



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008115406/13, 18.04.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
18.04.2008

(45) Опубликовано: 20.11.2009 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2309982 C2, 10.11.2007. ХАМАГАЕВА И.С. и др. Создание продукта функционального питания с использованием пропионово-кислых бактерий. Пробиотические микроорганизмы - современное состояние, вопросы и перспективы использования. Международная научно-практическая конференция памяти Галины Ивановны Гончаровой. Сборник материалов конференции. - М.: 2002, с.70-71. SU 1686718 A1, 20.02.1996.

Адрес для переписки:  
670013, Республика Бурятия, г.Улан-Удэ, ул.  
Ключевская, 40в, стр.1, ВСГТУ, ОИС

(72) Автор(ы):

Хамагаева Ирина Сергеевна (RU),  
Митыпова Наталья Васильевна (RU),  
Хамагаева Наталья Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное  
учреждение высшего профессионального  
образования Восточно-Сибирский  
государственный технологический  
университет (RU),  
Хамагаева Ирина Сергеевна (RU)

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЗАМОРОЖЕННОЙ КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ ЗАКВАСКИ НА ОСНОВЕ СИМБИОЗА ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

(57) Реферат:

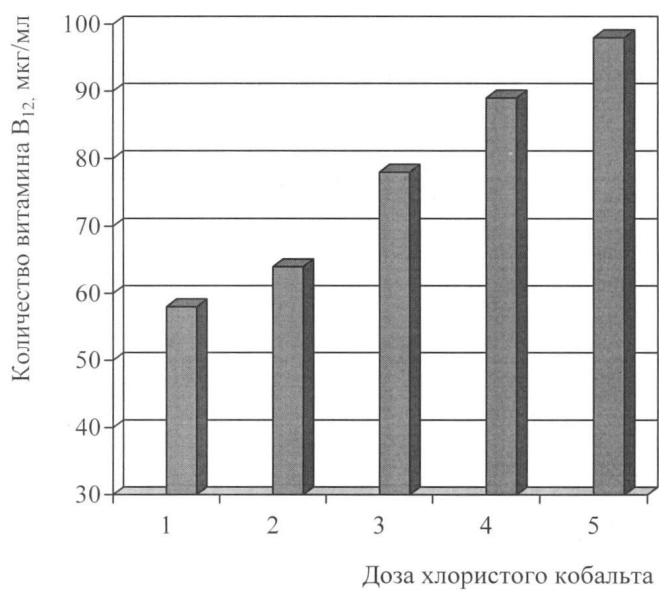
Способ получения замороженной концентрированной закваски на основе симбиоза пробиотических бактерий предусматривает приготовление питательной среды на основе осветленной творожной сыворотки с внесением хлористого кобальта в количестве (0,1-0,2) мг/мл. В охлажденную до (34±1)°С среду вносят комбинированную закваску в количестве (3-5)%, состоящую из отдельно активизированных β-галактозидазой

культур бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий, взятых в соотношении 1:1. Затем осуществляют наращивание клеток, отделение бактериальной массы от культуральной среды, смешивание ее с защитной средой, розлив и замораживание. Это обеспечивает повышение пробиотических свойств закваски, увеличение количества клеток бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий и высокую активность ферментации молока. 3 з.п. ф-лы. 4 ил., 5 табл.

RU 2 372 782 C1

RU 2 372 782 C1

Зависимость синтеза витамина В<sub>12</sub> комбинированной закваской от содержания ионов кобальта в питательной среде



Содержание  $\text{CoCl}_2$ , мг/л : 1 – нет;  
2 – 0,05;  
3 – 0,1;  
4 – 0,2;  
5 – 0,3.

Фиг.3

RU 2372782 C1

RU 2372782 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.  
**A23C 9/12** (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2008115406/13, 18.04.2008**

(24) Effective date for property rights:  
**18.04.2008**

(45) Date of publication: **20.11.2009 Bull. 32**

Mail address:

**670013, Respublika Burjatija, g.Ulan-Udeh, ul.  
Ključevskaja, 40v, str.1, VSGTU, OIS**

(72) Inventor(s):

**Khamagaeva Irina Sergeevna (RU),  
Mitypova Natal'ja Vasil'evna (RU),  
Khamagaeva Natal'ja Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie  
vysshego professional'nogo obrazovanija  
Vostočno-Sibirskij gosudarstvennyj  
tehnologičeskij universitet (RU),  
Khamagaeva Irina Sergeevna (RU)**

**(54) METHOD FOR PRODUCTION OF FROZEN CONCENTRATED LEAVEN BASED ON SYMBIOSIS OF PROBIOTICAL BACTERIA**

(57) Abstract:

FIELD: food industry.

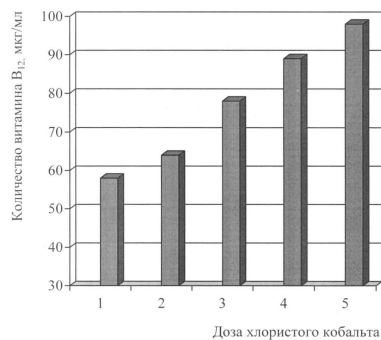
SUBSTANCE: production method of frozen concentrated leaven based on symbiosis of probiotical bacteria provides for preparation of nutrient medium based on enlightened curdy whey with addition of cobalt chloride in quantity (0.1-0.2) mg/ml. Combined culture starter in quantity (3-5)% consisting of bifidobacteria and propionate bacteria taken in ratio 1:1 separately activated  $\beta$ -galactosidase is added to cooled ((34±1)°C ) medium. After that cell growing is performed, bacterial mass is separated from cultural medium, mixed with protecting medium, poured and frozen.

EFFECT: this provides increased probiotical properties of starting culture, increased quantity of bifidobacteria and propionate bacteria cells and high

activity of milk fermentation.

4 cl, 4 dwg, 5 tbl, 3 ex

Зависимость синтеза витамина В<sub>12</sub> комбинированной закваской от содержания ионов кобальта в питательной среде



Содержание CoCl<sub>2</sub>, мг/л : 1 – нет;  
2 – 0,05;  
3 – 0,1;  
4 – 0,2;  
5 – 0,3.

Фиг.3

RU 2 372 782 C1

RU 2 372 782 C1

Предлагаемое изобретение относится к микробиологической промышленности, биотехнологии и может быть использовано для приготовления кисломолочных продуктов, а также биологически активных добавок к пище на основе биомассы пробиотических микроорганизмов.

Известно, что получение биопрепаратов является одним из сложных направлений в биотехнологии. Наиболее перспективным в технологическом и экономическом отношении является использование концентрированных препаратов, полученных на питательных средах, которые дают возможность получения культур с заданными свойствами. Использование замороженных концентрированных заквасок позволяет увеличить объем продукции, упростить технологический процесс, сократить его продолжительность и повысить санитарно-гигиенические показатели готового продукта.

Известен способ получения бактериального концентрата бифидобактерий для производства кисломолочных продуктов, предусматривающий приготовление питательной среды на основе осветленной молочной сыворотки и ростовых компонентов, внесение инокулята бифидобактерий, культивирование, отделение полученной биомассы, смешивание с защитной средой, замораживание [SU №1686718 А1, МКИ А23С 9/12, опубл. 20.10.1993 г.].

Недостатком данного способа является длительное культивирование бифидобактерий, которое составляет (32-40) ч, при этом количество микроорганизмов в готовой закваске достигает всего  $10^{8-9}$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Наиболее близким способом к заявляемому изобретению по совокупности признаков является способ получения бактериального концентрата пропионово-кислых бактерий, предусматривающий приготовление питательной среды на основе осветленной молочной сыворотки и ростовых компонентов, с добавлением хлористого кобальта для увеличения витаминобразующей способности пропионово-кислых бактерий, внесение активизированной  $\beta$ -галактозидазой культуры пропионово-кислых бактерий *Propionibacterium shermanii* штамм МГУ, наращивание клеток, отделение полученной биомассы, смешивание с защитной средой, замораживание [RU №2309982 С2, С12N 1/20, А23С 9/12, С12R 1/15, опубл. 10.11.2007 г. Бюл. №31].

Однако использование монокультур пробиотических микроорганизмов снижает биотехнологические и пробиотические свойства концентрата.

Задачей настоящего изобретения является создание концентрированной закваски на основе симбиоза бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий с выраженными биотехнологическими и пробиотическими свойствами. Концентрированная закваска может использоваться для разработки новых препаратов-пробиотиков, рекомендуемых для эффективной профилактики нарушения микробиоценоза желудочно-кишечного тракта и предупреждения развития дисбактериозов различной этиологии.

Создание симбиоза пробиотических микроорганизмов связано прежде всего с рядом его несомненных преимуществ в сравнении с монокультурами. Симбиоз культур имеет более широкий спектр трансформируемых веществ и более технологичен в практическом использовании.

Технический результат, обеспечиваемый при осуществлении предлагаемого изобретения, заключается в повышении пробиотических свойств концентрированной закваски, увеличении количества клеток бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий и обеспечении высокой активности ферментации молока.

Указанный технический результат при осуществлении изобретения достигается тем, что в способе приготовления концентрированной закваски, включающем приготовление питательной среды, внесение инокулята в количестве (3-5) %, наращивание клеток, отделение бактериальной массы от культуральной среды, смешивание ее с защитной средой, розлив и замораживание, согласно изобретению в качестве инокулята для заквашивания питательной среды используют комбинированную закваску, состоящую из отдельно активизированных культур бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий, при этом хлористый кобальт вводят в количестве (0,1-0,2) мг/мл.

Отличительными признаками заявляемого способа являются новые условия культивирования инокулята, а именно использование в качестве инокулята комбинированной закваски, состоящей из отдельно активизированных  $\beta$ -галактозидазой культур бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий, позволяющие реализовать в максимальной степени физиолого-биохимический и технологический потенциал микроорганизмов.

Для осуществления заявляемого способа получения концентрированной закваски были проведены экспериментальные исследования, в ходе которых подобраны оптимальные температурные условия для сбалансированного развития микрофлоры комбинированной закваски, выбрано соотношение культур и определены условия для накопления биомассы с высоким титром пробиотических бактерий.

Авторами исследовано влияние разных температурных параметров ферментации на скорости роста бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий. Результаты эксперимента представлены на фиг.1. Анализ данных фиг.1 показал, что изменение оптимальных температур культивирования бактерий приводит к снижению их скорости роста. Тогда как при промежуточной температуре 34°C наблюдается равномерное развитие микроорганизмов, значения средней удельной скорости роста бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий при данной температуре приближаются. В связи с этим для совместного культивирования пробиотических микроорганизмов выбран температурный режим ферментации (34±1)°C.

Выбор оптимального соотношения микроорганизмов в комбинированной закваске проводили с учетом биотехнологических свойств исследуемых культур и их ассоциаций. Полученные данные отражены в таблице 1.

Таблица 1

Выбор соотношения культур в комбинированной закваске

Показатель	Характеристика заквасок					
	Бифидобактерии	Пропионовые бактерии	Варианты комбинированной закваски, состоящей из бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий в соотношении			
			1:1	2:1	3:1	1:2
Консистенция и внешний вид	Однородная, жидкая	Вязкая, однородная с газообразованием	Однородная, в меру вязкая	Нежная, менее вязкая	Жидкая, с небольшим газообразованием	Нежная, вязкая
Вкус и запах	Мягкий кисломолочный	Освежающий, чистый	Кисломолочный, освежающий	Чистый, с приятным кисломолочным привкусом	Чистый кисломолочный	Освежающий, без посторонних запахов
Цвет	Молочно-белый, равномерный по всей массе					
Активность, ч	9,0	7,5	6,5	7,0	7,5	6,0
Кислотность, °Т	60	75	68	66	64	73
Содержание бактерий, к.о.е./мл: бифидобактерий	6·10 <sup>9</sup>	-	4·10 <sup>10</sup>	8·10 <sup>10</sup>	8·10 <sup>10</sup>	3·10 <sup>10</sup>
пропионово-кислых	-	5·10 <sup>9</sup>	5·10 <sup>10</sup>	5·10 <sup>10</sup>	3·10 <sup>10</sup>	8·10 <sup>10</sup>
Витамин В <sub>12</sub> , мкг/мл	0,04	38	49	44	40	53
ЛЖК, мг/100 г	1,6	2,0	2,9	2,7	2,3	3,1
Углекислый газ (СО <sub>2</sub> ), мм		3,6	3,4	3,1	2,8	3,7
Степень синерезиса, мл, за 30 мин	24	15	18	20	22	16

Как видно из таблицы 1, все исследуемые ассоциации микроорганизмов обладают хорошими органолептическими и биотехнологическими свойствами. При совместном культивировании пропионово-кислых и бифидобактерий количество жизнеспособных клеток составляет на порядок выше, чем у отдельных культур, содержание ЛЖК и витамина  $B_{12}$  увеличивается, что свидетельствует о симбиотических взаимоотношениях микроорганизмов. В результате эксперимента также установлено, что наиболее вязкой консистенцией и наибольшей влагоудерживающей способностью обладает образец с соотношением культур 1:2, но при этом наблюдается более кислый вкус, что объясняется высоким содержанием летучих жирных кислот, более интенсивное формирование сгустка, составляющее 6 ч.

Варианты соотношения культур бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий 2:1, 3:1 в комбинированной закваске имеют хорошие органолептические показатели, содержат несколько меньшее количество ЛЖК,  $CO_2$  и большую продолжительность сквашивания молока (7,0-7,5) ч. Это объясняется тем, что в заквасках преобладает культура бифидобактерий, которая характеризуется более длительной продолжительностью ферментации молока по сравнению с пропионово-кислыми бактериями при температуре культивирования  $34^{\circ}C$ .

Данные по изучению накопления витамина  $B_{12}$  микрофлорой заквасок свидетельствуют, что пропионово-кислые бактерии синтезируют значительное количество витамина  $B_{12}$  и его содержание в закваске составляет 38 мкг/мл. Установлено, что в комбинированных заквасках количество витамина  $B_{12}$  повышается. Это возможно объяснить благотворным влиянием метаболитов, выделяемых бифидобактериями в логарифмической фазе роста - аминокислот, витаминов, пептидов на синтез витамина  $B_{12}$ . Известно, что наиболее стимулирующим действием на синтез кобаламина оказывают аминокислоты, особенно аргинин и гистидин.

Наибольшее количество витамина  $B_{12}$  обнаружено в комбинированной закваске при соотношении бифидо- и пропионово-кислых бактерий 1:2, которое составляет 53 мкг/мл.

Уменьшение дозы пропионово-кислых бактерий в комбинированных заквасках способствует пропорциональному понижению витамина  $B_{12}$ .

Таким образом, оптимальное сочетание в комбинированной закваске бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий 1:1 выбрано с учетом сбалансированного содержания жизнеспособных клеток данных культур и по органолептическим свойствам полученной комбинированной закваски. Данная закваска более приятная на вкус, также она обладает умеренной кислотностью  $68^{\circ}T$ , приемлемой продолжительностью ферментации молока 6,5 ч, высоким содержанием летучих жирных кислот, витамина  $B_{12}$  и хорошими реологическими показателями.

Следующий этап исследований посвящен изучению пробиотических свойств полученной комбинированной закваски.

Механизм действия пропионово-кислых и бифидобактерий является многофакторным. Метаболиты бактериальных клеток оказывают на макроорганизм положительное воздействие комплексом образуемых ими биологически активных веществ. Наиболее важными из них являются антимутагенные и антимикробные вещества.

Антимутагенная и антибиотическая активности заквасок

Вид закваски	Антимутагенная активность, %	Антибиотическая активность			
		E. coli <sub>63</sub>		S. aureus	
		Бактерицидное действие	Бактерицидное действие	Бактерицидное действие	Бактерицидное действие
Бифидобактерий	28,7	1:4	1:16	1:4	1:32
Пропионово-кислые бактерии	42,4	1:4	1:32	1:8	1:64
Комбинированная закваска	54,2	1:8	1:64	1:16	1:128

Данные таблицы 2 свидетельствуют, что синтез антимикробных субстанций и антимутагенных веществ пробиотическими бактериями усиливается при симбиотических взаимоотношениях.

Из литературных источников известно, что экзополисахариды (ЭПС) не только улучшают реологические свойства кисломолочных продуктов, но также выступают в роли факторов, способствующих адгезии полезных микроорганизмов на стенках кишечника. Поэтому в дальнейших исследованиях изучали биосинтез ЭПС пропионово-кислыми, бифидобактериями и их ассоциацией. Полученные результаты представлены на фиг.2.

Следует отметить более высокий синтез ЭПС у пропионово-кислых бактерий, но при совместном культивировании с бифидобактериями количество экзополисахаридов уменьшается. Известно, что избыток источника углерода в среде оказывает стимулирующий эффект на выход ЭПС. В процессе ферментации основные метаболические функции клеток подвергаются сложной системе регуляции, контролирующей усвояемость лактозы - основного источника углерода и энергии для бактерий. Различия физиологии пропионово-кислых и бифидобактерий, проявляющихся при отдельном и совместном культивировании при метаболизме лактозы, могут объяснить разный выход экзополисахаридов. Кроме того, из литературных источников известно, что экзополисахариды обладают бифидогенными свойствами. Вероятно ЭПС, синтезируемые пропионово-кислыми бактериями, стимулируют рост бифидобактерий, о чем свидетельствует высокое количество жизнеспособных клеток бифидобактерий в комбинированной закваске.

В результате проведенных исследований установлено, что при совместном культивировании микроорганизмов повышаются антимутагенные свойства и усиливается антимикробная активность комбинированной закваски. Экзополисахариды, образуемые бактериями, усиливают пробиотический эффект комбинированной закваски.

Далее исследования авторов были направлены на создание концентрированной закваски бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий для прямого внесения в молоко.

Анализ технологии получения концентрированных заквасок показал, что наиболее важное значение имеет этап накопления биомассы микроорганизмов, эффективность которого в большей степени зависит от условий культивирования и активности посевного материала.

В связи с этим на первом этапе изучена биохимическая активность комбинированной закваски пропионово-кислых и бифидобактерий. Результаты представлены в таблице 3.

Качественная характеристика инокулята		Таблица 3
Показатели		Характеристика
Активность сквашивания, ч		14-16

Кислотность:	
титруемая, °Т	73±2
активная, рН	4,63-4,58
Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/см <sup>3</sup>	
5 бифидобактерий	4·10 <sup>10</sup>
пропионово-кислых бактерий	5·10 <sup>10</sup>
Объем продукта (см <sup>3</sup> ), в котором не допускаются:	
БГКП (колиформы)	10
S. aureus	10
10 Патогенные микроорганизмы (в т.ч. сальмонеллы)	100
Дрожжи, КОЕ/см <sup>3</sup> , не более	5
Плесени, КОЕ/см <sup>3</sup> , не более	5

Как видно из полученных данных, комбинированная закваска обладает достаточно  
15 высокой ферментативной активностью, умеренной кислотностью и высоким содержанием жизнеспособных клеток заквасочных культур.

Пропионово-кислые бактерии являются активными продуцентами витамина В<sub>12</sub>. Известно, что кобальт повышает витаминсинтезирующую способность  
20 пропионово-кислых бактерий, однако, его содержание в естественных средах минимально, поэтому в состав питательной среды был включен хлористый кобальт.

Авторами изучено влияние ионов кобальта на выход биомассы и на синтез  
25 витамина В<sub>12</sub>. Процесс ферментации контролировали по оптической плотности биомассы и количеству жизнеспособных клеток, подсчитанных в конце процесса ферментации. По данным показателям находили среднюю удельную скорость роста бактерий. Хлористый кобальт вносили в количестве 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 мг/л. В качестве контроля - среда, не содержащая ионов кобальта. Результаты исследований  
представлены на фиг.3 и 4 и в таблице 4.

30 Из фиг.3 видно, что кобальт повышает биосинтез витамина В<sub>12</sub>. С увеличением концентрации ионов кобальта идет большее накопление витамина. Следует отметить, в предлагаемом способе экспериментально установлено, что при совместном развитии бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий определенное количество кобальта не только контролирует образование кобаламина, но и служит фактором роста по  
35 сравнению с прототипом (фиг.4). В прототипе внесение в питательную среду ионов кобальта увеличивает синтез витамина В<sub>12</sub> пропионово-кислыми бактериями, но происходит снижение скорости роста клеток.

40 Таблица 4

Количество жизнеспособной микрофлоры в зависимости от содержания ионов кобальта в питательной среде

Концентрация СоСl <sub>2</sub> , мг/мл	Количество жизнеспособных клеток, к.о.е./мл			
	B. longum B379M	P. shermanii KM 186	Комбинированная закваска	
			B. longum B379M	P. shermanii KM186
0	7·10 <sup>11</sup>	6·10 <sup>11</sup>	3·10 <sup>12</sup>	4·10 <sup>12</sup>
45 0,05	3·10 <sup>11</sup>	5·10 <sup>11</sup>	3·10 <sup>12</sup>	5·10 <sup>12</sup>
0,1	6·10 <sup>10</sup>	2·10 <sup>11</sup>	6·10 <sup>12</sup>	8·10 <sup>12</sup>
0,2	1·10 <sup>10</sup>	8·10 <sup>10</sup>	5·10 <sup>11</sup>	7·10 <sup>11</sup>
0,3	7·10 <sup>9</sup>	2·10 <sup>10</sup>	5·10 <sup>10</sup>	8·10 <sup>10</sup>

50 В результате исследований оптимальной была выбрана доза хлористого кобальта в пределах (0,1-0,2) мг/л, которая позволила получить биомассу не только с высоким содержанием витамина В<sub>12</sub>, но и с достаточным количеством жизнеспособных клеток



пробиотических бактерий ( $10^{11}$ - $10^{12}$ ) к.о.е./мл, что на (1-2) порядка выше по сравнению с прототипом (табл.4.).

Кроме того, биомасса комбинированной закваски нарастает интенсивнее, процесс культивирования сокращается на 3-4 часа по сравнению с известным способом и составляет (19-21) ч. Это свидетельствует о том, что состав питательной среды содержит все компоненты, необходимые для роста бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий, входящих в состав комбинированной закваски, и о симбиотических взаимоотношениях данных культур при совместном культивировании.

Для использования концентрированной закваски в молочной промышленности необходимо создать условия для продления сроков хранения микрофлоры, что определяется экономическими условиями производства. Одним из способов сохранения жизнеспособности клеток является замораживание. Поэтому на следующем этапе работы проводили замораживание полученной биомассы комбинированной закваски и изучали влияние криоанабиоза на выживаемость клеток. Для этого суспензию клеток комбинированной закваски, полученной после центрифугирования, смешивали с защитной средой в соотношении 1:1 и замораживали при температуре не выше минус 20°C. Полученные результаты отражены в таблице 5.

Показатели	Количество клеток бифидобактерий, КОЕ/см <sup>3</sup>	Количество клеток пропионово-кислых бактерий, КОЕ/см <sup>3</sup>	Активность сквашивания 1 л молока 0,01 см <sup>3</sup> , ч
До замораживания	$7 \cdot 10^{12}$	$9 \cdot 10^{12}$	12-14
После замораживания	$2 \cdot 10^{12}$	$5 \cdot 10^{12}$	12-14

Как показывают полученные нами данные, количество клеток после замораживания осталось на том же уровне, что объясняется не только применением защитной среды, но и образованием естественных протекторов - экзополисахаридов.

Кроме того, по предлагаемому способу количество клеток осталось на том же высоком уровне  $10^{12}$  к.о.е./см<sup>3</sup> в течение 7 месяцев хранения. В известном способе получения бактериального концентрата пропионово-кислых бактерий количество жизнеспособных клеток в процессе хранения уменьшается на порядок и составляет  $10^{10}$  к.о.е./см<sup>3</sup>.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что комбинированная закваска обладает более выраженной антимуtagenной, антимикробной активностью и витаминсинтезирующими свойствами по сравнению с отдельными культурами микроорганизмов, входящими в ее состав. Отмечена высокая устойчивость комбинированной микрофлоры к низким температурам. Полученная заявляемым способом замороженная концентрированная закваска обладает высокими биохимическими свойствами и содержит высокое количество жизнеспособных клеток.

Именно выявленная совокупность отличительных признаков изобретения, заключающаяся в использовании в качестве инокулята комбинированной закваски бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий, влияет на достижение технического результата, выражающегося в повышении пробиотических свойств концентрированной закваски, увеличении количества клеток бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий и обеспечении высокой активности ферментации молока.

Предлагаемый способ получения замороженной концентрированной закваски на основе симбиоза пробиотических бактерий осуществляется следующим образом.

В качестве основы питательной среды в заявленном способе выбрана осветленная

творожная сыворотка, которая является сравнительно дешевым вторичным сырьем при производстве творога, в которую добавляют компоненты среды: буферные соли, аскорбиновую кислоту, пептон, агар и хлористый кобальт в количестве (0,1-0,2) мг/мл. Затем устанавливают рН среды в пределах 7,0. Питательную среду стерилизуют при (121±1)°С с выдержкой (23±2) мин, охлаждают до температуры (34±1)°С. В качестве инокулята для заквашивания питательной среды используют комбинированную закваску, состоящую из отдельно активизированных культур β-галактозидазой пропионово-кислых и бифидобактерий, в количестве 3-5%.

Наращивание клеток проводят в течение (19-21) ч в условиях периодического культивирования при однократной нейтрализации среды через (9-11) часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Полученную бактериальную массу охлаждают до температуры (18-20)°С, отделяют от культуральной среды и при этой температуре смешивают с защитной средой, разливают во флаконы по 2 мл и замораживают при минус (20-30)°С. Флаконы с концентрированной закваски закрывают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Замороженный препарат хранят до 7 месяцев при температуре минус (20-30)°С.

#### Пример 1.

Готовят питательную среду на основе осветленной творожной сыворотки, в которую добавляют компоненты среды: буферные соли, аскорбиновую кислоту, пептон, агар и хлористый кобальт в количестве 0,1 мг/мл. Затем устанавливают рН среды в пределах 7,0. Готовую среду стерилизуют при 121°С с выдержкой 23 минуты и охлаждают до 34°С. Затем в среду вносят комбинированную закваску в количестве 5%, состоящую из отдельно активизированных β-галактозидазой культур бифидобактерий штамм *Bifidobacterium longum* В379М и пропионово-кислых бактерий штамм *Propionibacterium shermanii* КМ 186 в соотношении 1:1. Нарращивают клетки в течение 19 часов в условиях периодического культивирования при однократной нейтрализации среды через 9 часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). По окончании процесса бактериальную массу охлаждают до 18°С и отделяют клетки от культуральной среды центрифугированием. Полученную бактериальную массу при температуре 18°С смешивают с защитной средой в соотношении 1:1. Затем разливают во флаконы по 2 мл, замораживают в холодильной камере при минус 30°С. Флаконы с концентрированной закваской закрывают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Замороженный препарат хранят до 7 месяцев при температуре минус 30°С.

#### Пример 2.

Готовят питательную среду на основе осветленной творожной сыворотки, в которую добавляют компоненты среды: буферные соли, аскорбиновую кислоту, пептон и агар, в среду также вносят хлористый кобальт в количестве 0,2 мг/мл. Затем устанавливают рН среды в пределах 7,0. Готовую среду стерилизуют при 120°С с выдержкой 25 минут и охлаждают до 35°С. Затем в среду вносят комбинированную закваску в количестве 4%, состоящую из отдельно активизированных β-галактозидазой культур бифидобактерий штамм *Bifidobacterium bifidum* 8<sub>3</sub> и пропиновокислых бактерий штамм *P.fredenreichii* subsp.*shermanii* АС - 2503 в соотношении 1:1. Нарращивают клетки в течение 20 часов в условиях периодического культивирования при однократной нейтрализации среды через 10 часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). По окончании процесса

бактериальную массу охлаждают до 20°C и отделяют клетки от культуральной среды центрифугированием. Полученную бактериальную массу при температуре 20°C смешивают с защитной средой в соотношении 1:1. Затем разливают во флаконы по 2 мл, замораживают в холодильной камере при минус 20°C. Флаконы с концентрированной закваской закрывают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Замороженный препарат хранят до 7 месяцев при температуре минус 20°C.

#### Пример 3.

Готовят питательную среду на основе осветленной творожной сыворотки, в которую добавляют компоненты среды: буферные соли, аскорбиновую кислоту, пептон и агар. Вносят хлористый кобальт в количестве 0,2 мг/мл. Затем устанавливают рН среды в пределах 7,0. Готовую среду стерилизуют при 122°C с выдержкой 22 минуты и охлаждают до 33°C. Затем в среду вносят комбинированную закваску в количестве 3%, состоящую из отдельно активизированных β-галактозидазой культур бифидобактерий штамм *Bifidobacterium longum* B379M и пропионово-кислых бактерий штамм *Propionibacterium shermanii* КМ 186 в соотношении 1:1. Нарращивают клетки в течение 21 часа в условиях периодического культивирования при однократной нейтрализации среды через 11 часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). По окончании процесса бактериальную массу охлаждают до 19°C и отделяют клетки от культуральной среды центрифугированием. Полученную бактериальную массу при температуре 19°C смешивают с защитной средой в соотношении 1:1. Затем разливают во флаконы по 2 мл, замораживают в холодильной камере при минус 25°C. Флаконы с концентрированной закваской закрывают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Замороженный препарат хранят до 7 месяцев при температуре минус 25°C.

#### Формула изобретения

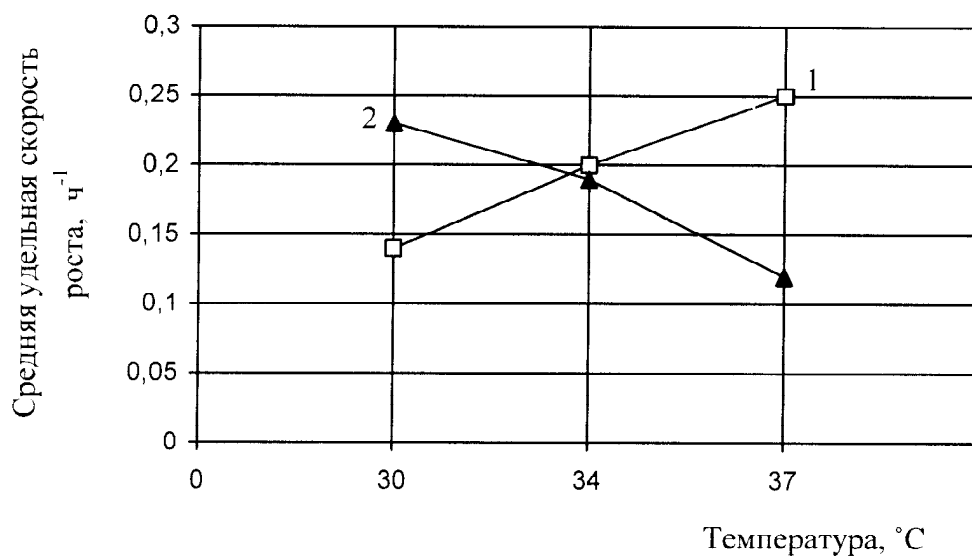
1. Способ получения замороженной концентрированной закваски на основе симбиоза пробиотических бактерий, предусматривающий приготовление питательной среды, содержащей хлористый кобальт, внесение инокулята в количестве 3-5%, наращивание клеток, отделение бактериальной массы от культуральной среды, смешивание ее с защитной средой, розлив и замораживание, отличающийся тем, что в качестве инокулята используют комбинированную закваску, состоящую из отдельно активизированных β-галактозидазой культур бифидобактерий и пропионово-кислых бактерий, при этом хлористый кобальт вводят в количестве 0,1-0,2 мг/мл.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве инокулята используют активизированные β-галактозидазой культуры бифидобактерий штамм *Bifidobacterium longum* B379M и пропионово-кислых бактерий штамм *Propionibacterium shermanii* КМ 186, взятых в соотношении 1:1.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве инокулята используют активизированные β-галактозидазой культуры бифидобактерий штамм *Bifidobacterium bifidum* 8<sub>3</sub> и пропионово-кислых бактерий штамм *P.fredenreichii* subsp.*shermanii* АС - 2503, взятых в соотношении 1:1.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что инокулят вносят при температуре (34±1)°C.

Зависимость скорости роста пробиотических  
микроорганизмов от температуры ферментации

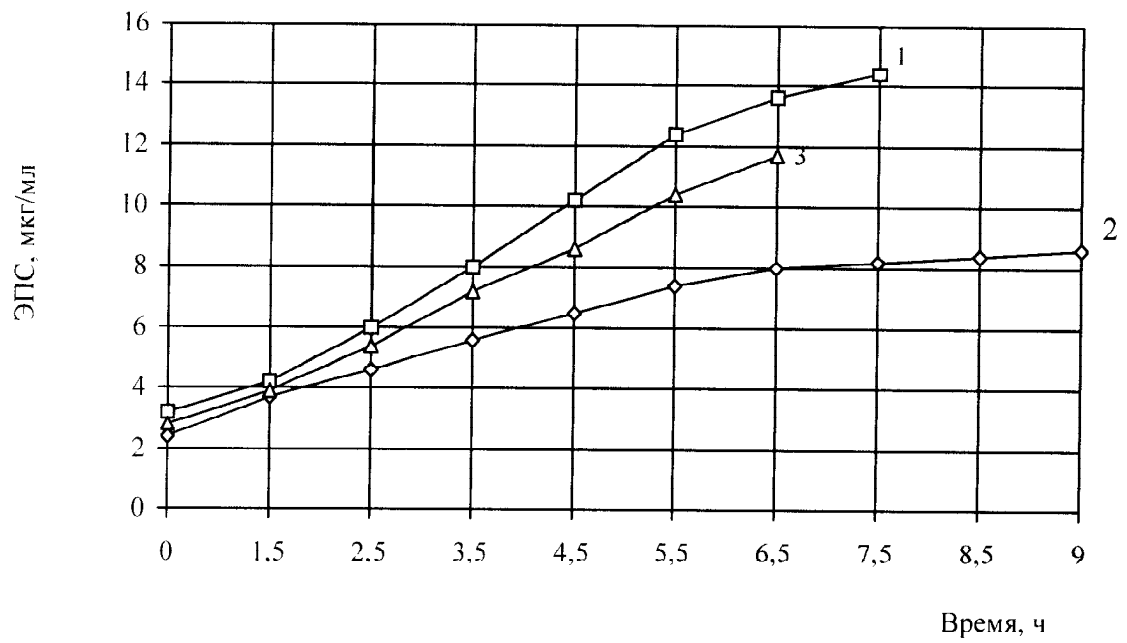


1 – бифидобактерии;

2 – пропионовокислые бактерии

Фиг. 1

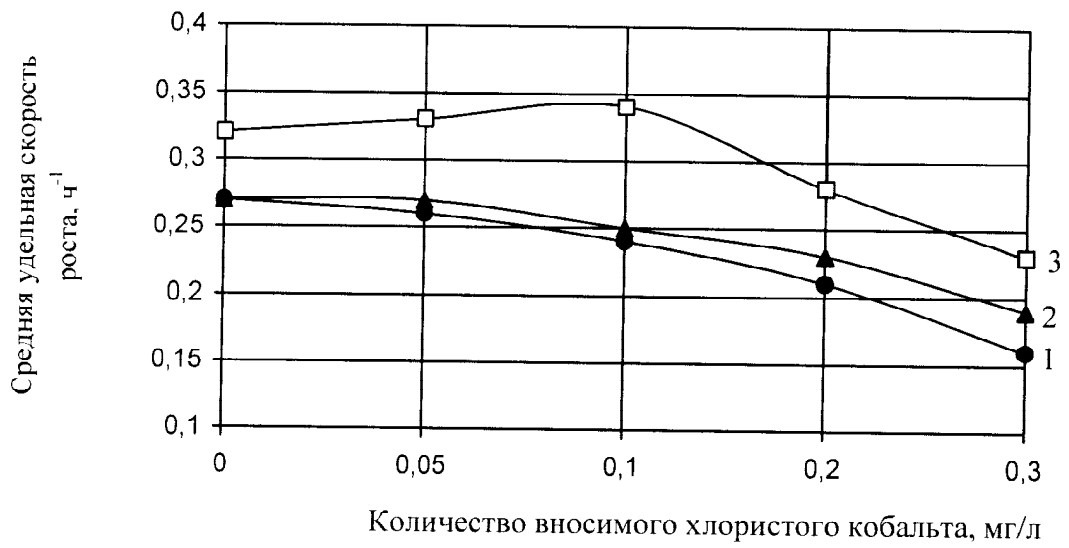
Динамика накопления экзополисахаридов  
пробиотическими бактериями



- 1 – пропионовокислые бактерии;  
2 – бифидобактерии;  
3 – комбинированная закваска

Фиг. 2

### Влияние кобальта на скорость роста пробиотических микроорганизмов



- 1 – бифидобактерии;
- 2 – пропионовокислые бактерии;
- 3 – комбинированная закваска

Фиг.4