

Изобретение относится к биотехнологии, представляет собой новый штамм бифидобактерий и может найти применение в производстве заквасочных препаратов для ферментированных молочных продуктов и продуктов прямого питания с лечебно-диетическими свойствами.

Согласно данным многолетних исследований бифидобактерий составляют основу нормальной кишечной микрофлоры, которая играет исключительно важную роль во всех жизненно важных процессах функционирования организма человека.

В настоящее время бифидобактерий широко используются во всем мире в качестве стартовых культур (как в чистой культуре так и в симбиозе с молочнокислыми бактериями) в производстве пробиотических препаратов и кисломолочных продуктов.

Как правило, выращивание бифидобактерий в молоке требует добавления в него активаторов различного происхождения. Известен штамм бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 1, культивируемый в молоке после предварительного внесения в него ростовых факторов растительного происхождения [Патент России №1813237, кл. A23C9/12, 9/13, 1993].

Однако, приготовление сухих экстрактов представляет достаточно трудоемкий процесс, трудновоспроизводимый в условиях крупномасштабного производства.

Этот же штамм согласно способа [Авт. св. СССР №997643, кл. A23C9/12, 1983] культивируют в молоке, предварительно обработанном ферментом  $\beta$ -галактозидазой с целью получения олигосахаридов, стимулирующих рост бифидобактерий. Недостатком данного способа является проведение производственного процесса в 2 этапа, а также большая его продолжительность (18-26ч).

Известен штамм *B. longum* 415, который выращивают в молоке совместно со штаммами уксуснокислых бактерий [Авт. св. СССР №1604847, кл. C12N1/20, A23C9/12, 1990]. Приготовление сочетаний уксуснокислых и бифидобактерий - трудоемкий и длительный процесс. При этом молокосвертывающая активность ассоциаций составляет 8-10 час, а накопление клеток бифидобактерий в молоке не превышает  $2,1 \cdot 10^9$  КОЕ/мл.

Наиболее близким к заявляемому является производственный штамм *B. bifidum* N4, который коагулирует молоко без добавления активаторов за 20ч с энергией кислотообразования  $80^\circ\text{T}$  [Авт. св. СССР №1622966, кл. A23C9/12, 1991].

Недостатком данного штамма является его слабая антагонистическая активность по отношению к бактериям группы кишечных палочек, а также низкая активность сквашивания молока.

В основу изобретения поставлена задача создания штамма *Bifidobacterium longum*, обладающего высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам, высокими показателями молокосвертывающей активности и энергии кислотообразования в молоке, использование которого упростит и удешевит процесс производства целевых продуктов, обеспечит повышение их биологической ценности и лечебно-профилактических свойств.

Штамм *Bifidobacterium longum* 352 получен направленной селекцией и выделен из ассоциации микроорганизмов, составляющей нормальную микрофлору здорового ребенка двух лет. Идентификацию штамма проводили с использованием определителя Берги. Штамм депонирован в коллекции культур микроорганизмов ГНИИ-генетика под номером ВКПМ S-1514.

Штамм характеризуется следующими свойствами.

Культурально-морфологические признаки штамма. Клетки культуры штамма, выращенной на жидких и полужидких питательных средах для культивирования бифидобактерий, а также на обезжиренном молоке, - палочковидные прямые или изогнутые  $0,8-1,0 \times 2,0-3,5$  мкм, с утолщениями по концам клетки, располагаются одиночно или в скоплениях; грамположительные, неподвижные, неспорообразующие.

Штамм хорошо растет на жидких питательных средах, используемых для культивирования бифидобактерий - на среде Блаурокк, гидролизат-молочной и кукурузо-лактозной с добавлением солей и факторов роста, в виде крошковатой массы по всему объему среды, кроме незначительной зоны аэробнозона.

При пересеве штамма на поверхность агаризованной среды Блаурокк в атмосфере углекислого газа при  $37^\circ\text{C}$  в течение 48-72 час образует выпуклые гладкие с ровными краями колонии белого цвета с диаметром 1-2 мм. При глубинном посеве штамма в той же среде образует колонии в виде гречишного зерна или лодочки (с диаметром проекции до 2 мм).

Штамм характеризуется высокими ростовыми показателями. На эталонной среде Блаурокк (содержание аминного азота 140 мг%) при температуре культивирования  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  длительность процесса периодического культивирования составляет 10 ч; лаг-фаза не превышает 1 ч, фаза логарифмического роста заканчивается к 6 часу периодического культивирования, удельная скорость роста и время генерации в экспоненциальной фазе составляет соответственно  $0,55 \cdot 10^{-1}$  и  $1,26 \cdot 10^{-1}$ , количество клеток бифидобактерий в стационарной фазе -  $(7,3 \pm 2,06) \cdot 10^9$  КОЕ/мл, что соответствует среднему значению показателя оптической плотности 3,45 ед. ОП (рис.1). На гидролизатно-молочной среде с добавлением солей и факторов роста при оптимальной температуре культивирования значения ростовых показатели следующие: длительность процесса периодического культивирования -  $(6 \pm 1)$  ч, лаг-фаза - менее 1 ч, фаза логарифмического роста заканчивается к пятому часу, удельная скорость роста - 0,69 ч, количество клеток в стационарной фазе -  $(5,3 \pm 1,2) \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл или 2,20 ед. ОП (рис.2). Значения ростовых показателей при культивировании заявляемого штамма на известных средах превышают таковые, полученные при культивировании известных промышленных штаммов.

Штамм коагулирует обезжиренное молоко при оптимальной для роста температуре  $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$  и посевной дозе 5% за  $(6 \pm 1)$  ч, а обезжиренное молоко с добавлением кукурузного экстракта за  $5,0 \pm 0,5$  ч. Образует однородный сгусток без отделения сыворотки приятного кисломолочного вкуса с легким специфическим привкусом уксусной кислоты. Титруемая кислотность молока через 24ч культивирования штамма при оптимальной температуре составляет  $(105 \pm 2)^\circ\text{T}$ . Накопление клеток штамма в молоке составляет  $(2,17 \pm 0,82) \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл при  $44^\circ\text{C}$  и  $(4,67 \pm 0,70) \cdot 10^9$  при  $37^\circ\text{C}$ .

Физиолого-биохимические свойства штамма.

Штамм аэротолерантен; в процессе лабораторного культивирования отмечено повышение устойчивости к кислороду.

Желатин не разжижает. Индол и сероводород не образует. Катализонегативный, не восстанавливает нитраты в нитриты. Сбраживает без образования газа лактозу, сахарозу, глюкозу, арабинозу, ксилозу, мальтозу, Д-рибозу; меллицитозу (медленно). Не ферментирует маннозу, рамнозу, трегалозу, целлобиозу, инулин, маннит, дульцит, инозит, сорбит, глицерин, глюконат.

Оптимальные температура и pH культивирования составляют соответственно  $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$  и 7,3-7,5 ед. pH (рис.3 и 4). Температурный диапазон роста  $20-65^\circ\text{C}$ ; растет в диапазоне pH от 4,5 до 8,5 ед. Высокий температурный оптимум штамма *B.longum* 352 позволяет интенсифицировать процесс сквашивания, упростить процесс приготовления заквасок на его основе, и обеспечить прочную консистенцию кисломолочных продуктов.

Отношение к диагностическим субстратам: растет в присутствии 4% NaCl, 40% желчи, 0,6% фенола, устойчив к щелочному раствору с pH 9,2.

Штамм не обладает протеолитической и липолитической активностями.

Антагонистические свойства. Штамм обладает высокой антагонистической активностью по отношению к ряду патогенных для человека микроорганизмов. Так, зоны угнетения роста следующих тест-культур составляли: более 30мм для *Escherichia coli* 0127, *Proteus vulgaris* 2029; *Staphylococcus aureus* 209 -  $22,6 \pm 6,6$ ; *Salmonella typhimurium* 91 -  $19,6 \pm 6,8$ ; *Shigella sonnei* 1776; *Shigella flexneri* 170 -  $10 \pm 5,0$ .

[Метод радиальных штрихов, агаризованная среда MPC-V без добавления лимоннокислых солей, рост в атмосфере  $\text{CO}_2$  в течение 72 ч. Егоров Н.С., 1986].

Антагонистическая активность культуральной жидкости *B.longum* 352 по отношению к *E.coli* 0111 K-59, определенная методом диффузии в агар, -  $15 \pm 0,5$ мм (коэффициент вариации 7,3%). Подавление роста данного патогена при совместном культивировании с испытуемым штаммом в жидкой среде Blaurock [Авт.св. СССР №1113076, кл. A23C9/12; C12N1/20, 1984] регистрируется в 0-1 разведениях культуральной жидкости.

Генетические особенности штамма. При определении чувствительности к антибиотикам методом диффузии в агар установлено, что штамм *B.longum* 352 устойчив к полимиксину, умеренно устойчив к канамицину, эритромицину, гентамицину и неомицину. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) канамицина, неомицина, эритромицина, левомицетина, стрептомицина, ампициллина составляют соответственно 100; 200; 0,5; 2; менее 5;  $0,5 \text{ мкг/мл}$ . В соответствии с полученными данными по определению МИК, штамм *B.longum* 352 является устойчивым к канамицину и неомицину.

Коэффициент изменчивости штамма по показателю концентрации биомассы в среде Blaurock составляет 6,2%; по антагонистической активности культуральной жидкости по отношению к *E.coli* 0111 K-59 - 7,3%; по энергии кислотообразования в молоке - 9,5%. Полученные значения коэффициентов изменчивости штамма по основным технологическим показателям и антагонистической активности свидетельствуют о стабильности его свойств, что является важным критерием при отборе штаммов для производства.

Изучение плазмидного профиля штамма показало наличие двух плазмид с размерами 60 и 80 тысяч пар нуклеотидов.

Адгезионные свойства штамма. Индекс адгезивности штамма составляет  $2,86 \pm 0,51$ , что достаточно высоко для бифидобактерий (для сравнения - индекс адгезивности штамма *B.bifidum*  $1-3,74 \pm 0,42$ ).

Штамм хранят в агаризованной среде Blaurock при температуре  $4-6^\circ\text{C}$  с периодичностью пересевов - 7-10 суток. Для длительного хранения используется лиофильно-высушенная в сахарозо-желатозной или другой из известных сред культура. Режимы сублимационной сушки. - традиционные. Перед использованием лиофильно-высушенную культуру оживляют в физиологическом растворе при оптимальной температуре в течение 2-4ч.

Предлагаемый штамм вступает в симбиотические взаимоотношения с мезофильными, термофильными стрептококками и лактобациллами, используемыми в молочной промышленности.

Преимущества штамма *B.longum* 352 ВКПМВ - по сравнению с известным штаммом *B.bifidum* 4:

- заявляемый штамм имеет стабильную и высокую антагонистическую активность, что позволит обеспечить стабильное качество целевых продуктов с лечебно-профилактическими свойствами;
- заявляемый штамм имеет более высокую активность сквашивания молока ( $6 \pm 1$ ч) по сравнению с прототипом (20ч), что обеспечит технологичность и быстроту процессов его ферментации;
- высокий температурный оптимум роста заявляемого штамма, а также высокие показатели удельной скорости роста и титра клеток при росте на производственных средах позволят получать симбиотические закваски и бактериальные препараты с высокой численностью клеток бифидобактерий, термофильных молочнокислых палочек и стрептококков.

Сравнительная характеристика заявляемого штамма и прототипа представлена в таблице.

Вышеперечисленные преимущества штамма *B. longum* 352 позволяют использовать его при получении сухих и жидких заквасочных препаратов для ряженки, простокваши, творога, йогурта и других ферментированных продуктов, а также в лиофилизированном виде составлять биологически активную основу (добавку) к детским и диетическим продуктам прямого питания как в чистой культуре, так и в симбиозе с молочнокислыми бактериями. Использование штамма расширит ассортимент и объемы производства ценных в диетическом отношении продуктов и препаратов.

Изобретение поясняется примерами использования штамма *B.longum* 352.

Пример 1. Получение лабораторной закваски *B.longum* 352.

Обезжиренное молоко стерилизуют при  $115^\circ\text{C}$  в течение 20 мин, охлаждают до  $44^\circ\text{C}$ . Вносят 1% чистой культуры *B.longum* 352, выращенной на среде Blaurock. Сквашивание проводят при  $44^\circ\text{C}$  до образования сгустка кислотностью  $65^\circ\text{T}$  (8ч). Количество жизнеспособных клеток бифидобактерий в закваске составляет  $(5,0 \pm 0,5) \cdot 10^{10}$  кое/мл.

Пример 2. Получение продукта типа йогурта.

Молоко нормализуют до содержания жира 3,2%, СОМО - 8%, пастеризуют при  $92^\circ\text{C}$  с выдержкой 20 мин,

охлаждают до температуры заквашивания 44°C и вносят 5% лабораторной закваски бифидобактерий (полученной по примеру 1), 1% закваски для йогурта, включающей *Streptococcus thermophilus* 27 ВКПМ В-4463 и *Lactobacillus acidophilus* 20 ЦМПМ В-2707, взятые в соотношении (мас.%) 4:1. Скваживание проводят при 44°C в течение 4ч до образования сгустка кислотностью 65-70°Т. Количество жизнеспособных клеток бифидобактерий в продукте составляет  $(3,0 \pm 0,6) \cdot 10^6$ к/мл. Продукт отличается приятным вкусом йогурта, имеет однородную слегка вязкую консистенцию без следов отделившейся сыворотки, проявляет антагонистическую активность по отношению к бактериям группы кишечных палочек - зона задержки роста *E.coli* 0111 К-59 -  $(18,0 \pm 1,0)$ мм, *E.coli* 0127 - более 30мм.

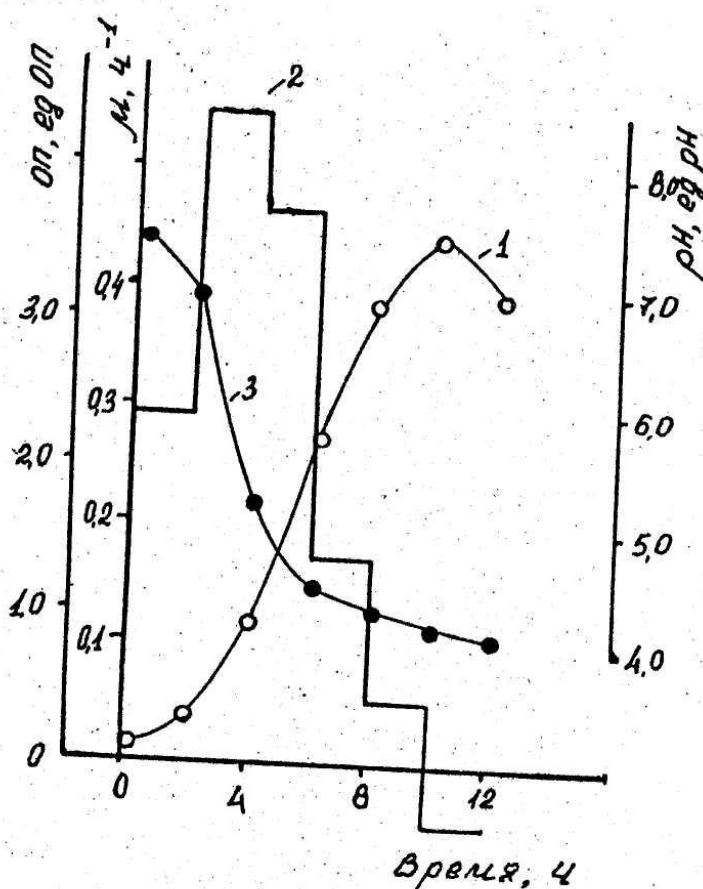
Пример 3. Получение бактериального концентрата с использованием штамма *B.longum* 352.

На 100л водопроводной воды вносят 3,0кг сухого обезжиренного молока, смесь нагревают до 55°C, доводят рН до 7,4, вносят 15г протосубтилина активностью 70 ед. и выдерживают смесь в этих условиях 2,5ч. После гидролиза в среду вносят 0,5кг лактозы, 0,5кг трехзамещенного лимоннокислого натрия, 2л кукурузного экстракта, 50,0г сернокислого железа. В среде устанавливают рН 8,0 путем добавления 30%-ного раствора гидроокиси натрия и стерилизуют ее при температуре 121°C в течение 30 мин. Активная кислотность среды после стерилизации  $(7,4 \pm 0,1)$  ед. рН. Среду охлаждают до 44°C, после чего инокулируют 10-50млн. к/мл культурой *B.longum* 352, 1-5млн. к/мл культурой *Streptococcus thermophilus* 27 ВКПМ В-4463 и 100-500тыс. к/мл культурой *Lactobacillus acidophilus* 20 ЦМПМ В-2707. Ассоциацию выращивают при 44°C в течение 8ч, поддерживая рН среды в пределах 7,5-6,6 ед. рН периодическим раскислением водным раствором аммиака. В конце роста культуральную жидкость охлаждают до 12°C, нейтрализуют до рН 7,2-7,4 и центрифугируют на суперцентрифуге ОТР при 15000об/мин. Полученную биомассу смешивают в соотношении 1:1 с защитной средой следующего состава в г/л: лактозы - 10, натрия хлористого - 5, аммония фосфорнокислого двузамещенного - 11, вода - до 1л. Суспензию клеток в защитной среде разливают по кюветам толщиной 10мм, замораживают и высушивают под вакуумом на сублимационной установке КС-30. В 1г сухого концентрата содержится 10млрд. к/мл бифидобактерий, 10млрд. к/мл молочнокислых стрептококков, 100млн. молочнокислых палочек. Наблюдается подавление роста бактерий группы кишечных палочек (штаммов 0127 и 0111 К-59) в 1-2 разведениях культуральной жидкости при совместном их культивировании с оживленными микроорганизмами бакконцентрата.

Пример 4. Клиническая апробация молочного продукта, обогащенного бакконцентратом, полученным по примеру 3. Клиническая апробация продукта проводилась на базе отделения питания здорового и больного ребенка ИПАГ АМН Украины. Продукт представлял собой цельное молоко сухое 2,5% жирности (производство МКК детских продуктов, г. Хорол, Полтавской области) с вложенным в упаковку порошком бакконцентрата, который вносили в молоко после его восстановления. Количество вносимого бакконцентрата соответствовало дозе, при которой численность биологически активной микрофлоры в восстановленном молоке составляла не менее  $10^8$ к/мл. Сухой порошок бакконцентрата вносили в восстановленное, прокипяченное и охлажденное до 37-38°C молоко. Под наблюдением находилось 12 детей возраста от 1г. и 2 мес. до 2-х лет, находившихся на искусственном вскармливании с различными видами патологии и бактериологически подтвержденным диагнозом кишечного дисбактериоза. Суточный объем продуктов составлял 250-400мл. Длительность приема продукта - 1 мес. У преобладающего числа детей в период приема продукта отмечено улучшение общего состояния, аппетита, уменьшение признаков интоксикации, а у детей с проявлениями экссудативного диатеза - угасание кожных проявлений. Уровень гемоглобина крови перед началом апробации у взятых под наблюдение детей был в пределах 120-122г/л и оставался на том же уровне к концу исследований, что свидетельствует об отсутствии отрицательного влияния продукта на гемопоэтическую функцию организма. Прибавка массы тела в пределах возрастной физиологической нормы отмечена у всех детей, получавших продукт в течение всего срока наблюдения. На фоне приема продукта нормализация стула у детей отмечена на  $4,7 \pm 0,6$  сутки. Отмечено положительное влияние включения в рацион питания продукта на состав кишечной микрофлоры у взятых под наблюдение детей. Это проявлялось в увеличении в 1,5-2,5 раза содержания общего количества бактерий группы кишечных палочек и бифидофлоры. Внутривидовой анализ микрофлоры позволил выявить в динамике снижение концентрации протей, бактерий группы кишечных палочек со слабовыраженными ферментативными свойствами, грибов рода *Candida*.

Таким образом, сухой молочный продукт, обогащенный бакконцентратом, обладает защитными свойствами при кишечных дисбактериозах, способствует восстановлению ряда форм кишечной флоры при одновременном угнетении условнопатогенных микроорганизмов. Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать обогащенный бакконцентратом сухой молочный продукт к применению в питании детей с 12-месячного возраста в качестве лечебно-профилактического продукта.

Показатели	<i>B. longum</i> 352 (заявляемый)	<i>B. bifidum</i> 4 (прототип)
Активность сквашивания, ч при 37°C	10±1	20
44°C	6±1	—
Кислотность молока через 24 ч культивирования, °Т		
при 37°C	99±1	80
44°C	105±2	—
Антагонистическая активность к микроорганизмам, мм		
Бактериям группы кишечных палочек	От 15,0 до 30,0	4
<i>Proteus vulgaris</i> 2029	Более 30,0	—
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	22,6±6,6	—
<i>Salmonella typhimurium</i> 91	19,6±6,8	—
<i>Shigella sonnei</i> 1776	Более 30,0	—
<i>Shigella flexneri</i> 170	10±5,0	—



Фиг. I . Изменение оптической плотности (1), удельной скорости роста (2), кислотности среды (3) при периодическом культивировании *B. longum* 352 на среде Блаурокка (37°C).

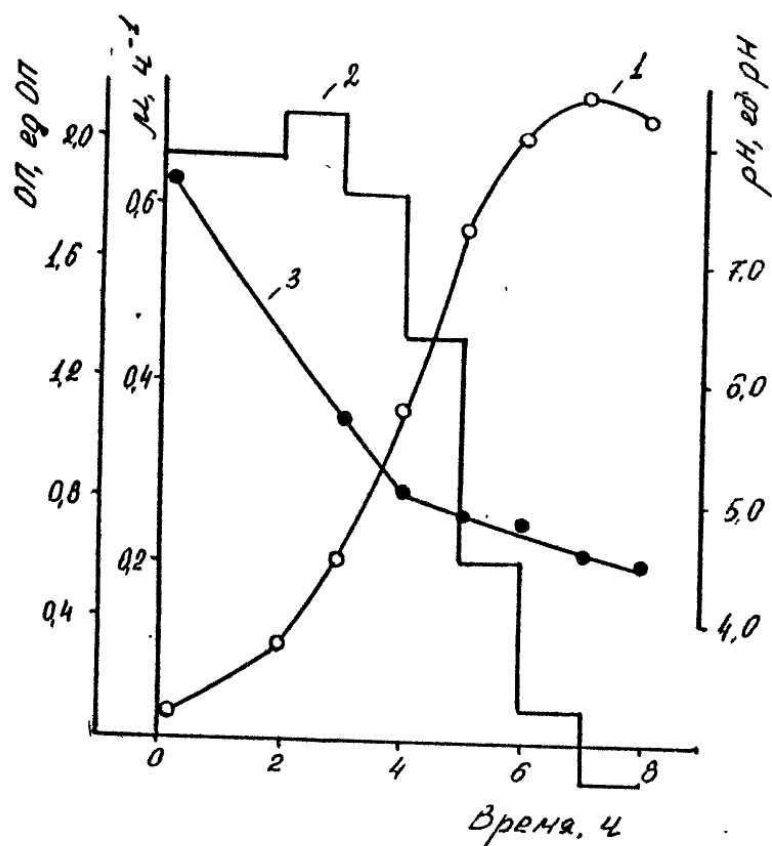


Рис.2 . Изменение оптической плотности (1), удельной скорости роста (2), кислотности среды (3) при периодическом культивировании *B. longum* 352 на гидролизатно-молочной среде (44°C).

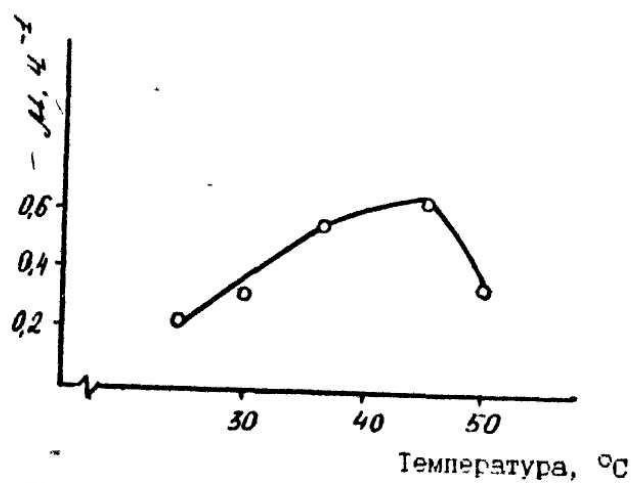


Рис.3 . Влияние температуры культивирования на удельную скорость роста *B. longum* 352.

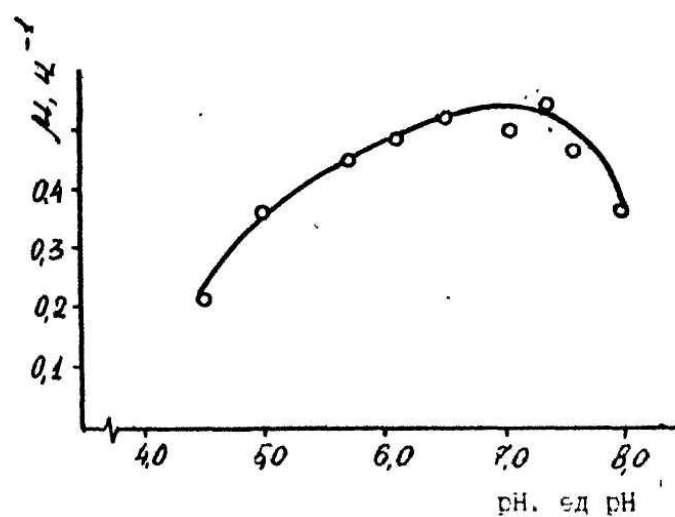


Рис. 4 . Влияние pH среды культивирования на удельную скорость роста *B. longum* 352.