

УДК 637.1

А.А. Майоров**АНАЛИЗ ПАРАМЕТРОВ СУЩЕСТВОВАНИЯ
И РАЗМНОЖЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Проведен анализ соотношений вероятностей различных переходов с численностью микроорганизмов на различных этапах развития. При сопоставлении этих параметров с параметрами среды обитания (температура, активная кислотность, окислительно-восстановительный потенциал и др.) можно определить степень влияния каждого из них. Полученные результаты и зависимости предложено использовать при моделировании процессов развития микроорганизмов в различных средах, в том числе и в сырной массе.

Развитие микроорганизмов, среда обитания, сыр, процесс культивирования, алгоритм оптимизации.

Развитие микроорганизмов играет наиболее существенную роль в производстве молочных продуктов [1, 2]. Для успешного размножения необходимо обеспечить им соответствующие условия. Способность к размножению лучше всего оценивать на основе теории вероятности. При этом рассчитывается вероятность деления одной клетки, пребывающей в конкретных условиях, характеризующихся наличием и концентрацией субстрата, активностью воды, активной кислотностью, массовой долей соли и рядом других параметров, влияющих на жизнедеятельность клетки [3, 5, 7].

Это можно делать на основе специальных экспериментов или на основе ранее проведенных экспериментов, в которых фиксировались условия проведения. Второй способ требует формирования достаточно большой базы данных, на основе которой можно спрогнозировать поведение бактерий в тех или иных условиях. Задача эта при большой, на первый взгляд, сложности требует строго формализованного подхода к описанию как свойств микроорганизмов, так и свойств среды обитания. Современные методы математического моделирования позволяют решать задачи прогнозирования поведения объектов во взаимодействии со средой [6, 10].

Следует отличать развитие микроорганизмов в замкнутой (нерегулируемой) среде и регулируемой. Кроме того, могут существовать частично регулируемые системы. К нерегулируемой системе следует отнести систему, на которую внешние воздействия не влияют или влияют пренебрежимо мало. Идеалом такого варианта системы следует считать термоизолированный герметичный объем, в котором находится субстрат с исходной численностью микроорганизмов. Условно к такой системе можно отнести сырную массу на этапе созревания [11, 13]. Основные физико-химические процессы в сыре происходят под влиянием ферментов, химических компонентов, входящих в состав сырной массы. Микроорганизмы активно участвуют в этом процессе, поглощая пита-

тельные вещества, выделяя продукты метаболизма, изменяя среду обитания. Воздействовать на их активность в процессе созревания сыра можно только через температуру. Снижение температуры вызывает снижение скорости размножения, а повышение температуры ведет к ускорению процессов деления клеток. Это характерно для большинства твердых и полутвердых сыров, где речь идет о диапазоне температур от 8 до 20 °С. В процессе созревания сыра изменяется также и его массовая доля влаги за счет испарения воды с поверхности. Доля эта невелика по отношению к массе сыра, но она может иметь определяющее значение для влияния на жизнедеятельность микроорганизмов.

Таким образом, сыр следует отнести к группе систем с частично регулируемыми параметрами. На практике это означает, что регулировать условия существования микроорганизмов внутри сырной массы можно, только изменяя температуру созревания и хранения.

Более поддающимся регулированию следует считать производство кисломолочных продуктов. Это реализуется обычно в емкостях, снабженных системой терморегулирования (охлаждение и нагрев) и мешалками, позволяющими перемешивать массу в процессе производства. Кроме того, в смесь можно добавлять различные ингредиенты, влияющие на условия существования микроорганизмов. Такими ингредиентами могут быть соль, сахар, ароматизаторы, консерванты, эмульгаторы, стабилизаторы и т.д. Такая система, являясь изолированной от внешней среды, управляема в более широком диапазоне. Однако объем этой системы и, следовательно, ее ресурсы ограничены, т.е. в данном объеме можно вырастить определенное количество микроорганизмов. Максимальная их концентрация ограничена не только наличием питательных веществ субстрата, но и целым рядом других факторов, среди которых следует выделить концентрационную зависимость.

В практике производства различных биопрепаратов используют так называемый проточный вариант ферментера, в котором максимально учтены возможности по регулированию условий существования микроорганизмов (бактерий). Аппараты такого типа снабжены, помимо устройств перемешивания и терморегулирования, еще и системами отбора продуктов жизнедеятельности, подачи питательных веществ, регулирования состава газовой фазы, подаваемой в субстрат. Ферментер такого типа должен быть оснащен специальными приборами контроля за параметрами культивирования микроорганизмов. Основным регулируемым параметром должна быть либо численность микроорганизмов в единице объема (объем биомассы), либо концентрация продукта их жизнедеятельности (фермента). Далеко не всегда эти два показателя взаимосвязаны. В таких случаях необходимо иметь информацию о влиянии качественных и количественных показателей субстрата (среды обитания) на выходные показатели (численность микроорганизмов, концентрацию интересующего фермента). Эта информация добывается при проведении специальных опытов, где варьируют параметрами среды обитания, выясняя действенность раздельного и совокупного влияния параметров среды обитания. На основании установленных закономерностей формируется программа управления процессом культивирования, в которой определяются основные и вспомогательные алгоритмы оптимизации процесса культивирования [14, 15].

Анализируя возможности тех или иных систем, реально можно определить диапазоны их управляемости и построить алгоритм управления, направленный на оптимизацию выходного параметра.

На практике существует необходимость анализа динамики развития микрофлоры в той или иной среде. При высокой концентрации микроорганизмов в единице объема влияние популяции на химический состав среды весьма велико и зачастую является решающим. Достаточно корректно можно исследовать влияние параметров среды на динамику развития микроорганизмов в специальных хеостагах, обеспечивающих стабильность условий культивирования [12, 13].

При культивировании в условиях изменяющейся среды анализ воздействия отдельных факторов затруднен, что приводит к неоднозначной интерпретации полученных результатов. Более детальную картину развития микроорганизмов в среде можно получить, используя метод реконструкции условий обитания (РУО). Одним из примеров использования метода может служить анализ динамики развития микрофлоры в сырах.

Развитие микрофлоры в сыре оценивается по результатам анализов на различных этапах производства. При переходе от одного этапа к другому на сыр, а следовательно и на микрофлору, оказывает влияние ряд факторов, учесть которое очень сложно. Реально каждый из факторов изменяется во времени, и определение доли влияния каждого из них на процесс развития микрофлоры представляет собой сложную задачу.

Дополнительную информацию о влиянии факторов можно получить на основании динамики изменения численности микрофлоры. Для этого следует провести дискретизацию процесса развития МФ с заданным шагом. Шаг дискретизации лучше выбирать соизмеримым с периодом генерации микроорганизмов (МО), например 0,5 часа. После этого можно переходить к построению дифференциальной кривой, которая в простейшем случае представляет собой разность в численности МФ на предыдущем и последующем шаге дискретизации:

$$D = Q_{i+1} - Q_i.$$

В идеальном случае, когда каждая клетка микроорганизмов делится на две:

$$Q_{i+1} = 2Q_i,$$

т.е. на каждом шаге происходит удвоение популяции МО.

Практически далеко не все микроорганизмы способны к делению.

Способность к делению определяется совокупностью факторов и может быть определена следующим образом:

$$K_i = \frac{Q_{i+1}}{2Q_i},$$

где Q_{i+1} – численность микроорганизмов в последующем поколении; Q_i – численность микроорганизмов в предыдущем поколении; K_i – коэффициент, характеризующий долю микроорганизмов, реализующих свою способность к делению.

Этот коэффициент можно интерпретировать как вероятность деления клеток на i -шаге. Это позволяет на каждом этапе деления рассчитывать вероятность деления клеток. В данном случае корректнее говорить не о вероятности деления, а о коэффициенте деления на конкретном этапе, который является совокупным коэффициентом влияния всех факторов, воздействию которых подвергаются микроорганизмы.

Зная общие закономерности влияния каждого из факторов на вероятность деления клеток МО, можно установить их долю влияния на различных этапах.

При анализе изменения численности как элементарного процесса деления клеток становится оправданным подход, основанный на оценке вероятности деления. В самом деле, процесс размножения микроорганизмов основан на делении конкретных микроорганизмов и развитие популяции в целом зависит от того, какая часть микроорганизмов поделится. Иначе говоря, можно представить процесс деления как вероятностный, стохастический. Переход клетки из состояния неподелившейся в поделившейся (две клетки) является дискретным. Сама вероятность деления в данном случае является функцией целого ряда факторов, в котором фактор времени является одним из многих.

Это может явиться в ряде случаев первостепенным, поскольку обычно описание развития микро-

флоры происходит в координатах «численность» – «время».

Использование вероятностных процессов при описании развития микроорганизмов позволяет также перейти к критериальным оценкам, которые очень важны при исследовании закономерностей, основанных на многоступенчатом влиянии большого количества факторов.

Если при использовании детерминированных функций можно со 100%-й уверенностью рассчитать показатель на основании изменения аргумента, связанного с ним функциональной зависимостью, то в отношении деления клеток это будет неправомочно. Даже при строго фиксированных показателях среды размножения микроорганизмов и работе со строго определенным штаммом нельзя с уверенностью сказать, что через строго определенный промежуток времени (например, 23,4 минуты) клетка поделится на две. Можно говорить только о том, что процесс деления может произойти в течение 22–25 минут при оговоренных условиях культивирования. То есть речь идет о том, что с высокой степенью вероятности деление произойдет между 22 и 25 минутами культивирования. Переходя к более строгим формулировкам, следует говорить именно о вероятности деления клеток в определенных временных рамках. График вероятности деления клетки может иметь несимметричную форму, поскольку ограничения в сторону ускорения процесса деления и в сторону его замедления имеют различный характер. Изменение условий культивирования меняет как координаты максимума, так и крутизну восходящей и нисходящей ветвей графика. При выходе условий культивирования за пределы оптимальной зоны вероятность снижается и при значительном удалении от этой зоны становится пренебрежимо малой. Огибающая этих кривых характеризует собой биокинетическую зону, т.е. зону, в которой возможно существование микроорганизмов с заданной вероятностью.

Вероятность деления клеток характеризует пророст, а точнее, скорость пророста во времени. Для полноты картины необходимо учитывать продолжительность продуктивного возраста клеток, которая может быть достаточно велика, но протекать без увеличения их численности. И наконец, важным элементом в общей картине развития микрооргани-

мов является период завершения жизнедеятельности микроорганизмов, отмирания клеток.

В зависимости от условий окружающей среды пребывание микроорганизмов в каждом из «этапов жизненного пути» может иметь различную продолжительность. В целом продолжительность цикла можно оценить на основании вероятностей пребывания микроорганизмов в трех основных состояниях.

С точки зрения математики использовать аппарат дифференциальных уравнений для описания процессов размножения микроорганизмов недостаточно корректно, поскольку применять его можно для непрерывных функций, а как уже ранее говорилось, процесс деления сам по себе является дискретным, т.е. прерывистым.

Если говорить о применимости математических аппаратов, то нельзя не отметить, что одним из эффективных методов анализа процессов размножения микроорганизмов может служить теория массового обслуживания (ТМО) с использованием цепей Маркова. При этом переход из одного состояния в другое можно описать с помощью расчета вероятности или интенсивности переходов. Представить процесс размножения можно в виде переходов из одного состояния в другое.

Все микроорганизмы (клетки) можно условно поделить на три группы, находящиеся в разных состояниях. В первую группу следует отнести микроорганизмы, способные к делению в пределах продолжительности одной генерации (продуктивная категория).

Ко второй группе относятся микроорганизмы, находящиеся в непродуктивной стадии, но потенциально способные к делению на последующих этапах (реверсивная категория). Эта категория может быть разделена на подгруппы, отличающиеся друг от друга в зависимости от предыстории. В этой категории должны наличествовать клетки, пребывающие в адапционном состоянии после деления, клетки, подвергшиеся мутационным воздействиям и антагонистическому воздействию других клеток, лишенные достаточных количеств питательных веществ и т.д. Это может уточняться при необходимости моделирования на уровне биохимических и биофизических процессов. В любом случае предполагается, что клетки этой категории сохраняют потенциальную возможность деления.

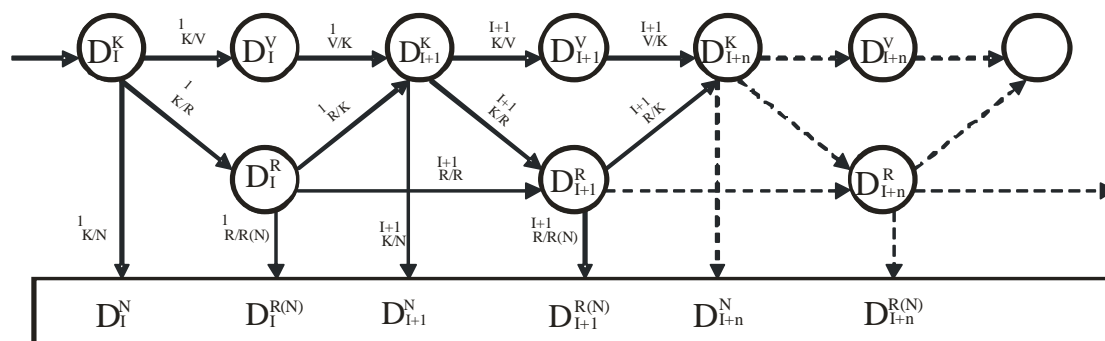


Рис. 1. Схема деления микроорганизмов

Третью группу составляют микроорганизмы, необратимо потерявшие способность к размножению (нереверсивная категория). Эта группа не определяется при проведении микробиологических исследований посевом на средах, но может вносить искажения в интерпретацию динамики развития микроорганизмов при измерении ее численности нефелометрическими или турбидиметрическими методами. Эту тонкость в использовании данных о численности необходимо учитывать, поскольку она очень важна для правильного построения модели и трактовки результатов исследований. В отношении молочнокислой микрофлоры принято считать, что клетки, полученные после деления материнской, являются равноценными. Накопление дефектов, приводящих к бесплодию клеток, происходит равновероятно для обеих ветвей, получающихся в процессе размножения. Это не означает, что число делений неограниченно даже при благоприятных условиях размножения. Вследствие накопления ошибок в результате последовательных генераций часть популяции подвергается мутациям, приобретая новые свойства, часть теряет способность к размножению в результате необратимых изменений в наследственном аппарате.

При построении математической модели развития популяции на основе теории массового обслуживания (ТМО) с использованием цепей Маркова общую схему можно представить в виде размеченного графа, включающего все состояния системы с заданными интенсивностями переходов (рис. 1). Число состояний зависит от сложности рассматриваемой модели процесса.

На начальном этапе имеется популяция, содержащая D_1 микроорганизмов. Под воздействием комплекса внутренних и внешних факторов происходит переход популяции в состояние V с численностью D_1^V продуктивных единиц с выделением категории N (нереверсивной) и категории R (реверсивной) с численностью D_1^N и D_1^R соответственно. Интенсивность переходов из состояния K в состояния V , N и R описывается коэффициентами $\lambda_{K/V}^1(\tau)$, $\lambda_{K/N}^1(\tau)$ и $\lambda_{K/R}^1(\tau)$. Величина этих коэффициентов зависит от совокупного влияния факторов воздействия на популяцию. При наличии вероятности обратных переходов в описании процессов используются соответствующие коэффициенты $\lambda_{n/i}$. Каждый из переходов может быть охарактеризован определенными интенсивностями. В данном случае исходя из заданных определений часть реверсивной категории может пополнить продуктивную категорию в следующем периоде размножения, другая часть реверсивной категории может перейти в аналогичную категорию в дальнейшем размножении.

С точки зрения формального подхода часть реверсивной категории, переходящей в аналогичную категорию следующего периода, можно рассматривать как часть нереверсивной, поскольку ее роль в процессе развития популяции такая же, как и у нереверсивной, при стационарно протекающем процессе изменения параметров окружающей среды. Но в целом для построения корректной модели и правильного восприятия ее поведения при исследованиях

следует сохранить структуру переходов в том состоянии, в котором она приведена на рис. 1.

Приведенную на рис. 1 схему можно заменить на рекурсивную, т.е. повторяющую саму себя на каждом из этапов размножения. Тогда в схеме размножения, как уже ранее упоминалось, будут наличествовать пять групп микроорганизмов (пять состояний). На самом деле в схеме участвуют три группы: продуктивная, непродуктивная реверсивная и нереверсивная непродуктивная (отмирающие клетки). Четвертой и пятой группами является гипотетическая часть микроорганизмов, представляющая собой микроорганизмы, находящиеся в метастабильном состоянии, и группа микроорганизмов, представляющая новое поколение, т.е. удвоенная численность продуктивной группы предыдущего поколения.

Граф состояний такой системы приведен на рис. 2. Группа микроорганизмов в состоянии S_1 (метастабильное состояние) переходит в состояние S_2 (реверсивная группа) и S_5 (нереверсивная группа). Часть микроорганизмов из состояния S_1 переходит в состояние S_3 (продуктивная группа). Интенсивность переходов из одного состояния в другое характеризуется соответствующими коэффициентами λ_i .

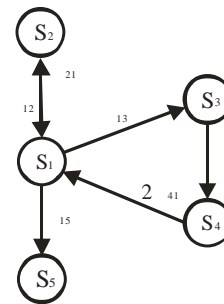


Рис. 2. Граф состояний системы микроорганизмов

Исходя из предположения, что численность микроорганизмов, находящихся в среде в любом из состояний системы S_i , есть величина случайная с экспоненциальной функцией распределения и интенсивностью переходов на данном этапе (λ_i), процесс размножения, соответствующий граф-схеме, можно описать системой уравнений:

$$\begin{aligned} P_1(\tau) &= (\lambda_{21} - \lambda_{12} - \lambda_{13} + 2\lambda_{41} - \lambda_{15})P_1(\tau); \\ P_2(\tau) &= (\lambda_{12} - \lambda_{21})P_1(\tau); \\ P_3(\tau) &= \lambda_{13}P_1(\tau) - \lambda_{34}P_3(\tau); \\ P_4(\tau) &= \lambda_{34}P_3(\tau) - 2\lambda_{41}P_4(\tau); \\ P_5(\tau) &= \lambda_{15}P_5(\tau), \end{aligned}$$

где $P_i(\tau)$ — вероятность того, что микроорганизм в момент времени τ находится в состоянии S_i .

Проведя анализ соотношений вероятностей различных переходов с численностью микроорганизмов на различных этапах развития и соизмеряя эти параметры с параметрами среды обитания (температура, активная кислотность, окислительно-восстановительный потенциал и др.), можно определить степень влияния каждого из них. Получен-

ные результаты и зависимости в дальнейшем можно использовать при моделировании процессов разви-

тия микроорганизмов в различных средах, в том числе и в сырной массе.

Список литературы

1. Тутельян, В.А. Новые технологии в науке о питании. – М., 2001.
2. Липатов, Н.Н. Некоторые аспекты моделирования аминокислотной сбалансированности пищевых продуктов // Пищевая и перерабатывающая промышленность. – 1986. – № 4. – С. 49–52.
3. Майоров, А.А. Разработка методов управления биосистемой сыра с целью совершенствования традиционных и создания новых технологий: автореф. дис. ... д-ра техн. наук. – Кемерово, 1999. – 61 с.
4. Осинцев, А.М. Использование методов динамической реологии для исследования процесса коагуляции молока / А.М. Осинцев, В.И. Брагинский, Л.А. Остроумов, Е.С. Громов // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2002. – № 9. – С. 46–49.
5. Шаманова, Т.П. Микробиологические и технологические подходы к производству ферментированных продуктов // Молочная промышленность. – 1998. – № 3. – С. 18–20.
6. Адлер, Ю.П. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий / Ю.П. Адлер, Е.В. Маркова, Ю.В. Гранковский. – М.: Мир, 1976. – 276 с.
7. Полищук, П.К. Микробиология молока и молочных продуктов / П.К. Полищук, Э.С. Дербинова, Н.Н. Казанцева. – М.: Пищевая промышленность, 1978. – 240 с.
8. Бабак, О. Использование микроорганизмов в пищевой промышленности [Электронный ресурс]: продовольственный торгово-промышленный журнал Продукт ВУ. – 2008. – № 11 (13). – Режим доступа: <http://www.produkt.by>
9. Борунова, С.Б. Анализ выживаемости термофильных молочнокислых микроорганизмов при замораживании / С.Б. Борунова, Н.Н. Фурик // Современные технологии сельскохозяйственного производства: материалы XIV Междунар. науч.-практ. конф. – Ч. 2. – Гродно, 2011. – С. 273–274.
10. Глазова, А.А. Устойчивость отечественных производственных культур бактерий рода *Lactobacillus* к антибактериальным препаратам / А.А. Глазова, С.Г. Ботина, И.А. Типисева // Сборник трудов Московского государственного университета пищевых производств. – М., 2010. – С. 67–77.
11. Гудков, А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты: монография / А.В. Гудков; под ред. С.А. Гудкова. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 799 с.
12. Емельянов, С.А. Влияние температуры на развитие микроорганизмов в молоке и молочных продуктах / С.А. Емельянов, А.Г. Храмцов, О.А. Суюнчев и др. // Вестник СевКавГТУ. – 2006. – № 2 (6). – С. 54–57.
13. Княжев, В.А. Микроорганизмы и пища. Риск и польза / В.А. Княжев, В.А. Тутельян // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2000. – № 12. – С. 3–6.
14. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уильямс; пер. с англ., под ред. Г.А. Заварзина. – Изд. 9-е. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – 432 с.; Т. 2. – 368 с.
15. Остроумов, Л.А. Питательные среды для бифидобактерий / Л.А. Остроумов, А.Ю. Просеков, М.Г. Курбанова, О.В. Козлова // Молочная промышленность. – 2010. – № 1. – С. 20–21.
16. Просеков, А.Ю. Влияние ферментации заквасочной микрофлорой на некоторые свойства молочного белково-углеводного сырья / А.Ю. Просеков, С.Г. Козлов, М.Г. Курбанова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2004. – № 9. – С. 31–33.

ГНУ «Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия Россельхозакадемии»,
656016, Россия, г. Барнаул, ул. Советской Армии, 66.
Тел.: (3852) 56-46-12
e-mail: sibniis.altai@mail.ru

SUMMARY

A.A. Mayorov

THE ANALYSIS OF LIVING AND REPRODUCTION PARAMETERS OF MICROORGANISMS

Probability correlation of different transfers with microorganisms quantity on the growth stages is analyzed. Comparing the parameters given with those of the environment (temperature, active acidity, oxidation-reduction potential, etc) one can define the influence of each. It is suggested to use the results and correlations in modeling microorganism development in different environment, the cheese mass being one of them.

Microorganism growth, environment, cheese, cultivation process, optimization algorithm.

Siberian research Institute for cheese-making
Russian Academy of agricultural Sciences
656016, Russia, Barnaul, Sovetskaya Army, 66
Phone: (3852) 56-46-12
e-mail: sibniis.altai@mail.ru

