

## Слайд 1

**Здравствуйте, уважаемые члены аттестационной комиссии!**

Тема моей выпускной квалификационной работы – **«ПРОБИОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ШТАММОВ PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII**

**(Микробиологическая защита пшеничного хлеба от «картофельной болезни» с помощью Propionibacterium freudenreichii)».**

Поиск новых пробиотиков - **современная и актуальная проблема.**

Важные вопросы, которые сейчас являются открытыми, состоят в следующем обязательно ли ПРО должны выживать в ЖКТ (болгарская палочка нежизнеспособна), прикрепляться к эпителию кишечника, колонизировать его (размножаться), вносят ли они вклад в здоровье человека (животного) в целом и какой конкретно.

## Слайд 2

**Цель работы** - обнаружение действия исследуемых штаммов классических пропионовокислых бактерий (*P. Propionibacterium*) в качестве пробиотиков, начальное изучение их пробиотически значимых свойств и разработка новых способов защиты пшеничного хлеба от гнилостного поражения.

**Задачи** данной работы Вы можете увидеть на данном слайде.

## Слайд 3

Пропионовокислые бактерии (ПКБ) образуют компактный филогенетический кластер в домене (империи или надцарстве) Bacteria. Они принадлежат к царству или филетической линии «Грамположительные бактерии», ветви с высоким содержанием ГЦ-пар в хромосомной ДНК. ПКБ объединены в род *Propionibacterium*, который входит в состав семейства Propionibacteriaceae.

Пропионовокислые бактерии в составе «коктейлей», предлагаемых для пищевой промышленности, указаны в таблице на слайде.

## Слайд 4

В теплых и влажных краях даже свежеспеченный хлеб очень быстро (в течение 2-х суток хранения) заболевает «картофельной болезнью», обусловленной развитием гнилостной микробиоты в мякише, которое превращает его в слизистый сгусток (рис. 6). Это обусловлено присутствием в муке спор бактерий *P. Bacillus* (*B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. Cereus* и др.) в концентрации 10 - 1000 на 1 г муки. При их прорастании происходят большие потери хлеба.

Преимущества микробиологической защиты хлеба заквасочным способом очевидны отсутствие вредных химических примесей, возможность введения кислот (солей) как антимикробных агентов вместе с клетками (возможно, пробиотиками), обогащение хлеба нутрицевтиками и пребиотиками. (но не в случае МКБ).

Визуальное обнаружение «картофельной болезни» пшеничного хлеба [Pere et al., 2003] – представлено на слайде презентации.

## Слайд 5

## Визуально наблюдаемое качество хлеба при использовании заквасок разных типов обозначения:

Стандартная дрожжевая закваска

Закваска ПКБ (*Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* ВКМ 103)

Закваска типа «жидкие дрожжи»

Закваска с молочнокислыми бактериями

Последовательное культивирование МКБ и ПКБ на мучной среде теоретически возможно, поскольку лактат является естественным субстратом для развития ПКБ (трофическая цепь, действующая, например, при созревании твёрдых сыров высшего качества), а мучная среда может быть модифицирована благодаря активным протеолитическим ферментам МКБ.



**Дипломный доклад**  
**990 руб.**

- ✓ Оплата после выполнения
- ✓ Любые дисциплины
- ✓ Срок от 1 часа

Почта: [9186862@mail.ru](mailto:9186862@mail.ru)  
Телефон: 8-919-918-6862

**Вакадеме.ру**

### Слайд 6

Бактерии культивировали на мСС 72 ч при 30°C при свободном доступе воздуха и при периодической нейтрализации образуемых кислот [Данилова и др., 2006]. Выращенные культуры хранят при 6°C. Образцы для анализа должны быть нейтральными (рН 6,8-7,0). Концентрация живых клеток в конце культивирования измеряют ((3-4) x 10<sup>9</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>).

Для измерения антиоксидантной активности ПКБ использовали электрохимический метод катодной вольтамперометрии. Методика эксперимента заключается в получении вольтамперограмм катодного восстановления кислорода с помощью портативного программируемого анализатора «Антиоксидант» (фирма «Полиант», г. Томск).

В предварительных исследованиях устанавливаем технологически значимые параметры действия исследуемых ПКБ в защите пшеничного хлеба от КБ. Были определены действующие концентрации пропионата натрия (90% подавление развития бацилл) на мучной среде. Они оказались более высокими, чем на пСС-А,Б. Вместе с тем, стало понятным, что чем «богаче» среда, тем выше действующая концентрация пропионата, что не является неожиданным. Пропионаты в мучной среде эффективны против бацилл в концентрации 0,24 - 0,30 %. Далее подтверждаем, что культуральная жидкость *P. Freudenreichii* действительно эффективно (на 90%) подавляет развитие бацилл при условии ее внесения в мучную среду в количестве не менее 20 %. Измерение концентрации ЛЖК показывает, что при этом в мучной среде содержится 0,183% пропионата и 0,09% ацетата натрия, и этого оказалось достаточно для подавления прорастания спор бацилл. Наконец, учитывая безопасность классических ПКБ и их потенциальную пробиотическую значимость для человека, предложено не отделять клетки от культуральной жидкости, а использовать цельные культуры для внесения в тесто. Результаты представлены на рисунке – слайд презентации.

#### **Слайд 7**

В результате проведенных исследований мы установили отсутствие стабильного роста культуры ПКБ на ЭМС. Для преодоления этого явления, т. е. для обеспечения роста ПКБ в мучной среде, обогатили ее компонентами полусинтетической среды (пСС-Б) без глюкозы, но включая триптон, и добились удвоения биомассы ПКБ за 24 часа.

Данные, представленные на слайде презентации, показывают циклическое (поэтапное) удвоение биомассы ПКБ на обогащённой ЭМС в нестерильных условиях после двукратного разбавления. Процедура приготовления закваски в модельной системе включала следующее: половину сырой биомассы (~ 1,5 мг/мл по АСБ) из 100 мл 96-ти суточной культуры на пСС-Б помещали в 100 мл нестерильной обогащенной ЭМС и инкубировали 24 часа. Биомасса возрастала вдвое. Затем после нейтрализации добавляли равный объём той же свежей мучной среды (рН 7,0), инкубировали и процесс двукратного разбавления/инкубирования повторяли.

В течение 5-ти циклов (этапов) сохранялась микробиологическая чистота искусственной закваски. При этом концентрация пропионата в конце каждого этапа составляла ~ 0,6%. Для увеличения концентрации пропионата на последнем этапе накопления закваски (перед внесением в тесто) время инкубирования увеличивали до 48 часов. Концентрация пропионата возрастала до 0,8 %. Расчет показал, что при внесении такой закваски в дрожжевое тесто (20% к массе муки) после выпечки, когда происходит уменьшение объема материала, достигаемая концентрация пропионата (см. рис. 4) может препятствовать развитию бацилл в хлебе.

Таким образом, путем обогащения мучной среды (ЭМС) компонентами пСС-Б была разработана модель накопительной закваски на основе ПКБ для дрожжевого теста.

#### **Слайд 8**

Световая микроскопия комплексной закваски натуральной нестерильной мучной среды (оМПЗ) на основе МКБ+ПКБ: а — первый этап накопления закваски; б - пятый этап – представлена на слайде презентации.

#### **Слайд 9**

Общий вид выпеченного пшеничного хлеба с применением заквасок на основе МКБ+ПКБ и МКБ (слева направо):

1 - контроль (без заквасок) - устойчивость хлеба к заболеванию «картофельной болезнью» 48 ч;

2 - закваска МКБ+ПКБ, 5% в тесте - устойчивость 192 ч;

3 - закваска МКБ+ПКБ, 10% в тесте - устойчивость 216 ч;

4 -закваска МКБ, 10% в тесте - устойчивость 96 ч.

**Вывод:** Научные предпосылки (сведения из литературы) и полученные нами данные свидетельствуют о широком спектре свойств классической ПКБ, которые имеют значения для проявления ее пробиотических эффектов, однако испытаний для выявления пробиотического действия *P. freudenreichii* на животных проведено немного. Расширение таких исследований на животных и пациентах-добровольцах должно стимулировать разработку и применение пробиотических препаратов на основе *P. freudenreichii*. При этом пропионовокислая культура на нестерильной мучной среде (ПКБ-закваска) не должна быть вытеснена контаминирующей микрофлорой. Эта технологическая стратегия для ПКБ оказалась возможной только на основе трофической цепи: МКБ - ПКБ. Сами по себе пропионовые бактерии, не способны к росту на мучной среде. Вместе с тем, термофильная МКБ:*L. Delbrueckii* превращает глюкозу, но преимущественно мальтозу «осахаренного» жидкого теста (заварки), в молочную кислоту, которая, с одной стороны, подавляет развитие спонтанных бактерий (МКБ), а с другой - после превращения ее в лактат, является источником углерода и энергии для развития ПКБ. Этот простой (экономичный и удобный) способ позволил решить проблему защиты пшеничного хлеба от «картофельной болезни» при улучшении его органолептических, физических инутрицевтических свойств. Предположительно хлеб обогащается биологически активными веществами, выделяемыми *P. freudenreichii*, а убитые нагреванием (при выпечке) клетки способны, возможно, оказывать иммуностропное действие (аналогия с *P. jensenii* 702).

#### **Слайд 10**

**Таким образом, Цель работы достигнута.**

Спасибо за внимание! Доклад окончен.