

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКОВОГО МЕМБРАННОГО ЭКСТРАКТОРА В ТЕХНОЛОГИИ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ И ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Д.А. Дурникин, М.М. Силантьева, О.В. Ерещенко

Алтайский государственный университет, 656049, Барнаул, пр. Ленина, 61

Email: Durnikin@list.ru, msilan@mail.ru, olga4ka_asu@mail.ru

Производство бактерий *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* и *Propionibacterium acidipropionici*, используемых в составе кормовых биоконсервантов в качестве продуцентов молочной, уксусной и пропионовой кислот, сопряжено с необходимостью постоянно поддерживать интегральную концентрацию органических кислот в среде культивирования на уровне, не превышающем 1%, поскольку более высокое содержание этих соединений подавляет рост и развитие микроорганизмов, не позволяя концентрации клеток подниматься выше $\sim 0.6 \cdot 10^9$ мл⁻¹. В экспериментальных лабораторных условиях pH среды можно регулировать путем нейтрализации выделяемых в виде метаболитов органических кислот, однако в условиях производства терять молочную, пропионовую и уксусную кислоты, имеющие широкое применение в разных областях промышленности и, в частности, весьма полезные при консервировании сочных кормов – нецелесообразно. Одним из возможных решений проблемы является применение мембранного экстрактора для удаления органических кислот, обладающих самостоятельной ценностью, из среды непосредственно в процессе культивирования; при этом за счет поддержания оптимального pH среды обеспечивается повышение конечной концентрации клеток *L. lactis*, *L. plantarum* и *P. acidipropionici* в 5.8, 3.6 и 3.2 раза, соответственно. Оснащение мембранного экстрактора дополнительными гидродинамическими ультразвуковыми излучателями обеспечивает снижение диффузионных ограничений у поверхности мембраны и ускорение процесса выведения органических кислот из среды культивирования *L. lactis*, *L. plantarum* и *P. acidipropionici* в 5.25, 5 и 6.25 раз, соответственно. Предлагаемая технология повышает экономическую эффективность производственного процесса и обеспечивает необходимое разнообразие технических решений.

Ключевые слова: биоконсерванты, ферментация, удаление метаболитов, молочная кислота, пропионовая кислота, ультразвук, мембранный экстрактор

PROSPECTS FOR THE APPLICATION OF ULTRASONIC MEMBRANE EXTRACTORS IN THE SUBMERGED CULTIVATION OF LACTIC ACID AND PROPIONIC ACID BACTERIA

D.A. Durnikin, M.M. Silantyeva, O.V. Ereshchenko

Altai State University

Email: Durnikin@list.ru, msilan@mail.ru, olga4ka_asu@mail.ru

The industrial production of lactic acid and propionic acid bacteria, which produce lactic, acetic and propionic acids and used as the components of biological preservatives of feed and fodder, requires to maintain a total concentration of organic acids in fermentation broth at a level of one percent during the whole fermentation process. The higher concentration inhibits the growth and development of these microorganisms, so their cell concentration in fermentation broth does not exceed $0.6 \cdot 10^9$ ml⁻¹. Under laboratory conditions, pH of cultivation medium can be regulated by the neutralization of organic acids with alkaline, but under the large-scale production, the loss of produced lactic, acetic, and propionic acids is inexpedient, since they are widely used in various industrial segments including the conservation of rich fodder. One of the possible solutions is the use of a membrane extractor to remove organic acids, which represent valuable metabolites, from the cultural broth directly during the cultivation process.

Citation:

D.A. Durnikin, M.M. Silantyeva, O.V. Ereshchenko (2016). Prospects for the application of ultrasonic membrane extractors in the submerged cultivation of lactic acid and propionic acid bacteria.

Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University, 6 (2), 321–328.

Поступило в редакцию / Submitted: 15.06.2016

Принято к публикации / Accepted: 21.08.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.15421/201663>

© Durnikin, Silantyeva, Ereshchenko, 2016

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0. License

In this study, the efficiency of a specially designed membrane extractor equipped with additional ultrasonic transducers, which reduced diffusion limitations near the membrane surface, has been assessed in the process of submerged cultivation of three bacterial cultures: *Lactococcus lactis* VPKM B-2092, *Lactobacillus plantarum* VPKM B-4173, and *Propionibacterium acidipropionici* VPKM B-5723. The extractor was connected to the fermenter as external device and consisted of a cartridge filter preventing the biomass uptake into the extractor and a membrane extractor of a “liquid-liquid” type equipped with pH-state and hydrodynamic ultrasonic transducers. Whereas classic pH-states feed a pH-correcting solution into a fermenter according to a signal from a pH sensor, the developed pH-state construction turned on the US membrane extractor to remove excess organic acids from the fermentation broth.

Due to the maintenance of optimum pH, the final concentration of *L. lactis*, *L. plantarum*, and *P. acidipropionici* cells increased in 5.8, 3.6, and 3.2 times, respectively. The equipping of a membrane extractor with ultrasonic transducers accelerated the removal of organic acids from fermentation broth of *L. lactis*, *L. plantarum*, and *P. acidipropionici* in 5.25, 5, and 6.25 times, respectively, i.e., provided a more rapid and efficient fermentation. The proposed technology improves the economical efficiency of the process and provides the required diversity of technical solutions for its use in a microbiological production.

Key words: biopreservatives, fermentation, lactic acid, propionic acid, removal of metabolites, ultrasound, membrane extractor

ВВЕДЕНИЕ

Комплексные кормовые биоконсерванты, в состав которых входят молочнокислые и пропионовокислые бактерии, являющиеся продуцентами молочной, уксусной и пропионовой кислоты и обеспечивающие возможность длительного хранения сочных кормов, являются перспективными и востребованными продуктами в сельском хозяйстве (Yitbarek, Tamir, 2014; Aragyn, 2012). Производство таких препаратов не требует применения уникального и дорогостоящего оборудования и может быть осуществлено с использованием комплекса стандартных биотехнологических узлов и блоков. Тем не менее, продолжающееся развитие и интенсификация сельского хозяйства требуют поиска и разработки новых технологических приемов, позволяющих повысить продуктивность и экономическую эффективность производства биоконсервантов.

Ускорение роста и развития микроорганизмов возможно не только путем использования специфических биостимуляторов – соединений, способных стимулировать синтетическую и репродуктивную активность клеток (Шигаева, 2002), но и посредством удаления в процессе культивирования клеток образующихся метаболитов, избыточное количество которых нередко подавляет развитие продуцирующих их культур (Nanba, Nucada, 1983). Так, этиловый спирт, выделяемый пивными и винными дрожжами в процессе их жизнедеятельности, по достижении концентрации в среде брожения, равной 5-7% и 12-15%, соответственно, начинает подавлять развитие данных микроорганизмов, а синтезируемый некоторыми клостридиями *n*-бутанол ингибирует развитие микробной культуры уже при 2% концентрации в среде культивирования (Гарибян, 2014).

Аналогичный эффект по отношению к молочнокислым и пропионовокислым бактериям проявляют секретируемые ими в процессе брожения органические кислоты. Следовательно, разработка технологии, позволяющей эффективно удалять упомянутые метаболиты из среды культивирования, способна обеспечить более интенсивный рост биомассы бактерий и наработку органических кислот, которые сами по себе являются достаточно ценными метаболитами, широко используемыми в различных областях промышленности.

Целью данного исследования было изучение возможности использования ультразвукового мембранного экстрактора с гидродинамическими излучателями для интенсификации процесса удаления органических кислот, секретируемых в среду молочнокислыми и пропионовокислыми бактериями в процессе их глубинного культивирования. Основанием для выбора данной технологии послужили известные свойства акустических микропотоков, снижающих диффузионные ограничения и увеличивающих эффективность экстракции экстракционных процессов (Акопян, Ершов, 2016). Предложенное и включенное в технологическую цепь устройство, обеспечивает ускорение процесса мембранной экстракции за счет интенсивных вихревых микропотоков с большими градиентами скоростей, создаваемых гидродинамическими преобразователями с широким спектром акустического излучения у поверхности мембраны. Вихревые микропотоки снижают диффузионные ограничения, интенсифицируя процессы переноса интегральным комплексом факторов ультразвукового воздействия (Soni et al., 2009; George et al., 2008).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на штаммах бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-2092, *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173 и *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723, культивируемых в ферментере емкостью 1 м³ производства ООО «ПромТрубМонтаж» (Россия). Состав питательных сред и режимы культивирования микроорганизмов соответствовали использованному в предыдущем исследовании (Дурникин и др., 2016).

Для корректировки рН в процессе культивирования бактерий была разработана и введена в конструкцию ферментера система удаления метаболитов, вынесенная за пределы контура ферментера и состоящая из 2-х внешних устройств: патронного фильтра, препятствующего прохождению биомассы, а также ультразвукового мембранного экстрактора системы «жидкость-жидкость», состоящего из рН-стата и экстрактора с гидродинамическими излучателями, обеспечивающего ускорение выделения органических кислот - продуктов метаболизма микроорганизмов. Суммарное содержание органических кислот в культуральной среде оценивали по рН среды при помощи рН-датчика, входящего в комплект анализатора АП-430-01 (ООО «Аналитприбор», Россия), управляющего исполнительным механизмом, регулирующим уровень рН в соответствии с заранее заданными условиями. Однако, в отличие от классического использования рН-статов, по сигналу датчика подающих в ферментер раствор, корректирующий рН, в данном случае при повышении кислотности, рН-стат включал ультразвуковой мембранный экстрактор, удаляющий из культуральной жидкости излишки органических кислот.

Конструкция устройства представлена на рис 1. Культуральная жидкость, содержащая целевой продукт, который требовалось экстрагировать, поступала в аппарат 1 через штуцер 4 до заполнения, после чего краны штуцеров 4 и 5 перекрывали; экстрагент поступал в аппарат 1 через штуцер 6 с последующим перекрытием кранов штуцеров 6 и 7. По сигналу рН-стата начинали работать циркуляционные насосы 8, тем самым создавая в аппарате по обе стороны от мембраны 2 течения с акустическими микропотоками, возбуждаемыми гидродинамическими ультразвуковыми излучателями 3.

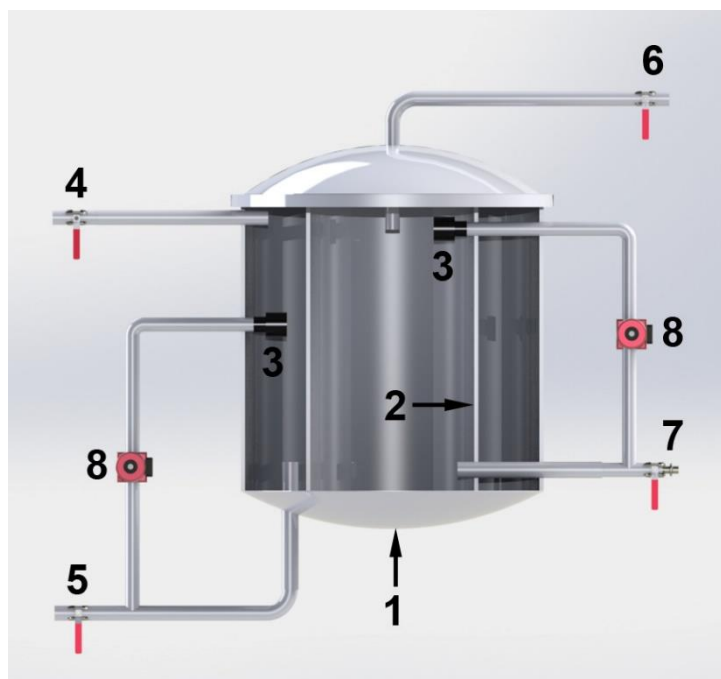


Рис 1. Мембранный экстрактор. 1 – корпус мембранного экстрактора; 2- внутренняя сетчатая перегородка с мембраной; 3 – гидродинамические ультразвуковые излучатели; 4 - входной патрубок для жидкости с экстрагируемым компонентом; 5 - выходной патрубок для жидкости после экстракции из нее экстрагируемого компонента и отводом для подачи на циркуляцию; 6 - входной патрубок для экстрагента; 7 - выходной патрубок для отвода и подачи экстракта и на циркуляцию; 8 – циркуляционные насосы.

Работу рН-стата, оснащенного ультразвуковым мембранным экстрактором, на начальном этапе исследования, выполненного в лабораторных условиях, контролировали путем измерения концентраций молочной и пропионовой кислот в отобранных из ферментера пробах среды культивирования. Измерение проводили методом газожидкостной хроматографии (Горяев, Евдакова, 1977).

Контур удаления органических кислот из культуральной среды схематически представлен на рис. 2.



Рис 2. Контур удаления органических кислот из культуральной среды. 1-ферментер, 2 - рН-стат, 3 – циркуляционный насос, 4 – ультразвуковой мембранный экстрактор, 5- датчик рН.

Повышение содержания органических кислот в ферментере регистрируется датчиком рН и анализируется рН-статом, который включает насос ультразвукового мембранного экстрактора по достижении заданного уровня рН (в данном случае рН 5.5). В экстракторе из культуральной среды экстрагент удаляются органические кислоты (в т.ч. молочная, уксусная и пропионовая), а культуральная среда с рН > 5.5 возвращается обратно в ферментер.

Эксперименты проводили как минимум в трех повторностях. Анализ и статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программы *Microsoft Excel 2007*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения оптимальных условий культивирования используемых в исследовании бактерий в лабораторных условиях была проведена серия ферментаций при различных значениях рН. Пример динамики изменения концентрации жизнеспособных клеток в процессе культивирования при различных рН показан на рис. 3.

В процессе культивирования *L. lactis* ВКПМ В-2092 среда постепенно закисляется за счет выделения метаболитов - молочной и уксусной кислот, что приводит к ингибированию роста клеток. Оптимальное значение рН среды для культивирования этих бактерий находится в интервале 6.0-7.0 (Vixquert, 2009). Согласно полученным нами результатам (рис. 3, табл. 1), средняя скорость ($\Delta C/\Delta t$) нарастания концентрации в культуре клеток *L. lactis* ВКПМ В-2092 в интервале 4-20 ч культивирования при увеличении рН культуральной среды с 5.6 до 6.6, возрастала приблизительно в 5.5 раз (от 0.31 час^{-1} до $\sim 1.8 \text{ час}^{-1}$).

Очевидно, что удаление из культуральной среды метаболитов – молочной и уксусной кислоты, равно как и их нейтрализация в процессе культивирования, будет способствовать поддержанию оптимального уровня рН, что обеспечит продление фазы активного роста клеток и существенно увеличит их концентрацию в среде к концу периода культивирования, длительность которого для *L. lactis* составила 20-24 ч.

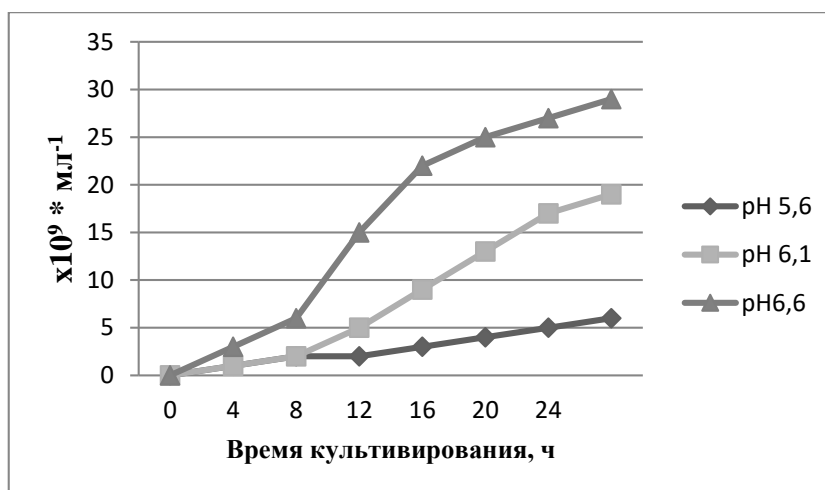


Рис. 3. Динамика роста концентрации жизнеспособных клеток *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-2092 в процессе культивирования в условиях различной кислотности культуральной среды.

Аналогичные исследования с *L. plantarum* ВКПМ В-4173, для которой оптимальное значение pH среды культивирования близко к 6.5 (Boonmee et al., 2016), показали, что и в этом случае при закислении среды метаболитами (молочной и уксусной кислотой) скорость прироста концентрации клеток в процессе культивирования в среде заметно снижается (табл. 1). Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что средняя скорость ($\Delta C/\Delta t$) нарастания концентрации в культуре клеток *L. plantarum* ВКПМ В-4173 в интервале 4-20 ч культивирования при увеличении pH среды культивирования с 5.5 до 6.0 возрастала приблизительно в 3.6 раз (с 0.25 час⁻¹ до 0.9 час⁻¹), а при дальнейшем повышении pH до значения 6.5 снижалась до 0.75 час⁻¹. Следовательно, как и для предыдущей бактериальной культуры, удаление из культуральной среды метаболитов способно привести к увеличению концентрации клеток в среде к концу периода культивирования (22-24 ч).

Известно, что биосинтез пропионовой кислоты также относится к процессам, ингибируемым накапливаемым продуктом. В связи с этим, глубинное культивирование пропионовокислых бактерий без корректировки pH характеризуется невысокой концентрацией бактериальных клеток в среде и низким выходом пропионовой кислоты (Hsu, 1991). Согласно литературным данным, оптимальным интервалом pH для культивирования *Propionibacterium acidipropionici* является интервал pH 6.0-7.1, а удельная скорость роста при этом составляет приблизительно 0.23 час⁻¹ (Сушкова, Воробьева, 2007). Из полученных нами экспериментальных данных следует, что средняя скорость ($\Delta C/\Delta t$) нарастания концентрации в культуре клеток *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723 в интервале 4-20 ч культивирования при увеличении pH среды с 5.5 до 6.0 возрастала приблизительно в 3.2 раза (Табл. 1) и практически не изменялась при дальнейшем повышении pH до 6.5.

Таблица 1. Влияние pH среды культивирования на скорость роста молочнокислых и пропионовокислых бактерий

Культура	Низкие значения pH		Значения pH, близкие к оптимальным		Коэффициент повышения скорости накопления биомассы
	pH	$\Delta C/\Delta t$, час ⁻¹	pH	$\Delta C/\Delta t$, час ⁻¹	
<i>Lactococcus lactis</i> ВКПМ В-2092	5.6	0.31	6.8	1.8	5.8
<i>Lactobacillus plantarum</i> ВКПМ В-4173	5.5	0.25	6.8	0.9	3.6
<i>Propionibacterium acidipropionici</i> ВКПМ В-5723	5.5	0.18	6.0	0.51	3.2

Таким образом, согласно полученным нами результатам, при снижении рН культуральной среды до уровня 5.5 и ниже (т.е. при превышении суммарного содержания органических кислот в среде значения 1%) происходит подавление роста и развития исследуемых микроорганизмов, и их концентрация в среде к концу периода культивирования не превышает $0.6 \cdot 10^9$ мл⁻¹. Для повышения активности бактерий и увеличения концентрации клеток в среде до величины $>10^{10}$ мл⁻¹, позволяющей существенно упростить процесс приготовления биоконсерванта и увеличить эффективность его действия, необходимо снизить воздействие на культуру органических кислот, поддерживая их концентрацию в ферментере на уровне, не превышающем 0.5%.

На следующем этапе исследования была проведена оценка эффективности применения ультразвукового мембранного экстрактора для удаления органических кислот из среды в процессе культивирования исследуемых бактерий. Дооснащение мембранного экстрактора гидродинамическими ультразвуковыми излучателями, снижающими диффузионные ограничения у поверхности фильтрующей мембраны, должно было ускорить процесс экстракции метаболитов, тем самым повышая общую эффективность ферментации. Поскольку очевидно, что количество извлеченных из культуральной жидкости кислот прямо пропорционально времени работы экстрактора, эффективность применения ультразвука в процессе мембранной экстракции оценивали по времени работы насосов, автоматически (по сигналу датчика рН в ферментере) включаемых в процессе культивирования для подачи в экстрактор культуральной жидкости с целью удаления из нее части органических кислот и поддержания заданного рН среды.

Результаты оценки интегрального времени работы насосов мембранного экстрактора при наличии или отсутствии ультразвукового воздействия в ходе культивирования каждой из включенных в исследование культур представлены на рис. 4.

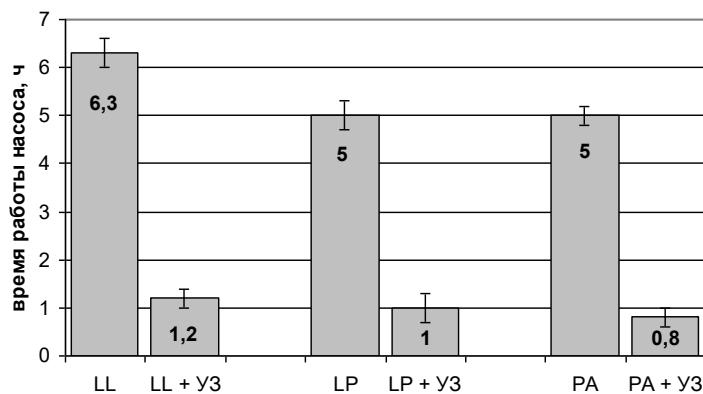


Рис. 4. Изменение интегрального времени (± 0.3 час) работы насосов мембранного экстрактора, удаляющего органические кислоты из культуральной жидкости в процессе ферментации молочнокислых и пропионовокислых бактерий при работающем (УЗ) и выключенном генераторе ультразвука. LL - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-2092, LP - *Lactobacillus plantarum* ВКПМ В-4173, PA - *Propionibacterium acidipropionici* ВКПМ В-5723.

Как следует из рис. 4, применение УЗ позволило сократить время работы насосов при ферментации культур *L. lactis* ВКПМ В-2092, *L. plantarum* ВКПМ В-4173, *P. acidipropionici* ВКПМ В-5723 в 5.25, 5 и 6.25 раз соответственно.

В экспериментальных лабораторных условиях рН среды можно регулировать путем нейтрализации выделяемых в виде метаболитов органических кислот щелочью (Wee et al., 2006; Неронова и др., 1967). Однако в условиях производства терять молочную, пропионовую и уксусную кислоты, имеющие широкое применение в разных областях промышленности и, в частности, весьма полезные при консервировании сочных кормов – нецелесообразно. С этой точки зрения использование мембранных экстракторов, позволяющих удалять органические кислоты непосредственно в процессе культивирования клеток, обеспечивая поддержание оптимального рН и возможность утилизации ценных метаболитов, представляется достаточно перспективным. Согласно полученным в данном исследовании результатам, оснащение мембранного экстрактора ультразвуковым модулем способно в 5-6 раз ускорить процесс выделения органических кислот из культуральной жидкости исследованных бактерий (рис. 4) и, таким образом, сократить время ферментации и повысить ее экономическую

эффективность, а в перспективе, возможно, разработать процесс непрерывного культивирования молочнокислых и пропионовокислых бактерий.

Следует также отметить, что применение ультразвукового экстрактора не требует использования дополнительных веществ для титрования культуральной жидкости. Устройство является универсальным и создает необходимое разнообразие технических решений, обеспечивая возможность оптимального выбора способов выделения продуктов химического и биологического синтеза методами мембранной экстракции.

Таким образом, оснащение ферментационного комплекса ультразвуковым мембранным экстрактором позволяет в 3-6 раз повысить концентрацию клеток в культуральной жидкости при ферментации молочнокислых и пропионовокислых бактерий, а также более эффективно выделять из культуральной жидкости метаболиты, обладающие самостоятельной ценностью и широко используемые в качестве пищевых добавок (E-260, E-270, E2-80), а также в сельском хозяйстве, косметологии, производстве фармпрепаратов и других областях промышленности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследование и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.580.21.0006 от 15.10.2015 г., RFMEFI58015X0006).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Aragyn Y.K. The use of probiotic strains as silage inoculants / In: Probiotic in animals (Rigobelo E.C., ed.). – Rijeka: Intech. – 2012. – P. 1-32.
- Bixquert J.M. Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics. // Revista Espanola de Enfermedades Digestivas. – 2009. – V. 101(8). – P. 553-564.
- Boonmee M., Cotano O., Amnuaypanich S., Grisadanurak N. Improved lactic acid production by *in situ* removal of lactic acid during fermentation and a proposed scheme for its recovery // Arabian Journal for Science and Engineering. – 2016. – Vol. 41(6). – P. 2067-2075.
- George B.J., Pereira N., Al Massum M., Kolev S.D., Ashokkumar M. Sensitivity enhancement in membrane separation flow injection analysis by ultrasound // Ultrasonics Sonochemistry. – 2008. – V. 15(2). – P. 151-156.
- Hsu S.-T. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: effects of pH // Biotechnology and Bioengineering. – 1991. – V. 38(6). – P. 571-578.
- Nanba B.A., Nucada R., Nagai S. Inhibition by acetic and propionic acids of the growth of *Propionibacterium shermanii* // Journal of Fermentation Technology. – 1983. – V. 61. – P. 551-556.
- Soni V., Abildskov J., Jonsson G., Gani R. A general model for membrane-based separation processes // Computers & Chemical Engineering. – 2009. – V. 33(3). – P. 644-659.
- Wee Y.-J., Kim J.-N., Ryu H.-W. Biotechnological production of lactic acid // Food Technology and Biotechnology. – 2006. – V. 44(2). – P. 163-172.
- Yitbarek M.B., Tamir B. Silage Additives: Review // Open Journal of Applied Sciences – 2014. – V. 4. – No. 5. – Article ID 44897.
- Акопян В.Б., Ершов Ю.А. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами. – М.: ЮРАИТ. – 2016. – 223 с.
- Гарибян Ц.С. Выделение бутанола из водных растворов // Известия МГТУ МАМИ. – 2014. – 2(20). – №3. – С. 101-106.
- Горяев М.И., Евдакова Н.А. Справочник по газожидкостной хроматографии органических кислот. – М.: Наука. – 1977. – 532 с.
- Дурникин Д.А., Силантьева М.М., Ерещенко О.В. Стимуляция ультразвуком накопления биомассы молочнокислых и пропионовокислых бактерий при глубинном культивировании // Biological Bulletin of Bogdan Chmelniyskiy Melitopol State Pedagogical University. – 2016. – 6(2). – С. 287-293.
- Неронова Н.М., Ибрагимова С.Л., Иерусалимский Н.Д. Влияние концентрации пропионата на удельную скорость роста *Propionibacterium hermanii* // Микробиология. – 1967. – V. 36(3). – P. 404-409.
- Сушкова В.И., Воробьева Г.И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества. – М.: Мир. – 2007. – 204 с.
- Шигаева М.Х. Разнообразие микроорганизмов // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2002. – №1. – С. 133-137.

REFERENCES

- Akopyan, V.B., Ershov, Yu.A. (2016). *Osnovy vzaimodeystvie ul'trazvuka s biologicheskimi ob'ektami*. Moscow: YuRAIT (in Russian).
- Aragyn, Y.K. (2012). *The use of probiotic strains as silage inoculants*. In: Probiotic in animals (Rigobelo E.C., Ed.). Rijeka: Intech.
- Bixquert, J.M. (2009). Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 101(8), 553-564.
- Boonmee, M., Cotano, O., Amnuaypanich, S., Grisadanurak, N. (2016). Improved lactic acid production by *in situ* removal of lactic acid during fermentation and a proposed scheme for its recovery. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 41(6), 2067-2075.
- Durnikin, D.A., Silantyeva, M.M., Ereshchenko, O.V. (2016). Ultrasound-enhanced cell production of lactic and propionic acid bacteria under submerged cultivation for industrial purposes. *Biological Bulletin of Bogdan Chmel'nitskiy Melitopol State Pedagogical University*, 6(2), 287-293 (in Russian).
- Garibyan, Ts.S. (2014). Vydelenie butanola iz vodnykh rastvorov. *Izvestiya MGTU MAMI*, 2(20), 101-106 (in Russian).
- George, B.J., Pereira, N., Al Massum, M., Kolev, S.D., Ashokkumar M. (2008). Sensitivity enhancement in membrane separation flow injection analysis by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(2), 151-156.
- Goryaev, M.I., Evdakova, N.A. (1977). *Spravochnik po gazozhidkostnoy khromatografii organicheskikh kislot*. Moscow: Nauka (in Russian).
- Hsu, S.-T. (1991). Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: effects of pH. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(6), 571-578.
- Nanba, B.A., Nucada, R., Nagai, S. (1983). Inhibition by acetic and propionic acids of the growth of *Propionibacterium shermanii*. *Journal of Fermentation Technology*, 61, 551-556.
- Neronova, N.M., Ibragimova, S.L., Ierusalimskij, N.D. (1967). Vlijanie koncentracii propionata na udel'nuju skorost' rosta *Propionibacterium hermanii*. *Mikrobiologija*, 36(3), 404-409 (in Russian).
- Shigaeva, M.H. (2002). Raznoobrazie mikroorganizmov. *Vestnik KazNU. Serija biologicheskaja*, 1, 133-137 (in Russian).
- Soni, V., Abildskov, J., Jonsson, G., Gani, R. (2009). A general model for membrane-based separation processes. *Computers & Chemical Engineering*, 33(3), 644-659.
- Sushkova, V.I., Vorob'eva, G.I. (2007). *Bezothodnaja konversija rastitel'nogo syr'ja v biologicheski aktivnye veshhestva*. Moscow: Mir (in Russian).
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N., Ryu, H.-W. (2006). Biotechnological production of lactic acid. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 163-172.
- Yitbarek, M.B., Tamir, B. (2014). Silage Additives: Review. *Open Journal of Applied Sciences*, 4(5), Article ID 44897.