



(51) МПК

*C12N 1/20* (2006.01)*A23C 9/12* (2006.01)*C12R 1/15* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005117901/13, 09.06.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
09.06.2005

(43) Дата публикации заявки: 20.12.2006

(45) Опубликовано: 10.11.2007 Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SU 1521769 A1, 15.11.1989. ХАМАГАЕВА 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 1469613 A1, 13.02.1987. RU 21951287 C2, 10.01.2005.

Адрес для переписки:

670013, г.Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в,  
стр.1, ВСГТУ, ОИС

(72) Автор(ы):

Хамагаева Ирина Сергеевна (RU),

Тумурова Софья Мункуевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования

Восточно-Сибирский государственный

технологический университет (RU),

Хамагаева Ирина Сергеевна (RU)

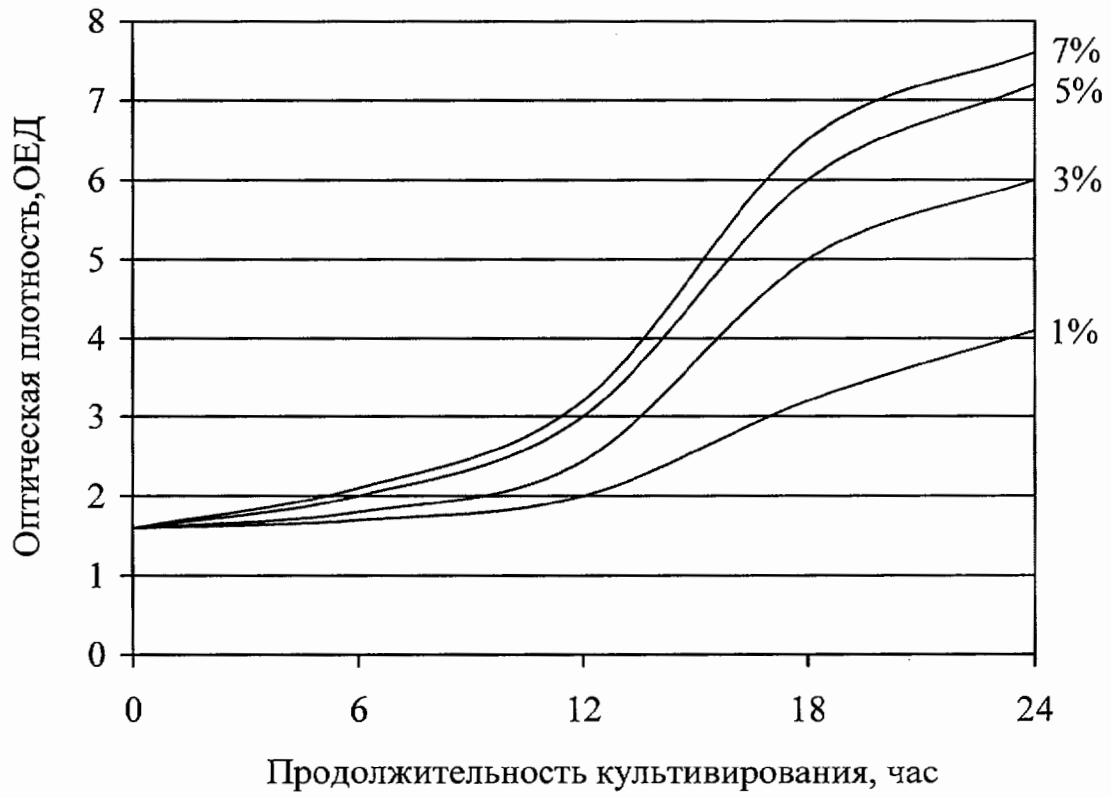
## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНЦЕНТРАТА ПРОПИОНОВО-КИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для производства пищевых продуктов, обогащенных пропионово-кислыми бактериями. В питательную среду на основе молочной сыворотки с добавлением хлористого кобальта в количестве 0,003 г/л вносят активизированную β-галактозидазой культуру пропионово-кислых бактерий *Propionibacterium*

*shermanii* штамм МГУ в количестве 3-5 мас.%. Осуществляют наращивание клеток, отделение бактериальной массы от культуральной среды, смешивание ее с защитной средой, розлив, замораживание и сушку. Изобретение обеспечивает повышение биохимической активности пропионово-кислых бактерий и создание бактериального концентрата, активно ферментирующего молоко и пищевые среды без добавления ростовых веществ. 6 ил., 2 табл.

# ВЛИЯНИЕ ДОЗЫ ИНОКУЛЯТА НА РОСТ БИОМАССЫ



Фиг.1

RU 2309982 C2

RU 2309982 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*C12N 1/20* (2006.01)*A23C 9/12* (2006.01)*C12R 1/15* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2005117901/13, 09.06.2005**(24) Effective date for property rights: **09.06.2005**(43) Application published: **20.12.2006**(45) Date of publication: **10.11.2007 Bull. 31**

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Khamagaeva Irina Sergeevna (RU),****Tumurova Sof'ja Munkuevna (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 BACTERIAL CONCENTRATE OF PROPIONIC ACID BACTERIA**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, in particular propionic acid bacterium-enriched food production.

SUBSTANCE: claimed method includes introducing of propionic acid bacterium culture strain *Propionibacterium shermanii* activated with  $\beta$ -galactosidase in amount of 3-5 mass % in nutrient medium based on milky whey with addition of cobalt chloride in amount of 0.003 g/l. Then cells are grown, bacterial mass is separated from cultural medium, blended with protective medium, poured, frozen and dried.

EFFECT: bacteria of increased biochemical activity, bacterial concentrate for milk and food fermentation without addition of growth substances.

6 dwg, 2 tbl, 4 ex

## ВЛИЯНИЕ ДОЗЫ ИНОКУЛЯТА НА РОСТ БИОМАССЫ



Фиг.1

Изобретение относится к медицинской, микробиологической, пищевой, молочной промышленности, в частности к микробиологии, и может быть использовано для производства пищевых продуктов, обогащенных пропионово-кислыми бактериями.

Известен способ получения закваски для кисломолочных продуктов. Закваска состоит из  
5 видов *Bifidobacterium bifidum*, *B. Longum*, *B. Adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*,  
*L. plantarum*, *L. casei*, *Lactococcus lactis*, *L. cremoris*, *L. diacetylactis*,  
*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus*, *Esherichia coli*  
M-17, *Propionibacterium thechnicum*, *H. shermanii* в соотношении по объему 1:1.

Однако получение данной симбиотической закваски связано с трудностями ее получения  
10 и опасностью инфицирования посторонней микрофлорой, так как технология  
приготовления закваски предусматривает культивирование каждой монокультуры, а затем  
смешивание их в определенных пропорциях. Также количество микроорганизмов в готовой  
закваске достигает всего  $10^{8-9}$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Наиболее близким по технической сущности к предлагаемому является способ  
15 получения бактериального концентрата пропионово-кислых бактерий, предусматривающий  
приготовление питательной среды, содержащей в качестве основы отработанную  
культуральную жидкость после культивирования молочнокислых культур для сыроделия, с  
добавлением сернокислого аммония, хлористого кобальта и кукурузного экстракта,  
внесение инокулята, наращивание клеток, отделение бактериальной массы от  
20 культуральной среды, замораживание и сушку (см. SU 1521769, C12N 1/20, A23C 9/12,  
1989 г.).

Однако культивирование на среде связано с трудностями ее приготовления, и  
длительным временем накопления биомассы пропионово-кислых бактерий. По известному  
способу полученный бактериальный концентрат наряду с молочнокислыми бактериями  
25 используется при производстве сыра и участвует в формировании органолептических  
показателей продукта (особенно вкуса и запаха). Данный концентрат не ферментирует  
молоко и не пригоден для получения кисломолочных напитков.

Таким образом, при производстве бактериальных препаратов основной задачей  
является обеспечение оптимальных условий получения и переработки микробной  
30 биомассы, при которой в готовой продукции сохранялось бы максимальное число  
жизнеспособных клеток и не утрачивались бы их полезные свойства, и сохранялась  
активность ферментации молока.

Технический результат, обеспечиваемый при осуществлении предлагаемого  
изобретения, заключается в получении бактериального концентрата пропионово-кислых  
35 бактерий с высоким количеством жизнеспособных клеток, не менее  $1 \cdot 10^{10}$  КОЕ/см<sup>3</sup>,  
активно ферментирующего молоко и пищевые среды без добавления ростовых веществ,  
упрощении и сокращении продолжительности процесса его получения.

Указанный технический результат при осуществлении изобретения достигается тем, что  
в известном способе приготовления бактериального концентрата, включающем  
40 приготовление питательной среды, содержащей хлористый кобальт, внесение инокулята,  
наращивание клеток, отделение бактериальной массы от культуральной жидкости,  
смешивание с защитной средой, розлив, замораживание и сушку, согласно изобретению в  
качестве инокулята для заквашивания питательной среды используют  
активизированную  $\beta$ -галактозидазой культуру пропионово-кислых бактерий  
45 *Propionibacterium shermanii* штамм МГУ в количестве 3-5 мас.%, для приготовления  
питательной среды используют молочную сыворотку, а содержание хлористого кобальта  
доводят до 0,003 г/л.

Отличительными признаками заявляемого изобретения являются новые условия  
культивирования пропионово-кислых бактерий, а именно использование в качестве  
50 инокулята активизированной  $\beta$ -галактозидазой культуру пропионово-кислых бактерий  
*Propionibacterium shermanii* штамм МГУ в количестве 3-5 мас.%. Благодаря активизации  
культуры пропионово-кислых бактерий ферментным препаратом  $\beta$ -галактозидазы,  
пропионово-кислые бактерии приобретают собственную  $\beta$ -галактозидазную активность и

способны накапливать интермедиаты, необходимые для метаболических нужд клетки, и расти в молоке без стимуляторов роста.

Создание препаратов на основе живых микроорганизмов является одним из самых сложных направлений в биотехнологии и успех их получения в значительной мере определяется факторами, непосредственно влияющими на физиолого-биохимические свойства и структуру клеток. Что касается пропионово-кислых бактерий, то вопросы их культивирования остаются малоизученными.

Известно, что важную роль при культивировании микроорганизмов играет активность посевного материала. Однако чистые культуры пропионово-кислых бактерий обладают слабой кислотообразующей активностью и не ферментируют молоко и пищевые среды. Поэтому пропионово-кислые бактерии используют в сыроделии и при производстве кисломолочных продуктов только в сочетании с молочнокислыми бактериями. Известен способ получения кисломолочного напитка «Целебный», где используют сухую закваску *Propionibacterium shermanii* (см. RU 21951276 A23C 9/12, 2000 г.).

Однако применение сухих заквасок пропионово-кислых бактерий связано с опасностью инфицирования, требует дополнительных затрат при пересевах и ограничивает объемы производства продукции.

В связи с этим наши исследования были направлены на создание бактериального концентрата пропионово-кислых бактерий для прямого внесения в молоко.

На первом этапе изучали биохимическую активность инокулята пропионово-кислых бактерий для получения концентрата. Нами была изучена суточная активизированная  $\beta$ -галактозидазой культура пропионово-кислых бактерий. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 Характеристика биохимической активности инокулята	
Характеристика	Показатели
Активность сквашивания, час	16-18
Кислотность:	
Титруемая, Т°	80±5
Активная, рН	4,63-4,58
Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/см <sup>3</sup>	9·10 <sup>9</sup>
Микроскопический препарат на молоке	кокковидные цепочки и диплококковидные клетки
БГКП (колиформы)	отсутствуют
Контаминация	отсутствуют

Как видно из таблицы 1, активизированная  $\beta$ -галактозидазой культура пропионово-кислых бактерий имеет высокую биохимическую активность.

Цикл развития культуры начинается с засева среды. Засев необходимо осуществлять в таком количестве, которое обеспечивало бы начало роста микроорганизмов с минимальной задержкой. В связи с этим, в следующей серии опытов определялось оптимальное количество необходимого инокулята для роста и размножения бактерий. Результаты представлены на фиг.1.

Полученные экспериментальные данные (фиг.1) свидетельствуют, что с повышением дозы инокулята увеличивается наращивание бактериальной массы. Так, при увеличении дозы инокулята с 1% до 5% значение оптической плотности резко возрастает. Дальнейшее повышение дозы с 5% до 7% незначительно сказывается на показаниях оптической плотности. Таким образом, анализ полученных данных показал, что наиболее оптимальной дозой инокулята является 3-5% от объема питательной среды.

Пропионово-кислые бактерии являются активными продуцентами витамина В<sub>12</sub>. Ионы кобальта входят в состав молекулы витамина В<sub>12</sub>, однако его содержание в естественных средах минимально. Поэтому дальнейшие наши исследования были направлены на изучение влияния ионов кобальта на выход биомассы и на синтез витамина В<sub>12</sub>. Кобальт вносили в количестве 0,002 г/л, 0,003 г/л, 0,004 г/л. В качестве контроля - среда, не содержащая кобальт. Результаты представлены на фиг.2, 3.

Как видно из фиг.2, с увеличением количества ионов кобальта идет большее накопление



витамина В<sub>12</sub>. Наибольшее значение - 50 мкг/мл, нами получено в 4-ом образце, содержащем 0,004 г/л кобальта. При дозе кобальта 0,003 г/л синтезируется витамина В<sub>12</sub> на 40% больше, чем в бескобальтовой среде, и достигает 40,67 мкг/см<sup>3</sup>.

5 Следует отметить, что внесение в питательную среду ионов кобальта несколько тормозит биохимические процессы (фиг 3). Отмечено снижение темпа наращивания биомассы в образце, содержащем 0,004 г/л кобальта, на 20% по сравнению с контролем. Во 2-ом и 3-ем образцах, содержащих 0,002 г/л и 0,003 г/л ионов кобальта, наблюдается наименьшая разница в значениях оптической плотности по сравнению с контрольным образцом на 7% и 12,5% соответственно.

10 Вероятно, внесение в питательную среду ионов кобальта увеличивает синтез витамина В<sub>12</sub> и, как следствие, идет снижение скорости роста клеток.

В результате исследований подобрана оптимальная доза ионов кобальта в количестве 0,003 г/л, которая позволит получить биомассу не только с высоким содержанием витамина В<sub>12</sub>, но и будет содержать достаточное количество жизнеспособных клеток пропионово-кислых бактерий.

15 Одним из способов сохранения микроорганизмов является криоконсервация. При снижении температуры системы подавляется активность ферментов, замедляются обмен веществ, развитие, рост, ослабляется чувствительность. Угнетение жизнедеятельности при замораживании живых организмов вызвано частичным превращением воды в лед. 20 Льдообразование связано с извлечением воды из протоплазмы клеток и их «высушиванием», а также с уменьшением содержания свободной воды в системе. Однако это является обратимым процессом, организм может снова перейти к активной жизнедеятельности при восстановлении благоприятных условий.

Поэтому на следующем этапе работы проводили замораживание биомассы пропионово-кислых бактерий. Для этого полученную центрифугированием суспензию клеток смешивали с защитной средой в соотношении 1:1. Смесь замораживали при температуре минус 18°С. При добавлении защитных компонентов в бактериальную массу пропионово-кислых бактерий, вероятно, в клетках с повышением осмотического давления иницируется синтез запасных веществ, способных выполнять защитную функцию при замораживании, 30 высушивании за счет прямого взаимодействия с жизненно важными внутриклеточными структурами.

Установлено, что количество клеток после замораживания составило  $1 \cdot 10^{11}$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Следует отметить, продолжительность сквашивания молока после активизации замороженной суспензии на молоке не изменилась, что говорит о сохранении 35 биохимической активности на достаточно высоком уровне. При изучении сроков хранения замороженного концентрата выявили, что оптимальным является 6 месяцев.

Таким образом, на основании исследований получен замороженный концентрат пропионово-кислых бактерий. Преимуществами метода криогенного хранения является малая вероятность заражения культуры, сохранение стабильности свойств 40 микроорганизмов, а также небольшой расход материалов при подготовке культуры к хранению.

Далее полученный замороженный концентрат пропионово-кислых бактерий подвергли сублимационной сушке. Начальная температура сушки замороженной биомассы пропионово-кислых бактерий составила минус 18°С, досушивание проводили при 45 температуре (37-38)°С. В процессе сушки остаточное давление в системе поддерживали на уровне (0,13-1,3) Па. Продолжительность контролировали по остаточной влажности бактериального препарата.

Качество сухого концентрата пропионово-кислых бактерий оценивали по количеству жизнеспособных клеток и активности сквашивания молока.

50 Результаты исследований представлены на фиг.4, 5.

Успех сублимационной сушки во многом зависит от качества используемых клеток, от того, насколько они жизнеспособны и в каких условиях они выросли. Как видно из фиг.4, количество клеток после сушки уменьшилось на порядок по сравнению с замороженным

концентратом и составило  $2 \cdot 10^{10}$  КОЕ/см<sup>3</sup>, что говорит о высокой выживаемости клеток.

Активизацию на молоке проводили методом прямого внесения, фиг.5, продолжительность ферментации увеличилась по сравнению с замороженным концентратом и составила (11-12) часов.

5 Таким образом, полученные результаты указывают, что сухой бактериальный концентрат пропионово-кислых бактерий обладает высокой биохимической активностью. Применение сухого бактериального концентрата для получения кисломолочных продуктов позволит исключить многочисленные пересадки, улучшить санитарно-гигиенические показатели готового продукта.

10 Хранение сухого бакконцентрата осуществляли в течение 12 мес. при температуре минус 18°C. Выживаемость микроорганизмов зависит от остаточной влажности и химического состава клетки, которые определяются условиями культивирования на начальном этапе получения концентрата (фиг.6).

15 Выживаемость клеток по истечении 12 мес. составила 40%. Абсолютное значение клеток осталось на высоком уровне:  $4 \cdot 10^{10}$  КОЕ/см<sup>3</sup> через 6 месяцев и  $2 \cdot 10^{10}$  КОЕ/см<sup>3</sup> через 12 месяцев.

Сухой концентрат пропионово-кислых бактерий при хранении в течение года сохранил основные физико-химические показатели, и, несмотря на некоторую гибель клеток, количество жизнеспособных клеток все же остается на достаточно высоком уровне.

20 Кроме того, по предлагаемому способу значительно сокращается продолжительность накопления клеток (24 часа) по сравнению с известным способом (72 часа). Использование заявляемого способа упрощает технологический процесс и повышает санитарно-гигиенические показатели продукта.

Качественная характеристика бактериального концентрата представлена в таблице 2.

25

Наименование показателя	Показатель	
	замороженный	сухой
	Таблица 2 Качественная характеристика бактериального концентрата	
Консистенция и внешний вид	столбик замороженной суспензии	пористая таблетка
Цвет	от белого до светло-желтого	белый или кремовый
30 Активность сквашивания, ч	10-12	12-13
Предельные значения pH	$5 \pm 0,5$	$5 \pm 0,5$
Температура при выпуске с предприятия, °С, не более	$-12 \pm 2$	$4 \pm 2$
Массовая доля влаги, не более, %	-	5
Количество пропионово-кислых бактерий на конец срока годности, КОЕ/см <sup>3</sup> , не менее	$1 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^{10}$
35 Объем продукта (см <sup>3</sup> ), в котором не допускаются:		
БГКП (колиформы)	2	2
<i>S. aureus</i>	2	2
Патогенные микроорганизмы (в т.ч. сальмонеллы)	10	10
Дрожжи, КОЕ/см <sup>3</sup> , не более	5	5
40 Плесени, КОЕ/см, не более	5	5
Микроскопический препарат на среде ГМК, ГМС	Палочковидные и кокковидные клетки, расположенные попарно или собранные в короткие цепочки	

45 Как видно из данных таблицы 2, полученные концентраты пропионово-кислых бактерий обладают высокой биохимической активностью и ферментируют молоко без стимуляторов роста.

Таким образом, анализ технического уровня по данной проблеме показал, что общим недостатком известных способов получения бактериального концентрата пропионово-кислых бактерий является то, что они не ферментируют молоко и пищевые среды без стимуляторов роста. Следует отметить, что активность сквашивания молока является 50 основным показателем при производстве кисломолочных продуктов.

Особенностью предлагаемого технического решения является использование активного инокулята, обеспечивающего получение жидкого, замороженного и сухого препаратов, активно ферментирующих молоко и пищевые среды без добавления ростовых факторов.

Предлагаемый способ получения бактериального концентрата пропионово-кислых бактерий для производства кисломолочных напитков осуществляется следующим образом.

Для получения жидкого, замороженного и сухого концентратов используют питательную среду на основе молочной сыворотки. Питательную среду стерилизуют при (112-120)°C с выдержкой 15-30 мин, охлаждают до температуры (30±1)°C. В качестве инокулята для заквашивания питательной среды используют активизированную β-галактозидазой культуру пропионово-кислых бактерий *Propionibacterium shermanii* штамм МГУ в количестве 3-5 мас.%. Нарращивание клеток проводят в течение 24 часов. Полученную бактериальную массу охлаждают до температуры 20°C, отделяют от культуральной среды и при этой температуре смешивают с защитной средой, разливают во флаконы или лотки, замораживают при минус 18°C и высушивают сублимационным методом.

При получении замороженного и сухого концентратов пропионово-кислых бактерий в составе защитной среды используют следующие компоненты в %: сахароза - 10, натрий лимоннокислый - 2, дистиллированная вода - остальное.

Водный раствор защитных сред стерилизуют при температуре 112°C в течение 30 минут, затем защитную среду охлаждают и хранят до использования.

Примеры, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Пример 1.

При получении жидкого бактериального концентрата пропионово-кислых бактерий используют питательную среду на основе молочной сыворотки. Для приготовления питательной среды творожную сыворотку осветляют, раскисляют до pH 6,5. В подготовленную сыворотку вносят хлористый магний - 0,4%, натрий лимоннокислый трехзамещенный - 0,2%, калий фосфорнокислый однозамещенный - 0,1%, аскорбиновую кислоту - 0,1%, пептон - 1%, агар-агар - 1,3%, pH среды устанавливают 6,78. Готовую среду стерилизуют при 115°C с выдержкой 30 минут и охлаждают до 30°C. Затем в среду вносят активизированную β-галактозидазой культуру *Propionibacterium shermanii* штамм МГУ в количестве 5% и наращивают клетки в течение 24 часов. По окончании процесса бактериальную массу охлаждают до 4°C. Затем проводят декантацию верхнего слоя сыворотки и разливают по флаконам. Флаконы с бактериальным концентратом закрывают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Жидкий бактериальный концентрат пропионово-кислых бактерий хранят до 3-х месяцев при температуре (4±2)°C.

Пример 2.

При получении жидкого бактериального концентрата пропионово-кислых бактерий используют питательную среду на основе молочной сыворотки. Для приготовления питательной среды творожную сыворотку осветляют, раскисляют до pH 6,3. В подготовленную сыворотку вносят хлористый магний - 0,4%, натрий лимоннокислый трехзамещенный - 0,2%, калий фосфорнокислый однозамещенный - 0,1%, аскорбиновую кислоту - 0,1%, пептон - 1%, агар-агар - 1,3%, хлористый кобальт в количестве 0,003 г/л, pH среды устанавливают 6,9. Готовую среду стерилизуют при 115°C с выдержкой 30 минут и охлаждают до 30°C, затем в среду вносят активизированную β-галактозидазой культуру *Propionibacterium shermanii* штамм МГУ в количестве 3% и наращивают клетки в течение 24 часов. По окончании процесса бактериальную массу охлаждают до 5°C. Затем проводят декантацию верхнего слоя сыворотки и разливают по флаконам. Флаконы с бактериальным концентратом закрывают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Жидкий бактериальный концентрат пропионово-кислых бактерий хранят до 3-х месяцев при температуре (4±2)°C.

Пример 3.

При получении замороженного бактериального концентрата пропионово-кислых бактерий используют питательную среду на основе молочной сыворотки. Для приготовления питательной среды творожную сыворотку осветляют, раскисляют до pH 6,35. В подготовленную сыворотку вносят хлористый магний - 0,4%, натрий лимоннокислый трехзамещенный - 0,2%, калий фосфорнокислый однозамещенный - 0,1%, аскорбиновую



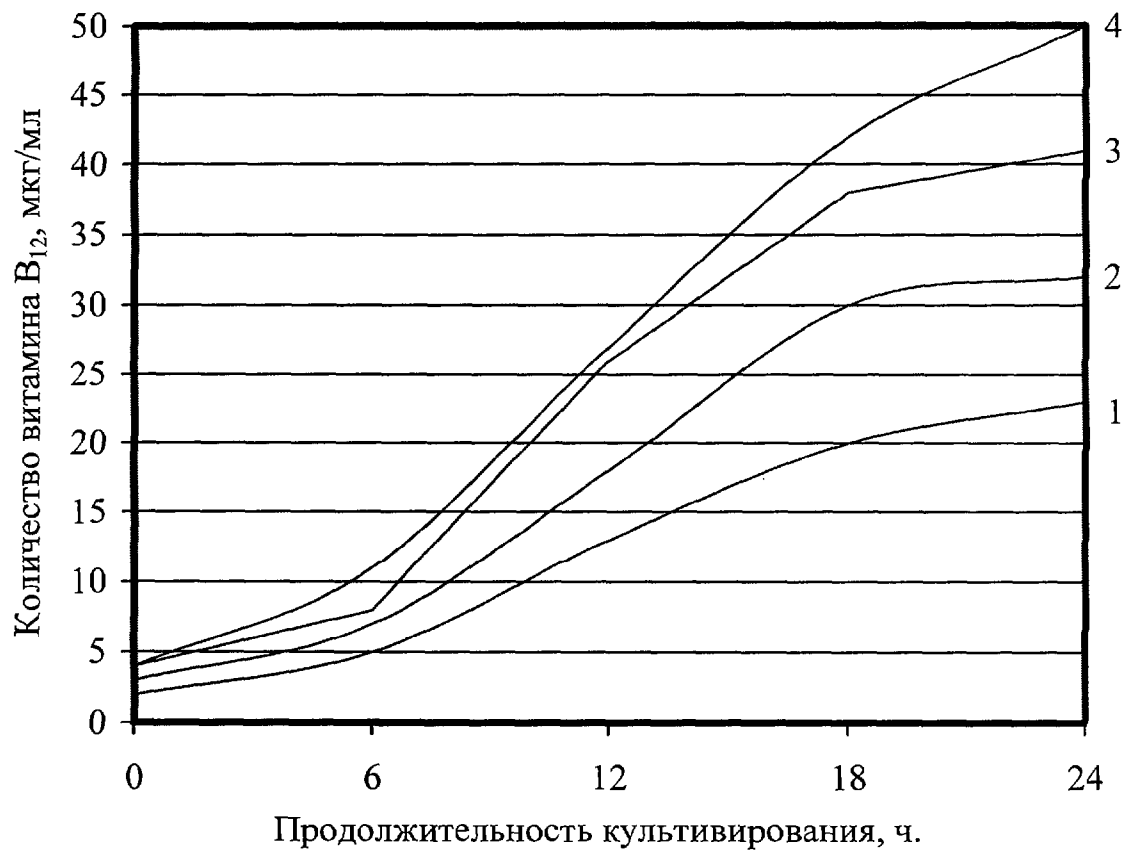
кислоту - 0,1%, пептон - 1%, агар-агар - 1,3%, рН среды устанавливают 6,79. Готовую среду стерилизуют при 115°C с выдержкой 30 минут и охлаждают до 30°C. Затем в среду вносят активизированную β-галактозидазой культуру *Propionibacterium shermanii* штамм МГУ в количестве 4% и наращивают клетки в течение 24 часов. 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. В составе защитной среды используют следующие компоненты в %: сахароза - 10, натрий лимоннокислый трехзамещенный - 2, дистиллированная вода - остальное. Затем разливают во флаконы по 2 мм, замораживают в холодильной камере при минус 18°C. Флаконы с бактериальным концентратом закрывают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Замороженный бактериальный концентрат пропионово-кислых бактерий хранят до 6-ти месяцев при температуре минус 12°C.

#### Пример 4.

При получении сухого бактериального концентрата пропионово-кислых бактерий используют питательную среду на основе молочной сыворотки. Для приготовления питательной среды творожную сыворотку осветляют, раскисляют до рН 6,4. В подготовленную сыворотку вносят хлористый магний - 0,4%, натрий лимоннокислый трехзамещенный - 0,2%, калий фосфорнокислый однозамещенный - 0,1%, аскорбиновую кислоту - 0,1%, пептон - 1%, агар-агар - 1,3%, рН среды устанавливают 7,0. Готовую среду стерилизуют при 115°C с выдержкой 30 минут и охлаждают до 30°C. Затем в среду вносят активизированную β-галактозидазой культуру *Propionibacterium shermanii* штамм МГУ в количестве 5% и наращивают клетки в течение 24 часов. 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. В составе защитной среды используют следующие компоненты в %: сахароза - 10, натрий лимоннокислый трехзамещенный - 2, дистиллированная вода - остальное. Затем разливают во флаконы по 2 мм, замораживают в холодильной камере при минус 18°C и высушивают в сублимационной установке в течение 24 часов. Флаконы с бактериальным концентратом закрывают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Сухой бактериальный концентрат пропионово-кислых бактерий хранят до одного года при температуре минус 12°C.

#### Формула изобретения

Способ получения бактериального концентрата пропионово-кислых бактерий, предусматривающий приготовление питательной среды, содержащей хлористый кобальт, внесение инокулята, наращивание клеток, отделение бактериальной массы от культуральной среды, смешивание ее с защитной средой, розлив, замораживание и сушку, отличающийся тем, что в качестве инокулята используют активизированную β-галактозидазой культуру пропионово-кислых бактерий *Propionibacterium shermanii* штамм МГУ в количестве 3-5 мас.%, для приготовления питательной среды используют молочную сыворотку, а содержание хлористого кобальта доводят до 0,003 г/л.

Влияние дозы ионов кобальта на синтез витамина В<sub>12</sub>

Доза ионов кобальта: 1- контроль;  
2- 0,002г/л;  
3- 0,003г/л;  
4- 0,004г/л.

Фиг.2

## Влияние дозы ионов кобальта на накопление биомассы



1- контроль;  
2- 0,002г/л;  
3- 0,003г/л;  
4- 0,004г/л.

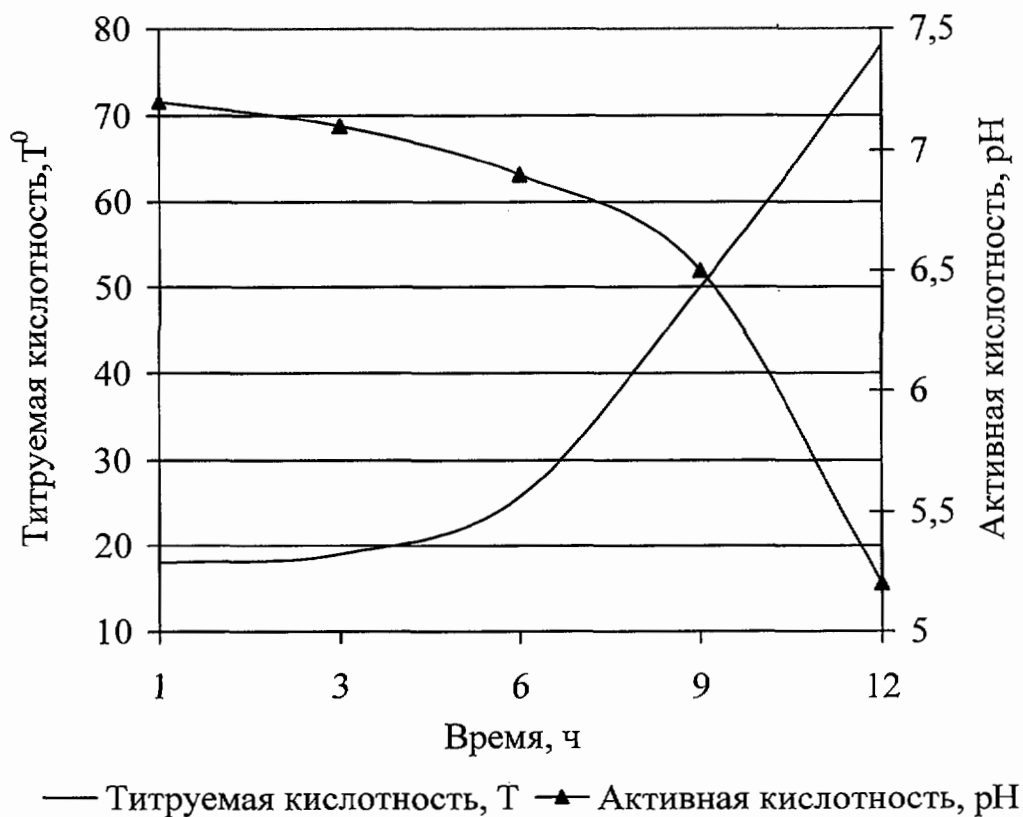
Фиг.3

## ИЗМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК ПРИ СУБЛИМАЦИОННОЙ СУШКЕ



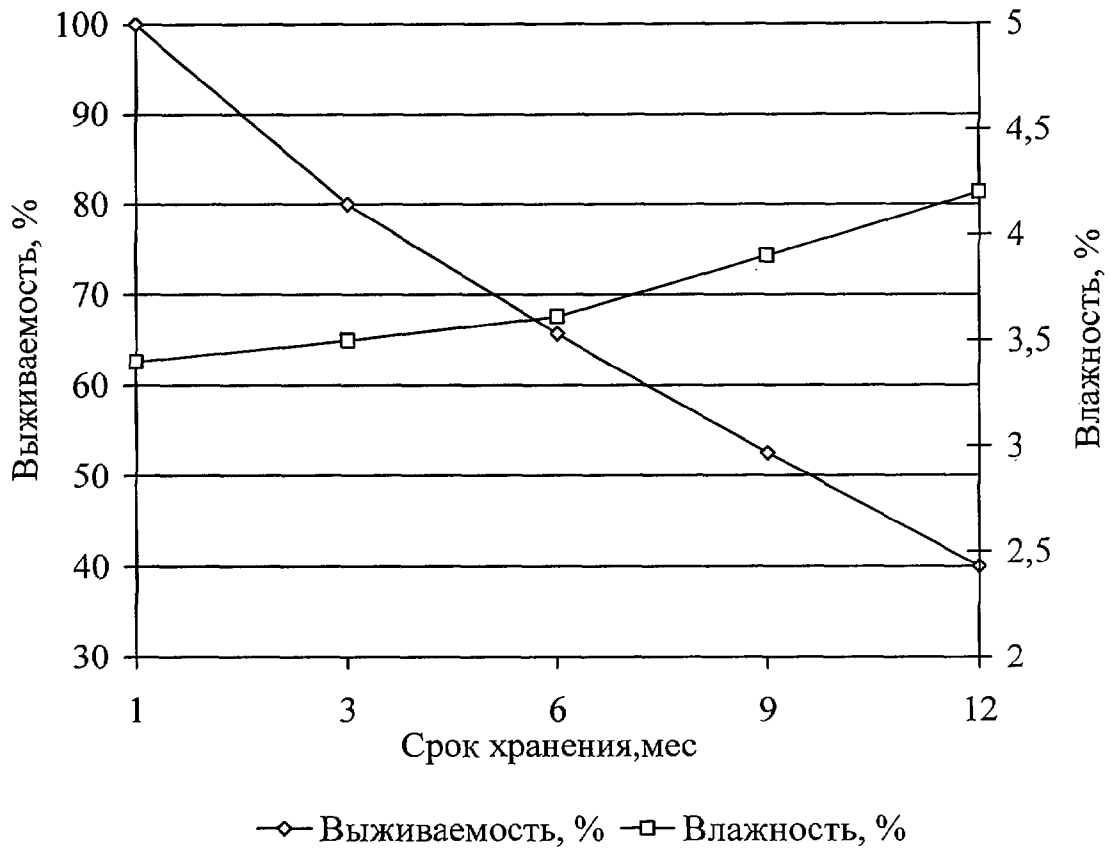
Фиг.4

Исследование биохимической активности  
бактериального концентрата  
пропионовокислых бактерий



Фиг.5

Влияние остаточной влажности на выживаемость клеток  
в процессе хранения



Фиг.6