

Изобретение относится к биотехнологии, в частности, к бактериальным препаратам повышенной биологической активности, используемым в производстве функциональных продуктов.

Благоприятное воздействие на организм человека бифидофлоры и лактофлоры в настоящее время не вызывает сомнений, поэтому эти микроорганизмы широко используются в производстве функциональных продуктов. Бифидобактерий, являясь облигатными представителями нормальной микрофлоры кишечника человека, очень плохо развиваются в молоке и не обеспечивают ферментированному продукту необходимые сенсорные показатели. Для преодоления этих затруднений данные микроорганизмы часто используют совместно с молочнокислыми бактериями в многокомпонентных стартовых культурах.

Известен способ получения сухого препарата бифидобактерий и молочнокислых бактерий Бифилакт (ТУ 49 1016 - 85), предназначенного для производства продуктов, обладающих лечебно-профилактическими свойствами. Этот препарат разработан на основе бифидобактерий видов *B.bifidum* и *B.longum*, молочнокислых стрептококков - *L.lactis*, *L.diacetilactis* и ацидофильной палочки *L.acidophilus*. Однако этот препарат содержит невысокое количество микроорганизмов: в 1г сухого препарата содержится  $(1 - 3) \times 10^9$  КОЕ бифидобактерий и  $(0,5 - 1) \times 10^8$  лактобактерий. Активность Бифилакта также невысокая.

Известен способ приготовления закваски для получения кисломолочного продукта, предусматривающий использование бифидобактерий вида *B.longum* совместно с кефирными грибами (А.с. СССР №1697684, кл. A23C9/12//C12P39/00/C12P39/00/C12R1 : 01/, 1991). Наряду с рядом положительных свойств (улучшенная органолептика, стимуляция роста бифидобактерий) в состав микрофлоры кефирных грибов входят микроорганизмы не характерные для естественного микробного ценоза кишечника человека.

Наиболее близким к заявляемому является способ получения сухого концентрата бифидобактерий и молочнокислых стрептококков. Способ осуществляют путем совместного культивирования бифидобактерий с молочнокислыми стрептококками, при этом микроорганизмы отбирают по энергии кислотообразования и антагонистическому воздействию на кишечную палочку. В состав бактериального концентрата включены бифидобактерий, имеющие энергию кислотообразования не ниже  $75^\circ\text{T}$  и титр антагонистической активности не менее  $1 : 4$ , и молочнокислые стрептококки, видов *L.lactis* ssp. *diacetilactis*, *L.lactis*, *L.cremoris* и *S.thermophilus*, которые характеризуются антагонистической активностью к кишечной палочке, определенной по методу диффузии в агар не менее 5мм. Численность бифидобактерий в бактериальном концентрате, полученном известным способом, не превышает  $7 \times 10^9$  КОЕ в 1г, а молочнокислых стрептококков -  $1,8 \times 10^{10}$  (А.св. СССР №1622966, кл. A23C9/12, 1992) - прототип.

Недостатком известного способа является низкая концентрация бифидофлоры, достаточно длительный процесс накопления биомассы 14 -

18ч, а также включение в состав бактериального концентрата мезофильных молочнокислых бактерий, которые не характерны для кишечной микрофлоры человека.

В основу изобретения поставлена задача создания способа получения бактериального концентрата, в котором путем изменения состава микрофлоры и технологических параметров обеспечивается сокращение продолжительности технологического процесса, повышение биологической активности и концентрации микрофлоры в бактериальном концентрате, обеспечивающих терапевтическое воздействие на организм человека, что необходимо для производства продуктов функционального питания.

Решение поставленной задачи включает тщательный подбор штаммов микроорганизмов и разработку эффективной технологии их накопления.

Заявляемый способ отличается от известного композиционным составом заквасочной микрофлоры, который конструировался с учетом функционального действия на организм человека. Бактериальный концентрат БМК содержит высокоактивные микроорганизмы, принадлежащие к видам *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* sp. *acidophilus*. Учитывая то, что бактериальный концентрат разработан для производства функциональных продуктов, выбор штаммов для него осуществляли руководствуясь требованиями, предъявляемыми к пробиотическим микроорганизмам. В частности, особое внимание уделяли соответствию таксономической принадлежности отобранных штаммов таковой нормальной микрофлоре кишечника человека, устойчивости к продуктам обмена пищеварительного тракта, высокой антагонистической активности по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре, а также сродству к энтероцитам. Свойства отдельных штаммов, включенных в состав БМК, представлены в табл.1.

Штаммы, включенные в состав бактериального концентрата, отличаются устойчивостью к высоким концентрациям хлорида натрия, фенола, желчи и адгезивностью (табл.2). Комплекс этих свойств указывает на достаточно высокую степень колонизации кишечника данными микроорганизмами.

Антагонистическая активность штаммов бактерий, использованных в известном способе, по отношению к бактериям группы кишечной палочки (метод диффузии в агар) колеблется в пределах от 1 до 6мм и существенно ниже таковой для штаммов, входящих в состав БМК (табл.3). Отобранные штаммы также подавляют развитие тест-культур при их совместном культивировании. В этих условиях титр антагонистической активности бифидобактерий по отношению к *E.coli* составлял  $1 : 4$ , термофильных стрептококков  $1 : 2$ , ацидофильной палочки  $1 : 5$ . Аналогичные результаты получены для *S.aureus* и *P.vulgaris*. Высокий уровень антагонистической активности отдельных штаммов сохраняется в бактериальном концентрате. Наряду с рассмотренными выше тест-культурами бактериальный концентрат БМК и его отдельные штаммы активно подавляют рост опасного патогена кампилобактер, вызывающего серьезные кишечные инфекции (табл.4). Следует отметить, что антагонистическая активность бактериального концентрата выше, чем активность отдельных

штаммов. Все это свидетельствует о высокой активности бактериального концентрата БМК и продуктов с его использованием для подавления нежелательной микрофлоры *in vivo*.

Заявляемый способ получения бактериального концентрата БМК предусматривает культивирование бифидобактерий и молочнокислых бактерий в питательной среде, приготовленной на основе гидролизованного молока, обогащенной ростовыми факторами и стимуляторами роста при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 12 - 14 часов при постоянном контроле pH. Отличительной особенностью способа является то, что при накоплении биомассы используют ступенчатое внесение культур. Вначале вносят бифидобактерии и культивируют самостоятельно в течение 6 - 7 ч. По истечении этого времени дополнительно вносят культуры термофильных стрептококков и ацидофильных палочек и продолжают процесс накопления биомассы еще в течение 5 - 7 ч.

Затем осуществляют отделение биомассы от культуральной жидкости, смешивают биомассу с защитной средой, замораживают и высушивают с применением сублимационной сушилки.

Использование данного приема культивирования позволяет снизить время накопления биомассы на 1 - 4 часа и получить бактериальный концентрат с содержанием бифидофлоры в 10 - 100 раз больше, чем в известном бакконцентрате (табл.5).

С использованием бактериального концентрата БМК разработаны сухие и жидкие продукты для функционального питания. Эффективность их терапевтического воздействия на организм человека подтверждена в клинических испытаниях, которые показали положительное влияние на состав кишечной микрофлоры.

Пример 1. Получение бактериального концентрата БМК. В 100л водопроводной воды восстанавливают 3,0кг сухого обезжиренного молока, смесь нагревают до  $55^\circ\text{C}$ , устанавливают pH 7,4, вносят 15г протосубтилина с активностью 70ед. и выдерживают смесь в этих условиях 2,5ч. После гидролиза в среду вносят 0,5кг лактозы, 0,5кг трехзамещенного лимоннокислого натрия, 2л кукурузного экстракта, 50г сернокислого железа. В среде устанавливают pH 8,0 с помощью 30% раствора гидроксида натрия и стерилизуют при температуре  $121^\circ\text{C}$  в течение 30мин. Активная кислотность после стерилизации должна составлять 7,4ед. pH. Питательную среду охлаждают до  $40^\circ\text{C}$  и инокулируют 8л бифидобактерий *B.longum* 352, с концентрацией клеток не менее  $2 - 5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Культуру выращивают при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 6ч в режиме периодической нейтрализации среды водным раствором аммиака до pH 7,0. Затем вносят по 0,8л молочнокислых бактерий штаммов *S.thermophilus* 27 с и *L.delbrueckii* ssp. *acidophilus* 20 у с численностью бактерий в 1мл  $(30 - 50) \times 10^7$  и  $(10 - 15) \times 10^7$  соответственно, и культивируют еще в течение 7 часов, поддерживая pH культуральной жидкости равным 6,5 - 7,0.

В конце роста охлаждают культуральную жидкость до  $12^\circ\text{C}$ , нейтрализуют до pH 7,2 - 7,4 и центрифугируют на суперцентрифуге ОТП при 15000об/мин. Полученную биомассу смешивают с защитной средой в соотношении 1 : 1. Состав защитной среды следующий (в г/л): сахароза 100,

цитрат натрия - 50, дистиллированная вода - до 1л. Суспензию биомассы в защитной среде разливают тонким слоем высотой не более 10мм, замораживают при  $-40^\circ\text{C}$  и высушивают в сублимационной установке КС-30. Продолжительность сушки 20ч до массовой доли влаги в сухом концентрате 5%.

Высушенную суспензию размельчают и расфасовывают в стерильную тару и плотно закупоривают.

В 1г бактериального концентрата содержится  $5 \times 10^{11}$  КОЕ бифидобактерий и  $1,6 \times 10^{10}$  лактобактерий.

Пример 2. Получение бактериального концентрата БМК. В питательную среду, подготовленную аналогично примеру 1, инокулируют 5л культуры бифидобактерий *B.longum* 352, содержащей не менее  $2 - 5 \times 10^8$  КОЕ/мл и культивируют при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 7ч в режиме периодической нейтрализации среды водным раствором аммиака до pH 7,0. Затем вносят по 0,8л штаммов лактобактерий *S.thermophilus* 27 с и *L.delbrueckii* ssp. *acidophilus* 20 у с численностью бактерий в 1мл  $(30 - 50) \times 10^7$  и  $(10 - 15) \times 10^7$  соответственно, и культивируют еще в течение 5 часов, поддерживая pH культуральной жидкости равным 6,5 - 7,0.

В конце роста охлаждают культуральную жидкость до  $12^\circ\text{C}$ , нейтрализуют до pH 7,2 - 7,4 и центрифугируют на суперцентрифуге ОТП при 15000об/мин. Полученную биомассу смешивают с защитной средой в соотношении 1 : 1. Состав защитной среды следующий (в г/л): сахароза 100, цитрат натрия - 50, дистиллированная вода - до 1л. Суспензию биомассы в защитной среде разливают тонким слоем высотой не более 10мм, замораживают при  $-40^\circ\text{C}$  и высушивают в сублимационной установке КС-30. Продолжительность сушки 20ч до массовой доли влаги в сухом концентрате 5%.

Высушенную суспензию размельчают и расфасовывают в стерильную тару и плотно закупоривают.

В 1г бактериального концентрата содержится  $5,5 \times 10^{11}$  КОЕ бифидобактерий и  $5,5 \times 10^{10}$  лактобактерий.

Пример 3. Использование бактериального концентрата БМК для получения сухого функционального продукта.

99кг сухой адаптированной молочной смеси Детолак (производство МКК детских продуктов г.Балта) разделяют на 4 равных части. Одну часть молочной смеси и 1кг бактериального концентрата БМК, полученного по примеру 1, перемешивают в асептических условиях в течение 2 - 3мин. К полученной смеси добавляют следующую порцию и снова перемешивают 2 - 3мин. Процедуру повторяют еще дважды. Полученную смесь расфасовывают в стерильную тару. 1г продукта содержит  $5,0 \times 10^9$  и  $1,6 \times 10^8$  КОЕ бифидобактерий и молочнокислых бактерий.

Пример 4. Использование бактериального концентрата БМК для получения сухого функционального продукта в таблетированной форме.

В смесителе смешивают 20,0г сахарозы и 72,0г глюкозы. Полученную смесь увлажняют раствором ячменно-солодового экстракта (4,5г экстракта и 12,0 воды), гранулируют, затем подсушивают в сушильной установке при температуре  $65^\circ\text{C}$  до содержания сухих веществ 98,5% снова

гранулируют, добавляют 1,0г бактериального концентрата, содержащего  $5,2 \times 10^{11}$  живых клеток бактерий, 1,3г аскорбиновой кислоты и 0,9г стеарата кальция. Смесь тщательно перемешивают и таблетируют на таблетировочной машине. Получают продукт виде таблетки, массой 0,8г, с гладкой блестящей поверхностью и приятным кисло-сладким вкусом. В 1 таблетке содержится  $4,2 \times 10^9$  КОЕ пробиотических бактерий, в том числе  $4 \times 10^9$  бифидобактерий и  $0,2 \times 10^9$  молочнокислых бактерий. Продукт отличается удобством применения.

Пример 5. Получение ферментированного молочного продукта с использованием БМК.

100кг молока пастеризуют при 92°C с выдержкой 10мин, гомогенизируют, охлаждают до 40°C, вносят 10г бактериального концентрата, перемешивают и выдерживают при указанной температуре в течение 8 - 10 часов до образования сгустка. После сквашивания ферментированную смесь охлаждают и направляют на розлив. Консистенция конечного продукта однородная сметанообразная. Вкус приятный кисло-молочный, кислотность 85°Т. В 1мл продукта содержится  $1,0 \times 10^8$  и  $5,7 \times 10^8$  бифидобактерий и лактобактерий соответственно.

Таким образом, заявляемый способ позволяет снизить продолжительность процесса накопления биомассы, получить бактериальный концентрат с более высоким содержанием клеток бактерий, а включение в его состав штаммов пробиотических микроорганизмов оказывает эффективное терапевтическое воздействие на организм человека.

#### Сравнительная характеристика входящих в состав заявляемого бактериальных концентратов

Вид, штамм	Время сквашивания молока
Прототип	
Бифидобактерии	20 - 6
Молочнокислые стрептококки	Нет свед
Заявляемый	
<i>B.longum</i> 352	7,0 - 8
<i>S.thermophilus</i> 27	3,5 - 4
<i>L.delbrueckii</i> ssp. <i>acidophilus</i> 20y	5,0 - 6

#### Основные свойства лакто- и бифидобактерий, бактериального концентрата БМК

Микроорганизм	Развитие в присутствии			
	NaCl		желчи	
	2	4	20	40
<i>B.longum</i> 352	+	+	+	+
<i>S.thermophilus</i> 27 c	+	-	+	-
<i>L.delbrueckii</i> ssp. <i>acidophilus</i> 20y	+	-	+	±

#### Антагонистическая активность штаммов, входящих в состав БМК

Тест-культура	<i>B.longum</i> 352	<i>S.thermophilus</i> 27
<i>E.coli</i> 0127	$30,1 \pm 2,2$	$27,7 \pm 3,1$
<i>S.aureus</i> 209	$22,6 \pm 3,6$	$17,0 \pm 2,1$
<i>S.sonnei</i>	$17,7 \pm 0,6$	$16,0 \pm 1,1$
<i>S.flexneri</i>	$10,0 \pm 0,5$	$9,0 \pm 4,1$
<i>P.vulgaris</i>	$30,2 \pm 1,8$	$24,0 \pm 3,1$
<i>Salmonella</i> sp.	$19,6 \pm 0,8$	$5,0 \pm 3,1$

#### Антагонистическая активность отдельных штаммов концентрата БМК по отношению к кампилобактериям

Штамм, композиция	<i>C. jejuni</i> шт. 447	<i>C. jejuni</i> шт. 448
<i>B.longum</i> 352	$35,6 \pm 2,5$	$28,0 \pm 2,1$
<i>S.thermophilus</i> 27	$27,3 \pm 3,4$	$18,7 \pm 2,1$
<i>L.acidophilus</i> 20y	$32,5 \pm 1,8$	$32,6 \pm 1,1$
БМК	$39,8 \pm 2,5$	$28,0 \pm 2,1$

Таблица 5

Сравнительная характеристика бактериальных концентратов,  
получаемых известным и заявляемым способами

Показатель	Прототип	БМК
Содержание бактерий в кон- центрате, $10^9$ КОЕ/г		
бифидобактерии	5 – 7	50 – 100
молочнокислые		
стрептококки	10 – 20	10 – 15
ацидофильные палочки	–	5 – 10
Время накопления биомассы	13 – 18	12 – 14