



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56385 (13) A

(51) 7 C 12N 1/20, A23C9/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО КОНЦЕНТРАТУ ПРЯМОГО ВНЕСЕННЯ ДЛЯ ПРОДУКТІВ СПЕЦІАЛЬНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

1

2

(21) 2001117522

(22) 05 11 2001

(24) 15 05 2003

(46) 15 05 2003, Бюл. № 5, 2003 р.

(72) Єресько Георгій Олексійович, Науменко Оксана Василівна, Рожанська Олександра Михайлівна, Ушакова Вікторія Вікторівна, Кігель Наталія Федорівна

(73) ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ІНСТИТУТ МОЛОКА ТА М'ЯСА УААН

(57) 1 Спосіб одержання бактеріального концентрату прямого внесення для продуктів спеціального призначення, який передбачає приготування живильного середовища на молочній основі з додаванням ростових речовин, внесення в нього посівного матеріалу, культивування та

відокремлення біомаси, змішування її з захисним середовищем, заморожування і сушіння, який відрізняється тим, що до складу живильного середовища вводять як активатори росту молочно-кислих бактерій оцтовокислий натрій і твін 80, як посівний матеріал використовують пробіотичні штами бактерій *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-7771, *Lactobacillus casei subsp. casei* ІМВ В-7017, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ВКПМ В-733 у співвідношенні 1:1:1, а у захисному середовищі вміст сухих речовин збільшують до 28-30%.

2 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що оцтовокислий натрій та твін 80 додають до живильного середовища перед стерилізацією в кількості 0,5% і 0,1% відповідно.

Винахід відноситься до біотехнології і може бути використаний в молочній промисловості для виробництва продуктів спеціального призначення.

При виробництві продуктів функціональної дії, як заквашувальну культуру, традиційно використовують лактобацили та біфідобактерії, оскільки саме їм належить важлива роль в підтриманні та нормалізації мікробіоценозу кишечника, неспецифічній резистентності макроорганізму, поліпшенні білкового та мінерального обміну. Сучасні дослідження показали, що заквашувальна культура *Lactobacillus casei*, не тільки регулює процеси травлення в кишечнику, а й виявляє протипухлинні та антигіпертонічні властивості, тому включення цього виду лактобактерій до складу бакпрепаратів спрямованої біологічної дії є дуже перспективним.

Відомо спосіб виробництва бактеріального препарату до складу якого залучено молочнокислі палички виду *L. casei* (Kazuhito Hayakawa, Hiroshi Sansava, Teruyuki Nagamune, Isao Endo High density culture of *Lactobacillus casei* by a cross-flow culture method based on kinetic properties of the micro-organism // J. Ferment. Bioengineering - 1990 - 70, N 6 - P 404 - 408). В стаціонарній культурі максимальна густина клітин *L. casei* не перевищує 10^9 КУО/мл внаслідок сильного підкислення середо-

вища в результаті накопичення молочної кислоти, яка утворюється в процесі культивування. Для збільшення оптичної густини заквашувальної культури *L. casei* запропоновано використання перехресно-проточної системи фільтрації для вилучення продуктів метаболізму із живильного середовища. Недоліком цього способу є технологічна складність виконання. Крім того, за 14 годин культивування вихід клітинної маси з 1 л середовища складає всього 4 г, що економічно невигідно.

Відомо спосіб виробництва бактеріального препарату для кисломолочних продуктів, який передбачає культивування *Lactobacillus acidophilus* в живильному середовищі при періодичному перемішуванні до вмісту 200 мл бактеріальних клітин в 1 мл, змішування одержаної біомаси з захисним середовищем, заморожування та сушіння методом сублімації (Патент України № 11193, А 23 С 21/02, С 12 N 1/20, 1996). Недоліком цього способу є те, що основою живильного середовища для накопичення біомаси є молочна сироватка, освітлена шляхом термокоагуляції, склад якої може коливатися в широких межах. Крім того, накопичення біомаси є тривалим (18 - 24 год.), в технологічному режимі відсутня стадія відокремлення одержаної біомаси, що не дозволяє отримати бактеріальний

(13) A

(11) 56385

(19) UA

препарат з високою концентрацією клітин

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб одержання заквашувального препарату для йогурта CI-2, який передбачає приготування живильного середовища на молочній основі з додаванням вуглеводів, лимоннокислого натрію, мікроелементів та стимуляторів росту, культивування посівного матеріалу, відокремлення біомаси, змішування її з захисним середовищем, заморожування та сушіння (ТУ У 46 39 ГО 271-1999 - прототип)

Згідно з цим способом стерилізацію розчину знежиреного молока та вуглеводів (лактози та глюкози) проводять при температурі 121°C протягом 30 хвилин. Після цього окремо готують стерильні розчини мінеральних солей та активаторів росту, які додають до охолодженої основи. В живильне середовище вносять 2,5% культури термофільних стрептококів і по 0,5% культур болгарської та ацидофільної паличок, які культивують для накопичення біомаси протягом 8 - 9 годин при 37°C. Одержану бактеріальну масу відокремлюють і змішують у співвідношенні 1 : (2 - 3) зі стерильним водним розчином захисного середовища із вмістом сухих речовин до 18%, та висушують методом сублімаційного сушіння. 1г готового бакпрепарату містить $2,0 \cdot 10^{11}$ КУО молочнокислих бактерій.

Основним недоліком цього способу є трудомісткість приготування живильного середовища для накопичення біомаси, оскільки більшість компонентів вноситься у вигляді стерильних розчинів до стерильної молочної основи, тому що одночасна стерилізація неможлива внаслідок згортання молока. В способі не повністю враховані особливості стерилізації кожного з компонентів живильного середовища, зокрема стерилізація глюкози при температурі 121°C протягом 30 хвилин веде до часткового руйнування вуглеводу, тому кінцева концентрація його залишається невизначеною. Крім того, відомий спосіб не передбачає відбір штамів до складу бактеріальної композиції за вимогами, які висуваються до пробіотичних культур.

Завданням винаходу є оптимізація процесу одержання бакконцентрату та посилення його біологічної активності, що забезпечить виробництво сухих та кисломолочних продуктів спеціального призначення.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі одержання бактеріального концентрату прямого внесення для продуктів спеціального призначення, який передбачає приготування живильного середовища на молочній основі з додаванням ростових речовин, внесення в нього посівного матеріалу, культивування та відокремлення біомаси, змішування її з захисним середовищем, заморожування і сушіння, згідно з винаходом до складу живильного середовища вводять як активатори росту молочнокислих бактерій оцтовокислий натрій і твін-80, як посівний матеріал використовують пробіотичні штами бактерій *Lactobacillus acidophilus* ВКПМВ-7771, *Lactobacillus casei subsp casei* ІМВ В-7017, *Streptococcus salivarius ssp thermophilus* ВКПМ В-733 у співвідношенні 1 : 1 : 1, а у захисному середовищі вміст сухих речовин збільшують до 28 - 30%,

Відмінністю способу є те, що джерело вуглеводного живлення - глюкоза, а також аскорбінова кислота, яка виконує функцію відновлювача, вносяться одночасно у вигляді окремо стерилізованих розчинів до охолодженої основи. Порівняльна характеристика живильного середовища для одержання бакконцентратів за відомим та заявленим способами, наведена в таблиці 1.

Порівняно з прототипом, частка сухого знежиреного молока зменшена в 3 рази, а мінеральних солей майже в 10 разів. Тим самим було усунуто проблему згортання молока при їх одночасній стерилізації. Водночас додатково до складу живильного середовища перед стерилізацією, як активатори росту молочнокислих паличок, вводяться 0,5% оцтовокислого натрію та 0,1% твіну 80. Останній, крім того, ще й запобігає утворенню піни при культивуванні та відокремленні біомаси.

В способі, що заявляється, враховано вимоги до режимів стерилізації для кожного з компонентів живильного середовища (табл. 1).

Особливістю способу є використання спеціально відібраної заквашувальної культури, до складу якої залучені пробіотичні штами молочнокислих бактерій *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-7771, *Lactobacillus casei subsp casei* ІМВ В-7017, *Streptococcus salivarius ssp thermophilus* ВКПМ В-733. Ця композиція поряд з хорошими органолептичними показниками, надає ферментованому продукту комплекс властивостей, які обумовлюють його позитивний вплив на організм споживача.

Штами лактобактерій є власними штамми ТІММ, виділеними з природних джерел, і задекларованими в ВКПМ (Росія) та в Національній колекції промислових мікроорганізмів ІМВ (Україна). Вони відбиралися на основі ретельних лабораторних досліджень з урахуванням вимог, що висуваються до штамів-пробіотиків, а саме висока антагоністична та холестеразна активності, здатність до адгезії в стінках кишечника, резистентність до жовчі, фенолу та високих концентрацій солей. Основні біологічні властивості відібраних штамів наведено в таблиці 2.

Як видно з даних таблиці 2, штами є стійкими до продуктів метаболізму травної системи та характеризуються високою адгезивністю. Ці властивості забезпечують їм успішний транзит через шлунково-кишковий тракт та закріплення в товстому кишечнику.

Наявність антагоністичних властивостей є обов'язковою умовою при доборі штамів молочнокислих бактерій для бактеріальних препаратів, особливо для тих, що використовуються в виробництві дієтичних та лікувально-профілактичних продуктів. Антагоністичну активність визначали *in vitro*, використовуючи 18 штамів тест-культур з колекції мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського МОЗ України, які належали до наступних родів: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* та *Staphylococcus*.

Дослідження антагоністичної активності відібраних молочнокислих бактерій показало, що найактивнішим з них є *L. acidophilus*, який викликає утворення зон затримки росту у 11 із 18 вико-

ристаних тест-культур. Найчутливішими до нього були патогенні серотипи кишкової палички, шигели та стафілококи - розмір зони затримки росту коливався в межах 13,5 - 20,2, 17 - 18 і 10,3 - 13,0 мм, відповідно. Штам *L. casei* також виявляв високу бактерицидну дію на тест-культури, а антагоністичний вплив термофільних стрептококів був дещо нижчим за інтенсивністю (зони затримки росту не перевищували 14,5 мм) та спектром культур, що пригнічувалися. Зокрема він був активним по відношенню до стафілококів, протеїв і псевдомонад. Позитивним є те, що всі досліджені штами не пригнічували розвитку штаму *E. coli* M-17, який є представником нормофлори людини.

Високий рівень антагоністичної активності окремих штамів зберігається і в готовому бакконцентраті. Аналіз антагоністичної активності сухого препарату показав, що його мінімальна бактерицидна доза складає 10 мг, а бактериостатична - 0,01 мг. Цей рівень вияву антагонізму з високою вірогідністю може забезпечити елімінацію небажаної мікрофлори в кишечнику та санітарний рівень продукту в процесі його виробництва.

Бактеріальний концентрат "ЛТС" характеризується високою біохімічною активністю, надає продуктові дієтичних властивостей, зокрема він утилізує 36,5% лактози, збагачує його вільними амінокислотами, в тому числі незамінними. Амінокислотний склад молока вихідного та ферментованого "ЛТС", наведено в таблиці 3.

Бакконцентрат "ЛТС" також знижує концентрацію холестерину в процесі сквашування молока із вмістом жиру 3,2%. Лабораторними дослідженнями показано, що у ферментованому продукті, виготовленому з використанням "ЛТС", на 38 - 40% знижено рівень холестерину у порівнянні з його вмістом у молочній основі. Ця властивість разом зі стійкістю до жовчі дозволяє з високою вірогідністю стверджувати про вплив культури на вміст холестерину в людському організмі.

Все це вказує на те, що бактеріальний концентрат прямого внесення, створений на основі штамів-пробіотиків, є високоактивним заквашувальним препаратом, дозволяє одержувати кисломолочний продукт з підвищеним вмістом вільних амінокислот, зниженим рівнем лактози і холестерину та високою кількістю корисних мікроорганізмів, стійких до продуктів обміну травної системи, здатних до закріплення та успішного розвитку в кишечнику людини. Сукупність цих властивостей забезпечить дієтичну та лікувально-профілактичну спрямованість продукту, ферментованого за допомогою цього концентрату.

Спосіб здійснюють таким чином:

В живильне середовище, що готують за схемою, відображеною в таблиці 1, вносять по 1,65% культур *S. salivarius* ssp. *thermophilus* ВКПМ В-733, *L. acidophilus* ВКПМ В-7771 і *L. casei* ssp. *casei* ІМБ В-7017. Інокуляти *S. salivarius* ssp. *thermophilus*, *L. acidophilus* готують шляхом внесення у стерильне знежирене молоко по 1% культури і подальшого їх нарощування при температурі 31°C протягом 16 годин. Інокуляти *L. casei* ssp. *casei* готують шляхом внесення у стерильне знежирене молоко 5% культури, вирощеної у середовищі МРС, і подальшого її культивування при 37°C протягом 16 - 18

годин.

Накопичення біомаси в живильному середовищі проводять при 37°C протягом 12 годин, підтримуючи активну кислотність на рівні рН 6,5.

Одержану біомасу відокремлюють від культуральної рідини шляхом центрифугування та змішують її в співвідношенні 1 : 2(3) із стерильним захисним середовищем.

Спосіб передбачає використання спеціального захисного середовища, в якому збільшено вміст сухих речовин до 30%, що забезпечує високий рівень виживання та активності бактеріальної мікрофлори при заморожуванні, сушінні та зберіганні бактеріального препарату. Захисне середовище готують із окремих стерильних розчинів із розрахунку 20% сахарози, 5% лимоннокислого натрію, 5% сухого знежиреного молока.

Суспензію бактеріальних клітин в захисному середовищі заморожують при мінус (40 ± 2)°C протягом 18 - 18 годин. Після цього суспензію висушують в сублімаційній сушарці при таких режимах температура на початку сушіння - мінус (25 ± 2)°C, в кінці - плюс (30 ± 2)°C. Тривалість сушіння - 18 - 20 годин.

Висушену суспензію подрібнюють у дрібнодисперсний порошок та фасують.

Застосування цих технологічних прийомів дозволяє за 12 годин культивування одержати з 1 л середовища 9,3 г сухого концентрату, 1 г якого містить $(3,5 - 4,1) \cdot 10^{11}$ життєздатних клітин молочнокислих бактерій.

Дослідження виживання клітин бакконцентрату "ЛТС" при зберіганні показало достатню стабільність бактерій протягом року (табл. 4). Визначено термін зберігання бакконцентрату "ЛТС", який склав 6 місяців при температурі 4 - 6°C, та 12 місяців при - мінус 18 - 20°C. Бакконцентрат "ЛТС" застосовується прямим внесенням у підготовлену молочну основу, його активність складає 6 годин.

Приклад 1. Спосіб одержання бактеріального концентрату "ЛТС".

В 70 л водопровідної води відновлюють 700 г сухого знежиреного молока, вносять 490 г пептону, 210 г лимоннокислого натрію, 350 г оцтовокислого натрію, 14 г $MgSO_4$, 35 г $MnSO_4$, 700 г лактози, 70 мл твіну 80. Після розчинення в середовищі встановлюють рН 8,3 шляхом додавання 40%-ного розчину гідроксиду натрію, стерилізують при 121°C протягом 30 хвилин і охолоджують до температури 55°C.

Окремо готують і вносять до основи стерильні розчини: 700 г глюкози, розчиненої в 2 л дистильованої води, 35 г аскорбінової кислоти у 400 мл води, стерилізовані при 105°C протягом 15 хвилин, та 1,4 л дріжджового автолізу, який готують згідно з відомою методикою. Після внесення всіх компонентів активна кислотність середовища повинна бути на рівні рН 6,5. В підготовлене середовище вносять по 1,2 л інокулятів штамів *S. salivarius* ssp. *thermophilus* ВКПМ В-733, *L. acidophilus* ВКПМ В-7771 і *L. casei* ssp. *casei* ІМБ В-7017 з концентрацією клітин кожного не менше 10^8 КУО/мл. Накопичення бактеріальної маси проводять при 37°C протягом 12 годин з періодичною нейтралізацією середовища 25%-ним водним розчином аміаку до активної кислотності рН 6,5. Після закінчення про-

цесу культуральну рідину охолоджують і центрифугують на суперцентрифугі при 15000об/хв. Одержану біомасу змішують у співвідношенні 1 : 2 із стерильним захисним середовищем, 1л якого готують з окремих стерильних розчинів із розрахунку: 200г сахарози, розчиненої в 400мл дистильованої води і стерилізованої при 105°C протягом 15 хвилин, 50г лимоннокислого натрію - у 100мл дистильованої води та 50г сухого знежиреного молока - у 500мл водопровідної води, стерилізованих при 121°C протягом 30 хвилин. Суспензію клітин розливають в стерильні кювети шаром не більше 6мм, заморожують при мінус 40°C протягом 16 годин і висушують в сублімаційній сушарці КС-30 при температурі від -25°C до +30°C з масовою часткою вологи в сухому концентраті не більше 5%, тривалість сушіння - 18 годин.

Висушену суспензію подрібнюють у порошок, фасують в стерильну тару та щільно закупорюють.

1г сухого бактеріального концентрату містить $4,1 \cdot 10^{11}$ КУО лактобактерій, його активність складає 6 годин.

Приклад 2. Спосіб одержання бактеріального концентрату "ЛТС".

Спосіб здійснюють за прикладом 1, але із складу живильного середовища для накопичення біомаси виключають оцтовокислий натрій та твін 80.

1г сухого бактеріального концентрату містить $1,4 \cdot 10^{10}$ КУО лактобактерій, його активність складає 10 годин.

Приклад 3. Виробництво ферментованого молочного продукту з використанням бакконцентрату "ЛТС".

100кг молока пастеризують при 92°C з витримкою 10 хвилин, гомогенізують, охолоджують до 37°C, вносять бакконцентрат (виготовлений за прикладом 1) в кількості 0,5 г, перемішують і витримують при вказаній температурі протягом 8 годин до утворення згустку з кислотністю 70°Т. Ферментовану суміш охолоджують та подають на розлив. Смак готового продукту прийнятний, кисло-молочний, консистенція - однорідна з глянцевою поверхнею. Загальна кількість корисної мікрофлори в 1г продукту складає $3,5 \cdot 10^9$ КУО.

Таким чином, спосіб, що заявляється, дозволяє одержати біологічно активний бактеріальний концентрат прямого внесення для виробництва продуктів спеціального призначення з високим вмістом пробіотичних культур, вільних амінокислот, в тому числі незамінних, зниженим рівнем лактози та холестерину. Ферментовані продукти, виготовлені відповідно способу, рекомендовано вживати в профілактичних цілях для нормалізації кишкової мікрофлори, обміну холестерину, поліпшення процесів травлення.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика приготування живильного середовища за відомим та заявленим способами

Бак концентрат	Послідовність внесення компонентів в живильне середовище			
	До стерилізації основи*, концентрація, %		Після стерилізації основи, концентрація, %	
Прототип	Знежирене молоко	3,0	Лимоннокислий натрій	1,0**
	Лактоза	1,0	MgSO ₄	0,2
	Глюкоза	1,0	MnSO ₄	0,02
			Пептон	0,5
			Дріжджовий екстракт	0,1
ЛТС	Знежирене молоко	1,0	Глюкоза	1,0***
	Лактоза	1,0	Аскорбінова кислота	0,05
	Лимоннокислий натрій	0,3	Дріжджовий автолізат	2,0
	Оцтовокислий натрій	0,5		
	MgSO ₄	0,02		
	MnSO ₄	0,005		
	Пептон	0,7		
	Твін 80	0,1		

Примітка: режим стерилізації * - при температурі 121°C протягом 30 хвилин.

** - при температурі 121°C протягом 10 - 15 хвилин.

*** - при температурі 105°C протягом 15 хвилин.

Таблиця 2

Фізіолого-біохімічні властивості штамів, залучених до бакконцентрату "ЛТС"

Показники	L casei IMB B-7017	S thermophilus ВКПМ B-7331	L acidophilus ВКПМ B-7771
Розвиток в присутності 30% жовчі	+	+	-*)
6,5% NaCl	+	+	-**)
0,5% фенолу	+	+	+
Оптимальна температура росту, °C	37 ± 1	37 ± 1	37 ± 1
Границя кислотоутворення, °T	176 ± 5	110 ± 5	334 ± 5
Індекс адгезивності (IA)	7,2 ± 0,1	8,3 ± 1,7	1,2 ± 0,2

**) штам розвивався при 20% жовчі

**) штам розвивався при 5% NaCl

Таблиця 3

Амінокислотний склад молока вихідного та ферментованого бакконцентратом "ЛТС", мг/мл

Амінокислота	Молоко	Ферментоване молоко
Треонін	0	2,19
Валін	4,42	6,10
Лейцин	0	7,94
Ізолейцин	0	2,80
Лізин	5,31	12,27
Метіонін	0	4,68
Аспарагінова кислота	2,93	13,62
Глутамінова кислота	32,28	97,97
Серій	0	6,64
Гліцин	9,01	4,44
Аланін	3,47	18,44
Аргінін	0	12,41
Пролін	0	43,59
Гістамін	6,32	15,41

Таблиця 4

Стан мікрофлори бакконцентрату "ЛТС" при зберіганні

Чисельність бактерій, КУО/г									
2 міс		4 міс		6 міс		9 міс		12 міс	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
2,9	6,5	2,9	6,5	2,8	6,2	2,5	3,2	2,1	1,2

Примітка, A - L casei + S thermophilus ($\cdot 10^{11}$), B - L acidophilus ($\cdot 10^{10}$)