

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( Н И У « Б е л Г У » )

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

**АНАЛИЗ МИКРОФЛОРЫ СЫРА НА ПРИМЕРЕ  
ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

Выпускная квалификационная работа  
обучающейся по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология  
очной формы обучения, группы 07001316  
Моховой Ирины Дмитриевны

**Научный руководитель**  
ассистент кафедры  
биотехнологии и  
микробиологии,  
Клюева В.В.

БЕЛГОРОД 2017

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1. Основные характеристики пропионовокислых бактерий.....	7
1.1.1. Физиолого-биохимические свойства пропионовокислых бактерий.....	8
1.1.2. Антимутагенные свойства.....	10
1.2. Практическое применение пропионовокислых бактерий.....	11
1.2.1. Получение витамина В12.....	11
1.2.2. Иммуномодулирующее действие.....	13
1.2.3. Антиоксидантные ферменты .....	14
1.2.4. Применение в животноводстве и в получении пропионовой кислоты .....	15
1.3. Производство твердых сыров.....	25
1.3.1. Характеристика твердых сыров.....	25
1.3.2. Свертывание молока и обработка сгустка.....	25
1.3.3. Дробление сырной массы и постановка зерна.....	26
1.3.4. Второе нагревание.....	27
1.3.5. Прессование и посол сыра.....	28
1.3.6. Влияние способа прессования сыра на количество пропионовокислых бактерий.....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32
2.1. Материал исследования.....	32
2.2. Методы исследования.....	34
2.2.1. Анализ микрофлоры сыров методом разбавления.....	34
2.2.2. Методы микроскопического исследования микроорганизмов.....	36
2.2.3. Статистическая обработка цифровых данных.....	37

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
3.1. Групповой анализ микрофлоры сыра. Численность микроорганизмов, выросших на питательной среде.....	39
3.2. Микроскопическое исследование микрофлоры сыров.....	40
3.3. Статистическая обработка цифровых данных.....	41
3.3.1. Обработка цифровых данных методом дисперсионного анализа.....	41
3.3.2. Обработка цифровых данных разностным методом.....	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	47

## **ВВЕДЕНИЕ**

Еще с древности сыр являлся ценным и незаменимым продуктом питания первобытных племен, его история начинается с возникновением кочевых восточных племен.

Сыр очень высоко ценится во всем мире по своим пищевым и вкусовым достоинствам. В среднем в нем содержится до 32, в иных сортах до 45 процентов жира, свыше 25 процентов белков, важные органические соли и витамины.

### **Актуальность**

Свойства и качественный состав сыра определяется микроорганизмами и экзоферментами, которые осуществляют различные биохимические процессы при изготовлении сыров, а именно: гидролиза белков до аминокислот, жиров – в свободные жирные кислоты, углеводов – в молочную кислоту.

Технологический процесс производства сыра включает в себя такие операции как: подготовка молока к свертыванию, свертывание молока, получение и обработка сгустка, формование сырной массы, самопрессование и прессование сырной массы, посолка сыра и созревание.

Главная и ценная особенность твердых сыров состоит в том, что они могут храниться длительное время без потери своих полезных свойств.

Сыр производят при свертывании белков молока, затем идет процесс обработки сгустка для его обезвоживания и дальнейшего созревания сырной массы. По виду свертывания молока выделяют сычужные и кисломолочные сыры. Чаще всего производятся сыры, где молоко свертывается при помощи сычужного фермента.

Сычуг – это часть желудка жвачного животного, в нем есть особые ферменты, которые приводят к свертыванию молока. Получившийся сгусток затем подвергают дроблению, измельчению и прессованию. После чего идет стадия прессования и заключительное созревание сыра.

Различные сорта сыра имеют свои особенности созревания. Например, голландским сырам требуется от 2 до 3 месяце, швейцарским от 6 до 8 месяцев. У них образуются характерные «глазки» - пустоты от газов, которые выделяются при брожении, появляется особый пикантный сладковатый вкус и аромат. Также на поверхности могут выделяться «слёзы» - это маленькие капельки воды, насыщенные солями молока.

В основе производства сыра используется ферментативно-микробиологический процесс, протекание которого зависит от физико-химических свойств молока, состава микроорганизмов закваски, их способности развиваться в молоке, в сгустке и сырной массе и условий технологического процесса.

Молочный жир, содержащийся в сыре, незаменим для питания людей, так как является основным поставщиком энергии и помогает усваиваться жирорастворимым витаминам А, D, E.

При созревании твердых сортов сыра молочные жиры расщепляются и происходит накопление летучих жирных кислот, которые и придают особый сырный аромат. К таким жирным кислотам относятся – масляная, каприловая и капроновая.

Также в сыре содержится много белка, минеральных солей и витаминов, и незаменимых аминокислот. Они находятся между собой в хорошо сбалансированном соотношении, что помогает более быстрому перевариванию и извлечению организмом нужных компонентов. 100г сыра содержит 20-30 г белка, 32-33 г жира, около 1 г кальция, 0,8 г фосфора.

Сыр является высококалорийным продуктом питания из-за высокого содержания жиров и белков. На 100г приходится от 200 до 400 кКал (840-1680 кДж).

Твёрдые сыры — одна из больших групп сыров, к ней относятся такие виды как Швейцарский, Голландский, Маасдам и др. Для них характерно относительно невысокое содержание влаги и плотная консистенция, в связи с прессованием во время производства.

Цель работы: оценить влияние длительности хранения на количественный состав пропионовокислой микрофлоры «Швейцарского» сыра и «Маасдам»

В соответствии с поставленной целью необходимо решить следующие задачи:

1) Изучить количественный состав микрофлоры «Швейцарского» сыра и сыра «Маасдам»

2) Сравнить количество пропионовокислых бактерий в исследуемых продуктах в зависимости от сроков хранения

Структура работы: дипломная работа состоит из введения, трёх глав, заключения и списка использованной литературы.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Основные характеристики пропионовокислых бактерий.

Бактерии рода *Propionibacterium* характеризуются как грамположительные, неподвижные палочки, слегка искривленные, иногда – ветвящиеся, похожи на микобактерии. Величина клеток меняется в зависимости от возраста и условий роста. В молодых культурах и в аэробных условиях – палочки, затем они укорачиваются иногда до кокковидных форм. Эти последние соединены в короткие цепочки. В анаэробных условиях клетки более длинные, ветвящиеся, напоминают промицелий проактиномицетов. Внутри клеток часто обнаруживаются легко окрашиваемые зерна.

Культуры образуют пигменты. Сбраживают молочную кислоту, сахара и спирты с образованием пропионовой, уксусной кислоты и углекислоты. Как правило, имеют каталазу, развиваются в анаэробных условиях, но могут расти и в аэробных. Используют для питания различные органические соединения. [11]

Пропионовокислые бактерии широко применяются при изготовлении кисломолочных продуктов, так как они обладают особыми иммуностимулирующими и антимуtagenными свойствами, они приживаются в кишечнике людей и способны к уменьшению уровня пагубного токсичного воздействия разнообразных химических соединений и ультрафиолетовых лучей. Важно отметить, что положительная роль пропионовокислых бактерий как пробиотиков обуславливается их способностью к образованию пропионовой кислоты, минорных органических кислот, бактериоцинов и ферментов. [9, 7]

Пропионовокислые бактерии синтезируют большое количество витамина B12, который принимает участие в регуляции основных обменных процессов в организме, способствует повышению иммунитета организма, улучшает общее самочувствие за счет активизации белкового, углеводного и

жирового обмена, улучшает качество крови, участвует в синтезе различных аминокислот, нуклеиновых кислот. [3]

Пропионовокислые бактерии используют в сыроделии и при изготовлении кисломолочных продуктов только в сочетании с другими молочнокислыми бактериями. Сложность изготовления таких продуктов связана с тем, что пропионовокислые бактерии обладают слабой кислотообразующей способностью и не ферментируют молоко. [7]

### **1.1.1. Физиолого-биохимические свойства пропионовокислых бактерий**

Бактерии содержат менахины, С-15 насыщенную жирную кислоту мембранных липидов. Своё название они получили в связи с тем, что при брожении они образуют пропионовую кислоту

Со временем к роду *Propionibacterium* начали относить виды анаэробных коринебактерий рода *Corynebacterium*, потому что они являются анаэробами, и их главный продукт метаболизма — это также пропионовая кислота, в пептидогликане клеточных стенок содержат в основном L-диаминопимелиновую кислоту как диаминокислоту, изо и антеизо-С-15 насыщенные кислоты - являющиеся главными жирными кислотами клеточных липидов. В отличие от аэробных коринебактерий они не содержат миколовых кислот и арабиногликана. [9]

Основные представители пропионовокислых бактерий.

*Propionibacterium freudenreichii*.

Клетки в анаэробных условиях мелкие кокковидные, часто - в цепочках, в парах. В аэробных условиях клетки палочковидные, длинные искривленные часто - с ветками очень похоже на типичные микобактерии. Неподвижные, грамположительные. Внутри клеток зерна легко красящиеся красками. Данный вид образует колонии желтые, гладкие, блестящие, умеренной величины. Растет хорошо на обычных питательных средах, предпочтительнее в анаэробных условиях. Не разжижает желатину, не свертывает молоко; Разлагает молочную кислоту, сбраживает глюкозу,



глицерин, ксилозу, левулезу, галактозу, арабинозу, инозит и другие углеводистые соединения. Образует при этом кислоты, преимущественно пропионовую. Не сбраживает сахарозу, мальтозу, лактозу, декстрин, крахмал. Сильно выражено действие каталазы, быстро восстанавливает нитраты. Оптимум температуры от 25 до 30 градусов. Условный анаэроб. Выделен из сыра. Встречается в молочных продуктах. [3]

*Propionibacterium shermanii* отличается способностью свертывать молоко и сбраживать лактозу, нитраты не восстанавливает. Выделена из сыра. [15]

*Propionibacterium petersonii* – колонии светложелтые, кремовые. Молоко свертывает слабо, сбраживает лактозу, мальтозу и сахарозу. Микроаэрофил. В остальном не отличается от основного вида. Выделен из сыра и из почвы.

*Propionibacterium pentosaceum*. Сбраживает лактозу, сахарозу, рафинозу, арабинозу и ксилозу. В остальном не отличается от основного вида. Выделен из эментальского сыра.

*Propionibacterium raffinosaceum*. Сбраживает арабинозу и ксилозу. Выделен из сливочного масла. [11]

*Propionibacterium casei* – короткие палочки, искривленные, колонии желтовато-палевого цвета, рост умеренный. Не сбраживает мальтозу и ксилозу. В остальном не отличается от основного вида. Выделен из сыра.

*Propionibacterium technicum* -клетки в анаэробных условиях палочковидные, искривленные, часто образуют ветки. С возрастом укорачиваются. В аэробных условиях клетки длинные. Колонии кремового или бледножелтого цвета, гладкие, блестящие, слегка выпуклые. Хорошо растет на питательных средах. Желатину не разжижает, молоко свертывает; сбраживает, кроме моносахаридов, дисахаридов и полисахаридов, декстрин, гликоген, крахмал, с образованием пропионовой кислоты, углекислого газа и небольшого количества уксусной кислоты. Факультативный анаэроб. Выделен из тильзитского сыра. [15]

*Propionibacterium zeae* - клетки как у типичных микобактерий, искривленные, с ветками, внутри зерна метакроматина; укорачиваются с возрастом до кокковидных. Колонии оранжевого цвета, гладкие, восковидно блестящие, умеренных размеров. Растет на питательных средах очень хорошо. Желатину не разжижает, молоко не свертывает. Сбраживает моно- и дисахариды, декстрин, гликоген и крахмал. Условный анаэроб, выделен из силоса, встречается в молочных продуктах. [9,11]

*Propionibacterium rubrum* – в анаэробных условиях клетки кокковидные, одиночные, в парах и в коротких цепочках; в аэробных условиях клетки палочковидные, искривленные, похожи на микобактерии. Колонии красные, буро-красные, гладкие, восковидно блестящие. Растет на питательных средах хорошо. Желатину не разжижает, молоко свертывает. Факультативный анаэроб. Обнаруживается в молочных продуктах [16]

*Propionibacterium sanguinem* отличается тем, что образуемый в бульонной культуре осадок более интенсивно окрашен в красный цвет; при росте в бульоне муть не образуется. Выделен из сыра. [15]

*Propionibacterium pituitosum* – культуры при росте в бульоне образуют муть. Сбраживает рафинозу, разлагает крахмал. Выделен из сыра. [11,9]

### 1.1.2. Антимутагенные свойства

Известно, что серосодержащие аминокислоты стимулируют рост, а бактерии устойчивы к высоким концентрациям  $H_2S$  в среде. Из серосодержащих аминокислот пептидов молока бактерии образуют диметилсульфид, обладающий антимутагенным действием. Пропионовые бактерии, как и все живые существа, в первую очередь бактерии, постоянно и длительно подвергаются воздействию внешних и внутренних мутагенов. Антимутагены увеличивают активность ферментативных систем, которые участвуют в детоксификации поступающих в клетку веществ, оказывают влияние на окислительно-восстановительный потенциал организма. Все эти процессы приводят тому, что количество мутаций уменьшается. [12, 10]

Изучение антимутагенеза важно именно в отношении тех бактерий, которые будут применяться при изготовлении кормов, кормовых добавок и пищи. Бактерии как источники антибиомутагенов или десмутагенов могут быть применены для предобработки пищевых продуктов и кормов с целью нейтрализации мутагенных (канцерогенных) веществ, а также как пробиотики. Пропионовокислые бактерии широко используют на практике: в сыроделии, производстве витамина В<sub>12</sub>, приготовлении ветеринарного препарата пропиовита, силосовании кормов. Экстракты клеток классических пропионовокислых бактерий проявляют высокую эффективность антимутагенного действия. Кроме супероксиддисмутазы в клеточном экстракте пропионовых бактерий присутствуют и другие белки (видимо, ферменты) с антимутагенной активностью. [10]

Пока можно твердо сказать, что обследованные штаммы обладают антимутагенностью против NaN<sub>3</sub> и что антимутагены имеют пептидную (белковую) природу и, видимо, являются ферментами. Было показано, что кожные и классические пропионовокислые бактерии выделяют в среду вещества с антимутагенной активностью. Десмутагенное действие культуральной жидкости проявлялось при выращивании бактерий на среде с глюкозой, лактозой и лактатом. [10,43]

## **1.2. Практическое применение пропионовокислых бактерий**

### **1.2.1. Получение витамина В<sub>12</sub> с помощью пропионовокислых бактерий**

В природе витамин В<sub>12</sub> и родственные корриноидные соединения можно обнаружить в клетках микроорганизмов, в тканях животных и некоторых высших растениях (горох, лотос, побеги бамбука, листья и стручки фасоли). Тем не менее происхождение витамина В<sub>12</sub> в высших растениях окончательно не установлено. Такие низшие эукариоты, как дрожжи и мицелиальные грибы, корриноиды, по - видимому, не образуют. Организм животных не может самостоятельно синтезировать витамин. [41,3]

Среди прокариотов способность к биосинтезу корриноидов широко распространена. Активно продуцируют витамин В<sub>12</sub> представители рода *Propionibacterium*. Природные штаммы пропионовокислых бактерий образуют 1,0 - 8,5 мг/л корриноидов, но получен мутант *P. shermanii* М - 82, с помощью которого получают до 58 мг/л витамина. [37]

При недостаточном количестве витамина В<sub>12</sub> в организме человека возникают желудочно-кишечные заболевания, дисбактериоз бактериоз, анемия. На сегодняшний день у человечества наблюдается нехватка витаминов, которая объясняется уменьшением потребления овощей и фруктов, использованием в медицинской практике антибиотиков и химиопрепаратов, увеличением потребления продуктов, подвергнутых технологической обработке. В связи с этим, на первый план поставлена задача обогащения витаминами продуктов повседневного спроса, в особенности кисломолочных продуктов. В связи с тем, что синтез витамина В<sub>12</sub> кишечной флорой очень мал, витамин должен поступать в организм с пищей, а так как кисломолочные продукты являются продуктами ежедневного потребления, то витаминизация их до определенного уровня очень необходима. [41, 36]

Среди современных способов обогащения кисломолочных продуктов витаминами можно выделить микробный синтез, так как последние исследования врачей и микробиологов подтвердили, что наиболее эффективно использование витаминов в коферментной (связанной с белком микробной клетки) легкоусвояемой форме. Поэтому важную роль в профилактике и лечении вышеперечисленных заболеваний могут играть кисломолочные продукты, содержащие пропионовокислые бактерии - продуценты витамина В<sub>12</sub>. [25,31]

Витамин В<sub>12</sub> сохраняется в клетках бактерий, поэтому проводят его экстракцию:

- 1) выделение витамина из клеток и превращение его в цианокобаламин;

2) выделение неочищенного продукта (80% чистоты), который можно использовать в животноводстве;

3) дальнейшую очистку до уровня 91-98% (для медицинских целей).

В семействе *Propionibacteriaceae* есть и другие представители, способные к высокому накоплению витамина В<sub>12</sub> в клетках. Это прежде всего *Eubacterium limosum* (*Butyrivacterium rettgerii*). Как продуценты витамина практический интерес имеют многие представители актиномицетов и родственных микроорганизмов. Истинный витамин В<sub>12</sub> в значительных количествах синтезирует *Nocardia rugosa*. Путем мутаций и отбора получен штамм *N. gignosa*, накапливающий до 18 мг/л витамина В<sub>12</sub>. Активные продуценты витамина обнаружены среди представителей рода *Microspora*: *M. purpureae*, *M. echinospora*, *M. halophitica*, *M. fused*, *M. chalconeae*. [9, 10, 12]

Таким образом, одним из основных методов получения витамина В<sub>12</sub> выбран был метод с помощью пропионовокислых бактерий, так как этот метод представляет штаммы, способные к самостоятельному синтезу 5,6 ДМБ. Он наиболее выгоден и даёт получить довольно большой выход продукта, например, в России составил 58 мг/л витамина, а во Франции достигли невероятного высокого выхода - 216 мг/л. Изучены были недавно открыты новые аналоги витамина В<sub>12</sub>: три из них получены при частичном синтезе (фтор-метилфосфито-Р-кобаламид, диметилфосфито-Р-кобаламин, Fe-кобаламин) и один фактор VA выделенный из активного ила. [38]

### 1.2.2. Иммуномодулирующее действие

Положительная роль пропионовокислых бактерий как пробиотиков обусловлена образованием ими пропионовой кислоты, минорных органических кислот, бактериоцинов, ферментов и витаминов. Эти уникальные микроорганизмы обладают мощными иммуномодулирующими свойствами. [38,28]

Известно, что пропионовокислые бактерии не подвергаются перевариванию в желудочно-кишечном тракте людей, обладают устойчивостью к действию желчных кислот, выдерживают низкую рН (2.0) кислотность желудка, ингибируют активность 3-глюкуронидазы, азаредуктазы и нитроредуктазы - ферментов, которые образованы кишечной микрофлорой и которые вовлекаются в образование мутагенов, канцерогенов и промоторов роста опухолей. Пропионовые бактерии обладают достаточно высокими адгезивными свойствами, которые позволяют им лучше других пробиотических микроорганизмов закрепляться на клетках кишечника, создавая защитный барьер, и оказывать стимулирующее воздействие на рост фекальных бифидобактерий и помогают в лечении бактериальных дисбактериозов. [37]

Одним из важных пробиотических проявлений бактерий считается их воздействие на иммунную систему. Известно, что кожные пропионовокислые бактерии, например *P. acnes* (а конкретно, структуры, входящие в состав их клеточной стенки), способны проявлять иммуотропные свойства. Штамм классической (молочной) пропионовокислой бактерии — *P. freudenreichii* RVS-4-irf — тоже обладает иммуномодулирующей активностью, а именно, индуцирует образование цитокинов — соединений белковой природы, которые являются медиаторами иммунокомпетентных клеток крови. Человеческая кровь содержит моноциты — продуценты цитокинов и является подходящей моделью для исследования иммуномодифицирующих свойств бактерий *ex vivo*. [1, 33]

### 1.2.3. Антиоксидантные ферменты

Антиокислительные ферменты играют важную роль в организме человека. В связи с этим, у некоторых штаммов пропионовокислых бактерий были открыты выраженные антиоксидантные свойства. Использовался прямой вольтамперометрический метод. Так как синтезируемые пропионовокислыми бактериями ферменты, супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза, образуют

антиоксидантную пару, которая борется со свободными радикалами кислорода, не давая им возможности запустить процессы цепного окисления.

Глутатионпероксидаза обезвреживает липидные перекиси. [34]

Процесс окисления с помощью цитохромов дает побочный продукт, который в некоторых концентрациях становится губительным для всего живого — перекись водорода ( $H_2O_2$ ). Перекись водорода является сильным окислителем и в крови может вызывать гемолиз эритроцитов. Фермент каталаза катализирует разложение перекиси водорода на воду и кислород. [34, 25]

Пероксидазы выполняют при этом защитные функции - окисляют органические вещества перекисью водорода, в результате чего образуется молекула воды ( $H_2O$ ). Таким образом, супероксидные радикалы с помощью антиоксидантных ферментов превращаются в безвредный кислород. (следует подчеркнуть, что когда концентрация перекиси водорода становится незначительной, каталаза начинает катализировать реакцию окисления перекисью водорода спиртов, формальдегидов и нитратов). [9, 26]

Наличие антиоксидантной активности пропионовокислых бактерий позволит расширить спектр применения данных микроорганизмов для обогащения ими физиологически функциональных продуктов питания.

#### **1.2.4. Применение в животноводстве и в получении пропионовой кислоты**

Новый высокопродуктивный штамм *Propionibacterium acidipropionici* FL-48 с повышенной устойчивостью к пропионовой кислоте.

Пропионовокислые бактерии, в том числе *Propionibacterium acidipropionici*, широко используются в химической промышленности для получения пропионовой кислоты, а также для консервирования пищи и заготовки зерна и зеленых кормов. Однако эффективность промышленного производства биомассы пропионовокислых бактерий ограничена их чувствительностью к высоким концентрациям в среде пропионовой кислоты. [24]

Поэтому, были разработаны новые биотехнологические процессы и штаммы, позволяющие преодолеть это ограничение и повысить рентабельность микробиологического производства. Методом двухступенчатого индуцированного мутагенеза с применением УФ-облучения и диэтилсульфата получен новый мутантный штамм *P. acidipropionici* ФЛ-48, обладающий повышенной резистентностью к 10 г/л пропионовой кислоты и превосходящий родительский штамм *P. acidipropionici* ВКПМ -5723 по скорости накопления биомассы и количеству продуцируемых пропионовой и уксусной кислот на 35%, 20% и 16%, соответственно. [24, 42, 35]

Стабильность характеристик нового штамма (скорость накопления биомассы и жизнеспособность на средах с повышенной концентрацией пропионовой кислоты) подтверждена трехкратным последовательным моноклональным рассевом на среду, содержащую 10 г/л пропионовой кислоты. Выполненная оптимизация технологии культивирования штамма позволила определить оптимальную дозу инокулюма для засева биореактора (10% от объема ферментационной среды) и поддерживаемый в течение первых 12 ч уровень рН среды, обеспечивающий максимальный прирост биомассы ( $6,1 \pm 0,1$ ). Проведенное масштабирование ферментации до 100-литрового биореактора с соблюдением оптимальных условий культивирования показало сохранение высокой скорости роста штамма в условиях пониженного рН; уже к 20-му часу ферментации количество жизнеспособных клеток в культуральной жидкости превышало  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/мл. [42]

Новый штамм представляет интерес в качестве компонента биоконсервантов для силоса и сенажа, а также может быть использован в качестве эффективного продуцента пропионовой кислоты.

Эффективное развитие животноводства невозможно без использования высококачественного силоса и сенажа. Силосование (ферментация) – биологический процесс, результат которого зависит от многих факторов,



оказывающих существенное влияние на показатели питательности и безопасности корма. Во многих регионах рискованного земледелия силос является основным сочным кормом для крупного рогатого скота в зимний период; его удельный вес по питательности в рационах может превышать 50%.

Технология заготовки силоса как способа сохранения сочных кормов известна уже более тысячи лет назад. Качество и скорость его созревания зависят от того, какая микрофлора преобладает на поверхности зеленой массы. Одним из существенных недостатков заготовки такого вида корма являются значительные потери питательных веществ исходного сырья в процессе силосования, вызванные присутствием гнилостных бактерий, плесневых и дрожжевых грибов, а также других нежелательных микроорганизмов и достигающие порой 25–30%. [27,35]

Полностью избежать этих потерь невозможно, но их можно значительно сократить за счет применения различных консервантов химического и биологического происхождения. Применение химических препаратов имеет ряд существенных недостатков: полученный силос не является экологически чистым, может содержать токсичные и дурно пахнущие компоненты, а сами применяемые химические препараты химически агрессивны и небезопасны для работающего персонала. [6, 39]

Альтернативой химическому методу могут служить биоконсерванты, способные не только сохранять в силосе питательные вещества, но и ускорять в нем процессы ферментации. В качестве таких агентов, как правило, применяются молочнокислые бактерии. При биологическом консервировании силоса МКБ перерабатывают водорастворимые углеводы растений в молочную кислоту, причем потери энергии в ходе этого процесса составляют всего 3–5%, что повышает питательную ценность силоса. При этом выделяющиеся метаболиты молочнокислых бактерий подавляют деятельность гнилостных и маслянокислых бактерий и плесневых грибов. Однако молочнокислые бактерии оказываются не в состоянии подавить

развитие дрожжевых и плесневых грибов в аэробных условиях (после вскрытия силосных ям), что снижает аэробную стабильность силоса после начала его использования. [6, 9, 12]

Эта проблема была решена путем добавления в состав биоконсервантов пропионовокислых бактерий, таких как *Propionibacterium acidipropionici*, способных преобразовывать молочную кислоту и глюкозу в уксусную и пропионовую кислоты и обладающих более выраженным противомикробным эффектом, чем молочная кислота, в аэробных условиях. Добавление пропионовокислых бактерий в консерванты для силосования приводит к улучшению аэробной стабильности силоса и значительно снижает темпы порчи силоса нежелательными микроорганизмами в условиях прямого контакта с воздухом. [4,1]

Кроме того, пропионовокислые бактерии обладают мощными иммуномодулирующими и антимуtagenными свойствами и способны снижать генотоксичный эффект ряда химических соединений и УФ-облучения, а вырабатываемая ими пропионовая кислота находит широкое применение в различных областях народного хозяйства. [40,6]

Биосинтез пропионовой кислоты относится к процессам, ингибируемым накапливаемым продуктом, а промышленное производство биомассы пропионовокислых бактерий, в частности, *P. acidipropionici*, методами глубинного культивирования характеризуется не очень высокой концентрацией клеток бактерий в культуральной жидкости. В то же время высокий спрос на штаммы пропионовокислых бактерий, используемые для консервирования пищи и при заготовке зерна и кормов, стимулирует поиск новых улучшенных штаммов и развитие новых ферментационных процессов с целью увеличения выхода биомассы и создания рентабельного производства. [41, 39]

Штамм *P. acidipropionici* ВКПМ В-5723, характеризуемый относительно невысокой устойчивостью к повышенным концентрациям ПК (при расसेве на агаризованную бифидум-среду, содержащую 5 и 10 г/л ПК,

выживаемость исходного штамма составляла 5,1% и 0,03%, соответственно). Для выращивания и поддержания штамма использовали бифидум-среду M1395. При проведении мутагенеза использовали агаризованную бифидум-среду, а также посевную и ферментационную среды следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт – 10, бульон соевого триптона – 5,  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  – 1,5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,5 (pH 7,0). Кроме того, в ферментационную среду дополнительно вносили глицерин (20 г/л) и  $\text{CoCl}_2$  (0,01 г/л).

Чашки помещали под УФ-излучатель (на расстоянии 30 см от него) и экспонировали в течение 2-3 минут. Степень выживаемости колоний определяли по соотношению колоний, выросших на облученных и контрольных чашках. Выросшие изолированные колонии пересеивали на агаризованную бифидум-среду, культивировали в течение 48 ч в стационарных условиях, после чего готовили клеточную суспензию в 0,9% растворе хлорида натрия ( $1 \times 10^{10}$  КОЕ/мл). На второй ступени проводили мутагенез с использованием диэтилсульфата (DES). Для этого 0,2 мл DES добавляли в пробирку с 16 мл стерильного 0,01 М фосфатного буфера (pH 7,0). Затем в эту же пробирку вносили 4 мл суспензии клеток, выросших на бифидумсреде после первой ступени мутагенеза, и инкубировали 30 минут. Затем клетки дважды отмывали в фосфатном буфере и переносили в посевную среду, дополнительно содержащую ПК в концентрации 5 г/л. [29, 25].

После инкубирования посевной культуры в течение 24 ч посевную среду переносили в ферментационную среду. Далее культуру инкубировали при 30 °С в течение 48 ч, после чего определяли основные физиологические и биохимические параметры культуры.

Условия культивирования. Для оценки полученных мутантных штаммов посевной материал выращивали с использованием посевной среды в течение 24 ч на ротационной качалке при 220–240 об. /мин и температуре  $30 \pm 1$  °С, после чего засеивали 100 мл ферментационной среды (объем посевного материала составлял 10% от объема ферментационной среды) и

выращивали в колбах Эрленмейера, объемом 750 мл в течение 24 ч при  $30 \pm 1$  °С и 200 об./мин. [30]

Эксперименты по оптимизации условий культивирования осуществляли на лабораторной установке Biotron, состоящей из четырех одинаковых биореакторов, вместимостью 3 л. Параметры культивирования (обороты мешалки, поддержание рН, подача компонентов питания и др.) программировали и контролировали при помощи компьютера. Режим культивирования устанавливали следующий: температура –  $30 \pm 1$  °С без аэрации (воздух подавали только до создания избыточного давления в аппарате до  $P = 1,5$  бар), режим работы мешалки – 400 об./мин. Масштабирование ферментации осуществляли в биореакторе емкостью 100 л. (43, 35,37)

Наработку биомассы пропионовокислых бактерий осуществляли при температуре  $30 \pm 1$  °С без аэрации (воздух подавали только до создания избыточного давления в аппарате до  $P = 1,5$  бар), режим работы мешалки – 200 об./мин. Инокулюм для засева биореактора нарабатывали на установке Biotron (24 ч,  $30 \pm 1$  °С, рН –  $6,1 \pm 0,1$ ). Общий объем полученного инокулюма составил 7 литров, общий объем ферментационной среды в биореакторе – 70 литров. Аналитические методы. [28, 31]

Количество жизнеспособных клеток определяли методом разведений по Пастеру с последующим высевом на агаризованную бифидумсреду. Для контроля физиологического состояния культуры готовили фиксированный мазок и исследовали его на фазовом контрасте с использованием микроскопа Olympus BX41 с объективом  $\times 100$  и масляной иммерсией. Сухой вес бактериальных клеток в суспензии определяли после высушивания пробы в сушильном шкафу при 105 °С до постоянного веса. Определение содержания органических кислот в культуральной жидкости осуществляли в соответствии с известными методиками. [22,24, 32]

Активную кислотность (рН) питательных сред и культуральной жидкости определяли потенциометрическим способом при помощи рН-метра

(культивирование в колбах/флаконах) или стерилизуемого рН-датчика (культивирование в ферментере). [32]

При переходе на крупномасштабное культивирование *P. acidipropionici* вопрос об устойчивости промышленных штаммов к органическим кислотам становится весьма актуальным. Способом решения данной проблемы был выбран двухступенчатый индуцированный мутагенез, сочетающий воздействие физического и химического мутагенных факторов. Этот метод достаточно широко применяется для получения штаммов микроорганизмов, обладающих новыми свойствами. Было выполнено успешное проведение такого мутагенеза у *P. acidipropionici* с использованием N-нитрозо-N-метилбиурета (НМБ) и УФ-облучения с целью получения мутантных штаммов, синтезирующих увеличенное количество витамина В<sub>12</sub>. [27,41]

В соответствии с результатами этого исследования, такая комбинация мутагенных факторов позволила существенно повысить эффект мутагенеза и увеличить число полученных высокопродуктивных мутантов. Использование дополнительного мутагенного фактора привело к пятикратному повышению частоты возникновения мутаций по сравнению с одноступенчатым мутагенезом, достигнув уровня  $1^{10-3}$ . [41]

Высев отобранных на второй ступени перспективных клонов на среду с добавлением пропионовой кислоты в концентрации 5 и 10 г/л обеспечил возможность селективного отбора резистентных к ПК штаммов. В результате была отобрана группа из шести мутантных штаммов, морфологически отличающихся от колоний исходного штамма и характеризующихся сохранением достаточно высокого количества жизнеспособных клеток при культивировании на среде, содержащей пропионовую кислоту. [36]

Полученная группа штаммов проанализирована по параметру скорости роста клеток, то есть способности штамма накапливать за короткое время максимальную биомассу. Для определения быстрорастущих вариантов штаммы культивировали на средах для мутагенеза при 30 °С в течение 24 ч, после чего определяли сухой вес клеточной биомассы. По результатам опыта

максимальное накопление биомассы отмечено для штамма *P. acidipropionici* ФЛ-48. [43,36]

Характеристики штамма *P. acidipropionici* ФЛ-48. На агаризованной бифидум-среде новый штамм образовывал округлые колонии размером до 1,3 мм, с неровными краями, маслянистые, влажные, светло-кремового и кремового цвета. Сравнение биохимических характеристик показало, что штамм ФЛ-48 сохранил способность сбраживать сахарозу, мальтозу, лактат и восстанавливать нитраты. Для подтверждения успешности мутации и стабильности нового штамма ФЛ-48 трижды провели через моноклональный рассев с высевом на питательную среду, содержащую 10 г/л ПК. Каждый раз для последующего посева отбирали по 10–20 колоний с поверхности агара, с параметрами, характерными для мутанта ФЛ-48. [6,9,43]

Результаты эксперимента подтвердили стабильность штамма по скорости накопления биомассы и жизнеспособности на средах с повышенной концентрацией пропионовой кислоты.

Сравнительную оценку биотехнологических свойств мутантного штамма ФЛ-48 и исходного штамма ВКПМ -5723 проводили в лабораторных условиях на установке Biotron. В качестве анализируемых параметров использовали ключевые параметры отбора – накопление биомассы бактерий и способность к синтезу пропионата. Оптимальное значение рН для роста пропионовокислых бактерий находится в интервале 6,0–7,0. (29,37)

Уже к 20 ч культивирования содержание жизнеспособных клеток в культуральной жидкости штамма ФЛ-48 достигло  $9,2 \times 10^9$  КОЕ/мл, в то время как аналогичное значение для родительского штамма составило  $6,8 \times 10^9$  КОЕ/мл. Таким образом, при культивировании в контролируемых условиях мутантный штамм отличается более высокой скоростью роста по сравнению с родительским штаммом, который достигает такого же количества жизнеспособных клеток в среде, только к 28–30 часам роста (данные не приведены). [17, 42]

Другим важным показателем, характеризующим штаммы пропионовокислых бактерий, является их способность продуцировать пропионовую и уксусную кислоту. Согласно полученным данным, уровень продукции пропионовой и уксусной кислот мутантным штаммом ФЛ-48 превосходит таковой родительского штамма на 20% и 16%, соответственно. [48]

Таким образом, по своим биотехнологическим свойствам мутантный штамм ФЛ-48 существенно превосходит исходный штамм ВКПМ В-5723. Оптимизация методики культивирования штамма *P. acidipropionici* ФЛ-48. Проблема улучшения промышленных штаммов пропионовокислых бактерий и совершенствования методов их промышленного культивирования широко изучается во всем мире. В качестве наиболее важного биотехнологического параметра определено максимальное накопление биомассы клеток, причем в максимально короткий промежуток времени. [37]

Важным параметром, влияющим на длительность ферментации и конечную плотность клеток, является доза посевного материала. По мере увеличения дозы инокулята в посевном аппарате с 1% до 10% количество жизнеспособных пропионовокислых бактерий в культуральной жидкости резко возрастает, достигая значения  $1,05 \times 10^{10}$  КОЕ/мл. Дальнейшее повышение дозы инокулята уже не обеспечивает прироста. Это связано с тем, что клетки, попав в богатую питательными веществами среду, начинают размножаться с максимальной для данной культуры скоростью. Чем выше начальная концентрация клеток, тем меньше времени им требуется для активации необходимых ферментных систем. [39]

Таким образом, оптимальная посевная доза штамма ФЛ-48, обеспечивающая максимальное наращивание биомассы мутантного штамма, составила 10%. Образующиеся в процессе культивирования ПБК органические кислоты снижают рН культуральной среды и тем самым угнетают рост клеточной массы бактерий. [25]

Ферментационную среду с исходным значением рН  $6,9 \pm 0,1$  засеивали инокулятом в объеме 10%. В момент начала ферментации включали автоматическую систему контроля рН. Поддержание рН ферментационной среды осуществляли путем подачи в биореактор 20% раствора NaOH. Протестировано четыре варианта опыта. В первых трех вариантах рН среды на протяжении первых 12 ч культивирования (фаза активного роста) поддерживали на уровне  $5,6 \pm 0,1$ ,  $6,1 \pm 0,1$  и  $6,6 \pm 0,1$ , соответственно. В четвертом варианте опыта рН среды не регулировали. Каждые 4 ч из биореактора отбирали пробы, в которых определяли количество жизнеспособных клеток. [36,42]

К концу периода контролируемой поддержки уровня рН наибольшее количество жизнеспособных клеток ( $3,4 \times 10^9$  КОЕ/мл) выявлено для варианта, в котором рН поддерживали на уровне  $6,1 \pm 0,1$ .

Для масштабирования производства мутантного штамма ФЛ-48 ферментацию проводили в 100-литровом биореакторе. После засева посевным инокулятом (в объеме 10% от объема ферментационной среды) штамм культивировали в контролируемых условиях, включая поддержку рН на уровне  $6,1 \pm 0,1$  в течение первых 12 ч. [29, 47]

Начиная с 12 ч культивирования, из биореактора отбирали пробы, в которых определяли сохранность жизнеспособных клеток штамма. Максимальное количество жизнеспособных клеток в питательной среде ( $1,05 \times 10^{10}$  КОЕ/мл) достигнуто к 20–22 ч ферментации. Указанное количество обеспечивает возможность получения лиофилизированной массы клеток, достаточной для производства, вышеупомянутого комбинированного биоконсерванта. [27, 45]

Наработанная в ходе исследования биомасса пропионовокислых бактерий использована для приготовления опытной партии вышеупомянутого биологического консерванта. Проведенные производственные испытания биоконсерванта, включавшие подбор оптимальной дозировки для заготовки силоса и оценку эффективности



скармливания этого силоса лактирующим коровам, показали положительный эффект от его применения. [32]

### **1.3. Производство твердых сыров**

#### **1.3.1. Характеристика твердых сыров**

Каждый сыр имеет свой определенный свойственный ему состав входящих в него аминокислот, поэтому для производства различных сыров нужно использовать различные микроорганизмы и соответственно бактериальные закваски. [5]

Такие сыры как Швейцарский сыр и Маасдам относятся к твёрдым сортам. У них температура второго нагревания составляет более 50 градусов. Для их производства используется молоко с низкой степенью зрелости – около 20 градусов кислотности.

По своим органолептическим свойствам эти сыры обладают приятным слегка сладковатым вкусом и особым пряным ароматом, который формируется благодаря пропионовокислым бактериям, которые являются основной составляющей микрофлоры. Цвет равномерный, может варьировать от слабо желтого до светло-кремового. Также есть глазки круглой или овальной формы. Сырная корка тонкая, в некоторых случаях может иметь беловатый налет. [5,14]

Молоко должно хорошо сворачиваться, образуя прочный сгусток; быть чистым, чтобы избежать попадания различных бактерий (маслянокислых и бактерий группы кишечной палочки) его пропускают через сепараторы-очистители.

#### **1.3.2. Свертывание молока и обработка сгустка**

В молоко вносится специальный сычужный фермент, хорошо перемешивают для равномерного распределения по всему объёму и оставляют в покое до свертывания при температуре 33-34 градуса в течение

25-35 минут. Для избегания остывания и загрязнения продукта котел накрывают крышкой.

Свертывание протекает до тех пор, пока сгусток не станет более прочным и из него начинает выделяться сыворотка. Затем верхний слой, содержащий большее количество жира снимают и перекладывают на низшие слои, таким образом плотность по всему сгустку выравнивается. [15]

### **1.3.3. Дробление сырной массы и постановка зерна**

Сгусток разрезают вертикально и обрабатывают. Верхние и нижние слои должны перемешаться. В результате процесса дробления сырная масса обезвоживается. Продолжительность процесса от 15 до 20 минут. Затем сырную массу перемешивают механическими мешалками, во избежание появления слипшихся и оседающих зерен. [15, 5, 19]

Постановка зерна – это основополагающий процесс при производстве твёрдых сыров. Очень важно соблюдать всю технологию данного процесса, чтобы зерна имели одинаковый размер и не образовывалось много сырной пыли.

С помощью специального отражателя, который движется по кругу в сыворотке и предупреждает оседание осуществляется постановка зерна, то есть разрезание сырной массы на небольшие кусочки размером 2-4 мм. Перемешивание идет до тех пор, пока сырные зерна не приобретут достаточную сухость и твёрдость. Продолжительность рассчитывается в зависимости от зрелости молока. В основном оно длится около 30-40 минут. В это время особенно быстро протекают все ферментативные процессы. Клетки молочнокислых бактерий делятся в 2,5 раза быстрее, чем с момента заквашивания до разрезания. Это обусловлено несколькими факторами: во-первых, сырное зерно механически обогащается бактериями, во-вторых, бактерии быстрее размножаются из-за увеличения рН среды (чем ближе значение рН к 6, тем быстрее развитие бактерий). [19]

### 1.3.4. Второе нагревание

Продолжительность второго нагревания зависит от степени обезвоживания сырной массы и развития молочнокислого процесса. Если обезвоживание протекает медленно, то температура должна быть выше, а продолжительность дольше. В среднем температура от 54 до 60 градусов, а время нагревания от 15 до 25 минут. Свойства сырной массы в это время кардинально меняются: увеличивается клейкость из-за плавления монокальцийпараказеината. [8,5]

При повышении температуры свыше 50 градусов, степень клейкости снижается, в связи с дегидратацией белка. В конце процесса обезвоживание достигает нужной степени, но вымешивание не останавливают до тех пор, пока зерно не приобретает нужную упругость и твердость, на это уходит от 15 до 40 минут. При использовании свежего молока может потребоваться около часа. [18]

От степени готовности сырного зерна в дальнейшем и будет зависеть качество сыра. Слишком пересушенные сырные зерна будут плохо склеиваться и наружный слой сыра будет приставать при прессовании к серпянке и отдираться. Если зерна не досушить, то наоборот они слишком быстро склеятся, это затруднит процесс выделения сыворотки из сыра при прессовании. [5, 13]

На этапе второго нагревания создаются оптимальные условия для развития стрептококков, особенно мезофильных, и в небольшой степени для термофильных стрептококков и палочек. Это объясняется тем, что температура 54-60 градусов близка к максимальной для жизнедеятельности стрептококков и выше оптимальной для развития палочек. Но во время всего производства сыра количество стрептококков выше, чем палочек. [13]

При перемешивании сырная масса оседает и образуется пласт с возвышением по центру в виде конуса. Этот пласт необходимо вынуть с помощью серпянки из котла, стараясь захватить всю сырную массу, не

нарушив целостности пласта и сформировать в сыр. При поломке пласта может испортиться рисунок сыра и его качество в целом. [17]

### **1.3.5. Прессование и посол сыра**

Цвет сыра после прессования варьирует от светло-желтого до соломенно-желтого. После прессования объём сыра уменьшается, его взбивают и отправляют на посолку.

В течение первых дней для того чтобы не деформировать сыр его солят при помощи гущи в соляных ёмкостях, а затем отправляют в более крепкий рассол 22-25% концентрации. Температура составляет от 8 до 10 градусов. Если молоко плохого качества, температура снижается до 5-8 градусов, а если молоко свежее и пастеризованное, то 12 градусов. Влажность в помещении во время посола должна быть 90-92%. [5,8, 16]

Сыры в рассоле должны лежать в один ряд, верхние части, которые выступают из рассола должны быть обильно посыпаны солью. Через определенные промежутки времени их нужно переворачивать. Процесс посола осуществляется от 8 до 10 дней. Затем их складывают на стеллажи для дальнейшей выдержки на 20-30 дней, при этом их нужно периодически переворачивать и обтирать. Такая выдержка обеспечивает освобождения сыра от поверхностной влаги и замедляет микробиологические процессы. [11]

Это можно объяснить тем, что при прессовании сыра микроорганизмы снова начинают свой рост, а при снижении температуры в соляных камерах это размножение замедляется. Спустя 25-30 дней сыры помещаются в бродильную камеру. Там протекает основной процесс брожения и образуются сырные глазки. Изменение температуры должно идти постепенно, поэтому выкладка сыра начинается с нижних полок и со временем их перекладывают всё выше и выше. [11, 14]

Во избежание различных механических повреждений сыры складывают на отдельные гладкие круги. Температура в бродильной камере

варьирует от 18 до 25 градусов, влажность воздуха 88—86 %. Каждые два дня сыры нужно переворачивать, обмывать и перетирать солью. Спустя время соль растворяется, образуя капельки рассола, их нужно распределять по всей поверхности сыра специальной щеткой. Рассол нужно растирать каждые 4-6 часов, для того чтобы на корке не было белых пятен и не образовывалось прослоек. [14, 17]

Брожение длится от 25 до 50 дней. Если при приготовлении сыра было использовано хорошее молоко, то брожение можно считать оконченным спустя 30-35 дней. После бродильной камеры сыры складывают в прохладную камеру и при температуре 12-15 градусов происходит их дозревание. Влажность при этом довольно высокая - 90%. При этом снова каждые 2-3 дня сыры нужно обмывать, переворачивать, обтирать и посыпать солью. Если вдруг возникает риск повторного брожения, то сыры нужно убрать в помещение с температурой 10-11 градусов. [18, 9]

Срок созревания твердых сыров составляет в среднем 6 месяцев, но спустя год их органолептические показатели гораздо лучше. Такая длительность процесса созревания объясняется тем, что объем микрофлоры, от которого зависит созревание относительно мал. Самое большое количество микроорганизмов наблюдается на второй день, а потом постепенно идёт на спад и немного увеличивается в теплой камере (бродильной). [14]

### **1.3.6. Влияние способа прессования сыра на количество пропионовокислых бактерий**

Качество сыра зависит от вида микроорганизмов и экзоферментов этих микроорганизмов, которые осуществляют сложный биохимический процесс: гидролиз белков до аминокислот, жиров – в свободные жирные кислоты, углеводов – в молочную кислоту. Вследствие этого формируются органолептические показатели: вкус, аромат, консистенция. [11]

Способ одностороннего прессования очень трудоемкий процесс.

При этом уплотнение сырной массы по направлению от прессуемой стороны падает вниз. Поэтому, чтобы получить одинаковую плотность верхней и нижней стороны, сыры перепрессуют, а это приводит к анизотропии сыра, т.е. неравномерному распределению влаги сырной массы. Это отрицательно влияет на развитие и распределение микроорганизмов, следовательно, биохимические процессы происходят неинтенсивно, в результате сыр получается низкого качества. [12,14]

При использовании нового способа двустороннего прессования сырной массы, ее уплотнение осуществляется одновременно с обеих сторон. Верхние и нижние слои, двигаясь навстречу друг другу и вытесняя из межзернового пространства сыворотку, создают одинаковые уплотнения почти по всей сырной массе. Это приводит к более равномерному распределению влаги, более равномерному распределению и развитию микрофлоры в сырной массе. С этой целью было исследовано влияние предложенного способа на качество сыра «Швейцарский», установлен оптимальный режим двустороннего прессования (давление, продолжительность), изучали также микробиологию, биохимию и анизотропность сыров. [16]

После глубокого анализа оптимального режима двустороннего прессования в зависимости от развития, распределения и изменения общего количества молочнокислых бактерий (стрептококков и палочек) при созревании сыра, определяли также динамику изменения пропионовокислых бактерий. [17]

Исследовано их влияние на качество сыра «Швейцарский» (образование крупной округлой формы глазков и хорошего рисунка). С этой целью в три опытных образца и три контрольных вносили 0,1 % бактериальной закваски, состоящей из рентгеномутантных палочек и по 1 мл на тонну молока жидкой культуры пропионовокислых бактерий. Известно, что для сыра «Швейцарский» большое значение имеют следующие виды брожения: молочнокислое с образованием молочной кислоты и пропионовокислое с образованием пропионовой и уксусной кислот,

нежелательны брожения, вызываемые маслянокислыми бактериями и кишечной палочкой. [22,7]

При оценке качеств молока, применяемого в дальнейшем для выработки сыра, использовали редуктазные, бродильные и сычужно-бродильные пробы, также изучали наличие маслянокислых бактерий, кислотность, содержание жира, белка, плотность и т.д [15, 7]

Опыты показали, что как в контрольных, так и в опытных сырах наибольший объем микрофлоры, в том числе пропионовых бактерий, наблюдался на вторые сутки и составлял от 1250 до 1300 млн клеток в 1 г сыра. После двух суток общее количество бактерий постепенно уменьшалось, при созревании в теплой камере – несколько повышалось, достигая 500 млн в 1 г сыра, по-видимому, за счет роста пропионовокислых бактерий. Вне теплого подвала численность клеток вновь снижалась до сотен миллионов. Исследовали также изменение численности пропионовокислых бактерий в процессе созревания опытных и контрольных сыров. [19,7, 11]

Небольшой рост количества клеток наблюдался во время обработки сырного зерна и прессования. После спада молочнокислого брожения количество пропионовокислых бактерий интенсивно росло и на 22-е сутки достигло 1,25 млн, на 25-е сутки – 13 млн, а при выдержке в теплой камере (30 сут) и по выходе из нее – 163 млн, у контрольных сыров соответственно на 22-е сутки – 1,3 млн, на 25-е сутки – 12,5 млн, на 30-е сутки – 160 млн. При дальнейшем созревании сыра количество клеток постепенно уменьшалось и составило 144 млн. [11]

Это означает, что процесс изменения количества пропионовокислых бактерий при созревании опытных и контрольных сыров протекает идентично. Небольшая разница наблюдалась на 30-е сутки в опытных сырах (на 3 млн больше), так как, по - видимому, при двустороннем прессовании вследствие равномерного распределения влаги в сыре условия для развития пропионовокислых бактерий более благоприятные. [15,6]

Количество общего и растворимого азота в опытных и контрольных сырах находилось почти на одном уровне, а по содержанию небелкового азота сыры отличались друг от друга в пользу опытных (разница составила 0,84 %). По-видимому, кроме молочнокислых, пропионовокислые бактерии также участвовали в формировании вкусового букета и рисунка сыра, что способствовало повышению качества сыра. В пробах как опытных, так и контрольных сыров маслянокислой и кишечной палочки не обнаружено.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы исследования

Для анализа пропионовокислых бактерий мы использовали два типа сыра. Мы произвели микробиологическое исследование на предмет количества в каждом из сыров количества бактерий и количественной характеристики пропионовых бактерий. Твердый сычужный – «Маасдам», производитель ОАО «Верхнедвинский маслосырзавод», Республика Беларусь д.Янино и «Швейцарский», производитель ООО «Куяганский маслосырзавод», с. Куяган, Алтайский край.



Рис. 2.1.1. Сыр «Швейцарский»



Состав: молоко нормализованное пастеризованное, соль поваренная пищевая, бактериальная закваска мезофильных и термофильных молочнокислых микроорганизмов, пропионовокислые бактерии, молокосвертывающий фермент препарат животного происхождения, уплотнитель хлорид кальция, консервант нитрат калия. Упаковано с применением защитной атмосферы.



Рис. 2.1.2. Сыр «Маасдам»

Состав: молоко нормализованное пастеризованное, соль поваренная пищевая выварочная экстра «Полесье», уплотнитель хлорид кальция, бактериальная закваска мезофильных, термофильных молочнокислых и пропионовокислых микроорганизмов, ферментный препарат животного происхождения «Naturen Premium 145» (состав: вода, хлористый натрий, химозин, пепсин, консервант бензоат натрия), добавка комплексная пищевая

«Краситель Истелатон 6203.01 Аннато WS01» (состав: вода, регулятор кислотности – гидроксид натрия, краситель «Аннато» )

Упаковано в газовой среде.

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. Анализ микрофлоры сыров методом разбавления.**

*Приготовление питательных сред.*

Для микробиологического исследования сыра нами была приготовлена универсальная питательная среда для анаэробных бактерий Агар с глюкозой.

Агар с глюкозой – в коническую колбу наливали 250 мл проточной воды, добавляли 12,5 г среды. Количество среды рассчитывали по пропорции: на 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды требует 50г порошка. Постепенно добавляя среду в колбу, медленно помешивали во избежание появления комочков. Закрывали колбу пробкой и подогревали на плитке до начала кипения. Затем среду ставили на автоклавирование при температуре 121 °С в течение 20 мин (фаза выдержки).

Приготовленную и простерилизованную питательную среду разливали в стерильном ламинарном шкафу в заранее подготовленные чашки Петри, которые также были простерилизованы в сушильном шкафу при температуре 170 °С в течение 2 часов. Слегка покачивая чашки, распределяли среду равномерно по их дну и оставляли стоять на ровной поверхности.

*Приготовление разбавлений.*

Для микробиологического анализа микрофлоры мы использовали, согласно ГОСТ Р 53430-2009 три разбавления – 1:1000, 1:10 000 и 1: 100 000.

Водопроводную воду разливали по 9 мл в пробирки и по 50 мл – в две небольшие колбы. Пробирки с колбой автоклавировали вместе со средой.

Затем взвешивали 10 г сыра на лабораторных весах и растирали в стерильной ступке до образования однородной массы. Эту массу смешивали со стерильной водопроводной водой из колбы, тщательно перемешивая

(разбавление 1:10). После чего 1 мл исследуемой суспензии стерильным инсулиновым шприцем переносили в первую пробирку с 9 мл стерильной воды, получали первое разбавление (0,01 или 1/100). Тщательно перемешивали содержимое пробирки, вбирая в шприц и выпуская из него полученную взвесь. Данную процедуру мы повторяли несколько раз, затем шприцем отбирали 1 мл суспензии из первой пробирки и переносили во вторую, получая, таким образом, второе разбавление (0,001 или 1/1000) и так далее аналогичным образом до тех пор, пока не получили разбавление 1/100 000.

Затем из каждого разбавления, тщательно взболтав его на вортексе, мы брали по 0,1 мл суспензии и высевали на чашки Петри, распределяя бактериальную суспензию равномерно по поверхности чашки стерильным шпателем, обжигая его каждый раз под пламенем спиртовки. Затем заливали охлажденной до 40°C питательной средой, так как посев осуществлялся под среду.

Для приготовления каждого разбавления мы использовали новый стерильный шприц во избежание получения ошибочного результата.

На рисунке 2.2.1.1. представлена схема разбавления пробы при анализе микрофлоры сыра.

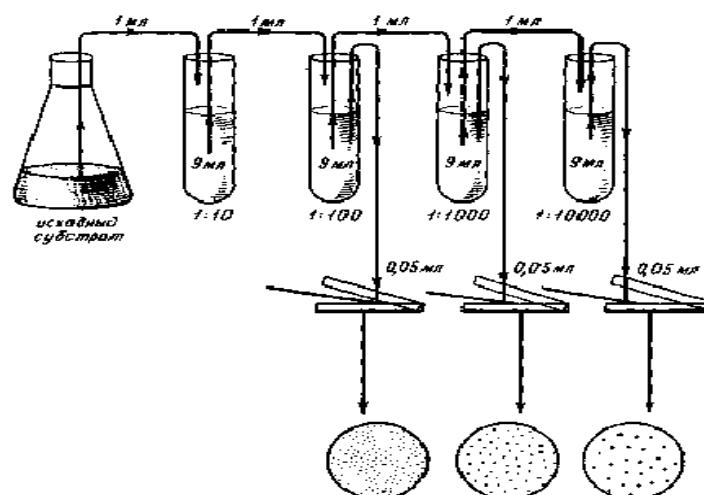


Рис. 2.2.1.1. Схема разбавления пробы при анализе микрофлоры сыра

Всего было взято 12 чашек Петри. Для каждого образца сыра по 6 чашек, по 2 на каждое разбавление.

После посева на боковой стенке чашек Петри мы отмечали степень разбавления, номер чашки, температуру и дату посева. Все чашки Петри помещали в термостаты крышками вниз (во избежание появления конденсата) с температурой 24 градуса. Чашки с посевами согласно ГОСТ Р 53430-2009, инкубировались 72 часа.

*Подсчет колоний микроорганизмов.*

Выросшие колонии рассматривали через стекло, не открывая чашки Петри. Если колоний немного, считали их на всей поверхности чашек. При большом количестве колоний чашки Петри помещали на лист черной бумаги, каждую делили на восемь секторов, производили подсчет в трех секторах, после чего находили среднее арифметическое и умножали на общее количество секторов. Описание колоний, выросших на питательных средах, производили по следующим показателям: форма, характер поверхности, цвет и край (ровный, волнистый и др.).

### **2.2.2. Методы микроскопического исследования микроорганизмов.**

*Фиксированный препарат.*

Данный метод мы использовали для определения формы бактериальных клеток. Работу начинали с приготовления мазка, который высушивали на воздухе либо над пламенем спиртовки. При этом важно было не допустить перегрева мазка, так как при этом может произойти свертывание белков протоплазмы бактериальной клетки. Затем мы производили фиксирование препарата путем быстрого проведения покровного стекла над пламенем горелки, что обеспечивает лучшее прикрепление мазка к стеклу. После этого – окрашивали препарат раствором карболового фуксина, промывали водопроводной водой, высушивали и рассматривали при большом увеличении.

*Метод окраски по Граму.*

Данный метод основан на способности клеток микроорганизмов удерживать красители трифенилметанового ряда.

Готовили фиксированный мазок на чистом предметном стекле, сверху помещали полоску фильтровальной бумаги и наносили краситель. Через 1 – 2 минуты снимали бумагу и, не промывая, наносили на мазок каплю йода. Через 1 мин обесцвечивали мазок спиртом и окрашивали красителем (карболовым фуксином). Затем смывали остатки красителя водой, высушивали над пламенем спиртовки и рассматривали под микроскопом при большом увеличении. При этом, грамположительные бактерии окрашивались в сине-фиолетовый цвет, а грамотрицательные – в розовый. [22]

### **2.2.3. Статистическая обработка цифровых данных.**

Основная задача математической статистики - это определение достоверности полученных результатов исследования. Для получения достоверных данных все варианты выборки должны находиться в равных условиях.

В проведенных опытах определяют достоверность различий между средними арифметическими исследуемых выборок (образцов). Данные задачи решают с помощью применения критериев достоверности Стьюдента ( $t$ ). Критерий Стьюдента – это показатель, который позволяет судить о надежности выводов, подтверждающих или опровергающих рабочую гипотезу.

Перед статистической обработкой полученные данные нужно подготовить: округлить, вычислить средние арифметические и выбраковать сомнительные данные.

Для статистической обработки цифровых данных мы применили два метода: метод описательной статистики и разностный метод.

В ходе исследования нами были рассчитаны статистические показатели, характерные для малых выборок.

- средние арифметические;
- стандартные ошибки;
- дисперсии;
- стандартные отклонения;
- критерий Стьюдента (t).

Данные расчеты проводились нами в программе Microsoft Office Excel 2016 с помощью описательной статистики.

Обработка полученных данных разностным методом включала несколько этапов:

- Вычисление среднего арифметического значения по всем повторностям ( $x_{cp}$ );
- Вычисление разности (d) между данными по повторностям;
- Определение среднего арифметического разности ( $d_{cp}$ );
- Расчет отклонения между каждой разностью и средним значением ( $d - d_{cp}$ );
- Возведение данного отклонения в квадрат и его суммирование ( $\sum(d - d_{cp})^2$ );
- Вычисление ошибок разностей ( $S_d$ ) по следующим формулам:

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)}}$$

- Вычисление критерия Стьюдента фактического:

$$t_{(1-2)} = (x_{2cp} - x_{1cp}) / S_{d(1-2)}$$

Фактический критерий мы сравнивали с теоретическим и делали выводы, пользуясь следующим правилом: если фактический критерий

Стьюдента равен теоретическому значению или больше него, то разность между вариантами существенна.

Теоретические значения критериев мы брали из таблицы числа степеней свободы, которое вычисляли по формуле:

$$v = (n_1 - 1) + (n_2 - 1)$$

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Групповой анализ микрофлоры сыра. Численность микроорганизмов, выросших на питательной среде

Анализ численности был произведен во всех образцах исследуемых сыров. Производилось два посева: свежего сыра (сразу после вскрытия упаковки) и сыра, который 1 неделю хранился в холодильнике. Для получения достоверных данных эксперимент был поставлен повторно.

В таблице 3.1.1. приведены цифровые данные о количестве пропионовокислых бактерий в сыре «Маасдам».

Таблица 3.1.1.

Количество пропионовокислых бактерий в сыре «Маасдам».

	1/1000		1/10 000		1/ 100 000	
	I	II	I	II	I	II
маасдам свежий	1375	1244	854	898	210	192
маасдам (1 неделя)	1068	948	642	754	148	135
Повторность						
маасдам свежий	1208	1186	868	756	217	195
маасдам (1 неделя)	998	972	622	674	168	153

В таблице 3.1.2. приведены цифровые данные о количестве пропионовокислых бактерий в Швейцарском сыре.

Таблица 3.1.2

Количество пропионовокислых бактерий в Швейцарском сыре.

	1/1000		1/10 000		1/ 100 000	
	I	II	I	II	I	II
швейцарский свежий	792	772	556	518	173	165
швейцарский (1 неделя)	700	542	480	422	127	105
<b>Повторность</b>						
швейцарский свежий	876	912	560	542	184	190
швейцарский (1 неделя)	650	684	456	422	147	126

На основе данных полученных по результатам подсчета колоний, можно сделать вывод, что количество пропионовокислых бактерий уменьшается после того, как сыр хранился в холодильнике 1 неделю.

### 3.2. Микроскопическое исследование микрофлоры сыров

Для дальнейшего изучения пропионовокислых бактерий мы провели микроскопическое исследование колоний выросших на чашках Петри. Были выбраны колонии, находящиеся под средой, так как пропионовые бактерии являются факультативными анаэробами.



Рис. 3.2.1 *Propionibacterium*. Фиксированный препарат, окраска метиленовым синим.



Клетки этих бактерий характеризуют как грамположительные, неподвижные палочки, слегка искривленные, иногда – ветвящиеся, похожи на микобактерии. Величина клеток меняется в зависимости от возраста и условий роста. В молодых культурах и аэробных условиях – палочки, затем они укорачиваются иногда до кокковидных форм, которые могут быть соединены в цепочки. В анаэробных условиях клетки более длинные, ветвящиеся, напоминают промицелий проактиномицетов. Внутри клеток часто обнаруживаются легко окрашиваемые зерна.



Рис. 3.2.2. Качественный состав микрофлоры сыров

На микрофотографии под номерами представлены: 1 – род *Lactobacillus*, 2 – род *Streptococcus*, 3 – род *Propionibacterium*

### **3.3. Статистическая обработка цифровых данных.**

#### **3.3.1. Обработка цифровых данных методом дисперсионного анализа**

В программе Microsoft Office Excel 2007 с помощью метода дисперсионного анализа были вычислены следующие параметры: среднее значение, стандартная ошибка, дисперсия и стандартное отклонение.

Таблица 3.3.1.1.

Общая численность пропионовокислых бактерий в разведении 1: 10<sup>6</sup>  
Сыр Маасдам

Сыр	Дата посева	Среднее	Дисперсия	Стандартное отклонение	Ошибка выборочной средней
Маасдам свежий	апрель	213,5	12,25	3,5	1,75
	май	193,5	2,25	1,5	0,75
Маасдам 1 неделя	апрель	158	100	10	5
	май	144	81	9	4,5

Таблица 3.3.1.2.

Общая численность пропионовокислых бактерий в разведении 1: 10<sup>6</sup>  
Швейцарский сыр

Сыр	Дата посева	Среднее	Дисперсия	Стандартное отклонение	Ошибка выборочной средней
Швейцарский сыр свежий	апрель	178,5	30,25	5,5	2,75
	май	177,5	33,25	6,5	3,25
Швейцарский сыр 1 неделя	апрель	137	100	10	5
	май	115,5	110,25	10,5	5,25

В ходе анализа численности данных мы можем сделать вывод о том, что количество пропионовокислых бактерий в швейцарском сыре меньше чем в сыре Маасдам. Также при хранении сыров наблюдается заметное уменьшение количества микроорганизмов (рис. 3.3.1.).

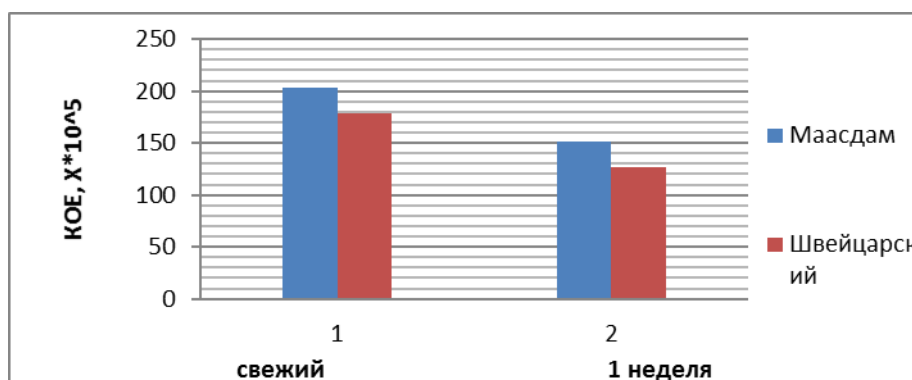


Рисунок 3.3.1. Изменение количества КОЕ в образцах сыра при хранении

### 3.3.2. Обработка цифровых данных разностным методом

Для обработки данных разностным методом мы использовали результаты разведения 1:10<sup>6</sup>. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

Таблица 3.3.2.1.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении количества пропионовокислых бактерий в сыре Маасдам, разведение 1:10<sup>6</sup>

Повторность	КОЕ (x*10 <sup>5</sup> )		d	d-d <sub>cp</sub>	(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd <sub>(1-2)</sub>	t <sub>факт</sub>
	маасдам свежий	маасдам 1неделя					
1	210	148	62	14	196	5,58	9,4
2	192	135	57	3	9		
3	217	168	49	-5	25		
4	195	153	42	-12	144		
	X1 <sub>cp</sub> =203,5	X2 <sub>cp</sub> =151	d <sub>cp</sub> =54	∑=0	∑(d-d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup> =374		

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)^2}} = \sqrt{\frac{374}{12}} = 5,58$$

$$t_{d(1-2)} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{S_{d(1-2)}} = \frac{203,5 - 151}{5,58} = 9,4$$

$$V = (4-1) + (2-1) = 4$$

На уровне значимости 0,05,  $t_{st} = 3,18$ , т. е.  $t_{d(1-2)} > t_{st}$ , следовательно, данные достоверны.

Таблица 3.3.2.2.

Обработка разностным методом данных, полученных при вычислении количества пропионовокислых бактерий в Швейцарском сыре, разведение 1:10<sup>6</sup>

Повторность	КОЕ (x*10 <sup>5</sup> )		d	d-d <sub>ср</sub>	(d-d <sub>ср</sub> ) <sup>2</sup>	Sd(1-2)	t <sub>факт</sub>
	Швейцарский сыр свежий	Швейцарский сыр 1 неделя					
1	173	127	46	-5,75	33,0625	6,25	8,28
2	165	105	60	8,25	68,0625		
3	184	147	37	-14,75	217,5625		
4	190	126	64	12,25	150,0625		
	X1 <sub>ср</sub> =178	X2 <sub>ср</sub> =126,25	d <sub>ср</sub> =51,75	∑=0	∑(d-d <sub>ср</sub> ) <sup>2</sup> =468,75		

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n-1)^2}} = \sqrt{\frac{468,75}{12}} = 6,25$$

$$t_{d(1-2)} = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{S_{d(1-2)}} = \frac{178 - 126,25}{6,25} = 8,28$$

На уровне значимости 0,05,  $t_{st} = 3,18$ , т. е.  $t_{d(1-2)} > t_{st}$ , следовательно, данные достоверны.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молочные продукты занимают первое место в основе правильного питания здорового человека. И сыр далеко не является здесь исключением. Он является легкоусвояемым белковым продуктом, обладает прекрасными органолептическими свойствами. Его пищевая ценность обеспечена высокой концентрацией в нем белков, жиров, незаменимых аминокислот, солей кальция и фосфора, необходимых для нормального развития организма человека. Особенно следует отметить роль твердых сыров, при изготовлении которых участвуют пропионовокислые бактерии.

Они относятся к одним из самых полезных микроорганизмов. Они участвуют в синтезе многих важнейших веществ: различных аминокислот, большего количества жирных кислот, липидов и фосфолипидов, полифосфатов ферментов и витаминов.

В связи с этим актуальными являются разработка заквасок пропионовокислых бактерий, обладающих высокой биохимической активностью, и на их основе создание кисломолочных продуктов питания.

В ходе проведенного нами исследования были получены следующие выводы:

- 1) Был изучен количественный состав микрофлоры «Швейцарского» сыра и сыра Маасдам. По полученным нами данным, можно сделать вывод о том, что количество бактерий в сыре Маасдам больше, чем в Швейцарском сыре. Это может быть связано с различными предприятиями и технологиями производства продукции, возможными нарушениями норм упаковки, транспортировки и хранения сыров.
- 2) При сравнении данных, полученных при исследовании микрофлоры Швейцарского сыра и сыра Маасдам, мы выявили, что при хранении количество пропионовокислых бактерий уменьшается. Это связано с несколькими факторами, во-первых, при хранении сыра нарушается целостность упаковки, в связи с чем увеличивается доступ кислорода,

что губительно сказывается на факультативно анаэробных пропионовокислых бактериях. Во-вторых, бактерии могут проявлять активность и при достаточно низких температурах, поэтому при хранении сыров в холодильнике расходуются питательные вещества необходимые для их жизнедеятельности и их численность снижается.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белозерова, Л.М. Разработка технологии кисломолочного продукта с использованием пропионовокислых бактерий: дис... канд. техн. наук / Белозерова Л.М. – Улан-Удэ, 2001.
2. Воробьева, Л.И. Пропионовокислые бактерии / Л.И. Воробьева. – М.: Изд-во МГУ, 2009. – 288 с.
3. Воробьева Л.И. Пропионовокислое брожение и образование витамина В12. /Л.И. Воробьева. -М.: МГУ. - 2014. - 100 с.
4. Гаврилова Н.Н., Ратникова И.А., Баякышева К., Захаренко Л.И. Создание ассоциации из молочнокислых и пропионовокислых бактерий, активной в отношении колибактериоза и сальмонеллеза / Н.Н. Гаврилова // Биотехнология. - 2005. -№2. - С.26-32.
5. Гудков А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / Под редакцией С.А.Гудкова // М.: Де Ли принт, 2003. - 800 с.
6. Гусев М.В., Л.А. Минеева. Микробиология. – М.: Академия, 2010. – 464 с.
7. Джеймс М.Джей, Мартин Дж. Лесснер, Дэвид А.Гольден. Современная пищевая микробиология. – М.: Бинوم. Лаборатория знаний, 2014. – 888 с.
8. Дьяченко, П.Ф. Специфичность протеолитической продуктивности заквасочных культур в сыроделии / П.Ф. Дьяченко, В.Г. Тиняков // Молоч. промышленность. – 1987. – № 4. – С. 19–22.
9. Ившина И.Б. Большой практикум Микробиология. Учебное пособие. – М.: Проспект Науки, 2014. – 112 с.
10. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. – М.: СпецЛит, 2006. – 772 с.

11. Мородинова В.А., Лепилкина О.В., Остроухова И.П., Самойлов А.В. Особенности формирования органолептических показателей сырных продуктов // Сыроделие и маслоделие. 2012. № 2.
12. Мармузова Л.В. Основы микробиологии, санитарии и гигиены в пищевой промышленности. – М.: Academia, 2013. – 160 с.
13. Мурадова Е.О., Ткаченко К.В. Микробиология. – М.: Эксмо, 2009. – 336 с.
14. Николаева, Е.А. Созревание сыра «Швейцарский» в полимерной пленке / Е.А. Николаева // Сыроделие и маслоделие. – 2007. – № 3. – С. 13. 5.
15. Определитель бактерий Берджи в 2-х томах под ред. Дж. Хоулта и др.. М.: Мир, 1997. - 780 с.
16. Остроумов Л.А. Биологические методы управления процессом производства сыров с высокой температурой второго нагревания: обзорная информация / Л.А. Остроумов // АгроНИИТЭИММП, 1993. - 40 с.
17. Остроумов Л.А. Качество советского сыра при различных уровнях молочнокислого и пропионовокислого брожения / Л.А.Остроумов, В.А.Бабушкина, А.А.Майоров, С.А.Говорюткина // Тр.ВНИИМС. 1978. Вып. XXIII. С.100-104.
18. Перфильев Г.Д. Производство и применение бактериальных концентратов / Г.Д. Перфильев, Ю.Я. Свириденко // Сыроделие и маслоделие, 2006. - № 3. - С. 24-29.
19. Попищук П.К., Дербинова З.С., Казанцева Н.Н. Микробиология молока и молочных продуктов. – М.: Пищевая промышленность, 1978.
20. Рогов, И.А. Химия пищи / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Н.И. Дунченко. – М.: КолосС, 2007. – 726 с.
21. Сидоренко О. Д. Микробиология. – М.: ИНФРА – М, 2005. – 287 с.: ил.



22. Сиротин А.А. Практикум по микробиологии / А.А. Сиротин. – Белгород, 2007. – 78 с.
23. Скотт Р., Робинсон Р., Уилби Р. Производство сыра. Сырье, технологии, рецептуры. – Пер. с англ. яз. под ред. К. К. Горбатовой. – СПб.: Профессия, 2005. – 464 с.
24. Соколова О.Я. Производственный контроль молока и молочных продуктов. – Оренбург.: ОГУ, 2012. – 195 с.
25. Табачников В.А. Крупноблочное прессование сыра. – М.: ЦНИИ ТЭИ, 1968.
26. Хамагаева, И. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий / И. Хамагаева и др. – Улан-Удэ, 2006. – 172 с.
27. Babuchowski A, Hammond EG, Glatz BA (1993) Survey of propionibacteria for ability to produce propionic and acetic acids. *J Food Prot* 56: 493-496
28. Boyaval P, Corre C, Madec MN (1994) Propionic acid production in a membrane bioreactor. *Enzyme Microbiol Technol* 16: 883-886
29. Chisti Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity // *Trends in Biotechnology*. – 2003. – V. 21(2). – P. 89–93.
30. Claude S (1996) Research of new outlet for glycerol ± Recent developments in France. In: Eierdanz H (ed) *Perspektiven Machwachsender Rohstoffe in der Chemie*. VCH, Weinheim, pp 133-143
31. Colomban A, Roger L, Boyaval P (1993) Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling. *Biotechnol Bioeng* 42: 1091-1098
32. Crespo JPSG (1990) Modelling of immobilized cell reaction for propionic acid production. *Biotechnol Bioeng* 36: 705-716
33. Draughon FA, Mobley DC, Sañey LM, Backus WR (1982) Effect of calcium propionate and sodium diacetate on fungi in stillage. *J Food Sci* 44: 1018-1019

34. Eaton DC, Gabelman A (1995) Fed-batch and continuous fermentation of *Selenomonas ruminantium* for natural propionic, acetic and succinic acids. *J Ind Microbiol* 15: 32-38
35. Emde R, Schink B (1990a) Enhanced propionate formation by *Propionibacterium freudenreichii* in a three-electrode amperometric culture system. *Appl Environ Microbiol* 56: 2773-2776
36. Erickson LE, Minkevich IG, Eroshin VK (1979) Utilization of mass-energy balance regularities in the analysis of continuous culture data. *Biotechnol Bioeng* 21: 575-591
37. Flores Galarza RA (1985) Preservation of high moisture corn by microbial fermentation. *J Food Prot* 48: 407-411
38. Hendricks B, Korus RA, Heimsch RC (1986) Propionic acid production by bacterial fermentation. *Biotechnol Bioeng* 15: 241-245
39. Hettinga DH, Reinbold GW (1972) The propionic-acid bacteria. A review. II. Metabolism. *J Milk Food Technol* 35: 358-372
40. Huitson JJ (1968) Cereals preservation with propionic acid. *Process Biochem* 31-32
41. Johns AT (1951) The mechanism of propionic acid formation by the *Propionibacteria*. *J Gen Microbiol* 5: 37-345
42. Lewis PV, Yang ST (1992b) A novel extractive fermentation process for propionic acid production from whey lactose. *Biotechnol Prog* 8: 104-110
43. Lueck E (2015) Propionic acid. In: Lueck E (ed) *Antimicrobial food additives. Characteristics. Uses. Eects.* Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 175-182
44. Mantire-Alhonen S (1987) A new type of milk with *Propionibacteria*. *Meijeritiet Aikak* 45: 49-61
45. Playne MJ (1985) Propionic and butyric acids. In: Moo-Young M (ed) *Comprehensive biotechnology, vol 3.* Pergamon, New York, pp 731-75

46. Quesada-Chanto A, Afschar AS, Wagner F (1994) Microbial production of propionic acid and vitamin B12 using molasses or sugar. *Appl Microbiol Biotechnol* 41: 378-383
47. Tabatabaie, F., Mortazavi, S.A. (2010). Effects of ultrasound treatment on viability and autolysis of starter bacteria in hard cheese. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environment Science*, 8(3), 301– 304.
48. Woskow SA, Glatz BA (2007) Propionic acid production by a propionic acid - tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and continuous fermentation. *Appl Environ Microbiol* 57: 2821-2828