

Л.Л. Богданова<sup>1</sup>, С.Л. Василенко<sup>1</sup>, Д.П. Бажанов<sup>2</sup>, К.К. Яцевич<sup>2</sup>, Н.И. Петрушеня<sup>1</sup>, Л.В. Сафроненко<sup>3</sup>

<sup>1</sup>РУП «Институт мясо-молочной промышленности»,

<sup>2</sup>ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

<sup>3</sup>Министерство сельского хозяйства и продовольствия

## ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИХ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ И ПРОИЗВОДСТВЕННО-ЦЕННЫХ СВОЙСТВ

*Из различных молочных продуктов выделено 24 штамма пропионовокислых бактерий, изучены их морфологические и физиолого-биохимические особенности. Установлена таксономическая принадлежность бактериальных культур, из которых 3 штамма определены как *Propionibacterium freudenreichii*. Принадлежность штамма Pr 106 к виду *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* подтверждена на основании определения сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и их филогенетического анализа. Изучены производственно-ценные, медико-биологические свойства и антибиотикоустойчивость трех штаммов *Propionibacterium freudenreichii*.*

**Введение.** Пропионовокислые бактерии – аэротолерантные анаэробные микроорганизмы, которые широко используются в различных отраслях АПК, в частности, для получения пропионовой кислоты, используемой в пищевой промышленности и сельском хозяйстве в качестве антисептика, витамина В<sub>12</sub> (являются его активными продуцентами) и в составе бактериальных концентратов для производства твердых и полутвердых сыров с высокой и средней температурой второго нагревания (типа Маасдам, Радамер, Швейцарский). Наиболее часто в составе бактериальных концентратов для производства сыров используют штаммы *Propionibacterium freudenreichii* ssp., которые ферментируют молочную кислоту, образованную молочнокислыми бактериями в процессе сбраживания лактозы, в пропионовую и уксусную кислоты, пролин и диоксид углерода. Эти вещества придают сырам острый вкус, а образующийся в процессе брожения диоксид углерода формирует рисунок сыра [1].

Пропионовокислые бактерии обладают уникальными иммуностимулирующими и антимуtagenными свойствами, они приживаются в ки-

шечнике человека, стимулируют рост собственных лакто- и бифидобактерий и способны к снижению мутагенного действия ряда химических соединений и ультрафиолетовых лучей [2]. Под влиянием пропионово-кислых бактерий и их антигенов заметно повышается противовирусная и антибактериальная защита организма, так как они синтезируют широкий спектр антибактериальных компонентов активных в отношении энтеробактерий, анаэробных микроорганизмов, грибов [3-5]. Поэтому в последние годы для увеличения профилактического, оздоровительного воздействия кисломолочных продуктов на организм человека для ферментации молочного сырья стали использовать консорциумы пробиотических микроорганизмов, в состав которых кроме лакто- и бифидобактерий введены и штаммы пропионовокислых бактерий [6].

Целью данного исследования являлось выделение промышленно-ценных штаммов пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii* ssp., в связи с чем последовательно решали следующие задачи: выделение штаммов пропионовокислых микроорганизмов; изучение физиолого-биохимических, производственно-ценных и медико-биологических свойств выделенных штаммов, необходимых для использования культур в составе БК, применяемых для ферментации молока.

**Материалы и методы. Объект исследования.** 24 культуры бактерий рода *Propionibacterium*, выделенные из молока, молочной сыворотки и молочных продуктов.

**Среды и реактивы.** В работе использовали коммерческую среду ГМС (по ТУ 10-02-02-789.192), MRS-среду [4] и ее модификации – mMRS [8], MRS+1% фруктозы, MRS+2% фруктозы, MRS+2% дрожжевого экстракта, MRS+1% мальтозы, MRS+2% мальтозы [9], лактатную среду – стандартную [10] и модифицированную (молочная кислота заменена на L-лактат кальция), тиогликолевую среду (по ТУ 9398-040-78095326) и среду МСА [11].

Агаризованные среды содержали 0,15% агара (полужидкая, для инкубирования бактерий в пробирках) или 1,5% агара (плотная, для выращивания микроорганизмов на поверхности чашек Петри).

Для приготовления физиологического раствора в 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяли 8,5 г хлористого натрия. Стерилизовали при (121±1)°С в течение 20 мин.

**Основные методы исследования.** *Культивирование бактерий* проводили в термостате при  $32\pm 2^\circ\text{C}$ .

*Для создания анаэробных условий* использовали анаэростат GENbox Jar7L REF96128 и генератор анаэробных условий GENbox anaer (BIOMERIEUX, Франция).

*Выделение исходных культур* пропионовокислых бактерий проводили из молока, молочной сыворотки и молочных продуктов, взятых для исследований у населения, реализующего продукцию собственного производства, на рынках г. Минска (Комаровском рынке, Чижовском рынке, ТД «Ждановичи»).

*Чистые культуры* получали путем трехкратного рассева исходных культур до получения изолированных колоний на агаризованной среде ГМС.

*Определение грампринадлежности* проводили согласно [12].

*Определение наличия каталазы* проводили согласно [13].

*Определение способности бактерий ферментировать углеводы.* Бактериальные культуры выращивали в течение  $16\pm 2$  ч, после чего 100 мкл бактериальной суспензии клеток вносили в 10 мл среды ГМС, где единственным источником углерода и энергии являлся исследуемый углевод. В качестве индикатора использовали бромкрезоловый пурпурный в концентрации 0,02%. Инкубировали в течение 5–7 сут.

*Устойчивость штаммов к химическим агентам* – NaCl, желчи определяли путем внесения 100 мкл  $16\pm 2$  ч бактериальных культур, выращенных в ГМС-среде, в ту же среду, содержащую исследуемое вещество в определенной концентрации. Инкубировали в течение трех-пяти суток.

*Определение антагонистической активности бактерий.* Использовали метод отсроченного антагонизма. Для этого на поверхность агаризованной ГМС -среды в чашке Петри штрихом высевали испытуемый штамм бактерий, инкубировали в течение 48 ч при  $37^\circ\text{C}$ , после чего перпендикулярным штрихом наносили  $16\pm 2$  часовые тест-культуры условно-патогенных (*Escherichia coli*) и технически-вредных микроорганизмов (маслянокислых бактерий *Clostridium tyrobutyricum*), инкубировали в термостате в течение 48–72 ч. Об уровне антагонистической активности исследуемых штаммов судили по зонам задержки роста тест-культур [5].

Определение чувствительности пропионовокислых бактерий к антибиотикам проводили методом дисковой диффузии.

При определении активности  $\beta$ -галактозидазы пропионовокислых бактерий к 1,75 мл 0,2 М Na-фосфатного (pH 7,0) или Na-цитратного (pH 4,2) буфера добавляли 0,25 мл синтетического хромогенного субстрата (ОНФГ) и 0,5 мл культуральной среды. Реакцию проводили при 40°C в течение 15 мин, после чего останавливали добавлением 0,5 мл 1М раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и быстрым охлаждением, затем осаждали клетки при 8000 об/мин в течение 10 мин и измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при 420 нм против контроля. В качестве последнего служила реакционная смесь вышеназванного состава, все ингредиенты которой были добавлены одновременно. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин в описанных выше условиях.

Предельную титруемую кислотность, °Т определяли по ГОСТ 3624 [15] после внесения 3% культуры в стерильное обезжиренное молоко и культивировании при 32°C в течение 7 суток.

Образование сгустка определяли по наличию четкого края, повторяющего контур сосуда, в котором проводилось сквашивание, образуемого при наклоне емкости со сквашенным молоком на 45 °С.

Определение нуклеотидной последовательности гена *16S rPHK* и филогенетическую идентификацию проводили в соответствии с методиками, изложенными в [16].

**Результаты исследований и обсуждение.** Выделение штаммов пропионовокислых бактерий проводили из молока, молочной сыворотки, молочных продуктов. Отбор проб проводили на Комаровском рынке у предпринимателей, реализующих продукцию из частных хозяйств.

Для получения изолированных колоний образцы продуктов ресуспендировали в физиологическом растворе и из последовательных разведений осуществляли высевы проб в трубки Буре с модифицированной лактатной средой, содержащей в качестве источника углерода L-лактат кальция. После инкубирования в течение 8 суток для дальнейших расщеплений отбирали колонии дисковидной формы диаметром 6 мм и более, желтовато-коричневой пигментации, поскольку именно такая форма,

размер и окраска колоний характерна для пропионовокислых бактерий [17]. Путем трехкратного посева выделено 24 чистые культуры.

Полученные штаммы исследованы по культурально-морфологическим свойствам. Установлено, что при выращивании на поверхности агаризованной среды выделенные бактерии образовывали блестящие, округлые колонии желтовато-коричневого цвета. При инкубировании в толще питательной среды с содержанием агара 1,5 %, колонии имели вид гречишного зерна. При анализе микроскопических препаратов бактериальных культур показано, что при культивировании штаммов на разных питательных средах (MRS, ГМС, тиогликолевая среда) форма и размер клеток выделенных культур варьирует. При выращивании на MRS и ГМС среде клетки культур были кокковидной формы. На среде MRS клетки были гораздо крупнее и образовывали короткие цепочки. На среде ГМС клетки имели вид рисовых зерен. В аэробных условиях или в анаэробных при низких значениях рН клетки штаммов имели тенденцию к рудиментарному ветвлению, образуя местами небольшие утолщения, отростки и вздутия.

Для идентификации выделенных культур исследовали их физиолого-биохимические свойства, характеристика которых представлены в табл. 1.

Таблица 1. – Физиолого-биохимические свойства пропионовокислых бактерий

№ бактериальной культуры	Грампринадлежность *	Наличие каталазы**	Образование кислоты из: ***										
			маннита	мальтозы	арабинозы	галактозы	сахарозы	маннозы	лактозы	фруктозы	трегалозы	глицерина	сорбита
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Pr 3с-4	+	-	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Pr 3с-5	+	-	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Pr 3с-6	+	-	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
Pr 3с-7	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Pr 14/1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Pr 14/2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Pr 13/3	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-

Pr 13/4	+	-	н/о										
Pr 13/5	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Pr 13/6	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
Pr 13/7	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Pr 10 8	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Pr 106	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
Pr 110	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Pr 1c-4	+	-	н/о										
Pr 1c-5	+	-	н/о										
Pr 2c-3	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Pr 2c-6	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Pr Or	+	-	н/о										
Pr 123/1	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Pr 123/2	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Pr 9	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Pr 2	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
Pr 3	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-

Примечание: «н/о» - не определяли  
 \* «+» - бактерии грамположительные  
 «-» - бактерии грамотрицательные  
 \*\* «+» - бактерии каталазоположительные  
 «-» - бактерии каталазоотрицательные  
 \*\*\* «+» - положительный тест (изменение окрашивания среды)  
 «-» - отрицательный тест (нет изменения окрашивания среды)

Как видно из табл. 1, все выделенные микроорганизмы были грамположительными, однако для семи штаммов было установлено отсутствие каталазы. Поскольку бактерии *Propionibacterium freudenreichii*, используемые в промышленности для производства бактериальных концентратов для сыров, каталазоположительные, то указанные штаммы были исключены из дальнейших исследований.

Известно, что способность ферментировать углеводы видоспецифична. Так, бактерии *Propionibacterium freudenreichii* ферментируют фруктозу, галактозу, глицерин, маннозу и не ферментируют мальтозу, сорбит, сахарозу, трегалозу [17]. Как видно из табл. 1, такими свойст-

вами обладают только три штамма – Pr 2, Pr 3 и Pr 106. Таким образом, на основании физиолого-биохимических свойств и с учетом морфологических особенностей из 24 выделенных культур к виду *Propionibacterium freudenreichii* были отнесены только три штамма: Pr 2, Pr 3 и Pr 106, которые и отобраны для дальнейшего изучения.

Известно, что пропионовокислые бактерии относятся к трудно идентифицируемым культурам. В связи с этим для проверки правильности определения таксономической принадлежности проводили филогенетическую идентификацию штамма Pr 106 с помощью сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма Pr106 была определена на протяженности 1417 п.о. и депонирована в GenBank (номер доступа HM626365). Поиск в базе данных GenBank показал, что ген 16S рРНК штамма Pr 106 имеет наибольшее сходство с гомологичными генами бактерий рода *Propionibacterium*. При попарном сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК максимальное (99,7%) сходство штамма Pr106 было выявлено с типовым штаммом *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* DSM 4902<sup>T</sup> (номер доступа последовательности Y10819) и значительно меньшее (98,5%) - с типовым штаммом *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSM 20271<sup>T</sup> (номер доступа последовательности X53217). Сходство гена 16S рРНК исследуемой бактерии и гомологичных генов типовых штаммов других видов рода *Propionibacterium* находилось на уровне менее 95,5%. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК показал, что штамм Pr 106 входит в состав единой, обособленной от типового штамма *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ветви, которая была образована типовым штаммом *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* и относящемуся к этому же подвиду референтным штаммом CIRM-B1A1 (рис. 1).

Дерево построено с помощью программы MEGA4 [18] по алгоритму объединения соседей. Блок выравнивания содержит 1347 нуклеотидов. Значения бутстрапа вычислены на основании анализа 1000 деревьев. В скобках приведены номера доступа последовательностей в GenBank. Линейка соответствует 0,01 замене на нуклеотидную позицию.

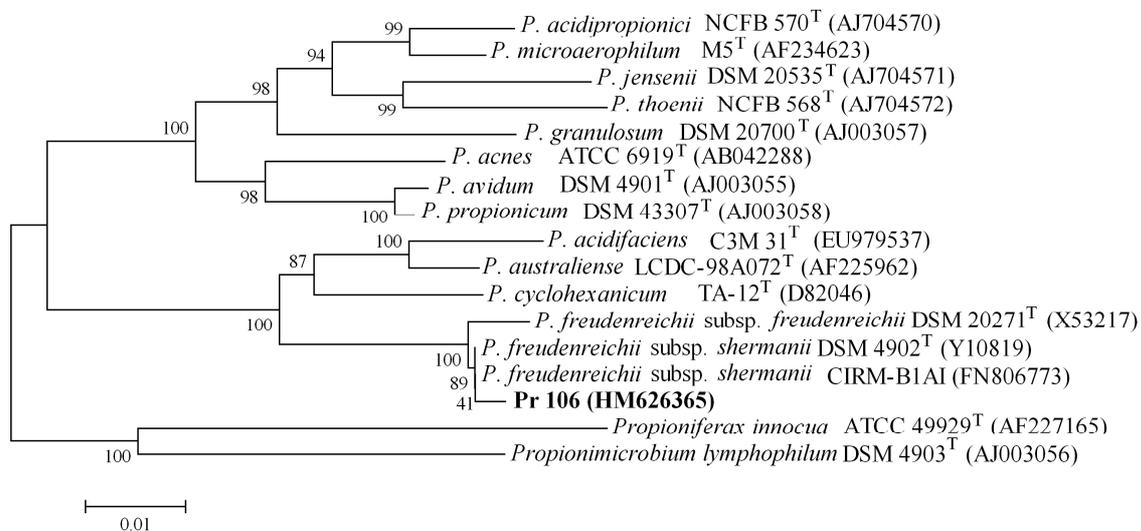


Рисунок 1 – Дендрограмма филогенетического родства штамма Pr 106 и бактерий рода *Propionibacterium*

Высокий показатель бутстрапа свидетельствовал об устойчивости этой ветви и возможности дифференциации подвидов *P. freudenreichii* (рис. 1). Таким образом, результаты определения сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рНК и их филогенетического анализа свидетельствуют о принадлежности штамма Pr 106 к *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*.

Таблица 2 – Рост штаммов пропионовокислых бактерий на питательных средах

Штамм	Рост на среде											
	MRS			mMRS			MRS+1% фруктозы			MRS+2% фруктозы		
	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
Pr 2	++	+++	+++	-	-	-	++	+++	+++	-	+++	+++
Pr 3	++	++	++	-	-	-	++	++	+++	-	+++	+++
Pr 106	+++	+++	+++	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Штамм	Рост на среде											
	MRS+2% дрожжевого экстракта			MRS+1% мальтозы			MRS+2% мальтозы			MCA		
	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
Pr 2	++	++	++	-	++	+++	-	-	-	++	+++	+++
Pr 3	++	++	++	-	++	+++	-	-	-	++	++	++
Pr 106	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	+++	+++

Примечание: «-» - отсутствие роста; «+» - слабый рост;  
«+++» - нормальный рост; «++++» - интенсивный рост

Для выявления возможности использования штаммов Pr 2, Pr 3 и Pr 106 в составе бактериальных концентратов для производства ферментированных молочных продуктов исследовали производственно-ценные свойства выделенных культур. Как видно из таблицы 3, все штаммы обладали низкой кислотообразующей способностью – на стерильном молоке формировали невязкий, неплотный сгусток кисломолочного вкуса со сладковатым привкусом через 6-7 сут. Предельная титруемая кислотность для исследуемых штаммов составила 92-100°Т. Установлено, что минимальная температура роста штамма Pr 106 – 15°С, максимальная – 37°С. Штаммы Pr 2 и Pr 3– обладали способностью к росту в более широком диапазоне температур – от 10°С до 40°С.

Таблица 3 – Основные производственно-ценные свойства пропионовокислых бактерий

Штамм	Температура роста, °С			Время образования сгустка, ч	Предельная титруемая кислотность, °Т	Органолептические характеристики продукта
	минимальная	оптимальная	максимальная			
Pr 2	10	30	40	168	92	Сгусток невязкий, неплотный, вкус чистый кисломолочный, сладкий
Pr 3	10	30	40	152	100	Сгусток невязкий, неплотный, вкус чистый кисломолочный, сладкий
Pr 106	15	30	37	160	98	Сгусток невязкий, неплотный, вкус чистый кисломолочный, сладкий

Таким образом, из-за низкой кислотообразующей способности штаммы пропионовокислых бактерий необходимо использовать в составе поливидовых бактериальных концентратов для производства ферментированных молочных продуктов только совместно со штаммами лактобактерий, являющихся активными кислотообразователями.

При изучении антагонистической активности культур пропионовокислых бактерий было установлено, что выделенные штаммы проявляют среднюю антагонистическую активность в отношении бактерий группы кишечной палочки (зона задержки роста штаммов *E. coli* на среде МПА составила 9-13 мм), и низкую – к маслянокислым микроорганизмам (зона задержки роста штаммов *C. tyrobutiricum* на среде МПА составила 1-5 мм) (рис. 3, 4).

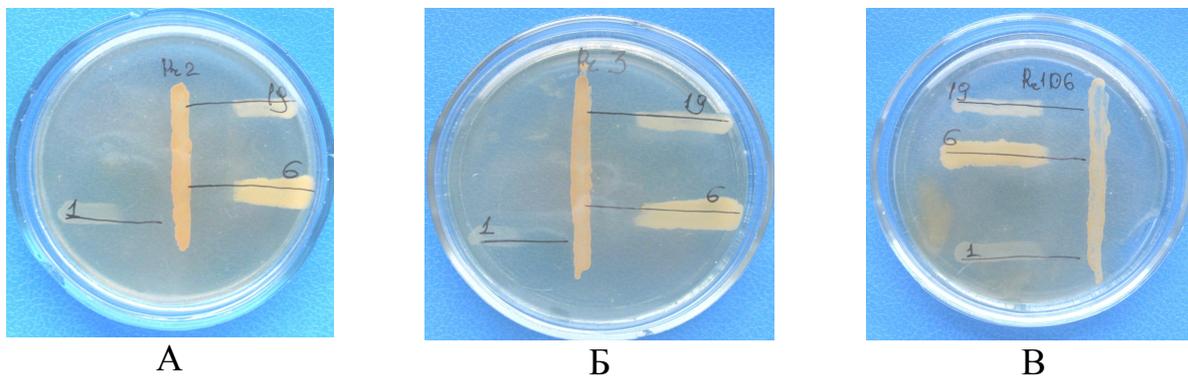


Рисунок 3 – Изучение антагонистической активности штаммов пропионовокислых бактерий (А – штамм Pr2, Б – штамм Pr3, В – штамм Pr106) по отношению к условно-патогенным микроорганизмам *E. coli*. 1 – штамм *E. coli* J5/3R16, 6 – штамм *E. coli* J5/3R446<sub>b</sub>, 19 – штамм *E. coli* 1019.

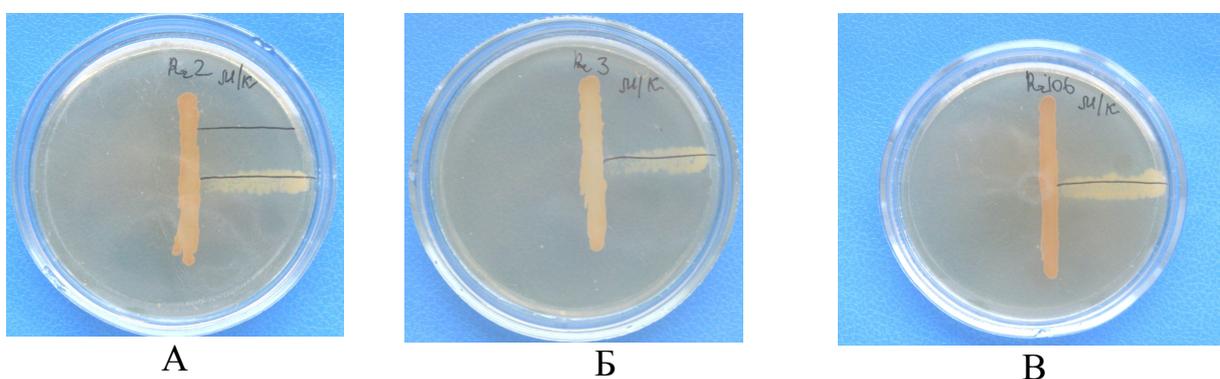


Рисунок 4 – Изучение антагонистической активности штаммов пропионовокислых бактерий (А – штамм Pr2, Б – штамм Pr3, В – штамм Pr106) по отношению к технически-вредным микроорганизмам *Clostridium tyrobutyricum*.

Как видно на рис. 4, у культуры Pr 2 размер зоны задержки роста маслянокислых бактерий составил 3 мм, у Pr 3 – 5 мм, поэтому их целесообразно использовать в составе БК для твердых и полутвердых сычужных сыров с высокой и средней температурой второго нагревания.

В последние годы доказано, что пропионовокислые бактерии имеют иммуностимулирующее и антимуtagenное действие, они ингибируют активность ферментов, образуемых кишечной микрофлорой и вовлекаемых в образование мутагенов, канцерогенов и промоторов роста опухолей [3, 19]. Поэтому кисломолочные продукты и пробиотические препараты, содержащие в том числе и пропионовокислые бактерии, рекомендуется применять на фоне антибиотикотерапии для более эффективного восстановления нормальной микрофлоры кишечника [20].

Для оценки возможности использования выделенных штаммов пропионовокислых бактерий в качестве пробиотиков, они протестирова-

ны по медико-биологическим свойствам – устойчивости к условиям среды пищеварительного тракта (резистентности к NaCl, желчи), а также на антибиотикорезистентность (табл. 4).

Таблица 4 – Медико-биологические свойства пропионовокислых бактерий

штамм	Устойчивость к						Диаметр зоны задержки роста (мм) при использовании антибиотика в концентрации (мкг, МЕ)																
	2 % NaCl	4 % NaCl	6 % NaCl	10% желчи	20% желчи	40 % желчи	оксацилин	тетрациклин	амикацин	стрептомицин	рифампицин	канамицин	ампициллин	ванкомицин	линкомицин	клиндамицин	эритромицин	левомицетин	пенициллин	цефалотин	цефокситин	хлорамфеникол	неомицин
							10	30	30	30	10	30	10	30	10	30	15	30	10	30	30	30	30
Pr 2			–				0	15	0	0	0	0	19	10	13	0	0	0	0	0	0	13	0
Pr 3			–				0	10	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
Pr 106	–						7	7	0	3	0	6	0	8	0	0	0	0	8	6	7	12	7

Как видно из табл. 4, пропионовокислые бактерии обладают высокой устойчивостью к антибиотикам, при этом резистентностью к наибольшему количеству исследуемых антибактериальных веществ обладал штамм Pr 3, который проявлял чувствительность только к тетрациклину, хлорамфениколу и канамицину. Штаммы Pr 2 и Pr 106 также обладали высокой популяционной устойчивостью к большинству исследованных антибиотиков: амикацину, стрептомицину, рифампицину, клиндамицину и эритромицину (табл. 4).

Штаммы Pr 2 и Pr 3 устойчивы к содержанию в среде 4% NaCl и 20% желчи, штамм Pr 106 устойчив к содержанию в среде 2% NaCl и 10% желчи (табл. 4), что является косвенным подтверждением возможности достижения исследуемыми культурами предполагаемой зоны колонизации – приэпителиальной зоны кишечника.

Высокий уровень метаболической активности и пластичности и, как следствие, конкурентоспособности микроорганизмов, в том числе и пропионовокислых бактерий, обусловлен генетически детерминированной продукцией ими широкого набора вне- и внутриклеточных ферментов, участвующих в утилизации крайне разнообразных по химической структуре субстратов. Особое место среди производимых в промышлен-

ных масштабах биокатализаторов занимают ферменты, участвующие в метаболизме углеводов, в том числе и лактозы [21]. Изучение  $\beta$ -галактозидазной активности исследуемых культур показало, что выделенные штаммы пропионовокислых бактерий проявляют невысокую активность нейтральной и кислой  $\beta$ -галактозидазы (от 0,114 до 0,3 ед/мл и от 0,016 до 0,355 ед/мл соответственно), при этом активность кислой и нейтральной  $\beta$ -галактозидазы культур была практически одинаковой, за исключением штамма Pr 106, у которого преобладала активность нейтральной  $\beta$ -галактозидазы. Следовательно, высока вероятность того, что  $\beta$ -галактозидазы пропионовокислых бактерий, оставаясь активными в кислой среде, могут образовывать из мономеров лактозы олигосахариды различной степени полимеризации, что приведет к обогащению ферментированных кисломолочных продуктов этими важными для человека биологически активными соединениями.

**Заключение.** Из различных источников выделено 24 культуры, из которых на основании изучения морфологических и физиолого-биохимических особенностей три штамма идентифицированы как *Propionibacterium freudenreichii*, которые широко применяются в молочной промышленности при производстве твердых и полутвердых сыров и пробиотических кисломолочных продуктов. С использованием метода секвенирования последовательности ДНК гена 16S рРНК подтверждена принадлежность штамма Pr 106 к виду *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii*. У выделенных штаммов пропионовокислых бактерий изучены производственно-ценные и медико-биологические свойства, определена  $\beta$ -галактозидазная активность.

### Литература

1. Степаненко, П. П. Микробиология молока и молочных продуктов. / П. П. Степаненко. — М.: Колос, 1996. — С. 231-235.
2. Воробьева, Л. И. Антимутагенность пропионовокислых бактерий / Л. И. Воробьева [и др.] // Микробиология. — 1991. — Т. 60. — № 6. — С. 83-89.
3. Волосовец, А. П. Пробиотики в современной педиатрии: перспективы клинического использования и оптимизация выбора / А. П. Волосовец, С. П. Кривоустов // Здоров'я України. — 2009. — №1. — С.41-45.

4. Воробьева, Л. И. Десмутагенное действие культуральной жидкости, полученной в результате пропионовокислого брожения на химически индуцированный мутагенез у *Salmonella typhimurium* ТА 100 / Л. И. Воробьева [и др.] // Микробиология. — 1993. — Т. 62. — № 6. — С. 1093-1100.
5. Воробьева, Л. И. Антимутагенное действие супероксиддисмутазы на индуцированный азидом натрия и нитрозогуанидином мутагенез у *Salmonella typhimurium* / Л. И. Воробьева // Генетика. — 1993. — Т. 62. — № 5. — С. 760-767.
6. Хамагаева, И. С. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий / И. С. Хамагаева, Л. М. Казанина, С. Н. Тулизрова // Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ. — 2006. — С.3-10.
7. De Man, J. C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. C. De Man, M. Rogosa, M. E. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. — 1960. — Vol. 23. — P. 130-135.
8. Dal Bello, F. Inducible gene expression in *Lactobacillus reuteri* LTH5531 during Type II sourdough fermentation / F. Dal Bello, J. Walter, S. Roos, H. Jonsson, C. Hertel // Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — Vol. 71. — № 10. — P. 5873-5878.
9. De Vuyst, L. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria / L. De Vuyst, M. Vancanneyt // Food Microbiol. — 2007. — Vol. 24. — P. 120-127.
10. Peltola, E. Effect of salt on bacteria of importance in Emmental cheese-making / E Peltola // Meijerit Aikkaus. — 1940. — Vol. 2. — № 1. — P. 11-21.
11. Masco, L. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria / L. Masco, G Huys, E. De Brandt, R. Temmerman, J. Swings // Int. J. Food Microbiol. — 2005. — Vol. 102. — P. 221– 230.
12. Герхардт, Ф. Методы общей бактериологии. Том 3. / Ф. Герхардт — М: Мир. — 1984. — С. 67-70.
13. Герхардт, Ф. Методы общей бактериологии. Том 3. / Ф. Герхардт — М: Мир. — 1984. — С. 16.
14. Гудков, А. В. Взаимодействие молочнокислых палочек и маслянокислых бактерий, вызывающих порчу сыра / А.В. Гудков, К.П. Алексеева // Молочная промышленность. — 1970, № 1. — С. 25.

15. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы. Определение кислотности: ГОСТ 3624-92. — Введ. 01.01.94. — Минск: Гос. Комитет по стандартизации Республики Беларусь: Госстандарт. — 2007. — 13 с.

16. Бажанов, Д. П. Филогенетическая идентификация трех штаммов ризосферных бактерий на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и генетического типирования / Д. П. Бажанов, К. К. Яцевич, А. А. Бажанова // Микробиология. — 2010. — Т.79. — №3. — С. 394-404.

17. Воробьева, Л. И. Пропионовокислые бактерии / Л. И. Воробьева. — М.: МГУ. — 1995. — 288 с.

18. Tamura, K. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar // Mol. Biol. Evol. — 2007. — V. 24. — P. 1596-1599.

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

20. Bellisle, F. Functional Food science and behavior and psychological functions / F. Bellisle [et al.] // Brit. J. Nutr. — 1998. — Vol. 80. — Suppl. 1. — P. s173-s193.

21. Fuller, R. Modulation of intestinal flora by probiotics, other nutritional factors, and intestinal microflora / R. Fuller // Nestle Nutrition Workshop Series. — 1997. — V. 42. — P. 33-46.

*L. Bogdanova, S. Vasylenko, D. Bazhanov, K. Yatsevich ,  
N. Petrushenia, L. Safronenko*

**ISOLATION OF PROPIONIC ACID BACTERIA AND  
CHARACTERIZATION OF THEIR PHYSIOLOGICAL,  
BIOCHEMICAL AND BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES**

**Summary**

24 propionic acid bacteria were isolated from different milk products. These bacteria were studied on morphological, physiological and biochemical properties. Three bacterial strains were determined as *Propionibacterium freudenreichii*. Strain Pr 106 was identified as *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* based on similarities of 16S rRNA gene sequences and their phylogenetic analysis. Three bacterial strains *Propionibacterium freudenreichii* were tested for producing and medico-biological properties and drug resistance.