате при температуре 30 °С в течение трех суток.

Наличие маслянокислых бактерий определяют по трем признакам:

– образованию газа;

– запаху масляной кислоты;

– наличию в микроскопическом препарате спорообразующих бактерий, имеющих форму барабанных палочек и дающих положительную реакцию на гранулезу (запасное крахмалоподобное вещество).

Для обнаружения гранулезы каплю взвеси исследуемых микробов наносят на предметное стекло, смешивают с каплей раствора Люголя и накрывают покровным стеклом. Гранулеза, содержащаяся в клетках, окрашивается йодом в синий цвет.

Определение основных групп микроорганизмов, наиболее часто встречающихся в сыром молоке, приведено в табл. 2.

Таблица 2

Определение основных групп микроорганизмов в сыром молоке

Определяемый показатель	Метод исследования	Используемая питательная среда	Засеваемое разведение молока	Количество чашек (или пробирок)	Результат исследования
Количество бактерий:					
молочно-кислых	Чашечный	Агар с гидролизованным молоком и мелом	4 5 6	1 1 1	
протеолитических	Чашечный	Молочный агар	2 3 4	1 1 1	
масляно-кислых	Предельных разведений	Стерильное молоко с добавлением парафина	1 2 3 4	2 2 2 2	
липолитических	Чашечный	Питательный агар с говяжьим жиром	1 2 3	1 1 1	
Количество дрожжей и плесеней	Чашечный	Сусло-агар или среда Сабуро	0 1 2	1 1 1	

Количественный учет липолитических бактерий

Липолитическими называют микроорганизмы, способные разлагать жир, что приводит к появлению различных пороков вкуса и запаха молочных продуктов. Липолитически активными являются некоторые виды бактерий (чаще всего псевдомонады), дрожжи, плесневые грибы.

Для определения липолитических бактерий на дно чашки Петри заливают стерильный расплавленный говяжий жир и тут же его сливают. На дне остается тонкий слой застывшего жира. В эту же чашку Петри вносят 1 $см^3$ исследуемого разведения молока и заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50 °С пита-

тельным агаром. После застывания агара чашки с посевами выдерживают при комнатной температуре (20 ± 2) °С в течение пяти–шести суток. Подсчитывают количество колоний липолитических микроорганизмов, вокруг которых образовались белые зоны.

Количественный учет дрожжей и плесеней

Учет дрожжей и плесеней в молоке производят посевом соответствующих разведений молока в чашки Петри, которые затем заливают расплавленным и остуженным до температуры 45–50 °С суслом-агаром или средой Сабуро. Чашки выдерживают в термостате при температуре (30 ± 2) °С в течение трех суток. Подсчитывают отдельно количество колоний дрожжей и колоний плесеней.

Задание по теме:

1. Определить бактериальную обсемененность сырого молока по редуктазной пробе.
2. Определить КМАФАнМ и БГКП в сыром молоке.
3. Провести групповой анализ микрофлоры сырого молока путем посева его разведений на различные питательные среды для учета количества молочнокислых, протеолитических, липолитических, маслянокислых бактерий, дрожжей и плесеней.

ТЕМА 4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПИТЬЕВОГО МОЛОКА

1. Микробиологический контроль пастеризованного молока

В питьевом молоке и сливках выборочно от одной–двух партий не реже одного раза в пять дней определяют общее количество бактерий и наличие БГКП.

Отбор проб. Пастеризованное молоко во флягах после тщательного перемешивания стерильной мутовкой отбирают черпаком в количестве 50–60 $см^3$ в стерильную посуду с пробкой. Продукты, расфасованные в потребительскую тару, отбирают по одному–два образца от партии. Кончик пакета протирают ватой, смоченной спиртом, и отрезают ножницами, предварительно профламбирован-

ными в пламени спиртовки. При контроле молока из секции охлаждения пастеризатора обжигают пробный кран и наливают молоко в стерильную посуду с пробкой.

Контроль эффективности пастеризации. Эффективность пастеризации молока и сливок контролируют вне зависимости от качества готового продукта не реже одного раза в декаду. Для этого 10 $см^3$ молока, отобранного после секции охлаждения, засевают в 50 $см^3$ среды Кесслера. Бактерии группы кишечной палочки не должны обнаруживаться в указанном объеме молока, проба на фосфатазу должна быть отрицательной. Общее количество бактерий в 1 $см^3$ молока, отобранного после секции охлаждения пастеризатора, не должно превышать 10 тыс.

Определение КМАФАнМ и БГКП. В отобранных пробах молока определяют КМАФАнМ (см. подразд. 3 темы 3). Для посева готовят разведения продукта от 10^{-1} до 10^{-5} $см^3$.

Для определения БГКП делают посев одного, двух и трех разведений продукта в среду Кесслера (см. подразд. 4 темы 3). Микробиологические показатели молока и сливок пастеризованных приведены в табл. 1 прил. 2.

2. Микробиологический контроль стерилизованного молока

Для контроля стерилизованного в потоке молока отбирают для исследования по одному пакету через каждый час работы с каждого фасовочного автомата. Контроль готовой продукции осуществляют не реже двух раз в неделю. Отобранные образцы должны соответствовать требованиям *промышленной стерильности*.

Для определения промышленной стерильности отобранные упаковки со стерилизованным молоком выдерживают при температуре 37 °С в течение трех суток, а со сливками – в течение пяти суток. После термостатной выдержки проводят осмотр образцов продукта. При наличии вздутия упаковки или изменения внешнего вида молока в бутылках (наличия сгустка, отстоя сыворотки, наличия хлопьев молока и др.) упаковки считают неотвечающими требованиям промышленной стерильности. Упаковки без внешних дефектов вскрывают, стерилизованное молоко и сливки анализируют органолептически.

Продукт отвечает требованиям промышленной стерильности, если не установлено изменений консистенции и вкуса, кислотность молока увеличилась не более чем на 2 °Т, в микроскопическом препарате отсутствуют клетки бактерий, а общее количество микроорганизмов в 1 $см^3$ не превышает 10 (см. табл. 1 прил. 2).

Задание по теме:

1. Определить бродильный титр пастеризованного молока.
2. Определить КМАФАнМ пастеризованного молока.
3. Определить промышленную стерильность стерилизованного молока.

ТЕМА 5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

1. Микробиологический контроль кисломолочных напитков

Обор проб для исследования кисломолочных напитков производится так же, как и при исследовании пастеризованного молока: после розлива отбирают по одному–два образца в упаковке от партии.

Готовую продукцию контролируют на наличие бактерий группы кишечных палочек и по микроскопическому препарату не реже одного раза в пять дней.

Для определения наличия БГКП кисломолочные продукты предварительно нейтрализуют. Для этого отбирают стерильной пипеткой 10 $см^3$ исследуемого продукта в стерильную колбочку и добавляют 1 $см^3$ 10 %-го раствора двууглекислого натрия. Содержимое колбочки перемешивают и засевают в три пробирки со средой Кесслера по 1 $см^3$ самого продукта, а также его первого и второго разведений. Для контроля состава микрофлоры готовых кисломолочных напитков просматривают микроскопические препараты, окрашенные метиленовым синим.

В поле зрения препарата, приготовленного из йогурта, ряженки, простокваши «Мечниковской», «Южной», «Болгарской», должны находиться цепочки кокков и длинные тонкие палочки; из ацидофильно-дрожжевого молока – ацидофильные палочки и дрожжи; из кефира – стрептококки, короткие палочки, изредка единичные дрожжевые клетки и т. д.

Микробиологические показатели кисломолочных напитков приведены в табл. 2 прил. 2.

2. Микробиологический контроль творога

При отборе творога из крупной тары (бочек, фляг) верхний слой продукта зачищают. Пробу отбирают стерильным щупом на расстоянии 3–5 см от края, направляя щуп к противоположной стороне и опуская примерно на 3/4 его длины. Из столбика творога на щупе отбирают стерильным шпателем 15–20 г творога и помещают в стерильную посуду, которую закрывают стерильной пробкой. От расфасованных продуктов отбирают один–два образца в упаковке.

Для микробиологического анализа отвешивают 10 г продукта на стерильном часовом стекле (или чашке Петри) и тщательно растирают его в стерильной или профламбированной ступке. К навеске добавляют 90 $см^3$ стерильного физиологического раствора, подогретого до 40–45 °С, и получают разведение продукта 1:10, из которого готовят все последующие разведения.

Готовый творог анализируют на присутствие БГКП в определенной массе и просматривают микроскопический препарат. Бактерии группы кишечной палочки определяют посевом по 1 $см^3$ разведений продукта от 10^{-1} до 10^{-5} в пробирки со средой Кесслера. Пробирки с посевами выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 18–24 ч, после чего их просматривают и определяют бродильный титр по наличию газообразования в поплавках.

В микроскопическом препарате творога должны обнаруживаться молочнокислые стрептококки. Обнаруженные в препарате дрожжи, палочки, молочная плесень являются посторонними микроорганизмами.

Микробиологические показатели творога приведены в табл. 3 прил. 2.

3. Микробиологический контроль сметаны

Отбор пробы производится в стерильную посуду после тщательного перемешивания из двух–трех мест партии при крупной расфасовке (фляги, бочки), а при мелкой расфасовке отбирают два образца от партии.

Сметану нейтрализуют добавлением 10 %-го раствора двууглекислого натрия до pH 6,5–6,8, а затем готовят десятикратные

разведения продукта от 10^{-1} до 10^{-4} см^3 для определения БГКП. С этой целью делают посев по 1 см^3 указанных разведений сметаны в четыре пробирки со средой Кесслера. Бактерии группы кишечной палочки не должны обнаруживаться в 0,01–0,001 см^3 продукта (см. табл. 2 прил. 2).

В сметане со сроком годности более 72 ч определяют количество дрожжей и плесеней путем посева 1 г продукта и его первого разведения в чашки Петри с суслом-агаром или средой Сабуро.

При просмотре микроскопических препаратов сметаны в поле зрения должны находиться молочнокислые стрептококки (в препаратах бифидосметаны – дополнительно единичные клетки бифидобактерий). Наличие посторонних микроорганизмов (термоустойчивых молочнокислых палочек, дрожжей, молочной плесени) свидетельствует о низком санитарно-гигиеническом уровне производства.

Задание по теме:

1. Сделать посевы сметаны для определения бродильного титра и количества дрожжей и плесеней.

2. Приготовить и просмотреть микроскопические препараты предложенных кисломолочных продуктов, зарисовать микроскопическую картину.

ТЕМА 6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЛИВОЧНОГО МАСЛА

Отбор пробы масла. Образец масла в транспортной таре отбирают стерильным щупом, предварительно сняв верхний слой, на расстоянии 3–5 см от края, направляя щуп к противоположной стороне и опуская на 3/4 его длины. Из столбика масла на щупе отбирают стерильным шпателем 15–20 г масла и помещают в стерильную посуду. Оставшийся после отбора пробы столбик масла на щупе возвращают на прежнее место, а поверхность масла аккуратно заделывают.

От партии масла в потребительской таре отбирают для анализа стерильным шпателем 15–20 г, включая поверхностный слой. Отобранную пробу помещают в стерильную посуду, которую закрывают стерильной пробкой.

Подготовка пробы к анализу. Перед исследованием пробу масла расплавляют на водяной бане при температуре 40–45 °С и перемешивают для получения однородной эмульсии. Из полученной эмульсии стерильной пипеткой берут 1 $см^3$ и вносят в пробирку с 9 $см^3$ стерильного физиологического раствора, подогретого до 40 °С. Из полученного таким образом первого разведения готовят второе разведение.

В кислосливочном масле два раза в месяц определяют наличие БГКП, патогенных бактерий, протеолитических бактерий, дрожжей и плесеней, а в сладкосливочном, кроме того, общее количество микроорганизмов (КМАФАнМ). При необходимости определяют количество липолитических бактерий.

Бродильный титр определяют посевом 1 $см^3$ продукта и его 10^{-1} и 10^{-2} разведений в пробирки со средой Кесслера.

Количество протеолитических бактерий определяют посевом на молочный агар по 1 $см^3$ разведений от 10^{-1} до 10^{-4} для сладкосливочного масла и от 10^{-1} до 10^{-3} для кислосливочного масла. Чашки с посевами помещают в термостат при температуре (30 ± 1) °С и инкубируют в течение 24 ч. Протеолитические бактерии учитывают по зонам просветления вокруг колоний, которые образуются в результате разложения белка этими микроорганизмами.

Количество дрожжей и плесеней определяют посевом в чашки Петри от 10^{-1} до 10^{-2} разведений масла, которые затем заливают суслом-агаром.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в сладкосливочном масле определяют посевом в чашки Петри с МПА 10^{-2} –10^{-4} разведений сливочного масла, кроме кислосливочного.

Задание по теме:

1. Расплавить сливочное масло на водяной бане и приготовить разведения от 10^{-1} до 10^{-5}.

2. Для определения КМАФАнМ засеять в чашки Петри по 1 $см^3$ 10^{-2}, 10^{-3} и 10^{-4} разведений масла и залить чашки расплавленным и остуженным до температуры 45 °С МПА.

3. Для определения количества дрожжей и плесеней засеять в чашки Петри первое и второе разведения масла и залить чашки суслом-агаром.

4. Для определения количества протеолитических бактерий засеять в чашки первое и второе разведения масла и залить чашки молочным агаром.

5. Для определения БГКП засеять 1 $см^3$ продукта и его первое и второе разведения в пробирки со средой Кесслера.

6. Руководствуясь данными, приведенными в табл. 4 прил. 2, определить соответствие исследуемого масла нормативным показателям.

ТЕМА 7. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В СЫРОДЕЛИИ

При контроле процесса производства сыра исследуют сырое молоко, предназначенное для выработки сыра, закваску, сычужный фермент, пастеризованное молоко и сыр.

В сыром молоке, поступающем на сыродельные заводы, кроме редуктазной пробы (см. подразд. 2 темы 3) и наличия ингибирующих веществ, один раз в 10 дней определяют общее число спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий и сычужно-бродильную пробу.

В пастеризованной смеси молока из сырной ванны или сыроизготовителя не реже одного раза в 10 дней определяют общее число спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий и БГКП. Споры указанных бактерий не должны обнаруживаться в 0,1 $см^3$; БГКП должны отсутствовать в 3 $см^3$ молока.

1. Исследование качества сырого молока, используемого для производства сыра

Сычужно-бродильная проба. Метод основан на способности некоторых микроорганизмов свертывать молоко в присутствии сычужного фермента. По характеру образовавшегося сгустка оценивают качество молока на его пригодность для изготовления сыра.

Чисто вымытые и высушенные широкие пробирки ополаскивают исследуемым молоком и наливают в них около 30 $см^3$ молока, затем в каждую пробирку вносят по 1 $см^3$ раствора сычужного

фермента, хорошо перемешивают и ставят на 12 ч в термостат при температуре (38 ± 1) °С. По истечении 12 ч пробы осматривают и относят молоко к одному из трех классов (табл. 3).

Таблица 3

Оценка качества молока по сычужно-бродильной пробе

Класс	Оценка качества молока	Характеристика сгустка
I	Хорошее	Сгусток с гладкой поверхностью, упругий на ощупь, без глазков на продольном разрезе, плавает в прозрачной сыворотке, которая не тянется и не горькая на вкус
II	Удовлетвори-тельное	Сгусток мягкий на ощупь, с единичными глазками (1–10), разорван, но не вспучен
III	Плохое	Сгусток с многочисленными глазками, губчатый, мягкий на ощупь, вспучен, всплыл кверху или вместо сгустка образуется хлопьевидная масса

Для производства сыра не допускается сырое молоко III класса по редуктазной пробе и III класса по сычужно-бродильной пробе.

Определение количества спор мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий. Готовят различные разведения сырого молока (или сыра), прогревают их при температуре (75 ± 1) ºС в течение 30 мин и высевают по 1 $см^3$ каждого из разведений, как минимум, в две пробирки со средой СДА (среда для анаэробов, прил. 3, п. 3.). После застывания питательной среды ее поверхность заливают слоем водного агара высотой 15–20 мм. Посевы выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) ºС в течение трех суток. Рост мезофильных анаэробных спорообразующих бактерий в посевах определяют по образованию разрывов столбика агара и изменению цвета питательной среды с красного на соломенно-желтый. Образование в среде желтых пятен или точек также указывает на наличие лактатсбраживающих анаэробных бактерий.

2. Микробиологический анализ готового сыра

Отбор проб. Поверхность сыра в месте взятия пробы протирают ватой, смоченной этиловым спиртом, спирт зажигают. Стерильный щуп вводят наклонно в середину головки на 3/4 его длины. Из столбика сыра на щупе отбирают стерильным шпателем 15–20 г сыра и помещают в стерильную посуду с пробкой. Верхнюю часть столбика сыра на щупе возвращают на прежнее место, поверхность сыра заливают парафином или оплавляют нагретой металлической пластинкой.

Подготовка проб к анализу. Из взятого образца отвешивают 10 г на стерильном часовом стекле (чашке Петри, бюксе), переносят в стерильную или профламбированную ступку и тщательно растирают с небольшим количеством стерильной воды, добавляя стерильную воду, подогретую до 40–45 ºС с таким расчетом, чтобы общий объем жидкости составил 90 $см^3$.

Содержимое ступки перемешивают и дополнительно растирают в течение 3–5 мин до получения тонкой суспензии. Суспензию (разведение сыра 10^{-1}) переносят в колбу и закрывают стерильной пробкой. Из первого разведения готовят все последующие разведения, тщательно перемешивая суспензию.

В сыре один раз в декаду после прессования, а также в процессе созревания определяют бродильный титр, количество маслянокислых бактерий и дрожжей.

Для определения бродильного титра готовят разведения сыра от 10^{-1} до 10^{-4} и засевают их по 1 $см^3$ в пробирки со средой Кесслера.

Для определения количества маслянокислых бактерий засевают по 1 $см^3$ первого, второго и третьего разведений сыра в пробирки с расплавленной средой СДА. После инкубации в течение 36–48 ч при температуре (30 ± 1) ºС подсчитывают количество выросших в пробирках колоний.

Для определения количества дрожжей и плесеней делают посев по 1 $см^3$ разведений сыра от 10^{-1} до 10^{-4} в чашки Петри с суслом-агаром.

Бактерии группы кишечных палочек должны отсутствовать в 0,001 г доброкачественного сыра, содержание спор маслянокислых бактерий не должно превышать 100 в 1 г сыра (табл. 5 прил. 2).

Задание по теме:

1. Определить качество сырого молока по сычужно-бродильной пробе.

2. Приготовить навеску сыра и его разведения.

3. В пробе исследуемого сыра определить бродильный титр, количество маслянокислых бактерий, дрожжей и плесеней.

ТЕМА 8. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОЧНЫХ КОНСЕРВОВ

1. Микробиологический контроль сгущенного молока с сахаром

Отбор пробы и подготовка к анализу. От каждой партии отбирают по две банки (одну банку до закатки, другую – после). Если продукт расфасован во фляги, то образцы отбирают из одной фляги от каждой партии.

Банки со сгущенным молоком тщательно промывают щеткой в теплой воде и протирают. Перед вскрытием крышку банки тщательно фламбируют пламенем тампона из ваты, смоченного спиртом.

Банки открывают стерильным консервным ножом. Отверстие банки немедленно закрывают стерильным пергаментом или стерильной крышкой чашки Петри. Из банки после перемешивания стерильной ложкой берут образец массой около 15 г и помещают в стерильную сухую колбу. Для анализа берут навеску массой 10 г, к которой добавляют 90 $см^3$ стерильного физиологического раствора, подогретого до 40–45 °С, и взбалтывают в течение 3–5 мин. Из приготовленного таким образом первого разведения готовят все последующие.

Ход анализа. В сгущенном молоке с сахаром определяют:

– количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в 1 $см^3$ продукта – посевом 10^{-1}–10^{-3} разведений на МПА;

– количество протеолитических бактерий – посевом 10^{-1}–10^{-2} разведений на молочный агар;

– количество дрожжей и плесеней – посевом 1 $см^3$ продукта и его первого разведения на сусло-агар;

– наличие бактерий группы кишечной палочки – посевом 1 $см^3$ продукта и его первого разведения в пробирки со средой Кесслера.

Бактерии группы кишечной палочки должны отсутствовать в 1,0 г доброкачественного сгущенного молока с сахаром; КМАФАнМ не должно превышать $2 \cdot 10^4$ КОЕ/г (табл. 6 прил. 2).

2. Микробиологический контроль сухих молочных продуктов

Отбор проб и подготовка к анализу. Из бочки или мешка стерильной ложкой берут из разных мест образец сухого молока массой около 50 г и помещают в стерильную сухую тару, плотно закрывающуюся пробкой или крышкой. Если продукт расфасован в банки или коробки, от каждой партии отбирают два образца в оригинальной упаковке. Из отобранного образца после тщательного перемешивания берут стерильной ложкой навеску массой 10 г и помещают в сухую стерильную колбу. К навеске добавляют 90 $см^3$ стерильного физиологического раствора, подогретого до 40–45 °С, и взбалтывают в течение 3–5 мин. Из полученного первого разведения готовят все последующие.

Ход анализа. В сухих молочных продуктах определяют:

– количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в 1 $см^3$ продукта – посевом 10^{-1}–10^{-3} его разведений на МПА;

– количество протеолитических бактерий – посевом 10^{-1}–10^{-2} разведений на молочный агар;

– количество дрожжей и плесеней – посевом 1 $см^3$ продукта и его первого разведения на сусло-агар;

– наличие бактерий группы кишечной палочки – посевом 10^{-1} и 10^{-2} разведений продукта в пробирки со средой Кесслера.

Бактерии группы кишечной палочки должны отсутствовать в 0,1 г доброкачественного сухого молока, КМАФАнМ не должно превышать $5 \cdot 10^4$ КОЕ/г (табл. 7 прил. 2).

Задание по теме:

1. В сгущенном молоке с сахаром определить КМАФАнМ, количество протеолитических бактерий, бродильный титр.

2. В сухом молоке определить КМАФАнМ, количество протеолитических бактерий, бродильный титр.

ТЕМА 9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ, ЗАКВАСКАХ, БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ

Определение молочнокислых бактерий в ферментированных молочных продуктах проводится в соответствии с ГОСТ 10444.11–89, который распространяется на пищевые и кисломолочные продукты, закваски и бактериальные препараты молочнокислых микроорганизмов.

Отбор проб и подготовку их к анализу осуществляют в соответствии с ГОСТ 9225–84.

Ход анализа. Для определения присутствия и подсчета количества молочнокислых бактерий в кисломолочных напитках отобранную для анализа упаковку протирают спиртом, надрезают ее край профламбированными ножницами и отбирают стерильной пипеткой 1 $см^3$ продукта.

Для определения молочнокислых бактерий в твороге или сыре взвешивают с соблюдением правил стерильности 10 г продукта, переносят навеску в стерильную ступку и растирают, порциями добавляя жидкость из колбы, содержащей 90 $см^3$ стерильного физиологического раствора. Приготовленную суспензию переносят обратно в колбу и получают исходное разведение продукта 10^{-1}.

Для приготовления разведений сухих заквасок или бактериальных препаратов края флакона или пакета протирают спиртом, край флакона обжигают и вынимают пробку, а пакет надрезают профламбированными ножницами. Отвешивают 1 г испытываемого материала в стерильную или профламбированную ступку, прикрытую стерильной крышкой от чашки Петри, тщательно растирают, добавляя небольшое количество стерильного физиологического раствора или фосфатного буфера из колбы, содержащей 99 $см^3$ раствора или буфера. Суспензированный материал переливают в колбу с оставшимся раствором и таким образом получают разведение сухой закваски или бактериального препарата 10^{-2} .

Из продуктов или их исходных разведений готовят следующие десятикратные разведения в соответствии с допустимым количеством микроорганизмов, указанным в нормативно-технической документации.

В табл. 4 приведены разведения молочных продуктов для посева на питательные среды.

Таблица 4

Разведения молочных продуктов для определения в них количества молочнокислых бактерий

Наименование продукта	Разведения, используемые для посева
Кисломолочные напитки, закваски жидкие и сухие, творог, сметана, сыры	10^{-6};10^{-7};10^{-8}; 10^{-9}
Бактериальные препараты молочнокислых бактерий	10^{-9};10^{-10};10^{-11}
Сухие кисломолочные продукты	10^{-6};10^{-7}; 10^{-8}

Для посева в агаризованную среду отбирают те разведения продукта, при посеве которых на чашках Петри вырастает от 15 до 150 колоний.

Для учета молочнокислых бактерий в ферментированных молочных продуктах, заквасках и бактериальных препаратах чашечным методом в качестве питательной среды используют агар с гидролизованным молоком (прил. 3, п. 1.1 и 1.2).

Подсчет выросших колоний молочнокислых бактерий на чашках Петри и пересчет их содержания в 1 г или 1 $см^3$ продукта проводят таким же образом, как и при определении КМАФАнМ (см. подразд. 3 темы 3).

Задание по теме:

1. Приготовить десятикратные разведения кисломолочного напитка, творога или бактериального препарата.
2. Посеять соответствующие разведения исследуемого продукта в чашки Петри с агаризованной питательной средой.
3. Выдержать чашки с посевами в термостате при оптимальной температуре в течение 48 ч.

4. Подсчитать число выросших на чашках колоний молочнокислых бактерий и определить их количество в 1 $см^3$ кисломолочного напитка.

ТЕМА 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА БИФИДОБАКТЕРИЙ В КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

Отбор проб. Для анализа отбирают три единицы потребительской упаковки методом случайной выборки. Микробиологический анализ продукта проводят не более чем через 4 ч с момента отбора проб. Пробы надо хранить и транспортировать при температуре продукта не выше 6 ºС, не допуская подмораживания.

Подготовка проб к анализу. Перед вскрытием поверхность упаковки обмывают, протирают, затем обрабатывают 70 %-м этиловым спиртом. Вскрытие упаковки производят в асептических условиях. Каждую отобранную упаковку анализируют отдельно.

Из каждой упаковки после тщательного перемешивания отбирают в стерильную колбу 10 $см^3$ исследуемого продукта и добавляют 1,0 $см^3$ стерильного раствора бикарбоната натрия с массовой концентрацией 100 $г/дм^3$. Содержимое колбы перемешивают.

К нейтрализованному образцу продукта добавляют физиологический раствор до достижения общего объема пробы 100 $см^3$, после чего смесь опять тщательно перемешивают. Таким образом получают разведение продукта 10^{-1}. Пипетку, которой отбирали пробу продукта, промывают до 10 раз полученной смесью до верхнего уровня имеющихся на ней делений.

Из полученного первого разведения готовят последующие, используя новую стерильную пипетку для каждого разведения. Для посева используют разведения 10^{-5}; 10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}.

Проведение исследования. Готовят два ряда питательных сред, каждый по пять пробирок, содержащих среду Блаурока (прил. 3, п. 2.1); кукурузно-лактозную – КЛС (прил. 3, п. 2.2) или гидролизатно-молочную – ГМС (прил. 3, п. 2.3).

Перед употреблением среду следует нагреть на кипящей водяной бане для удаления содержащегося в ней растворенного кислорода. При использовании плотных питательных сред их следует разогреть до полного расплавления агара и затем остудить до температуры (40 ± 2) ºС.

Внесение посевного материала в среду осуществляют с последнего разведения, внося в две последние пробирки по 1 см^3 разведения 10^{-8}. Для каждого посева используют новую стерильную пипетку.

Пробирки с посевами разведений продукта выдерживают в термостате с температурой (37 ± 1) ºС в течение 72 ч, просматривая посевы через 24 и 48 ч.

По окончании инкубации учитывают последние пробирки, в которых выросли колонии, типичные для бифидобактерий: в виде «гвоздиков», «вытянутых веретен», иногда в виде «полос», расположенных вдоль пробирки. В плотных средах колонии бифидобактерий выглядят в виде «дисков» или «гречишных зерен». Выросшие колонии подсчитывают.

Подтверждение наличия бифидобактерий устанавливают путем микроскопирования колоний. Препараты из колоний окрашивают по Граму. Бифидобактерии грамположительны и имеют под микроскопом вид тонких, мелкозернистых, слегка изогнутых палочек с раздвоением на концах (бифуркацией) или без него; располагаются группами, скоплениями в виде китайских иероглифов, могут образовывать короткие цепочки.

Содержание живых бифидобактерий в 1 см^3 продукта определяют по формуле

$$X = a \cdot 10^n,$$

где X – количество клеток живых бифидобактерий в 1 см^3 продукта; a – среднее количество колоний в последнем, засеянном в двух рядах разведении продукта; n – показатель последнего разведения продукта, в котором отмечен рост бифидобактерий.

Задание по теме:

1. Приготовить фиксированные окрашенные препараты бифидосодержащих кисломолочных продуктов. Найти в препарате бифидобактерии.

2. Провести анализ по определению содержания бифидобактерий в исследуемом продукте.

ТЕМА 11. МИКРООРГАНИЗМЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ ПОРЧИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Основными возбудителями порчи молочных продуктов являются гнилостные бактерии, энтерококки, термоустойчивые молочнокислые палочки, маслянокислые бактерии.

Гнилостные бактерии под действием протеаз вызывают гидролиз белков молока с накоплением органических кислот, альдегидов, кетонов, аминов, аммиака, сероводорода, диксида углерода. Развитие гнилостных бактерий в молочных продуктах приводит к появлении горького вкуса, неприятного запаха. Некоторые из продуктов распада белка ядовиты и могут вызвать пищевое отравление. *Энтерококки* – молочнокислые стрептококки кишечного происхождения, выделяются во внешнюю среду в довольно значительных количествах и контаминируют пищевые продукты. Они также обладают активными протеазами и способны выделять фермент типа сычужного, вызывающий свертывание молока без нарастания кислотности. Основным видом порчи, вызываемой термоустойчивыми *молочнокислыми палочками*, является излишняя кислотность. *Маслянокислые бактерии* сбраживают лактозу и лактаты с накоплением масляной кислоты, придающей продукту прогорклый вкус, и газов, что вызывает вспучивание, например позднее вспучивание сыров.

1. Гнилостные бактерии

По морфологическим и физиологическим признакам гнилостные бактерии принято делить на четыре группы: спорообразующие и неспорообразующие аэробы, спорообразующие анаэробы, неспорообразующие аэробы и факультативные анаэробы (табл. 5).

Споры бактерий рода *Bacillus* обладают высокой термоустойчивостью и выдерживают пастеризацию и в некоторых случаях стерилизацию молока. Вследствие высокой активности протеолитических и липолитических ферментов эти бактерии вызывают гидролиз белков и жиров с появлением в продукте горького и прогорклого, вкуса. Развитие *B. cereus* и *B. mycoides* приводит к «сладкому» свертыванию (при низкой кислотности) сливок, сгущенного стерилизованного молока.

Таблица 5

Некоторые представители гнилостных бактерий

Аэробные спорообразующие грамполо-жительные палочки	Аэробные неспорообразующие грамотри-цательные палочки	Факультативно-анаэробные неспорообразую-щие грамотрица-тельные палочки	Облигатно-анаэробные спорообразую-щие грамполо-жительные палочки
Род *Bacillus*: *B. subtilis,* *B. megatherium,* *B. mycoides,* *B. cereus*	Род *Pseudomonas* Род *Flavobacterium* Род *Alcaligenes*	*Escherichia coli,* *Proteus vulgaris,* *Serratia marcescens,* *Aeromonas hydrophila*	Род *Clostridium:* *C. putrificum,* *C. perfringens,* *C. sporogene*

Аэробные спорообразующие бактерии. К типичным гнилостным аэробным палочкам, образующим эндоспоры, относятся *Bacillus subtilis, Bacillus megatherium, Bacillus mycoides, B. circulans, B. licheniformis, B. cereus.* Все эти виды обладают высокой протеолитической активностью: разжижают желатин, свертывают и пептонизируют молоко, выделяют аммиак.

Bacillus subtilis (сенная палочка) (рис. 9) – прямые палочки с закругленными концами, иногда располагаются короткими цепочками, окраска по Граму положительная, в молодых культурах подвижны (перитрихи). Размеры клеток (0,6–0,7)×(3–5) мкм. Образует эндоспоры, располагающиеся центрально, причем диаметр спор превышает диаметр клетки. Колонии на мясопептонном агаре (МПА) серо-белого цвета, сухие, бугристые. При росте в мясопептонном бульоне (МПБ) на поверхности образуется сухая морщинистая пленка, бульон сначала мутнеет, а затем становится прозрачным. Оптимальная температура роста составляет 37 ºС, температурный диапазон – от 5 до 55 ºС.

Bacillus megatherium (рис. 10) – крупная палочка размером (1,5–2,0)×(3,5–7) мкм; грамположительная; подвижная; располагается чаще всего цепочками; образует споры, располагающиеся в центре клетки; капсул не формирует.

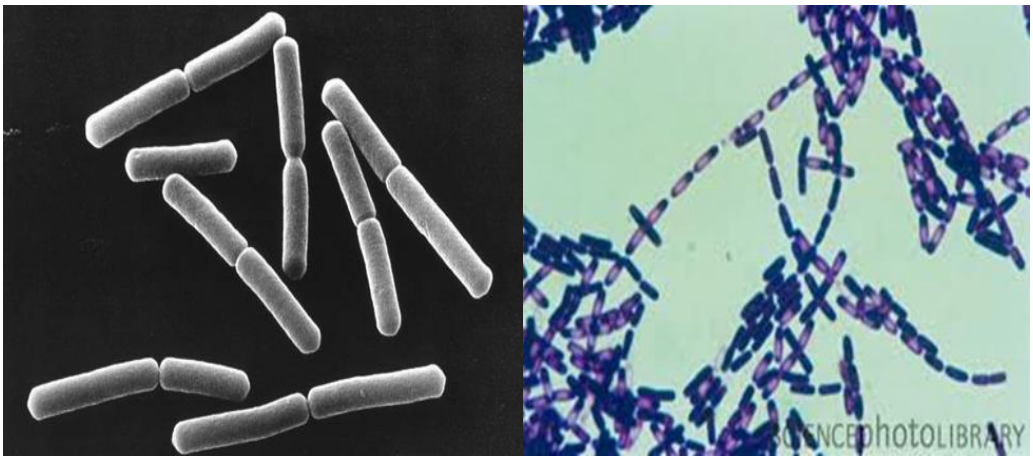


Рис. 9. Сенная палочка *Bacillus subtilis*

На поверхности МПА колонии *Bacillus megatherium* крупные, серо-белого цвета**,** гладкие, блестящие, с волокнисто-бахромчатыми краями. В мясопептонном бульоне вызывает помутнение. При расщеплении белков кроме аммиака образует сероводород.

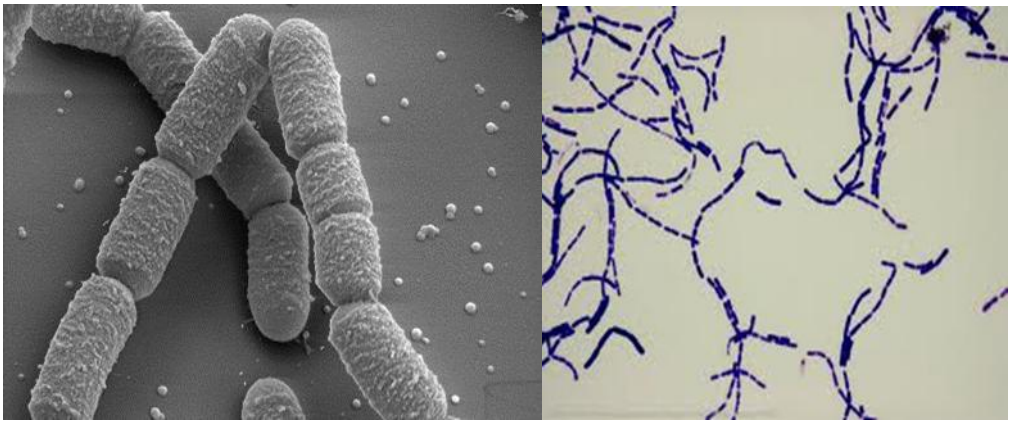


Рис. 10. *Bacillus megatherium*

Bacillus mycoides (грибовидная палочка)(рис. 11) – грамположительная, подвижная палочка (перитрих) размером (0,7–0,8)×(1,2–6) мкм, образует споры овальной формы. На МПА рост колоний напоминает мицелий, откуда и название *mycoides*, что означает грибовидный. В МПБ образует пленку и плотный осадок, при этом бульон остается прозрачным. Оптимальная температура роста составляет 30–32°С, температурный диапазон роста 10–45 °С.

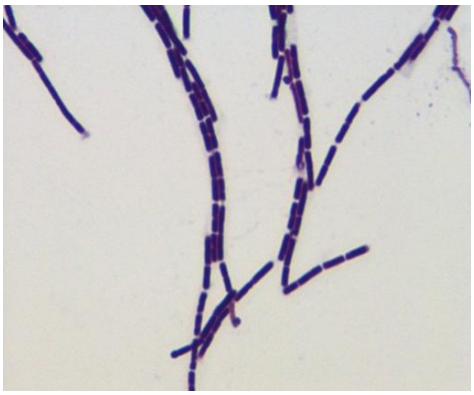


Рис. 11. Грибовидная палочка *Bacillus mycoides*

Bacillus cereus (рис. 12) – крупная грамположительная палочка длиной 8 мкм и диаметром 0,9–1,5 мкм, подвижная, образует эндоспоры, может формировать капсулу. По отношению к кислороду воздуха является микроаэрофилом. Оптимальная температура роста составляет 30–32 °С, температурный диапазон роста – от 10 до 48 °С. Поверхностные колонии на МПА крупные, плоские, с изрезанными краями, иногда розово-коричневые за счет образования пигмента. Рост культуры в мясопептонном бульоне характеризуется наличием тонкой белой пленки, пристеночного кольца и образованием хлопьевидного осадка. На кровяном агаре вокруг колоний палочки цереус наблюдаются четко очерченные зоны гемолиза.

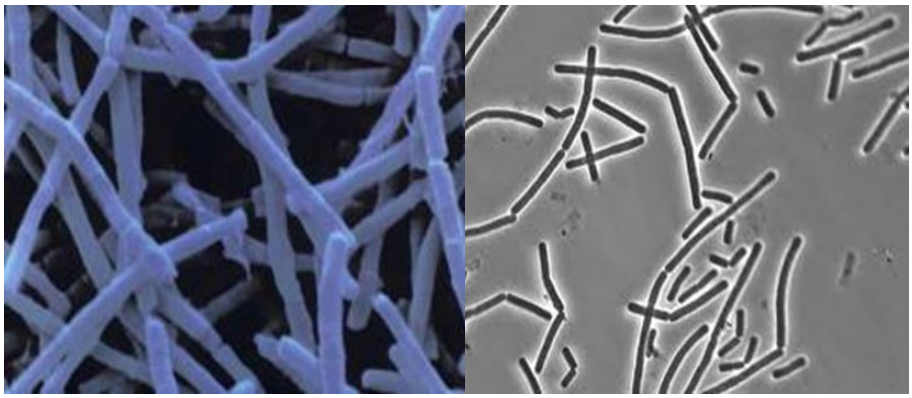


Рис. 12. *Bacillus cereus*

Споры палочки цереус выдерживают нагревание при температуре 105–125 °С в течение 10 мин. Вегетативные клетки устойчивы к высушиванию, а также высоким концентрациям хлорида натрия (до 10–15 %) и сахара (до 30–60 %). Все штаммы палочки цереус способны размножаться при щелочных значениях pH 9,0–9,5.

Кислая среда (pH 4,5–5,0) неблагоприятна для размножения данной палочки; наиболее чувствительна она и к уксусной кислоте.

Аэробные неспорообразующие бактерии. К этой группе относятся бактерии родов *Pseudomonas, Flavobacterium, Alcaligenes*

Род Pseudomonas. Бактерии рода *Pseudomonas* (рис. 13) – прямые или слегка изогнутые палочки размером (0,5–1,0)×(1,5–5,0) мкм, грамотрицательные, подвижные за счет одного или нескольких полярных жгутиков; спор и капсул не образуют; аэробы, окидазо- и каталазоположительные. Оптимальная температура роста составляет 18–22 °С, температурный диапазон роста 4–41 °С. Колонии на плотной среде блестящие, с ровными краями, часто окрашенные благодаря наличию пигментов: желто-зеленые у *P. fluorescens,* синевато-зеленые у *Pseudomonas aeruginosa,* желто-оранжевые у *P. alkaligenes.* Имеются и нефлюоресцирующие виды, например *P. fragi*. Типовой вид – *Pseudomonas aeruginosa.*

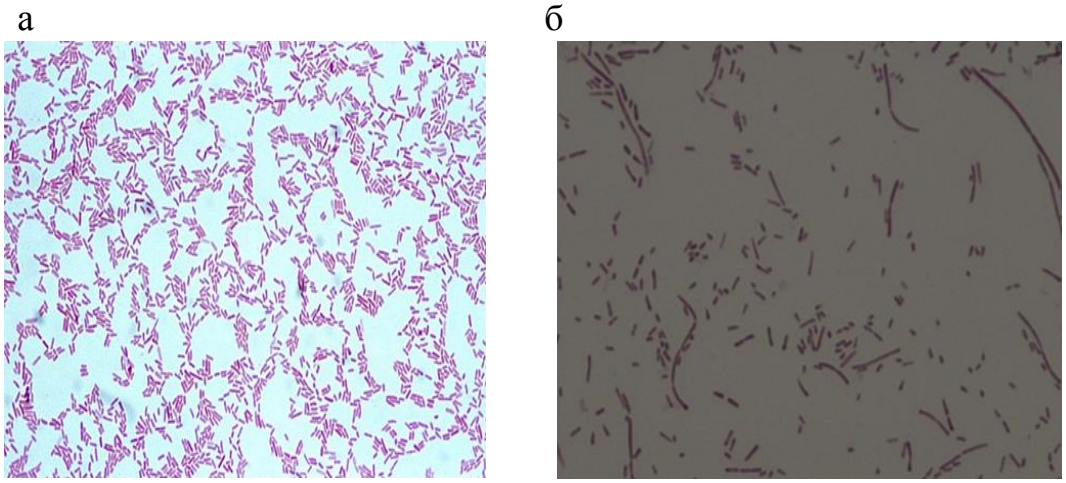


Рис. 13. Бактерии рода *Pseudomonas*:
а) *P. aeruginosa*; б) *P. fluorescens*

Псевдомонады являются доминирующими представителями психротрофных бактерий сырого молока. Наиболее часто встречаются *P. fluorescens, P. putida, P. fragi, P. aeruginosa*. Многие виды псевдомонад продуцируют термоустойчивые липазы и протеазы, которые выдерживают пастеризацию молока и, несмотря на гибель вегетативных клеток, вызывают порчу молочных продуктов в процессе их хранения.

Род *Flavobacterium* – палочки с закругленными концами размером 0,5 × (1,0–3,0) мкм, грамотрицательные, неподвижные, эндоспор не образуют. Оптимальная температура роста 25–30 °С. Колонии на плотных средах обычно окрашены в цвета от желтого до оранжевого, но есть и непигментированные штаммы. Каталазо-, фосфатазо- и оксидазоположительные. По типу питания – хемоорганотрофы. Типовой вид – *Flavobacterium aquatile*.

Флавобактерии широко распространены в почве, воде; они часто выделяются из охлажденных пищевых продуктов: молока, мяса, рыбы. Флавобактерии обладают активными липазами и вызывают порчу сливочного масла, сыров, консервированных молочных продуктов.

Род *Alcaligenes* – палочки или кокки размером (0,5–1,0) × × (0,5–2,6) мкм, располагающиеся одиночно; грамотрицательные, подвижные за счет перитрихиально расположенных жгутиков; спор и других покоящихся форм не образуют. Оптимальная температура роста составляет 20–37 °С. Колонии на плотных средах неокрашенные. Род *Alcaligenes* включает 14 видов и 7 подвидов. Типовой вид – *Alcaligenes faecalis.*

Представители рода *Alcaligenes* вызывают появление посторонних запахов в молоке за счет расщепления белков, жиров и прогоркание сливочного масла.

Факультативно-анаэробные неспорообразующие бактерии. К этой группе бактерий относятся некоторые представители семейства *Enterobacteriaceae* (роды *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*) и рода *Aeromonas.*

Escherichia coli (кишечная палочка) (рис. 14). Мелкие палочки размером (1,0–1,5) × (2–3) мкм, одиночные или в парах, грамотрицательные, подвижные (перитрихи); спор и капсул не образуют. каталазоположительные, оксидазоотрицательные. Оптимальная температура роста составляет 37–39 °С. На МПА образует бесцветные, блестящие, слегка слизистые колонии с гладкой поверхностью и ровными краями.

Кишечная палочка обладает слабой протеолитической активностью. Она не гидролизует молекулы казеина и свою ферментативную активность проявляет лишь на стадии расщепления пептонов.

Рис. 14. *Escherichia coli*

Proteus vulgaris (палочка протея) (рис. 15). Прямые палочки размером (0,4–0,8)×(1,2–3,0) мкм, грамотрицательные, подвижные (перитрихи). Клетки имеют многочисленные фимбрии. Спор, капсул и пигментов не образуют. Представители рода *Proteus* легко идеентифицируются благодаря своей способности к роению. При посеве в конденсационную воду свежеприготовленного мясопептонного агара через несколько часов наблюдается роение микроба, ползучий рост. Поверхность МПА покрывается тонкой вуалеобразной полупрозрачной пленкой. Оптимальная температура роста составляет 37 ºС, благоприятное значение pH – нейтральное. Палочка протея при расщеплении белков образует сероводород, индол.

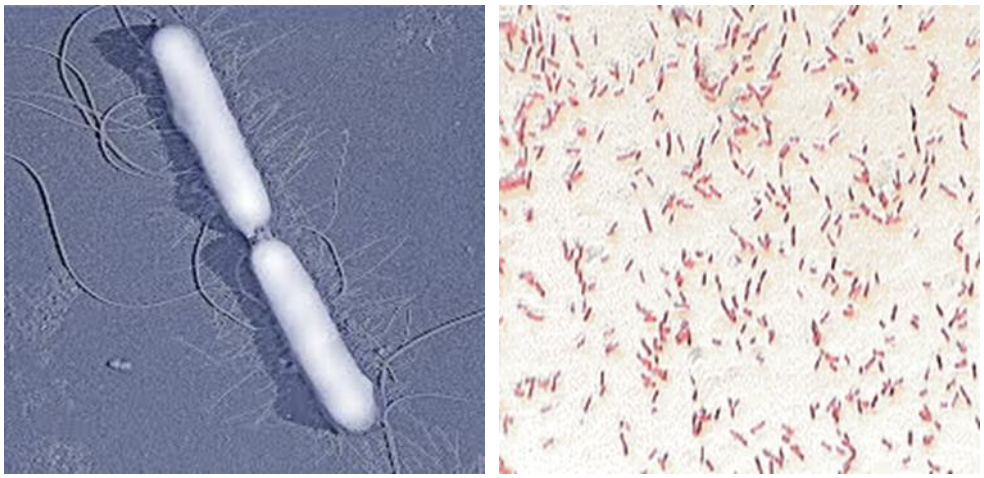


Рис. 15. *Proteus vulgaris* (палочка протея)

Serratia marcescens (рис. 16) – прямые палочки размером (0,5–0,8)×(0,9–2,0) мкм, подвижные, грамотрицательные. При определенных условиях способны образовывать капсулу. Образует пигмент ярко-красного цвета – продигиозин, за счет чего на МПА вырастают мелкие круглые блестящие колонии ярко-красного цвета, похожие на капли крови, отсюда вид получил название «чудесная палочка». Оптимальная температура роста составляет 22–25 °С, pH 6,5. Расщепляет белки с образованием сероводорода, аммиака, индола.

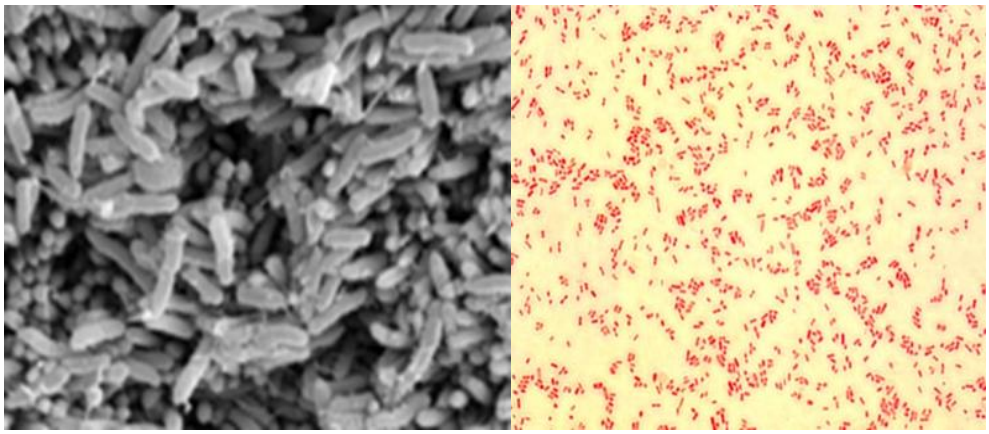


Рис. 16. *Serra555tia marcescens* («чудесная палочка»)

Род ***Aeromonas*.** Клетки имеют вид мелких палочек с закругленными концами размером (0,3–1,0)×(1,0–3,5) мкм. Располагаются одиночно, парами или короткими цепочками. По Грамму окрашиваются отрицательно, подвижные за счет одного полярного жгутика. Оптимальный диапазон температуры роста составляет 22–28 °С. Оксидазо- и каталазоположительные. Типовой вид – *Aeromonas hydrophila* (рис. 17).

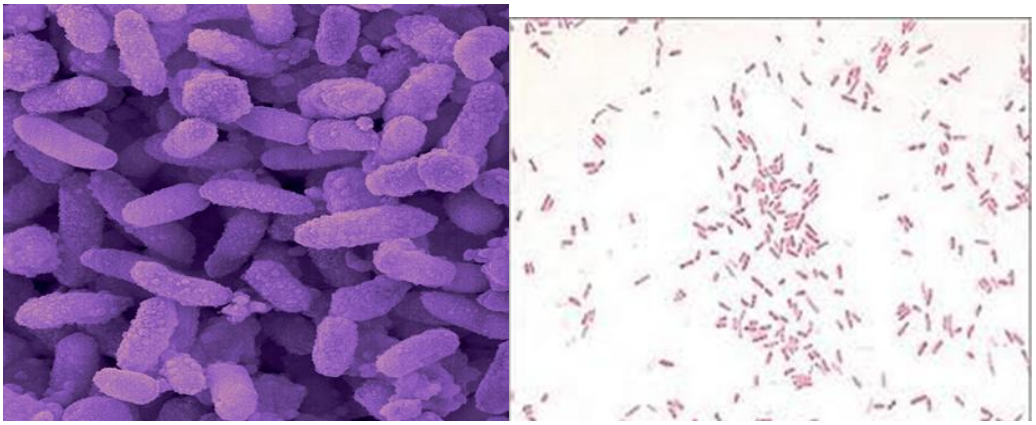


Рис. 17. *Aeromonas hydrophila*

Анаэробные спорообразующие палочки. *Clostridium putrificus* – длинные палочки размером (0,4–0,7)× (7–9) мкм, располагаются одиночно или цепочками, грамположительные, подвижные (перитрихи). Образуют эндоспоры, которые смещены от центра, их диаметр превышает диаметр клетки. Каталазоотрицательные. Штаммы этого вида обладают сильно выраженной протеолитической активностью: разжижают желатин и кровяную сыворотку, свертывают и пептонизирует молоко. При расщеплении белка данная палочка образует сероводород, аммиак, индол. На кровяном агаре вокруг колоний наблюдаются зоны гемолиза. Этот вид является одним из наиболее распространенных возбудителей анаэробного разложения белков.

Clostridium sporogenes (рис. 18) – палочки размером (0,6–0,9) × × (3–7) мкм с закругленными концами, грамположительные, подвижные; быстро образуют эндоспоры, обладающие высокой термоустойчивостью (сохраняют жизнеспособность после выдержки в автоклаве при 120 °С в течение 20 мин). Оптимальная температура роста составляет 37 °С, но может расти и при 50 °С. Наиболее распространенный вид порчи – образование большего количества газа при расщеплении белков, что может привести к раздуванию упаковки, бомбажу консервов.

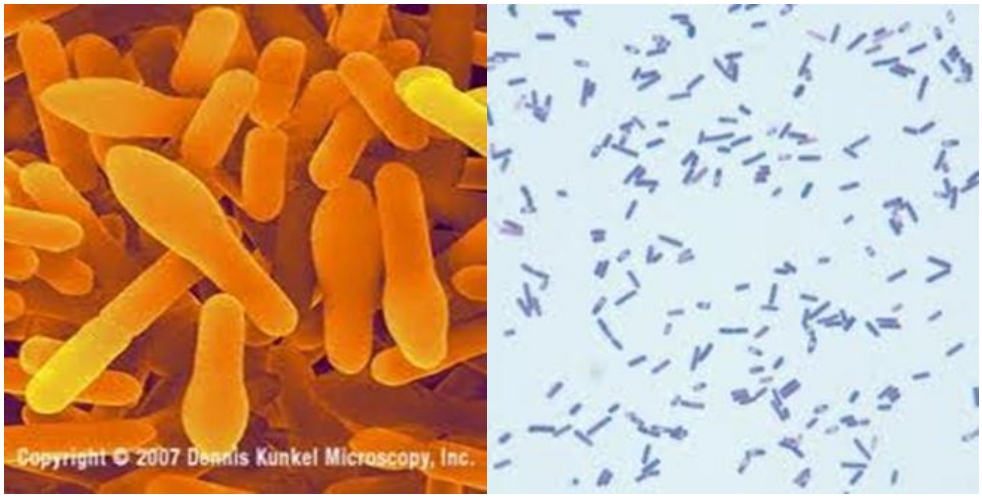


Рис. 18. *Clostridium sporogenes*

Clostridium perfringens (рис. 19) **–** крупная грамположительная палочка размером (5–8) × (1–2) мкм, неподвижная, образует эндоспоры. Расположение спор субтерминальное или центральное. В организме человека или животного данная палочка способна образовывать

капсулу. *C. perfringens* – анаэроб, быстро растет на питательных средах, особенно с добавлением глюкозы. В глубине МПА колонии имеют вид дисков или плотных комочков ваты. На поверхности кровяного агара образует влажные серовато-зеленого цвета колонии с четкой зоной гемолиза. На среде Вильсона–Блера, содержащей хлорид железа, колонии дискообразные, интенсивно черного цвета с потемнением среды вокруг колонии. Рост микроорганизма в молоке сопровождается образованием губчатого сгустка, «подбрасываемого» к ватной пробке пробирки за счет газообразования. Оптимальная температура роста 37–39 °С. Вегетативные формы *Cl. perfringens* погибают при температуре 80 °С через 30 мин, споры выдерживают кипячение в течение 1–2 ч.

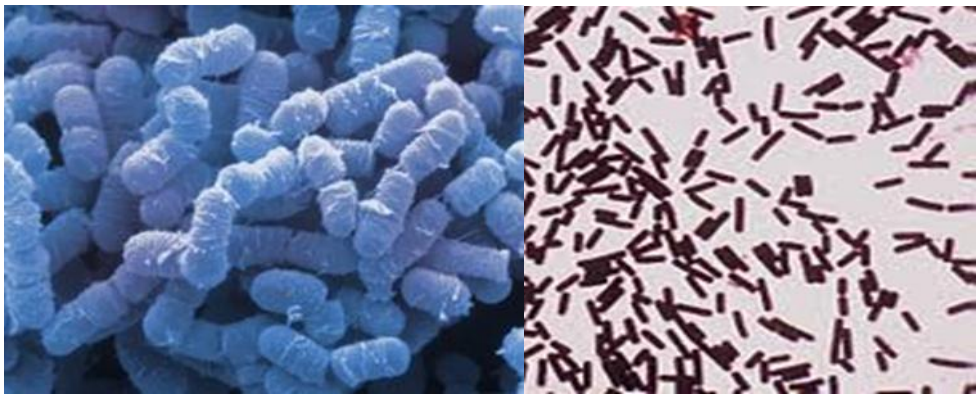


Рис. 19. *Clostridium perfringens*

2. Энтерококки

Энтерококки – молочнокислые стрептококки кишечного происхождения, лишь недавно перенесенные из рода *Streptococcus* в новый род *Enterococcus,* включающий 16 видов. Типовой вид – *Enterococcus faecalis.* В настоящее время энтерококки наряду с бактериями группы кишечной палочки считаются санитарно-показательными микроорганизмами.

Enterococcus faecalis – клетки сферической или овальной формы размером (0,6–2,0)(0,6–2,5) мкм, располагаются парами или короткими цепочками. Грамположительны, эндоспор и капсул не образуют и, как правило, неподвижны. Факультативные анаэробы, ферментируют углеводы с образованием *L*(+)-молочной кислоты. Оптимальная температура роста составляет 37–39 °С, температурный диапазон

роста – 10–45 °С. На МПА энтерококки образуют мелкие, круглые, выпуклые блестящие колонии с ровными краями серовато-голубоватого оттенка.

Энтерококки довольно устойчивы к неблагоприятным факторам внешней среды. Они выдерживают кратковременное нагревание при температуре 75–80 °С, поэтому занимают большой объем в остаточной микрофлоре пастеризованного молока. Энтерококки обладают протеолитическими ферментами и вызывают появление горького вкуса в молочных продуктах и сырах. За счет выделяемого ими сычужного фермента происходит преждевременное свертывание молока.

3. Маслянокислые бактерии

Маслянокислые бактерии – *Clostridium butyricum* и *Clostridium tyrobutyricum* – относятся к группе сахаролитических клостридий, которые сбраживают сахара с образованием преимущественно масляной и уксусной кислот и газов (CO_2 и H_2O). Благодаря своей газообразующей способности маслянокислые бактерии вызывают такие виды порчи молочных продуктов, как «позднее вспучивание» сыров, бомбаж консервов. Присутствие масляной кислоты придает продукту прогорклый вкус.

Clostridium butyricum – палочки размером (0,3–2,0)×(1,5–20) мкм с закругленными концами, часто располагающиеся парами или короткими цепочками; капсул не образуют. Клетки со спорами могут иметь форму булавы или теннисной ракетки. В молодых культурах грамположительные и подвижные (перитрихи). В старых культурах подвижность утрачивается и окраска по Граму варьируется. Споры овальные или сферические, их диаметр больше диаметра клетки. Облигатные анаэробы, оксидазо- и каталазоотрицательные. Оптимальная температура роста составляет 30–37 °С, температурный диапазон – 10–65 °С. Оптимальное значение pH 7,0–7,4.

4. Термоустойчивые лактобациллы

В молочных продуктах часто размножаются термоустойчивые молочнокислые палочки, способные выдерживать кратковременную пастеризацию про температуре 85–90 °С. Размножаясь в молоке

и молочных продуктах, эти бактерии накапливают значительное количество молочной кислоты и вызывают порок «излишне кислый вкус», при этом титруемая кислотность может возрасти до 200–220 ºТ. Иногда развитие термоустойчивых молочнокислых палочек приводит в появлению в продукте тягучести и нечистого вкуса.

Одним из представителей этой группы является *Lactobacillus delbrueckii.*

Lactobacillus delbrueckii. Данный вид включает три подвида: *L. delbrueckii ssp. delbrueckii, L. delbrueckii ssp.bulgaricus, L. delbrueckii ssp.lactis*. Палочки с закругленными концами размером (0,5–0,8)× × (2,0–9,0) мкм, грамположительные, неподвижные; эндоспор и капсул не образуют. В клетках часто наблюдается зернистость. Факультативные анаэробы, ферментируют углеводы с образованием *D*(–)-молочной кислоты. Оптимальная температура роста составляет 45–55 °С, температурный диапазон – от 20 до 65 °С. Каталазо- и цитохромотрицательные.

5. Мицелиальные грибы

Мицелиальные грибы способны размножаться на молочных продуктах как при низких температурах, так и при пониженных значениях активности воды a_w – от 0,94 до 0,60 (например, *Xeromyces bisporus*). Присутствие плесени на пищевом продукте делает его непривлекательным для потребителя. Наличие у мицелиальных грибов активных протеолитических и липолитических ферментов приводит к возникновению таких видов порчи, как неприятный запах, прогорклые вкус и запах, изменение структуры продукта. Среди мицелиальных грибов встречаются виды, образующие микотоксины, что представляет опасность для здоровья человека. Наиболее часто на молочных продуктах размножается молочная плесень – *Geotrichum candidum***.**

Geotrichum candidum (синоним *Endomyces lactis*) (рис. 20) – молочная плесень, образующая белый бархатистый мицелий, гифы которого распадаются на отдельные клетки – *оидии*, называемые также *артроспорами*.

Geotrichum candidum относится к высшим несовершенным грибам – дейтеромицетам.

Молочная плесень часто развивается на поверхностях кисломолочных продуктов, сыров, сливочного масла. Мицелий молочной плесени никогда не темнеет и не образует цветного плодоношения. Молочная плесень обладает активными протеазами и липазами, поэтому при размножении в молочных продуктах вызывает их прогоркание и появление неприятного специфического запаха.

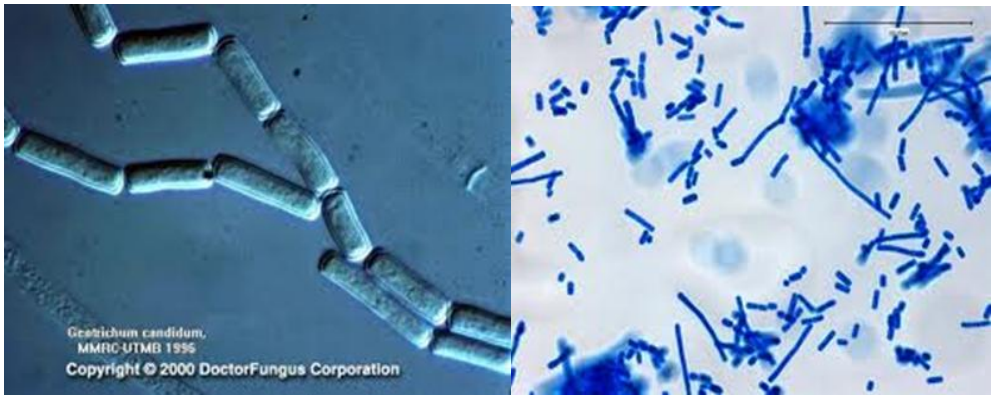


Рис. 20. Молочная плесень *Geotrichum candidum*
(синоним *Endomyces lactis*)

Mucor plumbeus (рис. 21) является представителем низших грибов – зигомицетов. На сусле-агаре образует пушистый мицелий темно-серого цвета с черными точками – спорангиями со спорангиоспорами. *В*ызывает порчу творога и сыров.

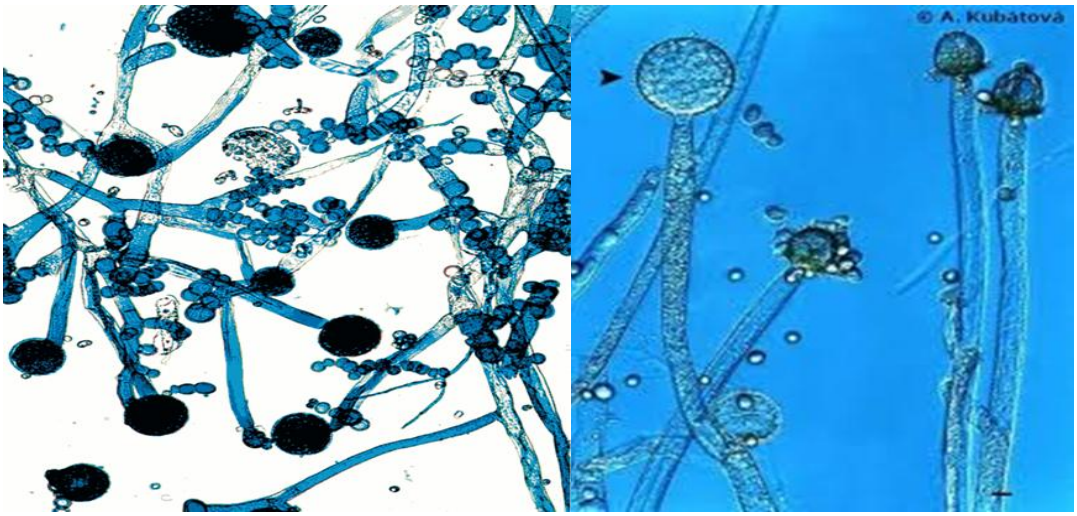


Рис. 21. *Mucor plumbeus*

Penicillium commune (рис. 22) относится к высшим грибам – аскомицетам. Этот вид на сусле-агаре образует бледно-зеленые колонии со светло-коричневой обратной стороной. Кисточки крупные, трехмутовчатые; конидии сферической формы, гладкие.

Penicillium commune является дикой разновидностью культурной плесени *Penicillium roqueforti* и чаще всего вызывает порчу сыров.

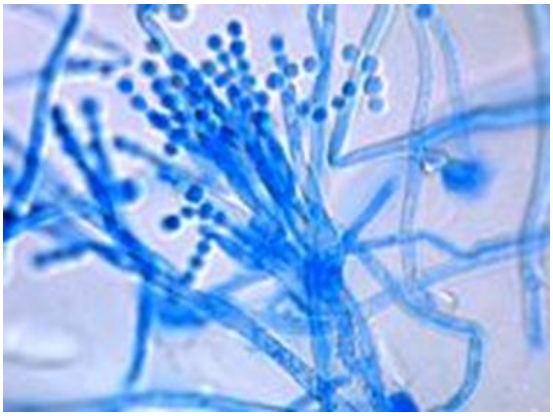


Рис. 22. *Penicillium commune*

Aspergillus glaucus (рис. 23) относится к высшим грибам – аскомицетам. На сусле-агаре образует плоские бархатистые колонии: сначала – белые, затем – серо-голубые с белым краем. Он хорошо растет на поверхности молочных продуктов при низких температурах хранения.

Рис. 23. *Aspergillus glaucus*

Catenularia fuliginea образует мелкие, медленно растущие колонии шоколадно-коричневого цвета. Конидии блестящие, желто-коричневые, отходящие от концевых гифов воздушного мицелия в виде длинных цепочек. Относится к высшим несовершенным грибам – дейтеромицетам. Этот вид часто размножается в сгущенном молоке с сахаром, образуя комки или «пуговицы» шоколадного цвета.

Monilia nigra – переходная форма от дрожжей к мицелиальным грибам. Вначале колонии сходны с колониями дрожжей, лишь позднее клетки удлиняются и образуют настоящий мицелий, от которого поднимаются воздушные нити. Мицелий эндогенный, выступает на поверхность в виде плотных пучков. Конидии формируются в цепочки, а затем распадаются на отдельные клетки.

Monilia nigra образует на корке твердых сыров черные пятна, проникающие внутрь сыра.

Monilia roseum способна размножаться на поверхности сливочного масла, образуя розовые пятна.

Cladosporium herbarum – гроздевидная плесень (рис. 24) Образует бархатистые колонии оливково-зеленого цвета. Мицелий многоклеточный, слаборазветвистый. Спороносцы представляют собой тонкие древовидные ветвящиеся гифы, оканчивающиеся гладкими сферическими или овальными спорами. Оборотная сторона колоний, прилегающая к субстрату, имеет черную окраску. *Р*азмножается на поверхности мяса, сливочного масла, сыра при холодильном хранении, образуя черные пятна.

Рис. 24. Гроздевидная плесень *Cladosporium herbarum*

Задание по теме:

1. Приготовить фиксированные окрашенные препараты гнилостных бактерий, энтерококков, маслянокислых бактерий и зарисовать микроскопическую картину.

2. Приготовить фиксированные окрашенные препараты кисломолочных продуктов и рассмотреть в них присутствие термоустойчивых молочнокислых палочек.

3. Рассмотреть колонии мицелиальных грибов, выросших на молочных продуктах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.

Крусь Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 2000. – 368 с.

Микробиологическая порча пищевых продуктов / Под ред. К. де В. Блекберна: Пер. с англ. – СПб.: Профессия, 2008. – 784 с.

МУК 4.2.999–00. Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах: Метод. указания. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000. – 16 с.

Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. 4-е изд., испр. – М.: Лира: Все для Вас. Подмосковье, 2006. – 413 с.

Степаненко П.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии молока и молочных продуктов. – М.: Лира, 2005. – 652 с.

Федеральный закон «Технический регламент на молоко и молочную продукцию» от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ (в редакции Федерального закона от 22.07.2010 № 163-ФЗ).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Характеристики заквасок ферментированных молочных продуктов

Продукт	Состав микрофлоры закваски	Температура скваши-вания молока, °С	Титруе-мая кис-лотность, °Т,	Микроскопическая картина	Органолептические показатели
1	2	3	4	5	6
Творог	*Lactococcus lactis ssp. lactis* (преобладают), *Lac. lactis ssp. diacetylactis*	28 ± 2	80–90	Диплококки и цепочки кокков разной длины, встречаются отдельные кокки	Вкус чистый, кисломолочный; слабый аромат диацетила; сгусток плотный, колющийся; консистенция жидкая; допускается слабое отделение сыворотки
Творог	Закваска «Каунасская»: *Lac. lactis, Lac. diacetylactis, Lac. lactis ssp. cremoris* (преобладают)	24 ± 2	80–90	То же	То же

Продолжение

Продукт	Состав микрофлоры закваски	Температура сквашивания молока, °С	Титруемая кислотность, °Т,	Микроскопическая картина	Органолептические показатели
1	2	3	4	5	6
Сметана	*Lac. cremoris* (преобладают), *Lac. lactis*, *Lac. diacetylactis*	26 ± 4	80–90	Диплококки и цепочки кокков разной длины, встречаются отдельные кокки	Вкус чистый, кисломолочный; слабый аромат диацетила; сгусток плотный; консистенция однородная, слабовязкая, без отделения сыворотки
Сметана	Закваска «Днепрянская В»: *Lac. lactis, Leu. mesenteroides ssp. cremoris, Acetobacter aceti*	26 ± 2	100–110	Диплококки, короткие цепочки, мелкие палочки, одиночные и в цепочках	Вкус чистый, кисломолочный; сгусток плотный; консистенция однородная, вязкая
Сметана, вырабатываемая ускоренным способом	*Lac. lactis, Lac. cremoris, Lac. diacetylactis, S. thermophilus*	32 ± 2	80	Диплококки и цепочки разной длины, встречаются одиночные кокки	Вкус чистый, кисломолочный; сгусток плотный; консистенция однородная, допускается слабовязкая

Продолжение

Продукт	Состав микрофлоры закваски	Температура сквашивания молока, °С	Титруемая кислотность, °Т,	Микроскопическая картина	Органолептические показатели
1	2	3	4	5	6
Простокваша «Болгарская», «Южная», «Мечниковская»	*S. salivarius ssp. thermophilus, L. delbrueckii ssp. bulgaricus*	40 ± 2	90–130	Цепочки кокков разной длины, палочки крупные и средней длины	Вкус чистый, кисломолочный со слабым фруктовым запахом; сгусток плотный; консистенция однородная, вязкая или невязкая
Ацидофильное молоко, ацидофильная паста, напиток «Московский»	*Lactobacillus acidophilus*	37 ± 2	100–130	Длинные тонкие палочки	Вкус чистый, кисломолочный; сгусток плотный; консистенция однородная, вязкая или невязкая; допускается слизистость
Ацидофильно-дрожжевое молоко	*Lactobacillus acidophilus, Saccharomyces lactis*	30 ± 1	100–130	Длинные тонкие палочки, дрожжевые клетки	Вкус чистый, кисломолочный с дрожжевым привкусом; сгусток плотный со следами газообразования; консистенция однородная, пенящаяся

Продолжение

Продукт	Состав микрофлоры закваски	Температура сквашивания молока, °С	Титруемая кислотность, °Т,	Микроскопическая картина	Органолептические показатели
1	2	3	4	5	6
Пахта «Идеал» диетическая	*Lactobacillus acidophilus, Lc. lactis ssp. diacetylactis*	38 ± 1	100–110	Диплококки, короткие цепочки кокков, длинные тонкие палочки	Вкус чистый, кисломолочный с выраженным ароматом диацетила; консистенция однородная
Йогурт	*S. thermophilus, L. bulgaricus*	40 ± 2	90–110	Цепочки кокков разной длины, палочки крупные и средней длины	Вкус чистый, кисломолочный со слабым фруктовым запахом; сгусток плотный; консистенция однородная, вязкая или невязкая
Ряженка, варенец	*Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (при низкой кислотности допускается добавление болгарской палочки в соотношении 6:1, 4:1)	42 ± 2	80–90	Цепочки кокков разной длины	Вкус чистый, кисломолочный; консистенция однородная, без отделения сыворотки

Продолжение

Продукт	Состав микрофлоры закваски	Температура сквашивания молока, °С	Титруемая кислотность, °Т,	Микроскопическая картина	Органолептические показатели
1	2	3	4	5	6
«Бифилин», «Бифидин»	*Bifidobacterium adolescentis*	37 ± 2	90–120	Палочки мелкие, зернистые, прямые или изогнутые, иногда с утолщением или раздвоением на концах	Вкус кисломолочный с привкусом уксусной кислоты; сгусток средней плотности; консистенция однородная
Напиток «Тонус»	*Lac. diacetylactis, Acetobacter aceti, Propionibacterium freudenreichii*	31 ± 2	90	Преобладают кокки, диплококки, редко – мелкие палочки	То же
Ацидолакт	*Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus*	37 ± 2	90–120	Цепочки кокков, длинные тонкие палочки	Вкус кисломолочный; сгусток плотный; консистенция однородная, слабовязкая

Продолжение

Продукт	Состав микрофлоры закваски	Температура сквашивания молока, °С	Титруемая кислотность, °Т,	Микроскопическая картина	Органолептические показатели
1	2	3	4	5	6
«Бифилакт»	*Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum*	37 ± 2	90–120	Длинные тонкие палочки; мелкие зернистые палочки прямые или изогнутые, иногда с утолщением или раздвоением на концах	Вкус чистый, кисломолочный с легким привкусом уксусной кислоты; сгусток плотный; консистенция однородная
«Бифилайф»	*B.bifidum, B. longum, B. infantis, B. adolescentis, B. breve*	37 ± 2	90–120	Мелкие зернистые палочки, прямые или изогнутые, иногда с утолщением или раздвоением на концах	Вкус кисломолочный с привкусом уксусной кислоты; сгусток средней плотности; консистенция однородная
Кумыс	*Lactobacillus delbruekii ssp. bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Saccharomyces lactis*	30 ± 2	130–140	Палочки крупные и средней длины, скопления клеток дрожжей	Вкус кисломолочный с дрожжевым привкусом; сгусток плотный со следами газообразования; консистенция однородная, пенящаяся

Продолжение

Продукт	Состав микрофлоры закваски	Температура сквашивания молока, °С	Титруемая кислотность, °Т,	Микроскопическая картина	Органолептические показатели
1	2	3	4	5	6
Кефир	Грибковая закваска: лактококки, лактобациллы, дрожжи, уксуснокислые бактерии	20 ± 2	95–110	Диплококки, кокки, цепочки разной длины, единичные клетки палочек и дрожжей, иногда их скопления	Вкус кисломолочный, острый, слабо выраженный дрожжевой; консистенция жидкая, пенящаяся
Масло кисло-сливочное	*Lac. lactis, Lac. cremoris, Lac. diacetilactis, Leuconostoc mesenteriodes ssp. cremoris*	25 ± 1	80–90	Диплококки, цепочки кокков разной длины	Вкус чистый, кисломолочный с выраженным запахом диацетила; консистенция однородная, без выделения сыворотки
Сыры с низкой температурой второго нагревания	*Lactococcus lactis ssp. lactis, Lactococcus lactis ssp. cremoris, Lactococcus lactis ssp. cremoris (biovar iacetylactis), Leuconostoc mesenteriodes ssp. cremoris*	30 ± 1	80–90	Диплококки, цепочки кокков разной длины	Вкус чистый, кисломолочный со слабо выраженным ароматом диацетила; сгусток ровный, плотный с выделением сыворотки

Окончание

Продукт	Состав микрофлоры закваски	Температура сквашивания молока, °С	Титруемая кислотность, °Т,	Микроскопическая картина	Органолептические показатели
1	2	3	4	5	6
Сыры с высокой температурой второго нагревания	*Lactobacillus helveticum, Streptococcus thermophilus*	43 ± 1	100–120	Палочки средней длины, длинные цепочки кокков	Вкус чистый, кисломолочный со слабо выраженным ароматом диацетила; сгусток ровный, плотный с выделением сыворотки

Приложение 2

Допустимые уровни содержания микроорганизмов в продуктах переработки молока при выпуске их в обращение

(согласно приложению № 4 в редакции к ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию» от 22.07.2010 № 163-ФЗ)

Таблица 1

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Примечание
		БГКП (колиформы)	патогенные, в том числе сальмонеллы	
Молоко сырое				
Высший сорт	$1 \cdot 10^5$	–	25	Соматические клетки, не более $4 \cdot 10^5$ в 1 $см^3$
Первый сорт	$5 \cdot 10^5$	–	25	Соматические клетки, не более $1 \cdot 10^6$ в 1 $см^3$
Второй сорт	$4 \cdot 10^6$	–	25	Соматические клетки, не более $1 \cdot 10^6$ в 1 $см^3$
Молоко, сыворотка, пахта пастеризованные				
В потребительской таре	$1 \cdot 10^5$	0,01	25	*S.aureus* в 1 $см^3$ не допускаются, *L.monocytogenes* в 25 $см^3$ не допускаются
Во флягах и цистернах	$2 \cdot 10^5$	0,01	25	*S.aureus* в 0,1 $см^3$ не допускаются, *L.monocytogenes* в 25 $см^3$ не допускаются
Сливки пастеризованные				
В потребительской таре	$1 \cdot 10^5$	0,01	25	*S. aureus* в 1 $см^3$ не допускаются, *L. monocytogenes* в 25 $см^3$ не допускаются

Окончание табл. 1

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Примечание
		БГКП (колиформы)	патогенные, в том числе сальмонеллы	
Во флягах и цистернах	$2 \cdot 10^5$	0,01	25	*S. aureus* в 0,1 $см^3$ не допускаются, *L. monocytogenes* в 25 $см^3$ не допускаются
Молоко топленое	$2{,}5 \cdot 10^3$	1,0	25	*S. aureus* не допускаются, *L.monocytogenes* в 25 $см^3$ не допускаются
Молоко и сливки стерилизованые	Требования промышленной стерильности: 1) после термостатной выдержки при температуре 37 °С в течение трех–пяти суток – отсутствие видимых дефектов и признаков порчи (вздутие упаковки, изменение внешнего вида и другие), отсутствие изменений вкуса и консистенции; 2) после термостатной выдержки допускаются изменения: а) титруемой кислотности – не более чем на 2 °Т; б) КМАФАнМ – не более 10 КОЕ/$см^3$ (г)			

Таблица 2

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи (Д), плесени (П), КОЕ/г, не более
		БГКП (коли-формы)	*S. aureus*	Патогенные, в том числе сальмо-неллы	
Жидкие кисло-молочные продукты, в том числе йогурт, со сроками годности не более 72 ч	МКБ не менее $1 \cdot 10^7$	0,01	1,0	25	–

Окончание табл. 2

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи (Д), плесени (П), КОЕ/г, не более
		БГКП (колиформы)	*S. aureus*	Патогенные, в том числе сальмонеллы	
Жидкие кисломолочные продукты, в том числе йогурт, со сроками годности более 72 ч:					
без компонентов	МКБ не менее $1 \cdot 10^7$	0,1	1,0	25	Д – 50*, П – 50
с компонентами	МКБ не менее $1 \cdot 10^7$	0,01	1,0	25	Д – 50*, П – 50
Жидкие кисломолочные продукты, обогащенные бифидобактериями, со сроками годности более 72 ч	МКБ не менее $1 \cdot 10^7$; бифидобактерии не менее $1 \cdot 10^6$	0,1	1,0	25	Д – 50*, П – 50
Ряженка	–	1,0	1,0	25	–
Сметана и продукты на ее основе	МКБ не менее $1 \cdot 10^7$	0,001***	1,0	25	Д – 50***, П – 50***
Термически обработанные сквашенные молочные и молочные составные продукты без и с компонентами**	–	1,0	1,0	25	Д – 50, П – 50

* Кроме напитков, изготавливаемых с использованием заквасок, содержащих дрожжи.

** Для термически обработанных продуктов – 0,01.

*** Для продуктов со сроками годности более 72 ч.

Таблица 3

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи (Д), плесени (П), КОЕ/г, не более
		БГКП (коли-формы)	*S. aureus*	Пато-генные, в том числе сальмо-неллы	
Творог и творожные изделия со сроками годности не более 72 ч	МКБ не менее $1 \cdot 10^6$	0,001	0,1	25	–
Творог и творожные изделия со сроками годности более 72 ч, в том числе замороженные	–	0,01	0,1	25	Д – 100, П – 50
Творожные изделия термической обработки	–	0,1	1,0	25	Д + П – 50
Творог зерненый	–	0,01	0,1	25	Д – 100, П – 50

Таблица 4

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрож-жи, КОЕ/г, не более	Плесе-ни, КОЕ/г, не более	Приме-чание
		БГКП (коли-формы)	*S. aureus*	патоген-ные, в том числе сальмо-неллы			
Масло сладко-сливочное, кисло-сливочное, соленое, несоленое,							

Окончание табл. 4

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Дрожжи, КОЕ/г, не более	Плесени, КОЕ/г, не более	Примечание
		БГКП (колиформы)	*S. aureus*	патогенные, в том числе сальмонеллы			
в том числе:							*L. monocytogenes* не допускаются в 25 г продукта
без компонентов	$1 \cdot 10^5$ *	0,01	0,1	25	100 в сумме		
с компонентами	$1 \cdot 10^5$	0,01	0,1	25	100	100	
Паста масляная (м.д.ж. 30–59 %), в том числе:							
без компонентов	$2 \cdot 10^5$	0,01	0,1	25	100	100	
с компонентами	$2 \cdot 10^5$	0,001	0,1	25	100	100	
Масло топленое	$1 \cdot 10^3$	1,0	–	25	–	200	
Сливочно-растительный спред	$1 \cdot 10^5$	0,01	0,1	25	100	100	

*КМАФАнМ в кислосливочном масле не нормируется.

Таблица 5

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Примечание
		БГКП (колиформы)	патогенные, в том числе сальмонеллы	
Сыры (сверхтвердые, твердые, полутвердые, мягкие, сывороточно-альбуминные)	–	0,001	25	*S. aureus* не допускаются в 0,001 г; *L. monocytogenes* не допускаются в 25 г
Сыры и сырные продукты плавленые, в том числе:				
без компонентов	$5 \cdot 10^3$	0,1	25	Плесени – не более 50, дрожжи – не более 50
с компонентами	$1 \cdot 10^4$	0,1	25	Плесени – не более 100, дрожжи – не более 100
копченые	$1 \cdot 10^4$	0,1	25	Плесени – не более 100, дрожжи – не более 100

Таблица 6

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Примечание
		БГКП (колиформы)	патогенные, в том числе сальмонеллы	
Молоко сгущенное стерилизованное в банках	Требования промышленной стерильности: 1) после термостатной выдержки при температуре 37 °С в течение шести суток – отсутствие видимых дефектов и признаков порчи (вздутие упаковки, изменение внешнего вида и др.), отсутствие изменений вкуса и консистенции; 2) после термостатной выдержки: а) не допускаются изменения титруемой кислотности; б) в микроскопическом препарате не должны обнаруживаться клетки микроорганизмов; 3) дополнительное требование к продуктам детского питания – отсутствие при посеве пробы грибов, дрожжей, молочнокислых микроорганизмов			
Молоко сгущенное с сахаром: в потребительской таре в транспортной таре	 $2 \cdot 10^4$ $4 \cdot 10^4$	 1,0 1,0	 25 25	 – –
Пахта, сыворотка молочная сгущенные с сахаром	$5 \cdot 10^4$	1,0	25	–
Какао, кофе натуральный со сгущенным молоком и сахаром или сливками с сахаром	$3{,}5 \cdot 10^4$	1,0	25	–

Таблица 7

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются			Примечание
		БГКП (колиформы)	*S. aureus*	Патогенные, в том числе сальмонеллы	
Молоко коровье сухое цельное	$5 \cdot 10^4$	0,1	1,0	25	–
Молоко сухое обезжиренное:					
для непосредственного употребления	$5 \cdot 10^4$	0,1	1,0	25	–
для промышленной переработки	$1 \cdot 10^5$	0,1	1,0	25	–
Напитки сухие	$1 \cdot 10^5$	0,01	1,0	25	Плесени – не более 50
Сливки сухие и сухие с сахаром	$7 \cdot 10^4$	0,1	1,0	25	–
Сыворотка сухая молочная	$1 \cdot 10^5$	0,1	1,0	25	Дрожжи – 50, плесени – 100
Пахта, ЗЦМ сухие	$5 \cdot 10^4$	0,1	1,0	25	Дрожжи – 50, плесени – 100

Приложение 3

1. Питательные среды для культивирования лактобактерий

1.1. Гидролизованное молоко

1 $дм^3$ обезжиренного молока кипятят и охлаждают до температуры (45 ± 1) ºС. Устанавливают pH 7,6–7,8 добавлением бикарбоната натрия. В молоко вносят 0,5–1,0 г порошка панкреатина, предварительно разведенного в небольшом количестве теплой воды. В смесь вносят 5 $см^3$ хлороформа, колбу закрывают корковой пробкой и выдерживают в термостате при 40 ºС в течение 24–48 ч. В течение первых 3–5 ч молоко несколько раз перемешивают, приоткрывая пробку для удаления хлороформа, затем гидролизованное молоко фильтруют через бумажный фильтр, разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 1, устанавливают pH 7,0–7,2, добавляя 40 %-й раствор NaOH, и стерилизуют при 0,1 МПа в течение 15 мин.

1.2. Агар с гидролизованным молоком

В 1 $дм^3$ гидролизованного молока вносят 15 г агара. Среду нагревают до полного расплавления агара, фильтруют ее через ватный фильтр, разливают в колбы или пробирки и стерилизуют при 0,1 МПа в течение 10 мин.

2. Питательные среды для культивирования бифидобактерий

2.1. Модифицированная печеночная среда Блаурока

Основой среды является печеночный отвар. Для его приготовления берут 0,5 кг говяжьей печени, очищают ее от пленок и протоков, мелко измельчают, заливают 1 $дм^3$ дистиллированной воды и кипятят в течение 1,5–2,0 ч. Отвар отфильтровывают и доводят его объем до 1 $дм^3$ дистиллированной водой. Добавляют на 1 $дм^3$ отвара 5,0 г хлорида натрия и 10 г пептона.

Устанавливают pH (8,15 ± 0,5) с помощью 10 %-го раствора гидроксида натрия. Среду кипятят в течение 10 мин и стерилизуют при 0,1 МПа течение 30 мин. На следующий день печеночный бульон декантируют, доливают дистиллированной водой и вносят на 1 дм^3 бульона:

глюкозы – 5,0 г;

агара-агара – 0,8 г;

цистеина – 0,3 г.

Среду кипятят в течение 10 мин, разливают в пробирки по 10 см^3 и стерилизуют при 0,1 МПа в течение 20 мин.

Среду проверяют на стерильность путем выдержки при 37 ºС в течение двух суток. Хранят среду не более одного месяца при температуре (20 ± 2) ºС и не более двух месяцев при температуре (4 ± 2) ºС.

Ростовые качества каждой партии среды Блаурока контролируют высевом лиофилизированной биомассы бифидобактерий.

2.2. Кукурузно-лактозная среда (КЛС)

Состав (г / дм^3)

Раствор кукурузного экстракта (1:5)…….50,00 см^3
Лактоза…….10,00
Пептон……..10,00
Натрий лимоннокислый трехзамещенный…….....6,00
Магний сернокислый……....0,12
Калий фосфорнокислый однозамещенный……2,00
Натрий фосфорнокислый двузамещенный ..…….1,00
Цистеин солянокислый…… 0,15
Агар…… 1,00
Вода дистиллированная – остальное
pH среды 7,0–7,2

Приготовление среды КЛС

В небольшом количестве дистиллированной воды расплавляют агар в количестве 2,5 г на 1 дм^3 приготовленной среды. К остальному количеству воды добавляют пептон, раствор кукурузного экстракта и соли, смесь нагревают до температуры (80 ± 2) ºС, после чего соединяют с расплавленным агаром, добавляют лактозу и солянокислый

цистин. Цистеин предварительно растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, в которой устанавливают pH (8,5 ± 0,5) с помощью 10 %-го раствора NaOH и нагревают на водяной бане до полного его растворения.

Смесь доливают горячей дистиллированной водой до заданного объема и устанавливают pH (7,1 ± 0,2) с помощью 40 %-го раствора NaOH. Среду разливают в пробирки высоким столбиком по 10 $см^3$ и стерилизуют при 0,1 МПа в течение 30 мин.

Среду проверяют на стерильность путем выдержки при температуре 37 ºС в течение двух суток.

2.3. Гидролизатно-молочная среда (ГМС)

В небольшом количестве гидролизованного молока, разведенного водой в соотношении 1:1, расплавляют 2,5 г агара (из расчета на 1 $дм^3$ среды). К остальному количеству гидролизата добавляют 10 г пептона и (3,5 ± 0,5) г хлорида натрия. Смесь нагревают до температуры (80 ± 2) ºС, после чего соединяют с расплавленным агаром. В смеси устанавливают pH (7,5 ± 0,1); кипятят в течение 15 мин, дают отстояться; сливают с осадка не фильтруя; доливают горячей дистиллированной водой до заданного объема и добавляют 10 г лактозы и 0,15 г солянокислого цистеина. Среду разливают в пробирки высоким столбиком по 10 $см^3$ или в колбы и стерилизуют при 0,1 МПа в течение 30 мин. Активная кислотность готовой среды (7,1 ± 0,2).

3. Среда для определения количества спор мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий (СДА)

К 900 $см^3$ мясопептонного бульона добавляют 58 г лактата кальция, 5 г ацетата натрия, 0,8 г солянокислого цистеина, 40 $см^3$ дрожжевого автолизата и 20 г агара. Смесь нагревают до температуры (95 ± 2) ºС, выдерживают при постоянном перемешивании до расплавления агара и добавляют по 10 $см^3$ 0,01 %-х водных свежеприготовленных растворов треххлористого железа и тетраборнокислого натрия, 10 $см^3$ 1 %-го раствора углекислого натрия и 1 $см^3$ 0,4 %-го водного раствора индикатора нейтрального красного. С помощью 20 %-го водного раствора молочной кислоты уста-

навливают pH среды (5,7 ± 0,05). Приготовленную среду разливают среду в пробирки по (15 ± 2) $см^3$, закрывают ватными пробками и стерилизуют при 0,1 МПа в течение 20 мин. Готовая среда должна иметь интенсивно-розовый или красный цвет.

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕМА 1. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ
И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ,
ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ МОЛОЧНЫХ
ПРОДУКТОВ 3
1. Молочнокислые бактерии 5
2. Бифидобактерии 12
3. Пропионовокислые бактерии 13
4. Уксуснокислые бактерии 14
5. Дрожжи 14
ТЕМА 2. МИКРОБИОЛОГИЯ ЗАКВАСОК 17
1. Определение пригодности молока для закваски 18
2. Проверка эффективности пастеризации молока для закваски 19
3. Общие правила приготовления заквасок
для различных молочных продуктов 20
4. Контроль качества заквасок 21
5. Приготовление закваски для кефира 23
ТЕМА 3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
СЫРОГО МОЛОКА 24
1. Отбор проб молока 24
2. Проба на редуктазу 25
3. Определение количества мезофильных аэробных
и факультативно-анаэробных микроорганизмов 26
4. Определение бактерий группы кишечных палочек 27
5. Групповой количественный учет микроорганизмов
в сыром молоке 29
ТЕМА 4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ПИТЬЕВОГО МОЛОКА 32
1. Микробиологический контроль пастеризованного молока 32
2. Микробиологический контроль стерилизованного молока 33
ТЕМА 5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 34
КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ 34
1. Микробиологический контроль
кисломолочных напитков 34
2. Микробиологический контроль творога 35
3. Микробиологический контроль сметаны 35

ТЕМА 6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЛИВОЧНОГО МАСЛА 36
ТЕМА 7. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В СЫРОДЕЛИИ 38
1. Исследование качества сырого молока, используемого для производства сыра 38
2. Микробиологический анализ готового сыра 40
ТЕМА 8. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОЧНЫХ КОНСЕРВОВ 41
1. Микробиологический контроль сгущенного молока с сахаром 41
2. Микробиологический контроль сухих молочных продуктов 42
ТЕМА 9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ, ЗАКВАСКАХ, БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ 43
ТЕМА 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА БИФИДОБАКТЕРИЙ В КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ 45
ТЕМА 11. МИКРООРГАНИЗМЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ ПОРЧИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ 47
1. Гнилостные бактерии 47
2. Энтерококки 56
3. Маслянокислые бактерии 57
4. Термоустойчивые лактобациллы 57
5. Мицелиальные грибы 58
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 62
ПРИЛОЖЕНИЯ 63

Красникова Людмила Васильевна
Гунькова Полина Исаевна
Маркелова Вероника Витальевна

МИКРОБИОЛОГИЯ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Лабораторный практикум

Учебно-методическое пособие

Ответственный редактор
Т.Г. Смирнова

Редактор
Е.О. Трусова

Компьютерная верстка
Н.В. Гуральник

Дизайн обложки
Н.А. Потехина

Подписано в печать 16.08.2013. Формат 60×84 1/16
Усл. печ. л. 5,12. Печ. л. 5,5. Уч.-изд. л. 5,25
Тираж 50 экз. Заказ № С 55

НИУ ИТМО. 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49
ИИК ИХиБТ. 191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9