МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЧЕЧЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БИОЛОГО-ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ, МОРФОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

Пробиотический потенциал штаммов *PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII*

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

Работа допущена к защите

Зав. кафедрой клеточной биологии, морфологии и микробиологии

_____Р.И.Хасанова

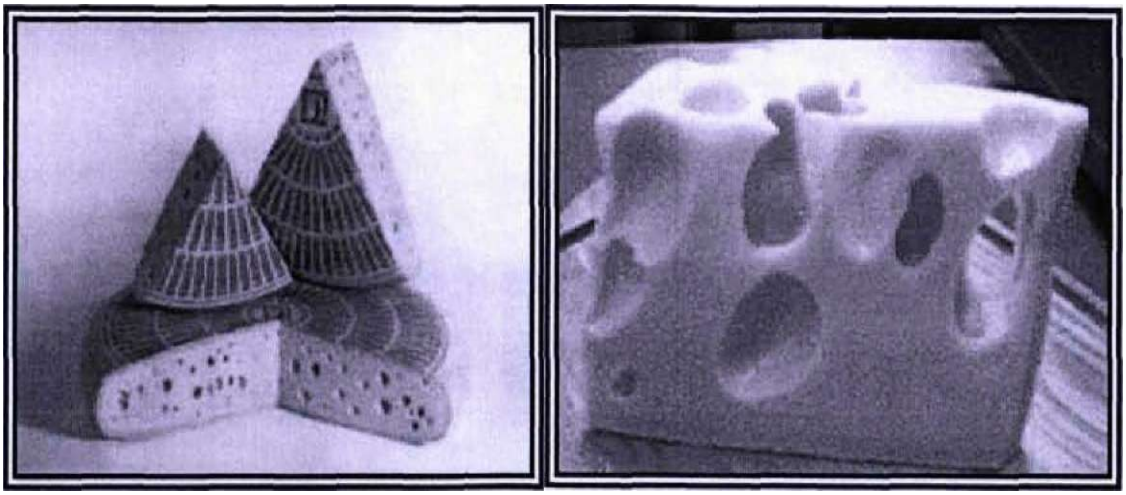
6 июня 2015 г.

Студентка 4 курса ДО

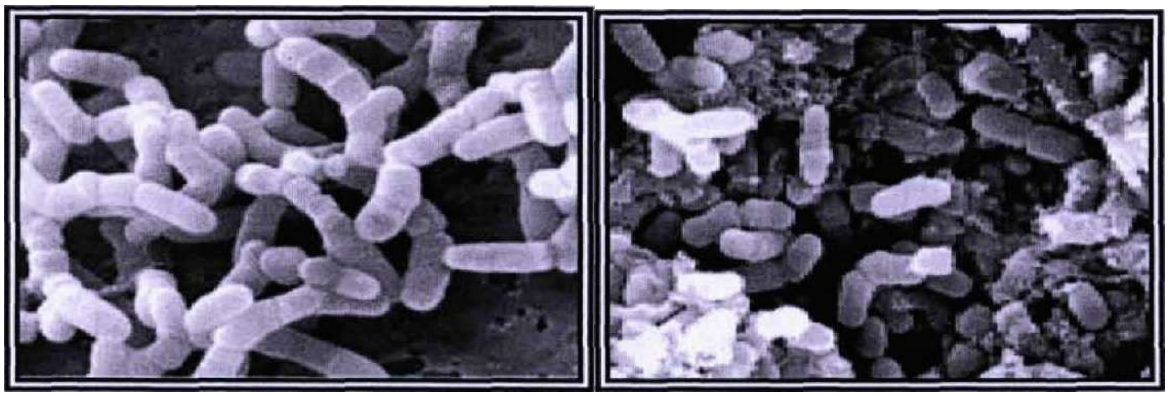
Муртазалиева Хава Юнусовна

Научный руководитель:
доцент, к.б.н. Шахгириева З.И.

Грозный– 2015г.







Leverrier et al., 2004 **Jan et al., 2004**

PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ…….. ….5

ГЛАВА I. Обзор литературы
Биология *Propionibacterium freudenreichii* в связи с решаемой проблемой.....…….....8

1.Практическое значение *P. Freudenreichii*: применение и разработка новых, способов микробиологической защиты пищевых и сельскохозяйственных
продуктов.....10
1.1.Использование способности ПКБ подавлять портящие микроорганизмы: биопротекторное действие и технологии биоконсервирования.....……10
1.2. Микробиологическая защита пшеничного хлеба от «картофельной болезни» с помощью *Propionibacterium freudenreichii*…….……17

ГЛАВА II. Разработка способов применения ***P. Jreudenreichii*** для защиты пшеничного хлеба от «картофельной болезни», вызываемой развитием бацилл…….. 26

Экспериментальная часть. Объекты, материалы и методы 26
2.1. Оценка антиоксидантной активности жидких культур штаммов *P. freudenreichii* RVS-2-ims (I Pr 2) и *P. freudenreichii* RVS-4-Irf-(II, Pr 4)……26
2.2. Разработка способов применения *P. Jreudenreichii* для защиты пшеничного хлеба от «картофельной болезни», вызываемой развитием бацилл……31
2.3.Способы введения пропионовокислых бактерий в пшеничное тесто для достижения защитного эффекта……34
2.4. Применение водного экстракта мучной среды (ЭМС) в качестве искусственной среды при разработке заквасок на основе ПКБ.....36

ЗАКЛЮЧЕНИЕ…….42

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ ……46

ПРИЛОЖЕНИЯ…….

СОКРАЩЕНИЯ

АОА	- антиоксидантная активность
АФК	- активные формы кислорода
АНМФ	- антимикробный фактор
АСБ	- абсолютно сухая биомасса
БПВ	- бактериоцин-подобные вещества
ГКС	- глюкозо-кукурузная среда
ЖКТ	- желудочно-кишечный тракт
КБ	- «картофельная болезнь» хлеба
КЖ	- культуральная жидкость
Me	- медиана, статистическая характеристика
МКБ	- молочнокислые бактерии
ПА	- протеолитическая активность
ПКБ	- пропионовокислые бактерии
ПК	- пропионовая кислота
П-Na	- пропионат натрия
пСС	- полусинтетическая среда для ПКБ
ПРО	- пробиотический микроорганизм (пробиотик)
УК	- уксусная кислота
ФАОЗ	- ферменты антиокислительной защиты
ЭМС	- (водный) экстракт мучной среды
ЭМС/Ld	- экстракт мучной среды после культивирования Lactobacillus delbrueckii
Pfr	- Propionibacterium freudenreichii

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых пробиотиков - современная и актуальная проблема. Слова «пробиотики» и «антибиотики» противоположны по смыслу. Понятие «пробиотики» (ПРО) подразумевает живые микроорганизмы с их экзометаболитами, поступившие в организм естественным путём, например, перорально, и благоприятно воздействующие на физиологическое состояние макроорганизма животного и человека (см. определение ВОЗ, 2002).

Одним из проявлений их действия является нормализация (регуляция) микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) животного и человека. Возникновению и развитию концепции этого нового направления «на стыке» смежных наук физиологии и экологии животных (человека), общей микробиологии, клинической микробиологии, науке о питании человека и других дисциплин, мы обязаны прежде всего русскому ученому, лауреату Нобелевской премии, Илье Ильичу Мечникову. В 1908 году он опубликовал работу по применению болгарской палочки (L. delbrueckii subsp. bulgaricus) в кисломолочных продуктах, что привело к массовому излечиванию желудочно-кишечных заболеваний на Балканах. Понятие «пробиотики» впервые упоминается Лиллеем и Стилвелом (Lilley, Stillwell) в 1965 году, однако исследования стали широко проводится только с 2000 года.

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

Среди пробиотических эффектов пробиотиков упоминаются: подавление нежелательной микробиоты и стимуляция истинных (индигенных, автохтонных, хозяйских) пробиотиков или эубиотиков в ЖКТ, иммуно- тропное действие (иммуномодуляция, иммуностимуляция),

снижение воспалительных и аллергических реакций, противораковое действие и в целом оздоровление организма животного и человека. [Rolfe, 2000; Шендеров, 2001; Tannock, 2004; Jan, 2004; Nomoto, 2005; Суворов, 2007; Adams, Huang, 2008]. Эти эффекты ПРО-микроорганизмов определяются устойчивостью к агрессивным факторам ЖКТ, способностью функционировать в ЖЕСТ в транзиторном состоянии (если они не являются эубиотиками), а главное, пробиотическими свойствами, обусловленными их специфической физиологией и метаболизмом.

Поиск новых ПРО и правильное их использование, например, в функциональном (клиническом) питании, нацелено на уменьшение применения химических медицинских препаратов, в том числе антибиотиков.

В- пищевых технологиях микроорганизмы широко используются. Выбор микроорганизмов для тех или иных микробиологических (пищевых) производств заведомо оправдан, если они уже признаны ПРО, хотя не все «пищевые» микроорганизмы могут и должны, относится к ПРО. Важно, чтобы они были безопасными для человека и осуществляли целевой процесс. Вместе с тем, защита пищевых и сельскохозяйственных продуктов от портящих микроорганизмов и в настоящее время, не исключает применения химических препаратов-ксенобиотиков. Среди них - бензоаты, сорбаты, антибиотики и значительно более вредные химические агенты, например, серный ангидрид.

В настоящей работе мы разрабатывали микробиологическую технологию производства пшеничного хлеба, защищенного от поражения гнилостными бактериями, его «картофельной болезни». Микробными агентами служили классические пропионовокислые бактерии.

Изоляты бактерий-были получены раньше в нашей лаборатории из сыра и по физиологии и морфологии были, отнесенные к *P. Propionibacterium.* Они имеют фенотипические разницы, но в результате

филогенического анализа были признаны нами как принадлежащие к одному виду: *Propionibacterium freudenreichii.*

Эта бактерия с 2007 г. имеет статус QPS (Qualified presumtion of Safety) Европейского комитета по безопасности микроорганизмов (EFSA), который действует с 2002 года, и внесена в Список GRAS: Generally Recognized As Safe, USA [Lan et al., 2007]. Подвид этой бактерии (P. *freudenreichii* ssp. *shermanii)* на коловиквиумах GRAS обсуждался дважды: в 2003 и 2008. В настоящее время *P. freudenreichii* рассматривают в качестве кандидата в пробиотики.

Выявлению и начальному изучению пробиотических свойств семи исследуемых штаммов *P. freudereichii,* а также разработке эффективного способа приготовления пшеничного хлеба, устойчивого к заболеванию «картофельной болезнью», посвящена настоящая работа.

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

В задачи работы входило:

1. Оценить пробиотически значимые свойства исследуемых штаммов пропионовокислых бактерий их иммунотропую, антимикробную, антиоксидантную активности, а также способность к образованю некоторых специфических экзометаболитов;
2. Разработать основы накопительной заквасочной технологии производства пшеничного хлеба, устойчивого к бактериальной деструкции («картофльной болезни»)

ГЛАВА I. Обзор литературы.

Биология *Propionibacterium freudenreichii* в связи с решаемой проблемой.

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

Philum B XIY Actinobacteria

Class I Actinobacteria Subclass I

Actinobacteridae Order I

Actinomycetales Suborder XII

Propionibacterineae Family 1

Propionibacteriaceae Genus I

Propionibacterium

Бактерии рода *Propionibacterium* по местообитанию и специальным фенотипическим и генотипическим характеристикам подпадают под одну из двух категорий [Cummins, Johnson, 1992; Glatz 1992]: классические или "молочные" и "кожные". В настоящее время идентифицированы (признаны) следующие виды пропионовокислых бактерий (ПКБ):

Классические (молочные) ПКБ

P. freudenreichii (ssp. freudenreichii и ssp. shermanii)

P. acidipropionici

P.jencenii

P, thoenii

Кожные ПКБ

P. acnes

P. avid um

P. granulosum

P. propionicus (*Arachnid propionica****).***

. ***P. limphophilum***

ПКБ, имеющие особые местообитания

P. innocuum = *Propioniferax innocula* ***(1991)*** **-** обитает на коже людей, но имеет фенотип классических ПКБ;

P. cyclohexanicum ***(1997)*** **–**выделена из сбраживаемого апельсинового сока, физиологически близка ***P. freudenreichii;***

P. microaerophilum **(2001) -** выделена из промывных вод оливок.

Taxonomic Outline of the Procaryotes Bergeys Manual of Systhematic Bacteriology, Second Edition. Release 3.0 July 2002 http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline2Q0210

Основным объектом настоящей работы является классическая ("молочная") бактерия *Propionibacterium freudenreichii (Pfr***,** ПКБ), поэтому именно ей мы уделяем внимание в настоящем обзоре.

Местообитания *Pfr* — молоко и молочные продукты: свежее коровье молоко [Cummins, Johnson, 1981; Fessier et al., 1999 (a)], кисломолочные продукты длительного хранения, например, сброженная жирная сметана (каймак)[Шакирзянова и др., 2002], "твердые" и "полутвердые" сычужные сыры (индигенная микробиота, ПКБ) с высокой температурой второго нагревания (52 - 55°С), которые долго созревают (до 3-х месяцев и более) при пониженной температуре [Cummins, Johnson, 1981; Fessier et al., 1999 (b)]. Источником *Pfr* являются также сброженные травы, силос [Воробьёва, 1995; Merry, Davies, 1999].

В каймаке, сырах и силосах классические ПКБ имеет трофическая связь (образуют трофическую цепь) с молочнокислыми бактериями, которые предварительно сбраживают углеводы (лактозу, глюкозу,

мальтозу) с образованием молочной кислоты, которую в форме лактатов ПКБ используют в качестве источников углерода и энергии.

Подходящие ("богатые") натуральные среды для культивирования Pfr в лабораторных и производственных условиях - это глюкозо- или лактатно-кукурузная среда, лактатная молочная сыворотка и другие натуральные среды. Отдельные штаммы Pfr способны использовать лактозу, т. е. расти на обезжиренном молоке.

Вышесказанное свидетельствует о том, что *Pfr* тяготеет к пищевым субстратам, причем не вызывая порчи модифицируют их качество. Поэтому эту бактерию можно назвать "пищевым микроорганизмом".

1. Практическое значение *P. Freudenreichii* применение и разработка новых, способов микробиологической защиты пищевых и сельскохозяйственных продуктов

1.1.Использование способности ПКБ подавлять портящие микроорганизмы биопротекторное действие и технологии биоконсервирования

Препараты на основе *P. Freudenreichii* уже используются для-борьбы с патогенными или портящими микроорганизмами, т.е. консервирования продуктов. Актуальность применения, ПКБ состоит в. замене химических препаратов и антибиотиков на биологические, которые экологически предпочтительны.

Так, был разработан биологический консервант «Микрогард» - пастеризованное снятое молоко после культивирования в нём *Propionibacterium freudenreichii*s ubsp. *shermanii*.Этот консервант был официально утвержден для использования в продуктах типа домашнего сыра и йогурта. По некоторым данным, примерно 30% всего домашнего сыра в США производится с добавлением «Микрогарда». Препарат ингибирует рост грибов, дрожжей и грамотрицательных бактерий. Считают, что антимикробную активность этот консервант проявляет за

счет наличия в нем пропионовой кислоты/пропионата, ацетата, а также особого пептида [Ayres et al., 1992; Holo et al., 2002]. Препарат представляет собой пастеризованное снятое молоко, которое подкисляют до pH 5,3 и культивируют на нем P. *Freudenreichii* ssp. *shermanii*(ATCC 9617) в течение 48 часов. Затем препарат нейтрализуют, пастеризуют и замораживают [Ayres et al., 1992]. Следует отметить, что используемое значение pH препарата оптимальным для развития *P. Freudenreichii* не является [Воробьёва, 1995]. Поэтому не удивительно, что «Микрогард» содержит менее 0,02% пропионовой кислоты/пропионата этого недостаточно для подавления микробного роста. Антимикробным действием, по-видимому, обладают метаболиты с молекулярной массой больше 300 Да, подверженные действию протеолитических ферментов. «Микрогард» подавляет рост многих исследованных грибов, например, *Penicillum exvansum* OSU, Blackyeast ,*Kluyvermyces marxianus* 8554, но не всех. Нечувствительность некоторых грибов *(Aspergillus niger* OSU, YeastY) может быть связана с действием их протеолитических ферментов. Минимальная ингибирующая концентрация для разных микроорганизмов различается. Она колеблется от 1% (для *Ps. putida*, *Yersini a*sp., *Aeromona s*sp., *Salmonella paratyphi*) до 3%*(Ps. Aeruginosa* ATCC419, *S. typhimurium*) [Al-Zoreky et al., 1991]. Действие препарата очень сильно зависит от состава того или иного пищевого продукта [Ayres et al., 1992].

Другой коммерческий препарат «Биопрофит» содержит L. *Rhamnosus* и *P. fi-eudenreichii.*Этот продукт используется для подавления роста дрожжей в молочнокислых продуктах и бацилла в хлебной закваске. Ингибирующий эффект обусловлен совместным действием двух штаммов [Al-Zoreky, 1991].

Подробно о применении *P. Freudenreichii* в производстве «твёрдых» сыров типа «Швейцарского», в производстве витамина B_{12} и пропионовой кислоты микробного происхождения, а также в составе заквасок при силосовании трав на корм скоту можно прочитать в книге Воробьевой Л.И.

[Воробьева, 1995]. Одна из разработок с использованием подсырной сыворотки и Pfrподвида*shermanii***,** а также смешанных культур, позволила получать пропионовую кислоту в концентрации 1,6 - 2,2% [Bodieetal., 1987]. Другая - с использованием последовательного культивирования сначала термофилов *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilic* на подсырной лактозной сыворотке, а затем ПКБ, использующей лактат, обеспечивала образование 2,6% пропионата[Ahernetal., 1987].

Все современное производство высококачественных сыров в мире включает, использование штаммов ПКБ. Сыры - это, прежде всего, консервирование молочного белка, казеина. В России, как и в Мире в целом, пропионовокислые бактерии как заквасочные (стартерные) культуры в производстве сыров применяют с конца 80-х - начала 90-х годов прошлого столетия. Для созревания» сыра (формирования его структуры, органолептических свойств и биологической ценности) абсолютное значение имеют соединения, выделяемые бактерией. Это прежде всего продукты пропионовокислого брожения: углекислый газ, пропионовая и другие летучие кислоты, их альдегиды, ацетон, диацетил и пропанол, а также диметилсульфид. Пролин и свободные нукпеотиды, выделяемые пропионовокислыми бактериями, создают специфический вкус сыра. «Настоящие» сыры, помимо их вкусовой привлекательности, продукты - весьма полезные для человека, благодаря биологически активным веществам, образуемым именно ПКБ. Среди них - незаменимые аминокислоты (метионин, пролин), свободные нуклеотиды, витамины группы В, в том числе фолиевая кислота и следы витамина B_{12}, нуклеотиды и нуклеозиды, естественные актимикробные факторы (пропионаты, пропионицины) и противовирусный антибиотик (пропионин), а также другие пептиды, в частности с антимутагенными и реактивирующими свойствами [Иконников и др., 1982; Воробьёва,. 1995; Hugenholtzetal., 2002; Рыжкова, 2003].

Таким образом, благодаря именно пропионовокислым бактериям высококачественные сыры являются продуктом, пищевые и биологические свойства которого превосходят молоко и молочные продукты, хотя сыроделие возникло в глубокой древности, и по сути таковым является сейчас, как способ консервирования молочного белка. Технологии производства сыра с применением заквасочных (стартерных) культур ПКБ, которая начала активно применяться в 90-годы прошлого века, а также о проблемах такого применения посвящена большая статья специалистов из Швейцарии [Frqhlich-Wyder et al., 2002].

Любая микробиологическая биотехнология подразумевает выявление эффектов микроорганизма(ов), их изучение и разработку (оптимизацию) способа введения в тот или иной пищевой продукт. По нашим представлениям, ПКБ как источник пропионатов и бактериоцинов (пребиоти- ков и нутрицевтиков) можно применять тремя способами:

1) в качестве биодобавки, т.е. выращенной культуры или культуральной жидкости, содержащей нужные экзометаболиты, не растущей и не ферментирующей субстрат;

2) в качестве ферментирующей углеводы или лактат с образованием пропионата суспензии клеток: не растущая культура (отделённые, в том числе иммобилизованные, живые или пермеабилизованные клетки);

3) в качестве растущей культуры ПКБ при совместном культивировании действующего микроорганизма (дрожжей, МКБ) и ПКБ. Это возможно в микробиологическом производстве, когда микроорганизм используют общий субстрат или наблюдается трофическая связь или кометоболизм (МКБ- ПКБ).

Вместе с тем, иногда исходят из общих представлений о полезных свойствах ПКБ, почерпнутых из литературных источнков, и вносят их в пищевой продукт механически без выявления их реальной активности (жизнедеятельности или метаболического вклада). В последнее время в России запатентовано достаточно много изобретений по внесению культур

ПКБ в пищевые продукты (табл. 1), однако надежность описываемых в изобретениях результатов по применению ПКБ, на самом деле, может быть невысокой.

Основной проблемой, возникающей при включении ПКБ в состав комплексной закваски, является их взаимодействие с другими заквасочными культурами. Как уже было сказано, ПКБ растут медленнее, чем большинство молочнокислых бактерий и достаточно чувствительны к снижению pH среды, которое они вызывают. Поэтому усовершенствование технологий приготовления заквасок с ПКБ должно быть направлено на обеспечение активности культур ПКБ в процессе создания продукта.

Примерами выявления эффектов, их изучения и тщательных разработок для получения новых пищевых продуктов с использованием ПКБ, которые базируются на собственных исследованиях, являются работы группы A. Babuchowski (Польша, Университет г. Олыптин). Исследовали последствия введения (и инкубирования) ПКБ в овощные продукты, в том числе предварительно ферментированные с помощью МКБ (сквашенная-капуста), смешанные свежие салаты, состоящие из разных овощей, и овощные соки, например, сок красной свеклы. Оценивали способность к развитию классических ПКБ разных видов, образование ими пропионовой и уксусной кислот, обогащение нутрицевтиками (витамином B_{12} и фолиевой кислотой), состав микробиоты по КОЕ, органолептические свойства продуктов и сроки хранения. Получили положительные результаты, показывающие перспективность применения ПКБ для обработки овощной продукции.

Таблица 1.Пропионовокислые бактерии в составе «коктейлей», предлагаемых для пищевой промышленности

Использование	Смешанная закваска	Источник
Для получения кисломолочных продуктов	***Propionibacteriumthechnicum, P. shermanii Bifidobacteriumbifidum, B. longum, B. adolescentis, Lactobacillus acidophilus, L. bulgaricus, L. helveticus, L. plantarum, L.***	**Патент РФ №2163445**

	casei,Lactococcuslactis, L. cremoris, L. diacetylactis, Streptococcus thermophilus, Escherichia coli*M-*17	
	Propionibacteriumshermanii,* *Streptococcus lactis subsp. diacetilactis, Acetob acteraceti	**Патент РФ №2075159**
	***Propionibacteriumshermanii*Э-*1,* *Streptococcus thermophilus* 17T, *Acetobacteraceti*15-11**	**Патент РФ №2138551**
	Propionibacteriumshermanii,* *Acetobacteraceti, Lactococcuslactis subsp. lactisbiovardiacetilactis, Leuconostocmesenteroides subsp. dextranicum	**Патент РФ №2185436**
Для производства творога	***Propionibacteriumshermanii,* *Streptococcus lactis sub. sp. Diacetilactis, Acetobacteraceti***	**Патент РФ № 2025075**
Для получения мясного продукта	***Propionibacteriumschermanii*(ВНИМИ, N 36) *Bifidobacteriumadolescentis* МС-42 (ВКПМ, N ЦМНМВ-1987)**	**Патент РФ №2084184**
	Propionibacteriumschermanii,* *Streptococcus lactis subsp. diacetilactis, Acetobacteraceti	**Патент РФ №95120979**

Установили благоприятные новые вкусовые качества овощных продуктов, снижение содержания вредных микроорганизмов, а также то, что эффект ПКБ в ферментированных молочнокислыми бактериями продуктах, в том числе в отношении обогащения продукта (кислой капусты) нутрицевтиками, проявляется при их длительном созревании. Эффекты зависели от применяемых штаммов ПКБ [Babuchowskietal., 1999].

Далее эти подходы были применены при исследовании сбраживания смеси соков томата и корней петрушки с помощью *P. Freudenreichii* и *P.acidipropionici,*которые вводили в количестве 10^9 КОЕ/мл и инкубировали 48 ч при 30°С в анаэробных условиях. Разные штаммы ПКБ росли на смеси по-разному. Оценивали концентрации пропионовой и уксусной кислот,

витамина В12, содержание живых клеток ПКБ в ферментированной смеси соков, а также их антимикробную активность в отношении *Salmonella* sp. и *Listeria monocytogenes.* Заключили, что некоторые (отобранные) штаммы ПКБ следует использовать для сбраживания данной смеси соков, поскольку увеличивются сроки хранения, продукт обладает антимикробными свойствами и в целом полезен для здоровья человека [Laniewska-Troekenhemetal., 2004].

Культивирование *P. Freudenreichii* на овощных соках (морковном и сельдерея) исследовали с целью получения полисахаридов микробного происхождения,, которые могут быть использованы в пищевой промышленности для увеличения вязкости жидких продуктов [Dobruchwskaetal., 2004]. Польские авторы [Warminska-Radykoetal., 2004] попытались также получить положильный эффект от введения в йогурты суспензий пропионо-вокислых бактерий.(5% об.,, 10^8 КОЕ/мл). Сообщили, что качественные характеристики модифицированных йогуртов, полученных с применением стартерных культур: *L. Delbrueckii* ssp.*bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*, практически не изменялись после введения суспензий ***P.*** *Freudenreichii* Т 109 и P.*thoenii* Т 112 и Т 120. Эти штаммы обладали высокой антибактериальной активностью против *E. coli* и *Y. entercolitica*.Наблюдали увеличение продолжительности жизни не только стартерных культур, но и введённых в йогурты бифидобактерий: *B. Breve* Т 109 и *B.animals* 22.

Следовательно, достигался эффект сохранения продукта с помощью ПКБ. При этом йогурты обогащались витамином B_{12} (скорее всего за счет внутриклеточного витамина ПКБ).

Мы должны заметить, что в экспериментах с йогуртами пропионово-кислые бактерии как суспензия свободных от среды и неразмножающихся клеток - скорее пассивная биодобавка (подобно бифидобактериям), чем агент формирования продукта: ПКБ не могут развиваться в йогурте (кислая среда и дефицит подходящего источника углерода после развития МКБ), а

также активно выделять экзометабаолиты (ЛЖК и нутрицевтики). Скорее всего, ПКБ, сохраняя жизнеспособность, осуществляют свой основной метаболизм за счёт внутренних субстратов, и проявляют слабую функциональную активность (ЛЖК, нутрицевтики). Здесь важнее то, что в йогурты вводятся и сохраняются живые клетки-пробиотики (ПКБ, наряду с бифидобактериями), которые как живые клетки, попадая в организм человека, могут функционировать (по-разному) в его ЖКТ.

1.2.Микробиологическая защита пшеничного хлеба от «картофельной болезни» с помощью Propionibacterium freudenreichii.

Хлеб - важнейший продукт питания народов Европы, Америки, Азии и других континентов. Исключение составляют народы, употребляющие рис вместо хлеба (Китай, Япония и др.). Его сохранность устойчивость к микробной деструкции (порче) всегда актуальна. В теплых и влажных краях даже свежевыпеченный хлеб очень быстро (в течение 2-х суток хранения) заболевает «картофельной болезнью», обусловленной развитием гнилостной микробиоты в мякише, которое превращает его в слизистый сгусток(рис. 6). Это обусловлено присутствием в муке спор бактерий *P.Bacillus (B. subtilis,B. mesentericus, B. Cereus* и др.) в концентрации 10 - 1000 на 1 г муки. При их прорастании происходят большие потери хлеба [Pelshenke, 1950; 1954; Воронцова, 1971 (а, б); Kaur, 1986; Богатырева и др., 1993; Odame-Darkwah, Marshall, 1993; Suomalainen, Mayramakinen, 1999; Богатырева, 2000, Pepe et al., 2003].

В ряде «теплых» стран, в том числе в Южной Африке и Испании, исследуют эффекты органических кислот химического происхождения (уксусная, молочная, пропионовая кислоты, их кальциевые соли, а также композиции солей) с целью применения для защиты хлеба при сохранении активности дрожжей. Наибольший положительный эффект проявил пропионат кальция [Pattisonetal., 2003]. При этом в США уже производят хлеб длительного хранения, который содержит химический пропионат (он

продается и в Москве). Отметим, что в России давно, [Моргун и др., 1973] был предложен защитный химический препарат против бациллярного поражения хлеба на основе ацетата натрия - аналог «Ропала», выпускаемого в ФРГ фирмой «Берингер Зон». Против поражения хлеба мицелиальными грибами предлагают использовать также сорбат калия [Guynotetal., 2005(a)],действие которого сравнивали с таковым бензоата и пропионата при pH в области 4,5 - 5,5 и установили, что химический сорбат калия предпочтителен [Guynotetal., 2005 (b)].

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

С одной стороны, имеется возможность ввести непосредственно в тесто готовый биопрепарат ПКБ, отдельно полученный в специальном производстве, а с другой — применять закваску. Заквасочный способ имеет дополнительные преимущества он экономичен и технически удобен (не является трудоемким нет необходимости создавать отдельное производство биопрепарата при участии специального обслуживающего персонала; используется то же сырье, что и для приготовления теста).

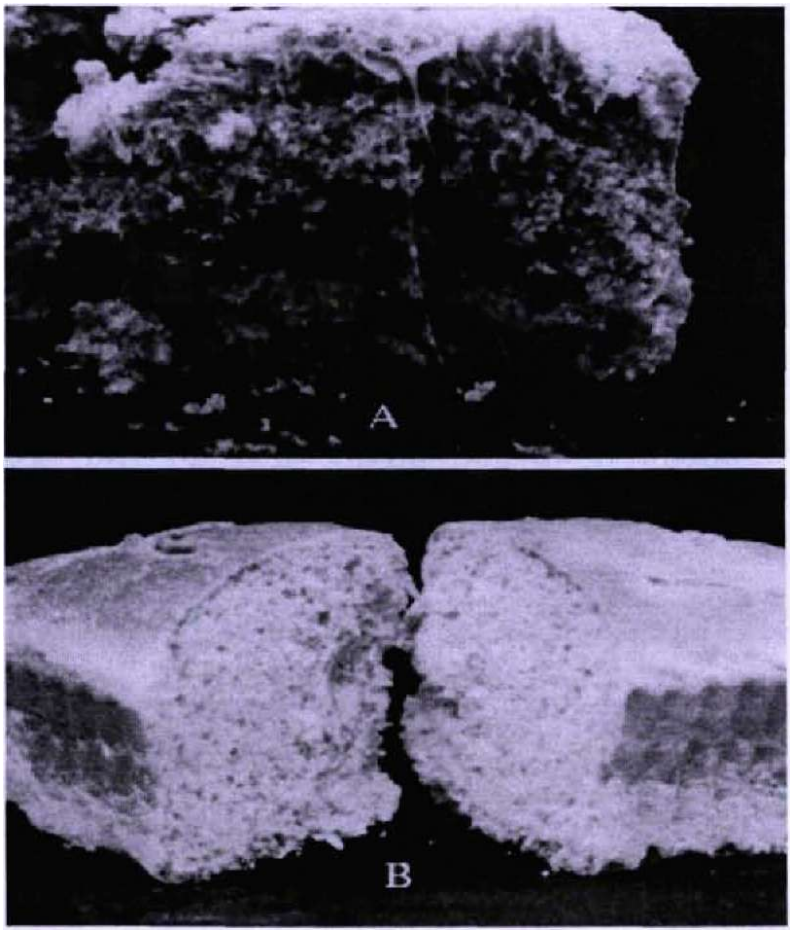


Рис. 1. Визуальное обнаружение «картофельной болезни» пшеничного хлеба [Pepe et al., 2003]

Этот способ накопления антимикробного препарата можно применять непосредственно на хлебозаводах, но при одном условии возможности культивировать бактерию как источник экзометаболитов на мучной среде. Подходы для борьбы с "картофельной болезнью" ранее разрабатывались: существует заквасочная технология с использованием некоторых штаммов молочнокислых бактерий, выделяющих молочную кислоту [Афанасьева, 2003; Богатырева, 2000; Pepe et al., 2003]. Однако, пропионо- вокислые бактерии, образующие пропионаты, считаются более перспективными антибациллярными агентами.

Пропионовокислые бактерии (ПКБ) известны как активные продуценты пропионовой кислоты (ее солей) и ряда других антимикробных факторов уксусной кислоты, диацетила, пропионицинов. Показано, что экзо-метаболиты ПКБ способны активно подавлять рост бацилл. Вместе с тем

ПКБ слабо подавляют рост таких микроорганизмов, как дрожжи и молочнокислые бактерии, используемые в хлебопекарном производстве [Odame-Darkwah, Marshall, 1993; Данилова и др., 2006].

Первые попытки применения ПКБ в хлебопечении с целью микробиологической защиты пшеничного хлеба от плесневания и «картофельной болезни» за счет выделяемых кислот (уксусной и пропионовой) были предприняты еще в. 50-х годах прошлого века [Pelshenke, 1950; Pelshenke, 1954 а, б]. Автор приготовил закваску (т.е. предварительно инкубировал ПКБ неизвестного штамма на мучной среде без пассирования), ввел её в тесто, содержащее дрожжи. Хлеб после выпечки имел повышенную устойчивость к микробному поражению.

Исследования далее продолжались в Польше, Финляндии, России, и других странах [Воронцова, 1971 (а, б); Majehrzak et al, 1977; Kaur, 1986; Javanainenetal., 1987; Al-Zorekyetal., 1991; Богатырева, Иордан и др., 1993; Odame-Darkwah, Marshall, 1993; Suomalainen, Mayramakinen, 1999; Богатырева, 2000; Данилова и др., 2006]. Результаты научных исследований, полученные вышеперечисленными авторами, подтверждают целесообразность применения ПКБ для микробиологической защиты пшеничного хлеба от «картофельной болезни».

Так, установлено [Javanainen et al., 1987], что классические ПКБ (разные штаммы *P. freudenreichii, P. acidipropionici, P. jensenii=technicum)* способны осуществлять пропионовокислое брожение с образованием пропионовой (0,34%) и уксусной кислот на мучной среде (pH 7,0) после её обработки а-амилазой и добавления солей: сульфата аммония, фосфата калия, хлористого кальция, сульфата магния, а также дрожжевого экстракта. Образованные кислоты нейтрализовали с помощью порошка карбоната кальция. Рост бактерий на мучной среде не оценивали, но наблюдали подавление образования ЛЖК *P. Acidipropionici* в присутствии *L. Plantarum* (в смешанной культуре); при этом в среде возрастала концентрация лактата.

Комбинации отдельно выращенных *Lactobacillus rhamnosus* LC705 и *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermaniiJ* S(10^8/г клеток в тесте) были эффективны против развития бацилл и плесени в хлебе [Suomalainen, Mayramakinen, 1999].

Ранее,- еще в, 1993 году, американские исследователи пытались решить проблему потери хлеба в развивающихся странах, используя пропионовокислые бактерии в тесте. Для этого исследовали взаимодействия между *P. Freudenreichii* ssp.*shermanii, B. pumilus* и *Saccharomyc escerevisiae.* Дрожжи как главный стартерный микроорганизм не должны были «страдать» от воздействия ПКБ. Испытания проводили при использовании полусинтетической среды и установили, что прорастание спор и рост вегетативных клеток бациллы сильно- подавлялось (бактериоцидное действие прежде всего на прорастание спор) после предынкубирования на ней ПКБ при 30°С в течение 13 часов. Дрожжи при этом были полностью жизнеспособны в. присутствии ПКБ [Odame-Darkwah, Marshal, 1993].

Влияние ПКБ на рост дрожжей могло быть отрицательным (соотношение клеток в инокуляте - 40:1), нейтральным (соотношение 12:1) или позитивным (соотношение 3:1). Также было показано, что культуральная жидкость молодой (18-24 ч роста) культуры ПКБ стимулирует рост дрожжей. Антимикробный агент ПКБ, пропионат, вплоть до концентрации 1,5% позволял дрожжам рати, но полностью подавлял развитие бацилл. Последнее является опеделяющим в применении пропионата (в том числе в составе культур пропионовокислых бактерий) для защиты хлеба от «картофельной болезни» [Данилова и др., 2006].

Показанные выше эффекты ПКБ в защите хлеба должны быть учтены и применены в производстве хлеба. Однако, для применения в реальном производстве важны не только эффекты, но способы и технологические параметры введения препарата в тесто (концентрация инокулята, концентрация пропионата, ингрaдиенты среды, их концентрации и т.д.). Это особенно важно для крупномасштабного производства.

Можно получать пропионовую кислоту/пропионаты микробиологического происхождения, и вводить их в тесто в нужной концентрации для защиты хлеба от бациллярной атаки. Однако экономичнее не удалять клетки, а использовать цельную культуру ПКБ, тем более, что она содержит нутрицевтики, выделяемые ПКБ. Можно вырастить культуру ПКБ отдельно на подходящей среде, затем ее сконценрировать и ввести в тесто в соответствии с необходимой концентрацией пропионатов. Но это требует отдельного производства (цеха) и дополнительных затрат труда.

Особенностью и традицией хлебопечения в России является применение так называемых заквасок, вносимых в дрожжевое пшеничное тесто в момент его замешивания. Закваски - это, по сути, продукт предварительного инкубирования заваренной и осахаренной пшеничной муки с определённым микроорганизмами или их композициями. Технология заквасок успешно развивалась в СССР и актуальна в современном производстве,

поскольку ведет к позитивным результатам как в отношении качества хлеба, его биологической ценности, так и удешевлению производства [Афанасьева, 2003; Богатырева, 2000]. До середины 80-х годов для этой цели применяли только чистые культуры молочнокислых бактерий. Образование ПКБ пропионатов в закваске послужило основой для разработок способов защиты хлеба с помощью пропионовокислых бактерий. Они должны развиваться на мучной среде, причем так, чтобы было реально периодическое двукратное разбавление свежей средой по крайней мере в течение суток. Вместе с тем оказалось, что развитие ПКБ, в отличие от МКБ, на мучной среде затруднено (лимитировано).

По данным Воронцовой [1971 (б)] ограниченное перидическое культивирование ПКБ было возможно только на весьма «богатой» и при этом стерилизованной мучной среде. Мучную среду обогащали глюкозой (1,5%), прессованными дрожжами (2%), кукурузным экстрактом (0,5%), гидрофосфатом калия **(**K_2HPO_4**,** 0,2%) и нейтрализовали до pH = 7,0.

Для производства хлеба эти условия - уже существенное удорожание, включая стерилизацию среды в большом объёме. При этом пшеничная мука, надо принять к, сведению, содержит аминокислоты, в том числе-незаменимые, витамины и микроэлементы [«Химический состав пищевых продуктов» М.Пищевая промышленность. 1979; 247с.], что должно было обеспечивать рост ПКБ без какого-либо обогащения заваренной и осахаренной мучной среды.

Сотрудники кафедры микробиологии МГУ и ГосНИИ Хлебопекарной промышленности (Россельхозакадемия) в свое время [Богатырева и др., 1993; Богатырева, 2000] предложили заквасочный способ введения ПКБ в дрожжевое пшеничное тесто. Он обеспечивал: 1) значительное увеличение устойчивости пшеничного хлеба к заболеванию «картофельной болезнью» даже по сравнению с МКБ; 2) улучшение его органолептических свойств (сдобный аромат и вкус); 3) увеличение объема хлеба(рис. 7); ускорение созревания теста, т.е. снижение расхода прессованных дрожжей. Способ включал: введение в мучную среду (осахаренную «заварку») активированной после лиофилизации ПКБ*(P. Freudenreichi i*ssp. *Shermanii* ВКМ 103) в количестве 200-400 мг (АСБ) на 100 г мучной среды, которая на первых этапах была дополнена кукурузным экстрактом и хлористым кобальтом (последний важен для биосинтеза витамина B_{12}), инкубирование и двукратное разбавление первичной закваски свежей мучной средой в несколько этапов.

Позже стало понятным, что можно снизить концентрацию соли кобальта на порядок, поскольку для пропионовокислого брожения достаточны малые количества внутриклеточных корриноидов (1,0 — 10 мкг/г АСБ) по сравнению с естественным высоким (1000 мкг/г АСБ) уровнем их образования в клетках бактерии. Последний достижим при концентации соли кобальта в среде ОД мг/л [Рыжкова, 2003].

Предложенный способ был испытан на многих (14-ти) хлебозаводах России и стран СНГ с положительным результатом. Однако в

производственных условиях возникала проблема нестабильности ПКБ-«закваски» при длительном ее ведении, а именно при многократном разбавлении вдвое свежей мучной средой («заваркой» без обогащения) с целью накопления нужного количества «закваски». Ценные свойства «закваски» постепенно утрачивались в результате, по-видимому, «вымывания» клеток ПКБ при разбавлении мучной средой. Это означало, что минимальная мучная среда (оМПЗ, т.е. осахаренная мучная «заварка» без добавок) не обеспечивает воспроизведение культуры ПКБ в накопительном производственном режиме.

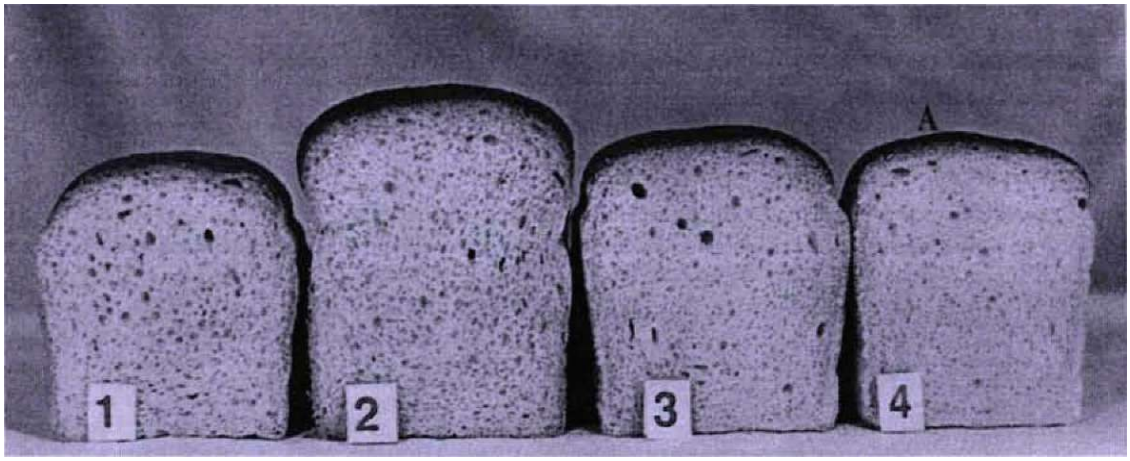


Рис. 2. Визуально наблюдаемое качество хлеба при использованиизаквасок разных типов обозначения:

1. Стандартная дрожжевая закваска

2. ЗакваскасПКБ(Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii ВКМ 103)

3. Закваска типа «жидкие дрожжи»

4. Закваска с молочнокислыми бактериями

Последовательное культивирование МКБ и ПКБ на мучной среде теоретически возможно, поскольку лактат является естественным субстратом для развития ПКБ (трофическая цепь, действующая, например, при созревании твёрдых сыров высшего качества), а мучная среда может быть модифицирована благодаря активным протеолитическим ферментам МКБ. По данным Пивето с сотрудниками термофильная МКБ — *Lactobacillus helveticus*,стимулирует рост *P. Freudenreichii* на молочной

среде благодаря образованию ею особых пептидов из казеина молока [Piveteau et al., 2002].

В связи с вышесказанным целью настоящей работы явилось обнаружение действия исследуемых штаммов классических пропионовокислых бактерий (*P.Propionibacterium*) в качестве пробиотиков, начальное изучение их пробиотически значимых свойств и разработка новых способов защиты пшеничного хлеба от гнилостного поражения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

ГЛАВА II. Разработка способов применения *P. Jreudenreichii* для защиты пшеничного хлеба от «картофельной болезни», вызываемой развитием бацилл.

Объекты, материалы и методы исследования.

2.1. Оценка антиоксидантной активности жидких культур штаммов *P. freudenreichii* RVS-2-ims (I Pr 2) и *P. freudenreichii* RVS-4-Irf-(II, Pr 4).

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

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

Электрохимическая ячейка прибора представляет собой стеклянный резервуар, в который последовательно помещают фоновый электролит и анализируемые образцы биопрепаратов. В качестве фонового электролита был выбран фосфатный буфер (pH 6,86). В электрохимической ячейке находится индикаторный ртутно-пленочный электрод, хлорид-серебряный электрод сравнения и хлорид-серебряный вспомогательный электрод. Объемы отбираемых проб составляют 0,1; 0,5 и 1,0 мл. Образцы перемешиваем с помощью магнитной мешалки.

Антиоксидантную активность образцов определяем используя метод катодной вольтамперометрии, а именно процесс электровосстановле-ния кислорода, ЭВ O_2. В его основе лежит модельная реакция ЭВ O_2, протекающая на индикаторном электроде по механизму, аналогичному восстановлению

кислорода в тканях и клетках организмов, способных к кислородному дыханию.

В данном способе регистрируется одноэлектронное восстановление кислорода с образованием активных кислородных радикалов (0_2). Предполагается, что антиоксиданты, имеющие восстановительную природу, реагируют с кислородом и его активными радикалами на поверхности индикаторного электрода, что отражается в уменьшении катодного тока ЭВ O_2 на ртутно-пленочном электроде в области потенциалов от 0 до - 0,7 В. Описанным выше вольтамперометрическим методом исследуем антиоксидантные свойства образцов двух анализируемых культур ПКБ и среды, на которой культировали бактерии, в качестве контроля. Рассчитываем значения кинетического критерия антиоксидантной активности для исследуемых образцов жидких культур ПКБ.

В этой части работы использовали штамм *P. freudenreichii* RVS-4-irf (Pr 4) как наиболее активный по кислотообразованию и синтезу корриноидов, который в лаборатории культивируется на одной из сред:

Среда пСС-Б (г/л): глюкоза - 25; триптон (пептон) - 1,0; $(MH_4)_2SO_4$ - 3,0; KH_2PO_4 - 1,0; $MgS0_4$-$7H_20$ - 0,25; кукурузный экстракт - 1,0; микроэлементы (мг/л): $MnS0_4$ -$5H_20$ - 5,0 или $MnC1_2$-$4H_20$ - 4,0; $ZnS0_4$-$7H_20$ - 0,01; $FeC1_3$-$6H_20$ - 0,005; $CoC1_2$*$6H_20$ - 0,1 мг; вода дистиллированная; pH 6,8-7,0.

Среда В отличается от пСС-Б тем, что кукурузный экстракт заменяем тремя витаминами и содержит (мкг/л): пантотенат кальция — 1000; тиамин-200; биотин 1,0.

Мучная среда 1 (оМПЗ) или «осахаренная» мучная пшеничная заварка. Для приготовления оМПЗ пшеничную 2 сорта заваривают водой с температурой 85 - 90° С (соотношение мука : вода= 1:3). После охлаждения заварки до 55°С вносятся ферментные препараты а-амилазы (Bakezyme P500BG, пр-во фирмы DSM, Германия) и глюкоамилазы (Bakezyme AG800BG, пр-во фирмы DSM, Германия) в количестве 0,001% и 0,01% к

массе муки в заварке соответственно. Продолжительность осахаривания при температуре 55° С 1,5 часа.

Мучная среда 2 (МС 2)

Среду готовят путем заваривания муки кипящей дрожжевой водой (Практикум по микробиологии, 2005) в том же соотношении и после охлаждения обрабатываем амилазами, как описано выше, а также протеолити- ческими ферментами (DSM Bakery Ingredients; Bakezyme B 500 (нейтральная бакт. протеаза); дозировка: 0,5 - 3,0 г/100кг.

Экстракт мучной среды (ЭМС)

Для приготовления ЭМС мучную заварку, оМПЗ, центрифугируем на центрифуге Beckman (США) 45 мин при 9 тыс. об/мин. Полученный супернатант ещё раз центрифугируют 30 мин при 9000 об./ мин. В результате получаем прозрачный раствор, сводный от нерастворимых веществ оМПЗ. Культивирование *Pfr* на среде пСС-Б проводим в пробирках 20х2 см при заполнении их 20 мл среды при свободном доступе воздуха. Температура культивирования составляет 30°С.

КЖ *Pfr* Рг 4 получаем центрифугированием культуры при 30000g в течение 15 мин, стерилизуем фильтрованием через мембранный фильтр «Synpor» №6 («Chemapol», Чешкая Республика) и вводили в ЭМС в количестве 10% (по объему). ЭМС содержит споры *B. subtilis* 40 и *B. cereus* 9 в момент посева. Контролями служат варианты без добавления КЖ, но с добавлением стерильной среды (контроль на изменение объема).

Световую микроскопию фиксированных окрашенных препаратов бактерий на мучной среде, проводят с помощью микроскопа Laboval-4, Zeiss, Germany. Компьютерное изображение получаем с помощью микроскопа Axioskop (Zeiss, Germany) системы автоматического анализа изображений KS 300, Zeiss (Germany). Увеличение при съемке х1000.

Статистическую обработку полученных результатов выполняют с % применением разных подходов в зависимости от количества повторных измерений. Среднее арифметическое значение со стандартным отклонением

вычисляют в опытах с большим количеством вариант (программа SigmaPlot 3.02). Медиану (Me), т. е. среднее по величине показание, с максимальным отклонением (в %), используют в экспериментах с тремя повторностями [Венчиков, Венчиков, 1974].

Классические («молочные») пропионовокислые бактерии *P.Propionibacterium)* служили объектами настоящей работы. Изоляты получены из «Швейцарского» сыра (Швейцария) в конце 80-х годов и фенотипически охарактеризованы как пропионовокислые бактерии в группе Е.П. Рыжковой (каф. микробиологии, МГУ имени М.В. Ломоносова). Изоляты (колонии) получали в анаэробных условиях на твёрдой селективной среде, содержащей лактат натрия, триптон, дрожжевой экстракт и соли по предложенному ранее методу [Cummins, Johnson, 1981].

Штаммы обладают общими свойствами, но их колонии различаются по цвету и размерам, а клетки по форме и размеру, физиолого-биохимически они различны по потребности в углеводах и ростовых факторах, несколько различаются их молекулярные характеристики: молярный % ГЦ-пар в ДНК.

Общие свойства: аэротолерантные анаэробы (или микроаэрофилы, что проявляется на жидких средах), грамположительные плеоморфные неподвижные палочки, лежащие под углом друг к другу («прищепки»), не формируют спор. Культуры образуют пропионовую и уксусную кислоты (соотношение ПК:УК ~ 2:1), синтезируют корриноиды, сбраживают моносахара, глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу, а также лактат, пируват, глицерин. Разжижения желатина нет (под вопросом штамм №7). Все штаммы каталазоположительны. ДНК хромосом имеет высокий молярный процент ГЦ-пар. Некоторые штаммы сраживают лактозу. Культуры растут на жидких средах при свободном доступе воздуха (без перемешивания). Оптимальное заполнение сосуда - 70% по объему. Оптимальная температура для роста 28-30°С. Клетки погружаются в толщу жидкости (на вторые-третьи сутки роста вблизи поверхности жидкой среды образуется

прозрачное «кольцо» среды). Растут на поверхности твердых сред в анаэробных условиях.

Культурально-морфологические и некоторые другие различия позволяю подразделить изоляты *Propionibacterium* на 7 штаммов: Pr1 - Pr 7.

Pr1: клетки - палочки размером 0,6 х 2-3 мкм, колонии гладкие выпуклые с ровными краями бежевого оттенка размером 0,8-2,0 мм. Проявляют слабый рост на среде с лактозой и отсутствие роста на средах с крахмалом, мальтозой и сахарозой. Способен расти на средах с рамнозой, ксилозой и рафинозой. Образует мало кориноидов (30 - 50 мкг/г АСБ). Восстанавливает нитраты до N_2.

Pr2: палочки размером 0,5 х 1-3 мкм (среди них есть более длинные, до 3-5 мкм, с редким ложным ветвлением). Колонии гладкие выпуклые блестящие с ровными краями кремового оттенка размером 1,0-2,0 мм. Клетки погружаются в толщу жидкости, на дне пробирки формируется-рыхлый «клубок» биомассы. Культура сбраживает лактозу с активным кислотообразованием. Клетки чувствительны к лизоциму, содержат корриноиды (соединения группы витамина B_{12}): 600 - 800 мкг/г АСБ. Не восстанавливает нитраты. Содержание Г+Ц пар в ДНК = 67,1 (мол. %).

Pr 3: типичный размер клеток 0,5 х 1-2 мкм (встречаются длинные, до 3-5 мкм, иногда ветвящиеся неровные палочки). Колонии гладкие выпуклые блестящие с ровными краями светло-коричневого оттенка размером 0,8 - 2,0 мм. Штамм хорошо растет на лактозе. Рост на мальтозе, сахарозе и крахмале отсутствует. Образует корриноиды ~ 500 мкг/г АСБ. Не восстанавливает нитраты.

Pr4 : неровные палочки, короткие (0,5 х 1-2 мкм), лежат под углом друг к другу без ветвления. Колонии гладкие выпуклые блестящие с ровными краями ярко розового цвета размером 0,8 - 2,0 мм. Штамм термоустойчив, выдерживает 52 - 55°С. Устойчив к NaCl (растет до концентрации 2%). Оптимальная концентрация глюкозы 2-4 %. На лактозе (мальтозе, сахарозе, крахмале) не растёт. Активное кислотообразование.

Образует корриноиды (много) 1 ООО мкг/г АСБ и более. Не восстанавливает нитраты. Содержание Г+Ц пар в ДНК = 68,0 (мол. %).

Рг 5: неровные палочки достаточно длинные, до 3 мкм в длину. Колонии желтоватые, блестящие округлые до 2 мм в диаметре. Культура[1] не сбраживает лактозу, а также: мальтозу, сахарозу и крахмал. Образует корриноиды (~ 200 мкг/г). Нё; восстанавливает нитраты. Молярный процент Г+Ц пар в ДНК = 66,0.

Рг 6: короткие неровные палочки (0,5 х 1,0 мкм). Колонии коричневые или красные, блестящие округлые (1-2 мм). Лактозу сбраживает, однакофост слабый: Hat других; дисахаридах; (мальтозе; сахарозе) и^ крахмале не растёт. Образует корриноиды (до 150 мг/г АСБ). Нитраты не; восстанавливает; Желатину не разжижает. Молярный процент Г+Ц пар в ДНК = 67,5.

Рг 7: короткие искривленные неровные: палочки (0,5 х 1,0 -1,5 мкм); без ветвления. Колонии кремовые, блестящие округлые (1-2 мм в диаметре). Культуры не используют лактозу в качестве источника углерода и энергии (а также мальтозу, сахарозу и крахмал). В клетках накапливаются корриноиды (до 800 мг/г АСБ). Желатину, возможно, разжижают. Нитраты восстанавливают.

2.2.Разработка способов применения*P. Jreudenreichii* для защиты пшеничного хлеба от «картофельной болезни», вызываемой развитием бацилл.

Выше мы показали, что исследуемые штаммы *P. Jreudenreichii (P/г),* выделяя в среду пропионовую кислоту/пропионаты и бактериоцин-подобные вещества (БПВ), эффективно подавляют развитие бацилл *B. siibtilis* и *B. cereus.* Именно эти гнилостные бактерии ответственны за порчу пшеничного хлеба, вызывая его «картофельную болезнь» (КБ).

Традиционная микробиологическая защита хлеба состоит в ведении в дрожжевое тесто молочнокислых бактерий. Молочная кислота (и низин)

препятствуют развитию гнилостной микробиоты, однако действуют они только в кислых условиях (pH 3,5 - 4,5). Пропионаты и БПВ, в отличие от лактатов активны в нейтральной среде, хотя и в кислой среде пропионовая кислота в сочетании с уксусной, по литературным сведениям, - более сильный АНМФ, чем молочная [Taniguchi e1 a1., 1998]. При этом ранее в нашей лаборатории было показано, что *S. cerevisiae* — стартерная культура в производстве пшеничного хлеба, подобно МКБ проявляет устойчивость к пропионату [Данилова и др., 2006]. Все это делает перспективным применение ПКБ для защиты хлеба от гнилостной микробиоты. Важно также то, что Р/г, в отличие от МКБ, образует ряд веществ стимуляторов, ароматизаторов и нутрицевтиков-метабиотиков (см. табл. 1), которые обогащают хлеб, среди них витамины группы В, в том числе фолиевая кислота и витами B_{12}.

В обзоре литературы описаны ранние исследования, разработки и испытания в производственных условиях, направленные на применение ПКБ для защиты хлеба. Общим заключением явилось то, что ПКБ целесообразно использовать для этой цели. Задача состоит в разработке экономичного и удобного для производства способа внесения ПКБ в тесто перед замешиванием и инкубированием дрожжей (обычно около 1,5 ч).

В предварительных исследованиях устанавливаем технологически значимые параметры действия исследуемых ПКБ в защите пшеничного хлеба от КБ. Были определены действующие концентрации пропионата натрия (90% подавление развития бацилл) на мучной среде. Они оказались более высокими, чем на пСС-А,Б. Вместе с тем, стало понятным, что чем «богаче» среда, тем выше действующая концентрация пропионата, что не является неожиданным. Пропионаты в мучной среде эффективны против бацилл в концентрации 0,24 - 0,30 %. Далее подтверждаем, что культуральная жидкость *P. Freudenreichii* действительно эффективно (на 90%) подавляет развитие бацилл при условии ее внесения в мучную среду в количестве не менее 20 %. Измерение концентрации ЛЖК показывает, что

при этом в мучной среде содержится 0,183% пропионата и 0,09% ацетата натрия, и этого оказалось достаточно для подавления прорастания спор бацилл. Наконец, учитывая безопасность классических ПКБ и их потенциальную пробиотическую значимость для человека, предложено не отделять клетки от культуральной жидкости, а использовать цельные культуры для внесения в тесто. Результаты представлены на рисунках 3.

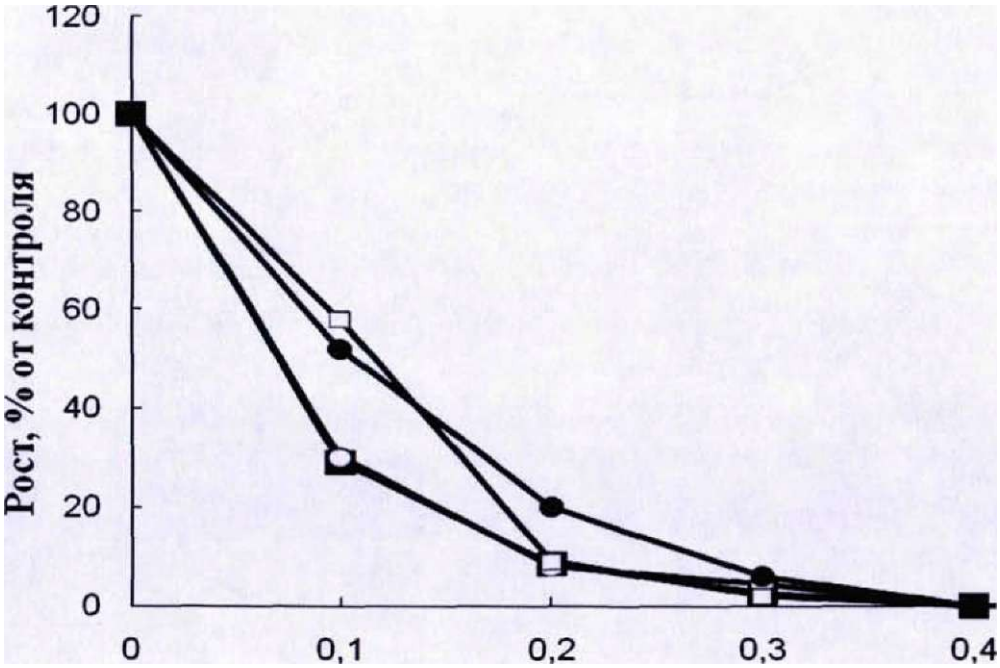


Рис. 3. Влияние химического пропионата-Na на рост *B. Subtilis* и *B. Cereus* на модельной мучной среде (ЭМС) из спор 25 спор/мл *B. Subtilis* в момент посева(о); 25 спор/мл *B. cereus*в момент посева); 250 спор/мл *B.cereus* в момент посева (•); 250 спор/мл *B. subtilis*в момент посева(▪).

В качестве модельной мучной среды используем водный экстракт оМПЗ, обработанной амилолитическими ферментами (ЭМС). Как видно из полученных результатов(рис. 3),90% подавление роста *B. Subtilis* достигалось при концентрации пропионата> 0,2 % при разном количестве вводимых спор (от 25 до 250 спор/мл среды). Такое количество спор бацилл

обычно обнаруживают в пшеничной муке второго сорта. Споры **B. *cereus*** оказались более устойчивыми к пропионату, чем споры ***B. subtilis.***

Для исследования влияния экзометаболитов *P. Freudenreichiii* на рост *B. subtilis* была использована культуральная жидкость (КЖ) 4-х суточной культуры ПКБ, выращенной на ГКС. Результаты исследования показывают, что действие КЖ почти не зависит от количества внесенных спор в пределах 25- 250 (спор/мл). При внесении КЖ (20% об./об.) к ЭМС, содержащую споры бацилл, наблюдали 90%-ное подавление роста *B. subtilis* (концентрация пропионата в среде - менее 0,2%). Можно видеть, что КЖ*Pfr* оказывает даже немного более сильное действие на рост *B. subtilis* ,чем химический пропионат натрия в той же концентрации. Возможно, культуральная жидкость содержит и другие вещества, подавляющие рост бацилл. Ими могут быть соли уксусной кислоты, диацетил, бактериоцины.

2.3.Способы введения пропионовокислых бактерий в пшеничное тесто для достижения защитного эффекта.

1. Культуру *P. Freudenreichii* можно вырастить на одной из подходящих для применения в производстве хлеба сред, желательно пищевой и обеспечивающей эффективный рост биомассы и образование ЛЖК; затем, не отделяя клетки, культуру (клетки ПКБ + экзометаболиты в КЖ) ввести в дрожжевое тесто при замесе. К таким средам относятся, во-первых, ГКС или пСС-Б и во-вторых, вновь разработанные в нашей лаборатории натуральные среды, представляющие собой А. - обогащенную кукурузным экстратом (2%) лактозную сыворотку (для штамма Рг 2); обезжиренное молоко, обогащенное кукурузным или дрожевым экстрактом, после предварительного культивирования одной из МКБ: *L. acidophilus, L. bulgaricus, L. Helveticus* или *S. Thermophilus* (образование ПК до 1,4%); Б. - обогащенный экстракт мучной среды (ЭМС) с добавлением дрожжевого экстракта и других компонентов: гидролизата казеина и глюкозы. Выращенные культуры можно вводить в тесто в количестве 20% без

отделения клеток, но при 10-кратном концентрировании для достижения защитного эффекта (0,2 - 0,3 % пропионата натрия к массе теста) в него достаточно ввести всего один-два процента препарата. Понятно, что эти способы не являются экономичными и удобными, т. к. среды достаточно дорогие, и требуется отдельное, независимое от хлебозаводов, производство препаратов ПКБ.

2. Привнесение в тесто компонентов той или иной среды, на которой выращена ПКБ, может и не ухудшать органолептические свойства теста (хлеба), однако само по себе обогащение хлеба дополнительными компонентами способствует росту бацилл и приводит к необходимости повышения концентраций пропионата-Ка. Поэтому был разработан способ приготовления препарата ПКБ, свободного от ростовой среды.

Культуру *P. frendenreichii* штамм Рг 4, выращенную в течение 96 часов на среде В (1 литр), центрифугировали (4000 об./мин, 20 минут), клетки суспендировали в водном растворе глюкозы (4 %, вода водопроводная, нестерильная) до концентрации клеток, равной 2,7 - 3,0 г АСБ в 100 мл раствора, и инкубировали (37°С) при периодической нейтрализации кислот (через 2 часа и более, ночь) до полного прекращения подкисления раствора. Подкисление происходило в течение 72 часов. В результате была получена суспензия клеток ПКБ в водном растворе пропионата с концентрацией 2,8 - 3,0 % (+ ацетат, соотношение 2:1, и остаточная глюкоза). А это означает, что при 10-кратном концентрировании суспензии клеток в водном растворе ЛЖК, достаточно введения примерно 1% этого препарата к весу (или объему) теста, чтобы достигнуть эффективной защиты хлеба от «картофельной болезни».

3. Экономичная и удобная заквасочная технология, которую традиционно применяют на хлебозаводах России с использованием молочнокислых бактерий, подразумевает периодическое двукратное разбавление закваски ***(культуру бактерии, предварительно выросшей на жидком тесте,***

добавляют в дрожжевое тесто при замесе до начала его созревания, т.е. "подъёма") свежей мучной средой (оМПЗ) и инкубирование в течение периода времени 18-24 ч при 30°С. Это возможно, поскольку МКБ активно развиваются на мучной среде. После накопления в достаточном количестве (в геометрической прогрессии) МКБ-закваску вносят в конечное дрожжевое тесто в количестве 10% об. к массе муки. Этот способ удобен и экономичен в условиях крупномасштабного производства хлеба, поскольку нет затрат на самостоятельное (отдельное) производство заквасочных культур в больших количествах.

2.4. Применение водного экстракта мучной среды (ЭМС) в качестве искусственной среды при разработке заквасок на основе ПКБ.

Пропионовокислые бактерии в виде биомассы, вносимой в дрожжевое тесто, оказывают выраженный положительный эффект на хлеб: его сохранность, органолептические и нутрицевтические свойства [Богатырёва и др., 1993; Богатырёва, 2000]. Однако ведение закваски, т.е. накопление ПКБ путём поэтапного разбавления свежей мучной средой (оМПЗ) затруднено, поэтому такая ПКБ-закваска сохраняет свою антибациллярную активность недолго, выдерживая несколько разводочных этапов (циклов). В процессе производственных испытаний предположили, что ПКБ на обычной мучной среде (жидкое тесто = «осахаренная» мучная заварка, оМПЗ) не размножаются, а постепенно «вымываются» из теста в разводочных циклах инкубирования-разбавления. Трудная задача настоящей работы состояла в пытке «заставить» ПКБ *(P. freudenreichii)* расти на мучной пшеничной среде, причем так, чтобы удвоение биомассы бактерии происходило в течение не более 24 часов. Это диктуется условиями хлебопекарного производства.

Действительно, мы установили отсутствие стабильного роста культуры ПКБ на ЭМС. Для преодоления этого явления, т. е. для обеспечения роста ПКБ в мучной среде, обогатили ее компонентами полусинтеческой среды

(пСС-Б) без глюкозы, но включая триптон, и добились удвоения биомассы ПКБ за 24 часа.

Данные, представленные на рис. 4, показывают циклическое (поэтапное) удвоение биомассы ПКБ на обогащённой ЭМС в нестерильных условиях после двукратного разбавления. Процедура приготовления закваски в модельной системе включала следующее: половину сырой биомассы (~ 1,5 мг/мл по АСБ) из 100 мл 96-ти суточной культуры на пСС-Б помещали в 100 мл нестерильной обогащенной ЭМС и инкубировали 24 часа. Биомасса возрастала вдвое. Затем после нейтрализации добавляли равный объём той же свежей мучной среды (pH 7,0), инкубировали и процесс двукратного разбавления/инкубирования повторяли.

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

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

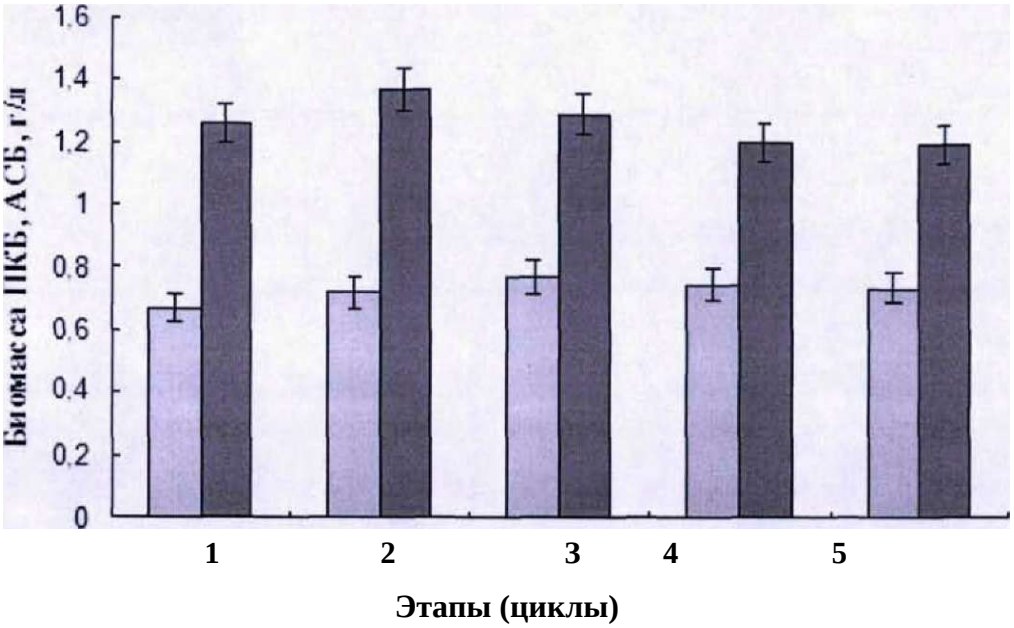


Рис. 4. Модель приготовления закваски для пшеничного дрожжевого теста на основе ПКБ путем двукратного разбавления (инкубирования) обогащенной мучной средой (ЭМС+пСС-Б). Биомасса ПКБ до инкубирования, □ ;Биомасса ПКБ после инкубирования.

В естественных условиях, т.е. на натуральной мучной среде (оМПЗ) при её обогащении с помощью компонентов среды пСС-Б пропионовокислая закваска "работала" значительно дольше, чем без обогащения, однако всё-таки не удается избежать развития в ней контаминирующих бактерий (предположительно, это МКБ *P.Leiconostoc*: очень мелкие палочки, сильно подкисляющие и ослизняющие закваску).

Эти бактерии из-за более высокой скорости роста вытесняют *Pfr*.Напомним, что к пропионату устойчивы не только дрожжи, что является благоприятным фактором в производстве дрожжевого пшеничного хлеба, но, к сожалению, в данном случае, и молочнокислые бактерии. Кроме того, нежелательно внесение в тесто компонентов среды пСС. Поэтому требовалась разработка нового подхода для получения закваски на основе ПКБ, защищенной от спонтанного развития именно МКБ.

Известно, что молочная кислота (pKa = 3,9) и высокая температура культивирования сами по себе существенны в нестерильной закваске в качестве антимикробных факторов, в том числе для подавления развития

мезофиль- ной молочнокислой микробиоты[Barefoot, Nettles, 1993; Богатырева, 2000]. Для использования этого феномена с целью достижения микробиологической чистоты в нестерильных условиях трехсуточную культуру ПКБ, выращенную на ЛКС, соединяли в МКБ-закваской в соотношении 1:1 (по объему). Последнее очень важно для длительного поэтапного процесса накопления закваски. Процесс повторяли многократно. На последнем этапе приготовления ПКБ-закваски время инкубирования увеличивали до 24 часов. На всех этапах (кроме последнего) в конце инкубирования, т. е. через20 ч, концентрация ПК/пропионата составляла 148 ± 12 мМ (1,43% по пропионату), а УК/ацетата - 78 ± 5,5 шМ (0,65% по ацетату). На последнем этапе приготовления комплексной закваски (перед внесением её в дрожжевое тесто) содержание ПК/пропионата возрастало до 190 ± 18 мМ (~ 1,8 % по пропионату), а УК/ацетата - 93 мМ ± 14 мМ (0,77% по ацетату). Полученные значения молярных концентраций ЛЖК (и их солей) соизмеримы с таковыми в модельных экспериментах.

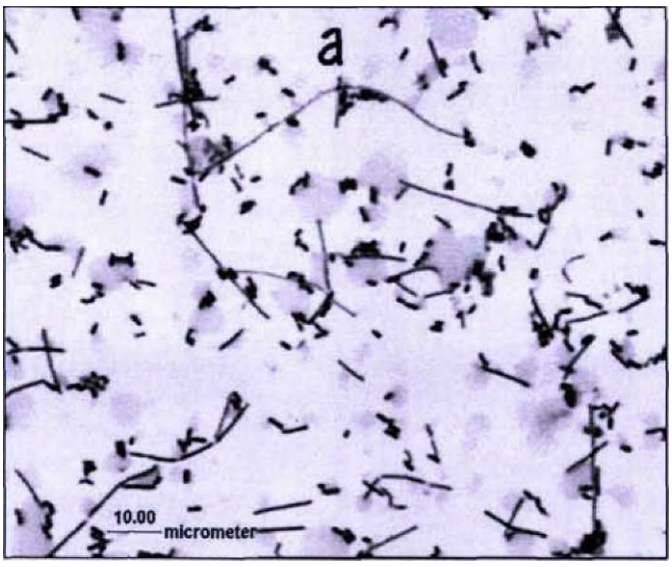


Рис.5. Световая микроскопия комплексной закваски натуральной нестерильной мучной среды (оМПЗ) на основе МКБ+ПКБ: ***а*** — первый этап накопления закваски; **б** - пятый этап

Следует отметить, что в отличие от модельного опыта на всех этапах накопления закваски на оМПЗ происходило её подкисление (примерно до pH

5,5), несмотря на нейтральный pH в начале инкубирования сразу после разбавления. Возможно, *L. Delbrueckii* способна гидролизовать крахмал и сбраживать глюкозу с образованием молочной кислоты при 30°С в отсутствие роста. Нельзя исключить также, что вновь образованная глюкоза является дополнительным источником пропионовой и уксусной кислот как продуктов брожения ПКБ. Подкисление закваски в целом благоприятно для активности пекарских дрожжей. После внесения комплексной закваски*(L. delbrieckii + P. freudenreichii)*в дрожжевое тесто, хлеб неизбежно обогащен витаминами группы В, в том числе фолиевой кислотой [Hugenholtzetal., 2002] и витамином B_{12} [Богатырева, 1993], а также пролином [Воробьёва, 1995] и свободными нуклеотидами [Иконников и др., 1982].

Качество выпеченного хлеба с применением комплексной закваски превосходит таковое не только в контроле (без заквасок), но и в опыте закваска без ПКБ, на основе только одной *L. Delbrueckii* (рис. 6). Он приобретает больший объем за счет увеличения пористости, обладает приятным кисловато-ореховым вкусом и сдобным ароматом. Сроки «противостояния» хлеба «картофельной болезни» в камере ускоренного старения материала (37°С и высокая влажность) с применением комплексной закваски (МКБ+ПКБ) увеличивались в 4,0 - 4,5 раза по сравнению с вариантом без заквасок, и в 2 раза по сравнению с закваской с использованием *L. Delbrueckii.*

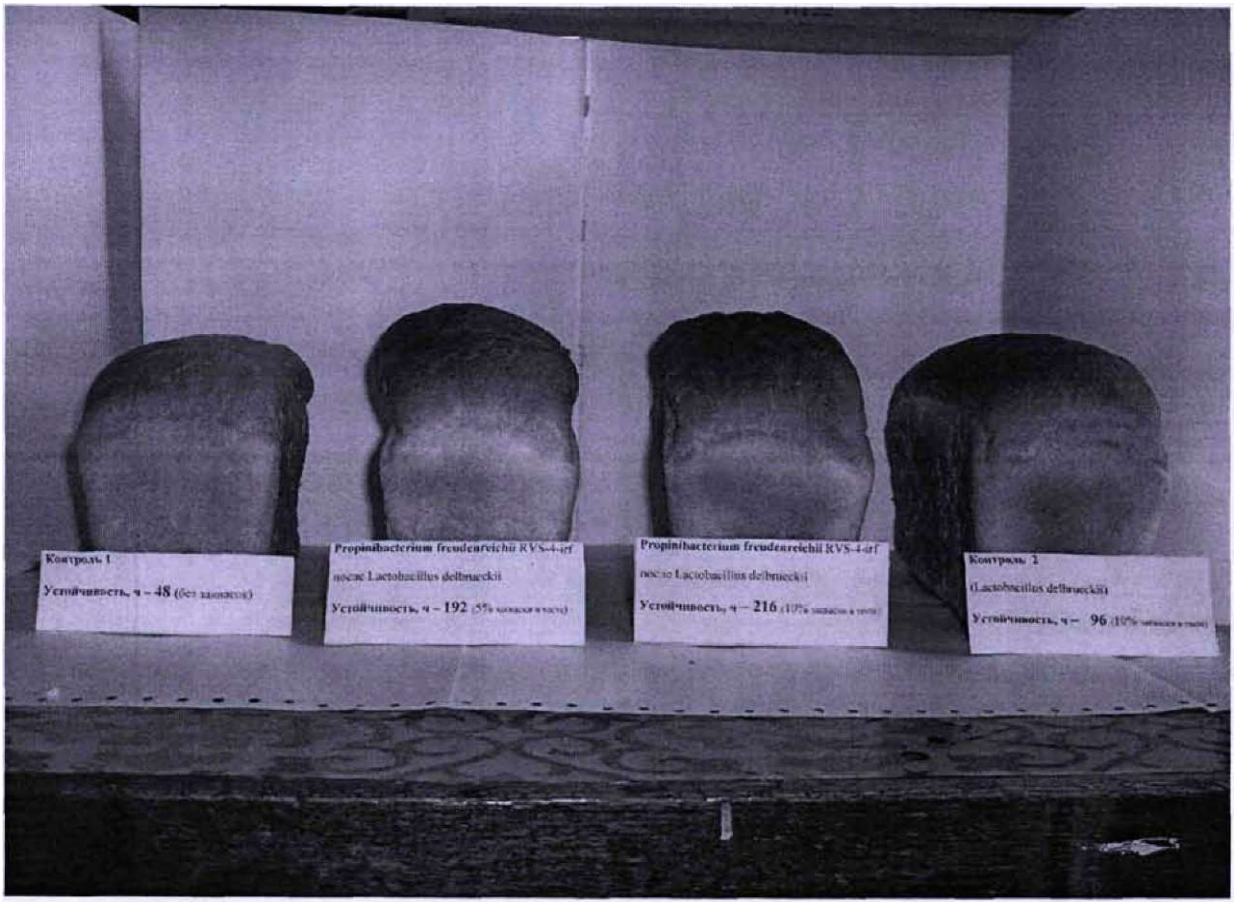


Рис. 6. Общий вид выпеченного пшеничного хлеба с применением заквасок на основе МКБ+ПКБ и МКБ (слева направо): 1 - контроль (без заквасок) - устойчивость хлеба к заболеванию «картофельной болезнью» 48 ч; 2 - закваска МКБ+ПКБ, 5% в тесте - устойчивость 192 ч; 3 - закваска МКБ+ПКБ, 10% в тесте - устойчивость 216 ч;*4* -закваска МКБ, 10% в тесте - устойчивость 96 ч.

Таким образом, в результате проведенной работы разработаны основы новой технологии защиты пшеничного хлеба от поражения гнилостной микробиотой («картофельная болезнь») с помощью комплексной накопительной закваски, получаемой путем последовательного культивирования *L. Delbrueckii* и *P. Freudenreichii* на мучной среде (на основе их кометаболизма). Такая закваска может быть накоплена в больших количествах в результате её поэтапного двукратного разбавления свежей МКБ-закваской.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ведется поиск новых штаммов, активных в отношении образования ЛЖК (пропионовой и уксусной кислот), бактериоцинов, витамина B_{12}и других биологически активных веществ. *Propionibacterium freudenreichii* является наиболее изученной и широко распространённой в природе. В сыром молоке коров и твёрдых сырах более 80% всех ПКБ составляет именно эта бактерия. Поиск новых штаммов *Pfr,*изучение их биологических свойств актуально в связи с проблемой пробиотиков. Эту бактерию в последнее время интенсивно изучают в качестве кандидата в пробиотики (пропионовокислым бактериям посвящают специальные международные симпозиумы). Сложность состоит в том, что она, по-видимому, истинным пробиотиком (эубиотиком) не является, а относится, скорее, к транзиторным.

Располагая штаммами классических пропионовокислых бактерий и их изолятов с использованием молекулярно-биологических методов и филогенетического анализа идентифицируем их как *P. Jreudenreichii* .

При этом исследуемые штаммы, имея общие признаки, заметно различаются фенотипически.

Необходимо провести более широкие испытания, пробиотического действия штаммов *P. Jreudenreichii* на млекопитающих, а также клинические эксперименты с привлечением пациентов-добровольцев.

Все исследуемые штаммы *Pjr* после их предварительного инкубирования в присутвии желудочного сока или эмульсии желчи оказываются способными к росту в жидких культурах. В модельном ЖКТ на примере штамма RVS-4-irf (Рг 4) установили, что ПКБ более чем на 60% (по logKOE/мл) сохраняет свою жизнеспособность.

Для всех семи исследуемых штаммов *P. Jreudenreichii* можно показать, что они индуцируют синтез разных цитокинов в цельной крови в сис-

темее*x vivo*.Наибольший эффект нативных клеток ПКБ проявился в отношении образования интерлейкина ФНО (фактор некроза опухолей). В целом полученные данные по стимуляции синтеза цитокинов в крови человека показывают, что клетки классических («молочных») ПКБ способны воздействовать на иммунную систему человека.

Пропионат (натрия) как основной антимикробный фактор ПКБ по разному действовал на микроорганизмы-мишени бацилы, псевдомонады и кишечная палочка были высокочувствительны (эффект ингибирования роста зависел от состава среды), а МКБ:*L. casei, L. acidophilus, L. brevis, L. fermentum, Streptococcus thermophilus,*— достаточно устойчивы. Последнее характерно и для *Saccharomyces cerevisiae*.Наблюдения (наряду с известным стимулирующим действием ПКБ на рост бифидобактерий), обращают внимание на новую проблему: избирательность действия ПКБ в отношении разных микроорганизмов, в том числе присутствующих в желудочно-кишечном тракте. Можно допустить существование сообществ пробиотиков в ЖКТ и мутуализм между ними. Эти предположения требуют соответствующих экспериментальных подтверждений.

Научные предпосылки (сведения из литературы) и полученные нами данные свидетельствуют о широком спектре свойств классической ПКБ, которые имеют значения для проявления ее пробиотических эффектов, однако испытаний для выявления пробиотического действия*P. Freudenreichii* на животных проведено немного. Расширение таких исследований на животных и пациентах-добровольцах должно стимулировать разработку и применение пробиотических препаратов на основе*P. freudenreichii*.При этом пропионовокислая культура на нестерильной мучной среде (ПКБ-закваска) не должна быть вытеснена контаминирующей микрофлорой. Эта технологическая стратегия для ПКБ оказалась возможной только на основе трофической цепи: МКБ - ПКБ. Сами по себе пропионовые бактерии, не способны к росту на мучной среде. Вместе с тем, термофильная МКБ:*L. Delbrueckii* превращает глюкозу, но

преимущественно мальтозу «осахаренного» жидкого теста (заварки), в молочную кислоту, которая, с одной стороны, подавляет развитие спонтанных бактерий (МКБ), а с другой - после превращения ее в лактат, является источником углерода и энергии для развития ПКБ. Этот простой (экономичный и удобный) способ позволил решить проблему защиты пшеничного хлеба от «картофельной болезни» при улучшении его органолептических, физических и нутрицевтических свойств. Предположительно хлеб обогащается биологически активными веществами, выделяемыми *P. freudenreichii,* а убитые нагреванием (при выпечке) клетки способны, возможно, оказывать иммунотропное действие (аналогия с *P. jensenii* 702).

ВЫВОДЫ.

1. Выявлены и частично изучены пробиотически значимые свойства исследуемых штаммов:

- иммунотропные (по стимуляции образования цитокинов в крови в системе ***ex vivo);***
- избирательно антимикробные на основе пропионатов и бактериоцин-подобных веществ, действующих в нейтральных условиях;
- антиокислительные (показано для жидких культур методом катодной вольтамперометрии);
- экзометаболитные и экзоферментные (низкое внеклеточное содержание витамина B_{12}может быть существенным в сконцентрированных препаратах; протеолитическая активность проявляется как в кислых, так и в нейтральных условиях).

2. Изучен новый способ применения *P. Freudenreichii* в заквасочной технологии производства пшеничного хлеба для его защиты от гнилостных бактерий («картофельной болезни» хлеба) он включает последовательное культивирование на мучной среде *L. Delbrueckii* и пропионовокислой бактерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Афанасьева О.В. Микробиология хлебопекарного производства. — К.: Береста, СПб Ф ГОСНИИ ХП, 2003. С. 221с.

2. Белобородова Н.В., Белобородов С.М. Метаболиты анаэробных бактерий (летучие жирные кислоты) и реактивность макроорганизма // Антибиотики и химиотерапия. 2000. № 2. С. 28-36.

3. Богатырева Т.Г. Научные основы технологий хлебобулочных изделий с направленным культивированием микроорганизмов /Автореферат докторской диссертации. М. 2000.

4. Богатырева Т.Г., Иордан Е.П., и др. Способ предотвращения заболевания хлеба картофельной болезнью /Патент на изобретение № 1608849 от 17 июня 1992. Приоритет-29 сентября 1988 г.

5. Богатырёва Т.Г., Прянишникова Н.И., Иордан Е.П. Исследование протеолитической активности молочнокислых, пропионовокислых бактерий и дрожжей, применяемых в хлебопечении // Межд. журнал Биотехнология у управление. 1994. Т. 1. № 4. С.40 -43.

6. Бонарцева Г.А. Об аэробном метаболизме пропионовокислых бактерий. Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук. М.: МГУ, 1973.

7. Брюхачёва Н.Л., Воробьёва Л.И., Бонарцева Г.А. Об* окислительном фосфорилировании у пропионовокислых бактерий // Микробиология. 1975. Т. 44. № 1. С. 11-14.

8. Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Турова Т.П., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф. // Микробиология. 2002. Т. 71. №4. С. 1-9.

9. Быховский В.Я., Зайцева Н.И. Микробиологический синтез тетрапирольных соединений. Итоги науки и техники. М.: ВИНИТИ. Серия: Биологическая химия, 1989. 176 с.

10. Венчиков А.И., Венчиков В.А. Основные приёмы статистической обработки результатов наблюдений в области физиологии. М.: Медицина, 1974. 152 с.

11. Воробьева Л.И. Пропионовокислые бактерии и образование вита мннав$_{12}$.М.: Издательство Московского университета, 1976. 264с.

12. Воробьёва Л.И. Пропионовокислые бактерии. М.: МГУ, 1995. 235с.

13. Воробьёва Л.И., Аль-Судани С., Краева Н.И. Пероксидазапропионовокислых бактерий // Микробиология. 1986. Т. 55. № 5. С. 750- 753.

14. Воронцова К.Е. (а) Влияние пропионовокислых бактерий на жизнедеятельность картофельной палочки // Хлебопекарная и кондитерская промышленность. 1971. № 4. С. 14-17. С. 206-216.

15. Воронцова К.Е. (б) Использование пропионовокислых бактерий в хлебопечении // Хлебопекарная и кондитерская промышленность. 1971. № 6. С. 10-13.

16. Галактионов В.Г. Иммунология (3-е издание). М.: Издательский центр «Академия», 2004. 528 с.

17. Данилова И.В., Богатырева Т.Г., Быковченко Т.В., Рыжкова Е.П., Положительное действие Propionibacterium freudenreichii на рост Saccharomyces cerevisiae при совместном культивировании // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т.42. №3. С. 326-331.

18. Драчева Л. В. 2007. Антиоксидантная активность пробиотическихбиоантиоксидантов // Клиническое питание. № 1-2. 39.

19. Драчева Л.В., Короткова Е.И., Дорожко Е.В. Применение вольтамперометрического метода при изучении биоантиоксидантов //Пищевая промышленность. 2008. № 4. 28-29.

20. Иконников Н.П., Иордан Е.П., Воробьева Л.И. Выделение нуклеотидов и их производных иммобилизованными клетками Propionibacterium shermanii . // Прикл. биохим. и микробиол. 1982. Т. 8. № 1. С. 34-40.

21. Иконников Н.П. Образование органических кислот, нуклеотидов и их производных иммобилизованными клетками Propionibacterium shermanii.

Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук. М.: МГУ, 1984.

22. Канопкайте С.И. Кобаламины. Вильнюс: Мокслас, 1978. 144 с.

23. Канопкайте С.И., Рачкус Ю.А. Биохимические и медицинские аспекты кобаламинов (B_{12}). Вильнюс: Academia, 1991. 267с.

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

25. Ленгерер И., Древе Г., Шлегель Г. Современная микробиология. Прокариоты (в 2-х томах). М.: Мир, 2005. Т. 1. С. 350, 383 -384.

26. Моргун К.Д., Ведерникова Е.И., Павлюк Р.Ю. Средства борьбы с картофельной болезнью // Хлебопекарная и кондитерская промышленность. 1973. № 11. С. 16 - 18.

27. Познанская А.А., Корсова Т.Л. //Успехи соврем, биол. 1980. Т. 90. № 1(4). С. 49-50.

28. Познанская А.А. Корсова Т.Л. //Успехи соврем, биол. 1984. Т. 98. № 3(16). С. 382-364.

29. Практикум по микробиологии п/р проф. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр "Академия", 2005. 606 с.

30. Рыжкова Е.П. Кобальт и корриноиды в биологии Propioibacterium freudenreichii.Автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора биологических наук. М.: МГУ, 2003.

31. Рыжкова Е.П. Лекции для студентов 4-го курса каф. микробиологии МГУ (1992-2009).

32. Рыжкова (Иордан) Е.П. Множественные функции корриноидов в биологии прокариотических организмов //Прикл. биохим. и микробиол. 2003. Т. 39. № 2. С. 133-159 (обзор).

33. Рябичева Т.Г, Вараксин Н.А., Тимофеева Н.В., Ким И.И., Нечаева Е.А. Испытания иммуномодуляторов в системе ***ex vivo II*** Новости «Вектор- Бест»

(АО «Вектор-Бест», Кольцове, Новосибирская обл., Россия ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). 2006. № 4 (42). С. 1-5.

34. Скулачев В.П. Кислород в живой> клетке: добро и зло // Природа (естественнонаучный журнал РАН). 1997. № 11. С. 26-35.

35. Стикс Г. Всепожирающее пламя // В мире науки (ScientificAmerican). 2007. № 11. С. 18-26.

36. Стоянова Л.Г., Сультимова Т.Д., Ботина С.Г., Нетрусов А.И. Выделение и идентификация низинобразующих штаммов Lactococcuslactis subsp.***lactis*** из молока // Прикл. биохим. микробиол. 2006. Т. 42. № 5. С. 560-568.

37. Суворов А.Н. Теоретические аспекты клинического использования пробиотиков // Клиническое питание (Научно-практический журнал). 2007. № 1-2. (243). С. А68.

38. Хамагаева И.С., Качанина Л.М. Кисломолочный напиток «Целебный» //Молочная промышленность. 2005. № 5. С. 66-68.

39. Шакирзянова М.Р., Рузиева В.М., Абдульмянова Л.И., Суйдаметова Э.А., Гулямова Т.Г. Способность некоторых штаммов пропионовокис- лых бактерий, выделенных в Узбекистане, к синтезу витамина B_{12} // Микробиология. 2002. Т. 71. № 4. С. 570.

40. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание (в трёх томах). Т. III. Пробиотики и функциональное питание. М.: ГРАНТЪ. 2001. 286 с.

41. Adams M.C., Huang Yang. ProbioticPropionibacterium. United States Patent 7427397 (2008).

42. Adams M.C., Lean M.L., Hitchick N.C., Beagley K.W. The efficacy of Propionibacterium jensenii 702 to stimulate a cell-mediated response to orally administered soluble Mycobacterium tuberculosis using a mouse model / Proc. Int. Symp. onPropionubacteria and Bifidobacteria: dairy and probiotic application. (INRA-STANDA INDUSTRIE, 2004). France. Saint- Malo, June 2st-4th 2004. Session 3-1. Presentation 1720.

43. Ahern W. P., Andrist D. F., Skogerson L. E. Production of fermented whey containing calcium propionate. United States Patent, 4,676,987, April 24, 1984.

44. Al-ZorekyN., Ayres J.W., SandineW.E. Antimicrobial activity of Micro-gard-against food spoilage and pathogenic microorganisms // J. Dairy Sei. 1991.V. 74. P. 758-763.

45. Ayres J. W. , SandineW. E., Weber G. H. Preserving foods using **metabolites** of Propionibacteriaother than propionic acid// United States Patent 5,096,718, March 17, 1992.

46. Babuchowski A., Laniewska-MorozL., Warminska-RadykoI. Propionibacteriain fermented vegetables // LAIT. 1999. V. 79**.** N.l**.** P. 113-124.

47. Barefoot S. F., Nettles C. G. Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures // J. Dairy Sei. 1993.V. 76. P. 2366-2379.

48. Bodie E. Propionic acid fermentation of ultra-high-temperature sterilized whey using mono- and mixed cultures // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1987. V. 25. N. 5. P. 434-437.

49. Bougie D., Roland N., LebeurrierF., Arhan P. Effect of Propionibacteriasupplementation on fecal Bifidobacteria and segmental colonic transit-time in healthy human subjects source // Scandinavian J. Gastroenterology. 1999. V. 34. N. 2. P. 144-148.

50. Bouton Y., Guyot P., Beuvier E., Tailliez P., Grappin R. Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofrementative lac-tobacilli during Comte cheese ripening // Int. J. Food Microbiol. 2002. V. 31. P. 59-68.

51. BredeD.A., Faye T., JohnsborgO., Odegard I., Nes I.F., Holo H. Molecular and genetic characterization of propionicin F, a bacteriocin from Propionibacterium freudenreichii //Appl. Environ. Microbiol. 2004 V. 70. N. 12. P. 73037310.