

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ  
Государственное образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
Восточно-Сибирский государственный  
технологический университет  
(ГОУ ВПО ВСГТУ)

**И. С. ХАМАГАЕВА  
Л. М. КАЧАНИНА  
С. М. ТУМУРОВА**

## **БИОТЕХНОЛОГИЯ ЗАКВАСОК ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

Улан-Удэ  
Издательство ВСГТУ  
2006

УДК 637.146:577.151  
ББК 30.16:36.95:51.28  
X 18

Печатается по решению редакционно-издательского  
совета Восточно-Сибирского государственного технологи-  
ческого университета

Рецензенты

д-р техн. наук, проф. Остроумов Л.А., Кемеровский  
технологический институт пищевой промышленности

д-р техн. наук, проф. Чиркина Т.Ф., Восточно-  
Сибирский государственный технологический университет

**Хамагаева И.С., Качанина Л.М., Тумурова С.М.**

X 18 Биотехнология заквасок пропионовокислых бакте-  
рий.–Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006.– 172 с.  
ISBN 5-89230-197-4

В монографии приведены данные, касающиеся стимулирующе-  
го действия  $\beta$ -галактозидазы в молоке на биохимическую активность  
пропионовокислых бактерий. Особое внимание уделено изучению ан-  
тимутагенной активности и витаминообразующей способности пропио-  
новокислых бактерий. Приведен обширный материал по технологии  
производства сухой закваски, концентрированных заквасок прямого  
внесения и кисломолочного продукта «Целебный». Изложены результа-  
ты исследований по созданию жидкого концентрата пропионовокислых  
бактерий в качестве БАД к пище.

Рекомендуется для студентов, аспирантов, магистров и специа-  
листов, занимающихся в области биотехнологии, медицины и пищевой  
промышленности.

ISBN 5-89230-197-4

ББК 30.16:36.95:51.28

© И.С. Хамагаева с соавт., 2006

© ВСГТУ, 2006

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** В последние годы все большее внимание уделяется созданию продуктов функционального питания, способных оказывать определенное регулирующее действие на организм в целом или на его определенные системы и органы или их функции. По мнению японских исследователей, которые являются основоположниками этого направления, функциональное питание в скором времени сможет успешно конкурировать на рынке со многими лекарственными препаратами (84).

При разработке продуктов нового поколения предлагается использовать микроорганизмы, способные прижиться в желудочно-кишечном тракте человека, оказывать положительное влияние на его иммунную систему (42,85). В связи с этим большой интерес представляет проблема использования пропионовокислых бактерий при изготовлении кисломолочных продуктов.

Пропионовокислые бактерии обладают уникальными иммуностимулирующими и антимуtagenными свойствами, они приживаются в кишечнике людей и способны к снижению генотоксического действия ряда химических соединений и УФ-лучей. Известно, что положительная роль пропионовокислых бактерий как пробиотиков обусловлена образованием ими пропионовой кислоты, минорных органических кислот, бактериоцинов и ферментов (26,37). Пропионовокислые бактерии синтезируют большое количество витамина В<sub>12</sub>, который регулирует основные обменные процессы в организме, способствует повышению иммунного статуса организма, улучшает общее самочувствие за счет активизации белкового, углеводного и жирового обмена, улучшает качество крови, участвует в синтезе различных аминокислот, нуклеиновых кислот. При недостатке витамина В<sub>12</sub> возникают желудочно-кишечные заболевания, дис-

бактериоз, анемия (22,28,78,87).

В настоящее время наблюдаемый у населения дефицит витаминов, обусловленный сокращением потребления овощей и фруктов, применением в медицинской практике антибиотиков и химиопрепаратов, возрастанием потребления продуктов, подвергнутых технологической обработке, выдвигает на первый план задачу обогащения витаминами продуктов повседневного спроса, таких, как кисломолочные.

Учитывая, что синтез витамина В<sub>12</sub> кишечной флорой незначителен, витамин должен поступать в организм с пищей, а так как кисломолочные продукты являются продуктами ежедневного потребления, то витаминизация их до определенного уровня целесообразна (87). 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 (84). Поэтому важную роль в профилактике и лечении вышеперечисленных заболеваний могут играть кисломолочные продукты, содержащие пропионовокислые бактерии - продуценты витамина В<sub>12</sub>.

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.

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

# ГЛАВА I. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

## 1.1. Физиолого-биохимические свойства пропионовокислых бактерий

Пропионовокислые бактерии были открыты Фройденрайхом и Орла-Енсенем (113,126). Сыры, молоко и молочные продукты стали основными источниками выделения пропионовых бактерий. Из «эмментальского» сыра Фройденрайх и Орла-Енсен выделили чистые культуры бактерий, которые составили три морфологические группы: *Bacterium acidipropionici* a, *B. acidipropionici* b и *Bacillus acidipropionici*. Тролли-Петерсон (135,136), пользуясь методом Бури, выделила ряд штаммов, большая часть которых идентична с культурами Фройденрайха и Орла-Енсена, а одна отличалась значительным слизеобразованием и была отнесена к четвертой группе – *Bacterium acidipropionici* c (27).

Первым исследователем микрофлоры русских сыров был А.Ф. Войткевич. Он описал изолированные пропионовокислые бактерии, которые по своим свойствам напоминали *B. acidipropionici* a. Шерман (131) выделили ряд культур пропионовых бактерий, в том числе новую – *B. acidipropionici* d, отличающуюся от известных высокой продукцией кислот при развитии в молоке и на среде с глицерином.

Ван Ниль (137,138) изолировал 30 штаммов пропионовокислых бактерий. В результате собственных исследований, а также на основании литературных данных он установил восемь видов и одну разновидность пропионовокислых бактерий, что положило начало их систематике.

Пропионовокислые бактерии объединены в род *Propionibacterium* (126), который входит в состав семейства *Propionibacteriaceae* (105).

В целом пропионовокислые бактерии характеризуются как грамположительные, каталазоположительные, неспорообразующие, неподвижные, факультативно анаэробные и аэротолерантные палочковидные бактерии. При брожении они образуют пропионовую кислоту, откуда и получили свое название. Поскольку главное место обитания анаэробных коринебактерий — это поверхность кожи людей, их стали называть кожными пропионовокислыми бактериями, а бактерии, выделенные из сыра и молока, — молочными, или классическими, пропионовокислыми бактериями. Все виды (классических) пропионовокислых бактерий рода *Propionibacterium* представлены в табл. 1.1.1.

Таблица 1.1.1 — Виды рода *Propionibacterium*

Название видов и групп, принятых к 1988 г.	Первоначальное название
<i>P. freudenreichii</i> <i>P. thoenii</i> <i>P. jensenii</i>	<i>P. freudenreichii</i> , <i>P. shermanii</i> <i>P. thoenii</i> , <i>P. rubrum</i> <i>P. jensenii</i> , <i>P. zeae</i> , <i>P. thechnicum</i> , <i>P. raffinosaceum</i> , <i>P. petersonii</i>
<i>P. acidipropionici</i> <i>P. cocoides</i> *	<i>P. arabinosum</i> , <i>P. pentosaceum</i>

\* Предложен в 1983 г. (Воробьева и др.).

Воробьева и др. (6,27,28,29) предложили в род *Propionibacterium* включить пропионовокислые кокки, имеющие с палочковидными бактериями много общих свойств. Кокки выделяют из молока и сыров на ранних стадиях их созревания. В отличие от типичных пропионовых бактерий кокки хорошо растут на поверхности плотных сред в виде оранжевых колоний и обладают широкими ферментативными способностями. Новый вид предложено назвать *Propionibacterium coccoides*.

Важным свойством рода является образование пропионовой кислоты в результате пропионовокислого брожения, зависящего от кофермента В<sub>12</sub> (25).

Главное место обитания классических пропионовокислых бактерий – твердые сычужные сыры и более 60% штаммов, выделенных в Финляндии из «Эмментальского» сыра, относится к *Propionibacterium freudenreichii* и *Propionibacterium shermanii* (125).

Коринеформенные бактерии рода *Propionibacterium* впервые были выделены из швейцарского сыра. Лактат, который первоначально образуется в свернувшемся молоке молочнокислыми бактериями, сбраживается, затем до пропионата, ацетата и СО<sub>2</sub>, развивающимися как вторичная микрофлора пропионовокислыми бактериями. Пропионат и ацетат придают швейцарскому сыру специфический аромат, а выделяющаяся СО<sub>2</sub> создает характерную для него ноздреватость.

Дальнейшие исследования показали, что первичным природным местообитанием пропионовых бактерий является рубец травоядных животных, где они сбраживают лактат, образованный другими представителями микрофлоры рубца. Кроме лактата эти бактерии могут сбраживать и другие сахара. Хотя пропионовокислые бактерии не растут в присутствии воздуха и требуют для своего развития анаэробных условий или низкого парциального давления О<sub>2</sub>, сообщение Воробьевой о том, что эти бактерии можно культивировать в аэробных условиях, было встречено микробиологами с удивлением. Американские исследователи обнаружили у бактерий ферменты цикла Кребса. В результате изучения аэробного метаболизма у пропионовокислых бактерий установлены функционирующая цепь переноса электронов (ЦПЭ), кислородное, фумаратное, нитратное дыхание, система антиокислительной защиты. Эти исследования продемонстрировали удивительную лабильность метабо-

лизма пропионовокислых бактерий, которые, как оказалось, экипированы как для анаэробной, так и для аэробной жизни. Например, оказалось, что анаэробные представители семейства образуют значительные количества супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, ферментов, характерных для аэробного метаболизма. Кроме того, исследованные Антилой (100) штаммы развивались в аэробной среде, если субстрат содержал дрожжевой экстракт.

Пропионовокислые бактерии – это палочки самой разнообразной величины, от очень коротких, почти кокков, до длинных. Клетки расположены единично, парами или короткими цепочками. Некоторые виды характеризуются утолщениями и веточками на концах. Величина клеток может значительно меняться в зависимости от их возраста и условий культивирования. Молодые клетки в аэробных условиях имеют вид коротких палочек, в анаэробных, а также при повышенных температурах они становятся более длинными. Имеются сведения о наличии пропионовокислых бактерий в пределах одного вида взаимопревращающихся от шарообразной до палочковой формы и обратно (49, 54, 65). Палочковидные клетки бактерий склонны к полиморфизму. Рудиментарное ветвление наблюдается в аэробных или в анаэробных условиях при низких значениях рН (19,20,25).

Бактерии хорошо окрашиваются по Грамму (граммположительные), слабо окрашиваются метиленовой синью, чем значительно отличаются от молочнокислых. Колонии обычно влажные, округлые или в виде гречишного зерна, блестящие, маслянистые. Цвет колоний у пропионовокислых бактерий кремовый, желтый, оранжевый, красный, коричневый. Под микроскопом они отличаются от других бактерий по своеобразному «полисадному» расположению клеток, иногда образующих изогнутые цепочки и «иероглифы» вследствие деления с защелкиванием. В сканирую-

щем микроскопе видно, что клетки бактерий неровные, с округлыми концами, в отдельных случаях покрыты слизью и образуют слизистые тяжи.

Клетки *Propionibacterium freudenreichii* имеют вид кокков, у *Propionibacterium rubrum*, *Propionibacterium pentosaceum* – короткие палочки, а у *Propionibacterium petersonii* – длинные палочки 8-10 мкм, что в 4-5 раз превосходит размеры клетки других видов. Толщина клеток (0,5-1) мкм. Клетки имеют тенденцию к рудиментарному ветвлению, местами образуя небольшие утолщения, отростки и вздутия. Этот вид отличается от других необычным плеоморфизмом. Неправильной формы клетки с ложным ветвлением и беспорядочными перегородками сохраняются на всех стадиях роста культуры (19, 20, 25).

*P. shermanii* выделяют из «Швейцарского» и «Советского» сыров, сырого молока. В больших количествах образует пролин, с чем связывают аромат сыра. Клетки в виде коротких палочек, часто почти кокков. От других видов отличается более высокой термоустойчивостью. Главная жирная кислота - 12-метилтетрадекановая (≈43%). Главный сахар в пептидогликане - галактоза, меньше маннозы и рамнозы, глюкозы нет вообще. Сбраживает лактозу.

Пропионовокислые бактерии растут в пределах температуры (15-40)<sup>0</sup>С, хотя есть данные, что рост происходит при более низкой температуре (до минус 10<sup>0</sup>С). Оптимальная температура развития классических пропионовокислых бактерий (30±1)<sup>0</sup>С. Оптимальная величина рН роста пропионовокислых бактерий 6,5-7,0, максимальная - 8,0, минимальная - 4,6 (24,25,28,29).

Пропионовокислые бактерии относятся к солеустойчивым. При содержании в лактатной среде 4% NaCl происходит нормальный рост и брожение.

Состав клеточных стенок: обнаружено (130) два различных типа пептидогликана. Клетки *P. shermanii* и *P. freu-*

*denreichii* содержат непосредственно поперечно связанный пептидогликановый тип с т-ДАП в положении 3. В состав сахаров клеточных стенок *P. shermanii* и *P. freudenreichii* входят галактоза, манноза и рамноза (последняя в клеточных стенках других видов не обнаружена), глюкоза отсутствует (118).

При обследовании 40 штаммов было обнаружено (119,133), что основным типом жирной кислоты, экстрагируемой из целых клеток, является С<sub>15</sub> насыщенная кислота с разветвленной цепочкой. Причем у видов *P. shermanii* и *P. freudenreichii* С<sub>15</sub>-кислота присутствует в форме антеизо-С<sub>15</sub>-изомера (12-метилтетрадекановая), у второй группы (*P. arabinosum*, *P. jensenii*, *P. pentosaceum*, *P. thoenii*, *P. zeae*) обнаруживают в основном изо-С<sub>15</sub>-кислоту (13-метилтетрадекановую). У других бактериальных видов С<sub>15</sub>-кислоты присутствуют в «следовых» количествах, так что наличие ее в больших количествах (больше в 2-3 раза, чем любой другой жирной кислоты) у пропионовых бактерий может служить диагностическим признаком.

Таксономическим признаком рода является также состав клеточных фосфолипидов. Для рода *Propionibacterium* основной фосфолипид представлен мономаноидом глицерил фосфорилмиоинозита (129). Фосфолипиды у пропионовокислых бактерий составляют около 10% от общего количества липидов.

Главный гликолипид пропионовокислых бактерий представлен 1-0-пентаденаил-2-0 (6-0-гентадеканойл-α-D-маннопиранозил) миоинозитом и включает жирные кислоты (пентадеканойдную, гептадеканойдную), маннозу и инозит в молярных отношениях 2:1:1. Все изученные виды пропионовых бактерий содержат однотипный главный гликолипид, что является важным таксономическим признаком рода.

Пропионовокислые бактерии синтезируют значительные количества жирных кислот, липидов и фосфолипидов (63), состав которых является таксономическим признаком. Некоторые штаммы *P. shermanii* синтезируют также  $C_{12}$ ,  $C_{21}$ ,  $C_{22}$ ,  $C_{23}$ - жирные кислоты. Липиды пропионовокислых бактерий, по-видимому, не только входят в структурные элементы клеток, но и играют еще роль защитных компонентов против действия некоторых антибиотиков.

Пропионовокислые бактерии в значительных количествах синтезируют полифосфаты (63,70).

При выделении пропионовокислых бактерий учитывают такие свойства, как способность использовать лактаты, хороший рост в анаэробных условиях при нейтральном значении pH. Анаэробные условия создают путем добавления к агаровой среде сульфита Na или цистеина, тиогликолята Na.

Купенов (71) с целью получения колоний пропионовокислых бактерий в чашках Петри без создания анаэробных условий предлагает использовать среду Кребса, содержащую дрожжевой экстракт Дифко, лактат Na, «V.F.»-бульон, соли и 0,5-1,0% агара «Oxoid».

Для выделения и поддержания пропионовокислых бактерий рекомендуют (124) среду следующего состава (%): триптиназа (BBL)-1, дрожжевой экстракт (Difco)-1, лактат Na-1,  $KH_2PO_4$ -0,25,  $MnSO_4$ -0,0005, агар (Difco)-1,5. Вода дистиллированная, конечный pH доводят до 7,0. Для создания оптимальных условий роста в среду вносят х-цистеин (0,05%) и твин 80 (0,05%), стимулирующие рост бактерий.

Среда, поддерживающая хороший рост всех пропионовых бактерий, имеет следующий состав (%): триптиназа (BBL)-1, дрожжевой экстракт (Дифко)-0,5, глюкоза-1,  $CaCl_2$ ,  $MnSO_4$ , NaCl-0,002, К-фосфатный буфер-0,05М, твин 80 Na-формальдегид сульфоксалат-0,05,  $NaHCO_3$ -0,1, конечный pH-7,0 (102, 106, 107).

В исследованиях Воробьевой (33, 97) хороший рост пропионовокислых бактерий достигался в кукурузно-глюкозной среде состава: кукурузный экстракт-2%, глюкоза-1%,  $K_2HPO_4$ -0,2%,  $(NH_4)_2SO_4$ -0,5%,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ -10 мг/м, pH 7,0 с помощью насыщенного раствора  $NaHCO_3$ . В отличие от многих, пропионовокислые бактерии хорошо утилизируют лактаты, поэтому зрелые сыры («Швейцарский», «Советский», «Алтайский») успешно используют для выделения пропионовых бактерий.

Пропионовокислые бактерии лучше всего используют лактат в присутствии дрожжевого экстракта (103), но еще более сильное стимулирующее действие, чем дрожжевой экстракт, проявляет бесклеточный экстракт штаммов молочнокислых бактерий - *Streptococcus thermophilus* (89, 115, 116). Лактат в качестве источника углерода обеспечивает более высокую скорость роста пропионовокислых бактерий, чем лактоза (110, 111).

Суммируя результаты изыскания повышения биологической полноценности молочных сред, можно отметить следующее. При добавлении в молоко или сыворотку 0,5%-ного дрожжевого экстракта увеличивается продуцирование кислот пропионовокислыми бактериями в 2,5-4,5 раза, а при внесении 1% лактата натрия активизируется этот процесс в 1,6-4,6 раза (59). Эффект от добавления пептонизированного молока, гидролизата казеина значительно меньше. Наиболее благоприятной средой для развития пропионовых бактерий является дрожжевой автолизат с глюкозой.

Потребность пропионовокислых бактерий в наборе витаминов значительно меньшая, чем у молочнокислых бактерий. Delwiche (108) показал, что они нуждаются только в пантотеновой кислоте и биотине, некоторые из них требуют тиамин. Рибофлавин стимулирует рост, но облигатной потребности в нем нет, витамины  $B_{12}$  и  $B_2$  бактерии синтезируют самостоятельно (22, 23, 127). Рост всех про-

пионовокислых бактерий стимулируется твином 80. Низин оказывает сильное ингибиторное действие (96).

В качестве источника углерода для синтеза наиболее благоприятна глюкоза, хотя бактерии неплохо растут на лактозе, лактате, пирувате, глицерине(25). Отдельные виды свертывают молоко, не разжижают желатин, образуют ди-ацетил и ацетоин. На средах с глюкозой и арабинозой пропионовокислые бактерии образуют  $\alpha$ -молочную кислоту, при использовании в качестве источника углерода молочной кислоты – пропионовую и уксусную кислоты (30, 101, 102, 104, 133).

Для культивирования на лактозосодержащих средах наибольший интерес представляет вид *Propionibacterium shermanii* (25).

Из дрожжевого экстракта было выделено растворимое в эфире вещество, которое являлось фактором роста для пропионовокислых бактерий, если последние культивировались на среде с единственным источником азота – сульфатом аммония. Сравнительное изучение влияния различных солей аммония на рост *P. shermanii* показало, что наиболее благоприятен уксуснокислый и щавелевокислый аммоний, наименее –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , цитрат  $\text{H}(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  являются равноценными источниками азота для пропионовокислых бактерий (21).

Пропионовые бактерии могут синтезировать все аминокислоты за счет ассимиляции азота  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (14, 31, 72). Биосинтез белков пропионовыми бактериями сопровождается созданием пула из 15 аминокислот: цистина, гистидина, аргинина, аспартата, глутаминовой кислоты, глицина, серина, треонина,  $\beta$ -аланина, тирозина, валина, метионина, пролина, фенилаланина и лейцина (14, 126). Известно, что бактерии содержат пептидазы, при участии которых обеспечивают себя незаменимыми аминокислотами и осуществляют реакции трансаминирования, могут расти на любой из

20 аминокислот, внесенной в среду в качестве единственного источника азота (103, 72).

Известно, что серосодержащие аминокислоты стимулируют рост, а бактерии устойчивы к высоким концентрациям  $\text{H}_2\text{S}$  в среде (33, 96, 112). Из серосодержащих аминокислот пептидов молока бактерии образуют диметилсульфид, обладающий антимуtagenным действием (34, 82).

Пропионовые бактерии, как и все живые существа, в первую очередь бактерии, постоянно и длительно подвергаются воздействию внешних и внутренних мутагенов. К обычным внешним естественным источникам мутагенов относятся радиация, газ радон, космические лучи,  $\text{K}^{40}$  и другие радионуклиды (ядра нестабильных изотопов, самопроизвольно распадающихся в земной коре) (7).

Поскольку в естественных условиях микроорганизмы (а также растения и животные) постоянно подвергаются действию мутагенов, у них сформировались эндогенный и экзогенный защитные механизмы: у всех живых существ образуются молекулы, способные к осуществлению антимутагенеза. Под антимутагенезом понимают снижение частоты спонтанной и индуцированной мутации. Антимутагены регулируют скорость спонтанных мутаций, стабилизируют мутационный процесс. Антимутагены повышают активность ферментативных систем, участвующих в детоксификации поступающих в клетку веществ, влияют на окислительно-восстановительный потенциал организма. Все эти процессы приводят к снижению мутаций.

В 1989 г. Воробьевой (38,39), с использованием теста Эймса, впервые была обнаружена антимутагенность пропионовых бактерий против азида  $\text{Na}$  ( $\text{NaN}_3$ ).

Изучение антимутагенеза важно именно в отношении тех бактерий, которые используют при изготовлении кормов, кормовых добавок и пищи. Бактерии как источники антибиомутагенов или десмутагенов могут быть использо-

ваны 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 (34, 2, 64).

Экстракты клеток классических пропионовокислых бактерий проявляют высокую эффективность антимуtagenного действия. Кроме супероксиддисмутазы в клеточном экстракте пропионовых бактерий присутствуют и другие белки (видимо, ферменты) с антимуtagenной активностью (67, 68). Пока можно твердо сказать, что обследованные штаммы обладают антимуtagenностью против NaN<sub>3</sub> и НГ и что антимутагены имеют пептидную (белковую) природу и, видимо, являются ферментами (34, 43, 50).

Было показано (32), что кожные и классические пропионовокислые бактерии выделяют в среду вещества с антимуtagenной активностью. Десмутагенное действие культуральной жидкости проявлялось при выращивании бактерий на среде с глюкозой, лактозой и лактатом. Установление факта антимуtagenности культуральной жидкости и клеточного экстракта пропионовокислых бактерий открыло новые, ранее не известные у них свойства, обуславливающие защиту клетки от внешних и эндогенных мутагенов (34, 39). Поэтому пропионовокислые бактерии могут стать источниками новых и ценных антимуtagenов.

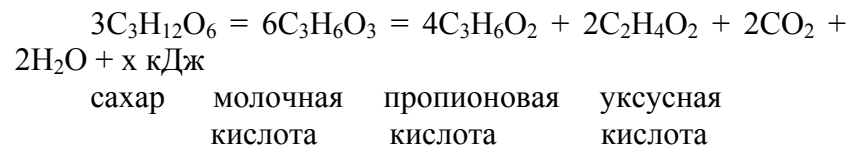
Таким образом, пропионовокислые бактерии относятся к наиболее полезным микроорганизмам. Они способны к синтезу практически важных веществ: большинства аминокислот, значительного количества жирных кислот, липидов и фосфолипидов, полифосфатов ферментов и витаминов.

## 1.2. Брожение, осуществляемое пропионовокислыми бактериями

Основное энергетическое значение для пропионовокислых бактерий имеют так называемые ключевые реакции пропионовокислого брожения (25).

Под пропионовокислым брожением подразумевают биохимический процесс превращения бактериями сахара, молочную кислоту и ее солей в пропионовую кислоту. В этом брожении, кроме пропионовой кислоты, образуются и такие продукты, как уксусная кислота, углекислый газ, янтарная кислота, ацетон, диацетил (134), другие летучие ароматические соединения – диметилсульфид, ацетальдегид, пропионовый альдегид, этанол и пропанол (35, 109, 121).

Пропионовокислое брожение выражается следующим уравнением:



Химизм данного брожения подобен типичному молочнокислому брожению с той разницей, что образовавшаяся молочная кислота в этом брожении не конечный продукт, а промежуточный. От других типов брожения пропионовокислое отличается высоким выходом АТФ, участием некоторых уникальных ферментов и реакций (79).

Пропионовокислым бактериям свойственен бродильный тип метаболизма: они расщепляют сахара по пути Эмбдена–Мейергоффа до пропионата, ацетата, СО<sub>2</sub> и сукцината. Химизм пропионовокислого брожения хорошо изучен и описан (114, 132, 143).



Ключевую реакцию брожения – превращение  $\alpha$ -метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА катализирует кофермент  $B_{12}$  (Ado Cbl).

Когда сбраживаемым субстратом является лактат, он сначала окисляется в пируват. Часть пирувата далее окисляется до ацетил-КоА и  $CO_2$ , причем превращение ацетил-КоА в ацетат сопровождается образованием АТФ (41). Получение в процессе брожения окисленных продуктов, ацетата и  $CO_2$  уравнивается сопутствующим восстановлением пирувата до пропионата.

Пировиноградная кислота – обязательное промежуточное соединение в брожении (140, 141).

Пируват может быть превращен в пропионат несколькими путями:

- 1). пируват  $\rightarrow$  акрилат  $\rightarrow$  пропионат;
- 2). пируват  $\rightarrow$  лактат  $\rightarrow$  пропионат;
- 3). пируват +  $C_1 \rightarrow$  сукцинат  $\rightarrow$  метилмалонат  $\rightarrow$  пропионат.

Первые две возможности у пропионовых бактерий не реализуются, и образование пропионата происходит из дикарбоновой кислоты по третьему пути (139).

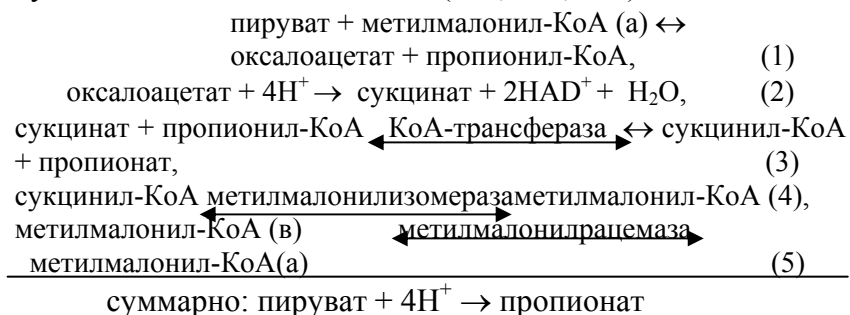
Сначала лактат окисляется до пирувата при участии флавопротеида в качестве акцептора водорода, затем в реакции транскарбоксилирования образуется оксалоацетат. Донором  $CO_2$  служит (S)-метилмалонил-КоА, а переносчиком  $CO_2$  – биотин. Под действием малатдегидрогеназы и фумаразы образуется фумарат, который восстанавливается до сукцината в реакции, катализирующей фумаратредуктазой. Эта реакция сопряжена с синтезом АТФ путем фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов. Далее в КоА-трансферазной реакции образуется сукцинал-КоА. Затем под действием метилмалонил-КоА-мутазы, содержащей кофермент  $B_{12}$ , осуществляется перегруппировка, ведущая к образованию (R)-метилмалонил-КоА, который, од-

нако, не является субстратом для транскарбоксилазы. Скорее всего, (S)-стереоизомер образуется при действии специфической рацемазы. В этом случае в реакции транскарбоксилирования синтезируется пропионил-КоА, и в результате последующего переноса КоА на сукцинат образуется пропионат (71, 98, 99).

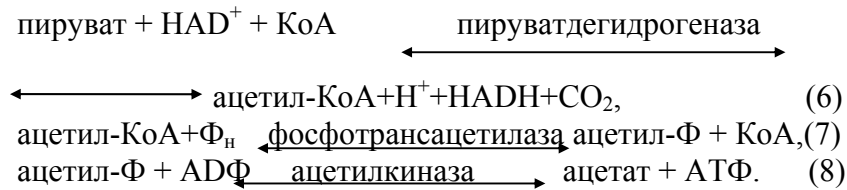
В процессе сбраживания лактата в пропионат потребляется одна молекула  $NADH_2$ . Она образуется при окислении лактата до ацетата в соответствии с суммарным уравнением реакций брожения:



Открытие американских исследователей нашло свое подтверждение и в исследованиях Воробьевой (36). Реакции, ведущие к образованию пропионовой кислоты у пропионовокислых бактерий, могут быть представлены следующей последовательностью (107, 117, 142):



Превращение оксалоацетата в сукцинат происходит в результате работы ферментов ЦТК: малатдегидрогеназы, фумаразы и сукцинат-дегидрогеназы. Указанные ферменты выделены из клеток *P. shermanii* /101/ и осуществляют превращение оксалоацетата в сукцинат с достаточно высокой скоростью /121/. Уксусная кислота образуется в результате окислительного декарбоксилирования пирувата:



Соотношение продуктов брожения может быть разным и в значительной степени зависит от степени окисленности источника углерода. При росте на среде с глицерином, например, отношение пропионовая : уксусная 2:1, с лактатом 1:1,5 и пируватом 1:2. Так, по данным Орла-Енсена, в нормальном, вполне созревшем эментальском сыре количество пропионовой кислоты обыкновенно превышает количество уксусной приблизительно в два раза. В сырах других типов это соотношение всегда сильно отклоняется в пользу уксусной кислоты, которая нередко становится уже преобладающей. Так, по данным Орла-Енсена, в нормальном эдамском сыре количество пропионовой кислоты / количество уксусной кислоты = 1/8. С другой стороны, по наблюдениям А. Виртанена, при культивировании пропионово-кислых бактерий в строго анаэробных условиях соотношение между количествами кислот отклоняется в обратную сторону; именно в этом случае на одну молекулу уксусной всегда образуется 3 молекулы пропионовой (65). Также большое влияние имеет значение концентрации ионов водорода. При увеличении концентрации ионов водорода в среде изменяется соотношение основных продуктов брожения: образование уксусной кислоты увеличивается, а пропионовой заметно уменьшается (25,55).

Соотношение пропионовой и уксусной кислот зависит от состава и свойств среды и внешних условий существования микроорганизмов. В сырах в период максимального развития культуры пропионовых бактерий (первая фаза) в основном образуются относительно окисленные соединения

(уксусная кислота), в период спада развития – преимущественно более восстановленные (вторая фаза). Но при замедлении развития культуры *P. shermanii* (замена пептона аммонийными солями) уксусная кислота превалирует перед пропионовой, однако и в этом случае отношение пропионовой кислоты к уксусной возрастает. Этот пример служит доказательством связи продуцирования кислот с составом среды. Отношение пропионовой кислоты к уксусной зависит также от вида бактерий. В среде с глюкозой и дрожжевым автолизатом пропионовокислые бактерии рода *P. thonii* продуцируют указанные кислоты в отношении 5:1, для *P. gubrum* это отношение равно 3:1 и для *P. shermanii* – 2:1. Для культур *P. shermanii* (9 штаммов) отношения пропионовой кислоты к уксусной колеблется от 1,4 до 2,8. Между количеством организмов и количеством образующихся кислот нет прямой связи (120).

Изменение состава карбоновых кислот в питательной среде (соли молочной, пировиноградной и янтарной кислот) значительно влияет на продуцирование пропионовой и уксусной кислот культурами *P. shermanii* (120). Отношение пропионовой кислоты к уксусной изменяется, с лактатом оно равно 1,83 (17,55:9,55), с пируватом – 0,64 (8,20:12,75) и янтарной кислотой – 2,0 (3,30:1,50). В присутствии лактозы продуцирование пропионовой кислоты происходит более энергично, чем в присутствии глюкозы. При сбраживании культурами *P. jensenii* (110) пировиноградной кислоты более окисленной, чем молочная, также наблюдается, что соотношение пропионовой и уксусной кислот смещается в сторону более окисленной уксусной.

Соотношение кислот зависит от состава закваски. Так, при использовании закваски с двумя культурами – *L. helveticum* и *Str. thermophilus* это соотношение ниже, чем при использовании одной *L. helveticum* (60).

Таким образом, уникальность пропионовокислого брожения обусловлена участием ФЕП – карбоксилтрансфосфорилазы фермента, не обнаруженного у других организмов, синтезирующих пропионат. Благодаря наличию этого фермента, брожение, осуществляемое пропионовокислыми бактериями, работает как циклический процесс. Другая особенность брожения связана со способом образования пропионата, которое сопряжено с восстановлением фумарата до сукцината и окислением пирувата до ацетата и  $\text{CO}_2$ . Транспорт электронов, сопровождающий эти реакции, сопряжен с окислительным фосфорилированием и синтезом АТФ. И третьей уникальной характеристикой брожения является высокий выход АТФ, превышающий выход АТФ в других известных брожениях. 1,5 М глюкозы могут дать пропионовокислым бактериям около 6 М АТФ.

### **1.3. Использование пропионовокислых бактерий в пищевой промышленности**

Сырделие – наиболее древняя биотехнология, использующая биохимическую активность пропионовых бактерий. Первые исследования пропионовокислых бактерий были связаны с изучением их роли в созревании сыров. Наиболее высокими органолептическими свойствами и длительными сроками хранения обладают твердые сычужные сыры с высокой температурой второго нагревания, при изготовлении которых принимают участие пропионовокислые бактерии. Общее правило, касающееся использования этих бактерий в созревании сыров, гласит: вреден как недостаток, так и избыток пропионовокислых бактерий, но без их участия сыр нужного качества изготовить невозможно; могут получаться «слепые» (131), т.е. сыры без «глазков» или с другими дефектами. Многие пороки лучших сыров вызваны отсутствием или слабым ростом пропионовокислых бак-

терий. Для нормального развития пропионовокислых бактерий рекомендуют (131) использовать молоко с высоким содержанием белка (3,3%). При концентрации мочевины менее 4 мМ, нужно обеспечивать преобладание стрептококков над молочнокислыми бактериями введением смешанной термофильной культуры с соотношением микроорганизмов 10:1. Существуют и другие условия, несоблюдение которых подавляет деятельность в сырах пропионовых бактерий (73, 94).

Физиологические особенности пропионовых бактерий: термоустойчивость, отсутствие роста при высоких температурах, при более 4,5% концентрациях соли, задержка роста при  $9^{\circ}\text{C}$ , способность сбраживать лактаты, находятся в соответствии с технологическим режимом сыроварения. После второго нагревания большая часть молочнокислых палочек погибает, а образованный ими лактат начинает активно сбраживаться пропионовокислыми бактериями.

Из высококачественного «Советского» сыра и молока было выделено (9, 10, 11) 25 штаммов пропионовокислых бактерий, из которых 17 штаммов представлены *P. freudenreichii*, а остальные отнесены к *P. acidipropionici* и *P. jensenii*, так что основным штаммом «Советского» сыра является *P. freudenreichii*. Кроме того, на ранней стадии созревания сыра были выделены пропионовокислые кокки. Основная роль пропионовокислых бактерий в созревании сыров состоит в использовании лактатов, образованных молочнокислыми бактериями при сбраживании лактозы молока, при этом лактаты превращаются в пропионовую, уксусную кислоты и  $\text{CO}_2$ . Кислоты обеспечивают острый вкус сыров и участвуют в консервации молочного белка казеина; гидролитическое расщепление липидов с образованием жирных кислот важно для развития органолептических свойств сыра; образование пролина и других аминокислот, а

также летучих веществ: ацетоина, диацетила, диметилсульфида, ацетальдегида, участвующих в формировании аромата сыра; образование углекислоты в процессе пропионовокислого брожения лактата и декарбоксилирования аминокислот (главным образом);  $\text{CO}_2$  участвует в создании рисунка сыра – «глазков», образовании витаминов и в первую очередь витамина  $\text{B}_{12}$  (53, 59, 61).

Вместе с тем требуется регуляция активности пропионовокислых бактерий, которые не должны, в частности, развиваться и образовывать  $\text{CO}_2$  при низких температурах, что может привести к разрывам и трещинам в сырах.

Созревание сыра – сложный биохимический процесс, протекающий при участии сычужного фермента, ферментов молока, молочнокислых и пропионовых бактерий. Происходят энзиматические изменения в белках, жире, аминокислотах; формируется аромат, внешний вид, консистенция сыра. Высокая температура второго нагревания содействует развитию термофильных молочнокислых стрептококков и пропионовых бактерий. Посолка оказывает сдерживающее влияние на интенсивность развития микрофлоры сыра: задерживается рост молочнокислых палочек и пропионовокислых бактерий.

Пропионовокислые бактерии размножаются в сыре в значительном количестве в период выдерживания его в бродильном подвале, рост их продолжается в течение всего периода созревания. В результате пропионовокислого брожения образуются специфический вкус и запах, а также характерный рисунок «Швейцарского» сыра. Развитие пропионовокислых бактерий внутри сыра происходит энергичнее, чем у поверхности. Это, по всей вероятности, связано с повышением содержания влаги и уменьшением содержания соли во внутренних слоях (59).

Источником пропионовокислых бактерий в сыре является молоко. Специально приготовленные культуры этих

бактерий применяют в сыроделии очень редко. Пропионовокислые бактерии погибают при 15-минутной выдержке при  $70^\circ\text{C}$ , в то время как такая же выдержка при  $60^\circ\text{C}$  оказывает только подавляющее действие (123). Большинство пропионовокислых бактерий хотя и погибает при подогревании до  $70^\circ\text{C}$ , тем не менее при кратковременной пастеризации молока при этой температуре в нем можно найти еще много живых микроорганизмов.

Классическая технология изготовления «Швейцарского» сыра не предусматривала специального внесения пропионовокислых бактерий (закваска), поскольку использовали сырое молоко хорошего качества, вытяжку из сычуга молочных телят, где содержалось достаточное количество пропионовокислых бактерий. В настоящее время в сыроделии используют пастеризованное молоко, так при пастеризации при  $71^\circ\text{C}$  за 15 с погибают почти все пропионовокислые бактерии (10,95), а норма предусматривает содержание в 1 г сыра после прессования  $2 \cdot 10^3 - 4 \cdot 10^3$  пропионовокислых бактерий, поэтому при изготовлении «Советского» сыра требовалось внесение пропионовокислых бактерий с высокой кислото-, газообразующей способностью, липолитической активностью, устойчивостью к действию различных ингибиторов (включая постороннюю микрофлору) при развитии в сыре и совместимостью с молочнокислыми бактериями, входящими в состав закваски для сыров (10, 46). Так из 22 штаммов молочнокислых бактерий 9 оказались антагонистами пропионовокислых бактерий, при этом *Str. lactis* и *Str. diacetylactis* имели наибольший спектр подавления (10,65,89). *Str. cremoris*, *Str. thermophilus* и *Lbm. helveticum* отнесены к штаммам совместимым с *P. freudenreichii* и *P. shermanii*. При учете совместимости штаммов в закваске качество сыра повышается и по общему среднему баллу превышает качество сыра высшего сорта (10, 102). Среди обитателей сыра есть и такие, которые стимулируют биохими-

ческую активность пропионовых бактерий. Так, под действием микрококков сыра на 20 % увеличивается выход CO<sub>2</sub> пропионовокислыми бактериями; *Micrococcus caseolyticus* ингибирует активность бактерий кишечной палочки при выработке и созревании сыров, что создает благоприятные условия для развития пропионовокислых бактерий (74, 128).

Пропионовокислое брожение в «Советском» сыре не достигает необходимых масштабов без внесения в молоко культур пропионовых бактерий, что отрицательно сказывается на его качестве. Для улучшения качества сыра необходимо применять эти культуры. Пастеризация молока при выработке «Советского» сыра создает предпосылки для систематического применения культур пропионовокислых бактерий. Их вносят в молоко в незначительных количествах – несколько капель на 1 т. Такая предосторожность вызывается тем, что излишнее активизирование пропионовокислого брожения ведет к появлению ненормального рисунка в сыре (крупные «глазки» и разрывы сырного теста). В последние годы взгляды на дозы культур пропионовокислых бактерий существенно изменяются под влиянием того, что их развитие не находится в пропорциональной зависимости от количества введенной культуры и обуславливаются биологическими факторами, связанными с составом среды и жизнедеятельностью молочнокислой микрофлоры.

Богданов (17) исследовал влияние состава различных сред на рост пропионовокислых бактерий для подбора наилучшей среды для приготовления производственной закваски. Им избраны сыворотка с пептоном и обезжиренное молоко с панкреатиновым автолизатом. Максимальное количество бактерий в первой среде при 30<sup>0</sup>С наступает через 5 дней, при 22<sup>0</sup>С – через 15 дней и при комнатной температуре – через 30 дней.

За рубежом закваски пропионовокислых бактерий обычно готовят в виде жидкой культуры на сывороточно-пептоновой среде и рассылают потребителям в небольших бутылочках, снабженных капельным устройством. Срок годности заквасок два месяца. Войткевич (15) рекомендует для приготовления производственной закваски пропионовокислых бактерий использовать молочную сыворотку, добавляя к ней 2% карбоната кальция. Смесь сыворотки с мелом разливают в бутылочки, закрывают их пробками и стерилизуют. После охлаждения в среду вносят основную культуру (1-2) % и выдерживают 10 дней при температуре 30<sup>0</sup>С. Богданов предложил применять в производственных условиях закваски 10-15-дневного возраста, выдержанные при 30<sup>0</sup>С на следующих средах: молочно-пептонной сыворотке с мелом; обезжиренном молоке с автолизатом и мелом и автолизате с глюкозой и мелом. Количество вносимой закваски зависит от степени развития рисунка и в среднем составляет 10 мл на ванну.

Культуры *P. shermanii* выращивали на разведенном водой (1:1) дрожжевом автолизате с 2% глюкозы при 30<sup>0</sup>С в течение 4–5 дней. В одной капле такой среды содержалось в среднем 293 млн. клеток. Культуры этих же пропионовых бактерий были приготовлены на обезжиренном молоке при совместном выращивании их с молочнокислыми стрептококками и палочками *L. helveticum* в условиях регулярной нейтрализации образующейся молочной кислоты (рН 5,2–5,6). Этот препарат содержал около 570 млн. клеток пропионовокислых бактерий, 11 млн. клеток молочнокислых палочек.

Для созревания и получения сыра высокого качества важное значение имеет фосфолипазная активность пропионовокислых бактерий. Бактерии содержат внутри – (А) и внеклеточную (С) фосфолипазу (91). В некоторых штаммах присутствуют обе липазы вместе, но для сыроделия важна

внеклеточная фосфолипазная активность. Под действием фосфолипазы С происходит значительный гидролиз фосфолипидных компонентов сыра (обнаружено 8 таких компонентов) без образования лизосоединений, обнаруженных наряду с фосфатидными кислотами в прогорклых образцах сыров, а также в сырах с привкусом сала (76,77). Наибольшее число фосфолипидов выявлено среди штаммов *P. globosum* (77). Сыр, выработанный с бактериальной закваской с высоким уровнем фосфолипазы С, имел наиболее высокие вкусовые показатели, консистенцию, рисунок; штамм рекомендован для включения в состав закваски для «Советского» сыра.

Усовершенствованием в технологии сыроварения можно назвать создание многоштаммовой сухой закваски пропионовых бактерий из трех штаммов вида *P. freudenreichii*. Многоштаммовая закваска превосходила монокультуру в отношении газо- и кислотообразования (10,66). Общая оценка опытных сыров, изготовленных с применением сухой многоштаммовой закваски по сравнению с контрольными, была на 4,2 балла выше. Установлена возможность непосредственного внесения сухих культур в перерабатываемое молоко без предварительного их перевода в активное состояние. Сухая закваска удобнее при транспортировке, чем ранее применявшаяся жидкая закваска. Многоштаммовая сухая закваска внедрена в производство сыра «Советского».

Пропионовокислые бактерии также применяют в хлебопечении. Их наряду с молочнокислыми бактериями и дрожжами вводят в некоторые закваски для теста с целью образования в процессе ферментации, помимо молочной и уксусной кислот, еще и пропионовой.

При внесении в тесто такой закваски хлеб содержит 0,1% уксусной, 0,2% молочной, 0,1% пропионовой кислоты (по отношению к весу муки). Такого количества пропионо-

вой кислоты достаточно для проявления фунгицидного действия, без заметного влияния на вкус и аромат выпекаемого хлеба.

Использование пропионовокислых бактерий нашло себя, хотя и незначительно, в кисломолочном производстве.

С целью обогащения витамином В<sub>12</sub> в кефир и другие молочнокислые продукты вносили пропионовокислые бактерии, повышая, таким образом, питательные свойства и лечебную ценность этих продуктов (15, 18, 40, 49, 57, 62, 69, 78).

В нашей стране изготовлен кисломолочный напиток (83), закваска которого включает уксуснокислые бактерии *Acetobacter lovaniense*, вязкие рассы молочнокислых стрептококков и *P. shermanii* с соотношением штаммов (2,5–3,5): (9–11) : (3–4). Сырьем служит смесь молока с творожной сывороткой в соотношении 9:1–7:3. Разбавление молока творожной сывороткой приводит к экономии молока, но вместе с тем и к разбавлению его, вследствие чего содержание в продукте сухих веществ, витаминов, белка снижается. Эти неизбежные потери компенсируются использованием в составе закваски бактерий, синтезирующих белки, витамины, внеклеточные полисахариды, увеличивающие вязкость продукта. Активными продуцентами внеклеточных полисахаридов служат некоторые штаммы уксуснокислых бактерий. В симбиозе со стрептококками образование внеклеточных полимеров увеличивалось. *P. shermanii* и *A. lovaniense* в виде монокультур не росли в молоке, а в смеси росли и вызвали его свертывание за (32–36)ч, обогащая молоко витамином В<sub>12</sub> и другими витаминами группы В.

Однако при совместном культивировании с молочнокислыми стрептококками наблюдали снижение содержания витаминов, которые, по-видимому, утилизируются последними. Поэтому при изготовлении напитка уксуснокислые и пропионовокислые бактерии выращивают в сыворот-

ке (где они хорошо растут), а молочнокислые и уксуснокислые бактерии в молоке с последующим смешиванием компонентов. При добавлении в молоко 5% творожной сыворотки содержание в продукте витамина В<sub>12</sub> составляло 12500 мкг/кг, В<sub>2</sub> 74,8 мкг/кг, никотиновой кислоты 2900 мкг/кг, а при добавлении в молоко 20% сыворотки 27850; 176,8 и 18250 мкг/кг соответственно.

Известен также способ производства кисломолочного продукта, предусматривающий нормализацию молока, добавление 4,5 % сахарозы, пастеризацию при 87<sup>0</sup>С с выдержкой 15 мин, гомогенизацию при давлении 15 МПа при 45<sup>0</sup>С (86). Молоко охлаждают до 33<sup>0</sup>С и вносят 5% симбиотической закваски пропионовокислых бактерий, молочнокислых мезофильных ароматобразующих стрептококков и уксуснокислых бактерий. После сквашивания до кислотности 56–64<sup>0</sup>Т в течение (3,5–5,0)ч в межстенное пространство резервуара со сгустком пускают ледяную воду и оставляют в покое. Через 2 ч проводят перемешивание молочного сгустка 5 мин, затем продолжают охлаждение до 14<sup>0</sup>С. Титруемая кислотность сгустка составляет 80<sup>0</sup>Т. Далее вносят 12% фруктово-ягодного наполнителя или 0,08% ароматизатора, перемешивают его в течение 5 мин, после чего разливают в тару. Охлаждение продукта до (2–4)<sup>0</sup>С ведут в холодильной камере. Срок хранения продукта один месяц при данной температуре. Готовый продукт имеет однородную сметанообразную гомогенную консистенцию молочно-белого цвета, кисломолочный освежающий, слегка острый вкус. Количество клеток пропионовокислых бактерий в 1 см<sup>3</sup> 10 единиц, молочнокислых стрептококков 10<sup>7</sup>, уксуснокислых бактерий 10<sup>2</sup>.

С использованием пропионовокислых бактерий изготавливают кисломолочный продукт «Тонус» (47, 48, 87). Молоко нормализуют, гомогенизируют, пастеризуют при 90–94<sup>0</sup>С с выдержкой 2–8 мин или при 85–89<sup>0</sup>С 10–15мин, ох-

лаждают до температуры заквашивания 32–34<sup>0</sup>С, вносят 3–5% симбиотической закваски, состоящей из пропионовокислых, молочнокислых мезофильных ароматобразующих стрептококков и уксуснокислых бактерий, сквашивают до 68–76<sup>0</sup>Т, охлаждают в покое 2–3 ч, перемешивают (5–10)мин, охлаждают до (14–20)<sup>0</sup>С, перемешивают и доохлаждают до (4–8)<sup>0</sup>С. Готовый продукт содержит пропионовокислых бактерий 10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup>, молочнокислых бактерий 10<sup>7</sup>–10<sup>8</sup>, уксуснокислых бактерий 10<sup>1</sup>–10<sup>3</sup>. Создание оптимальных условий для жизнедеятельности вышеперечисленных микроорганизмов приводит к продуцированию и накоплению витаминов в процессе сквашивания. В результате в готовом продукте содержится витамина А больше, чем в сборном сыром молоке или простокваше в 3 раза, витамина Е в 7–8 раз, В<sub>1</sub> – в 1,5–2 раза, В<sub>2</sub> – в 1,5 раза, витамина В<sub>12</sub> – в 10–15 раз. В готовом продукте содержание нитратов-канцерогенов снижается на 50% по сравнению с сырым молоком.

Э.Е. Грудзинской, А.К. Максимовой и А.В. Рожковой (2,3) были разработаны способы получения кисломолочного продукта «Эвита» и сметаны, в состав закваски которых входили пропионовокислые бактерии – продуценты витаминов группы В, за счет которых повышаются питательные свойства и биологическая ценность продуктов.

При изготовлении сметаны применение закваски, содержащей продуценты витаминов группы В, позволяет вести процесс ее производства в одних условиях независимо от жирности сырья, при этом сквашивание ведут при (30–32)<sup>0</sup>С, что ускоряет процесс и позволяет получить продукт с высокими питательными свойствами. Полученный продукт богат витаминами группы В (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>12</sub>), фолиевой кислотой, микроэлементами, в том числе и железом, а также другими продуктами метаболизма в легкоусвояемой форме, которые обладают лечебными свойствами. Срок хранения сметаны составляет 10 суток (3).

Д.С. Янковким и Г.С. Дымент (Украинский научно-исследовательский институт мясной и молочной промышленности) (4) получили бактериальную закваску, состоящую из пропионовокислых бактерий и аэробных микроорганизмов родов *Acetobacter*, *Bacillus* и *Pseudomonas*. Активизация размножения пропионовокислых бактерий в молоке происходит в результате активного поглощения кислорода аэробными микроорганизмами вышеуказанных таксономических групп и таким образом исключается влияние данного ингибитора на пропионовокислые бактерии. Кроме того, штаммы родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, обладающие высокой протеолитической активностью, накапливают низкомолекулярные азотистые вещества, стимулирующие развитие *Propionibacterium*.

В процессе исследований было выявлено, что для получения симбиотических сочетаний, обладающих высокой молокосвертывающей, протеолитической активностью и другими производственно-ценными свойствами при высоком содержании клеток пропионовокислых бактерий, анаэробные бактерии рода *Propionibacterium* необходимо соединить с аэробными бактериями родов *Acetobacter*, *Bacillus* или *Pseudomonas* в соотношении комбинаций молочнокислых бактерий 2:3.

Во Всесоюзном научно-исследовательском институте молочной промышленности Э.Е. Грудзинской (5) был разработан способ получения кисломолочного напитка из сыворотки, предусматривающий термическую обработку исходного сырья, охлаждение до температуры заквашивания, внесение закваски, сквашивания полученной смеси и охлаждение. Способ отличается тем, что, с целью повышения биологической ценности продукта и улучшения его вкусовых свойств, после термической обработки в сыворотку вносят добавку азотистых соединений в количестве (5–10)% от массы сыворотки, перед внесением закваски смесь ней-

трализуют, а в качестве закваски используют культуру пропионовокислых бактерий – штамм *P.shermanii* Э<sub>2</sub> и дрожжи «Скородумовой», при этом сквашивание ведут при температуре (29–31)<sup>0</sup>С в течение (70–74)ч. В качестве добавки азотистых соединений используют гидролизованное молоко, кукурузный экстракт, дрожжевой автолизат или культуральную жидкость из микроорганизмов, синтезирующих аминокислоты - ацидофильных или уксуснокислых бактерий. Готовый продукт имеет кисло-сладкий вкус с дрожжевым привкусом и содержит: витамин В<sub>12</sub> 250–300; В<sub>1</sub> 156–228; В<sub>2</sub> 250–150; фолиевой кислоты 110–178 мкг/л

Э.Е Грудзинской, В.Ф. Семенихиной, Н.В. Скобелевой (6) был создан консорциум бактерий *P. shermanii*, *Streptococcus lactis* subsp, *Diacetilactis* и *Acetobacter aceti*, используемый для приготовления кисломолочных напитков. Ведущая роль пропионовокислых бактерий проявляется в преобладании их по количеству клеток (10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup>)КОЕ в 1см<sup>3</sup> и осуществлению синтеза витаминов группы В. Пропионовокислые бактерии в чистой культуре плохо развиваются в молоке и нуждаются в сопутствующих микроорганизмах, способных обогатить среду доступным для них азотным питанием. С этой целью в симбиоз введены ароматобразующие молочнокислые и уксуснокислые бактерии. Ароматобразующие молочнокислые стрептококки находятся в симбиозе в количестве 10<sup>7</sup>–10<sup>8</sup> клеток. Они подрабатывают сложные белки молока до более усвояемых форм (пептиды, полипептиды, аминокислоты), кроме того, они малоактивные и при развитии снижают рН среды медленно до рН 4,7 (к моменту сквашивания), имеют низкий предел кислотообразования. Тем самым создают благоприятные условия и благоприятствуют условиям синтеза витаминов группы В.

Уксуснокислые бактерии в симбиозе находятся в количестве 10<sup>1</sup>–10<sup>3</sup> клеток. В чистой культуре они в молоке не развиваются. Являясь автотрофами, они синтезируют ами-



нокислоты и поставляют азотное питание для пропионово-кислых бактерий, особенно в период формирования симбиоза, активизируя их развитие. Уксуснокислые бактерии увеличивают жизнеспособность бактерий за счет потребления молочной кислоты основного продукта метаболизма молочнокислых бактерий, снижая кислотность закваски и повышая рН среды в сторону, благоприятную для жизнедеятельности пропионовокислых и молочнокислых бактерий. Симбиоз стабильно синтезирует при развитии на молоке витамина: В<sub>12</sub> – от 28 до 32 мкг/л, В<sub>1</sub> – от 0,06 до 0,08 мг%, В<sub>2</sub> – от 0,16 до 0,69 мг%, Е – до 0,064 мг%, содержит фолиевую кислоту. Титруемая кислотность соответствует 65–75<sup>0</sup>Т.

Данные раздела показывают, что пропионовокислые бактерии используют в основном в сыроделии при производстве сыров с высокой температурой второго нагревания и незначительно – при производстве кисломолочных продуктов.

Таким образом, при выработке кисломолочных продуктов в качестве закваски используют пропионовокислые бактерии в комбинации с молочнокислыми бактериями. При совместном культивировании пропионовокислых бактерий с молочнокислыми бактериями отмечается отсутствие антагонистического воздействия друг на друга. Однако молочнокислые бактерии утилизируют витамины, образованные пропионовокислыми бактериями, вследствие чего снижается лечебная и биологическая ценность продуктов. Анализируя данные раздела, следует подчеркнуть, что отсутствуют кисломолочные продукты с использованием одних пропионовокислых бактерий.

Интенсивный путь развития молочной промышленности требует новых нетрадиционных подходов к разработке технологии молочных продуктов. Одним из важнейших направлений развития технического прогресса в области пе-

реработки молока является развитие биотехнологии, в частности применение ферментных препаратов для производства молочных продуктов. Среди ферментных препаратов, рекомендованных для пищевой промышленности, важная роль принадлежит β-галактозидазе, использование которой при переработке молочного сырья позволяет ускорить процесс молочнокислого брожения, повысить лечебные свойства и качество молочных продуктов.

И.С. Хамагаевой (1, 93) были созданы научные основы биотехнологии получения новых лечебных кисломолочных продуктов для детского и диетического питания с применением ферментного препарата дрожжевой β-галактозидазы. Авторами установлено, что вследствие действия β-галактозидазы на молочный сахар накапливаются важные бифидогенные продукты трансгликозилирования. Известно, что, помимо гидролитического действия, β-галактозидаза катализирует реакции трансгликозилирования, в ходе которых образуются высокомолекулярные олигосахариды при использовании лактозы в качестве субстрата (93).

И.С. Хамагаевой теоретически обоснован механизм стимулирующего действия β-галактозидазы на рост бифидобактерий в молоке. Обнаружено, что активизация роста бифидобактерий связана с повышением собственной β-галактозидазной активности бактерий, в результате чего бифидобактерии приобретают способность накапливать из лактозы необходимые для своего роста соединения: глюкозу и олигосахариды (1, 93).

Так как пропионовокислые бактерии и бифидобактерии относятся к одной группе – коринеформным бактериям, то нами выдвинута гипотеза о возможности активизации пропионовокислых бактерий в молоке с помощью ферментного препарата β-галактозидазы.

#### 1.4. Особенности технологии производства бактериальных концентратов

Бактериальный концентрат это высококонцентрированная биомасса, где количество клеток на 2–3 порядка выше, чем в заквасках. Применение бактериальных концентратов в молочной промышленности позволяет интенсифицировать процесс сквашивания, снизить рабочие площади и повысить санитарно-гигиенические показатели продукта (60,64).

Культивирование микроорганизмов может осуществляться в стационарных или непрерывно-поточных условиях, что существенно влияет на применяемые аппаратуру и технологические приемы.

При периодическом культивировании в питательную среду добавляют культуру, и процесс выращивания посевного материала ведут до тех пор, пока в среде не накопится максимальное количество клеток. При этом культура сначала размножается в условиях избытка питательных веществ, количество которых за время выращивания постепенно снижается. Компоненты питательной среды часто используются неравномерно и некоторые из них могут в процессе развития культуры лимитировать рост биомассы. Одновременно в среде накапливаются и продукты метаболизма, которые также оказывают отрицательное влияние на конструктивный обмен и нормальную физиологию клеток, составляющих единую популяцию. Культура, выращиваемая в постоянном объеме питательной среды при периодическом процессе, проходит определенный цикл развития. На протяжении этого цикла изменяются как скорость размножения клеток и морфология, так и биохимическая и метаболическая активность клеток. Последовательные перестройки внутриклеточной системы являются ответной реакцией на изменение окружающей среды. Размножение клеток начи-

нается с засева среды. Засев осуществляется в таком количестве, которое обеспечивает начало роста микроорганизмов с минимальной задержкой или даже без лаг-фазы. После лаг-фазы следует логарифмическая, или экспоненциальная, фаза роста. Клетки размножаются с максимальной для данной культуры скоростью. Вследствие этого, запас необходимых питательных веществ в среде уменьшается, что является основной причиной снижения скорости роста. Кроме того, накапливаются продукты метаболизма, которые в определенной концентрации могут мешать нормальному протеканию биохимических процессов обмена веществ (45, 61).

В ходе роста и размножения в закрытой системе возрастает негативное влияние лимитирующих факторов, в результате скорость роста уменьшается, наступает фаза замедленного роста. В стационарной фазе масса клеток в питательной среде достигает максимального уровня, и наступает период, когда число отмерших и автолизированных клеток превышает прирост. В результате количество биомассы уменьшается и наступает фаза отмирания.

При непрерывном способе культивирования в ферментер постоянно подается свежая среда и одновременно вытекает такой же объем культуры.

Непрерывные процессы имеют ряд преимуществ перед периодическими: возможность специализации аппаратуры для каждой операции (стадии) непрерывного процесса, стабилизации его во времени, улучшения качества продукта, возможность автоматизации (77, 78, 85).

Получению биомассы молочнокислых бактерий в непрерывно-поточных условиях посвящено большое количество работ (20, 51). Здесь испытывали различные среды, состоящие из стандартных компонентов, сыворотки и ферментных гидролизатов обезжиренного молока, и устанавливали влияние различных факторов (рН, механическое пере-

мешивание, пропускание газа и т.д.) на рост молочнокислых бактерий. E.G. Pont, G.I. Hollaway, разработавшие способ получения концентрата *Str.lactis* в непрерывно-поточных условиях, считают, что сыворотка является самой дешевой и доступной средой для накопления биомассы молочнокислых бактерий.

Исключительную роль при производстве бактериального концентрата играет состав питательной среды. Правильный подбор состава среды обеспечивает возможность выделения микроорганизмов из мест их обитания, получения чистых культур, изучения их морфологии и биохимических особенностей, дает возможность получить биомассу полезных микроорганизмов. Главная цель при подборе среды для выращивания любого микроорганизма состоит в том, чтобы создать сбалансированную смесь необходимых питательных веществ в таких концентрациях, при которых рост будет наилучшим (15, 66).

При приготовлении сред сначала целесообразно составить их минеральную основу, содержащую все те питательные вещества, которые можно дать любому организму в неорганической форме. Затем в эту основную среду можно ввести нужные добавки – источники углерода, энергии, азота, и необходимые ростовые факторы.

В качестве источника углерода для синтезов наиболее благоприятна глюкоза, хотя пропионовокислые бактерии неплохо растут и на лактозе, лактате, пирувате, глицерине. Рост бактерий усиливается, если глюкоза стерилизуется в составе основной среды, а не вносится асептически в простерилизованную среду. Предполагается, что глюкоза может реагировать с фосфатами и аминокислотами при нагревании с образованием фактора, заменяющего  $\text{CO}_2$ , который необходим для инициации роста. Установлено, что глюкоза поглощается анаэробно растущими клетками *P. Shermanii* активной энергезависимой транспортной систе-

мой (34, 139, 148).

Известно, что серосодержащие аминокислоты стимулируют рост. Пропионовокислые бактерии могут утилизировать любой источник серы от самого окисленного сульфата до самого восстановленного  $\text{H}_2\text{S}$ , причем хороший рост в присутствии сульфита имел место при концентрации 6 ммоль  $\text{S}^{2-}$ , что в 10 раз больше, чем те, что выдерживает пурпурная несерная бактерия *Phodopseudomonas globiformis*.

Хороший рост штамма *P. Shermanii* поддерживали тиосульфат, а также элементарная сера. В последнем случае культура выделяла сульфид. Восстановление  $\text{S}^{2-}$  до  $\text{H}_2\text{S}$  может происходить как энзиматическим, так и неэнзиматическим путем. Способность *P. Shermanii* утилизировать тиосульфат, сульфит, элементарную серу, сульфид говорит в пользу того, что эти соединения служат интермедиатами ассимиляционной сульфатредукции у пропионовокислых бактерий.

В пропионовокислом брожении участвуют тиамин, биотин, пантотеновая кислота, рибофлавин, витамин  $\text{B}_{12}$  (27, 35, 116, 143).

Биотин – простетическая группа метилмалонил-КоА-транскарибоксилазы, пантотенат входит в состав КоА. Тиамин, имеющий также стимулирующий эффект, не является, как у других микроорганизмов, коферментом карбоксилазы (т.е. кокарбоксилазой), поскольку у пропионовокислых бактерий не находят ацетальдегида (следы, правда, недавно обнаружены), однако он может участвовать в окислительном декарбоксилировании  $\alpha$ -кетокислот в составе дегидрогеназ. Рибофлавин входит в состав ФАД и ФМН.

Витамины  $\text{B}_{12}$  и  $\text{B}_2$  бактерии синтезируют самостоятельно и в значительных количествах, а в других трех витаминах существует потребность. Некоторые штаммы могут расти в синтетической среде без тиамина, для других вита-

мин В<sub>1</sub> может быть заменен парааминобензойной кислотой.

Рибофлавин стимулирует рост, но облигатной потребности в нем нет.

Штаммы имеют потребность в биотине и пантотеновой кислоте. Коэнзим-А может заменить пантотеновую кислоту для *P. Freudenreichii*, а дестиобиотин (серу не содержащий предшественник биотина) проявляет большую активность для *P. Pentosaceum*, чем биотин.

Среды также должны содержать отдельные ингредиенты в определенных соотношениях, примерно соответствующих отношениям их в клетке. Для большинства гетеротрофных микроорганизмов применяются среды, содержащие в среднем 0,8–1,2 г/л аминного азота (в составе NH<sub>2</sub>), 2,5–3,0 г/л общего азота (N), 1% пептона и 0,5% хлоридов в пересчете на NaCl.

Среды должны иметь достаточную влажность, обеспечивающую возможность диффузии питательных веществ в клетку. Для грибов эта влажность обеспечивается содержанием 12% воды, бактериям ее нужно не менее 20%.

Одним из важнейших факторов, влияющих на рост и размножение микроорганизмов, является показатель концентрации водородных ионов (рН). рН среды может изменять активность ферментов, что в свою очередь ведет к изменению биохимической активности микроорганизмов и направления вызываемых ими биохимических превращений в среде.

Большинство микроорганизмов развивается при нейтральной или слабощелочной реакции среды. Есть среди бактерий кислотоустойчивые, например, молочнокислые, и некоторые уксуснокислые бактерии. При подкислении среды до рН4 развитие большинства бактерий практически прекращается. К колебаниям рН в пределах от 6 до 9 бактерии сравнительно мало чувствительны.

После стерилизации рН среды, как правило, изменя-

ется. Чаще всего происходит подщелачивание среды в результате диссоциации (разрушения) карбонатов. Кроме того, в процессе культивирования микроорганизмы могут выделять в среду метаболиты, изменяющие рН среды настолько, что рост микроорганизмов существенно замедляется или даже становится невозможным. Так, при сбраживании глюкозы могут накапливаться органические кислоты, и среда резко подкисляется. Усвоение белков и аминокислот приводит к образованию аммиака, что подщелачивают среду (53).

Чтобы избежать изменения рН, в среду добавляют буферные системы. Чаще всего используют фосфатные буферы, состоящие из смеси однозамещенных и двузамещенных фосфатов (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Это единственные неорганические соединения, обладающие буферным действием в физиологически важном диапазоне около нейтрального значения рН, так как они малотоксичны для микроорганизмов. Кроме того, они служат источником фосфора – одного из элементов, необходимых для роста.

Среды должны обладать определенным окислительно-восстановительным потенциалом, определяющим насыщение ее кислородом, и обозначается gh<sub>2</sub>. По шкале от 0 до 41 этим индексом можно обозначить любую степень аэробности: насыщенным кислородом раствор обозначается gh<sub>2</sub>=41, насыщенный водородом gh<sub>2</sub>=0. Анаэробные микроорганизмы размножаются при gh<sub>2</sub> не выше 5, аэробы не ниже 10.

Применять среды необходимо стерильными, чтобы обеспечить рост чистых культур микроорганизмов. Посторонняя микрофлора может влиять на рост изучаемого микроорганизма, изменять свойства среды, ее состав, рН и др. Режим стерилизации среды определяется ее составом.

Поскольку потребности микроорганизмов чрезвычайно разнообразны, нельзя составить универсальную среду, оптимальную для роста всех микроорганизмов. Сущест-

вуют самые различные по составу и технике приготовления питательные среды. Применяются всевозможные естественные и искусственные субстраты, начиная от простой водопроводной воды и солевых растворов до сложных экстрактов из зародышей животных и растений, от отбросов (навоз) до полноценных белков человека и животных (16).

Для размножения любой бактерии (независимо от целей) необходимо обеспечить подходящее биофизическое окружение. Умелое обращение с биофизическими, биохимическими и биологическими факторами приобретает особую важность в получении накопительных культур и последующего выделения бактерий в виде чистой культуры. Температура, аэрация и давление определяются условиями культивирования. Все эти факторы влияют на скорость роста, выход биомассы, метаболизм и химический состав бактерий(62).

Следующим технологическим процессом является концентрирование биомассы. Концентрирование биомассы является процессом обезвоживания-удаления воды, содержащейся в веществе в свободном, несвязанном состоянии. В зависимости от степени влажности, плотности вещества, размера твердых частиц, требований технологического характера в микробиологической промышленности применяют различные методы обезвоживания. К ним относятся фильтрование, центрифугирование, коагуляция и т.д.

Продолжительность выращивания молочнокислых бактерий перед их отделением из культуральной среды при получении бактериального концентрата, по данным ряда авторов, существенно влияет на активность полученных препаратов и на их стойкость. Клетки, отделенные в стационарной фазе, были более активными и более стойкими в замороженном состоянии, чем старые клетки. А клетки, выделенные в логарифмической фазе роста, являются нестойкими в замороженном состоянии (1, 23, 67, 105, 120).

В связи с тем, что активность и стойкость концентрата молочнокислых бактерий определяются возрастом клеток, большое значение имеет быстрое выделение клеток из культуральной жидкости или же охлаждение ее перед выделением клеток. При использовании в качестве питательной среды молока, сыворотки, гидролизованного молока, клетки отделяют от среды центрифугированием.

Исследования показали, что жидкий бактериальный концентрат нестойк при хранении, даже при низкой температуре (4–6)<sup>0</sup>С. Быстрое вымирание клеток в концентрате объясняется кислой реакцией среды, высокой влажностью, а также отсутствием защитных веществ. В этих условиях окислительные процессы протекают особенно быстро. Стойкость бакконцентрата можно повысить путем хранения его в консервирующих растворах: замораживанием в защитной среде, высушиванием в защитной среде (36, 44, 109, 112).

Хранение микроорганизмов в замороженном и высушенном состоянии основано на принципах анабиоза. Анабиоз - состояние временного, обратимого прекращения жизнедеятельности, из которого организм может снова перейти к активной жизнедеятельности (7, 10, 12, 138).

Основными физическими факторами, регулирующими интенсивность обмена веществ – жизненных процессов в живых клетках, являются температура и влажность.

При криоанабиозе подавляется активность ферментов, замедляются обмен веществ, развитие, рост, движение. Большое влияние на сохранение жизнеспособности и продуктивности микроорганизмов при замораживании, хранении и последующем оттаивании оказывают условия замораживания: скорость и температура, длительность процесса, наличие и состав защитных сред, продолжительность хранения, условий культивирования, возраста культуры.

Большую роль в сохранении жизнеспособности кле-

ток при замораживании и последующем высушивании играют криозащитные вещества. Механизм защитного действия криозащитных веществ основан, главным образом, на их способности создавать более прочные связи с молекулами воды, чем связи молекул воды между собой, что препятствует формированию правильной решетки льда и задерживает начало роста кристаллов. В качестве защитных сред в различных исследованиях использовались физиологический раствор, вода, сыворотка, кровь, растворы углеводов (глюкозы, сахарозы и др.), различные соотношения желатины и аскорбиновой кислоты и пр.

Применяемые в настоящее время защитные среды характеризуются большим разнообразием состава. В них входят вещества, различные по химической природе - от неорганических солей до сложных органических соединений и естественных биологических субстратов. Защитная среда предохраняет микроорганизмы от необратимых изменений как в процессе замораживания и высушивания, так и при последующем хранении сухих препаратов в нерегулируемых внешних условиях (56, 58, 101).

Режимы хранения также существенно влияют на стойкость замороженных концентратов. Так, при хранении концентрата молочнокислых бактерий в защитной среде в течение 6 месяцев при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$  наблюдалась гибель (9–8)% клеток, а при температуре  $-(6\div 8)^{\circ}\text{C}$  погибало (16–28)%. Однако это не отразилось на активности и всех других качественных показателей концентрата.

В молочной промышленности для получения сухих бакконцентратов в основном применяют распылительную или сублимационную сушку (68, 89, 111).

Сущность метода распылительной сушки заключается в том, что жидкость диспергируют с помощью специальных приспособлений – распыливающих устройств и высушивают в потоке сушильного агента. При высокой степени

дисперсности распыленного материала процесс протекает практически мгновенно. Это позволяет использовать высокотемпературный сушильный агент при сушке термолabileльных материалов без снижения качества продукта.

При сублимационной сушке происходит удаление воды следующим образом. В начале высушивания, когда вся масса препарата находится в замороженном состоянии, прежде всего происходит испарение свободной воды из кристаллов льда, расположенных на поверхности препарата. По мере испарения льда поверхность замороженного препарата отступает внутрь, сверху же остается пористая масса субстрата, содержащего связанную влагу. Так как температура этой пористой массы вследствие низкой теплопроводности выше, чем температура замороженного препарата, какую-то часть связанной воды с наименьшей энергией связи можно удалить в то время, когда происходит сублимация воды из нижних замороженных слоев.

По окончании первого периода высушивания, когда свободная влага удаляется полностью, температура повышается до температуры  $0^{\circ}\text{C}$ .

Во второй период, когда температура материала повышается до температуры  $30^{\circ}\text{C}$  и выше, создаются условия для удаления связанной воды. Преимущества этого процесса: влага удаляется при низких температурах, что практически исключает термоинактивацию продукта, сохраняется стабильная структура материала, а также облегчается возможность получения сухого продукта в фасованном и стерильном виде. К основным недостаткам сублимационной сушки относятся высокие продолжительность, энергоемкость процесса и сложность сублимационного оборудования (69, 80, 83). Высушенные препараты могут храниться долгое время: от года и выше.

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что создание бактериального концентрата является

сложным биотехнологическим процессом, требующим создания определенных физико-химических и биохимических условий получения и переработки биомассы, при которых в готовой продукции сохранялось бы максимальное количество жизнеспособных клеток и не утрачивались их полезные свойства.

## **ГЛАВА II. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СПОСОБА АКТИВИЗАЦИИ НА БИОХИМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В МОЛОКЕ**

### **2.1. Влияние обработки молока $\beta$ -галактозидазой на развитие чистых культур пропионовокислых бактерий**

Как было отмечено в литературном обзоре, чистые культуры пропионовокислых бактерий обладают слабой кислотообразующей способностью, требуют для своего развития анаэробных условий культивирования и не ферментируют молоко. Пропионовокислые бактерии нуждаются в сопутствующих микроорганизмах, способных обогатить среду доступным для них азотистым питанием. В связи с этим в мировой практике при выработке различных кисломолочных продуктов в качестве закваски используют пропионовокислые бактерии в комбинации с молочнокислыми. Молочнокислые бактерии в процессе своей жизнедеятельности образуют лактат, который является источником брожения для пропионовокислых бактерий.

Ранее И.С. Хамагаевой (1) установлено, что кислотообразующую способность бифидобактерий можно повысить путем обработки молока ферментным препаратом  $\beta$ -галактозидазы *Sacch. fragilis*. Автором показано, что боль-

шой стимулирующий эффект наблюдается на культурах с низкой кислотообразующей способностью, таких как бифидобактерии. Теоретически обоснован механизм стимулирующего действия  $\beta$ -галактозидазы на рост бифидобактерий в молоке. Установлено, что активизация роста бифидобактерий связана с повышением собственной  $\beta$ -галактозидазной активности бактерий, в результате чего бифидобактерии приобретают способность накапливать из лактозы необходимые для своего роста соединения: глюкозу и олигосахариды (1, 92).

Известно, что пропионовокислые бактерии и бифидобактерии относятся к одной группе – *Corynebacterium*. Пропионовокислые бактерии имеют ясно выраженную склонность к образованию утолщений и веточек на концах клеток, как и бифидобактерии, у которых способность к бифуркации резко выражена. Так как наряду с этим *Bifidobacterium bifidum* образует, кроме молочной кислоты, значительные количества летучих кислот (до 30-40% уксусной), то С. Орла-Иенсен (125) высказывает вполне обоснованное предположение, что *Bifidobacterium bifidum* является связующим звеном между типичными молочнокислыми палочками и пропионовокислыми бактериями. Вследствие чего нами была выдвинута гипотеза о возможности активизации пропионовокислых бактерий в молоке с помощью ферментного препарата  $\beta$ -галактозидазы.

В связи с этим исследовали влияние обработки молока  $\beta$ -галактозидазой на развитие чистых культур пропионовокислых бактерий.

## 2.2. Исследование влияние концентрации $\beta$ -галактозидазы на биохимическую активность пропионовокислых бактерий

Для выявления оптимальных условий обработки молока ферментным препаратом исследовали влияние различных концентраций  $\beta$ -галактозидазы на развитие чистых культур пропионовокислых бактерий в молоке. О биохимической активности судили по изменению титруемой и активной кислотности, по количеству жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий, а также по активности ферментации.

В обезжиренное молоко вносили разные концентрации фермента – от 1,0 до 4,0 Е/мл и выдерживали в течение 2 ч в термостате при 37<sup>0</sup>С для протекания реакции трансгликозилирования. Затем молоко стерилизовали при 120<sup>0</sup>С с выдержкой 10–15 мин, охлаждали до температуры заквашивания 30<sup>0</sup>С, вносили чистые культуры пропионовокислых бактерий штаммы ВНИМИ и МГУ и оставляли для сквашивания. Контролем служило молоко, не обработанное  $\beta$ -галактозидазой.

Результаты исследований представлены в табл. 2.2.1.

Данные, приведенные в табл.2.2.1, характеризуют рост пропионовокислых бактерий в молоке, обработанном различными дозами  $\beta$ -галактозидазы.

Образование сгустка кислотностью (70–72)<sup>0</sup>Т культура ВНИМИ и (56–58)<sup>0</sup>Т культура МГУ наблюдали через (25–26)ч культивирования. Активная кислотность (рН) изменялась в соответствии с титруемой кислотностью и в конце сквашивания составляла (4,73–4,71) и (4,87–4,85) соответственно. Следует отметить, что культура, полученная из ВНИМИ, имеет более высокую кислотообразующую способность, чем культура, полученная из МГУ.

Таблица 2.2.1 – Влияние концентрации ферментного препарата на биохимическую активность пропионовокислых бактерий в молоке

Наименование штамма	Кол-во фермента, Е/мл	Продолжительность сквашивания, ч	Титруемая кислотность, <sup>0</sup> Т	Активная кислотность, рН	Количество живых клеток в 1 см <sup>3</sup>
P. shemanii штамм ВНИМИ	1	25-26	70-72	4,73-4,71	3·10 <sup>8</sup>
	2	24	74-76	4,69-4,67	2·10 <sup>9</sup>
	3	25	72-74	4,71-4,69	1,6·10 <sup>9</sup>
	4	28-30	68-70	4,75-4,73	1·10 <sup>8</sup>
P. shemanii штамм МГУ	1	26	56-58	4,87-4,85	5·10 <sup>8</sup>
	2	24	62-64	4,81-4,79	2·10 <sup>9</sup>
	3	25	60-62	4,83-4,81	1,8·10 <sup>9</sup>
	4	28	52-54	4,91-4,89	1,3·10 <sup>8</sup>
Контроль	–	48	30	–	–

Динамику роста пропионовокислых бактерий изучали методом предельных разведений на среде ГМС (гидролизатно-молочная среда) или ГМК-1 (гидролизатно-молочно-кукурузная среда) культивированием с высоким столбиком. В жидкой активизированной закваске пропионовокислые бактерии имеют форму коккоидных клеток, собранных в цепочки, иногда ветвящиеся, а также обнаруживаются короткие палочки. При культивировании на среде ГМС и ГМК-1 бактерии имеют форму палочковидных и коккоидных клеток, отдельных или собранных в цепочки, встречаются Y– или V– образные.

В контрольном образце сгусток не образовывался, при культивировании бактерий в течение 48 ч кислотность мо-



лока увеличилась только до 30<sup>0</sup>Т. На средах ГМС и ГМК-1 рост бактерий отсутствовал.

Результаты исследований, представленные в табл.2.2.1, показывают, что с увеличением концентрации β-галактозидазы от 1,0 до 2,0 Е/мл повышаются кислотообразующая способность пропионовокислых бактерий и количество жизнеспособных клеток. При дальнейшем увеличении концентрации ферментного препарата от 3,0 до 4,0 Е/мл наблюдается понижение кислотообразующей способности и количества жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий.

Незначительные отличия по количеству клеток наблюдались при концентрации фермента 2,0 и 3,0 Е/мл, хотя наибольшее количество клеток отмечено в молоке, обработанном β-галактозидазой при концентрации 2 Е/мл, и составляло 2·10<sup>9</sup> в 1 см<sup>3</sup>. По-видимому, это можно объяснить тем, что наибольшее количество олигосахаридов образуется при концентрации фермента 2 Е/мл. Дальнейшее же насыщение субстратом до 4 Е/мл не приводит к пропорциональному увеличению олигосахаридов, и стимулирующий эффект β-галактозидазы на развитие пропионовокислых бактерий ослабевает.

Таким образом, проведенные исследования показали, что обработка молока β-галактозидазой оказывает выраженный стимулирующий эффект на рост пропионовокислых бактерий и повышает их биохимическую активность. Оптимальной концентрацией β-галактозидазы является доза 2 Е/мл.

### 2.3. Исследование влияния ферментного препарата на рост пропионовокислых бактерий в молоке

Проведенные нами исследования (раздел 2.2.) показали, что обработка молока β-галактозидазой повышает биохимическую активность пропионовокислых бактерий и они образуют в молоке сгусток. Поэтому дальнейшие наши исследования были направлены на изучение биохимической активности пропионовокислых бактерий при пересадках. Полученные результаты представлены в табл. 2.3.1.

Как видно из табл. 2.3.1, стимулирующее действие ферментного препарата выражается в повышении кислотообразующей способности, количества жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий и интенсификации процесса сквашивания. Обращает на себя внимание тот факт, что в последующих генерациях пропионовокислые бактерии развиваются с одинаковой активностью, и она практически приближается к активности молочнокислых бактерий. Наиболее интенсивно развивается культура *P.shermanii* штамм МГУ, о чем свидетельствует количество жизнеспособных клеток, и составляет 1·10<sup>10</sup> в 1 см<sup>3</sup>.

Результаты исследований показывают, что активизированные культуры пропионовокислых бактерий второй и третьей генерации характеризуются высокой биохимической активностью и содержат большое количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий – 10<sup>9</sup>–10<sup>10</sup> в 1 см<sup>3</sup>.

При дальнейших пересевах активизированных β-галактозидазой культур пропионовокислых бактерий на стерильное обезжиренное молоко было обнаружено, что они хорошо растут в молоке без стимулятора роста (β-галактозидазы).

Таблица 2.3.1 – Изменение биохимической активности пропионовокислых бактерий при пересевах

Наименование штамма	Вид генерации	Продолжительность сквашивания, ч	Титруемая кислотность, °Т	Активная кислотность, рН	Количество живых клеток в 1 см <sup>3</sup>
P.shermanii Штамм ВНИМИ	1	24	74-76	4,69-4,67	2·10 <sup>9</sup>
	2	18-20	83-85	4,60-4,58	4·10 <sup>9</sup>
	3	16-18	85-90	4,58-4,53	9·10 <sup>9</sup>
P.shermanii штамм МГУ	1	24	62-64	4,81-4,79	2·10 <sup>9</sup>
	2	18-20	68-70	4,75-4,73	5·10 <sup>9</sup>
	3	16-18	70-75	4,73-4,68	1·10 <sup>10</sup>

Примечание. 1 и 2 – генерации на молоке, обработанном ферментным препаратом; 3 – генерация на молоке без обработки ферментным препаратом

Этот факт, по-видимому, можно объяснить повышением собственной β-галактозидазной активности пропионовокислых бактерий (как и в случае с бифидобактериями), в результате чего последние приобретают способность накапливать из лактозы необходимые для своего роста соединения: глюкозу и олигосахариды, которые ускоряют пути катаболизма и анаболизма. Причем β-галактозидазная активность пропионовокислых бактерий сохраняется на достаточно высоком уровне при последующих пересевах (табл. 2.3.2)

Таблица 2.3.2 – Изменение собственной β-галактозидазной активности пропионовокислых бактерий

Пропионовокислые бактерии	β-галактозидазная активность, Е/мл	
	P.shermanii штамм ВНИМИ	P.shermanii штамм МГУ
1-я генерация	3,2	3,25
2-я генерация	4,4	4,5
3-я генерация	4,1	4,2

Таким образом, на основании проведенных экспериментов изучено влияние ферментного препарата на рост пропионовокислых бактерий в молоке и разработан способ их культивирования.

#### 2.4. Исследование активизированных культур пропионовокислых бактерий при пересадках

Для проверки на стойкость активизированных культур пропионовокислых бактерий изучали влияние пересадок на их активность. Пересадки велись каждые 10 дней на стерильное обезжиренное молоко.

Культуры пропионовокислых бактерий перевивали петлей в 10 мл стерилизованного обезжиренного молока, термостатировали до свертывания и хранили между перевивками при температуре не выше 6<sup>0</sup>С. Результаты исследований представлены в табл. 2.4.1.

Как видно из табл. 2.4.1, при пересадках снижается биохимическая активность закваски пропионовокислых бактерий, увеличивается процесс сквашивания молока после 10 пересадок до 24 ч и снижается количество жизнеспособных клеток с 1·10<sup>10</sup> до 1·10<sup>8</sup> в 1 см<sup>3</sup>.

Таблица 2.4.1 – Влияние пересадок на активность пропионовокислых бактерий

Наименование штамма	Кол-во пересадок	Кислотность		Кол-во клеток в 1см <sup>3</sup>	Акт-ть сквашивания, ч
		титруемая, °Т	активная, рН		
P. shermanii штамм ВНИМИ	1	85±2	4,52±0,02	9·10 <sup>9</sup>	16
	2	85±2	4,52±0,02	9·10 <sup>9</sup>	16
	3	85±2	4,52±0,02	7·10 <sup>9</sup>	16
	4	86±1	4,50±0,01	7·10 <sup>9</sup>	16
	5	86±2	4,50±0,02	6·10 <sup>9</sup>	16-18
	6	87±1	4,48±0,01	4·10 <sup>9</sup>	16-18
	7	88±2	4,47±0,02	2·10 <sup>9</sup>	16-18
	8	88±2	4,47±0,02	7·10 <sup>8</sup>	18-20
	9	90±2	4,45±0,02	3·10 <sup>8</sup>	20-22
	10	90±2	4,45±0,02	1·10 <sup>8</sup>	22-24
P. shermanii штамм МГУ	1	76±2	4,70±0,02	1·10 <sup>10</sup>	13
	2	76±2	4,70±0,02	1·10 <sup>10</sup>	13
	3	76±2	4,70±0,02	9·10 <sup>9</sup>	13
	4	77±1	4,68±0,01	7·10 <sup>9</sup>	13
	5	77±2	4,68±0,02	6·10 <sup>9</sup>	13-15
	6	78±2	4,62±0,02	4·10 <sup>9</sup>	13-15
	7	78±2	4,62±0,02	3·10 <sup>9</sup>	13-15
	8	80±2	4,58±0,02	8·10 <sup>8</sup>	16-20
	9	80±2	4,58±0,02	5·10 <sup>8</sup>	20-22
	10	80±2	4,58±0,02	2·10 <sup>8</sup>	22-24

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан эффективный биотехнологический способ активизации пропионовокислых бактерий в молоке.

## ГЛАВА III. ИССЛЕДОВАНИЕ И ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПРОИЗВОДСТВА ЗАКВАСОК И КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С ПРОПИОНОВОКИСЛЫМИ БАКТЕРИЯМИ

### 3.1. Разработка схемы приготовления лабораторной закваски

Одной из поставленных перед нами задач была определена необходимость разработки технологической схемы приготовления и использования закваски пропионовокислых бактерий на производстве.

Проведенные нами исследования (гл. 2) показали, что обработка молока ферментным препаратом повышает биохимическую активность чистых культур пропионовокислых бактерий, и они приобретают способность расти в молоке без стимуляторов роста.

Созданный биотехнологический способ активизации пропионовокислых бактерий в молоке позволил разработать следующую схему приготовления закваски:

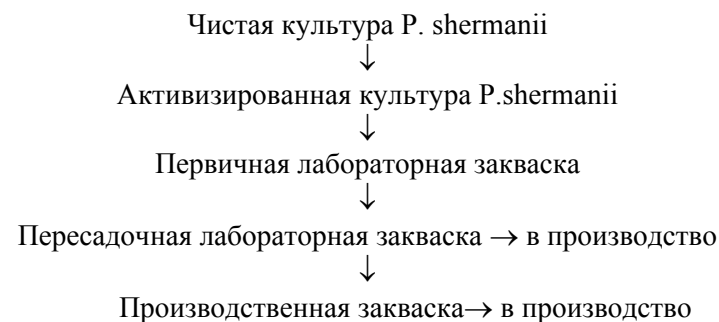


Схема приготовления закваски пропионовокислых бактерий в условиях производства

Полученную активизированную культуру пропионовокислых бактерий пересевали в стерильное обезжиренное молоко. При внесении (1-2)% активизированной культуры молоко сквашивается за (16-18)ч. Активизированная культура II генерации может использоваться в качестве маточной для приготовления лабораторной закваски.

В исследованиях, проведенных в разделе 2.3, было выявлено, что в III генерации количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий достигает высокого уровня, хотя культивировали их на обычном молоке без добавления ферментного препарата. Поэтому возможно использование пропионовокислых бактерий III генерации в качестве маточной культуры для приготовления лабораторной закваски. Для этого проводили сравнительные исследования активности лабораторной закваски, приготовленной с использованием культур пропионовокислых бактерий II и III генерации.

Для приготовления лабораторной закваски обезжиренное молоко стерилизовали при температуре  $(121 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  с выдержкой (10-15)мин. После стерилизации молоко охлаждали до  $(30 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  и часть образцов заквашивали (1-2)% закваской пропионовокислых бактерий II генерации, а другую часть – III генерации. Полученные результаты представлены в табл. 3.1.1.

Анализ данных табл.3.1.1 позволяет сделать вывод, что показатели лабораторной закваски, приготовленной с использованием культур пропионовокислых бактерий II и III генераций, почти не отличаются. Примечательно, что количество жизнеспособных клеток в лабораторной закваске, приготовленной с использованием культур пропионовокислых бактерий III генерации остается на достаточно высоком уровне и составляет  $10^9$  в  $1 \text{ см}^3$ .

Таблица 3.1.1 – Активность лабораторной закваски, приготовленной с пропионовокислыми бактериями II и III генерации

Показатель закваски	Закваска II генерации	Закваска III генерации
P. shermanii штамм ВНИМИ: кислотность, $^{\circ}\text{T}$ количество клеток в $1 \text{ см}^3$ продолжительность сквашивания, ч	85-90	90-92
	$9 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^9$
	16-18	16-18
P. shermanii штамм МГУ: кислотность, $^{\circ}\text{T}$ количество клеток в $1 \text{ см}^3$ продолжительность сквашивания, ч	72-75	74-76
	$1 \cdot 10^{10}$	$9 \cdot 10^9$
	16-18	16-18

Таким образом, культуры пропионовокислые бактерии II и III генераций можно рекомендовать для приготовления лабораторной закваски. В связи с этим необходимо было уточнить сроки хранения культур пропионовокислых бактерий II и III генераций. Полученные результаты представлены в табл. 3.1.2. Закваски хранили при температуре  $(6 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ .

Анализ данных табл. 3.1.2. показывает, что в течение 10 дней хранения прирост кислотности составил всего лишь  $(6-7)^{\circ}\text{T}$ , и количество жизнеспособных клеток было практически стабильным.

Дальнейшее хранение активизированных культур приводит к значительному уменьшению живых клеток до  $10^8$  в  $1 \text{ см}^3$ .

Таблица 3.1.2 – Изменение свойств активизированной культуры II и III генераций при хранении

Показатели закваски	Продолжительность хранения при (6±2) <sup>0</sup> С, суток						
	0	3	5	7	10	12	15
1	2	3	4	5	6	7	8
Р. shermanii штамм ВНИМИ II генера- ция Титруемая кисл-ть, <sup>0</sup> T Активная кисл-ть, рН Кол-во живых клеток в 1 см <sup>3</sup>	83	83	85	87	90	92	94
	4,60	4,60	4,58	4,56	4,53	4,51	4,49
	4·10 <sup>9</sup>	4·10 <sup>9</sup>	3·10 <sup>9</sup>	3·10 <sup>9</sup>	2·10 <sup>9</sup>	8·10 <sup>8</sup>	4·10 <sup>8</sup>
III генера- ция Титруемая кисл-ть, <sup>0</sup> T Активная кисл-ть, рН Кол-во живых клеток в 1 см <sup>3</sup>	85	85	87	89	91	93	95
	4,58	4,58	4,56	4,54	4,52	4,51	4,48
	9·10 <sup>9</sup>	9·10 <sup>9</sup>	8·10 <sup>9</sup>	6·10 <sup>9</sup>	4·10 <sup>9</sup>	1·10 <sup>9</sup>	7·10 <sup>8</sup>

Продолжение табл. 3.1.2

Р. shermanii штамм МГУ II генера- ция Титруемая кисл-ть, <sup>0</sup> T Активная кисл-ть, рН Кол-во живых клеток в 1 см <sup>3</sup>	68	68	70	72	75	77	80
	4,75	4,75	4,73	4,71	4,68	4,66	4,63
	2·10 <sup>9</sup>	2·10 <sup>9</sup>	2·10 <sup>9</sup>	1·10 <sup>9</sup>	1·10 <sup>9</sup>	7·10 <sup>8</sup>	3·10 <sup>8</sup>
III генера- ция Титруемая кисл-ть, <sup>0</sup> T Активная кисл-ть, рН Кол-во живых клеток в 1 см <sup>3</sup>	70	70	72	74	76	79	82
	4,73	4,73	4,71	4,69	4,67	4,64	4,61
	1·10 <sup>10</sup>	1·10 <sup>10</sup>	9·10 <sup>9</sup>	6·10 <sup>9</sup>	4·10 <sup>9</sup>	1·10 <sup>9</sup>	7·10 <sup>8</sup>

Таким образом, культуры II и III генераций можно хранить в течение 10 суток. Поэтому по истечении 10 дневного срока хранения пропионовокислые бактерии III генерации можно получить путем пересева культур II генерации на стерильное обезжиренное молоко и использовать для приготовления лабораторной закваски.

Из лабораторной закваски готовят пересадочную лабораторную закваску путем внесения в стерильное обезжиренное молоко при указанной выше температуре (1-2)% инокулята. Лабораторную закваску отправляют на производство или используют для приготовления производственной закваски.

Для изготовления производственной закваски подбирали дозу вносимой лабораторной закваски. В стерилизованное молоко вносили 1, 2, 3, 5 и 10 % пересадочной лабораторной закваски. Полученные результаты представлены в табл. 3.1.3.

Таблица 3.1.3 – Влияние массовой доли лабораторной закваски на качество производственной закваски

Наим. штамма	Массовая доля закваски, %	Прод. сквашивания, ч	Кислотность		Кол-во клеток в 1 см <sup>3</sup>
			титруемая, °Т	активная, рН	
P.shermannii штамм ВНИМИ	1	14-15	78-80	4,65-4,63	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>
	2	13-14	78-80	4,65-4,63	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>
	3	9-10	80-82	4,63-4,61	10 <sup>9</sup>
	5	7,5-8,5	82-85	4,61-4,58	10 <sup>9</sup>
	10	6,5-7,5	82-85	4,61-4,58	10 <sup>9</sup>
P.shermannii штамм МГУ	1	14-15	68-70	4,75-4,73	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>
	2	13-14	68-70	4,75-4,73	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>
	3	9-10	72-74	4,71-4,69	10 <sup>9</sup>
	5	7-8	72-74	4,71-4,69	10 <sup>9</sup>
	10	6-7	73-75	4,70-4,68	10 <sup>9</sup>

Из табл. 3.1.3 видно, что с увеличением массовой доли закваски, продолжительность сквашивания молока сокращается. При увеличении дозы закваски от 5 до 10 % активность сквашивания увеличивается незначительно и составляет всего 1,5 ч. При этом количество жизнеспособных

клеток практически не зависело от массовой доли вносимой закваски и составляло 10<sup>9</sup> в 1 см<sup>3</sup>.

Отсюда следует, что с целью уменьшения затрат на приготовление производственной закваски целесообразным является внесение (3-5)% лабораторной закваски.

### 3.2.Выбор дозы закваски для приготовления кисломолочного напитка

Темп кислотообразования пропионовокислых бактерий и продолжительность сквашивания молока зависят от массовой доли закваски. В связи с этим определяли зависимость кислотообразования (рис. 3.2.1 – 3.2.4) и развития клеток пропионовокислых бактерий (рис.3.2.5, 3.2.6) от продолжительности сквашивания молока и температуры культивирования. Пропионовокислые бактерии культивировали при температурах (30±1)<sup>0</sup>С и (22±2)<sup>0</sup>С.

Результаты, представленные на рис. 3.2.1.- 3.2.6. свидетельствуют, что с увеличением дозы закваски повышается кислотообразующая способность пропионовокислых бактерий и интенсифицируется процесс молочнокислого брожения. С увеличением массовой доли закваски от 3 до 5% продолжительность сквашивания молока пропорционально сокращается. При дальнейшем повышении дозы закваски от 5 до 10 % продолжительность сквашивания сократилась незначительно и составила всего лишь 2 часа. При этом количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий в готовом продукте практически не зависело от количества вносимой производственной закваски и равнялось 10<sup>9</sup> к.о.е. в 1см<sup>3</sup>. При понижении температуры культивирования до (22±2)<sup>0</sup>С отмечается снижение биохимической активности пропионовокислых бактерий, и процесс ферментации удлиняется на 2 часа. Анализируя полученные нами данные, необходимо отметить, что с целью уменьшения затрат на

приготовление кисломолочного продукта наиболее целесообразным является внесение (3-5)% производственной закваски.

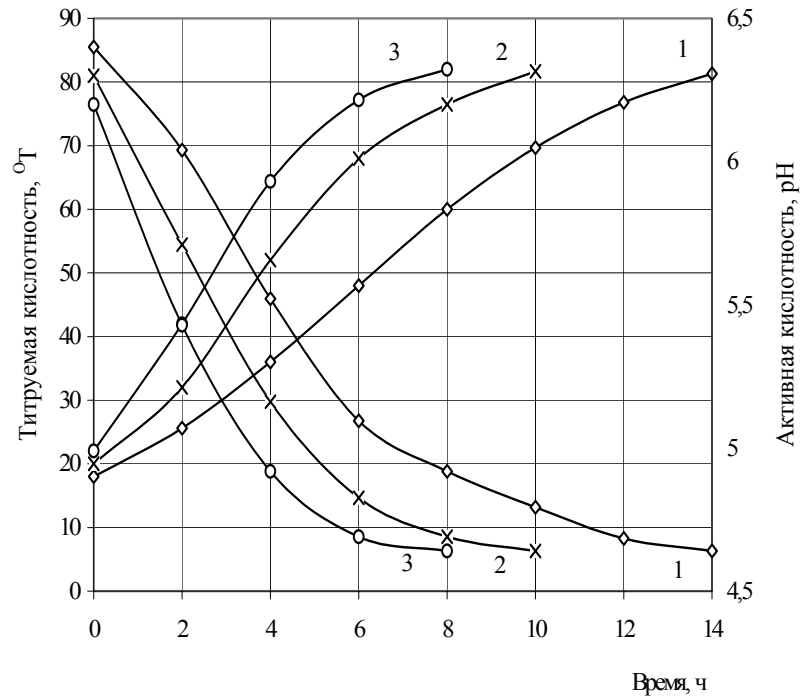


Рис. 3.2.1 – Влияние дозы закваски пропионовокислых бактерий *P. shermanii* штамм ВНИМИ на активность кислотообразования при температуре  $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ :  
1 – доза закваски 3%; 2 – доза закваски 5%; 3 – доза закваски 10%.

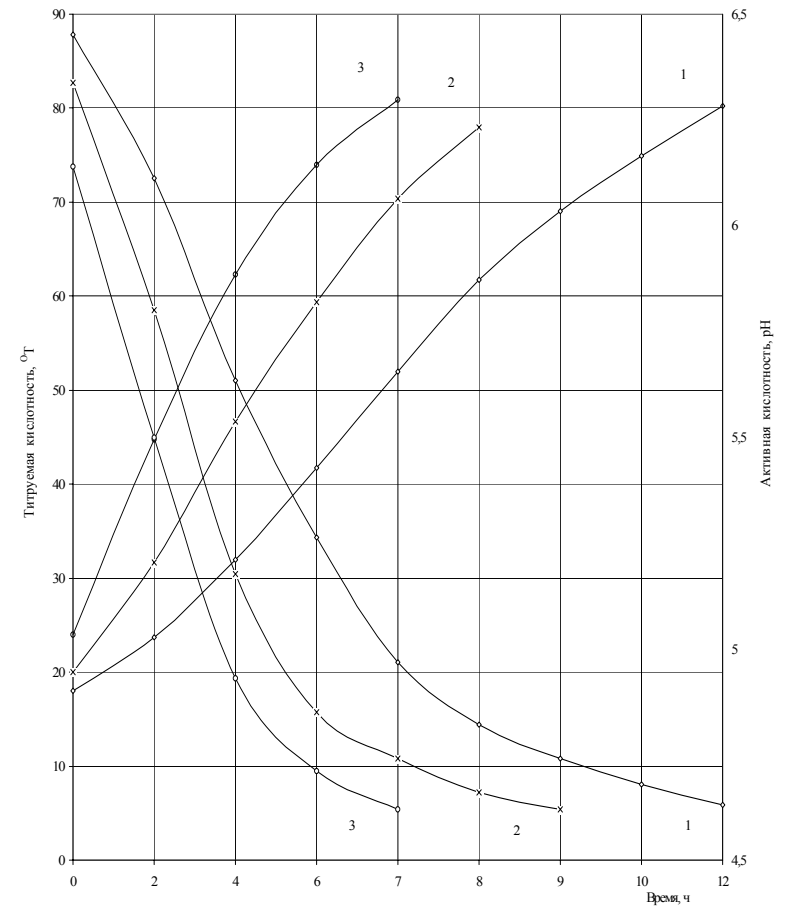


Рис. 3.2.2 – Влияние дозы закваски пропионовокислых бактерий *P. shermanii* штамм МГУ на активность кислотообразования при температуре  $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ :  
1 – доза закваски 3%; 2 – доза закваски 5%; 3 – доза закваски 10%.

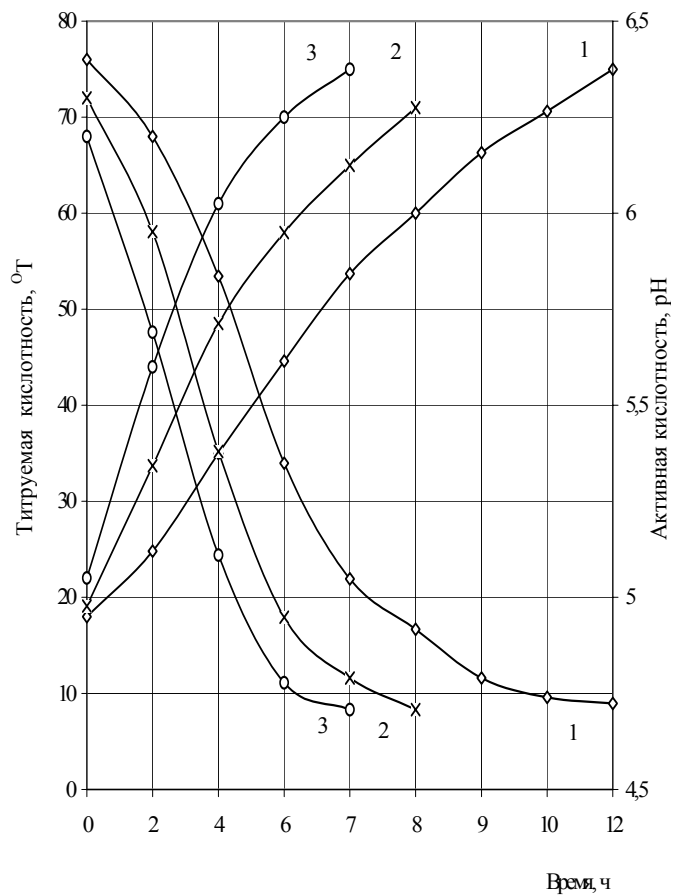


Рис. 3.2.3 – Влияние дозы закваски пропионовокислых бактерий *P. shermanii* штамм ВНИМИ на активность кислотообразования при температуре  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ :  
 1 – доза закваски 3%; 2 – доза закваски 5%;  
 3 – доза закваски 10%.

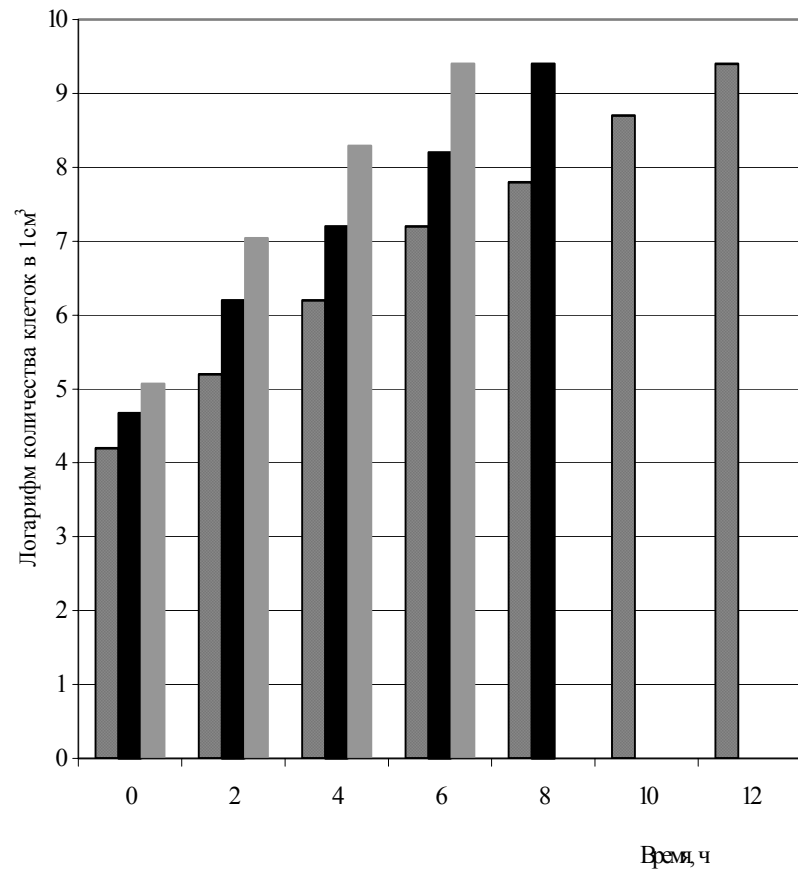


Рис. 3.2.4 – Влияние дозы закваски пропионовокислых бактерий *P. shermanii* штамм МГУ на активность кислотообразования при температуре  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ :  
 1 – доза закваски 3%; 2 – доза закваски 5%;  
 3 – доза закваски 10%.



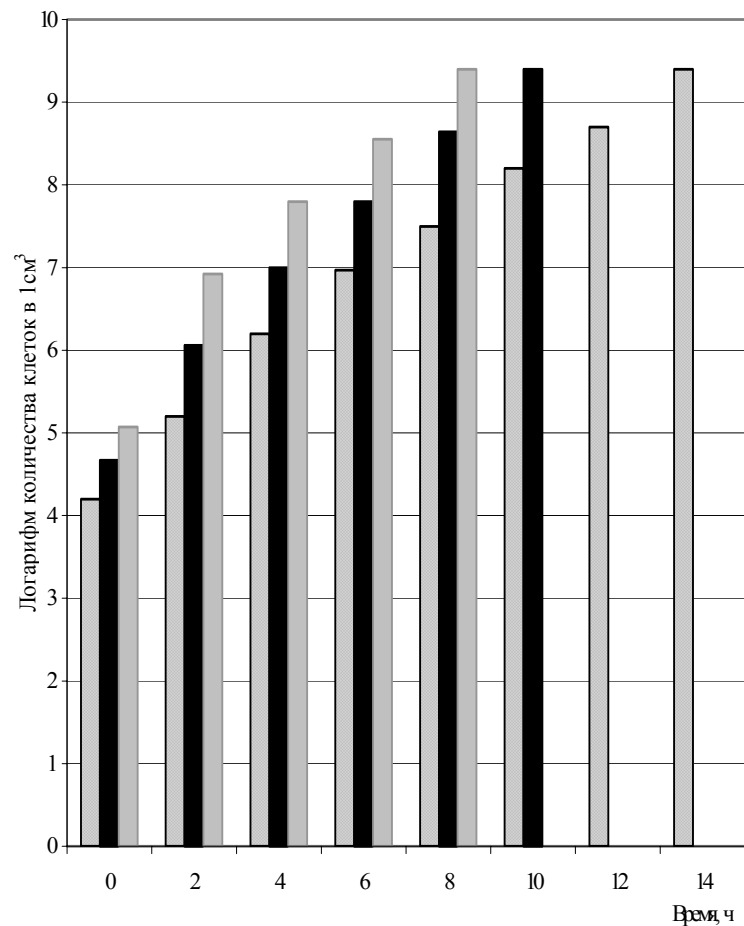


Рис.3.2.5 – Влияние дозы закваски на рост клеток пропионовокислых бактерий при температуре  $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ :  
 1 – доза закваски 3%; 2 – доза закваски 5%; 3 – доза закваски 10%.

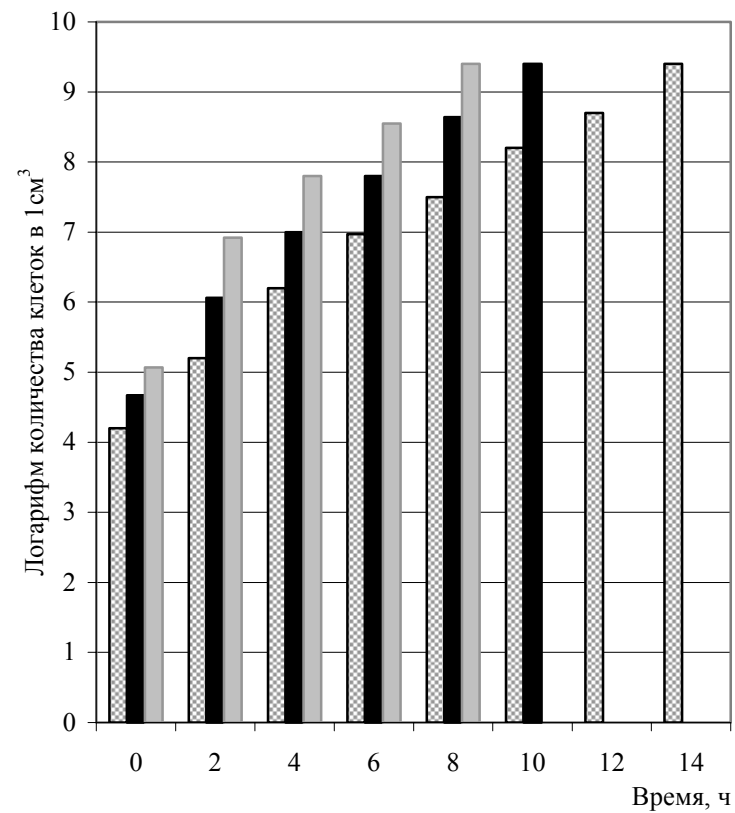


Рис. 3.2.6 – Влияние дозы закваски на рост клеток пропионовокислых бактерий при температуре культивирования  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ :  
 1 – доза закваски 3%; 2 – доза закваски 5%; 3 – доза закваски 10%.

Определяли структурно-механические и синергетические свойства сгустков, полученных при температурах  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$  и  $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ . Полученные результаты представлены в табл. 3.2.1.

Таблица 3.2.1 – Влияние температуры ферментации на структурно-механические и синергетические свойства готового продукта

Наименование штамма	Температура сквашивания, $^{\circ}\text{C}$	Вязкость сгустка, с	Количество выделенной сыворотки, мл, за период, мин	
			15	30
P. shermanii ВНИМИ	$22\pm 2$	10	6	10,5
	$30\pm 1$	6	11	16
P. shermanii МГУ	$22\pm 2$	9	7	11
	$30\pm 1$	5	12	18

Как видно из табл. 3.2.1, продукт, полученный при температуре сквашивания молока  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$  характеризуется более высокими структурно-механическими и синергетическими свойствами, чем продукт полученный при  $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ . Ферментация молока при температуре  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$  способствует получению продукта, обладающего наибольшей вязкостью и влагоудерживающей способностью, хотя при этом режиме процесс сквашивания удлиняется на (2-3) ч.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования позволили выбрать оптимальные технологические параметры производства кисломолочного продукта.

### 3.3. Исследование витаминобразующей способности пропионовокислых бактерий

Пропионовокислые бактерии настроены на высокий уровень витамина  $\text{B}_{12}$ , который находится в заквасках в активной коферментной форме. Присутствие витамина  $\text{B}_{12}$  в биологически активной форме способствует повышению иммунного статуса организма, влияет на кровообразование, активизирует процессы свертывания крови, участвует в синтезе различных аминокислот, нуклеиновых кислот, активизирует процессы обмена углеводов и жиров. Оказывает благоприятное влияние на функции печени, нервной и пищеварительной систем (22,79). Витамин используется при лечении малокровия (18,58), нервных заболеваний (18), авитаминозов (40) и др. При недостаточном потреблении витамина  $\text{B}_{12}$  возникает анемия, нарушаются функции нервной системы, появляются слабость, головокружение, одышка, снижается аппетит.

Нами изучена витаминобразующая способность пропионовокислых бактерий при температурах культивирования  $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$  и  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ . Результаты исследований представлены на рис. 3.3.1.

Результаты исследований, представленные на рис. 3.3.1, показывают, что активизированные культуры пропионовокислых бактерий синтезируют большое количество витамина  $\text{B}_{12}$ . Установлено, что при оптимальной температуре культивирования  $30^{\circ}\text{C}$  содержание витамина  $\text{B}_{12}$  составляет 1500 мкг/мл – культура P. shermanii штамм МГУ, и 1200 мкг/мл – культура P. shermanii штамм ВНИМИ. При понижении температуры культивирования до  $20^{\circ}\text{C}$  синтез витамина  $\text{B}_{12}$  замедляется, но к концу ферментации количество его достигает практически того же уровня, что и при оптимальной температуре культивирования  $30^{\circ}\text{C}$ . Следует отме-

тить, что более высокой витаминсинтезирующей способностью обладает культура *P. shermanii* из МГУ.

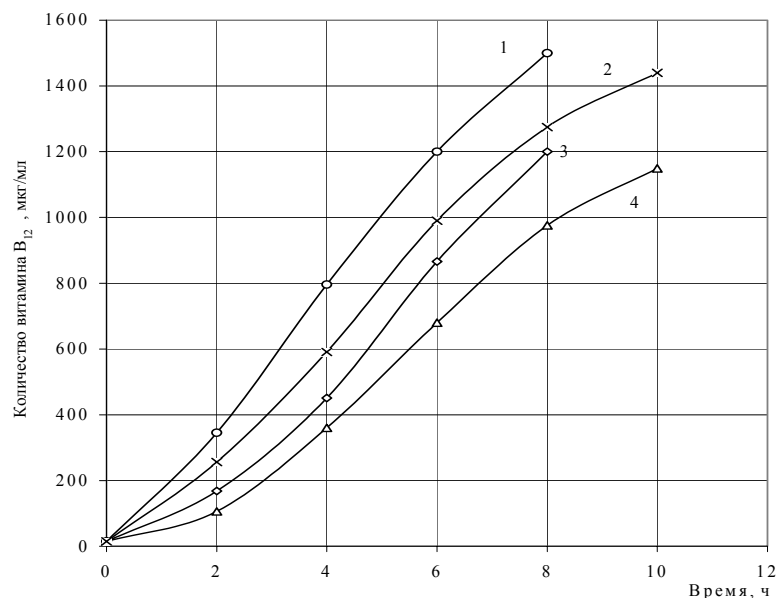


Рис. 3.3.1 – Динамика накопления витамина  $B_{12}$  пропионовокислыми бактериями:

1 – культурой *P. shermanii* штамм МГУ при температуре  $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ; 2 – культурой *P. shermanii* штамм МГУ при температуре  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ; 3 – культурой *P. shermanii* штамм ВНИМИ при температуре  $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ; 4 – культурой *P. shermanii* штамм ВНИМИ при температуре  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$

В результате математической обработки данных были установлены функциональные зависимости синтеза витамина  $B_{12}$  разными культурами пропионовокислых бактерий в зависимости от времени и температуры ферментации в виде уравнений:

культурой *P. shermanii* штамм МГУ при температуре  $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$  :

$Y = -2,819x^2 + 208,82x + 9,791$ ;  
культурой *P. shermanii* штамм МГУ при температуре  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$

$Y = -0,753x^2 + 150,55x + 9,849$ ;  
культурой *P. shermanii* штамм ВНИМИ при температуре  $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$

$Y = 9,685x^2 + 71,27x + 9,928$ ;  
культурой *P. shermanii* штамм ВНИМИ при температуре  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$

$Y = 3,581x^2 + 78,19x + 9,921$ .

Коэффициенты корреляции равны 0,998; 0,993; 0,989 и 0,991 соответственно.

Качественные показатели кисломолочного продукта представлены в табл. 3.3.1.

Таблица 3.3.1 – Качественные показатели кисломолочного продукта

Показатель	Норма
1	2
Внешний вид и консистенция	Однородная, нежная в меру вязкая, допускается небольшое газообразование
Вкус и запах	Чистый с приятным кисломолочным привкусом, специфическим для данного продукта без посторонних привкусов и запахов
Цвет	Молочно — белый, равномерный по всей массе. Допускается кремовый оттенок

Продолжение табл. 3.3.1

Продолжительность сквашивания, ч:	
при температуре (22±2) <sup>0</sup> С	10-12
при температуре (30±1) <sup>0</sup> С	8-10
Кислотность, <sup>0</sup> Т	70-90
Количество клеток пропионовокислых бактерий в 1 см <sup>3</sup> , не менее	10 <sup>8</sup>
БГКП (колиформы) в 0,01 см <sup>3</sup> продукта	Не допускаются
Патогенные, в т.ч. сальмонеллы в 25 см <sup>3</sup> продукта	Не допускаются
Витамин В <sub>12</sub> , мкг/мл	1200-1500

Как видно из табл. 3.3.1, кисломолочный продукт характеризуется хорошими органолептическими, физико-химическими и санитарно-гигиеническими показателями. Он имеет приятный специфический кисломолочный вкус, свойственный данному продукту, содержит высокое количество клеток пропионовокислых бактерий 10<sup>9</sup> в 1 см<sup>3</sup> и большое количество витамина В<sub>12</sub> – (1200-1500) мкг/мл.

Таким образом, на основании проведенных экспериментальных исследований разработана технология кисломолочного продукта с использованием жидкой закваски пропионовокислых бактерий.

## ГЛАВА IV. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЗАКВАСКИ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

### 4.1. Подготовка закваски пропионовокислых бактерий к лиофилизации

Жидкая закваска обладает кратковременным сроком хранения, что сдерживает промышленное освоение кисломолочных продуктов с пропионовокислыми бактериями. Нами было установлено (гл. 2), что при длительных перепадах снижается активность жидкой закваски пропионовокислых бактерий. Поэтому следующий этап исследований был посвящен разработке технологии сухой закваски пропионовокислых бактерий. Одним из наиболее надежных способов длительного сохранения микроорганизмов является высушивание. При этом отпадает необходимость оборудования специальных хранилищ, удешевляется транспортирование, облегчается применение и т. д.

Первоначальным и важным этапом технологического процесса консервирования являются отбор и предварительная подготовка биоматериалов. При лиофилизации микроорганизмов исключительно большое значение уделяется условиям культивирования бактерий, возрасту культур. Существует мнение, что все положительные качества биомассы, определяющие свойства конечного продукта, формируются только на стадии культивирования, а на последующих стадиях полезные свойства микроорганизмов могут только утрачиваться.

В связи с этим исследовали влияние возраста культур на криорезистентность пропионовокислых бактерий. Результаты исследований представлены на рис.4.1.1.

Как видно из рис. 4.1.1, для обеих культур справедливо утверждение о зависимости криорезистентности от воз-

раста культуры. Наибольшая криорезистентность клеток пропионовокислых бактерий наблюдалась в конце активно-го роста и начале стационарной фазы развития.

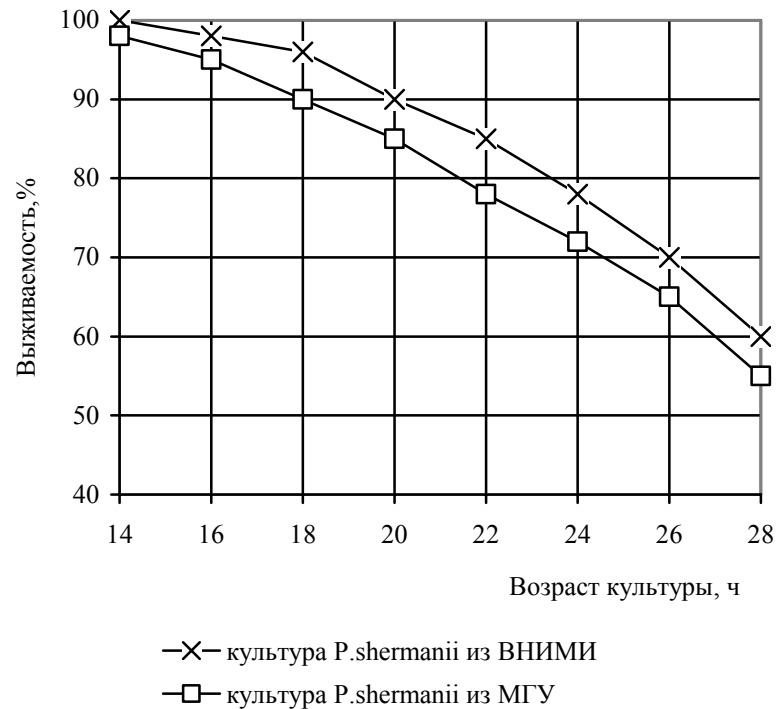


Рис. 4.1.1 – Влияние возраста культуры на криорезистентность пропионовокислых бактерий

Среди факторов, влияющих на выживаемость клеток при воздействии замораживания и оттаивания, важными являются рН и температура, при которой производится смешивание закваски с защитной средой (1-3).

Одним из важнейших факторов, влияющих на рост и размножение микроорганизмов, является показатель кон-

центрации водородных ионов (рН). рН среды может изменять активность ферментов, что в свою очередь ведет к изменению биохимической активности микроорганизмов и направления вызываемых ими биохимических превращений в среде (66). При сушке и хранении заквасок продукты жизнедеятельности молочнокислых бактерий, и в первую очередь  $H^+$ - ионы, образующиеся при диссоциации молочной кислоты и других кислот, оказывают губительное действие на клетки. В результате происходят расстройства термодинамического равновесия в системе, сублетальные и летальные повреждения клетки (12). Различные микроорганизмы, встречающиеся в кисломолочных продуктах, по-разному относятся к реакции окружающей их среды. Для более активных кислотообразователей, как правило, характерна большая устойчивость к высокой активности кислотности среды. Поэтому при производстве сухих молочнокислых заквасок рекомендуется перед замораживанием и сушкой проводить нейтрализацию среды, что позволяет повысить выживаемость клеток при высушивании, а также их стойкость при хранении. Исследователи рекомендуют раскислять едким натром закваску перед сушкой до исходной кислотности молока перед заквашиванием. Далее проводили сравнительное изучение криорезистентности клеток пропионовокислых бактерий при рН 4,6 и нейтрализованной до рН (6,8-7,0) закваски.

Существует мнение, что при низких температурах многие клетки теряют возможность полностью контролировать последовательность и характер биохимических превращений, что может вызвать их ускоренное отмирание. Этим объясняется существование так называемой минимальной температуры роста – величины, характерной для каждого вида и даже штамма бактерий. В биотехнологии сухих бактериальных заквасок эта особенность не учитывалась, хотя из нее следует очень важный вывод о том, что

после окончания культивирования закваску необходимо хранить и смешивать с защитной средой при возможно более низких температурах, но не ниже минимальной температуры роста данного штамма (88). Известно, что минимальная температура роста пропионовокислых бактерий равняется 15<sup>0</sup>С. В связи с этим в дальнейших исследованиях изучали влияние температуры и рН на криорезистентность пропионовокислых бактерий. Результаты исследований представлены на рис. 4.1.2.

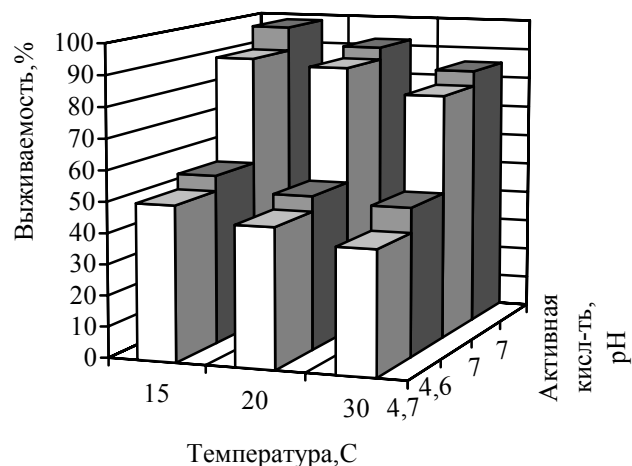


Рис.4.1.2 – Влияние рН и температуры смешивания закваски с защитной средой на криорезистентность пропионовокислых бактерий:  
– культура *P. shermanii* из МГУ; – культура *P. shermanii* из ВНИМИ;

Как видно из рис. 4.1.2, при значении рН 4,6 клетки были более подвержены воздействию процессов замораживания и оттаивания, чем при рН (6,8-7,0). Таким образом, при сдвиге рН в сторону более щелочных значений криорезистентность повышалась, что уменьшало вероятность образования внутриклеточного льда.

Результаты исследований, представленные на рис.4.1.2 свидетельствуют, что с понижением температуры от +30 до +15<sup>0</sup>С, при которых производится смешивание закваски с защитной средой, наблюдается увеличение выживаемости бактерий. Это, вероятно, можно объяснить тем, что при минимальной температуре роста пропионовокислых бактерий (+15<sup>0</sup>С) понижается уровень жизнедеятельности бактерий, замедляются обменные процессы и клетки лучше адаптируются к изменившимся условиям. Полученные данные зависимости криорезистентности от рН и температуры смешивания закваски с защитной средой дают возможность их совместного анализа и определения их оптимальных значений.

В результате математической обработки данных были установлены функциональные зависимости выживаемости пропионовокислых бактерий в зависимости от рН и температуры смешивания закваски с защитной средой в виде уравнения:

культура *P. shermanii* из МГУ при рН 4,7–  
 $Y = 39,0 + 270,0x$ ;

культура *P. shermanii* из МГУ при рН 7,0 –  
 $Y = -0,0133x^2 - 1,866x + 121,9$ ;

культура *P. shermanii* из ВНИМИ при рН 4,6 –  
 $Y = 0,0266x^2 - 1,733x + 80,0$ .

культура *P. shermanii* из ВНИМИ при рН 7,0 –  
 $Y = -0,02x^2 - 0,299x + 109,0$ ;

Коэффициенты корреляции равны соответственно 0,999; 0,999; 0,998 и 0,918.

В разделе 2.3. было отмечено, что активизированная культура пропионовокислых бактерий III генерации обладает высокой биохимической активностью, что дает возможность использовать ее при приготовлении закваски для дальнейшего высушивания. На основании проведенных экспериментов для высушивания рекомендуется использовать активизированную культуру пропионовокислых бактерий, полученную путем сквашивания стерилизованного цельного или обезжиренного молока (1–2)% закваски III генерации, брать культуру в возрасте от 14 до 20 ч, нейтрализовать до pH (6,8–7,0) и смешивать при температуре +15°C. Показатели активности лабораторной закваски, предназначенной для сушки, представлены в табл. 4.1.1.

Таблица 4.1.1 – Биохимическая активность закваски пропионовокислых бактерий перед сушкой

Показатель	Норма	
	P. shermanii ВНИМИ	P. shermanii МГУ
1	2	3
Активность по продолжительности сквашивания, ч	14-16	14-16
Кислотность: титруемая, °Т активная, pH	80-85 6,8-7,0	70-75 6,8-7,0
Количество живых клеток в 1 см <sup>3</sup>	(7-9)·10 <sup>9</sup>	(8-10)·10 <sup>9</sup>
Витамин В <sub>12</sub> , мкг/мл	1200,0	1500,0
ЛЖК, 0,1н NaOH, мл	1,3	1,0

Данные табл. 4.1.1 свидетельствуют о том, что закваска, используемая для высушивания, обладает высокой биохимической активностью. При производстве сухих бак-

териальных препаратов большое значение имеет активность исходных культур. В связи с этим рекомендуемый способ активизации пропионовокислых бактерий позволяет получить активную закваску, что обеспечивает принципиально новый подход к подготовке культур к консервированию.

Замораживание является технологической операцией предшествующей непосредственно сублимации. Гибель клеток при замораживании может быть вызвана воздействием гипертонических растворов, механическим действием внеклеточного льда, внутриклеточной кристаллизацией воды, частичной дегидратацией содержимого клеток и другими факторами. Применение криозащитных веществ, предохраняющих микроорганизмы при замораживании (размораживании), позволяет значительно повысить жизнеспособность микроорганизмов.

В Восточно-Сибирском государственном технологическом университете разработана технология получения сухих препаратов бифидобактерий. При этом теоретически обоснованы и выбраны оптимальные режимы сублимационной сушки (88). Технологические параметры, рекомендованные при производстве сухих препаратов бифидобактерий, были использованы в наших дальнейших исследованиях.

Состав защитной среды представлен в табл. 4.1.2.

Таблица 4.1.2 – Состав защитной среды

Компоненты защитной среды	Массовая доля, %
Дистиллированная вода	88
Сахароза	10
Натрий лимоннокислый трехзамещенный	2

Закваску пропионовокислых бактерий вносили в защитную среду в количестве 30%. Смесь тщательно перемешивали, разливали по флаконам и замораживали при температуре (-18)<sup>0</sup>С. После активизации замороженной закваски определяли количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий. Полученные данные представлены в табл. 4.1.3.

Таблица 4.1.3 – Влияние замораживания на выживаемость клеток

Закваска	Количество клеток в 1 см <sup>3</sup>	Активность сквашивания, ч
До замораживания	9·10 <sup>9</sup>	14-16
После замораживания	7·10 <sup>9</sup>	14-16

Результаты, полученные в ходе экспериментов, показали, что замораживание незначительно влияет на жизнеспособность пропионовокислых бактерий. После активизации замороженной закваски на молоке продолжительность сквашивания не изменилась. Следовательно, защитная среда, содержащая сахарозу и натрий лимоннокислый, способна оказывать защитное действие на микрофлору закваски пропионовокислых бактерий при замораживании.

Вероятно, компоненты защитной среды предотвращают непосредственный контакт микроорганизмов с кристаллами льда, действуют в качестве электролитного буфера и предохраняют от быстрой и слишком большой дегидратации.

Таким образом, на основании проведенных исследований подобраны оптимальные условия подготовки закваски пропионовокислых бактерий к консервированию.

## 4.2. Исследование качественных показателей сухой закваски пропионовокислых бактерий

Основной принцип сублимационного консервирования микроорганизмов – сохранение их качественных показателей.

Сухую закваску пропионовокислых бактерий оценивали по следующим показателям: остаточная влажность, растворимость, количество клеток пропионовокислых бактерий, активность сквашивания молока. Качественная характеристика лиофилизированной закваски представлена в табл. 4.2.1.

Таблица 4.2.1 – Характеристика лиофилизированной закваски пропионовокислых бактерий

Показатель	Норма	
	P. shermanii ВНИМИ	P. shermanii МГУ
1	2	3
Внешний вид	Пористая таблетка или однородный порошок	
Цвет	Белый или кремовый	
Активность, ч	14±2	
Кислотность сгустка: титруемая, °Т активная, рН	85±5 4,58±0,1	75±5 4,68±0,1
Массовая доля влаги, %	3,2±0,5	
Растворимость, мин.	1±0,2	
Гидрофильность, %	85	
Количество живых клеток в 0,1 г	(7-8) ·10 <sup>9</sup>	(8-9) ·10 <sup>9</sup>



Продолжение табл. 4.2.1.

1	2	3
Клетки на среде ГМС на молоке	Коккоидной и палочковидной формы, собранные в цепочки Кокковидные цепочки и диплококковидные клетки	
Бактерии группы кишечной палочки в 0,1 г	Отсутствуют	
Контаминация	Отсутствует	

Данные, приведенные в табл. 4.2.1, показывают, что сухая закваска пропионовокислых бактерий обладает хорошей растворимостью, повышенной гидрофильностью (85%), что свидетельствует о ее хорошем качестве. Кроме того, закваска имеет высокую активность по продолжительности сквашивания (2–2,5) л молока и значительное число жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий  $(7-9) \cdot 10^9$  в 0,1 г.

Таким образом, полученная лиофилизированная закваска пропионовокислых бактерий на молочной основе имеет хорошие качественные показатели и обладает способностью ферментировать молоко без применения стимуляторов роста.

Изучали морфологию клеток пропионовокислых бактерий до и после сушки. Морфология клеток пропионовокислых бактерий зависит от многих факторов: условий культивирования, возраста культуры, количества пересевов, состава среды. В жидкой активизированной закваске пропионовокислые бактерии имеют форму коккоидных клеток, собранных в цепочки, иногда ветвящиеся, а также обнаруживаются короткие палочки; при культивировании на среде ГМС и ГМК-1 – палочковидных и коккоидных клеток, отдельных или собранных в цепочки, встречаются Y- или V-образные.

После реактивации сухие культуры пропионовокислых бактерий не давали каких-либо отклонений по морфологическим свойствам по сравнению с исходными культурами. Так, форма, величина и расположение клеток, а также величина колоний при их восстановлении в молоке и посева на среду ГМС и ГМК-1 оставались неизменными. Этот факт свидетельствует о соблюдении необходимых условий культивирования, подборе эффективной защитной среды и щадящих режимах консервирования.

#### 4.3. Исследование срока хранения лиофилизированной закваски пропионовокислых бактерий

Практическая ценность высушенных заквасок определяется их качеством не только в свежем состоянии, но и в течение продолжительного срока их действия. В связи с этим проблема сохранения сухих препаратов пропионовокислых бактерий в течение длительного времени хранения является актуальной.

Из литературных источников известно, что стойкость сухих препаратов зависит от многих факторов: технологических особенностей микроорганизмов, параметров технологического процесса, влажности сухого биоматериала, температуры и условий хранения. Известно, что на стойкость закваски большое влияние оказывает температура хранения. По данным И.В. Лагоды, Л.А. Банниковой и др., самыми приемлемыми для хранения являются температуры  $-18^{\circ}\text{C}$  и  $+4^{\circ}\text{C}$ . В связи с этим дальнейшие наши исследования были направлены по пути изучения стойкости лиофилизированной закваски в процессе хранения при температурах  $(+4 \div +6)^{\circ}\text{C}$  и  $(-18)^{\circ}\text{C}$ . Полученные результаты представлены в табл. 4.3.1 и 4.3.2.

Анализ представленных в табл. 4.3.1 данных показывает, что через 6 месяцев хранения при температуре (+4 ÷ +6)<sup>0</sup>С идет снижение количества клеток пропионовокислых бактерий штамм ВНИМИ на 25%. Все остальные свойства закваски остались без изменения. В дальнейшем, при хранении до года, произошло уменьшение количества клеток до 10<sup>8</sup> к.о.е. в 0,1 г.

При хранении закваски *P. shermanii* штамм МГУ в течение 6 мес. количество клеток уменьшилось до 1·10<sup>9</sup> в 0,1 г. Хранение же закваски до года заметно сказалось на количестве клеток и составило 1·10<sup>8</sup> в 0,1 г.

Таблица 4.3.1 – Изменение биохимической активности сухих заквасок пропионовокислых бактерий в процессе хранения при (4-6)<sup>0</sup>С

Наименование штамма	Продолжительность хранения, мес.	Активность, ч	Кислотность		Кол-во клеток, в 1 см <sup>3</sup>
			титруемая, <sup>0</sup> Т	активная, рН	
1	2	3	4	5	6
P. shermanii штамм ВНИМИ	0	14	85±1	4,58±0,01	8·10 <sup>9</sup>
	3	14	86±2	4,57±0,02	8·10 <sup>9</sup>
	6	14-16	90±1	4,51±0,01	6·10 <sup>9</sup>
	9	20-22	90±2	4,51±0,02	7·10 <sup>8</sup>
	12	22-24	95±2	4,49±0,02	1·10 <sup>8</sup>
P. shermanii штамм МГУ	0	14	70±1	4,73±0,01	9·10 <sup>9</sup>
	3	14	72±2	4,71±0,02	8·10 <sup>9</sup>
	4	16-18	73±1	4,70±0,02	5·10 <sup>9</sup>
	5	16-18	73±2	4,70±0,02	3·10 <sup>9</sup>
	6	18-20	75±1	4,68±0,01	1·10 <sup>9</sup>
	12	22-24	78±2	4,65±0,02	1·10 <sup>8</sup>

Таким образом, хранение сухой закваски пропионовокислых бактерий при температуре (4-6)<sup>0</sup>С позволяет сохранить высокую активность и достаточное количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий в течение 6 месяцев.

Результаты наблюдений за изменением активности сухой закваски пропионовокислых бактерий в процессе хранения при температуре (-18)<sup>0</sup>С представлены в табл. 4.3.2.

Таблица 4.3.2 – Изменение биохимической активности сухих заквасок пропионовокислых бактерий в процессе хранения при (-18)<sup>0</sup>С

Наименование штамма	Продолжительность хранения, мес.	Активность, ч	Кислотность		Кол-во клеток, в 1 см <sup>3</sup>
			титруемая, <sup>0</sup> Т	активная, рН	
1	2	3	4	5	6
P. shermanii штамм ВНИМИ	0	14	85±1	4,58±0,01	8·10 <sup>9</sup>
	3	14	85±2	4,57±0,02	8·10 <sup>9</sup>
	6	14	86±1	4,56±0,01	8·10 <sup>9</sup>
	9	14	87±1	4,55±0,01	7·10 <sup>9</sup>
	12	14-16	87±2	4,55±0,02	5·10 <sup>9</sup>
P. shermanii штамм МГУ	15	20-22	90±2	4,53±0,02	2·10 <sup>8</sup>
	0	14	70±1	4,73±0,01	9·10 <sup>9</sup>
	3	14	70±2	4,73±0,02	9·10 <sup>9</sup>
	6	14	72±1	4,71±0,01	7·10 <sup>9</sup>
	9	14-16	72±1	4,71±0,02	5·10 <sup>9</sup>
P. shermanii штамм МГУ	12	16-18	73±2	4,70±0,02	3·10 <sup>9</sup>
	15	22-24	75±2	4,769±0,02	1·10 <sup>8</sup>

Анализ данных, полученных в процессе хранения при  $(-18)^{\circ}\text{C}$ , показал, что в течение 9 месяцев хранения активность сухой закваски *P.shermanii* ВНИМИ соответствует активности закваски непосредственно после сушки. Дальнейшее хранение до 12 месяцев приводит к незначительному снижению количества клеток бактерий и составляет  $(2-5)\cdot 10^9$  в 0,1 г. Продолжительность сквашивания молока увеличилась лишь на 3 ч.

Таким образом, результаты исследований указывают на возможность хранения сухой закваски пропионовокислых бактерий при температуре  $(-18)^{\circ}\text{C}$  в течение 12 месяцев.

Одним из основных показателей сухой закваски является остаточная влажность, влияющая на выживаемость клеток при хранении. Изменение выживаемости клеток пропионовокислых бактерий в процессе хранения показано на рис. 4.3.1.

Как видно из рис.4.3.1, с увеличением влажности сухой закваски в процессе хранения выживаемость клеток бактерий уменьшается. Так, после 12 месяцев хранения при температуре  $(4-6)^{\circ}\text{C}$  при влагосодержании 3,4 % выживаемость клеток пропионовокислых бактерий *P. shermanii* из МГУ составила – 30%, а *P. shermanii* из ВНИМИ – 50%.

Необходимо отметить, что при хранении сухой закваски при  $(-18)^{\circ}\text{C}$  выживаемость пропионовокислых бактерий выше, чем при  $(4-6)^{\circ}\text{C}$ , и после 12 месяцев хранения составила *P.shermanii* из МГУ – 50 %, а *P.shermanii* из ВНИМИ – 75%.

При математической обработке данных установлена функциональная зависимость выживаемости жизнеспособных клеток от продолжительности хранения в виде уравнений:

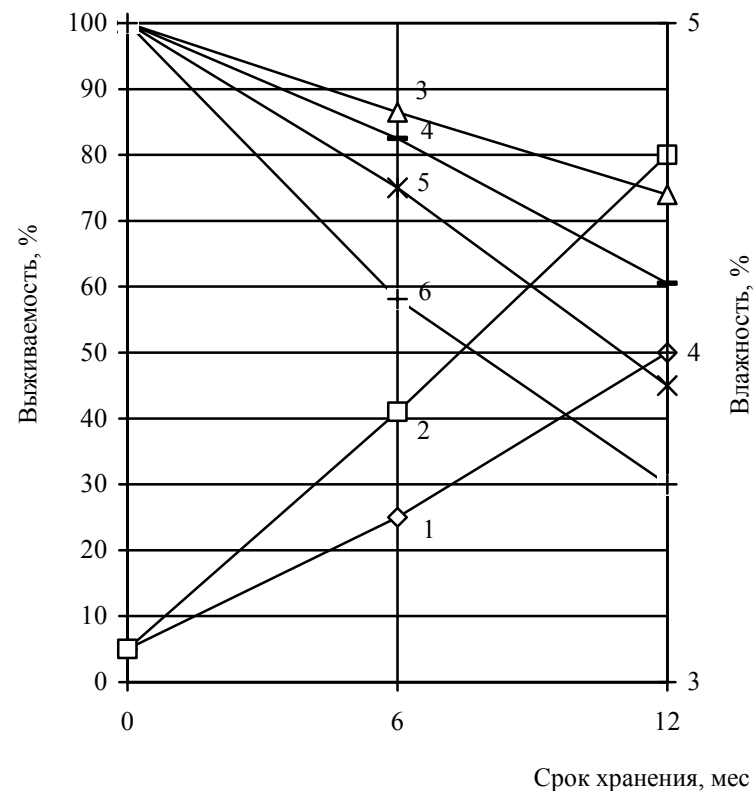


Рис. 4.3.1 – Изменение выживаемости клеток пропионовокислых бактерий в процессе хранения  
 1 – влажность при  $(-18)^{\circ}\text{C}$ ;  
 2 – влажность при  $(4-6)^{\circ}\text{C}$ ;  
 3 – выживаемость *P. shermanii* из ВНИМИ при  $(-18)^{\circ}\text{C}$ ;  
 4 – выживаемость *P. shermanii* из МГУ при  $(-18)^{\circ}\text{C}$ ;  
 5 – выживаемость *P. shermanii* из ВНИМИ при  $(4-6)^{\circ}\text{C}$ ;  
 6 – выживаемость *P. shermanii* из МГУ при  $(4-6)^{\circ}\text{C}$

1.  $Y = -0,0625X^2 - 3,791X + 0,01$ ;
2.  $Y = 0,1139X^2 - 7,2X + 0,01$ ;
3.  $Y = -0,0555X^2 - 2,617X + 0,01$ ;
4.  $Y = 0,0472X^2 - 2,88X + 0,01$ ;

где  $Y$  – выживаемость бактерий, %,

$X$  – продолжительность хранения, мес.

Коэффициенты корреляции соответственно равны 0,998; 0,997; 0,998 и 0,997.

Таким образом, на основании экспериментальных исследований можно сделать заключение, что лиофилизированная закваска пропионовокислых бактерий, полученная из активизированной жидкой культуры и высушенная сублимационным методом в специальной защитной среде, обладает высокими качественными показателями и является стойкой при хранении.

#### 4.4. Технологическая схема производства сухой закваски пропионовокислых бактерий

Проведенные исследования позволили разработать технологию производства лиофилизированной закваски пропионовокислых бактерий.

Технологический процесс производства закваски состоит из следующих этапов:

- приготовление жидкой активизированной закваски;
- смешивание закваски с защитной средой;
- замораживание, сушка, хранение.

Схема производства сухой закваски приведена на рис. 4.4.1. Как видно из рис.4.4.1, технология производства лиофилизированной закваски проста и не требует дорогостоящих питательных сред и ростовых веществ.

Приготовление лабораторной закваски. Закваску готовят на обезжиренном или цельном молоке, стерилизованном при температуре  $(121 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  в течение (10-15)мин. Сухую культуру пропионовокислых бактерий *P. shermanii* активизируют путем культивирования на обработанном  $\beta$ -галактозидазой молоке.

Лабораторную закваску готовят путем внесения 1-2% закваски III генерации в стерилизованное молоко и выдерживают при температуре  $(30 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  в течение (14-16)ч до образования сгустка кислотностью  $(85 \pm 5)^{\circ}\text{T}$ . В случае необходимости закваску можно охладить до температуры  $(4 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  и хранить в охлажденном состоянии не более (8-10) ч.

Развитие пропионовокислых бактерий контролируют по микроскопическому препарату, рН и количеству жизнеспособных клеток.

Смешивание закваски с защитной средой. Полученную жидкую лабораторную закваску нейтрализуют 1н раствором едкого натра до рН (6,8-7,0) и смешивают в количестве 30% с защитной средой при температуре не ниже  $15^{\circ}\text{C}$ . Защитная среда состоит из водного раствора, содержащего сахарозу (10%), натрий лимоннокислый (2%). После смешивания закваски с защитной средой смесь хорошо перемешивают и отправляют на розлив.

Замораживание и высушивание. Розлив смеси производится во флаконы по  $1\text{ см}^3$  или в стерильные лотки толщиной слоя 6-8 мм. Лотки закрывали марлевыми салфетками. Замораживание проводится в морозильной камере при температуре  $(-18)^{\circ}\text{C}$  в холодильной камере в течение (12-14) ч.

Высушивание закваски пропионовокислых бактерий производится в камерной сублимационной установке при следующих режимах: температура в начале процесса  $(-18)^{\circ}\text{C}$ , в конце процесса  $(38 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ , остаточное давление 0,13-1,3 Па, продолжительность процесса  $(22 \pm 2)$  ч.

Упаковка. Флаконы с сухой закваской закрывают резиновыми пробками и закатывают алюминиевыми колпачками.

Закваску, высушенную на лотках, перед фасовкой измельчают и рассыпают в стерильную тару по 150-300 доз.

Хранение сухой закваски осуществляли при температуре  $(-18)^{\circ}\text{C}$  в течение 12 месяцев или при температуре  $(4-6)^{\circ}\text{C}$  не более 6 месяцев со дня выработки.

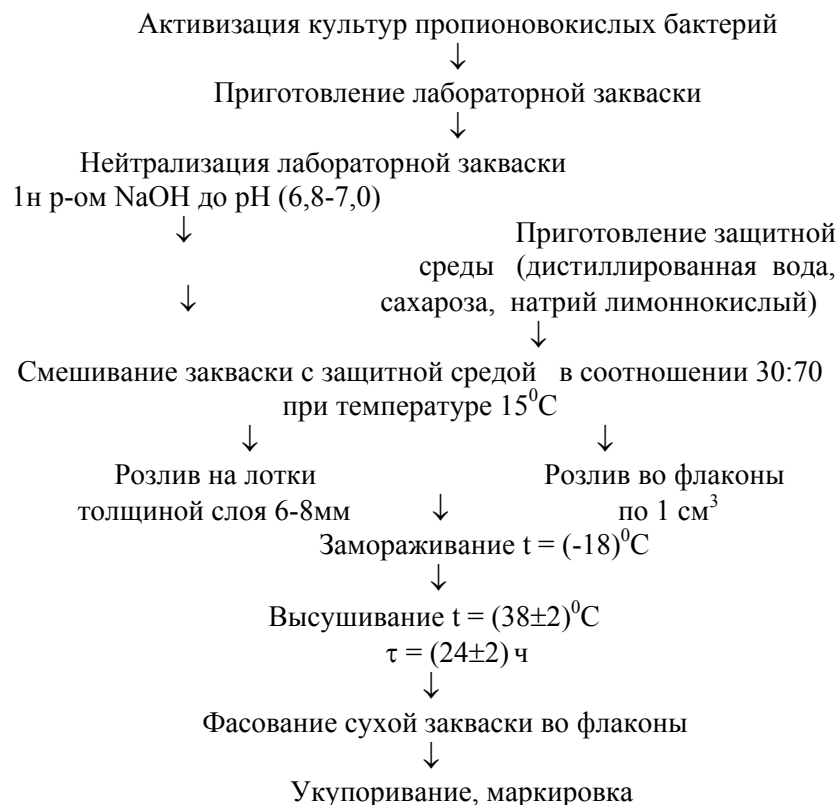


Рис. 4.4.1. Схема производства сухой закваски пропионовокислых бактерий

Таким образом, на основании проведенных экспериментальных исследований разработаны технология производства сухой закваски пропионовокислых бактерий, активно ферментирующая молоко, и нормативно-техническая документация (ТУ 9229-002-02069473-99 «Закваска сухая пропионовокислых бактерий»).

## ГЛАВА V. ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ СУХОЙ ЗАКВАСКИ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

### 5.1. Использование сухой закваски пропионовокислых бактерий при производстве кисломолочного продукта

На следующем этапе исследований была разработана схема приготовления и использования сухой закваски пропионовокислых бактерий в условиях производства, которая представлена на рис. 5.1.1.



Рис. 5.1.1 – Схема приготовления закваски в условиях производства при использовании сухой закваски пропионовокислых бактерий

Для приготовления первичной лабораторной закваски порцию сухой закваски (0,1 г) вносят в (2-2,5) дм<sup>3</sup> стерилизованного при температуре (121±1)<sup>0</sup>С молока, тщательно перемешивают и помещают в термостат при температуре (30±1)<sup>0</sup>С до образования сгустка. Из лабораторной закваски готовят пересадочную лабораторную закваску путем внесения в стерилизованное при указанной выше температуре молоко (1–2)% инокулята. Полученную закваску отправляют в производство или используют для приготовления производственной закваски. Биохимическая активность лабораторной и производственной закваски показана в табл. 5.1.1.

Таблица 5.1.1 – Биохимическая активность лабораторной закваски пропионовокислых бактерий

Вид закваски	Акт-ть сквашивания, ч	Кислотность		Кол-во клеток, в 1 см <sup>3</sup>	ЛЖК, 0,1н NaOH, мл
		титруемая, <sup>0</sup> T	активная, рН		
1	2	3	4	5	6
Р. shermanii штамм ВНИ-МИ:					
Лабораторная	12-16	80-85	4,63-4,58	9·10 <sup>9</sup>	1,25
Пересадочная лабораторная	12-16	82-85	4,61-4,58	9·10 <sup>9</sup>	1,3
Производственная	7,5-8,5	85-90	4,58-4,53	8·10 <sup>9</sup>	1,3

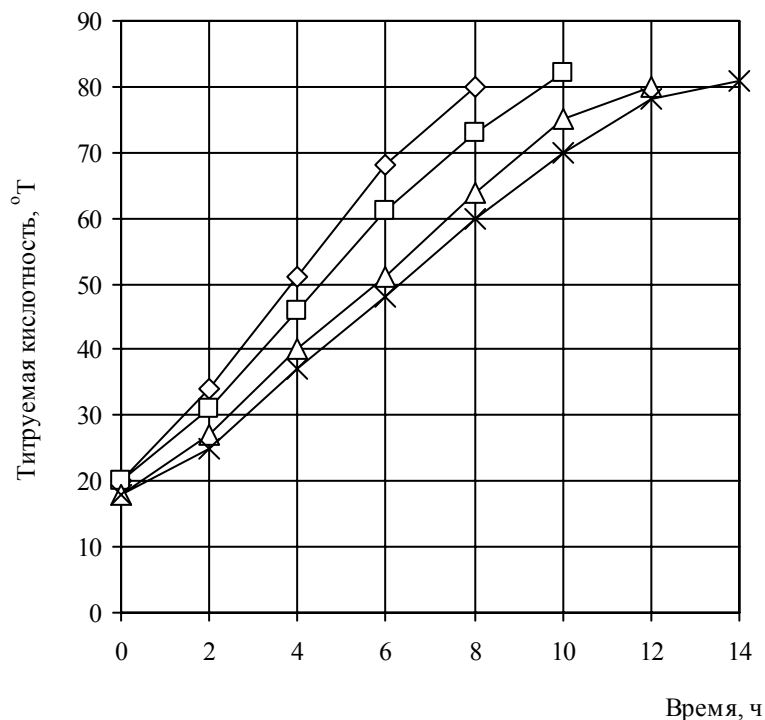
Продолжение табл. 5.1.1.

1	2	3	4	5	6
Р. shermanii штамм МГУ:					
Лабораторная	12-16	65-70	4,76-4,73	9·10 <sup>9</sup>	0,9
Пересадочная лабораторная	12-16	72-75	4,71-4,68	9·10 <sup>9</sup>	1,0
Производственная	7-8	70-75	4,73-4,68	8·10 <sup>9</sup>	1,0

Данные, приведенные в табл. 5.1.1, показывают, что сухая закваска в процессе реактивации имеет высокую энергию кислотообразования и активный рост клеток пропионовокислых бактерий. Лабораторная закваска характеризуется высокой активностью сквашивания молока, и число жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий составляет (8-9) ·10<sup>9</sup> в 1 см<sup>3</sup>. Кроме того, установлено, что после пересадки активность закваски повышается. Ее высокая активность обусловлена, вероятно, тем, что при реактивации в регидратированных клетках начинается синтез белка с первых минут после возвращения воды. Большинство ферментов, необходимых для энергообеспечения клетки, очевидно, повышают свою активность и способствуют интенсивному росту микроорганизмов.

Нами были уточнены режимы ферментации молока при производстве кисломолочного продукта с использованием сухой закваски пропионовокислых бактерий. Для приготовления кисломолочного продукта в молоко вносили (3-5)% производственной закваски. О характере сквашивания судили по изменению титруемой кислотности и количеству клеток. Результаты исследований представлены на рис. 5.1.2 и 5.1.3.

Результаты исследований, представленные на рис. 5.1.2 показывают, что продолжительность ферментации молока остается на прежнем уровне составляет (8-12) ч,



- ◇— Доза закваски 5%, при t=(29-31) С
- Доза закваски 3%, при t=(29-31) С
- △— Доза закваски 5%, при t=(20-22) С
- ×— Доза закваски 3%, при t=(20-22) С

Рис.5.1.2 – Изменение титруемой кислотности при сквашивании молока

как и при использовании жидкой закваски. Количественный учет пропионовокислых бактерий показал (рис. 5.1.3), что при дозах закваски (3-5)% количество жизнеспособных клеток в конце ферментации составляет  $10^9$  в  $1 \text{ см}^3$ .

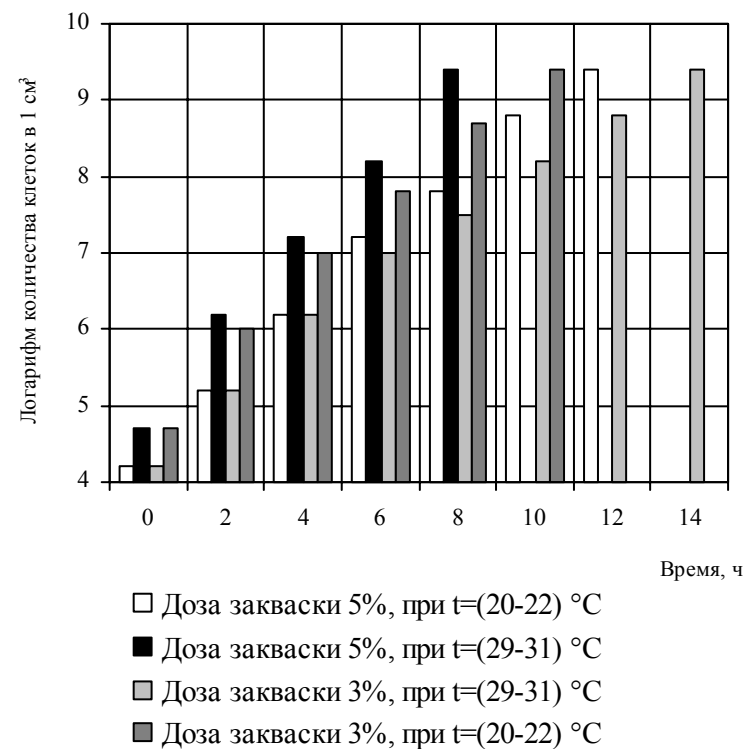


Рис.5.1.3 – Изменение количества клеток пропионовокислых бактерий при сквашивании молока

Качественные показатели кисломолочного напитка «Целебный» приведены в табл. 5.1.2.

Как видно из табл. 5.1.2, кисломолочный напиток «Целебный» характеризуется хорошими органолептическими, физико-химическими и санитарно-гигиеническими показателями. Он имеет приятный специфический кисломолочный вкус, свойственный данному продукту, содержит высокое количество клеток пропионовокислых бактерий  $10^9$

в 1 см<sup>3</sup> и большое количество витамина В<sub>12</sub> – (1200-1500) мкг/мл.

Таблица 5.1.2 – Качественные показатели кисломолочного напитка «Целебный»

Показатель	Норма
1	2
Внешний вид и консистенция	Однородная, нежная, в меру вязкая, допускается небольшое газообразование
Вкус и запах	Чистый, с приятным кисломолочным привкусом, специфическим для данного продукта, без посторонних привкусов и запахов
Продолжительность сквашивания, ч:	
при t (22±2) <sup>0</sup> С	10-12
при t (30±1) <sup>0</sup> С	8-9
Кислотность, <sup>0</sup> Т	70-90
Количество клеток пропионовокислых бактерий в 1 см <sup>3</sup> , не менее	10 <sup>8</sup>
БГКП (колиформы) в 0,01 см <sup>3</sup> продукта	Не допускаются
Патогенные, в т. ч. сальмонеллы в 25 см <sup>3</sup> продукта	Не допускаются
Витамин В <sub>12</sub> , мкг/мл	1200-1500

## 5.2. Исследование сроков хранения кисломолочного напитка «Целебный»

Кисломолочные напитки, благодаря наличию в них молочной кислоты, антибиотиков, продуцируемых микроорганизмами, входящими в состав закваски, имеют более длительный срок хранения. Однако в процессе хранения в них может развиваться посторонняя микрофлора, снижающая качество продукта. Для установления обоснованных сроков хранения изучали изменения физико-химических, микробиологических и органолептических показателей кисломолочного продукта в процессе хранения при (6±2)<sup>0</sup>С. Результаты исследований представлены в табл. 5.2.1.

Таблица 5.2.1 – Изменение показателей кисломолочного напитка «Целебный» при хранении

Показатель	Продолжительность хранения, сут.						
	0	1	2	3	4	7	8
Р.shermanii ВНИМИ							
Кислотность, <sup>0</sup> Т	76	76	78	78	80	82	84
Количество живых клеток в 1 см <sup>3</sup>	8·10 <sup>9</sup>	8·10 <sup>9</sup>	8·10 <sup>9</sup>	6·10 <sup>9</sup>	4·10 <sup>9</sup>	3·10 <sup>9</sup>	1·10 <sup>9</sup>
БГКП	отсутствуют						

Как видно из табл. 5.2.1, в течение 8 суток хранения кислотность выросла всего на 8<sup>0</sup>Т, а количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий оставалось на достаточно высоком уровне – 10<sup>9</sup> в 1 см<sup>3</sup> продукта.



Вкус и запах в течение 8 суток хранения оставался приятным, чистым, кисломолочным, без посторонних привкусов и запахов. На 9–е сутки хранения в продукте появлялся привкус горечи. Данные, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что кисломолочный напиток «Целебный» характеризуется стабильными органолептическими, физико-химическими и микробиологическими показателями в течение 7 суток хранения. Такой длительный срок хранения кисломолочного продукта можно объяснить наличием природного антиоксиданта – пропионовой кислоты среди продуктов метаболизма микрофлоры закваски.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработана технология и утверждена нормативно-техническая документация на кисломолочный напиток «Целебный» (ТУ 9222-008-02069473-2004).

Использование сухой закваски пропионовокислых бактерий позволит организовать широкомасштабное внедрение кисломолочного напитка «Целебный».

### **5.3. Технологический процесс производства кисломолочного напитка «Целебный»**

Технологический процесс производства кисломолочного напитка «Целебный» состоит из следующих операций:

- приемка и подготовка сырья, нормализация;
- гомогенизация, пастеризация и охлаждение смеси;
- заквашивание и сквашивание;
- охлаждение и перемешивание сгустка;
- розлив, упаковка, маркировка и доохлаждение готового продукта.

#### **Приемка и подготовка сырья, нормализация**

1. Молоко принимают по количеству и качеству установленному ОТК (лабораторий) предприятия.

2. Отобранное по качеству молоко очищают на сепараторах-молокоочистителях и затем немедленно охлаждают до  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ .

3. После очистки и охлаждения молоко нормализуют по массовой доле жира в соответствии с рецептурой. При этом нормализацию осуществляют с таким расчетом, чтобы массовая доля жира в нормализованной смеси была на 0,05% выше массовой доли жира в продукте.

4. Сухое цельное или обезжиренное молоко восстанавливают в соответствии с действующей документацией.

#### **Гомогенизация, пастеризация и охлаждение смеси**

5. Нормализованное молоко, предварительно нагретое до  $t (65-70)^\circ\text{C}$ , гомогенизируют при давлении 15-20 МПа /150-200 кг/см<sup>3</sup>.

При производственной необходимости допускается гомогенизировать смесь при температуре пастеризации.

В случае производства продукта 2,5% жирности и нежирного процесс гомогенизации допускается исключить.

6. После гомогенизации молоко направляют на пастеризацию при температуре  $(93\pm 2)^\circ\text{C}$  с выдержкой (15-20)с.

7. После тепловой обработки молоко охлаждают до температуры заквашивания  $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ .

#### **Заквашивание и сквашивание**

8. Заквашивают и сквашивают смесь в резервуарах для кисломолочных продуктов с охлаждаемой рубашкой, снабженных специальными мешалками, обеспечивающими

равномерное и тщательное перемешивание смеси с закваской и молочного сгустка. При небольших объемах производства пастеризацию, охлаждение, заквашивание и сквашивание смеси можно производить в ваннах ВДП или других двустенных емкостях с мешалками.

9. Во избежание вспенивания, влияющего на отделение сыворотки, при хранении напитка смесь в резервуар подают через нижний штуцер.

10. В охлажденное молоко при включенной мешалке вносят закваску на чистых культурах пропионовокислых бактерий в количестве 5% от объема заквашенной смеси.

Заквашенную смесь перемешивают в течение 10 мин.

11. После перемешивания смесь оставляют в покое для сквашивания при температуре  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  на (8-12) ч. до образования сгустка кислотностью не менее  $70^\circ\text{T}$ .

#### Охлаждение и перемешивание сгустка

12. По окончании сквашивания в межстенное пространство подают ледяную воду в течение  $(45 \pm 15)$  мин. Затем сгусток перемешивают от 15 до 40 мин. Продолжительность перемешивания зависит от конструкции мешалки и консистенции сгустка.

13. Перемешанный сгусток при помощи насоса, предназначенного для перекачки вязких жидкостей, подают на пластинчатый охладитель, охлаждают до температуры не более  $6^\circ\text{C}$  и направляют в промежуточную емкость, а затем на розлив. При отсутствии охладителей продукт можно охладить в резервуаре до температуры не более  $20^\circ\text{C}$ , подавая в межстенное пространство ледяную воду с температурой  $(1-2)^\circ\text{C}$ .

При наличии достаточных площадей холодильных камер, способных обеспечить охлаждение упакованного продукта, допускается направлять напиток кисломолочный

«Целебный» на розлив непосредственно после частичного охлаждения сквашенного продукта ледяной водой до  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$  и тщательного перемешивания.

#### Розлив, упаковка, маркировка и доохлаждение готового продукта

14. Перед началом розлива продукт перемешивают в течение (3-5) мин., разливают в стеклянную тару номинальной вместимостью 0,5 и 1 дм<sup>3</sup> по ГОСТ 15844-92 или в бумажные пакеты с полимерным покрытием.

15. Упаковку и маркировку продукта производят в соответствии с требованиями действующих технических условий на напиток кисломолочный «Целебный».

16. При необходимости упакованный продукт в корзинах или полиэтиленовых ящиках направляют в холодильную камеру для доохлаждения его до температуры не более  $6^\circ\text{C}$ , после чего технологический процесс считается законченным и продукт готов к реализации.

Таким образом, технология кисломолочного напитка «Целебный» проста и не требует дополнительного оборудования.

Производство сухих заквасок пропионовокислых бактерий организовано в научно-исследовательской лаборатории лиофильной сушки ВСГТУ.

Опытно-промышленная проверка и внедрение технологии кисломолочного напитка «Целебный» с использованием сухой закваски пропионовокислых бактерий осуществлены на молочном комбинате «ДАКГОМЗ» (г. Комсомольск-на-Амуре), малом предприятии по производству продуктов диетического и лечебного питания «Вита» (г. Усолье-Сибирское), на малом предприятии г.Иркутска.

## ГЛАВА VI. РАЗРАБОТКА БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНЦЕНТРАТА ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Применение сухих заквасок связано с опасностью инфицирования, требует дополнительных затрат при пересевах, ограничивает объемы производства продукции. В связи с этим перспективным направлением в конструировании заквасок является создание бактериального концентрата пропионовокислых бактерий для прямого внесения в молоко. Бактериальный концентрат-это высококонцентрированная биомасса, где количество клеток на 2-3 порядка выше, чем в заквасках. Применение бактериальных концентратов в молочной промышленности позволяет интенсифицировать процесс сквашивания, снизить рабочие площади и повысить санитарно-гигиенические показатели продукта. Кроме того, жидкая форма бактериального концентрата может использоваться в качестве биологически активной добавки к пище для улучшения качества жизни.

### 6.1. Подбор питательной среды для культивирования пропионовокислых бактерий

Жизнедеятельность микроорганизмов неразрывно связана с условиями окружающей среды. Влияние внешних факторов на развитие микроорганизмов зависит от их биологических особенностей и от особенностей воздействующего фактора, который может иметь как благоприятное, так и губительное действие. Важную роль при этом играет состав питательной среды.

Питательные среды по своему назначению делятся на диагностические и производственные. Первые предназначены в основном для обнаружения, выделения и иден-

тификации микроорганизмов. Производственные питательные среды по составу делятся на посевные и основные ферментационные, приготовленные в большинстве случаев на полупродуктах и отходах сельскохозяйственного и пищевого производства с добавками минеральных солей. Химический состав этих сред не всегда точно известен, но он должен содержать все необходимые для роста и развития микробов вещества: азот, углерод, неорганические соединения в виде солей, витамины, микроэлементы и другие компоненты. Среда считается оптимальной, если она имеет определенные показатели pH, окислительно-восстановительного потенциала, осмотического давления и т.д.

На кафедре «Технология молочных продуктов. Товароведение и экспертиза товаров» разработана технология получения бактериального концентрата бифидобактерий. Из литературных источников известно, что пропионовокислые бактерии, так же как и бифидобактерии, относятся к актиномицетной группе микроорганизмов. Пропионовокислые бактерии имеют ясно выраженную склонность к образованию утолщений и веточек на концах клеток, как и бифидобактерии, у которых способность к бифуркации резко выражена. Также для количественного учета бактерий применяются идентичные среды, вследствие чего для накопления биомассы пропионовокислых бактерий была взята среда на основе молочной сыворотки для культивирования бифидобактерий с последующей оптимизацией.

Состав питательной среды представлен в табл. 6.1.1.

Данные табл. 6.1.1 указывают, что питательная среда для культивирования пропионовокислых бактерий относится к естественным средам, так как в основе ее лежит сыворотка творожная. Также в ее состав входят дополнительные, необходимые для нормального роста бактерий вещества. Для стабилизации действия ферментов вносят магний хлористый в качестве редуцирующего вещества- аскорбиновую

кислоту, агар – для создания условий, близких к анаэробным. Для поддержания оптимальной буферной емкости среды использованы натриевые и калиевые соли лимонной и уксусной кислоты. Водородный показатель среды воздействует на ионное состояние, следовательно, и на доступность для организма многих метаболитов и неорганических ионов.

Таблица 6.1.1 – Состав питательной среды для наращивания биомассы пропионовокислых бактерий

Компоненты	Количество, г.
Сыворотка творожная	1000
Магний хлористый	0,3
Натрий лимоннокислый трехзамещенный	1,0
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,5
Аскорбиновая кислота	0,1
Агар микробиологический	1,3

Для создания асептических условий развития микроорганизмов питательную среду подвергали стерилизации при температуре  $(121 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  30 мин. Это необходимо для получения чистых культур микроорганизмов, так как посторонняя микрофлора может влиять на рост бактерий, изменять свойства среды и т.д.

Таким образом, питательная среда для культивирования пропионовокислых бактерий содержит все необходимые источники питания и обладает оптимальными физико-химическими показателями.

## 6.2. Исследование активности инокулята для получения бакконцентрата пропионовокислых бактерий

Важную роль при культивировании микроорганизмов играет активность посевного материала. Инокулят должен обладать высокой биохимической активностью, увеличить выход биомассы, сократить продолжительность наращивания микроорганизмов. Следует отметить, что длительность лаг-фазы также зависит и от возраста инокулята. Это связано с тем, что в клетках накапливаются токсичные вещества. В данной работе использована суточная активизированная закваска пропионовокислых бактерий.

Нами была изучена биохимическая активность инокулята. Результаты приведены в табл. 6.2.1.

Таблица 6.2.1 – Характеристика биохимической активности инокулята

Показатели	Характеристика
Активность сквашивания, ч	16-18
Кислотность:	
титруемая, $\text{T}^{\circ}$	80 $\pm$ 5
активная, pH	4,63-4,58
Количество жизнеспособных клеток в $1 \text{ см}^3$	9 $\cdot$ 10 <sup>9</sup>
Микроскопический препарат на молоке	кокковидные цепочки и диплококковидные клетки
БГКП (колиформы)	отсутствуют
Контаминация	отсутствуют

Как видно из табл. 6.2.1, посевной материал обладает хорошей ферментативной активностью. Это связано, прежде всего, с тем, что, благодаря активизации, пропионовокислые бактерии приобрели способность ферментировать молоко и пищевые среды без стимуляторов роста.

Таким образом, для получения бактериального кон-

центрата с высоким титром жизнеспособных клеток данный инокулят обладает достаточно высокой биохимической активностью.

### 6.3. Влияние дозы инокулята на выход биомассы

Цикл развития культуры начинается с засева среды. Засев необходимо осуществлять в таком количестве, которое обеспечивало бы начало роста микроорганизмов с минимальной задержкой. Внесение небольшого количества инокулята в большой объем свежей среды может привести к диффузии из клеток витаминов, кофакторов и ионов, которые необходимы для поддержания активности многих внутриклеточных ферментов. Посевной материал, попав в свежую среду, постепенно начинает размножаться. Через определенное время в стационарной фазе, количество клеток в питательной среде достигает максимального уровня.

В связи с этим, в следующей серии опытов определялось оптимальное количество необходимого инокулята для роста и размножения бактерий.

Результаты, представленные на рис.6.3.1. свидетельствуют, что с увеличением дозы инокулята интенсивность нарастания биомассы увеличивается. Так, при увеличении дозы инокулята с 1 до 5% значение оптической плотности резко возрастает. Дальнейшее повышение дозы инокулята до 7% незначительно сказывается на показаниях оптической плотности.

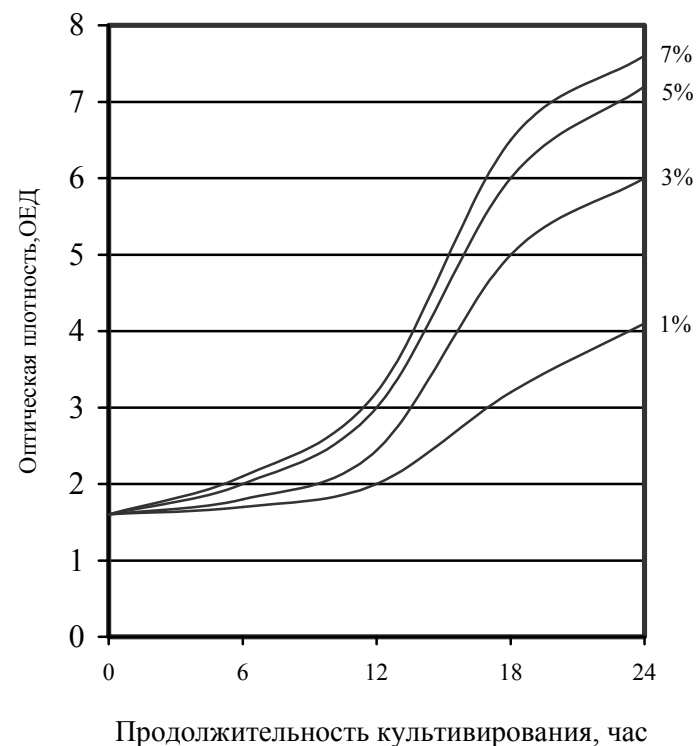


Рис.6.3.1– Влияние дозы инокулята на накопление биомассы

Накопление биомассы отождествляется с ростом микроорганизмов. Рост и размножение связаны друг с другом: при росте происходит увеличение числа клеток. Зависимость роста от дозы инокулята представлена в табл. 6.3.1.

Таблица 6.3.1 – Динамика роста пропионовокислых бактерий в зависимости от дозы инокулята

Доза инокулята	Продолжительность культивирования, ч				
	3	9	12	18	24
1%	$3 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^9$
3%	$6 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^{10}$	$8 \cdot 10^{11}$
5%	$8 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^{12}$
7%	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^{10}$	$6 \cdot 10^{11}$	$7 \cdot 10^{12}$

Количество клеток к концу культивирования при дозе инокулята 5% достигает  $1 \cdot 10^{12}$  в  $1 \text{ см}^3$ , что на 3 порядка выше, чем при дозе инокулята 1%, и на порядок выше, чем при дозе 3%. Это связано с тем, что клетки, попав в свежую, богатую питательными веществами среду, начинают размножаться с максимальной для данной культуры скоростью. И чем выше начальная концентрация клеток, тем меньше времени им требуется для активизации необходимых ферментных систем, синтеза нуклеиновых кислот, особенно РНК, которые необходимы для биосинтеза белков. Наибольший урожай клеток был отмечен при дозе инокулята 7% и составил  $7 \cdot 10^{12}$  в  $1 \text{ см}^3$ . Однако стоит отметить, что это не намного выше, чем при дозе инокулята 5%.

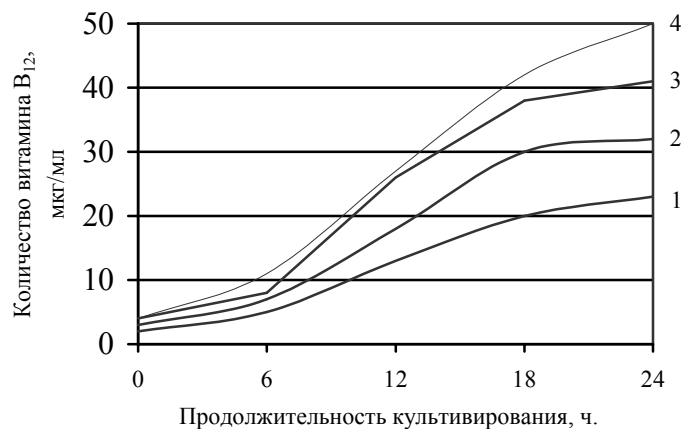
Таким образом, анализ полученных данных показал, что для наращивания биомассы пропионовокислых бактерий наиболее оптимальной дозой инокулята является 5% от объема питательной среды.

#### 6.4. Влияние хлористого кобальта на синтез витамина В<sub>12</sub> пропионовокислыми бактериями

В литературном обзоре показано, что пропионовокислые бактерии являются активными продуцентами витамина В<sub>12</sub>. Следует отметить, что синтез витамина зависит от условий культивирования. Известно, что корриноиды включают в группу тетрапиррольных соединений, несущих жизненно важные функции. Ионы металлов в этих соединениях находятся в комплексе с органическими лигандами, а в коферментах В<sub>12</sub> атом кобальта связан с углеродом. Ко-В<sub>12</sub> – единственное металлоорганическое соединение, обнаруженное в живых организмах. Это уникальный биокатализатор. Энзиматический гемолиз Со-С связи приводит к образованию реактивных веществ. Эти вещества провоцируют протекание реакций, которые в иных случаях должны были бы быть подавлены.

Однако в естественных питательных средах содержание кобальта минимально. Поэтому наши дальнейшие исследования были направлены на изучение влияния ионов кобальта на выход биомассы и на синтез витамина В<sub>12</sub>. Кобальт вносили в количестве 0,002 г/л, 0,003 г/л, 0,004 г/л. В качестве контроля – среда, не содержащая кобальт. Результаты представлены на рис.6.4.1, 6.4.2, 6.4.3.

Как видно из рис. 6.4.1, с увеличением количества ионов кобальта идет большее накопление витамина В<sub>12</sub>. Наибольшее значение – 50 мкг/мл, мы получили в 4-м образце, содержащем 0,004 г/л кобальта. При дозе кобальта 0,003 г/л витамина синтезируется на 40% больше, чем в безкобальтовой среде, и достигает 40,67 мкг/см<sup>3</sup>.



Доза ионов кобальта: 1- контроль;  
2- 0,002 г/л; 3- 0,003 г/л; 4- 0,004 г/л.

Рис. 6.4.1. Влияние дозы ионов кобальта на синтез кобаламина



1- контроль; 2- 0,002 г/л; 3- 0,003 г/л;  
4- 0,004 г/л.

Рис. 6.4.2 – Влияние дозы ионов кобальта на накопление биомассы

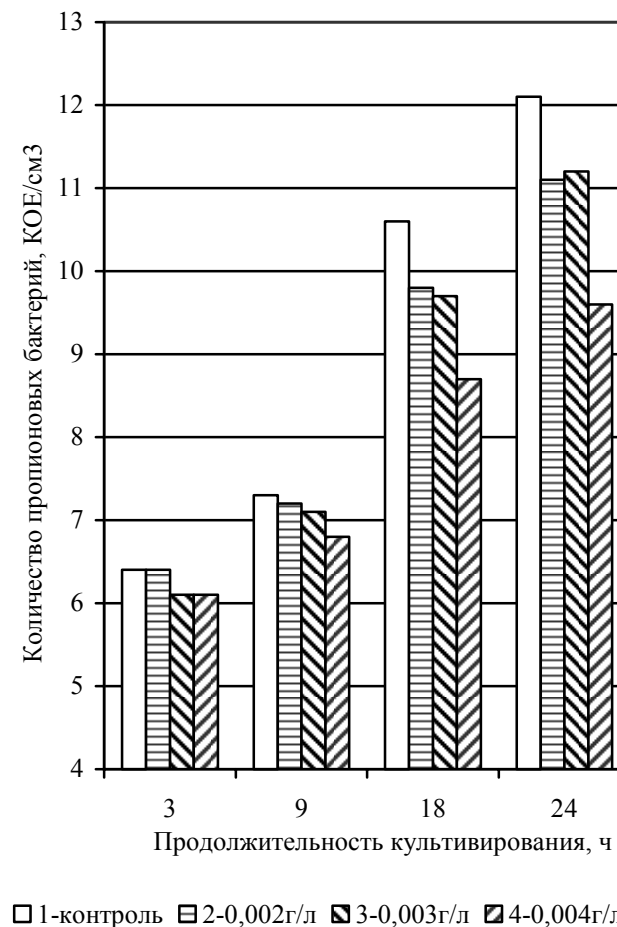


Рис. 6.4.3 – Влияние содержания ионов кобальта на рост пропионовокислых бактерий

Следует отметить, что внесение в питательную среду ионов кобальта несколько тормозит биохимические процессы (рис 6.4.2, 6.4.3). Количество клеток в образце, содержащем 0,004г/л кобальта, к концу культивирования составило  $8 \cdot 10^9$  в  $1 \text{ см}^3$ , что на 3 порядка меньше, чем в кон-

троле. Отмечено снижение темпа наращивания биомассы в этом же образце на 20% по сравнению с контролем. Наиболее приближенные к контролю значения мы получили во втором и третьем образцах, содержащих 0,002 г/л и 0,003 г/л ионов кобальта. Количество жизнеспособных клеток к концу культивирования достигло  $8 \cdot 10^{10}$  в 1 см<sup>3</sup>,  $6 \cdot 10^{10}$  в 1 см<sup>3</sup> соответственно. Также в этих образцах наблюдается наименьшая разница в значениях оптической плотности с контрольным образцом на 7 и 12,5%.

Вероятно, внесение в питательную среду ионов кобальта увеличивает синтез витамина В<sub>12</sub> и, как следствие, идет снижение скорости роста пропионовокислых бактерий. Можно предполагать, что для синтеза витамина помимо целостности клеточных структур необходим определенный уровень, таких метаболитов, как сукцинил КоА, глицин, метионин, НАД, АТФ, ГТФ. Поэтому при культивировании пропионовокислых бактерий возникает нечто вроде конкуренции процесса биосинтеза витамина В<sub>12</sub> и других анаболических процессов за общие предшественники, ибо АТФ, НАД, ФАД входят в молекулу витамина как структурные единицы.

Установлена корреляционная зависимость между количеством ионов кобальта и накоплением витамина В<sub>12</sub>. При дозе ионов кобальта 0,002 г/л уравнение функциональной зависимости имеет вид:

$$y = -0,2143x^2 + 9,3857x - 7,8,$$

коэффициент корреляции  $r$  при этом составляет 0,993;

при дозе ионов кобальта 0,003 г/л зависимость факторов описывается уравнением:

$$y = -0,5714x^2 + 13,829x - 11,8;$$

при 0,004 г/л ионов кобальта уравнение имеет вид:

$$y = 0,0714x^2 + 11,871x - 9,6.$$

В среде, не содержащей ионов кобальта уравнение примет вид:

$$y = -0,0714x^2 + 6,1286x - 5.$$

В результате исследований подобрана оптимальная доза ионов кобальта в количестве 0,003 г/л, которая позволит получить биомассу не только с высоким содержанием витамина В<sub>12</sub>, но и будет содержать достаточное количество жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий.

### 6.5. Исследование антимуtagenной активности пропионовокислых бактерий

Известно, что бактерии, эволюционно наиболее древние существа, постоянно подвергаются мутагенным и инактивирующим факторам среды. Это обстоятельство предполагает, что бактерии должны обладать надежными средствами защиты для сохранения стабильности своего генома. Кроме системы репарации ДНК, они могли выработать защиту путем синтеза веществ с протекторными, реактивирующими и антимуtagenными свойствами. Под антимуtagenезом понимают снижение частоты спонтанной и индуцированной мутации. Антимуtagenны регулируют скорость спонтанных мутаций, стабилизируют мутационный процесс.

Открытие антимуtagenеза у бактерий открывает большие перспективы их использования, так как способы культивирования бактерий имеют определенные преимущества перед культивированием растений. Бактерии можно выращивать на дешевых средах за короткое время путем направленного регулирования их метаболизма. В связи с особенностями метаболизма бактерий их защитные соединения могут экскретироваться, и это есть еще одно преимущество бактерий перед другими источниками антимуtagenнов и протекторов.

Изучение антимуtagenеза важно прежде всего в от-



ношении бактерий, используемых при изготовлении пищи, кормов, кормовых добавок и пробиотиков. К числу таких бактерий принадлежат и пропионовокислые.

В связи с этим в следующей серии опытов нами была изучена антимуtagenная активность пропионовокислых бактерий. Результаты представлены в табл. 6.5.1.

Таблица 6.5.1. – Исследование антимуtagenной активности пропионовокислых бактерий

Среда	Время культивирования, ч	Среднее число ревертантов на чашку	Ингибирование, %
Среда для культивирования	48	502	20
Культуральная жидкость	48	628	25
Клетки	48	70	71,6

В результате исследований установлено, что культуральная жидкость и клетки пропионовокислых бактерий обладают антимуtagenным действием в отношении мутагена, индуцируемого 4-нитрохиолин-N-оксидом. Это связано с тем, что пропионовокислые бактерии синтезируют значительные количества антиокислительных ферментов: супероксиддисмутазы, пероксидазы и каталазы. Присутствие этих ферментов позволяет клетке удалять супероксидные и пероксидные радикалы, образованные в окислительных реакциях.

Таким образом, показано, что пропионовокислые бактерии способны на биосинтез соединений, обладающих

защитой от внешних и эндогенных мутагенов, что делает их привлекательными для создания пищевых добавок и профилактических продуктов питания.

### 6.6. Феноменологическое описание процесса культивирования микроорганизмов

Основным физиологическим показателем, характеризующим кинетические свойства культуры, является удельная скорость роста, величина которой зависит от многих факторов: концентрации субстрата в питательной среде, температуры, pH среды, редокс-потенциала и т.д.

Накопление биомассы пропионовокислых бактерий проводили путем периодического культивирования. Известно, что зависимость концентрации биомассы от времени обычно описывается сложной кривой. Она может быть разбита на 5-6 участков. Количественное описание всей кривой роста чрезвычайно затруднительно и на практике не применяется. Наибольший практический интерес представляет экспоненциальная фаза, когда идет образование биомассы и продуктов метаболизма.

Количественному описанию фазы экспоненциального роста посвящено огромное число работ, в которых предлагаются самые различные подходы к решению задачи. Наибольшее распространение получило количественное описание роста с помощью моделей процесса, отражающих реально наблюдаемые под микроскопом явления, т.е. принимающих те или иные допущения о механизме роста и размножения клеток. Наиболее известной и применимой из таких схем оказалась модель экспоненциального роста, которая исходит из следующих постулатов:

1). увеличение численности популяции микроорганизмов есть результат актов удвоения каждой особи, которая делится через одинаковые интервалы времени  $g$ ;

2). рост, развитие и деление любой клетки происходит независимо от присутствия других микроорганизмов;

3). в некоторых пределах изменение концентрации компонентов питательной среды не влияет на время удвоения клеток  $g$ , которое определяется только типом микроорганизма и условиями культивирования.

Использование этих постулатов приводит к очевидной связи текущей концентрации клеток  $[X]$  в любой момент времени  $\tau$  с начальной концентрацией  $[X]_0$  при  $\tau=0$ :

$$[X]=[X]_0 \cdot 2^{\tau/g} \quad (1)$$

Простое логарифмирование выражения показывает, что оно описывает прямую в координатах  $\lg[X]=\varphi(\tau)$ :

$$\ln[X]=\ln[X]_0 + \tau/g \ln 2 \quad (2)$$

или  $\ln[X]/[X]_0 = \ln 2/g \cdot \tau = \mu \tau \quad (3)$

Дифференцирование зависимости (1) позволяет найти скорость роста культуры:

$$d[X]/d\tau = [X]_0 \cdot 2^{\tau/g} \cdot \ln 2/g = [X] \ln 2/g, \text{ т.е. при } \ln 2/g = \mu$$

$$d[X]/d\tau = \mu[X] \quad (4)$$

или  $d[X]/d\tau \cdot 1/[X] = \mu \quad (5)$

Таким образом, согласно последнему уравнению удельная скорость роста микроорганизмов  $\mu$  по экспоненциальной модели должна быть величиной постоянной, обратно пропорциональной времени удвоения биомассы  $g$ .

Для расчета удельной скорости роста микроорганизмов в закрытой периодической системе в экспоненциальной

фазе роста также возможно применение следующих уравнений:

$$\mu = \frac{X_1 - X_0}{X_1(t_1 - t_0)}; \quad (6)$$

$$Q_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}, \quad (7)$$

где  $\mu$  – удельная скорость роста,  $1/ч$ ;

$X$  – концентрация биомассы,  $г/л$ ;

$Q_x$  – продуктивность по массе,  $г/(л \cdot ч)$ .

Параметры процесса периодического культивирования в питательной среде пропионовокислых бактерий представлены в табл. 6.6.1.

Таблица 6.6.1. – Параметры процесса периодического культивирования в питательной среде пропионовокислых бактерий

Параметры процесса	Питательная среда	
	без кобальта	с кобальтом
Биомасса, $г/дм^3$	16	14
Удельная скорость роста $\mu$ , $ч^{-1}$	0,076	0,07
Продуктивность по биомассе, $г/(л \cdot ч)$	0,94	0,65
Концентрация клеток, млрд, к.о.е. в $1см^3$	2,20	1,70
Витамин $B_{12}$ , $мкг/мл$	24,18	40,67
Антимутагенная активность, %	71,6	77,4

Данные, представленные в табл. 6.6.1, свидетельствуют, что введение ионов кобальта в питательную среду несколько снижает удельную скорость роста и объем биомассы. Следует отметить увеличение синтеза антимутагенных веществ в питательной среде, содержащей кобальт.

Это свидетельствует о возможной взаимосвязи между синтезом витамина В<sub>12</sub> и содержанием антимутагенных веществ.

Таким образом, при количественном описании процесса периодического культивирования пропионовокислых бактерий в питательной среде установлены оптимальные параметры получения жидкого концентрата.

### 6.7. Исследование сроков хранения жидкого концентрата пропионовокислых бактерий

Рост популяции – это сложный, постоянно изменяющийся процесс. Культура, выращиваемая в постоянном объеме питательной среды, проходит определенный физиологический цикл развития. На протяжении этого цикла изменяются как скорость размножения клеток и морфология, так и биохимическая и метаболическая активность клеток. При этом культура сначала размножается в условиях избытка питательных веществ, количество которых за время выращивания постоянно уменьшается. Одновременно в среде накапливаются и продукты метаболизма, которые также оказывают отрицательное влияние на конструктивный обмен и нормальную физиологию клеток, составляющих единую популяцию.

В связи с этим уточнялись сроки хранения жидкого концентрата пропионовокислых бактерий, т.е. в течение какого времени физико-химические и микробиологические показатели останутся на достаточно высоком уровне.

Клетки собирали в период максимальной стабильно-

сти и жизнеспособности культуры, т.е. в поздней экспоненциальной или ранней стационарной фазах роста. Хранение осуществляли при температуре (4-6)°С, в течение 4 месяцев. О влиянии сроков хранения на качественные показатели бакпрепарата судили по количеству клеток. Полученные результаты отражены на рис. 6.7.1.

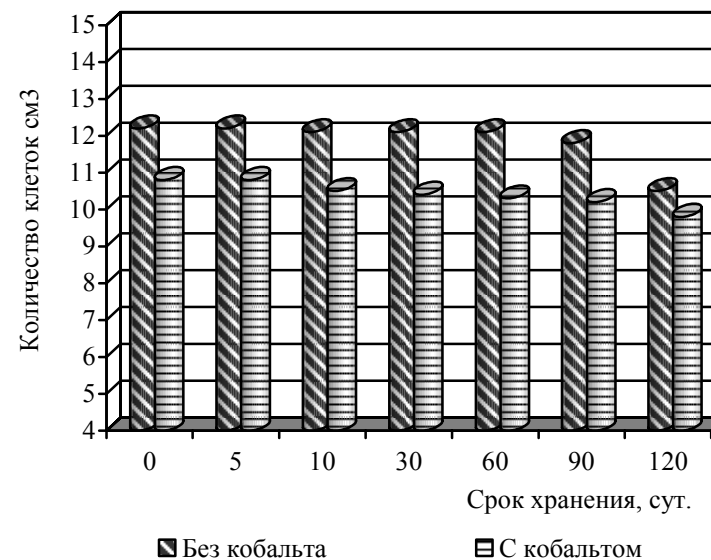


Рис. 6.7.1 – Изменение количества пропионовокислых бактерий в процессе хранения

Из представленных данных видно, что количество жизнеспособных клеток жидкого препарата остается на достаточно высоком уровне в течение 3 месяцев, и затем медленно снижается. К концу четвертого месяца количество жизнеспособных клеток составляет  $5 \cdot 10^{10}$  в  $1 \text{ см}^3$ , а в концентрате с кобальтом  $8 \cdot 10^9$  в  $1 \text{ см}^3$  так как выделяемые в

процессе жизнедеятельности метаболиты угнетают рост бактерий, что приводит к их гибели.

В результате исследований определили, что оптимальный срок хранения жидкого концентрата пропионово-кислых бактерий составляет 3 месяца.

### **6.8. Технологическая схема производства жидкого концентрата пропионовокислых бактерий**

На основании полученных данных, нами была разработана технологическая схема производства жидкого препарата пропионовокислых бактерий. Технологическая схема представлена на рис.6.8.1.

#### **Технологическая схема производства жидкого препарата пропионовокислых бактерий**

Технологический процесс проводят в следующем порядке:

- подготовка питательной среды;
- внесение инокулята и наращивание клеток;
- получение бактериальной суспензии клеток;
- розлив;
- укупоривание, маркирование.

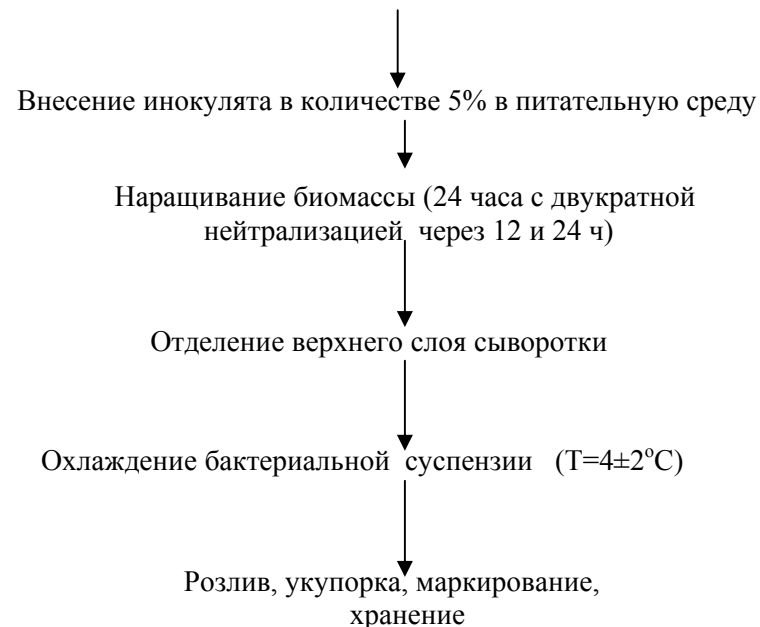
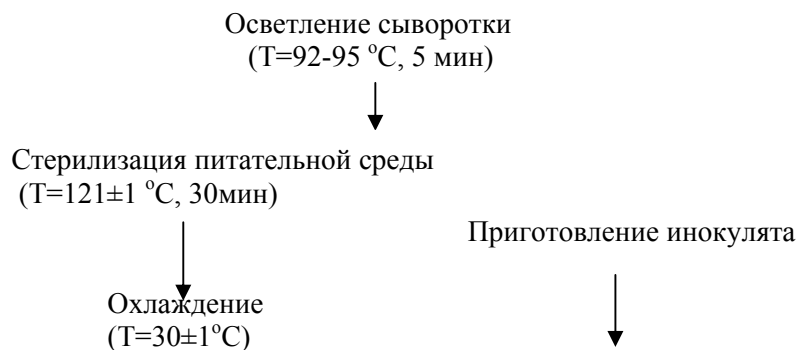


Рис. 6.8.1 – Схема приготовления жидкого концентрата

#### **1. Подготовка питательной среды**

1.1. Средой для наращивания пропионовокислых бактерий служит осветленная творожная сыворотка с добавлением буферных солей, аскорбиновой кислоты и агара. Осветление творожной сыворотки проводят путем нагревания до температуры  $(94\pm 1)^\circ\text{C}$  и выдерживают ее для более полного выделения белков в течение 60 мин. После этого сыворотку осветляют путем фильтрования или центрифугирования. В осветленную сыворотку добавляют компоненты среды согласно рецептуре, устанавливают реакцию pH среды в пределах  $(7,0\pm 0,1)$ .

1.2. Готовую среду стерилизуют при температуре  $(121\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, охлаждают до температуры  $(30\pm 1)^\circ\text{C}$  для пропионовокислых бактерий.

## 2. Внесение инокулята и наращивание клеток

2.1. Инокулят готовят из сухой активизированной закваски пропионовокислых бактерий ТУ 9229-002-02069473-99.

2.2. Для получения бактериальной суспензии клеток, стерилизация, охлаждение среды и наращивание клеток пропионовокислых бактерий осуществляются в ферментере или в колбах из термостойкого стекла.

2.3. В подготовленную питательную среду вносят инокулят пропионовокислых бактерий в количестве 5% от массы среды. Среду с закваской тщательно перемешивают.

2.4. Наращивание клеток пропионовокислых бактерий проводят при температуре  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24 \pm 2)$  ч в условиях периодического культивирования при однократной нейтрализации культуральной жидкости через 12ч, поддерживая рН на оптимальном уровне, насыщенном стерильным раствором углекислого натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

## 3. Получение бактериальной суспензии клеток

3.1. После окончания процесса культивирования отделяют сыворотку для получения бактериальной суспензии клеток, которую охлаждают до температуры  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Выход бактериальной суспензии клеток из культуральной жидкости составляет (40-50) %.

## 4. Розлив

4.1. Полученную суспензию клеток разливают в асептических условиях в стерильные флаконы вместимостью  $10 \text{ см}^3$  по  $(5 \pm 0,1) \text{ см}^3$  или  $(10 \pm 0,2) \text{ см}^3$ .

## 5. Укупоривание и маркирование

5.1. Флаконы укупоривают стерильными резиновыми пробками в асептических условиях и закатывают алюминиевыми колпачками на полуавтомате.

## 6. Хранение

6.1. Хранение концентратов проводят при температуре  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$  90 суток.

Качественная характеристика разработанного бактериального концентрата пропионовокислых бактерий с добавлением и без добавления в питательную среду ионов кобальта – представлена в табл. 6.8.1.

Таблица 6.8.1 – Качественная характеристика препаратов пропионовокислых бактерий

Наименование показателя	Показатель	
	без кобальта	с кобальтом
1	2	3
Консистенция и внешний вид	Однородная, допускается отделение сыворотки	
Цвет	От белого до светло-желтого с белыми вкраплениями	
Вкус и запах	Чистый, слегка кисловатый, без посторонних привкусов	
Предельные значения рН	5,5-8	5,5-8
Температура при выпуске с предприятия, $^\circ\text{C}$ , не более	6	6
Количество пропионовокислых бактерий на конец срока годности в $1 \text{ см}^3$ , не менее	$1 \cdot 10^{11}$	$1 \cdot 10^{10}$
Количество витамина В <sub>12</sub> , мкг/мл	24,18	40,67
Объем продукта ( $\text{см}^3$ ), в котором не допускаются:		
БГКП (колиформы)	10	10
S. aureus	10	10
Патогенные микроорганизмы (в т.ч. сальмонеллы)	50	50
Дрожжи, в $1 \text{ см}^3$ , не более	10	10
Плесени, в $1 \text{ см}^3$ , не более	10	10

Разработанный бактериальный концентрат характеризуется высоким титром жизнеспособных клеток, содер-

жит высокое количество витамина В<sub>12</sub>, обладает антимуtagenными свойствами. Таким образом, концентрат пропионовокислых бактерий может быть рекомендован для непосредственного употребления в качестве биологически активной добавки к пище для профилактики и в комплексной терапии при различных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, аллергических, простудных заболеваниях. Повышает общее самочувствие за счет активизации белкового, углеводного и жирового обмена, улучшает качество крови.

## **ГЛАВА VII. ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ К ЗАМОРАЖИВАНИЮ**

### **7.1. Исследование устойчивости пропионовокислых бактерий к замораживанию**

Известно, что основными физическими факторами, регулирующими интенсивность обмена веществ – жизненных процессов в живых клетках, являются температура и влажность. Один из способов сохранения популяции микроорганизмов – замораживание. При снижении температуры системы (криоанабиоз) подавляется активность ферментов, замедляются обмен веществ, развитие, рост, движение, ослабляется чувствительность. Угнетение жизнедеятельности при замораживании живых организмов вызвано частичным превращением воды в лед. Льдообразование связано с извлечением воды из протоплазмы клеток и их «высушиванием», а также с уменьшением содержания свободной воды в системе. Однако это является обратимым процессом. Организм может снова перейти к активной жизнедеятельности при восстановлении благоприятных условий.

В следующей серии опытов, нами было изучено влияние криоанабиоза на выживаемость клеток пропионовокислых бактерий.

Разрушение клеток микроорганизмов при замораживании происходит в основном из-за увеличения концентрации в клетке и суспендирующей среде электролитов и других веществ. Это ведет к разрушению (денатурации) белковых компонентов и ферментов в ней, в то время как концентрация электролитов вне клетки к дегидратации протоплазмы из-за диффузии воды через мембрану клеточной стенки. Поэтому, для уменьшения повреждения клеток применяют защитные среды. Защитная среда должна предохранять микроорганизмы от необратимых изменений как в процессе замораживания и высушивания, так и при последующем хранении. Криопротекторы уменьшают концентрацию электролитов, противодействуют осмотическому давлению, изменяют структуру воды вне клеток, действуют на поверхность и проницаемость клеток.

Состав защитной среды представлен в табл. 7.1.1.

Таблица 7.1.1 – Состав защитной среды

Компоненты защитной среды	Содержание компонентов, г/л
Дистиллированная вода	1000
Сахароза	100
Натрий лимоннокислый трехзамещенный	20

Добавление к среде натрия лимоннокислого создает буферную емкость, а защитное действие сахарозы объясняется способностью гидратироваться, понижать точку замораживания воды и замедлять скорость ее кристаллизации.

Биомассу пропионовокислых бактерий вносили в защитную среду в соотношении 1:1. Смесь тщательно

перемешивали, разливали во флаконы и замораживали при температуре - 18°C. После активизации замороженного концентрата определяли количество клеток и активность сквашивания молока. Полученные результаты представлены в табл. 7.1.2.

Таблица 7.1.2 – Устойчивость пропионовокислых бактерий к замораживанию

Показатели	Количество клеток пропионовокислых бактерий в 1 см <sup>3</sup>	Активность сквашивания 1 л молока 0,5 см <sup>3</sup> , ч.	Органолептическая оценка
До замораживания	2·10 <sup>12</sup>	10-12	+
После замораживания	1·10 <sup>11</sup>	10-12	+

Полученные данные указывают, что количество клеток после замораживания уменьшилось на порядок и составило 1·10<sup>11</sup> в 1 см<sup>3</sup>. Продолжительность сквашивания молока после активизации замороженной суспензии на молоке не изменилась, что говорит о сохранении биохимической активности на достаточно высоком уровне.

Вероятно, это связано с тем, что замораживанию подверглась достаточно густая суспензия клеток (10<sup>11</sup>–10<sup>12</sup>) в 1 см<sup>3</sup>. Известно, что при различных стрессах густая суспензия повреждается в меньшей степени, чем популяция низкой плотности, из-за действия так называемого популяционного эффекта. Также свое положительное влияние оказала защитная среда. Защитное действие сахарозы при замораживании бактерий объясняется ее способностью гидратироваться, понижать температуру замораживания воды и замедлять скорость ее кристалли-

зации. Добавление в среду лимоннокислого натрия обеспечивает установление реакции среды, близкой к нейтральной или слабокислой.

Таким образом, на основании исследований получен замороженный концентрат пропионовокислых бактерий. Преимуществами метода криогенного хранения является малая вероятность заражения культуры, сохранение стабильности свойств микроорганизмов, а также небольшой расход материалов при подготовке культуры к хранению.

## 7.2. Изучение сроков хранения замороженного концентрата

Достаточно высокая выживаемость, получаемая непосредственно после замораживания, не является гарантией длительного сохранения свойств и жизнеспособности культуры. В данном случае выживаемость микроорганизмов зависит от состава резервных веществ в клетках, а также количества микроорганизмов в полученной биомассе и характера взаимоотношений между бактериями и криопротектором.

Оценку качества концентрата в процессе хранения проводили по количеству клеток и изменению ферментационной активности бактериального концентрата пропионовокислых бактерий. Хранение проводили в течение 7 месяцев. Температура хранения - (15÷18)°C. Результаты представлены в табл. 7.2.1.

Анализ данных показывает, что в течение 6 месяцев хранения, замороженный концентрат сохраняет высокую биохимическую активность, которая несколько уменьшается к концу срока хранения. Количество жизнеспособных клеток к концу исследуемого срока составило 2·10<sup>10</sup> в 1 см<sup>3</sup>, что на порядок ниже, чем в начале хранения.

Таблица. 7.2.1 – Изменение активности замороженной суспензии клеток пропионовокислых бактерий при хранении

Срок хранения, сут.	Количество пропионовокислых бактерий в 1 см <sup>3</sup>	Активность сквашивания 1 л молока 0,5 см <sup>3</sup> , ч.
1	2	3
10	$2 \cdot 10^{11}$	10-12
10	$1 \cdot 10^{11}$	10-12
30	$1 \cdot 10^{11}$	10-12
60	$1 \cdot 10^{11}$	10-12
90	$1 \cdot 10^{11}$	10-12
120	$1 \cdot 10^{11}$	10-12
150	$7 \cdot 10^{10}$	10-12
180	$4 \cdot 10^{10}$	10-12

Температура хранения - 18<sup>0</sup>С замороженных препарата, по существу, обеспечивает им состояние анабиоза, и любые неблагоприятные факторы в меньшей степени оказывают губительное действие на клетки. Незначительное уменьшение количества клеток не повлияло на качественные характеристики концентрата. Оптимальный срок хранения, таким образом, составил 6 месяцев.

### 7.3. Исследование влияния лиофилизации на биохимическую и ферментативную активность пропионовокислых бактерий.

Высушивание из замороженного состояния, или лиофилизация, является одним из самых экономичных и эффективных методов длительного хранения микроорганизмов.

Лиофилизация заключается в удалении воды из замороженной суспензии бактерий путем сублимации при

низком парциальном давлении, то есть при этом вода испаряется, минуя жидкую фазу. В любой момент клетки можно перевести в гидратированное исходное состояние. Специфика процесса лиофилизации определяет его основные преимущества: влага удаляется при низких температурах, что практически исключает термоинактивацию продукта, сохраняется стабильная структура материала (не происходит разрушения или конгломерации частиц), также облегчается возможность получения сухого продукта в фасованном и стерильном виде.

Таким образом, на следующем этапе работы проводилась лиофилизация бактериального препарата пропионовокислых бактерий.

Начальная температура сушки замороженной биомассы пропионовокислых бактерий составила - 18<sup>0</sup>С, досушивание проводили при температуре (37–38)<sup>0</sup>С. В процессе сушки остаточное давление в системе поддерживали на уровне (0,13–1,3)Па. Продолжительность контролировали по остаточной влажности бактериального препарата.

Качество сухого концентрата пропионовокислых бактерий оценивали по количеству жизнеспособных клеток и активности сквашивания молока. Результаты исследований представлены на рис 7.3.1, 7.3.2.

Успех лиофилизации во многом зависит от качества используемых клеток, от того, насколько они жизнеспособны и в каких условиях они выросли. Как видно из рис. 4.3.1. количество клеток после сушки уменьшилось на порядок по сравнению с замороженным концентратом и составило  $2 \cdot 10^{10}$  КОЕ/см<sup>3</sup>, что говорит о высокой выживаемости клеток.

Активизацию на молоке проводили методом прямого внесения, рис. 7.3.2., продолжительность ферментации увеличилась по сравнению с замороженным концентратом всего на (10 – 15)%, и составила (11–12) ч.





Рис. 7.3.1 – Изменение количества клеток при лиофилизации

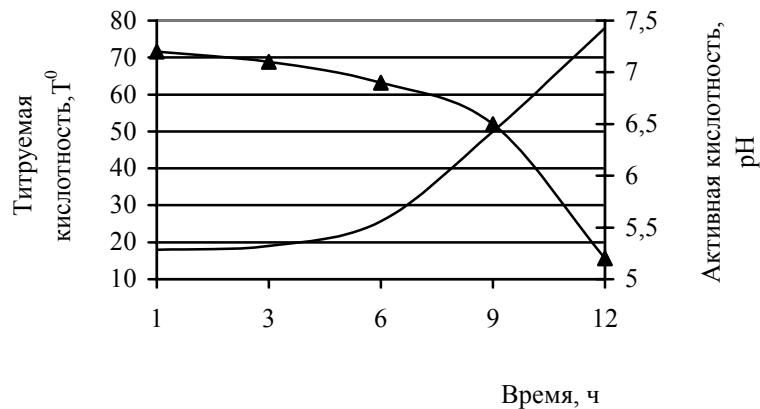


Рис. 7.3.2 – Исследование биохимической активности сухого концентрата пропионовокислых бактерий

Количество клеток в кисломолочном продукте  $3 \cdot 10^9$  в  $1 \text{ см}^3$ , титруемая кислотность равна  $(75 \pm 5)^\circ\text{T}$ . Пропионовая, уксусная кислоты и углекислый газ, образованные в результате пропионовокислого брожения, обуславливают приятный кисломолочный вкус и небольшое газообразование сгустка.

Полученные результаты указывают, что сухой препарат пропионовокислых бактерий обладает высокой биохимической активностью и способен сквашивать молоко путем прямого внесения. Применение сухого концентрата для получения кисломолочных продуктов позволит исключить многочисленные пересадки, повысить производительность труда и улучшить санитарно-гигиенические показатели готового продукта.

В дальнейших экспериментах изучалась морфология клеток пропионовокислых бактерий до и после сушки. Морфология клеток зависит от многих факторов: условий культивирования, возраста культуры, состава среды. При культивировании на среде ГМС и ГМК-1 бактерии имеют вид палочек и коротких палочек, почти кокковидных клеток, отдельных или собранных в короткие цепочки.

После реактивации сухие культуры пропионовокислых бактерий не давали каких-либо отклонений по морфологическим свойствам по сравнению с исходными культурами. Так, форма, величина и расположение клеток, а также величина колоний при их восстановлении в молоке и посеве на среду ГМС и ГМК-1 оставались неизменными. Этот факт свидетельствует о соблюдении необходимых условий культивирования, подборе эффективной защитной среды и щадящих режимов консервирования.

#### 7.4. Изучение стойкости сухого концентрата пропионовокислых бактерий при хранении

Повреждение клеток и инактивация части членов микробной популяции происходят не только во время обезвоживания, но и при хранении сухих препаратов.

На выживаемость клеток в сухих препаратах во время хранения основное влияние оказывают химический состав биомассы, остаточная влажность препарата, состав и свойства защитной среды, температура окружающей среды. Поэтому в дальнейших исследованиях оценку качества сухого препарата в процессе хранения проводили по следующим показателям: количеству клеток, влажности, биохимической активности, растворимости.

Хранение бакконцентрата осуществляли в течение 12 месяцев, при температуре – 18°C.

Высококачественная закваска должна не только обладать производственно-ценными свойствами, но и сохранять их в течение продолжительного срока их действия.

Результаты наблюдений за изменением биохимической активности представлены в таблице 7.4.1. Представленные данные свидетельствуют, что продолжительность ферментации молока почти не меняется в течение всего срока хранения.

Удаление воды из живой системы вызывает переход белков протоплазмы из гидрозоля в гидрогель, что приводит к угнетению жизненных функций организма, степень которого определяется остаточной влажностью.

Вода в живых клетках составляет (80-90)% от массы. Во время высушивания клетки теряют свободную воду и рост микроорганизмов прекращается при остаточной влажности, равной (10-12)%. При снижении остаточной влажности до (2-5)% сохраняется прочно связанная с клеточными структурами вода, которая строго локализована. В высу-

шенных таким образом клетках биохимические реакции приостанавливаются или отдельные реакции протекают очень медленно.

Таблица 7.4.1 – Изменение биохимической активности сухого концентрата пропионовокислых бактерий в процессе хранения

Продолжительность хранения, мес.	Активность, ч	Кислотность	
		титруемая, °Т	активная, рН
0	12	80±2	4,58±0,01
3	12	80±2	4,58±0,01
6	12	80±5	4,56±0,01
9	12	80±5	4,56±0,01
12	12	80±5	4,55±0,01

Количество воды, оставшейся после высушивания, влияет не только на жизнеспособность клеток непосредственно после лиофилизации, но также на скорость их отмирания во время хранения. Поэтому, изучали изменение выживаемости бактерий в зависимости от остаточной влажности сухого концентрата во время хранения (рис. 7.4.1).

Из рис. 7.4.1. видно, что в процессе хранения массовая доля влаги в сухом препарате увеличилась на 0,3% и составило 3,6%. Вероятно, это связано с герметичностью упаковки и низкой температурой хранения. Выживаемость клеток по истечении 12 месяцев хранения составила 40%.

Показатель выживаемости коррелирует со значениями массовой доли влаги сухого концентрата, коэффициент корреляции составляет 0,98.

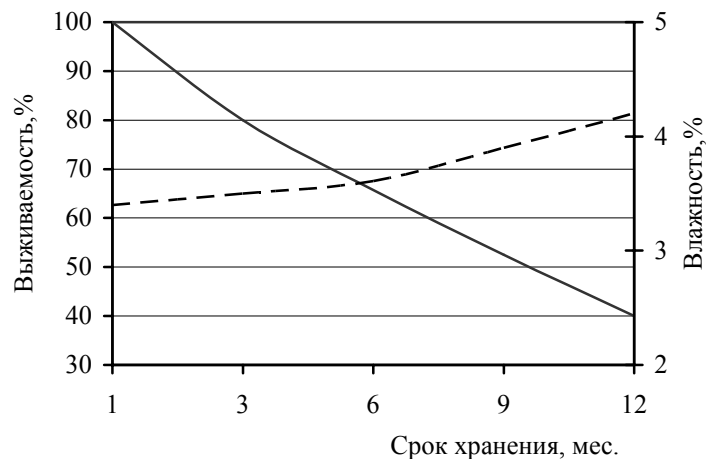


Рис. 7.4.1 – Зависимость выживаемости клеток от остаточной влажности в процессе хранения

Функциональная зависимость рассматриваемых величин имеет следующее математическое выражение:

$$y = 1,4679x^2 - 23,366x + 121,72,$$

где  $y$  – выживаемость клеток в процессе хранения,  
 $x$  – влажность препарата.

Абсолютное значение жизнеспособных клеток осталось на достаточно высоком уровне  $4 \cdot 10^{10}$  в  $1 \text{ см}^3$  – через 6 мес. и  $2 \cdot 10^{10}$  в  $1 \text{ см}^3$  – через 12 месяцев.

Другим показателем качества сухого концентрата является его растворимость, которая находится в обратно пропорциональной зависимости от влажности препарата.

В связи с этим оценку качества концентрата в процессе хранения проводили по показателям массовой доли влаги и растворимости. Результаты отражены на рис.7.4.2.

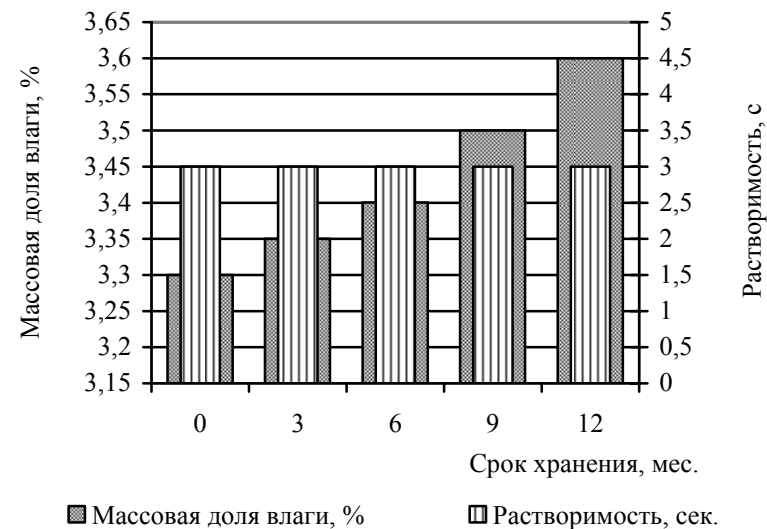


Рис. 7.4.2 –Изменение физико-химических показателей сухого концентрата при хранении

Из рисунка видно, что массовая доля влаги в процессе хранения изменяется незначительно. Так, по истечении 6 месяцев массовая доля влаги увеличилась на 0,1%, а еще через 6 месяцев на 0,3%. Незначительное увеличение влажности не повлияло на растворимость сухого препарата, и оно осталось на прежнем уровне.

Анализ полученных данных показал, что сухой бактериальный концентрат пропионовокислых бактерий при хранении в течение года сохранил основные физико-химические показатели. И несмотря на незначительную гибель клеток, количество жизнеспособных бактерий все же остается на высоком уровне.

### 7.5. Изучение биохимической активности замороженного и сухого концентратов пропионовокислых бактерий

Темп кислотообразования и продолжительность ферментации молока являются качественными показателями и зависят от биохимической активности бактериального концентрата.

В связи с этим в следующей серии опытов, изучалась динамика кислотообразования и развития пропионовокислых бактерий. Процесс ферментации молока проводили при температуре  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  и  $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Результаты отражены на рис.7.5.1. и 7.5.2.

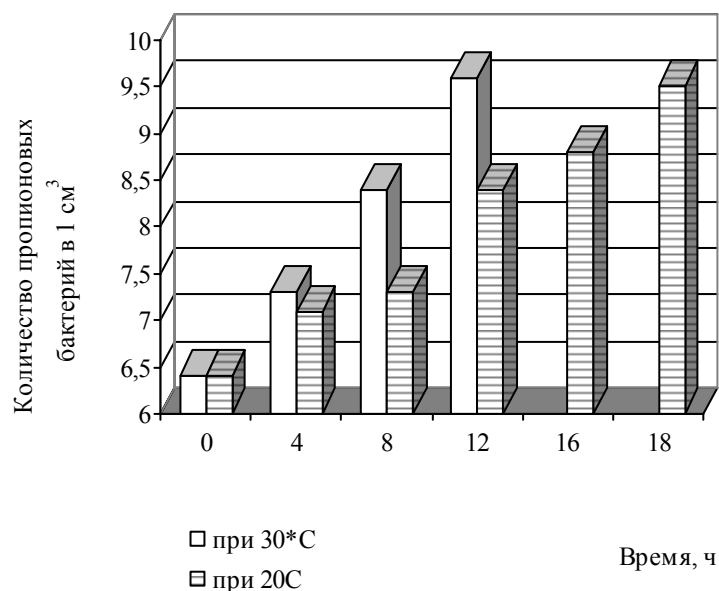


Рис. 7.5.1 – Исследование биохимической активности концентрата пропионовокислых бактерий

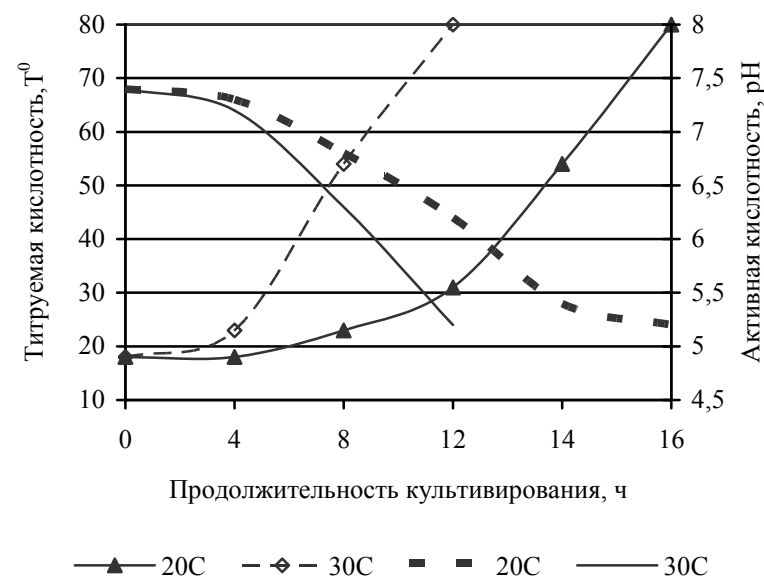


Рис. 7.5.2 – Динамика роста пропионовых бактерий в процессе сквашивания молока

Анализ полученных данных показал, что при температуре  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  продолжительность сквашивания составила (10–12)ч. При понижении температуры ферментации молока до  $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$  отмечаются снижение биохимической активности пропионовокислых бактерий и увеличение продолжительности сквашивания до (14–16) ч. Однако количество клеток к концу ферментации в обоих случаях достигло примерно  $(5-7) \cdot 10^9$  в 1 см<sup>3</sup>.

Также определяли структурно-механические и синергические свойства сгустков, полученных при температуре  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  и  $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Результаты отражены в табл. 7.5.1.

Таблица 7.5.1 – Влияние температуры сквашивания на структурно-механические и синергетические свойства сгустка

Температура сквашивания, °С	Вязкость сгустка, с	Количество выделившейся сыворотки, мл, за период, мин	
		15	30
22±2	9	7	10
30±1	6	11	15

Как видно из табл. 7.5.1, кисломолочный сгусток, полученный при температуре (22±1)°С обладает более высокими структурно-механическими свойствами и влагоудерживающей способностью, чем при температуре (30±1)°С.

Анализ полученных данных доказывает, что концентрат пропионовокислых бактерий позволяет получить кисломолочный продукт с достаточно плотным сгустком, хорошими органолептическими показателями и высоким титром жизнеспособных клеток.

### ГЛАВА VIII. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЗАМОРОЖЕННОГО И СУХОГО КОНЦЕНТРАТОВ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Полученные экспериментальные данные позволили разработать технологию производства бакконцентрата пропионовокислых бактерий.

8.1. Схема технологического процесса отражена на рис.

Осветление сыворотки (T=92-95°С, 5 мин)

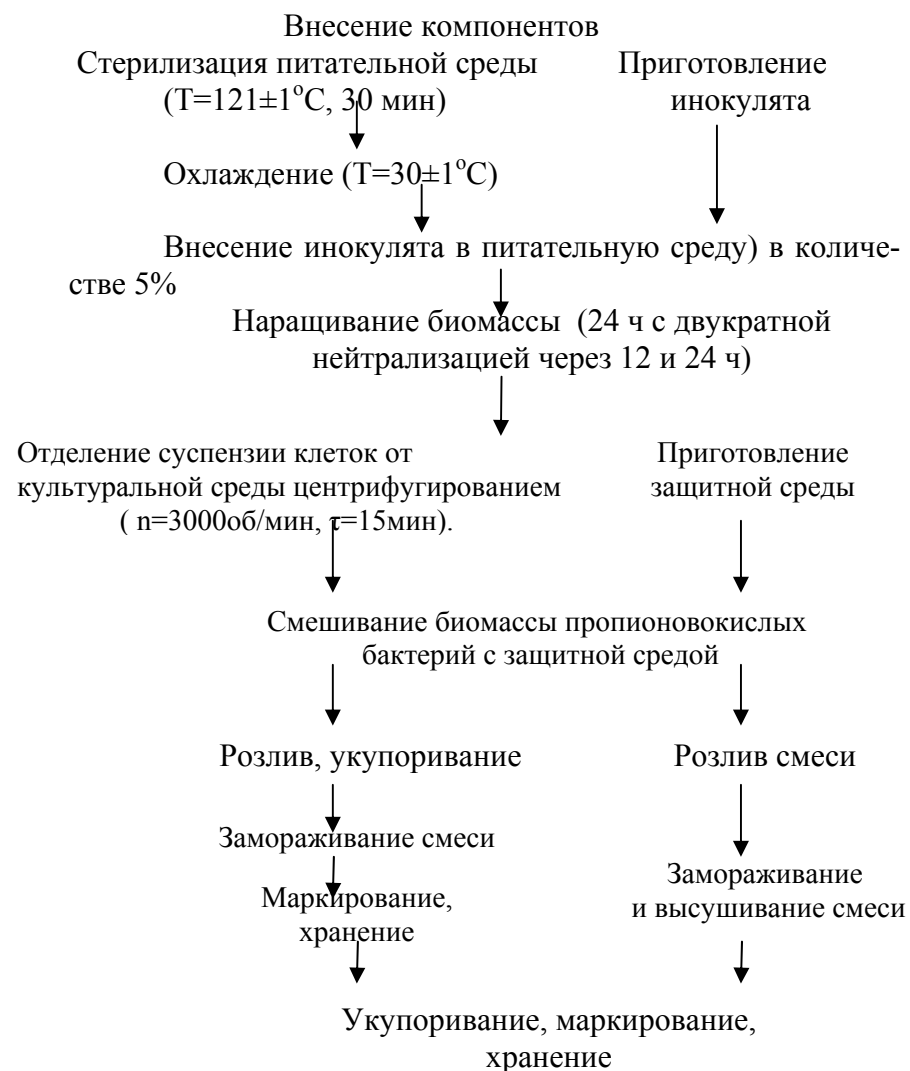


Рис. 8.1 – Схема технологического процесса производства замороженного и сухого концентратов

Технологический процесс производства концентрата состоит из следующих стадий:

- подготовка питательной среды;
- внесение инокулята и наращивание биомассы пропионовокислых бактерий;
- получение суспензии клеток центрифугированием,
- подготовка защитной среды;
- смешивание защитной среды с бактериальной массой пропионовокислых бактерий;
- замораживание;
- сушка, хранение.

Подготовка питательной среды.

Средой для наращивания пропионовокислых бактерий служит осветленная творожная сыворотка с добавлением буферных солей, аскорбиновой кислоты и агара. Осветление творожной сыворотки проводят путем нагревания до температуры  $(94\pm 1)^\circ\text{C}$  и выдерживают ее для более полного выделения белков в течение 60 мин. После этого сыворотку осветляют путем фильтрования или центрифугирования.

В осветленную сыворотку, согласно рецептуре, добавляют компоненты среды, устанавливают реакцию pH среды в пределах  $(7,0\pm 0,1)$ . Готовую среду стерилизуют при температуре  $(121\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, затем охлаждают до температуры  $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ .

Внесение инокулята и наращивание клеток.

Инокулят готовят из сухой активизированной закваски пропионовокислых бактерий ГУ 9229-002-02069473-99

Для получения бактериальной суспензии клеток, стерилизацию и охлаждение среды, наращивание клеток пропионовокислых бактерий осуществляют в ферментере или в колбах из термостойкого стекла.

В подготовленную питательную среду вносят ино-

кулят пропионовокислых бактерий в количестве 5% от массы среды. Среду с закваской тщательно перемешивают.

Наращивание клеток пропионовокислых бактерий проводят при температуре  $(30\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24\pm 2)$  ч в условиях периодического культивирования при двукратной нейтрализации культуральной жидкости через 12 и 24 ч, поддерживая pH на оптимальном уровне, насыщенном стерильным раствором углекислого натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

Получение бактериальной суспензии клеток.

После того, как получили биомассу пропионовокислых бактерий, проводят ее охлаждение до температуры  $20^\circ\text{C}$  и отделяют клетки от культуральной жидкости центрифугированием. Режим центрифугирования:  $n=3000$  об/мин,  $\tau=15$  мин.

Выход бактериальной массы –  $(1,5-2)\%$ . Полученную суспензию клеток смешивают с защитной средой в соотношении 1:1, разливают во флаконы по 2 мл (1 доза) и замораживают в морозильной камере при температуре  $-18^\circ\text{C}$ .

Высушивание замороженной суспензии клеток проводят на сублимационной установке при начальной температуре сушки –  $18^\circ\text{C}$ , температура досушивания  $(38\pm 2)^\circ\text{C}$ . В процессе сушки остаточное давление в системе поддерживают на уровне 0,13-1,3 Па.

Конец высушивания контролируют по остаточной влажности концентрата  $(1-5)\%$ . Продолжительность процесса составляет  $(22\pm 2)$  ч.

Флаконы с замороженным и сухим концентратами пропионовокислых бактерий закрывают резиновыми пробками и металлическими колпачками.

Хранение замороженного и сухого концентрата пропионовокислых бактерий осуществляют в морозильной камере при температуре  $-18^\circ\text{C}$ .

Качественная характеристика концентрата представлена в табл. 8.1.

Таблица 8.1 – Качественная характеристика концентрата пропионовокислых бактерий

Наименование показателя	Показатель	
	замороженный	сухой
1	2	3
Консистенция и внешний вид	Столбик замороженной суспензии	Пористая таблетка
Цвет	От белого до светло-желтого	Белый или кремовый
Активность сквашивания, ч	10-12	12-13
Предельные значения рН	5±0,5	5±0,5
Температура при выпуске с предприятия, °С, не более	-12±2	4±2
Массовая доля влаги, %, не более	-	5
Кол-во пропионовокислых бактерий на конец срока годности в 1 см <sup>3</sup> , не менее	1·10 <sup>10</sup>	1·10 <sup>10</sup>
Объем продукта (см <sup>3</sup> ), в котором не допускаются:		
БГКП (колиформы)	2	2
<i>S. aureus</i>	2	2
Патогенные микроорганизмы (в том числе сальмонеллы)	10	10

Продолжение табл. 8.1.

1	2	3
Дрожжи в 1 см <sup>3</sup> , не более	5	10
Плесени в 1 см <sup>3</sup> , не более	5	5
Микроскопический препарат на среде ГМК, ГМС	Палочковидные и кокковидные клетки, расположенные попарно или собранные в короткие цепочки	Палочковидные и кокковидные клетки, расположенные попарно или собранные в короткие цепочки

Данные, представленные в табл. 8.1, доказывают, что замороженный и сухой бактериальные концентраты обладают высокими биохимическими свойствами, содержат достаточное количество живых клеток и могут быть рекомендованы для применения не только при производстве кисломолочных напитков, но и в других отраслях пищевой промышленности.

#### ГЛАВА IX. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНЦЕНТРАТА ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

В производственных условиях бактериальный концентрат пропионовокислых бактерий рекомендуется использовать методом прямого внесения. Шесть доз концентрата рассчитаны для ферментации 1 т молока. С применением концентрата пропионовокислых бактерий разработана технология кисломолочного продукта «Целебный»

ТУ 9229-008-02069473-2004.

Технологический процесс производства  
кисломолочного напитка «Целебный»

Напиток кисломолочный «Целебный» вырабатывают  
резервуарным способом.

Резервуарный способ производства

9.1. Технологический процесс производства напитка  
осуществляют в следующей последовательности:

- приемка и подготовка сырья, нормализация;
- гомогенизация, пастеризация и охлаждение смеси;
- заквашивание и сквашивание;
- охлаждение и перемешивание сгустка;
- розлив, упаковка, маркировка и доохлаждение го-  
тового продукта.

Приемка и подготовка сырья, нормализация

9.2. Молоко принимают по количеству и качеству ус-  
тановленным ОТК (лабораторией) предприятия.

9.3. Отобранное по качеству молоко очищают на се-  
параторах-молокоочистителях и затем немедленно охлаж-  
дают до температуры  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ .

9.4. После очистки и охлаждения молоко нормали-  
зуют по массовой доли жира в соответствии с рецептурой.  
При этом нормализацию осуществляют с таким расчетом,  
чтобы массовая доля жира в нормализованной смеси была  
на 0,05% выше массовой доли жира в продукте.

9.5. Сухое цельное или обезжиренное молоко восста-  
навливают в соответствии с действующей документацией.

Гомогенизация, пастеризация и охлаждение смеси.

9.6. Нормализованное молоко, предварительно на-  
гретое до температуры  $(65-70)^\circ\text{C}$ , гомогенизируют при дав-  
лении 15-20 МПа /150-200 кг/см<sup>3</sup>. При производственной  
необходимости допускаются гомогенизировать смесь при  
температуре пастеризации. В случае производства продукта  
2,5% жирности и нежирного процесс гомогенизации допус-  
кается исключить.

9.7. После гомогенизации молоко направляют на  
пастеризацию при температуре  $(93\pm 2)^\circ\text{C}$  с выдержкой (15-  
20) с.

9.8. После тепловой обработки молоко охлаждают до  
температуры заквашивания  $(30\pm 1)^\circ\text{C}$ .

Заквашивание и сквашивание

9.9. Заквашивают и сквашивают смесь в резервуарах  
для кисломолочных продуктов с охлаждаемой рубашкой,  
снабженных специальными мешалками, которые обеспечи-  
вают равномерное и тщательное перемешивание смеси с  
закваской и молочным сгустком. При небольших объемах  
производства пастеризацию, охлаждение, заквашивание и  
сквашивание смеси можно производить в ваннах ВДП или  
других двустенных емкостях с мешалками.

9.10. Во избежание вспенивания влияющего на отде-  
ление сыворотки, при хранении напитка смесь в резервуар  
подают через нижний штуцер.

9.11. В охлажденное молоко при включенной мешал-  
ке вносят закваску на чистых культурах пропионовокислых  
бактерий в количестве 5% от объема заквашенной смеси.

Заквашенную смесь перемешивают в течение 10 мин.

9.12. После перемешивания смесь оставляют в покое  
для сквашивания при температуре  $(30\pm 1)^\circ\text{C}$  на (8-10) ч или



при температуре  $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$  на (10-12)ч до образования сгустка кислотностью  $(70-90)^{\circ}\text{T}$ . При использовании закваски прямого внесения продолжительность сквашивания не более (12-14) ч.

#### Охлаждение и перемешивание сгустка

1913. По окончании сквашивания в межстенное пространство подают ледяную воду в течение  $(45\pm 15)$  мин. Затем сгусток перемешивают от 15 до 40 мин. Продолжительность перемешивания зависит от конструкции мешалки и консистенции сгустка.

9.14. Перемешанный сгусток при помощи насоса, предназначенного для перекачки вязких жидкостей, подают на пластинчатый охладитель, охлаждают до температуры не более  $6^{\circ}\text{C}$  и направляют в промежуточную емкость, а затем на розлив. При отсутствии охладителей продукт можно охладить в резервуаре до температуры не более  $20^{\circ}\text{C}$ , подавая в межстенное пространство ледяную воду с температурой  $(1-2)^{\circ}\text{C}$ .

При наличии достаточных площадей холодильных камер, способных обеспечить охлаждение упакованного продукта, допускается направлять напиток кисломолочный «Целебный» на розлив непосредственно после частичного охлаждения сквашенного продукта ледяной водой до  $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$  и тщательного перемешивания.

#### Розлив, упаковка, маркировка и доохлаждение готового продукта

9.15. Перед началом розлива продукт перемешивают в течение (3-5) мин, разливают в тару. Тара и упаковочные материалы, применяемые для розлива и упаковки продукта,

должны соответствовать требованиям действующих стандартов или технических условий.

9.16. Упаковку и маркировку продукта производят в соответствии с требованиями действующих технических условий на напиток кисломолочный «Целебный».

9.17. При необходимости упакованный продукт в корзинах или полиэтиленовых ящиках направляют в холодильную камеру для доохлаждения его до температуры не более  $6^{\circ}\text{C}$ , после чего технологический процесс считается законченным и продукт готов к реализации.

Нами были изучены качественные показатели кисломолочного продукта «Целебный». Результаты представлены в табл. 9.1.

Таблица 9.1 – Качественная характеристика кисломолочного продукта

Наименование показателя	Характеристика
1	2
Органолептические: внешний вид и консистенция вкус и запах	Однородная, нежная  Чистый, с приятным кисломолочным привкусом, специфическим для данного продукта, без посторонних запахов и привкусов
цвет	Молочно-белый или кремовый

Продолжение табл. 9.1.

1	2
Микробиологические: количество пропионово- кислых бактерий на конец срока годности в 1 см <sup>3</sup> , не менее	1·10 <sup>7</sup>
Объем продукта, в котором не допускаются:	
БГКП (колиформы)	0,1
<i>S. aureus</i>	1,0
Патогенные микроorganiz- мы (в т.ч. сальмонеллы)	25
Дрожжи в 1 см <sup>3</sup> , не более	50
Плесени в 1 см <sup>3</sup> , не более	50

Как видно из табл. 9.1 кисломолочный напиток «Целебный» характеризуется хорошими органолептическими, физико-химическими и санитарно-гигиеническими показателями. Напиток имеет приятный специфический кисломолочный вкус, свойственный данному продукту, содержит высокое количество пропионовокислых бактерий 10<sup>9</sup> в 1 см<sup>3</sup>. Разработана нормативно-техническая документация на кисломолочный продукт «Целебный» с применением концентрата пропионовокислых бактерий.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сказать, что преимуществами применения бактериального концентрата пропионовокислых бактерий являются исключение необходимости пересадок для увеличения объема закваски, экономия расходных материалов и улучшение санитарно-гигиенического состояния производства.

## ГЛАВА X. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 10.1. Постановка эксперимента

Экспериментальная часть исследований проводилась в лабораториях кафедры «Технология молочных продуктов. Товароведение и экспертиза товаров» Восточно-Сибирского государственного технологического университета.

Объектом исследований служили активизированные культуры *Propionibacterium shermanii* штамм МГУ.

При приготовлении питательной среды использовали творожную сыворотку. Сыворотку предварительно осветляли нагреванием при температуре (92-95)°С с последующим раскислением и фильтрованием. В осветленную сыворотку вносили следующие компоненты: для стабилизации действия фермента- хлористый магний, для поддержания буферной емкости среды –натрий лимоннокислый, калий фосфорнокислый, в качестве редуцирующего вещества- аскорбиновую кислоту, агар- для создания условий близких к анаэробным. После растворения компонентов устанавливали рН 6,8-7,0 и стерилизовали при температуре 112°С в течение 30 мин.

В качестве инокулята использовали сухую активизированную закваску пропионовокислых бактерий ТУ 9229-002-02069473-99

### 10.2. Методы исследований

#### *Физико-химические методы исследований:*

– титруемую кислотность определяли по ГОСТ 3624-92 титрованием 0,1н раствором едкого натра с фенолфталеином и выражали в градусах Тернера;

– оптическую плотность определяли фотоколориметрическим методом на КФ -77 при  $\lambda=550$  нм;

– массовую долю влаги определяли по ГОСТ 3627-73;

– растворимость концентрата, лиофилизированного во флаконах, определяли добавлением 0,9% раствора хлорида натрия из расчета 1 мл на 1 дозу. После перемешивания в течение 1 мин препарат должен образовывать однородную взвесь;

– определение рН проводили потенциометрическим методом по ГОСТ 3624-87;

– определение количества витамина В<sub>12</sub> осуществляли спектрофотометрическим методом.

Настоящий метод определения кобаламинов заключается в отделении и промывке клеток пропионовокислых бактерий, переводе кобаламинов в водный раствор путем гидролиза, воздействию светом на полученный гидролизат для перевода кобаламинов в оксикобаламин и определении оптической плотности при длине волны 530 нм. Оптическая плотность раствора пропорциональна содержанию кобаламина.

Культуральную жидкость вместе с клетками тщательно перемешивают и для анализа берут 100-150 мл, центрифугируют при 6000 g 20 мин. Супернатант отбрасывают, промывают 3-4 объемами дистиллированной воды, отделяя промывные воды центрифугированием. Промытую биомассу взвешивают и переносят в колбу Эрленмейера с 30-кратным количеством кислой воды, для приготовления которой дистиллированную воду подкисляют 0,1н раствором соляной кислоты до рН 4,6-5,0. Проводят гидролиз полученной суспензии на кипящей водяной бане в течение 40 мин. После охлаждения гидролизат центрифугируют, определяют рН и объем гидролизата. Гидролизат должен иметь рН 4,6-5,0, в случае подщелачивания его подкисляют 0,1н

раствором соляной кислоты. После этого гидролизат помещают под лампу (60 Вт) в течение 30 мин (в случае выпадения осадка гидролизат фильтруют через бумажный фильтр). Оптическую плотность раствора определяют на спектрофотометре при длине волны 530 нм относительно плотности контроля, которым служит дистиллированная вода. Содержание кобаламинов (мкг/мл) в культуральной жидкости рассчитываем по формуле:

$$C=D_{530} \cdot 10^4 \cdot V_1 / 56 \cdot V_2, \quad (1)$$

где С – содержание кобаламинов, мкг/мл;

$D_{530}$  – оптическая плотность фильтрата, замеренная при  $\lambda=530$  нм;

$V_1$  – объем гидролизата, мл;

56 – предельный показатель (коэффициент экстинкции), для оксикобаламина при  $\lambda=530$  нм;

$V_2$  – количество культуральной жидкости, взятой на анализ, мл.

– определение массы биомассы взвешиванием. Определение биомассы состоит из трех операций; доведение массы центрифужных пробирок или фильтров до постоянного значения, отделения клеток микроорганизмов от культуральной жидкости, определения их массы.

Сухую биомассу определяют по формуле:

$$A=(A-B) \cdot 1000 / V, \quad (2)$$

где М – сухая биомасса, г/л;

А – масса центрифужной пробирки с осадком, г;

В – масса центрифужной пробирки без осадка, г;

В – объем культуральной жидкости, взятой для центрифугирования, г.

Точность метода определяется полнотой отмывания клеток от компонентов среды и тщательностью взвешивания.

### **Микробиологические методы исследований:**

– определение количества клеток пропионовокислых бактерий проводили методом предельных разведений на среде ГМС или ГМК по ТУ 10-02-02-789-192-95;

– морфологию пропионовокислых бактерий изучали путем приготовления препаратов, окрашенных метиленовым синим с последующим микроскопированием в иммерсионной системе с объективом 90 нанесенной каплей кедрового масла;

– бродильный титр бактерий групп кишечных палочек определяли по ГОСТ 9225-84;

– контаминацию посторонними бактериями определяли по ГОСТ 9225-84.

Для определения отбирали по 4 образца, при величине серий до 3000 флаконов. Содержимое флакона с сухим препаратом разводили, добавляя 5 см<sup>3</sup> 0,9%-ного раствора хлорида натрия пипеткой 7-2-5 -по ГОСТ 202 94-74.

Из флаконов препарат пипетками Пастера в количестве (0,5-1,0)см<sup>3</sup> засекали на скошенные МПА, питательный агар с глюкозой и жидкую среду Сабуро в пробирках. Материал на МПА и питательный агар с глюкозой распределяли по всей поверхности, покачивая пробирку, а в среде Сабуро перемешивали путем 5-6 - кратного всасывания, выдувания (прокачка). Посевы на МПА и питательном агаре с глюкозой выдерживали при температуре (37±1)°С, а на среде Сабуро – при температуре (22±2)°С. После инкубации посевов в течение восьми суток на питательных средах не должно быть роста микрофлоры.

Для определения антимутагенной активности применяли тест Эймса, а в качестве индикатора мутагенности – тест-штамм *Salmonella typhimurium* TA 100. Штамм несет мутацию ауксотрофности по гистидину и ревертирует к прототрофности под действием мутагенов, вызывающих мутации типа замены пар оснований. Принцип метода со-

стоит в том, что под действием мутагена на селективной среде вырастают ревертанты по гистидину, по числу которых определяют мутагенный эффект. Соответственно антимутагены снижают число индуцированных ревертантов.

Порядок проведения эксперимента состоял в следующем: в 2 мл верхнего агара, содержащего 0,5 мМ гистидин/биотин, добавляли 0,1 мл свежей культуры *S. typhimurium*, 0,1 мл испытуемого мутагена и 0,1 мл испытуемого в качестве антимутагена образца. Смесь быстро перемешивали и выливали на поверхность минимальной агаризованной среды (нижнего агара) в чашки Петри. Путем интенсивного перемешивания достигали равномерного распределения верхнего агара по поверхности нижнего. Чашки инкубировали в течение 48 ч при 37°. Одновременно ставили позитивный контроль, когда в смеси присутствовал мутаген, но не было антимутагена. и отрицательный контроль, когда в смеси не было мутагена, но присутствовал потенциальный антимутаген. Общий объем смеси доводили до 0,4 мл с помощью 0,2 М фосфатного буфера рН 7,4.

После инкубирования культуры подсчитывали число ревертантов в чашках. Эксперименты ставили в трех повторностях и проводили статистическую обработку данных.

Ингибиторный эффект (АМ-активность) рассчитывали по формуле:

$$\text{Ингибирование (\%)} = \frac{(a - b) * 100}{a - c}, \quad (3)$$

где  $a$  – число гистидиновых ревертантов, индуцированных под действием мутагена;  $b$  – число гистидиновых ревертантов, индуцированных под действием мутагена в присутствии АМ, и  $c$  – число ревертантов, вырастающих в присутствии только АМ.

Показатели безопасности продуктов определяли в соответствии с медико-биологическими требованиями, утвержденными комитетом Госсанэпиднадзора РФ.

**Реологические методы исследований:**

– относительную вязкость кисломолочного продукта определяли по скорости истечения жидкости из пипетки.

– степень синерезиса – по количеству выделившейся сыворотки, полученной после фильтрации 100 мл разрушенного сгустка.

**Статистическая обработка результатов**

Для объективной оценки полученных экспериментальных данных проводили их математическую обработку по результатам 3 – 4 повторностей. Исследуемые показатели подвергали обработке методами математической статистики и корреляционного анализа с применением ЭВМ, используя пакет стандартных программ.

Статическая обработка данных заключалась в следующей поэтапной обработке результатов исследований:

1. Среднюю арифметическую (M) определяли по формуле:

$$\bar{M} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}, \quad (4)$$

где X– значение единичного измерения величины;

n- число повторностей измерений величины.

2. Среднеквадратичное отклонение (δ) определяли по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{M})^2}{n}}. \quad (5)$$

3. Ошибку средней арифметической определяли по формуле:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n - 1}}. \quad (6)$$

4. Достоверность средней арифметической определяли по критерию достоверности (t) согласно формуле:

$$t = \frac{\bar{M}}{m}. \quad (7)$$

5. Доверительную ошибку (E) определяли по формуле:

$$\varepsilon = t(\alpha; f) \cdot m, \quad (8)$$

где t(α;f) – критерий Стьюдента.

Для обработки аналитических данных эксперимента была выбрана доверительная вероятность α=0,95 при уровне значимости p=0,05.

6. Коэффициент корреляции значений M<sub>x</sub> и M<sub>y</sub> определяли по формуле:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (X - M_x) \cdot (y - M_y)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X - M_x)^2 \cdot (y - M_y)^2}}, \quad (9)$$

где M<sub>x</sub> – средняя арифметическая одного признака;

M<sub>y</sub> – средняя арифметическая другого зависимого признака.

7. Достоверность коэффициента корреляции определяли по формуле:

$$m_R = \frac{1 - R^2}{\sqrt{n}} \quad (10)$$

8. Для установления тесноты связи между изучаемыми величинами определяли корреляционное отношение  $\eta$  по формуле:

$$\eta = \frac{(y - \bar{y})^2 - (y - y_x)^2}{(y - \bar{y})^2}, \quad (11)$$

где  $(y - \bar{y})^2$  – сумма квадратов отклонений индивидуальных значений  $y$  от средней арифметической  $\bar{y}$ ;

$(y - y_x)^2$  – сумма квадратов отклонений варианта от средних  $y_x$ , соответствующих определенным фиксированным значениям независимой переменной  $X$ .

## ВЫВОДЫ

1. Разработан эффективный биотехнологический способ культивирования пропионовокислых бактерий в молоке.

2. Установлено, что активизированные культуры пропионовокислых бактерий обладают высокой биохимической активностью и ферментируют молоко без добавления стимуляторов роста. Обнаружено, что активизация роста пропионовокислых бактерий связана с повышением собственной  $\beta$ -галактозидазной активности.

3. Выбраны оптимальные технологические параметры производства кисломолочного продукта с использованием жидкой закваски пропионовокислых бактерий.

4. Обнаружено, что в процессе ферментации молока пропионовокислые бактерии синтезируют большое количество витамина  $B_{12}$ .

5. Установлено, что активизированные культуры пропионовокислых бактерий в процессе сушки-регидратации не утрачивают активности ферментации молока.

6. Разработана технология производства лиофилизированной закваски пропионовокислых бактерий, обладающая высокой активностью сквашивания молока.

7. Разработана схема приготовления и использования сухой закваски пропионовокислых бактерий в условиях производства.

8. В результате проведенных исследований подобрана питательная среда для культивирования пропионовокислых бактерий, позволяющая получить биомассу с высоким титром жизнеспособных клеток,  $1 \cdot 10^{12}$  в  $1 \text{ см}^3$ .

9. Подобрана оптимальная доза ионов кобальта для получения жидкого концентрата пропионовокислых бактерий с высоким количеством витамина  $B_{12}$  40,67 мкг/мл.

10. При изучении антимуtagenеза пропионовокислых бактерий установлено, что они способны синтезировать вещества с высокой ингибирующей активностью, обуславливающие защиту от внешних и эндогенных мутагенов.

11. Разработана технология производства жидкого концентрата пропионовокислых бактерий. Данный концентрат рекомендован для непосредственного употребления в качестве биологически активной добавки к пище для профилактики желудочно-кишечных заболеваний и В<sub>12</sub>-дефицитных состояний.

12. Доказано, что пропионовокислые бактерии обладают устойчивостью к криоанабиозу и лиофилизации, сохраняют высокое количество клеток  $1 \cdot 10^{11}$  в  $1 \text{ см}^3$ ,  $1 \cdot 10^{11}$  в  $1 \text{ см}^3$  соответственно.

13. Разработаны оптимальные технологические параметры производства кисломолочного продукта «Целебный» с использованием концентрата пропионовокислых бактерий.

14. Отмечено, что применение концентрата на предприятиях молочной промышленности позволяет интенсифицировать производственный процесс и повысить санитарно-гигиенические показатели готового продукта.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Авторские заявки №4109403/28-13; №4109407/28-13 СССР. Способ производства закваски для производства кисломолочных продуктов / Хамагаева И.С., Булгатова Г.А., Семенова Л.П., Ладодо К.С., Гончарова Г.И., Ляннол А.И. – Заяв.05. 06. 1986; пол.реш. от 30. 06. 1987. с грифом «П».

2. Авторская заявка 2035155 RU, МКИ А23С9/12. Способ получения кисломолочного продукта «Эвита» / Грудзинская Э.Е., Максимова А.К., Рожков А.В. (RU). – №5063111/13; Заяв. 25. 09. 1992; опубл.20. 05. 1995, бюл. №14.

3. Авторская заявка 2077215 RU, МКИ А23С9/12. Способ производства сметаны / Грудзинская Э.Е., Максимова А.К., Ованова Г.Г., Рожков А.В. (RU). Заяв. 28. 06. 1994; опубл. 20. 04. 1997, бюл. №11.

4. Авторская заявка 1548884 SU, МКИ А23С1-23/00. Способ получения бактериальной закваски для кисломолочных продуктов / Янковский Д.С., Дымент Г.С. (SU). – №4313903/30-13; Заяв. 08. 10. 1987.; не опубликовано.

5. Авторская заявка 581923 СССР, МКИ А23С21/02. Способ получения кисломолочного напитка из сыворотки / Грудзинская Э.Е. (СССР). – №3516651/28-13; Заяв. 19. 11. 1982.

6. Авторская заявка 1495132 СССР, МКИ А23С9/12. Консорциум бактерий *P. shermanii*, *Str. actis. subsp. Diacetilactis*, *Acetobacter acetii*, используемый для приготовления кисломолочных продуктов / Грудзинская Э.Е., Семенихина В.Ф., Скобелева Н.В., Устинов М.Н.(СССР). – №4440565/13; Заяв. 30. 06. 1988.

7. Абиев С.К., Порошенко Г.Г. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластмогенных свойств химических соединений // Итоги науки и техники. Сер. Токсикология. – М., 1986. Т. 14.

8. Алексеева М.А. и др. Физиолого-биохимические особенности пропионовокислых кокков // Микробиология. – 1973. – Т.42. – №3. – С. 464 – 467.

9. Алексеева М.А. Изучение развития пропионовокислых бактерий в «Советском» сыре и их влияние на его качество: Автореферат. канд. дисс. – М., 1974.

10. Алексеева М.А. и др. Совершенствование критериев подбора пропионовокислых бактерий и способа их применения в сыроделии // Научно-технический прогресс – важнейший путь реализации продовольственной программы. – Барнаул, 1983. – С. 117 – 129.

11. Алексеева М.А., Климовский И.И., Анищенко И.П. Видовой состав пропионовокислых бактерий в «Советском» сыре // Молочная промышленность. – 1973. – №12. – С. 12 – 13.

12. Аркадьева З.А. // Биологические науки. – 1983. – Т.4. – С. 93 – 105.

13. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 255 с.

14. Баранова Н.А., Климантович Н.Н. Влияние аминокислот на рост *P.shermanii* и биосинтез витамина В<sub>12</sub> // Научные докл. Высшей школы. Биол. науки. – 1971. – №8. – С. 94 – 97.

15. Белоусова Н.Н. Применение пропионовокислых бактерий в производстве молочных продуктов: Обзор. – М.: ЦИНТИПищепром, 1961. – 106 с.

16. Биргер М.О, Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. – М.: Медицина, 1982. – 456 с.

17. Богданов В.М. Приготовление заквасок пропионовокислых бактерий // Молочная промышленность. – 1960. – №1. – С. 16 – 20.

18. Богданов В.М., Якушев В.В., Грудзинская Э.Е. Обогащение молочных продуктов витамином В<sub>12</sub>: Обзор. – М.: ЦИНТИПищепром, 1963. – 58 с.

19. Бонарцева Г.А. Аэробный метаболизм пропионовокислых бактерий: Автореф. канд. дис. – М., 1973.

20. Бонарцева Г.А. и др. Об аэробном метаболизме пропионовокислых бактерий // Микробиология. – 1973б. – Т.17. – №5. – С. 765 – 771.

21. Бонарцева Г.А., Крайнова О.А., Воробьева Л.И. О путях конечного окисления пропионовокислых бактерий // Микробиология. – 1973. – Т.42. – № 4. – С. 583 – 588.

22. Букин В.Ч., Арешкина Л.О., Куцева Л.Р. Химия и биохимия витамина В<sub>12</sub> // Успехи современной микробиологии. – 1955. – Вып. 3.

23. Быховский В.Я. Микробиологический синтез витамина В<sub>12</sub>. – М.: Пищевая промышленность, 1984. – 89 с.

24. Волкова Н.Г. Изучение физиолого-биохимических свойств *P.acnes* с целью получения сухого препарата для животноводства. Автореф: канд. дис. – М., 1980.

25. Воробьева Л.И. Пропионовокислые бактерии. – М.: МГУ. – 1995. – 288 с.

26. Воробьева Л.И., Баранова Н.А. Об изменчивости пропионовокислых бактерий // Микробиология. – 1969. – Т.38. – №1. – С.114–117.

27. Воробьева Л.И. и др. Пропионовокислые кокки и их систематическое положение // Микробиология. – 1983. – Т.52. – №3. – С.465 – 471.

28. Воробьева Л.И. Пропионовокислые бактерии и образование витамина В<sub>12</sub>. – М.: МГУ, 1976. – 105 с.

29. Воробьева Л.И. Сравнительное физиолого-биохимическое изучение *P.shermanii* и *Mycobacterium luteum* // Микробиология. – 1965. – Т.34. – №6. – С.531–537.

30. Воробьева Л.И. и др. Образование летучих жирных кислот иммобилизованными клетками пропионовокислых бактерий // Прикл.биохим.микробиол. – 1977. – Т.13. – №4. – С.531 – 537.

31. Воробьева Л.И. Наипольнейшие из анаэробов. Пропионовокислые бактерии для биотехнологии // Химия и жизнь. – 1984. – №5. – С.19 – 22.

32. Воробьева Л.И., Иордан Е.П. Функции кобамидных коферментов в метаболизме пропионовокислых бактерий // Витамины. – Киев, 1976. – С.16 – 20.

33. Воробьева Л.И., Чарахчян И.А. Потребление различных источников серы пропионовокислыми бактериями // Микробиология. – 1983. – Т.52. – №6. – С.875 – 879.

34. Воробьева Л.И. и др. Антимутагенность пропионовокислых бактерий // микробиология. – 1991. – Т.60. – №6. – С.83 – 89.



35. Воробьева Л.И. Брожение, вызываемое иммобилизованными клетками пропионовокислых бактерий // Иммобилизованные клетки микроорганизмов. – Пущино, 1978. – С.127 – 134.
36. Воробьева Л.И. Пропионовокислое брожение и образование витамина В<sub>12</sub>. – М.: МГУ. 1976. – 100 с.
37. Воробьева Л.И. и 160 диск пропионовокислых бактерий в кишечнике человека // Журн.микробиол.эпидемиол. иммун. – 1987.-№2. – С.7 – 11.
38. Воробьева Л.И. и др. Антимутагенное действие супероксиддисмутазы на индуцированный азидом натрия и нитрозогуанидином мутагенез у *Salmonella typhimurium* // Генетика. – 1993. – Т.29. – №5. – С.760 – 767.
39. Воробьева Л.И., Чердынцева Т.А., Воробьева Н.В. Антимутагенность пропионовокислых бактерий // Тез. докл. Всес. Коорд. совещания «Генетические последствия загрязнения окружающей среды мутагенными факторами. – Самарканд, 1990.
40. Вышемирский Ф.А. Витамины и их роль в повышении пищевой ценности молока и молочных продуктов. – М.: АгроНИИТЭИММП, 1987.
41. Гайтан В.И., Воробьева Л.И. пул АТФ в клетках *P.shermanii* в разных условиях культивирования // Микробиология. –1981. – Т.50. – №6. – С. 949 – 954.
42. Ганина В.И. Стабильные закваски – качественные и безопасные молочные продукты // Молочная промышленность. – 1999. – С. 25 – 26.
43. Ганичева Т.В., Воробьева Л.И. Индуцированный мутагенез пропионовокислых бактерий // Микробиология. – 1991. – Т.60. – №1. – С.101– 106.
44. ГОСТ 9225-84. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа. – Переизд. февраль 1986 с изм.1. – Взамен ГОСТ 9225-68; введ.01.01.86.- М.: Изд-во стандартов, 1986. –24 с.
45. Готтшалк К. Метаболизм бактерий: пер.с англ. / Под ред. Е.Н. Кондратьевой, пер. Г.П. Мирошниченко, Т.Ю. Переслени. – М.: Мир, 1982. – 309 с.
46. Граников Д.А. Советский сыр. – М.: Пищевая промышленность, 1978. – 134 с.

47. Грудзинская Э.Е. Новый кисломолочный продукт // Молочная и мясная пром-сть. – 1988. – №6. – С.27 – 28.
48. Грудзинская Э.Е., Семенихина В.Ф., Седунова Н.В., Дубинин А.В., Иванов А.Ф. Кисломолочный продукт «Тонус» для диетотерапии // Молочная и мясная пром-сть. – 1988. – №4. – С.43 – 47.
49. Грудзинская Э.Е. Обогащение молочных продуктов витамином В<sub>12</sub> // Молочная пром-сть. – 1965. – №6. – С. 16 – 20.
50. Грузина В.Д., Ерохина Л.И., Пономарева Г.М. Действие мутагенных факторов на изменчивость *P.shermanii*, продуцентов витамина В<sub>12</sub> // генетика.- 1973. – Т.9. – №4. – С.158 – 161.
51. Грузина В.Д., Ерохина Л.И., Пономарева Г.М. Селекция пропионовокислых бактерий и роль морфологических мутантов в отборе активных вариантов // Генетика. – 1974. – Т.10. – №2. – С.121 – 127.
52. Домрачева Г.И., Коновалова Ю.В., Майданюк А.Е. Влияние пропионовокислых бактерий на качество силоса, рост и развитие молодняка животных // Науч.тр. Сиб. научно-исслед. ин-та с.-х. животных. – Омск, 1970. – №15. – С.173 – 177.
53. Ельцова М.В. Накопление вкусовых и ароматических в процессе созревания сыра и влияние их на качество продукта. Автореф. канд.дис. – М., 1961.
54. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. – М.: Агропромиздат, 1990.
55. Ибрагимова С.И., Неронова Н.М., Работкова И.Л. Влияние ионов водорода на некоторые свойства *P.shermanii* // Микробиология. – 1972. – Т.41. – №5. – С.834 – 837.
56. Инихов Г.С., Брио Н.Н. Методы анализа молока и молочных продуктов. – М.: Пищевая промышленность, 1971. – 422с.
57. Карлин Р.Ш. Содержание витаминов группы В кефире и его обогащение при добавлении *P.shermanii* // Прикл. биохим. микробиол. – 1966. – Т.2. – №4. – С.386 – 391.
58. Кассирский И.М. Витамин В<sub>12</sub> // Здоровье. – 1966. –№11.

59. Климовский И.И. Биохимические и микробиологические основы производства сыра. – М.: Пищевая промышленность, 1966. – 207с.

60. Климовский И.И., Алексеева К.П. Влияние молочнокислых бактерий и их культуральной среды на развитие пропионовокислых бактерий / Молочная промышленность. – 1964. – №4.

61. Козиковский Ф.В. Искусство сыроделия // В мире науки. – 1985. – №7. – С.36.

62. Коновалова Л.В., Воробьева Л.И. Биосинтез витаминов группы В пропионовокислыми бактериями // Научн. докл. Высшей школы. Биол. науки – 1969. – №1. – С.91 – 93.

63. Коновалова Л.В., Воробьева Л.И. Влияние полимиксина М на накопление липидов и полифосфатов клетками *P.shermanii* // Научн. докл. Высшей школы. Биол. науки. – 1972. – №7. – С.101 – 104.

64. Коноплев Е.Г., Щербаков Л.А. Применение комплексной закваски пропионовокислых бактерий и дрожжей при силосовании кукурузы // Изв. АН. СССР. Сер. Биол. – 1970. – №1. – С.142 – 144.

65. Королев С.А. Основы технической микробиологии молочного дела. – М.: Пищевая промышленность, 1974. – 344 с.

66. Королева Н.С., Пятницына И.Н., Банникова Л.А., Бавина Н.А. Способ приготовления сухих заквасок // Молочная промышленность. – 1984. – №5. – С.27 – 29.

67. Краева Н.И., Воробьева Л.И. Внутриклеточная локализация, выделение и характеристика супероксиддисмутазы из *P.globosum* // Прикл. биохим. микробиол. – 1981. – Т.17. – №6. – С.837 – 842.

68. Краева Н.И., Воробьева Л.И. Супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза пропионовокислых бактерий // Микробиология. – 1981. – Т.50. – №5. – С.813-817.

69. Круглова Л.Т., Бубкова Б.Д. Обогащение творога витамином В<sub>12</sub> // Молочная промышленность. – 1962. – №11.

70. Кулаев И.С. Биохимия высокомолекулярных полифосфатов: Автореф. докт. дис. – М., 1969.

71. Куненов Л.Г. Сравнительное изучение изменчивости продуцентов витамина В<sub>12</sub> под действием химических мутагенов. Автореф. канд. дис. – М., 1974.

72. Кучерас Р.В., Гебгардт А.Г. Влияние аминокислот на кобамидсинтетическую активность *P.shermanii* // Приклад. биохим. микробиол. – 1972. – Т.8. – №3. – С. 341– 345.

73. Кюрштейнер О. Опыт применения пропионовокислых бактерий при выработке эментальского сыра // Schweiz Milchztg. – 1975. – С. 71–73.

74. Лайпанов И.З. Биотехнологические свойства микрококков вида *Micrococcus caseolyticus* // Тез. докл. научно-практ. конф. «Интенсификация производства и повышение качества сыра». – Барнаул, 1989.

75. Мейнелл Д., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. – М.: Мир, 1967.

76. Мельникова Л.В. Фосфолипазная активность пропионовокислых бактерий // Тез. докл. Всесоюз. съезда микробиологов о-ва «Достижения микробиологии – практике». – Алма-Ата, 1985.

77. Мельникова Л.В. Фосфолипазная активность пропионовокислых бактерий и ее влияние на качество «Советского» сыра: Автореф. канд. дис. – Углич, 1987.

78. Мелузова Л.О., Новотельнова Н.Г., Яковлева Д.Л. О биосинтезе витаминов молочнокислыми заквасками // Микробиология. – 1968. – Т.27. – №6. – С.56 – 59.

79. Метаболизм микроорганизмов / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1986. – 252 с.

80. Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. – М.: Колос, 1971. – 343 с.

81. Опарин Ю.Г. // Биотехнология. – 1996. – №7. – С.3 – 13.

82. Работкова И.Л., Иванова И.И. Рост и развитие микробных культур // Успехи микробиологии. – 1971. – №7. – С.67 – 107.

83. Романовская Н.Н. и др. Способ получения кисломолочных напитков. Авт. свид. №118 4506. Опубл. 15.10.85, бюл. №38.

84. Семенихина В.Ф. Развитие микробиологии кисломолочных продуктов // Молочная промышленность. – 1994. – №1. – С. 9– 11.

85. Семенихина В.Ф., Рожкова И.В., Сундукова М.Б. Кисломолочные продукты нового поколения // Молочная пром-сть. – 1989. – №7. – С. 29 – 30.

86. Семенихина В.Ф., Рожкова И.В., Грудзинская Э.Е., Харитонов В.Д. Способ производства кисломолочного продукта. Авт. свид. №2020829. Оpubл. 15.10.94, бюл. №19.

87. Совершенствование способов приготовления заквасок и методов микробиологического контроля в молочной промышленности // Сб. научн. трудов под ред. В.Ф. Семенихиной – М., 1989.

88. Столярова А.С. Разработка лиофилизированных препаратов бифидобактерий: Диссер. канд. тех. наук. – Улан-Удэ, 1995. – 147 с.

89. Телевич М.Б. Биологические свойства *Str. Lactis*: Автореф. канд. дис. – Киев, 1961.

90. Техническая микробиология пищевых продуктов / Под ред. А.Я. Понкратова. – М.: Пищевая промышленность, 1968. – 743 с.

91. Уманский М.С., Мельникова Л.В. Влияние продуктов гидролиза фосфолипидов молока на качество «Советского» сыра // Информ. листок. – Барнаул. – 1986. – С. 195 – 200.

92. Ф.С. Н2-132 ВС-88 Бифидумбактерин сухой.- Взамен ТУ 42.14.264-81; введ. 08.0719.88. – М., 1988. – 18 с.

93. Хамагаева И.С. Теоретическое обоснование и разработка технологии кисломолочных продуктов на основе использования β-галактозидазы и бифидобактерий: Диссер. докт. техн. наук. – М., 1989. – 456 с.

94. Хоштеттлер А. Влияние введения чистых культур пропионовокислых бактерий на молочнокислое брожение в эмментальском сыре / Schweiz Milchztg. – 1978. – С. 69 – 71.

95. Шарифьян С.А. Микрофлора Советского и русско-швейцарского сыров из пастеризованного молока / Молочная пром-сть. – 1969. – №3. – С. 14 – 20.

96. Чан Тхи Ткань. Изучение физиолого-биохимических особенностей представителей различных видов пропионовокислых бактерий и их мутагенных форм: Автореф. канд. дис. – М., 1973.

97. Чарахчян И.В., Воробьева Л.И. Особенности потребления сульфата пропионовокислыми бактериями // Микробиология. – 1984. – Т. 53. – №1. – С.38 – 42.

98. Allen S.H. et al. The isolation, purification and properties of methylmalonil racemase // J. Biol.Chem. – 1963. – Vol. 326. – P. 1637 – 1642.

99. Antila M. Der Aminosäureabbau durch Propionsäurebakterien // Meijerit. Aikakausk. – 1956. – Bd. 18,19. – S. 1 – 6.

100. Antila M. Die Bildung von Azetoin und Diazetyl bei Propionsäurebakterien // Meijerit. Aikakausk. – 1956. – Bd. 18, 19. – S.7 – 14.

101. Antila M. Über die Propionsäurebakterien im Emmentaler Kase // Meijerit. Aikakausk. – 1954. – Vol. 16. – №1. – P.1 – 132.

102. Barker H.A. Biochemical functions of corrinad compound // Biochem.J. – 1967. – Vol. 105. – P.1 – 14.

103. Barker H.A., Liomann F. On lactic acid metabolism in propionic acid bacteria and the problem of oxido reduction in the system fatty-hydroxyketo acid // Arch.Biochem. – 1960. – Vol. 4. – P. 361–170.

104. Berger J.U., Johnson M.J., Peterson W.H. The proteolytic enzymes of bacteria // J.Bact. – 1959. – Vol. 36. – P. 521 – 545.

105. Cummins C.S., Johnson J.L. *Cornebacterium parvum*: a synonym for *Propionibacterium acnes* // J. Gen.Microbiol. – 1974. – Vol. 80. – P. 433 – 442.

106. Cummins C.S., Johnson J.L. The genus *Propionibacterium* // Microbiol. – 1992. – Vol. 1. – P. 832 – 849.

107. Cummins C.S., Johnson J.L. The genus *Propionibacterium* // The Prokaryotes. Springer. – Verlag.Berlin; Heidelberg. – 1981. – P. 1894 – 1902.

108. Delwiche E.A. Mechanim of propionic acid formation by *Propionibacterium pentosaceum* // J. Bact. – 1958. – Vol. 56. – P. 811– 820.

109. Delwiche E.A., Carson S.F. A citris acid cycle in *Propionibacterium pentosaceum* // J.Bact. – 1968. – Vol. 65.- №3. – P. 318 – 321.

110. Dykstra G.J. et al. Formation of dimethylsulfide by *P.shermanii* ANCC 9617. Vol. 6. – P. 355 – 365.

111. El-Hagarawy I.S. Factors, affecting the organic acid production by propionibacteria used in the manufacture of Sfiiss cheese // Diss. Abstr., 1954. – Vol.36. – P. 638.

112. El-hagarawy., Slatter W.L., Harper W.J. Organic acid production by propionibacteria. Effect of stains, pH, carbon source, and intermediatefermentatin products // J. Dairu Sci. – 1967. – Vol. 40. – P.579 – 587.

113. Freudenreich E., Orla-Jensen. Uber die Emmentahaler Kase stattfindeter Propionsauregerung // Lands. Jahrb/ Schweiz, 1966. – Bd. 20. – S.320.

114. Fromageot C., Chaix P. Respiration fermentataion chez Propionibacterium pentosaceum // Ensumologia. – 1976. – Bd. 3. – S. 288.

115. Hettinga D.H., Reinbold G.W. the Propionic acid bacteria – a Review, I.Growth // J.Milk 166 Technol. – 1972. – Vol. 35. – №5. – P.295 – 301.

116. Hietaranta M., Antila M. The influence of biological nutriens on the growth of propionic acid bacteria in milk // Int. Dairu Congr. – 1979. – Vol. 3. – P.1428 – 1431.

117. Hietaranta M., Antila M. Some aspects of citris acid breakdown in Emmental cheese // Mejerit. Finl. Sveks. – 1983. – Vol. 16. – P. 91– 94.

118. Johnns A.T. Mechanism of the propionic acid formation by propionibacteria // J.Cen.Micr. – 1986. – Vol. 5. – P. 337 – 345.

119. Johnson J.L., Gummins C.S. Gell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical Propionibacteria and STAINS OF Arachnia propionica // J.Bact. – 1972. – Vol. 109. – №3. – P.1047 – 1066.

120. Kameda T. Fattu acids as characteristic species // J.Bacteriol. – 1967. – Vol. 93. – №3. – 1961. – S.184.

121. Krane W. Milchwissenschaft.- Berlin, 1961. – S.184.

122. Krebs H.A., Egglestone L.V. Bioloical sunthesis of oxaloacetit acid from pyrivic acid and CO<sub>2</sub>. The mechanism of carbon dioxide fixation in propionic acid bacteria // Biochem.J. – 1988. – Vol.35. – №7. – P.676-687.

123. Kurmann J.Ein vollsynthetishernahrboden fur Propionsaurebakterien // Pathol. Et.Microbiol. – 1960. – Vol.23. – P.700 – 711.

124. Malik G.W., Reinbold G.W. Vedamuthu E.R. An evaluation of the taconomy of Propionibacterium // Canad. J.Microbiol.- 1968. – Vol. 14.- №11. – P.1185 – 1191.

125. Merilaeinen V., Antila M. The propionic acid bacteria in finnish Emmental cheese // Meijeritieellinen Aikakakuskirya, Helsinki.-1976. – Vol. 34. – P.107 – 116.

126. Orla-Jensen .J. Die Hauptlinien des naturlichen Bacteriensystems // Zbl. Bact.Paras. Infect. Hyg. – 1960. – Bd.22. – S.305 – 346.

127. Osman H.G., Chenouda M.S. Biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub> by P.shermanii .V. Interrelationship between vitamin B<sub>12</sub> and porphyrin synthesis // J.Allg. Microbiol. – 1971. – Vol. 11. – №3. – P.199 – 204.

128. Ritter P., Schwab H., Holzern. Testing the stimulatory or inhibitory effect of micrococci on propionic bacteria // Schweiz. Milcgzgtg. – 1967. – Vol. 93. – №113. – P.929 – 930.

129. Shaw N., Dinclinger J.D. The structure of an acylated mannoside in the lipids of propionic acid bacteria // Biochem.J. – 1969. – Vol.112. – №6. – P.769 – 776.

130. Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial gell walls and their taxonomic implication // Bact.Revs. –1872. – Vol.36. – P. 407 – 477.

131. Sherman J.M. The cause of eyes and characteristic flavour in Emmentaler or Swiss cheese // J.Bact. – 1981. – Vol. 5. – 379 – 392.

132. Siewert R. Zum auftreten von blinden emmentalerksen. Teil 2 // Milchforsch– Milchprax. – 1989. – Bd.131. – №5. – S.118 – 119.

133. Stjernholm R., Wood H.C. The symmetrical C<sub>3</sub> in the propionic acid fermentation and the effect of avidum on propionate fermentation // Iowa State Coll.J.Sci. – 1963. – Vol. 38. – №1. – P. 123–140.

134. Tomka G. Acetoin and diacetil production of the rod shaped propionic acid bacteria // Dairu Gongr.Proc. – 1985. – Vol. 2. – P. 619-622.

135. Troili-Peterson G. Studien uber die microorganismen des schwedischen guter kases // Zbl.Bact.Paras.Inf.Hyg. – 1960. – Bd. 2. – S. 120 – 143.

136. Troili-Peterson G. Studien uber in kase gefundene gluzerinvergarnde und lactat vergerende bacterien // Zbl.Bact.Paras.Inf.Hyg. – 1958. – Bd. 24. – S. 333.
137. Van Niel C.B. The Propionic Acid Bacteria // Haarlem. – 1979. – S. 250.
138. Van Niel C.B. The genus Propionibacterium. In: R.S. Breed, E.G.D.Myrlau, N.R.Smith (ed) Bergeys manual of determinative bacteriologu. 8<sup>th</sup>.ed. Williams & Wilkins. – Baltimore, 1974.
139. Vitranen A.J., Karstrom H. Uber die Propinsauregarung // Soc.Sci.Fennica, Comment Physic- Math. – 1983. – Vol.1. – P.1– 23.
140. Werkmann C.H., Wood H.G. Heterotrophic assimilation of carbon dioxide // Adv.Ensymol. – 1972. – Vol. 2.– P. 135 – 182.
141. Wood H.G., Werkn 168 H. Puruvic acid in the dissimilation of glucose by the propionic acid bacteria // Biochem.J.–1984.– Vol. 28.- P. 745–747.
- 142.Wood H.G., Stone R.W., Werkmann C.H. The intermediate metabolism of the propionic acid bacteria // Biochem.J.- 1977.- Vol. 31.- P.349 – 359.
143. Wood H.G. et el. Metabolism of methylmalonil-CoA and the role of biotnand B<sub>12</sub> coenzymes // Ann.N.Y.Acad.Sci. – 1964. – Vol. 112. – №1.– P.661.

## СОДЕРЖАНИЕ

	стр
Введение.....	3
<i>Глава I. Современное состояние и перспективы использования пропионовокислых бактерий</i>	
1.1. Физиолого-биохимические свойства пропионовокислых бактерий.....	5
1.2. Брожение, осуществляемое пропионовокислыми бактериями.....	16
1.3. Использование пропионовокислых бактерий в пищевой промышленности.....	21
1.4. Особенности технологии производства бактериальных концентратов.....	35
<i>Глава II. Исследование влияния способа активизации на биохимическую активность пропионовокислых бактерий</i>	
2.1. Влияние обработки молока β-галактозидазой на развитие чистых культур пропионовокислых бактерий в молоке.....	45
2.2. Исследование влияния концентрации β-галактозидазы на биохимическую активность пропионовокислых бактерий.....	47
2.3. Исследование влияния ферментного препарата на рост пропионовокислых бактерий в молоке.....	50
2.4. Исследование активизированных культур пропионовокислых бактерий при пересадках.....	52
<i>Глава III. Исследование и выбор оптимальных параметров производства заквасок и кисломолочного продукта с пропионовокислыми бактериями</i>	
3.1. Разработка схемы приготовления лабораторной закваски.....	54
3.2. Выбор дозы закваски для приготовления кисломолочного напитка...	60
3.3. Исследование витаминообразующей способности пропионовокислых бактерий.....	68
<i>Глава IV. Разработка технологии лиофилизированной закваски пропионовокислых бактерий</i>	
4.1. Подготовка закваски пропионовокислых бактерий к лиофилизации...	72
4.2. Исследование качественных показателей сухой закваски пропионовокислых бактерий.....	80
4.3. Исследование срока хранения лиофилизированной закваски пропионовокислых бактерий.....	82
4.4. Технологическая схема производства сухой закваски пропионовокислых бактерий.....	87
<i>Глава V. Практические аспекты применения сухой закваски пропионовокислых бактерий</i>	
5.1. Использование сухой закваски пропионовокислых бактерий при производстве кисломолочного напитка.....	90
5.2. Исследование сроков хранения кисломолочного напитка «Целебный».....	96
5.3. Технологический процесс производства кисломолочного напитка «Целебный».....	97
<i>Глава VI. Разработка бактериального концентрата пропионовокислых</i>	

<i>бактерий</i>	
6.1. Подбор питательной среды для культивирования пропионовокислых бактерий.....	101
6.2. Исследование активности инокулята для получения бактериального концентрата пропионовокислых бактерий.....	104
6.3. Влияние дозы инокулята на выход биомассы.....	105
6.4. Влияние хлористого кобальта на синтез витамина В <sub>12</sub> пропионовокислыми бактериями.....	108
6.5. Исследование антимутагенной активности пропионовокислых бактерий.....	112
6.6. Феноменологическое описание процесса культивирования микроорганизмов.....	114
6.7. Исследование сроков хранения жидкого концентрата пропионовокислых бактерий.....	117
6.8. Технологическая схема производства жидкого концентрата пропионовокислых бактерий.....	119
<i>Главам VII. Изучение устойчивости пропионовокислых бактерий к замораживанию</i>	
7.1. Исследование устойчивости пропионовокислых бактерий к замораживанию.....	123
7.2. Изучение сроков хранения замороженного концентрата.....	126
7.3. Исследование влияния лиофилизации на биохимическую и ферментативную активность пропионовокислых бактерий.....	127
7.4. Изучение стойкости сухого концентрата пропионовокислых бактерий при хранении.....	131
7.5. Изучение биохимической активности замороженного и сухого концентратов пропионовокислых бактерий.....	135
<i>Глава VIII. Разработки технологии замороженного и сухого концентратов пропионовокислых бактерий.....</i>	137
<i>Глава IX. Практическое применение бактериального концентрата пропионовокислых бактерий.....</i>	142
<i>Глава X. Материалы и методы исследований</i>	
10.1. Постановка эксперимента.....	148
10.2. Методы исследований.....	148
Выводы.....	156
Библиография.....	158

Научное издание

ХАМАГАЕВА Ирина Сергеевна  
КАЧАНИНА Людмила Михайловна  
ТУМУРОВА Софья Мункуевна

## БИОТЕХНОЛОГИЯ ЗАКВАСОК ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Редактор Т. Н. Чудинова

Ключевые слова: пропионовокислые бактерии, сухая закваска, биотехнологический способ, витаминообразующая способность, антимутагенная активность, жидкий, замороженный, сухой концентрат пропионовокислых бактерий.

Подписано в печать 28.12.2005 г. Формат  
60x84 1/16. Усл.печ.л. 10, 0.  
Тираж 100 экз. Бумага писчая.  
Печать операт. Заказ 267.

---

Издательство ВСГТУ  
670013 г.Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в.