



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **107738**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 1/20** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 11451**

(22) Дата подання заявки: **29.01.2016**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **24.06.2016**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **24.06.2016, Бюл.№ 12**

(72) Винахідник(и):

**Капельянець Леонід Вікторович (UA),  
Труфкаті Людмила Вікторівна (UA),  
Крупицька Лариса Олександрівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ  
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ,  
вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)**

## (54) КОМПОЗИЦІЯ ІНГРЕДІЄНТІВ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ BIFIDOBACTERIUM

### (57) Реферат:

Композиція інгредієнтів для культивування бактерій роду Bifidobacterium містить лактозу, пептон, аскорбінову кислоту, натрій лимоннокислий тризаміщений, калій фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчанокислий, агар-агар, дистильовану воду, стимулятор росту. При цьому як стимулятор росту вона містить соєву сироватку.

**UA 107738 U**



Корисна модель належить до біотехнологій, харчової та медичної промисловості, може бути використана у виробництві біологічно активних домішок, препаратів і продуктів харчування пробіотичної дії, призначених для корекції мікробіоти шлунково-кишкового тракту.

В останній час для корекції дисбактеріозу шлунково-кишкового тракту людини використовують препарати і продукти, які містять мікроорганізми-пробіотики або їх метаболіти. В першу чергу це біфідобактерії та продукти їх життєздатності. Біфідобактерії беруть активну участь у травленні і всмоктуванні. Вони сприяють процесам ферментативного перетравлення їжі, тому що підсилюють гідроліз білків, зброджують вуглеводи, обмилюють жири, розчиняють клітковину, стимулюють перистальтику кишечника, сприяють нормальній евакуації кишкового вмісту. Антагоністична активність біфідобактерій пов'язана з продукцією органічних кислот і бактеріоцинів з широким спектром антимікробної дії, а також зі здатністю блокувати рецептори на слизовій кишечнику, запобігаючи фіксації на них потенційно небезпечних мікроорганізмів. У зв'язку з цим, підбір дешевого поживного середовища, яке відповідає фізіологічним потребам мікроорганізмів, є однією з основних задач у виробництві бактеріальних препаратів, що нормалізують мікробіоту, тому для приготування поживного середовища, для культивування біфідобактерій, було запропоноване середовище з додаванням стимулятора росту рослинного походження, а саме з додаванням соєвої сироватки.

У літературі описана значна кількість виробничих поживних середовищ для культивування і виділення біфідобактерій. Вуглеводна частина поживних середовищ представлена переважно лактозою. До їх складу також входять як аміне харчування пептони і відвари рослинного і тваринного походження.

Відоме поживне середовище для культивування біфідобактерій, що містить органічну, мінеральну основу та стимулятори росту (Патент RU 2080376, МПК C12N1/20, опубл. 1995), при наступному спів відношенні компонентів, мас. %:

залізо сірчанокисле	0,002-0,1
натрій хлористий	4,0-6,0
глюкоза	8,0-12,0
агар-агар	0,75-1,0
аскорбінова кислота	0,8-1,0
гідролізат молозивної	решта.
казеїново-сироваткової маси	

Недоліком даного середовища є те, що воно має слабкі ростові властивості, тому що вміст амінного азоту у такому середовищі доволі низький - 70-110 мг. А також через те, що основа поживного середовища - гідролізат молозивної казеїново-сироваткової маси - є важко доступним, тому його використання у промисловому масштабі є неперспективним для культивування біфідобактерій.

У випадках технологічного виробництва використовують кукурудзяно-лактозне середовище, оскільки речовини рослинного походження, будучи природними акумуляторами біологічно активних речовин, у тому числі вітамінів, ферментів, амінокислот, мікро- і макроелементів, в поєднанні з традиційними пробіотичними штамами, надають більший лікувальний ефект. Крім цього рослинна сировина є менш дорогою, ніж сировина тваринного походження.

Як найближчий аналог вибрано кукурудзяно-лактозне середовище на основі кукурудзяного екстракту (Методические указания МУК 4.2.577-96. Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов: Методические указания. - М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. - 95 с.), при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

кукурудзяний екстракт	4,0
лактоза	1,0
пептон	1,0
аскорбінова кислота	0,05
натрій лимоннокислий	0,6
тризаміщений	
калій фосфорнокислий	0,2
двозаміщений	
магній сірчанокислий	0,12
агар-агар	0,25
вода дистильована	решта до 100.

Найближчий аналог і композиція інгредієнтів, що заявляється, мають наступні спільні компоненти: лактозу, пептон, аскорбінову кислоту, натрій лимоннокислий тризаміщений, калій фосфорнокислий однозаміщений, магній сірчанокислий, агар-агар і дистильовану воду.

Наявність у складі середовища нестандартного компонента - кукурудзяного екстракту, забезпечує нестандартність самого середовища, що призводить до короткочасного терміну зберігання кінцевого продукту, а так само супроводжується незадовільними органолептичними властивостями біологічно активних домішок і заквасок.

5 В основу корисної моделі поставлено задачу створити композицію інгредієнтів для культивування бактерій роду *Bifidobacterium*, і ця задача вирішується шляхом додаванням доступної, екологічно чистої, рослинної сировини, при збільшенні строку зберігання середовища з більш високими титрами біомаси бактерій в процесі зберігання.

10 Поставлена задача вирішена композицією інгредієнтів для культивування бактерій роду *Bifidobacterium*, що містить стимулятор росту, лактозу, пептон, аскорбінову кислоту, натрій лимоннокислий тризаміщений, калій фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчаноокислий, агар-агар і воду дистильовану. Як стимулятор росту композиція містить соєву сироватку, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

соєва сироватка	3-5
лактоза	0,1
пептон	0,1
аскорбінова кислота	0,05
натрій лимоннокислий тризаміщений	0,6
калій фосфорнокислий двозаміщений	0,2
магній сірчаноокислий	0,12
агар-агар	0,25
вода дистильована	решта.

15 Після вивчення хімічного складу було встановлено, що найбільш повноцінними і придатними для включення у композицію інгредієнтів для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* є зернобобові культури та продукти їх переробки. Вони містять високоякісний білок і, крім того, є джерелом поліненасичених жирних кислот, вітамінів, макро- і мікроелементів, не містять холестерину і твердих жирів. Крім цього, соя та продукти її переробки є джерелами харчових волокон та ізофлавінів, тому вони самі по собі стимулюють ріст нормальної мікробіоти шлунково-кишкового тракту.

20 Використання запропонованої композиції дозволяє за 16-24 години культивування при 37 °C отримати біомасу біфідобактерій з вмістом життєздатних клітин від  $6 \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> до  $5 \cdot 10^{11}$  КУО/см<sup>3</sup>.

Заявлена корисна модель ілюструється фігурами, де:

25 фіг. 1 - динаміка росту *B.bifidum* на лактозному середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки;

фіг. 2 - динаміка росту *B. longum* на лактозному середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки;

30 фіг. 3 - динаміка росту *B. adolescentis* на лактозному середовищі з додаванням різної масової частки соєвої сироватки;

фіг. 4 - технологічна схема отримання соєвої сироватки.

35 Було приготовано поживне середовище на основі лактози і соєвої сироватки. Приготування соєвої сироватки для додавання в експериментальні зразки поживного середовища включало в себе наступні етапи - замочування насіння сої (t=50 °C, t=1 год.) та луцення. На першому етапі при замочуванні насіння сої виникає неприємний бобовий запах, який необхідно усунути при отриманні готової сировини. Проведений аналіз показав, що основну частину ароматичних речовин складають спирти: ізобутанол, ізопентанол, гексанол, деканол, гептанол і летючі жирні кислоти: оцтова, мурашина, ізомасляна, ізовалер'янова [Ковалев Н.И., Куткина М.Н., Кравцова В.А. Технология приготовления пищи: учебник для средних специальных учебных заведений / Под ред. доктора технических наук, проф. Николаевой М. А. – М.: Издательский Дом "Деловая литература", 2008. - 480 с.]

40 Під час обробки сої протягом 5 хвилин при температурі 120 °C в 0,5 % -му розчині Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> при гідромодулі 1:6 виникає активація ліпоксигеназного комплексу ферментів сої. При цьому збільшувалась концентрація спиртів: ізобутанолу - в 5 разів, ізопентанолу - в 2,5 рази, гексанолу - в 2 рази. Під час бланшування відбувалась інактивація ферментів, у тому числі ліпоксигеназного комплексу та часткове видалення легколетючих продуктів розкладання. Масові частки бутанолу, ізопентану і гексанолу зменшувались в 2,5 рази. Після видалення розчину Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, провівши дезінтеграцію, здійснювали водну екстракцію при температурі 100 °C і гідромодулі 1:5 протягом 10 хвилин. Після фільтрації пастеризували при температурі 90 °C

протягом 15 хвилин. Перед початком сквашування соєвий екстракт (соєве молоко) охолоджували до 37 °С. Осадження білків проводили шляхом внесення заквасочної культури при температурі 37 °С протягом 6 годин або за допомогою внесення 30 мас. % розчину лимонної кислоти до рН=4,5 при температурі 90 °С протягом 15 хвилин. На останньому етапі після фільтрації соєвої сироватки нейтралізували її розчином 30 мас. % NaOH, доводячи значення активної кислотності до 6,8-7,0 од. рН (фіг. 4).

У невеликій кількості дистильованої води розплавляли агар-агар в кількості 0,25 мас. % на 1,0 дм<sup>3</sup>. До решти дистильованої води додавали 0,1 мас. % пептону, 3-5 мас. % соєвої сироватки, 0,6 мас. % натрію лимоннокислого тризаміщеного, 0,2 мас. % калію фосфорнокислого двозаміщеного, 0,12 мас. % магнію сірчанокислого. Суміш нагрівали до температури (80±1)°С, після чого з'єднуючи з розплавленим агаром, додавали 0,1 мас. % лактози і 0,05 мас. % аскорбінової кислоти. У суміш доливали дистильовану воду, доводячи об'єм до 100 мас. %. Встановлювали активну кислотність середовища (7±0,1) од. рН за допомогою 30 %-го розчину NaOH. Середовище розливали в пробірки високим стовпчиком по 10,0 мл і автоклаували при 0,5 атм при температурі (120±1)°С протягом 30 хвилин.

Ростові властивості приготованої композиції інгредієнтів перевіряли, використовуючи музейні культури біфідобактерій ОНАХТ *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, які є класичними пробіотичними культурами.

Культури біфідобактерій - *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis* - засівали у рідке поживне середовище із різноманітною масовою часткою соєвої сироватки у співвідношенні посівний матеріал і поживне середовище 1:10, для вивчення накопичення біомаси бактерій. Посіви витримували в термостаті при (37±1)°С протягом 48 годин. Динаміку зростання біфідобактерій на запропонованому середовищі порівнювали з динамікою приросту біомаси бактерій на еталонному кукурудзяно-лактозному середовищі.

Збільшення вмісту масової частки соєвої сироватки у композиції інгредієнтів для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* стимулювало процес накопичення біомаси мікроорганізмів, які досліджували (фіг. 1-3).

В кінці культивування кількість клітин *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis* на запропонованій композиції інгредієнтів з масовою часткою соєвої сироватки 3 мас. % максимально наближалось до значень контролю, в той час, як при використанні композиції інгредієнтів для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* з додавання соєвої сироватки у кількості 1 мас. % і 2 мас. % кількість клітин біфідобактерій була значно нижча, ніж у контролі. З підвищенням кількості соєвої сироватки від 4 мас. % до 5 мас. % кількість клітин біфідобактерій зростала. При подальшому додаванні соєвої сироватки у кількості 6 мас. % спостерігали збільшення приросту біомаси всіх культур роду *Bifidobacterium* в порівнянні із показниками у композиції інгредієнтів, яка містила 5 мас. % соєвої сироватки. На середовищі з додаванням 6 мас. % соєвої сироватки відбувався активний приріст біомаси бактерій і накопичення продуктів метаболізму, тому ростові фактори середовища виснажувалися, що спричинило внутрішньовидову конкуренцію за споживання поживних речовин. Це і стало причиною зниження кількості клітин після 24 години культивування. Максимальний позитивний ефект на організм людини виявляють препарати і продукти харчування, що містять живі біфідобактерії у кількості від 10<sup>8</sup> КУО/см і більше. Саме кількісний вміст життєздатних біфідобактерій є основним показником якості препаратів і продуктів харчування пробіотичного призначення (Пробиотики: химия, технология, применение. / Л.В. Капрельянец. - Киев: ЭнтерПринт, 2015. – 252 с.)

При використанні композиції інгредієнтів для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* з додавання соєвої сироватки у кількості 3 мас. % показник приросту біомаси бактерій мав необхідне значення для використання в харчовій промисловості і максимально наближався до контролю, тому запропоновано саме таку кількість соєвої сироватки для отримання мікробної біомаси для виробництва продуктів харчування пробіотичної дії. Композиція інгредієнтів з додаванням 4-5 мас. % соєвої сироватки мала більш високі показники приросту біомаси біфідобактерій, що дозволяє рекомендувати цю композицію для виробництва біологічно-активних концентратів, призначених для корекції мікробіоти шлунково-кишкового тракту людини.

Проведено мікробіологічне дослідження впливу заявленої композиції інгредієнтів для культивування бактерій роду *Bifidobacterium* на морфологічні та культуральні властивості пробіотичних бактерій, що досліджувались. Виявлено, що при культивуванні біфідобактерій на запропонованій композиції морфологічні та культуральні властивості біфідобактерій всіх культур відповідали видам *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*.

В мазках культивованих мікроорганізмів, що вирости на запропонованій композиції інгредієнтів, всі культури біфідобактерій мали типову морфологію паличок з біфуркацією чи

потовщенням з одного з кінців, при фарбуванні за методом Грама - фарбувалися як грампозитивні, розташовувалися у вигляді пучків, а також у вигляді окремих особин.

#### Приклад 1

У невеликій кількості дистильованої води розплавляли агар-агар в кількості 0,25 мас. % на 1,0 дм<sup>3</sup>. До решти дистильованої води додавали 0,1 мас. % пептону, 3 мас. % соєвої сироватки, 0,6 мас. % натрію лимоннокислого тризаміщеного, 0,2 мас. % калію фосфорнокислого двозаміщеного, 0,12 мас. % магнію сірчанонокислого. Суміш нагрівали до температури (80±1)°C, після чого, з'єднуючи з розплавленим агаром, додавали 0,1 мас. % лактози і 0,05 мас. % аскорбінової кислоти. У суміш доливали дистильовану воду, доводячи об'єм до 100 мас. %. Встановлювали активну кислотність середовища (7±0,1) од. рН за допомогою 30 %-го розчину NaOH. Середовище розливали в пробірки високим стовпчиком по 10,0 мл і автаклавували при 0,5 атм при температурі (120±1)°C протягом 30 хвилин.

#### Приклад 2

У невеликій кількості дистильованої води розплавляли агар-агар в кількості 0,25 мас. % на 1,0 дм<sup>3</sup>. До решти дистильованої води додавали 0,1 мас. % пептону, 4 мас. % соєвої сироватки, 0,6 мас. % натрію лимоннокислого тризаміщеного, 0,2 мас. % калію фосфорнокислого двозаміщеного, 0,12 мас. % магнію сірчанонокислого. Суміш нагрівали до температури (80±1)°C, після чого, з'єднуючи з розплавленим агаром, додавали 0,1 мас. % лактози і 0,05 мас. % аскорбінової кислоти. У суміш доливали дистильовану воду, доводячи об'єм до 100 мас. %. Встановлювали активну кислотність середовища (7±0,1) од. рН за допомогою 30 %-го розчину NaOH. Середовище розливали в пробірки високим стовпчиком по 10,0 мл і автаклавували при 0,5 атм при температурі (120±1)°C протягом 30 хвилин.

#### Приклад 3

У невеликій кількості дистильованої води розплавляли агар-агар в кількості 0,25 мас. % на 1,0 дм<sup>3</sup>. До решти дистильованої води додавали 0,1 мас. % пептону, 5 мас. % соєвої сироватки, 0,6 мас. % натрію лимоннокислого тризаміщеного, 0,2 мас. % калію фосфорнокислого двозаміщеного, 0,12 мас. % магнію сірчанонокислого. Суміш нагрівали до температури (80±1)°C, після чого, з'єднуючи з розплавленим агаром, додавали 0,1 мас. % лактози і 0,05 мас. % аскорбінової кислоти. У суміш доливали дистильовану воду, доводячи об'єм до 100 мас. %. Встановлювали активну кислотність середовища (7±0,1) од. рН за допомогою 30 %-го розчину NaOH. Середовище розливали в пробірки високим стовпчиком по 10,0 мл і автаклавували при 0,5 атм при температурі (120±1)°C протягом 30 хвилин.

#### Приклад 4

У невеликій кількості дистильованої води розплавляли агар-агар в кількості 0,25 мас. % на 1,0 дм<sup>3</sup>. До решти дистильованої води додавали 0,1 мас. % пептону, 1 мас. % соєвої сироватки, 0,6 мас. % натрію лимоннокислого тризаміщеного, 0,2 мас. % калію фосфорнокислого двозаміщеного, 0,12 мас. % магнію сірчанонокислого. Суміш нагрівали до температури (80±1)°C, після чого, з'єднуючи з розплавленим агаром, додавали 0,1 мас. % лактози і 0,05 мас. % аскорбінової кислоти. У суміш доливали дистильовану воду, доводячи об'єм до 100 мас. %. Встановлювали активну кислотність середовища (7±0,1) од. рН за допомогою 30 %-го розчину NaOH. Середовище розливали в пробірки високим стовпчиком по 10,0 мл і автаклавували при 0,5 атм при температурі (120±1)°C протягом 30 хвилин.

#### Приклад 5

У невеликій кількості дистильованої води розплавляли агар-агар в кількості 0,25 мас. % на 1,0 дм<sup>3</sup>. До решти дистильованої води додавали 0,1 мас. % пептону, 2 мас. % соєвої сироватки, 0,6 мас. % натрію лимоннокислого тризаміщеного, 0,2 мас. % калію фосфорнокислого двозаміщеного, 0,12 мас. % магнію сірчанонокислого. Суміш нагрівали до температури (80±1)°C, після чого, з'єднуючи з розплавленим агаром, додавали 0,1 мас. % лактози і 0,05 мас. % аскорбінової кислоти. У суміш доливали дистильовану воду, доводячи об'єм до 100 мас. %. Встановлювали активну кислотність середовища (7±0,1) од. рН за допомогою 30 %-го розчину NaOH. Середовище розливали в пробірки високим стовпчиком по 10,0 мл і автаклавували при 0,5 атм при температурі (120±1)°C протягом 30 хвилин.

#### Приклад 6

У невеликій кількості дистильованої води розплавляли агар-агар в кількості 0,25 мас. % на 1,0 дм<sup>3</sup>. До решти дистильованої води додавали 0,1 мас. % пептону, 6 мас. % соєвої сироватки, 0,6 мас. % натрію лимоннокислого тризаміщеного, 0,2 мас. % калію фосфорнокислого двозаміщеного, 0,12 мас. % магнію сірчанонокислого. Суміш нагрівали до температури (80±1)°C, після чого, з'єднуючи з розплавленим агаром, додавали 0,1 мас. % лактози і 0,05 мас. % аскорбінової кислоти. У суміш доливали дистильовану воду, доводячи об'єм до 100 мас. %. Встановлювали активну кислотність середовища (7±0,1) од. рН за допомогою 30 %-го розчину

NaOH. Середовище розливали в пробірки високим стовпчиком по 10,0 мл і автклаувували при 0,5 атм при температурі  $(120 \pm 1)^\circ\text{C}$  протягом 30 хвилин.

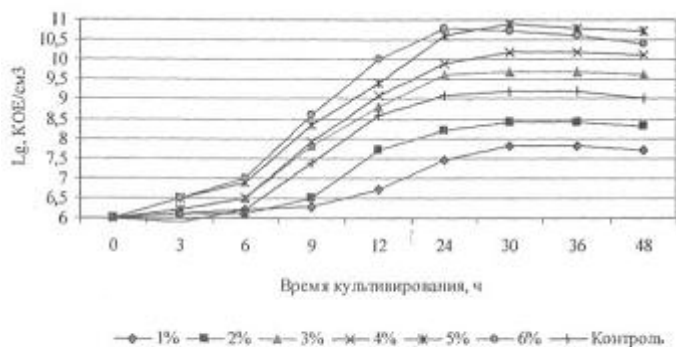
# ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

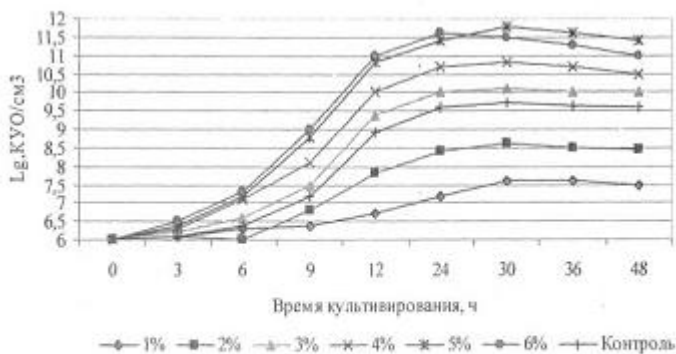
Композиція інгредієнтів для культивування бактерій роду *Bifidobacterium*, що містить лактозу, пептон, аскорбінову кислоту, натрій лимоннокислий тризаміщений, калій фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчаноокислий, агар-агар, дистильовану воду, стимулятор росту, яка **відрізняється** тим, що як стимулятор росту вона містить соєву сироватку, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

10

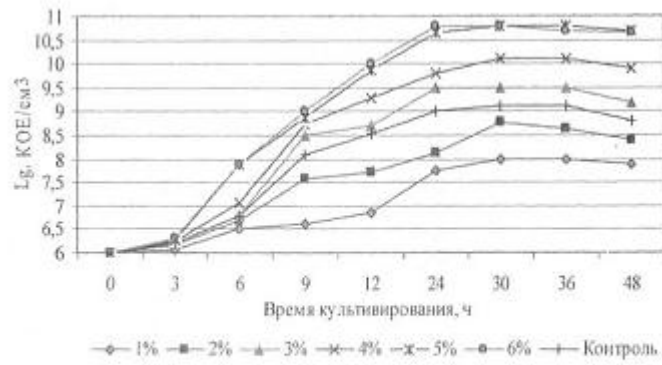
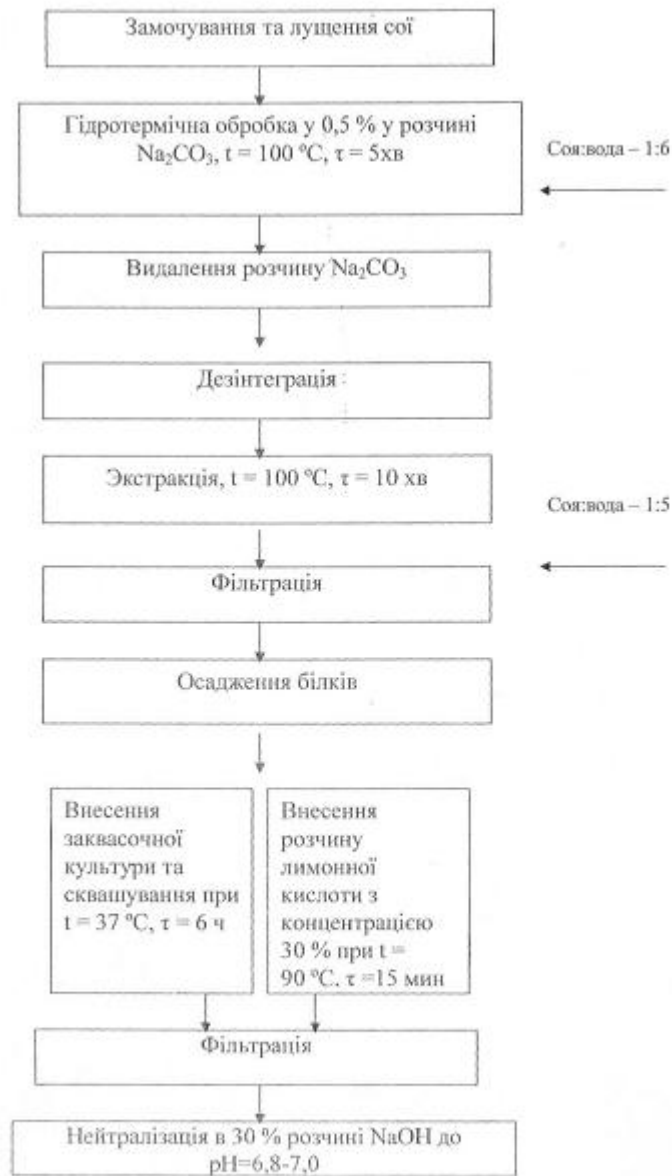
соева сироватка	3-5
лактоза	0,1
пептон	0,1
аскорбінова кислота	0,05
натрій лимоннокислий тризаміщений	0,6
калій фосфорнокислий двозаміщений	0,2
магній сірчаноокислий	0,12
агар-агар	0,25
вода дистильована	решта.



Фиг. 1



Фиг. 2


**Фиг. 3**

**Фиг. 4**



---

Комп'ютерна верстка В. Мацело

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601