



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 54036

(13) A

(51) 7 A23C9/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД  
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ  
ВЛАСНИКА  
ПАТЕНТУ(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТУ З ПІДВИЩЕНИМИ ФУНКЦІОНАЛЬНИМИ  
ВЛАСТИВОСТЯМИ

1

2

(21) 2002043382

(22) 23 04 2002

(24) 17 02 2003

(46) 17 02 2003, Бюл. № 2, 2003 р.

(72) Капрельянц Леонід Вікторович, Пауліна Яро-  
славна Борисівна, Величко Тетяна Олексівна,  
Кіпменчук Олена Олександрівна, Щапін Ольга  
Федорівна(73) Капрельянц Леонід Вікторович, Пауліна Яро-  
славна Борисівна, Величко Тетяна Олексівна,  
Кіпменчук Олена Олександрівна, Щапін Ольга  
Федорівна, ОДЕСЬКА ДЕРЖАВНА АКАДЕМІЯ  
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ(57) 1 Спосіб одержання кисломолочного продук-  
ту шляхом сквашування молока бактеріями-пробиотиками, який відрізняється тим, що до мо-  
лока додають пребіотичні речовини вуглеводної  
природи, а бактеріальні закваски вносять поетап-  
но - на першому етапі закваски *Bifidobacterium*  
*longum* штам Я 23 та *Streptococcus thermophilus*  
штам В-4463, на другому - закваску *Lactobacillus*  
*acidophilus* штам 317/402 "Наріне"2 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що як  
джерело пребіотичних речовин використовують  
препарат "Мальтозин", який додають в кількості  
0,3-0,5% від маси молока3 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що як  
джерело пребіотичних речовин використовують  
сухе соєве молоко, яке додають в кількості 0,15-  
0,25% від маси молокаВинахід відноситься до харчової промислови,  
а саме до способів одержання кисломолочних  
продуктівВідомий спосіб [Патент №20508 Україна Спо-  
сіб отримання бактеріального препарату "Біолак-  
тин" та спосіб виробництва кисломолочного про-  
дукту з його використанням МПК<sup>6</sup> C12N1/20,  
A23C9/12 Надр. 27 02 98 Бюл. №1], за яким кис-  
ломолочний продукт одержують шляхом зброджу-  
вання молока певними штамми бактерій родів  
*Lactobacillus* та *Bifidobacterium*Загальною ознакою зі способом, що заявля-  
ється, у даного способу є використання бактерій  
родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*, які є бактері-  
ями-пробиотиками - мікроорганізмами, що корелю-  
ють мікрофлору кишечника та сприяють нормалі-  
зації багатьох обмінних процесів та функцій  
організму людиниАле сукупність штамів бактерій, що використо-  
вують, підібрана для здійснення корекції мікробіо-  
ценозу кишечника дітей раннього віку. Вона не є  
оптимальною для дорослих осіб. Ферментація  
молока здійснюється шляхом одночасного вне-  
сення бактерій родів *Lactobacillus* та  
*Bifidobacterium*, внаслідок чого створюються менш  
сприятливі умови для розвитку біфідобактерій, ніж  
за способом, що заявляється, оскільки лактобаци-ли є більш активними кислотоутворювачами, ніж  
біфідобактерії, розвиток яких за цих умов гальму-  
єтьсяКрім того цей спосіб не передбачає викорис-  
тання пребіотиків - речовин, які не засвоюються у  
верхніх відділах шлунково-кишкового тракту лю-  
дини, а піддаються гідролізу ферментами бакте-  
рій, в товстій кишці та служать селективними суб-  
стратами для еубіотичної мікрофлори та  
стимуляторами для бактерій-пробиотиків. Тому при  
живанні кисломолочного продукту, одержаного за  
цим способом, не відбувається колонізації кишеч-  
нику бактеріями-пробиотикамиВідомий також спосіб одержання бактеріаль-  
ного концентрату, який передбачає ферментацію  
молока бактеріями-пробиотиками родів  
*Bifidobacterium* та *Streptococcus* [Патент 22655  
Україна Бактеріальний концентрат "Старт", що  
використовується для одержання функціональних  
продуктів МПК<sup>6</sup> C12N1/20, A23C23/00 Надр.  
30 06 98 Бюл. №3]. Загальною ознакою із спосо-  
бом, що заявляється, у даного способу є викорис-  
тання та одночасне культивування бактерій  
*Bifidobacterium longum* та *Streptococcus*  
*thermophilus*, що дозволяє одержати біомасу бак-  
терій-пробиотиків в необхідній кількості

Однак даний спосіб не передбачає викорис-

(13) A

(11) 54036

(19) UA

тання бактерій роду *Lactobacillus* та пребіотиків, внаслідок чого одержаний препарат поступається за лікувально-профілактичними властивостями, кисломолочному продукту, що одержується за способом, що заявляється

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб одержання бактеріального концентрату молочнокислих бактерій, який передбачає використання про-біотичних бактерій родів *Bifidobacterium*, *Streptococcus* та *Lactobacillus* [Патент 24636 А Україна Спосіб одержання бактеріального концентрату БМК для виробництва продуктів функціонального харчування МПК<sup>6</sup> C12N1/20, A23C9/12 Надр 10 10 98 Бюл №5]

Загальними суттєвими ознаками цього способу і способу, що заявляється, є використання як бактерій-пробіотиків бактерій родів *Bifidobacterium*, *Streptococcus* та *Lactobacillus* та поетапне додавання бактеріальних заквасок

Але за способом-прототипом не використовуються пребіотичні речовини, які необхідні для розвитку бактерій-пробіотиків, що обмежує їх здатність до розмноження та колонізації товстого кишечника

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу у спосіб одержання кисломолочного продукту шляхом використання пребіотичних речовин вуглеводної природи та двох етапного додавання заквасок бактерій-пробіотиків отримати кисломолочний продукт з підвищеними функціональними властивостями. Додатковий технічний результат полягає в скороченні технологічного циклу

Поставлена задача вирішується в спосіб одержання кисломолочного продукту шляхом додавання до простерилізованого молока пребіотичних речовин вуглеводної природи, давання закваски, що містить біфідобактерії в кількості 6 - 9% та термофільні стрептококи в кількості 0,1 - 0,5% від маси молока, ферментації молока протягом 5 - 6 годин, додавання закваски, що містить лактобацили в кількості 0,2 - 0,5% від маси молока та наступної ферментації протягом 5 - 6 годин

Як джерела пребіотичних речовин використовують препарат "Мальтозін", який додають в кількості 0,3 - 0,5% від маси молока, або сухе соєве молоко, яке додають в кількості 0,15 - 0,25% від маси молока, що зброджується

Перед додаванням до молока сухе соєве молоко розчиняють у воді при співвідношенні 1:10, препарат "Мальтозін" використовують у вигляді 10% водного розчину. Розчини пребіотиків стерилізують при 111 - 112°C протягом 20 хвилин

Суттєвими ознаками способу, що заявляється, є використання пребіотичних речовин вуглеводної природи та поетапне додавання бактеріальних заквасок

Як бактерії-пробіотики використовують *Bifidobacterium longum* штам Я23, з колекції Біларуського НДІ молочної та м'ясної промисловості, *Streptococcus thermophilus* штам В-4463, з колекції Всеросійської колекції промислових мікроорганізмів та *Lactobacillus acidophilus* штам 317/402 "Наріне" з колекції Інституту мікробіології АН Вірменії

Співвідношення бактерій у заквасках визначено з урахуванням їхньої здатності до кислотоутво-

рення при використанні для ферментації молока закваски *L. acidophilus* 317/402 "Наріне", яка містить  $4 - 6 \times 10^7$  КУО, в кількості 1% від маси молока, кислотність, що титрується, через 24 години становить 220°Т, при використанні закваски *B. longum* штам Я23, яка містить  $3 - 5 \times 10^8$  КУО, в кількості 3% від маси молока, кислотність, що титрується, через 24 години становить 50°Т, при використанні закваски *S. thermophilus* В-4463, яка містить  $3 - 5 \times 10^8$  КУО, в кількості 1% від маси молока, кислотність, що титрується, через 24 години становить 96°Т

Тому для створення оптимальних умов одночасного культивування біфідобактерій та стрептококів закваску біфідобактерій додають у кількості 6 - 9%, а закваску стрептококів у кількості 0,1 - 0,5%, закваску лактобацил додають у кількості 0,2 - 0,5% від маси молока, що зброджується

Причинно-наслідковий зв'язок між поетапним додаванням бактеріальних заквасок, використанням пребіотичних речовин та одержанням кисломолочного продукту з підвищеними функціональними властивостями зумовлений наступним

Відомо, що бактерії родів *Bifidobacterium*, *Streptococcus* та *Lactobacillus* - постійні представники мікрофлори організму людини, є основними пробіотичними культурами, які використовуються в препаратах та продуктах функціонального призначення. При цьому біфідобактерії є більш вимогливими до умов культивування, ніж інші бактерії-пробіотики. Тому при одержанні симбіотичних функціональних кисломолочних продуктів, тобто таких, в яких використовують кілька видів бактерій-пробіотиків, біфідобактерії як правило вносяться раніше інших культур

Експериментальне дослідження впливу порядку внесення заквасок на кількість бактерій, що накопичуються в кисломолочному продукті, показало, що в разі внесення заквасок у кількості та порядку, що передбачені за способом, що заявляється, - спочатку закваска, що містить біфідобактерії та термофільні стрептококи, а потім закваска, що містить лактобацили, в кисломолочному продукті накопичується більше біфідобактерій, ніж при внесенні заквасок у кількості та порядку, що передбачені за способом-прототипом - спочатку закваска, що містить біфідобактерії, а потім закваска, що містить лактобацили та термофільні стрептококи. В той же час кількість стрептококів та лактобацил, які накопичуються в кисломолочному продукті, порядок внесення заквасок не впливає (фіг 1)

Це пояснюється тим, що при одночасному внесенні біфідобактерій та термофільних стрептококів внаслідок того, що стрептококи використовують кисень, розчинений в молоці, створюються більш сприятливі умови для розвитку біфідобактерій, які є анаеробами

Більшість пребіотиків відносяться до нейтральних цукрів, зокрема до оліго-сахаридів [Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса // Вопросы питания - 1999 - №2 - С 32 - 40]

Сухе соєве молоко містить такі пребіотичні речовини як галактоолігосахариди в кількості 8,5%, а також амінокислоти, білки, розчинні полісахариди,

мінеральні сполуки, що необхідні для розвитку бактерій [ТУ У 01193627 063-2000-10-02 "Молоко сухе соєве"]

Препарат "Мальтоизин" одержують шляхом ферментативної модифікації крохмалевмісних субстратів, він містить такі пребіотичні речовини як ізомальтоолігосахариди в кількості 22%, а також 15% білків та 33% вуглеводів, які використовуються бактеріями як поживні речовини [Кисельов С В, Капрельянц Л В Біо-технологічні аспекти отримання харчових домішок з групи ізомальтоолігосахаридів // Наукові праці ОДАХТ - 1998 - Вип 18]

Позитивний вплив соєвого молока та мальтоизину як джерел пребіотичних речовин на процес накопичення біомаси бактерій-пробіотиків демонструють результати експериментів, в яких у молоці, що містило різну кількість пребіотиків протягом 6 годин проводили культивування монокультури *Bifidobacterium longum* Я23, *Streptococcus thermophilus* B-4463, *Lactobacillus acidophilus* 317/402 "Наріне", що вносили до живильного середовища в однаковій кількості

Було встановлено, що додавання соєвого молока в кількості 0,15 - 0,25% від маси молока, що зброджується, приводило до збільшення біомаси *B. longum*, *L. acidophilus* та *S. thermophilus*, відповідно на 180 - 280%, 40 - 110% та 50 - 60% відносно контролів, в яких бактерії культивувались без додавання пребіотика (фіг 2)

При додаванні до живильного середовища 0,3 - 0,5% мальтоизину відбувався найбільший приріст біомаси лактобацил та біфідобактерій - відповідно на 175 - 175% та 120 - 140% відносно контролів, збільшення біомаси стрептококів не спостерігалось (фіг 3)

При перевищенні оптимальної концентрації пребіотиків відбувалось зменшення біомаси пробіотиків внаслідок того, що в присутності пребіотика підсилювались процеси обміну у бактерій та прискорювалось їх розмноження, отже стаціонарна фаза розвитку бактерій починалась та закінчувалась раніше, і наприкінці ферментації в середовищі накопичувались продукти обміну, які гальмували розвиток бактерій. Додавання пребіотиків в кількості меншій за оптимальні не приводило до збільшення біомаси бактерій, внаслідок нестачі пребіотичних речовин

За методом [Брили В Й, Брилене Т А, Ленцнер Х П, Ленцнер А А Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело - 1986 - №4 - С 210 - 212] було проведено дослідження адгезивної властивості бактеріальних культур, які були культивовані з додаванням 0,4% мальтоизину та 0,2% соєвого молока, а також контрольних зразків, що культивувались без додавання пребіотиків. Було встановлено, що індекс адгезивності бактерій, що вирощувались з додаванням пребіотиків, перевищував індекс адгезивності контрольних культур (фіг 4)

Перелік фігур Фігура 1 - діаграма "Залежність кількості бактерій в кисломолочному продукті від порядку внесення заквасок",

Фігура 2 - графік "Залежність кількості біомаси бактерій від концентрації соєвого молока в живильному середовищі",

Фігура 3 - графік "Залежність кількості біомаси бактерій від концентрації мальтоизину в живильному середовищі",

Фігура 4 - діаграма "Вплив пребіотиків на адгезивні властивості бактерій"

Таким чином мальтоизин як пребіотик стимулює переважно розвиток лакто-бацил, у меншій ступені - біфідобактерій і не викликає збільшення біомаси стрептококів. Соєве молоко є в першу чергу біфідогенним пребіотиком, але також стимулює розвиток лактобацил та стрептококів

При культивуванні бактерій-пробіотиків у присутності пребіотиків відбувається підсилення їх адгезивної властивості, отже вони можуть більш активно колонізувати кишечник

Крім того внаслідок стимуляції життєдіяльності бактерій пребіотиками скорочується технологічний процес одержання кисломолочного продукту на 3 години. При використанні як пребіотика соєвого молока на 2 години скорочується перший етап ферментації, в якому приймають участь біфідобактерії та стрептококи, та на 1 годину - другий етап ферментації, в якому приймають участь лактобацили. При використанні як пребіотика препарату "Мальтоизин" на 1 годину скорочується перший етап ферментації, та на 2 години другий етап ферментації

Це підтверджують наступні приклади

Приклад 1. 200г сухого соєвого молока розчиняють у 2кг води та стерилізують при 111 - 112°C протягом 20 хвилин. 100кг коров'ячого молока стерилізують при 111 - 112°C протягом 30 хвилин або у потоці при 135°C з витримкою 7 - 8 секунд та охолоджують до 39°C. Змішують коров'яче та соєве молоко, додають 7кг закваски, яка містить *Bifidobacterium longum* штам Я23 в кількості  $(3 \cdot 5) \times 10^8$  КУО/г, та 300г закваски, яка містить *Streptococcus thermophilus* штам B-4463 в кількості  $(3 \cdot 5) \times 10^8$  КУО/г. Проводять сквашування молока при 39°C протягом 5 годин при періодичній нейтралізації середовища 30% розчином NaOH до pH 6,6 - 6,8. Додають закваску, яка містить 300г *Lactobacillus acidophilus* штам 317/402 "Наріне" в кількості  $(4 \cdot 6) \times 10^7$  КУО/г та проводять сквашування при 39°C протягом 6 годин при періодичній нейтралізації середовища до pH 6,6 - 6,8. Одержаний кисломолочний продукт містить  $(8,0 \cdot 8,6) \times 10^8$  біфідобактерій,  $(2,2 \cdot 2,5) \times 10^7$  лактобацил та  $(3,3 \cdot 3,4) \times 10^8$  термофільних стрептококів

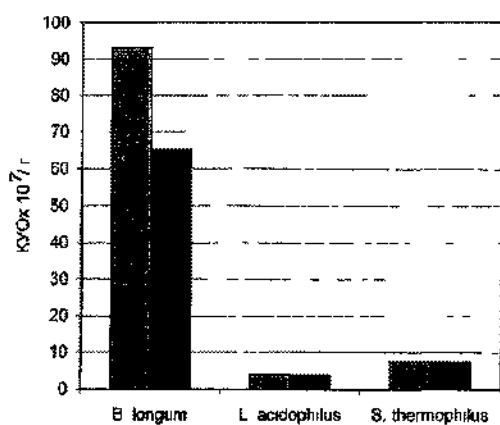
Приклад 2 здійснюють аналогічно прикладу 1, при цьому до 100кг молока додають 4кг стерильного 10% водного розчину препарату "Мальтоизин", який готують шляхом розчинення 400г мальтоизину в 3,6кг води. Сквашування молока в присутності біфідобактерій та стрептококів проводять протягом 6 годин, після додавання закваски лактобацил - ще протягом 5 годин. Одержаний кисломолочний продукт містить  $(3,0 \cdot 3,3) \times 10^8$  біфідобактерій,  $(6,2 \cdot 6,5) \times 10^7$  лактобацил та  $(2,3 \cdot 2,4) \times 10^8$  термофільних стрептококів

Приклад 3 здійснюють аналогічно прикладу 1, при цьому сквашування проводять без додавання пребіотичних речовин. Для одержання вираженого згустку кожний етапи сквашування необхідно проводити протягом 7 годин. Одержаний кисломолочний продукт містить  $(1,0 \cdot 1,3) \times 10^8$  біфідобактерій,

$(3,2 \text{ } 3,5) \times 10^7$  лактобацил та  $(2,2 \text{ } 2,5) \times 10^7$  термофільних стрептококів

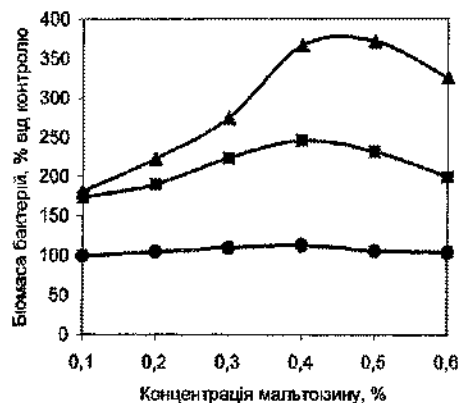
Наведені приклади свідчать про те, що тільки сукупність суттєвих ознак способу, що заявляєть-

ся, дозволяє одержати кисломолочний продукт з підвищеною кількістю бактерій-пробіотиків при скороченому технологічному циклі



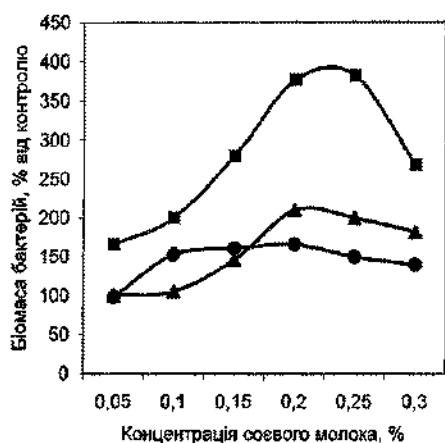
■ Спосіб, що заявляється ■ Прототип

Fig.1



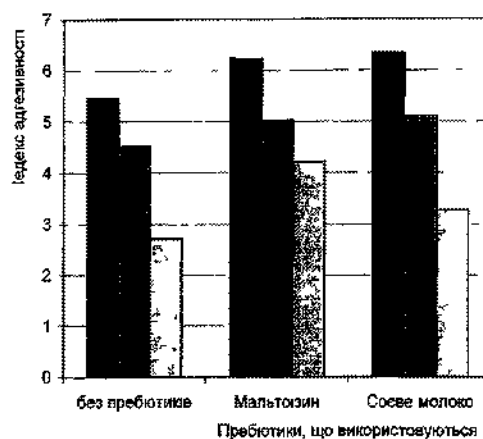
■ *B. longum* ▲ *L. acidophilus* ● *S. thermophilus*

Fig.3



■ *B. longum* ▲ *L. acidophilus* ● *S. thermophilus*

Fig.2



■ *B. longum* ■ *S. thermophilus* □ *L. acidophilus*

Fig.4