

УДК 637.136.5.579.67(045)

Е.Н. Бирюк, к.с-х.н., Н.Н. Фурик к.т.н., Т.М. Смоляк, И.П. Пыжик,
Н.И. Олешкевич, В.А. Клапкова, Н.В. Карницкая
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ ИНТЕГРАЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАКВАСКАХ

(Поступила в редакцию 4 апреля 2016 г.)

В статье приведены результаты разработки, валидации и апробации методики выполнения измерений интегрального содержания пробиотических микроорганизмов в кисломолочных продуктах и бактериальных заквасках.

Ключевые слова: МВИ, пробиотические микроорганизмы, бактериальные закваски, кисломолочные продукты.

Введение. В настоящее время во всем мире наблюдается тенденция к расширению спектра пробиотических культур, используемых в функциональном питании, и ужесточаются требования к данным культурам. Изготовленные на основе заквасок и пробиотических микроорганизмов молочные продукты должны содержать достаточное количество заквасочных микроорганизмов в нужных видовых соотношениях. Для этого требуется проведение систематического контроля показателей качества продукции, как изготовителями, так и органами надзора. При контроле микроорганизмов для молочной промышленности лабораторная служба руководствуется целым перечнем методов, изложенных как в ГОСТированных, так и в отраслевых документах, поэтому разработка и аттестация методики выполнения измерений (МВИ) интегрального содержания пробиотических микроорганизмов в ферментированных молочных продуктах и бактериальных заквасках является актуальной.

Материалы, методы, объекты исследования. Информационная проработка осуществлена с использованием реферативных, информационных и патентных материалов, отечественных и зарубежных журналов, данных интернет-сайтов, в т.ч. ГОСТ [1–12].

В качестве объектов исследования использовали:

- 10 штаммов лактобактерий (*L.plantarum* L31/1, *L.casei* Бф11, *L.helveticus* a28/4, *L.acidophilus* a35/2 и L35/6, *L.rhamnosus* pl25/1, *L.gasseri* L9/1, *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* b18/2, *L.delbrueckii* subsp. *lactis* L39/4, *L.fermentum* L36/2);

- 4 штамма бифидобактерий: *B. adolescentis* Б19, *B. bifidum* BF27, *B.animalis* ssp. *lactis* Б39, *B. longum* С14;

- 3 штамма пропионовокислых бактерий: *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* Pr 2, *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* Pr 3 и *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* Pr 106.

При разработке методики, для получения экспериментальных данных, использовали следующие виды продукции:

- комплект из 3 концентрированных бактериальных заквасок: закваска концентрированная лактобактерий (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L.helveticus*, *L. acidophilus*), закваска концентрированная бифидобактерий (*B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. Longum*), закваска концентрированная пропионовокислых бактерий

(P. freudenreichii subsp. freudenreichii);

- йогурт 1 (жирность 1,5 %, производитель ОАО «Бабушкна крынка», г. Могилев);
- йогурт 2 (жирность 3.0 %, производитель ОАО «Молочный мир» г. Гродно);
- йогурт 3 (жирность 5 %, производитель ОАО «Савушкин продукт» г. Брест);
- йогурт 4 (жирность 7 %, производитель ОАО «Бабушкна крынка», г. Могилев);
- йогурт 5 (жирность 8 %, производитель ОАО «Молочный мир» г. Гродно).

Для апробации разработанной методики выполнения измерений интегрального содержания пробиотических микроорганизмов были отобраны следующие образцы кисломолочной продукции и поливидовых заквасок:

1. Активиа, био йогурт (Danon, РФ).
2. Actimel, кисломолочный напиток (Danon, РФ).
3. Neo Имунеле Natural, напиток кисломолочный с соком, 1,2% обогащенный пробиотиками (ОАО «Вимм-Биль-Дамм», РФ).
4. Бифидин, биопродукт (ООО «Биомолпром», РБ).
5. Аристей, греческий йогурт (Минский Молочный Завод №1, РБ).
6. Сметана «Славянские традиции с бифидобактериями» 18% (Минский Молочный Завод №1, РБ).
7. Бифиленд, продукт кисломолочный (ОАО «Сморгонские молочные продукты» или ОАО «Бабушкина крынка», РБ).
8. BioTrio, йогурт (ОАО «Здравушка-милк», РБ).
9. Сметана «Пан Мысліцкі» 15% (ОАО «Щучинский МСЗ» производственный цех «Слоним», РБ).
10. Сыр Ланбергольд Гранд (ОАО «Пружанский молочный комбинат», РБ).
11. Сыр «Альдамер» (Польша).
12. Закваска сухая концентрированная «Пробилакт-2» (РУП «Институт мясо-молочной промышленности»).
13. Закваска сухая концентрированная термофильного стрептококка и болгарской палочки «ТЛББв» (РУП «Институт мясо-молочной промышленности»).

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследований был осуществлен подбор питательных сред для культивирования бифидо-, лакто- и пропионовокислых бактерий. Изучен рост коллекционных штаммов бифидобактерий на трех питательных средах: Блаурока, кукурузно-лактозная (ГМК-1), гидрализатно-молочная (ГМС); лактобактерий на 4-х питательных средах: МРС, Рогоза, ГО, Бликфельда; пропионовокислых бактерий на трех питательных средах: ПГС, ГМК-1, среда с лактатом кальция. Установлены различия в характере роста исследуемых культур на указанных средах. Анализ полученных результатов показал, что в количественном отношении лучший рост исследуемых культур бифидобактерий отмечен на среде ГМК-1, лактобактерий – на средах Рогоза и МРС, пропионовокислых бактерий на среде с лактатом кальция.

Проект МВИ был разработан в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010-99 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения» [13].

В основу проекта МВИ были положены следующие критерии:

- методика основана на высеве определенного количества продукта и (или) его разведений в жидкие или агаризованные селективные питательные среды, культивирование посевов при оптимальных условиях и, при необходимости, определении морфологических свойств обнаруженных микроорганизмов и их подсчете.

- методика предназначена для установления соответствия микробиологических показателей качества ферментированных молочных продуктов и бактериальных заквасок требованиям нормативно-технической документации.

Одной из основных целей стандартизации метода является устранение

различий между пользователями (лабораториями), насколько это возможно, и данные, полученные в эксперименте по оценке точности, свидетельствуют о том, насколько эффективно данная цель была достигнута [14].

Изучение содержания пробиотических микроорганизмов в кисломолочных продуктах и концентрированных заквасках проводили в условиях воспроизводимости с участием трех производственных лабораторий: производственно-испытательной лаборатории РУП «Институт мясо-молочной промышленности», производственной лаборатории ОАО «Гормолзавод №2», производственной лаборатории УП «Минский хладокомбинат №2».

Анализ данных предусматривал три этапа:

- критическое рассмотрение данных с целью обнаружения и обработки выбросов и других нарушений;
- расчёт предварительных значений прецизионности и средних значений для каждого уровня отдельно;
- установление окончательных значений прецизионности и средних значений.

В ходе проведения межлабораторного эксперимента были определены основные метрологические характеристики по оперативному контролю повторяемости и воспроизводимости разработанной методики.

Для определения метрологических характеристик были использованы 17 коллекционных штаммов.

Эксперимент проводился в соответствии с перечисленными этапами:

- определение комплекта из 10 коллекционных штаммов лактобактерий, 4 коллекционных штаммов бифидобактерий и 3 коллекционных штаммов пропионовокислых бактерий.
- получение каждой из лабораторий групп повторных независимых результатов измерений n при строго определенных условиях повторяемости;
- статистический анализ полученных групп результатов измерений с точки зрения их совместимости и наличия выбросов;
- расчет средних значений, оценок стандартных отклонений на основании невыбросовых значений;
- расчет стандартного отклонения внутрилабораторной повторяемости, стандартного отклонения воспроизводимости, предела повторяемости r и предела воспроизводимости R .

При валидации были выбраны следующие валидационные характеристики и показатели точности:

- СКО и предел повторяемости;
- СКО и предел воспроизводимости.

В результате валидации методики при проведении межлабораторного эксперимента для каждого из уровней были рассчитаны: среднее значение, стандартное отклонение повторяемости S_{rj} ($3,93 \times 10^7$ для лактобактерий, $1,27 \times 10^8$ для бифидобактерий и $3,00 \times 10^7$ для пропионовокислых бактерий) стандартное отклонение воспроизводимости S_{Rj} (соответственно $8,45 \times 10^7$, $1,35 \times 10^8$, $7,78 \times 10^7$) предел повторяемости r (соответственно $1,10 \times 10^8$, $1,35 \times 10^8$, $8,4 \times 10^7$) и предел воспроизводимости R (соответственно $2,37 \times 10^8$, $3,78 \times 10^8$, $2,18 \times 10^8$).

Результаты испытаний, полученные разными операторами в различных лабораториях, были проверены на наличие выбросов и разбросов с помощью числового метода по критерию Граббса. Установлено, что единичные разбросы и выбросы отсутствуют, что свидетельствует о приемлемости измерений.

Для проведения апробационных испытаний в лабораторных условиях МВИ по определению интегрального содержания пробиотических микроорганизмов в ферментированных молочных продуктах и концентрированных бактериальных заквасках использованы образцы различных заквасок и йогуртов. Апробационные

экспериментальные значения не превышали установленных пределов повторяемости r и предела воспроизводимости R , что свидетельствует о приемлемости полученных результатов в соответствии с разработанной МВИ.

При оценке неопределённости измерения использовали стандартное отклонение воспроизводимости S_R , как включающее большее по сравнению со стандартным отклонением повторяемости S_r количество составляющих неопределённости.

Прецизионность методики определения пробиотических микроорганизмов представлена в таблице 1, значения суммарной стандартной и расширенной неопределённости – в таблице 2.

Таблица 1 – Значения показателей повторяемости и воспроизводимости

Виды продукции	Показатель повторяемости (S_r) (СКО повторяемости), КОЕ/г	Показатель воспроизводимости (S_R) (СКО воспроизводимости), КОЕ/г	Предел повторяемости (r), (для двух результатов параллельных определений), КОЕ/г	Предел воспроизводимости (R), (для двух единичных измерений), КОЕ/г
Закваска концентрированная лактобактерий	$2,6 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$
Закваска концентрированная бифидобактерий	$1,8 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$
Закваска концентрированная пропионовокислых бактерий	$4,1 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
Ферментированные молочные продукты с лактобактериями	$2,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$	$7,0 \times 10^7$
Ферментированные молочные продукты с бифидобактериями	$2,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$

Таблица 2 – Оценка неопределённости результатов измерений, выполненная в соответствии с МВИ

Виды продукции	Суммарная стандартная неопределённость (u), КОЕ/г	Расширенная неопределённость (U)*, КОЕ/г
Закваска концентрированная лактобактерий	$2,8 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$
Закваска концентрированная бифидобактерий	$1,8 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$
Закваска концентрированная пропионовокислых бактерий	$4,4 \times 10^7$	$8,7 \times 10^7$
Ферментированные молочные продукты с лактобактериями	$2,3 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$
Ферментированные молочные продукты с бифидобактериями	$2,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^7$

* $k=2$, $P=95\%$

На заключительном этапе работы были проведены исследования по апробации разработанной методики на кисломолочной продукции (сметана, йогурт, кисломолочные напитки) и поливидовых концентрированных заквасках.

Для определения присутствия и подсчета количества бактерий рода *Lactobacillus* проводили посев на среду MRS, бактерий рода *Bifidobacterium* – на среду ГМК-1, пропионовокислых бактерий – на среду с лактатом кальция. Результаты посевов приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты микробиологических посевов из разных кисломолочных продуктов и поливидовых заквасок

Наименование продукта	Количество микроорганизмов, КОЕ/г		
	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Propionibacterium sp.</i>
<u>напиток кисломолочный:</u>			
Actimel	4,5x10 ⁸	-	-
Нео Имунеле Natural	5,0x10 ⁷	-	-
<u>биопродукт:</u>			
Бифидин	-	1,5x10 ⁸	-
Бифиленд	-	4,2x10 ⁸	-
<u>биоогурт:</u>			
Активиа	3,3x10 ⁸	3,45x10 ⁸	-
Аристей	-	2,5x10 ⁶	-
БиоТгю	1,2x10 ⁷	2,5x10 ⁶	-
<u>сметана:</u>			
Славянские традиции с бифидобактериями	-	2,1x10 ⁶	-
Пан Мыслицкі	-	1,3x10 ⁷	-
<u>сыр:</u>			
Ланбергольд Гранд	-	-	7,5x10 ³
Альдамер	-	-	1,7x10 ⁴
<u>закваски сухие концентрированные поливидовые:</u>			
Пробилакт-2	3,1x10 ⁹	-	-
ТЛБВ	1,5x10 ⁹	-	-

Полученные экспериментальные данные по кисломолочной продукции (напитки кисломолочные, биоогурты, биопродукты, сметана) и сухим концентрированным закваскам соответствовали данным приведенным на товарных этикетках.

Заключение. Разработанная методика выполнения измерений интегрального содержания пробиотических микроорганизмов в кисломолочных продуктах и концентрированных заквасках позволяет получать результаты испытаний, удовлетворяющие предварительно установленным критериям приемлемости и может быть использована для количественного определения пробиотических микроорганизмов в кисломолочных продуктах и концентрированных заквасках микробиологическим методом.

Список использованных источников

1. Способ приготовления питательной среды для культивирования бифидобактерий и лактобактерий: пат. 2250259 междунар.: МПК А23С9/12С12Н1/20 (2005) / С.С. Есиев, В.К. Ильин, Л.В. Ракитская; дата публ.: 20.04.2005.

Sposob prigotovlenija pitatel'noj sredy dlja kultivirovanija bifidobakterij i laktobakterij [Method for preparing the nutrient medium for the cultivation of bifidobacteria and lactobacilli]: pat. 2250259: МПК А23С9/12С12Н1/20 (2005) / S.S. Esiev, V.K. Il'in, L.V. Rakitskaja; data publ.: 20.04.2005.

2. Питательная среда для культивирования лактобактерий: пат. 2415922 междунар.: МПК С12Н1/20С12Р1/225 (2009) / Л.Д. Тимченко, Н.И. Пенкова, В.Н. Вакулин, Я.В. Тарантат, Л.С. Катунина; дата публ.: 10.04.2011.

Pital'naja sreda dlja kul'tivirovanija laktobakterij [The nutrient medium for the cultivation of lactobacilli]: pat. 2415922 mezhdunar.: MPK S12N1/20S12R1/225 (2009) / L.D. Timchenko, N.I. Penkova, V.N. Vakulin, Ja.V. Tarantat, L.S. Katunina; data publ.: 10.04.2011.

3. Питательная среда для культивирования бифидобактерий: пат. 2438815 междунар.: МПК В21Д3/00 (2009) / В.М. Критский, С.И. Журавлев, А.Я. Сударкин; дата публ.: 10.05.2010.

Pital'naja sreda dlja kul'tivirovanija bifidobakterij [The nutrient medium for the cultivation of bifidobacteria]: pat. 2438815 mezhdunar.: MPK V21D3/00 (2009) / V.M. Kritskij, S.I. Zhuravlev, A.Ja. Sudarkin; data publ.: 10.05.2010.

4. Жиленкова, О.Г. Селекция производственно перспективных штаммов бифидобактерий, выделенных от детей: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.03, 03.01.06 / О.Г. Жиленкова; Рос. акад. наук, Ин-т эпидемиолог. и микробиол. – М., 2011. – 30 с.

Zhilenkova, O.G. Selekcija proizvodstvenno perspektivnyh shtammov bifidobakterij, vydelennyh ot detej [Selection of the production strains of bifidobacteria isolated from children]: avtoref. diss. ... kand. biol. nauk: 03.02.03, 03.01.06 / O.G. Zhilenkova; Ros. akad. nauk, In-t jepidemiolog. i mikrobiol. – M., 2011. – 30 s.

5. Пиксасова, О.В. Новый подход к молекулярной диагностике бифидобактерий : автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / О.В. Пиксанова; МГУ. – М., 2009. – 25 с.

Piksasova, O.V. Novyj podhod k molekularnoj diagnostike bifidobakterij [A new approach to molecular diagnostics of bifidobacteria]: avtoref. diss. ... kand. biol. nauk: 03.00.07 / O.V. Piksanova; MGU. – M., 2009. – 25 s.

6. Хамагаева, И.С. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий / И.С. Хамагаева, Л.М. Качанина, С.М. Тумурова. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006. – 172 с.

Hamagaeva, I.S., Biotehnologija zakvasok propionovokislyh bakterij [Biotechnology of the propionic acid bacteria starter cultures] / I.S. Hamagaeva, L.M. Kachanina, S.M. Tumurova. – Ulan-Udje: Izd-vo VSGTU, 2006. – 172 s.

7. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения: СТБ ИСО 5725-1-2002; введ. РБ 01.07.2003. – Минск: Госстандарт РБ, 2003. – 23 с.

Tochnost' (pravil'nost' i precizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenij. Chast' 1. Obshhie principy i opredelenija [Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1: General principles and definitions]: STB ISO 5725-1-2002; vved. RB 01.07.2003. – Minsk: Gosstandart RB 2003. – 23 s.

8. Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов: ГОСТ 10444.11-89; введ. 01.01.1991. – М.: Госагропром СССР, 1991. – 19 с.

Produkty pishhevye. Metody opredelenija molochnokislyh mikroorganizmov [Food products. Methods for determination of lactic acid microorganisms]: GOST 10444.11-89; vved.01.01.1991. – M.: Gosagroprom SSSR, 1991. – 19 s.

9. Йогурты. Общие технические условия: СТБ 1552-2012; введ. 10.02.2012. – Минск: Госстандарт РБ, 2012. – 24 с.

Jogurty. Obshhie tehicheskie uslovija [Yogurt. General specifications]: STB 1552-2012; vved. 10.02.2012. – Minsk: Gosstandart RB, 2012. – 24 s.

10. Средства лекарственные для ветеринарного применения пробиотические. Методы определения пробиотических микроорганизмов: ГОСТ 31928-2013; введ. 01.07.2014. – М.: Стандартиформ, 2014. – 16 с.

Sredstva lekarstvennyye dlja veterinarnogo primenenija probioticheskie. Metody opredelenija probioticheskikh mikroorganizmov [Means of medicines for veterinary use,

probiotic. Methods for determination of probiotic microorganisms]: GOST 31928-2013; vved. 01.07.2014. – М.: Standartinform, 2014. – 16 s.

11. Сборник инструкций по санитарно-микробиологическому контролю. Метод определения бифидобактерий в пищевых продуктах: инструкция по применению /ГУ РНПЦ гигиены, Мн.: 2009. – 88 с.

Sbornik instrukcij po sanitarno-mikrobiologicheskomu kontrolju. Metod opredelenija bifidobakterij v pishhevyh produktah [Collection instruction for the sanitary-microbiological control. Method for determination of bifidobacteria in food]: instrukcija po primeneniju /GU RNPC gigieny, Mn.: 2009. – 88 s.

12. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа: ГОСТ 9225-84, введ. 01.01.1986. утв.: Стандартиформ, 2009. – 15 с.

Moloko i molochnye produkty. Metody mikrobiologicheskogo analiza [Milk and dairy products. Methods of microbiological analysis]: GOST 9225-84, vved. 01.01.1986. - Standartinform, 2009. – 15 s.

13. Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения: ГОСТ 8.010-99, введ. 01.06.2001. – Минск: Госстандарт РБ, 2010. – 18 с.

Gosudarstvennaja sistema obespechenija edinstva izmerenij. Metodiki vypolnenija izmerenij. Osnovnye polozhenija [State system for ensuring the uniformity of measurements. Methods of the measurement. The main provisions]: GOST 8.010-99, vved. 01.06.2001. – Minsk: Gosstandart RB, 2010. – 18 s.

14. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений: СТБ ИСО 5725-2-2002. введ. РБ 01.11.2002. – Минск: Госстандарт РБ, 2003. – 62 с.

Tochnost' (pravil'nost' i precizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenij. Chast' 2. Osnovnoj metod opredelenija povtorjaemosti i vosproizvodimosti standartnogo metoda izmerenij [Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method]: STB ISO 5725-2-2002. vved. RB 01.11.2002. – Minsk: Gosstandart RB, 2003. – 62 s.

*A. Biruk, N. Furik, T. Smaliak, I. Pyzhik,
N. Aliashkevich, V. Klapkovova, N. Karnitskaya
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

DEVELOPMENT OF MEASUREMENT TECHNIQUE OF INTEGRAL CONTENT OF PROBIOTIC MICROORGANISMS IN FERMENTED MILK PRODUCTS AND BACTERIAL STARTERS

Summary

The article describes the results of the work on the development, validation and testing of procedure of measurements of the integral content of probiotic microorganisms in fermented milk products and bacterial cultures.

Keywords: procedure of measurements, probiotic microorganisms, bacterial starters, fermented milk products.