



(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013120619/10, 06.05.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 06.05.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.05.2013

(43) Дата публикации заявки: 20.11.2014 Бюл. № 32

(45) Опубликовано: 27.01.2015 Бюл. № 3

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2294645 C2, 10.03.2007. 2203944 C2, 10.05.02003. САДОВАЯ Т.Н. Разработка технологии пищевой симбиотической добавки, Автореф. дисс. на соискание ученой степени кандидат технических наук, Краснодар, 2003. БАРХАТОВА Т.В., Создание технологий симбиотических продуктов на основе растительных олигосахаридов, Автореф. дисс. на соискание ученой степени (см. прод.)

Адрес для переписки:

670013, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в, стр. 1, ФГБОУ ВПО ВСГУТУ, Начальнику ОИС Цыбенковой Г-Х.

(72) Автор(ы):

Хамагаева Ирина Сергеевна (RU),
 Замбалова Наталья Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления" (RU),
 Хамагаева Ирина Сергеевна (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНЦЕНТРАТА БИФИДОБАКТЕРИЙ В ЖИДКОЙ ФОРМЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, пищевой и медицинской промышленности и может быть использовано при производстве бактериальных концентратов, биологически активных добавок к пище, ферментированных пищевых продуктов. Способ получения бактериального концентрата бифидобактерий в жидкой форме предусматривает приготовление питательной среды с добавлением ростовых компонентов на основе осветленной творожной сыворотки или на водной основе с добавлением

до 1,5% глюкозы, или на соевой сыворотке с добавлением лактозы в количестве 1%. В приготовленную питательную среду вносят активизированный β-галактозидазой штамм бифидобактерий *B. bifidum* 8₃ в количестве 3-5% и наращивают биомассу, охлаждают, разливают. Изобретение позволяет повысить технологичность и интенсивность процесса, повысить биохимическую активность бифидобактерий и потребительские свойства получаемого продукта. 7 табл., 5 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

доктор технических наук, Ставрополь, 2003. ПОТАПЧУК Н.Ю., и др., Питательная среда для культивирования бифидобактерий на основе соевой сыворотки., Сборник научных трудов с международным участием, посвященный 50-лет университета, Серия.: Биоорганическая и пищевая химия/ВСГУТУ, Улан-Удэ, 2012, вып. 17, стр. 127-129. ТУМУНОВА С.Б., Разработка технологии производства сухого концентрата бифидобактерий, Автореф. дисс. на соискание ученой степени кандидата технических наук, Улан-Удэ, 1995. RU 2129794 C1, 10.05.1999. SU 1686718 A1, 20.02.1996

R U 2 5 4 0 0 2 2 C 2

R U 2 5 4 0 0 2 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2013120619/10, 06.05.2013**(24) Effective date for property rights:
06.05.2013

Priority:

(22) Date of filing: **06.05.2013**(43) Application published: **20.11.2014** Bull. № 32(45) Date of publication: **27.01.2015** Bull. № 3

Mail address:

**670013, Respublika Burjatija, g.Ulan-Udeh, ul.
Ključevskaja, 40v, str. 1, FGBOU VPO VSGUTU,
Nachal'niku OIS Tsybenovoj G-Kh.**

(72) Inventor(s):

**Khamagaeva Irina Sergeevna (RU),
Zambalova Natal'ja Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovanija "Vostočno-
Sibirskij gosudarstvennyj universitet tekhnologij
i upravlenija" (RU),
Khamagaeva Irina Sergeevna (RU)**

(54) **METHOD OF OBTAINING BACTERIAL CONCENTRATE OF BIFIDOBACTERIA IN LIQUID FORM**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and medical industry and can be used in production of bacterial concentrates, biologically active food additives, fermented food products. Method of obtaining bacterial concentrate of bifidobacteria in liquid form includes preparation of nutritional medium with addition of growth components based on clarified cottage cheese whey or on water base with addition of up to 1.5% of glucose, or on soybean whey with addition of lactose

in amount 1%. Strain of bifidobacteria *B. bifidum* 8₃, activated with β -halactosidase, is introduced into prepared nutritional medium in amount 3-5%, biomass is grown, cooled, poured in containers.

EFFECT: invention makes it possible to increase manufacturability and intensity of the process, increase biochemical activity of bifidobacteria and consumer properties of obtained product.

7 tbl, 5 dwg, 4 ex

RU 2 540 022 C2

RU 2 540 022 C2

Предлагаемое изобретение относится к биотехнологии, пищевой и медицинской промышленности и может быть использовано при производстве бактериальных концентратов, биологически активных добавок к пище, ферментированных пищевых продуктов.

5 Известен способ получения жидкого концентрата бифидобактерий, предусматривающий приготовление питательной среды, внесение посевного материала, выращивание биомассы бифидобактерий, охлаждение и фасовку жидкого продукта (см. RU №2326940, C12N 1/20, A61K 35/74, A23C 9/12, 12.10.2007).

10 Недостатком известного способа является сложность приготовления питательной среды, многократные пересадки для получения производственной закваски и низкая активность ферментации молока при получении кисломолочного продукта.

Наиболее близким по технической сущности к предлагаемому изобретению является способ получения бактериального концентрата бифидобактерий в жидкой форме, предусматривающий приготовление питательной среды, внесение инокулята, наращивание биомассы, розлив, укупорка (см. RU №2373277, Кл. A23C 9/12, 2006).

Недостатком данного способа является низкая биохимическая активность инокулята и связанные с этим многократные пересевы для получения производственной закваски, что усложняет технологический процесс. Кроме того, высокое содержание NaCl в питательной среде приводит к ухудшению потребительских свойств готового продукта.

20 Техническим результатом изобретения является повышение биохимической активности бифидобактерий и потребительских свойств готового продукта.

Указанный технический результат при осуществлении изобретения достигается тем, что в способе получения бактериального концентрата бифидобактерий в жидкой форме, предусматривающем приготовление питательной среды с добавлением ростовых
25 компонентов, внесение инокулята, наращивание биомассы, охлаждение, розлив, согласно изобретению питательную среду готовят на основе осветленной творожной сыворотки или на водной основе с добавлением глюкозы до 1,5%, или на основе соевой сыворотки с добавлением лактозы в количестве 1%, а в качестве инокулята используют активированный β -галактозидазой штамм бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 8₃
30 в количестве 3-5%.

Отличительными признаками заявляемого изобретения является принципиально новые условия культивирования, использование инокулята бифидобактерий с высокой биохимической активностью и оптимизация питательных сред на основе творожной сыворотки, соевой сыворотки и водной основы с использованием глюкозы и лактозы
35 в качестве источника брожения.

Для осуществления заявляемого способа получения концентрата были проведены экспериментальные исследования по подбору и оптимизации питательной среды и изучению влияния углеводного состава на качественную характеристику концентрата.

40 При создании концентратов бифидобактерий необходимо подобрать условия культивирования бифидобактерий, которые обеспечивают получение инокулята с высокой биохимической активностью. Известно, что важную роль при культивировании микроорганизмов играет активность посевного материала.

Ранее нами был разработан эффективный биотехнологический способ активизации бифидобактерий для получения активного инокулята (см. RU №997643, A23C 9/12, 23.02.1983). Однако проведенные нами исследования показали, что не все виды и штаммы бифидобактерий активизируются разработанным нами способом.

Для активизации культур бифидобактерий использовали пастеризованное обезжиренное молоко, вносили препарат дрожжевой β -галактозидазы (Максилакт Л 2000) в количестве

2 Е/мл и выдерживали в термостате в течение 2 часов для протекания реакции трансгликозилирования.

Затем молоко при 120°C с выдержкой 10-15 мин, вносили сухие препараты различных штаммов бифидобактерий, полученных из ФГУП «Гос НИИгенетика», и оставляли для ферментации.

О биотехнологической активности бифидобактерий судили по титруемой и активной кислотности, по количеству жизнеспособных леток. Результаты исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1- Влияние обработки молока β-галактозидазой на биохимическую активность бифидобактерий.

Наименование штамма	Виды генераций	Продолжительность ферментирования, ч	Титруемая кислотность, Т°	Активная кислотность, рН	Количество жизнеспособных клеток КОЕ/см ³
1	2	3	4	5	6
15 Bifidobacterium Bifidum 8 ₃	I	40±1	4	5,11±0,02	2*10 ⁸
	II	19±1	44	5,21±0,01	8*10 ⁹
	III	16±1	54	5,06±0,03	2*10 ⁹
20 Bifidobacterium adolescentis DSM 20083			60		
	I	21±1	51	5,25±0,01	1*10 ⁹
	II	16±1	54	5,21±0,01	3*10 ⁹
	III	12±1	60	5,06±0,03	6*10 ⁹
Bifidobacterium adolescentis ГО4а200	I	-			
Bifidobacterium adolescentis 415	I	-			

Примечание: I и II генерации - на молоке, обработанном β-галактозидазой, II генерация - на молоке без фермента.

Анализ данных табл. 1 показывает, что наиболее активно развивается Bifidobacterium adolescentis DSM 20083, о чем свидетельствует наименьшая продолжительность ферментации молока. Интересен тот факт, что другие штаммы Bifidobacterium adolescentis не активизируются ферментным препаратом β-галактозидазой, т.к. при длительном культивировании в молоке не образуется сгусток.

Следует отметить, что активизированная культура бифидобактерий B. bifidum 8₃ во II генерации характеризуется высокой биохимической активностью, а в III генерации приобретает способность активно ферментировать молоко без добавления β-галактозидазы.

Таким образом, активизация бифидобактерий ферментным препаратом β-галактозидазой зависит от видовой и штаммовой принадлежности.

Теретическое обоснование механизма стимулирующего действия β-галактозидазы на рост бифидобактерий представлен в монографии (Хамагаева И.С. Научные основы биотехнологии кисломолочных продуктов для детского и диетического питания. Монография.- Улан-Удэ, Из-во ВСГТУ, 2005, 279 с.).

В дальнейших исследованиях нами использована активизированная культура бифидобактерий Bifidobacterium bifidum 8₃, так как она характерна для желудочно-кишечного тракта людей различных возрастных групп, детей и взрослого населения, тогда как Bifidobacterium adolescentis в основном превалирует у людей пожилого возраста (см. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. III: Пробиотики и функциональное питание, М., Издательство «Грантъ», 2001, 288 с.).

Характеристика инокулята бифидобактерий на обезжиренном молоке представлена

в табл. 2.

Как видно из табл.2, инокулят бифидобактерий *B. bifidum* 8₃ обладает высокой биохимической активностью и содержит 10^9 КОЕ в 1 см³.

Таблица 2. - Характеристика инокулята бифидобактерий.

Характеристика	<i>B. bifidum</i> 8 ₃
Активность сквашивания, ч	12-14
Кислотность Титруемая Т° Активная, рН	60-65 4,95
Количество жизнеспособных клеток КОЕ/см ³	$3 \cdot 10^9$
Контаминация	Отсутствует

В дальнейших исследованиях изучали влияние дозы инокулята на рост биомассы бифидобактерий (табл.3).

Таблица 3				
Влияние дозы инокулята на рост бифидобактерий				
Доза инокулята, % <i>bifidum</i> 8 ₃	Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/см ³			
	Продолжительность культивирования, ч			
	6	12	18	24
1	$1 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^9$
3	$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^{11}$
5	$8 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^{10}$	$8 \cdot 10^{11}$
7	$1 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^{12}$

Из данных, представленных в табл.3, видно, что с повышением дозы инокулята наблюдается более интенсивный рост бифидобактерий. Следует отметить, что оптимальная доза инокулята составляет 3-5%, при этом количество жизнеспособных клеток к 24 часам культивирования составляет 10^{11} КОЕ/см³, что обеспечивает высокую активность концентрата. Повышение дозы инокулята до 7% нецелесообразно с экономической точки зрения, так как незначительное повышение жизнеспособных клеток требует неоправданных затрат на приготовление инокулята.

Следует отметить, что для культивирования бифидобактерий и получения препаратов используются различные среды, это среда Блаурок (см. Гончарова Г.И. К методике культивирования бифидобактерий. Лабораторное дело. 1969 г.), казеиново-дрожжевая и большое распространение получила гидролизатно-молочная среда (см., например, RU №2052253, А23С 9/12, 20.01.1996). Но, несмотря на сложность приготовления среды и длительность пассажей в среде накопления жидкий концентрат бифидобактерий содержит 10^9 КОЕ/мл и обладает низкой биохимической активностью, не ферментирует молоко и пищевые среды. Необходимо подчеркнуть, что к концентратам относят препараты с содержанием клеток не менее чем 10^{10} КОЕ в см³.

Таким образом, при производстве бактериальных концентратов основной задачей является подбор оптимальных условий культивирования для роста микробной массы и получения в готовой продукции высокого количества жизнеспособных клеток бифидобактерий и обеспечения активности ферментации молока и пищевых сред.

В дальнейших исследованиях для получения биомассы пробиотических микроорганизмов разработанную ранее питательную среду на основе молочной сыворотки (см. RU 2129794 С1. Хамагаева И.С. Способ получения сухого препарата

для производства кисломолочных продуктов, 10.05.1999).

Рост биомассы и количество жизнеспособных клеток бифидобактерий изучали в питательной среде на основе молочной сыворотки при внесении 5% инокулята активизированной культуры *B. bifidum* 8₃ (фиг. 1, 2).

5 Из фиг. 1 видно, что при внесении 5% инокулята в питательную среду наблюдается рост биомассы бифидобактерий *B. bifidum* 8₃, о чем свидетельствуют данные по изменению оптической плотности и выходу биомассы.

Такая же динамика наблюдается по численности жизнеспособных клеток (фиг.2).
10 Следует отметить, что через 20-24 часа культивирования количество жизнеспособных клеток бифидобактерий достигает 10^{10} - 10^{11} КОЕ на 1 см³ (фиг.2).

Полученные результаты свидетельствуют, что использование активизированных культур бифидобактерий в качестве инокулята интенсифицирует рост биомассы и обеспечивает высокое количество жизнеспособных клеток в концентрате.

15 Характеристика концентрата представлена в таблице 4.

Органолептические показатели концентрата бифидобактерий должны соответствовать требованиям, указанным в таблице 4.

20

Таблица 4	
Качественная характеристика концентрата бифидобактерий на основе творожной сыворотки	
Наименование показателя	Показатель
1	2
Консистенция и внешний вид	Однородная. Допускается отделение сыворотки

25

Продолжение таблицы 4		
1	2	
Цвет	От белого до светло-желтого с белыми вкраплениями	
Вкус и запах	Чистый, слегка кисловатый, без посторонних привкусов и запахов	
Предельные значения pH	5,5-7,5	
Количество бифидобактерий на конец срока годности, КОЕ/см ³ , не менее	$1 \cdot 10^{10}$	
30 Температура при выпуске с предприятия, °С, не более	6	
Объем продукта (см ³), в котором не допускаются	БГКП (колиформы)	10
	<i>S.aureus</i>	10
	Патогенные микроорганизмы (в т.ч. сальмонеллы)	50

35 К настоящему времени накопилось значительное количество данных о существовании категории детей и взрослых с нарушениями углеводного обмена, проявляющимися в непереносимости молочного сахара - лактозы, вызванного отсутствием или снижением активности лактазы в слизистой кишечника. Лактазная недостаточность также сопровождается дисбактериозом, препятствующим формированию нормального биоценоза в кишечнике. Все это свидетельствует о целесообразности создания новых,
40 более эффективных и универсальных молочных продуктов для питания детей и взрослых.

Нами была исследована возможность применения питательной среды, приготовленной на основе воды с добавлением глюкозы и всех остальных компонентов при производстве бактериального концентрата бифидобактерий.

45 При приготовлении питательной среды использовали дистиллированную воду. Глюкозу в различных количествах добавляли в готовую питательную среду, т.е. в среду, приготовленную на воде с добавлением всех компонентов, что и при производстве концентрата на основе творожной сыворотки. Количество вносимой глюкозы составило 1%, 1,5% и 2%. Контролем служил бактериальный концентрат бифидобактерий на

основе творожной сыворотки. Для оценки влияния глюкозы на рост бифидобактерий сравнивали средние удельные скорости роста культур ($\mu_{\text{ср}}$), рассчитанные на отрезке фаз экспоненциального роста бактерий при температуре культивирования 37°C. Результаты представлены на фиг.3.

5 Согласно полученным данным фиг.3 максимальная скорость роста достигалась при добавлении в питательную среду глюкозы в количестве 1,5%.

Об активности биохимических процессов судили и по количеству жизнеспособных клеток бифидобактерий, подсчитанных в конце процесса ферментации. Результаты исследований представлены на фиг.4.

10 Как видно из фиг.4, при добавлении глюкозы в питательную среду в количестве до 1,5% рост клеток составляет в среднем $4 \cdot 10^{12}$, что на порядок выше, чем в среде с добавлением глюкозы 1%, и примерно одинаковый со средой с добавлением 2% глюкозы.

15 В результате проведенных опытов было выявлено, что при внесении в питательную среду глюкозы до 1,5% интенсифицируется рост бифидобактерий, а также наблюдается энергичное развитие количества жизнеспособных клеток (до 10^{12}). Дальнейшее увеличение дозы глюкозы не приводит к значительному повышению жизнеспособных клеток бифидобактерий.

20 Качественная характеристика разработанного бактериального концентрата бифидобактерий на водной основе представлена в таблице 5.

Таблица 5		
Качественная характеристика концентратов бифидобактерий		
Наименование показателя	Характеристика	
	на водной основе	на творожной сыворотке
1	2	3
Органолептические: Внешний вид и консистенция	Однородная	Однородная, допускается отделение сыворотки
Вкус и запах	Сладкий	Слегка кисловатый
Цвет	От белого до молочного	От белого до светло-желтого, с белыми вкраплениями

	1	2	3
30	Физико-химические:		
	Предельное значение pH	5,5-8	5,5-8
	Активность сквашивания, ч	12	12
	Температура при выпуске с предприятия, °C	6	6
35	Микробиологические:		
	Количество бифидобактерий на конец срока годности,	$1 \cdot 10^{12}$	$1 \cdot 10^{10}$
	КОЕ/см ³ , не менее		
40	Объем продукта, в котором не допускаются:		
	БГКП (колиформы)	0,1	0,1
	<i>S. aureus</i>	1,0	1,0
	Патогенные микроорганизмы (в т.ч. сальмонеллы)	25	25
	Дрожжи, КОЕ/см ³ , не более	50	50
45	Плесени, КОЕ/см ³ , не более	50	50

Полученные данные позволяют сделать вывод о возможности использования при производстве концентрата бифидобактерий среды на водной основе с добавлением глюкозы.

Эпидемиологические исследования, проводившиеся в разных странах мира, показали, что полноценное питание, сбалансированное по основным питательным веществам, витаминам, микронутриентам, а также включающее продукты, обладающие антиоксидантным действием, способно в значительной степени снизить содержание холестерина в крови и смертность от сердечно-сосудистых заболеваний. Одним из таких продуктов, представляющих большой интерес, является соя.

Россия занимает одно из последних мест в мире по культивированию сои, что, несомненно, становится в настоящее время серьезной проблемой, а с другой - неблагоприятная структура белкового питания населения свидетельствует о необходимости увеличения использования соевых белковых продуктов как непосредственно в питании человека, так и в пищевых производствах.

Широкие возможности применения продуктов из сои при лечении заболеваний пищеварительной системы связаны, прежде всего, с диетическими ограничениями, а также многочисленными благоприятными воздействиями соевых продуктов на пищеварительную систему. Клинические исследования доказали лечебную эффективность соевых пищевых добавок при самых различных заболеваниях органов пищеварения. Потребление соевых продуктов позволяет скорректировать белковый компонент рациона, усилить восстановительные процессы, нормализует моторную деятельность желудочно-кишечного тракта, оказывает положительное действие на иммунную систему.

Нами была изучена возможность применения соевой сыворотки при приготовлении питательной среды для производства бактериального концентрата бифидобактерий.

Для приготовления бактериального концентрата на основе соевой сыворотки готовили соевое молоко, т.е. на 1 л воды добавляли 90 г соевой муки и варили 10 минут. В соевое молоко добавляли хлористый магний и отделяли сыворотку от сгустка. Далее готовили 3 опытных образца питательной среды с различным содержанием соевой сыворотки. В первом образце соотношение соевой сыворотки и воды составляло 30%:70%; во втором образце - 50%:50% и в третьем образце содержание соевой сыворотки составило 100%.

В каждый опытный образец вносили ростовые компоненты, как и при производстве концентрата бифидобактерий на основе творожной сыворотки. Контролем служил бактериальный концентрат бифидобактерий на основе творожной сыворотки. Для оценки влияния соевой сыворотки на рост бифидобактерий сравнивали средние удельные скорости роста культур ($\mu_{cp.}$), рассчитанные на отрезке фаз экспоненциального роста бактерий при температуре культивирования 37°C. Результаты представлены на фиг.5.

Согласно полученным данным максимальная скорость роста достигалась при приготовлении концентрата на среде, содержащей 100% соевой сыворотки.

Об активности биохимических процессов судили и по количеству жизнеспособных клеток бифидобактерий, подсчитанных в конце процесса ферментации. Результаты исследований представлены на фиг.6.

Как видно на фиг.6, при приготовлении концентрата на среде, содержащей 100% соевой сыворотки, рост клеток составляет $2 \cdot 10^{12}$, что на порядок выше, чем в среде с добавлением соевой сыворотки меньшей концентрации и примерно одинаковый со средой на основе творожной сыворотки.

Далее подбирались оптимальные концентрации компонентов, содержащихся в среде. Подбор оптимальной дозы лактозы представлен на фиг.7.

Согласно полученным данным максимальная скорость роста достигалась при приготовлении концентрата на среде, содержащей 1% лактозы. По количеству

жизнеспособных клеток бифидобактерий, подсчитанных в конце ферментации, также в этой пробе достигается максимальное число ($3 \cdot 10^{12}$).

Полученные данные позволяют сделать вывод о возможности использования при производстве концентрата бифидобактерий среды на основе соевой сыворотки с добавлением лактозы.

Качественная характеристика разработанного бактериального концентрата бифидобактерий на соевой основе представлена в таблице 6.

Таблица 6		
Качественная характеристика бакпрепаратов бифидобактерий		
Наименование показателя	Характеристика	
	на соевой основе	на творожной сыворотке
1	2	3
Органолептические:		
Внешний вид и консистенция	Однородная, вязкая	Однородная, допускается отделение сыворотки
Вкус и запах	Слегка кисловатый	Слегка кисловатый
Цвет	От белого до светло-желтого	От белого до светло-желтого, с белыми вкраплениями
Физико-химические:		
Предельное значение pH	5,5-8	5,5-8
Активность сквашивания, ч	12	12
Температура при выпуске с предприятия, °C	6	6
Микробиологические:		
Количество бифидобактерий на конец срока годности, КОЕ/см ³ , не менее	$1 \cdot 10^{12}$	$1 \cdot 10^{10}$

1	2	3
Объем продукта, в котором не допускаются:		
БГКП (колиформы)	0,1	0,1
<i>S. aureus</i>	1,0	1,0
Патогенные микроорганизмы (в т.ч. сальмонеллы)	25	25
Дрожжи, КОЕ/см ³ , не более	50	50
Плесени, КОЕ/см ³ , не более	50	50

Полученные данные позволяют сделать вывод о возможности использования при производстве концентрата бифидобактерий среды на соевой основе с добавлением лактозы.

Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод, что использование принципиально нового биотехнологического подхода к получению инокулята, заключающегося в предварительной активизации штамма бифидобактерий *B. bifidum* 8₃ ферментным препаратом дрожжевой β-галактозидазы, обеспечивает высокую биохимическую активность и повышает потребительские свойства бактериальных концентратов.

Использование активного инокулята бифидобактерий позволяет получать бактериальные концентраты на питательных средах на основе осветленной творожной сыворотки, на водной основе с добавлением глюкозы, соевой сыворотки с добавлением лактозы и обеспечивает достижение указанного выше технического результата.

Таким образом, разработанные бактериальные концентраты на различных питательных средах обладают высокой активностью ферментации молока и пищевых

сред, содержат 10^{10} - 10^{12} КОЕ/см³ жизнеспособных клеток бифидобактерий и обеспечивают высокие потребительские свойства готового продукта.

Сравнительный анализ предлагаемого изобретения с прототипом представлен в таблице 7.

5

10

Питательная среда	Количество клеток		Ферментация молока	
	прототип	Предлагаемый способ	прототип	предлагаемый способ
Восстановленное обезжиренное молоко	10^8	10^9	обогащает	Сквашивает с образованием сгустка и синтезом биологически активных веществ
Жидкая форма БАД <i>B. angulatum</i> OV на гидролизатно-молочной среде	10^9		Обогащает	
Жидкая форма БАД <i>B. bifidum</i> 8 ₃ на сыворо-роточной среде, на водной и соевой основе		10^{10} - 10^{12}		Ферментирует с образованием сгустка биологически активных веществ

Основные преимущества предлагаемого способа.

15

1. Высокая биохимическая активность бифидобактерий, обусловленная использованием инокулята активизированного штамма *B. bifidum* 8₃, что обеспечивает

10^{10} - 10^{12} КОЕ в 1 см³ и повышение полезности и пробиотических свойств БАД.

20

2. Жидкие концентрированные закваски бифидобактерий можно использовать в качестве заквасок прямого внесения, так как они активно ферментируют молоко (3 ЕД активности сквашивают 300 литров молока).

3. Использование более дешевой питательной среды, где основой является сыворотка, вода, соевая сыворотка, тогда как в прототипе используется гидролизированное молоко.

25

4. Технологичность и интенсификация процесса производства (отсутствие многочисленных пассажей на питательной среде при приготовлении БАД).

Заявляемый способ осуществляют следующим образом.

30

При получении жидкого концентрата бифидобактерий средой для наращивания бифидобактерий служит осветленная творожная сыворотка, или питательная среда на водной основе с добавлением до 1,5% глюкозы, или сыворотка с добавлением лактозы в количестве 1%.

35

В основу питательной среды вносят ростовые компоненты, pH среды устанавливают в пределах (7,0±0,1). Готовую среду стерилизуют при t=121°C в течение 30 мин, затем охлаждают до температуры (37±1)°C и вносят инокулят - активизированную β-галактозидазой культуру бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 8₃ в количестве 3-5% и наращивают биомассу в условиях периодического культивирования в течение (24±2) ч при однократной нейтрализации через 12 часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия (Na₂CO₃). После окончания процесса культивирования отделяют верхний слой культуральной жидкости, бактериальную суспензию охлаждают до (4±2) °C, разливают в асептические флаконы вместимостью 10-12 мл, укупоривают и маркируют.

40

Примеры, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

45

Пример 1. При получении жидкого концентрата бифидобактерий средой для наращивания бифидобактерий служит осветленная творожная сыворотка. Осветленную творожную сыворотку раскисляют до pH 6,5-7,0. В подготовленную сыворотку вносят хлористый магний - 0,4%, буферные соли - 0,3%, пептон - 1%, агар-агар - 0,75%, pH среды устанавливают в пределах (7,0±0,1). Готовую среду стерилизуют при t=121°C в течение 30 мин, затем охлаждают до температуры (37±1)°C и вносят инокулят - активизированный β-галактозидазой *Bifidobacterium bifidum* 8₃ в количестве 3% и

наращивают биомассу в условиях периодического культивирования в течение (24±2) ч при однократной нейтрализации через 12 часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия (Na₂CO₃). После окончания процесса культивирования отделяют верхний слой культуральной жидкости, бактериальную суспензию охлаждают до (4±2) °С, разливают в асептические флаконы вместимостью 10-12 мл, укупоривают и маркируют.

Пример 2. Питательная среда готовится на соевой основе.

В соевую сыворотку вносят лактозу - 1%, MgCl₂ - 0,3%, буферные соли - 1,5%, аскорбиновую кислоту - 0,1%, пептон - 5%, агар микробиологический - 0,8%, pH среды устанавливают в пределах (7,0±0,1). Готовую среду стерилизуют при t=121°С в течение 30 мин, затем охлаждают до температуры (37±1)°С и вносят инокулят - активизированный β-галактозидазой штамм бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 8₃ в количестве 5% и наращивают биомассу в условиях периодического культивирования в течение (24±2) ч при однократной нейтрализации через 12 часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия (Na₂CO₃). После окончания процесса культивирования отделяют верхний слой культуральной жидкости, бактериальную суспензию охлаждают до (4±2)°С, разливают в асептические флаконы вместимостью 10-12 мл, укупоривают и маркируют.

Пример 3. При получении жидкого концентрата бифидобактерий средой для наращивания бифидобактерий служит осветленная творожная сыворотка. Осветленную творожную сыворотку раскисляют до pH 6,5-7,0. В подготовленную сыворотку вносят хлористый магний - 0,4%, буферные соли - 0,3%, пептон - 1%, агар-агар - 0,75%, pH среды устанавливают в пределах (7,0±0,1). Готовую среду стерилизуют при t=121°С в течение 30 мин, затем охлаждают до температуры (37±1)°С и вносят инокулят - активизированный β-галактозидазой *Bifidobacterium bifidum* 8₃ в количестве 5% и наращивают биомассу в условиях периодического культивирования в течение (24±2) ч при однократной нейтрализации через 12 часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия (Na₂CO₃). После окончания процесса культивирования отделяют верхний слой культуральной жидкости, бактериальную суспензию охлаждают до (4±2) °С, разливают в асептические флаконы вместимостью 10-12 мл, укупоривают и маркируют.

Пример 4. Питательная среда готовится на водной основе.

В воду вносят глюкозу - 1,5%, буферные соли - 0,1%, аскорбиновую кислоту - 0,1%, пептон - 5%, агар микробиологический - 1,5%, pH среды устанавливают в пределах (7,0±0,1). Готовую среду стерилизуют при t=121°С в течение 30 мин, затем охлаждают до температуры (37±1)°С и вносят инокулят - активизированный β-галактозидазой штамм *Bifidobacterium bifidum* 8₃ в количестве 5% и наращивают биомассу в условиях периодического культивирования в течение (24±2) ч при однократной нейтрализации через 12 часов насыщенным стерильным раствором углекислого натрия (Na₂CO₃).

После окончания процесса культивирования отделяют верхний слой культуральной жидкости, бактериальную суспензию охлаждают до (4±2)°С, разливают в асептические флаконы вместимостью 10-12 мл, укупоривают и маркируют.

Формула изобретения

Способ получения бактериального концентрата бифидобактерий в жидкой форме, предусматривающий приготовление питательной среды с добавлением ростовых компонентов, внесение инокулята, наращивание биомассы, охлаждение, розлив,

отличающийся тем, что питательную среду готовят на основе осветленной творожной сыворотки или на водной основе с добавлением до 1,5% глюкозы, или на основе соевой сыворотки с добавлением лактозы в количестве 1%, а в качестве инокулята используют активизированный β -галактозидазой штамм бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 8₃ в количестве 3-5%.

10

15

20

25

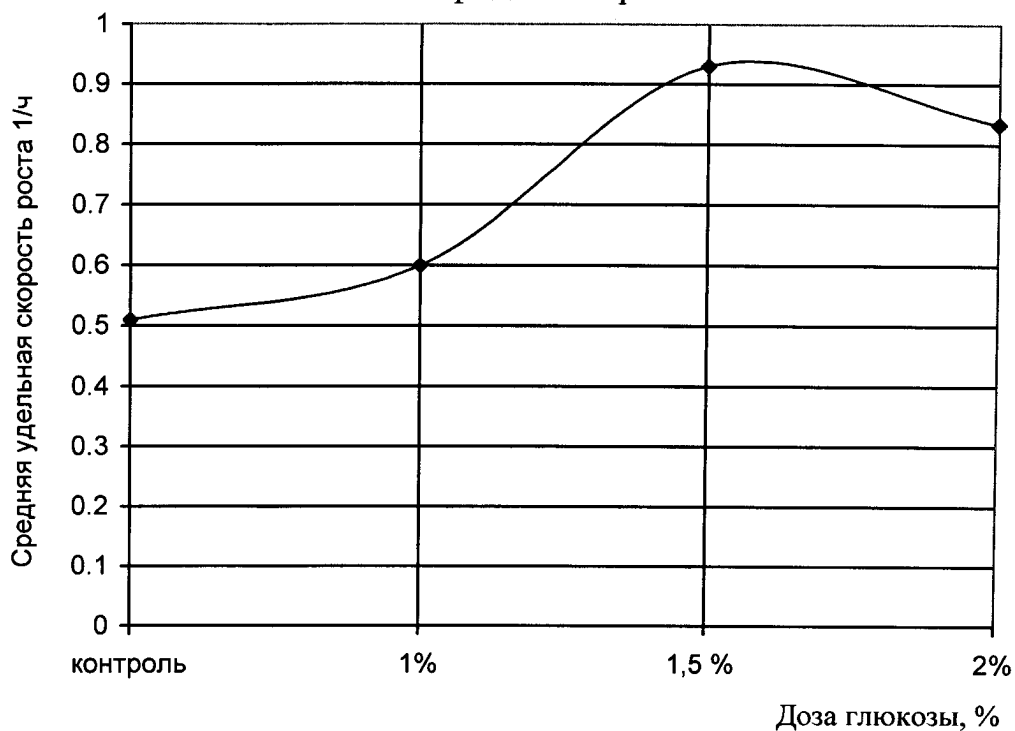
30

35

40

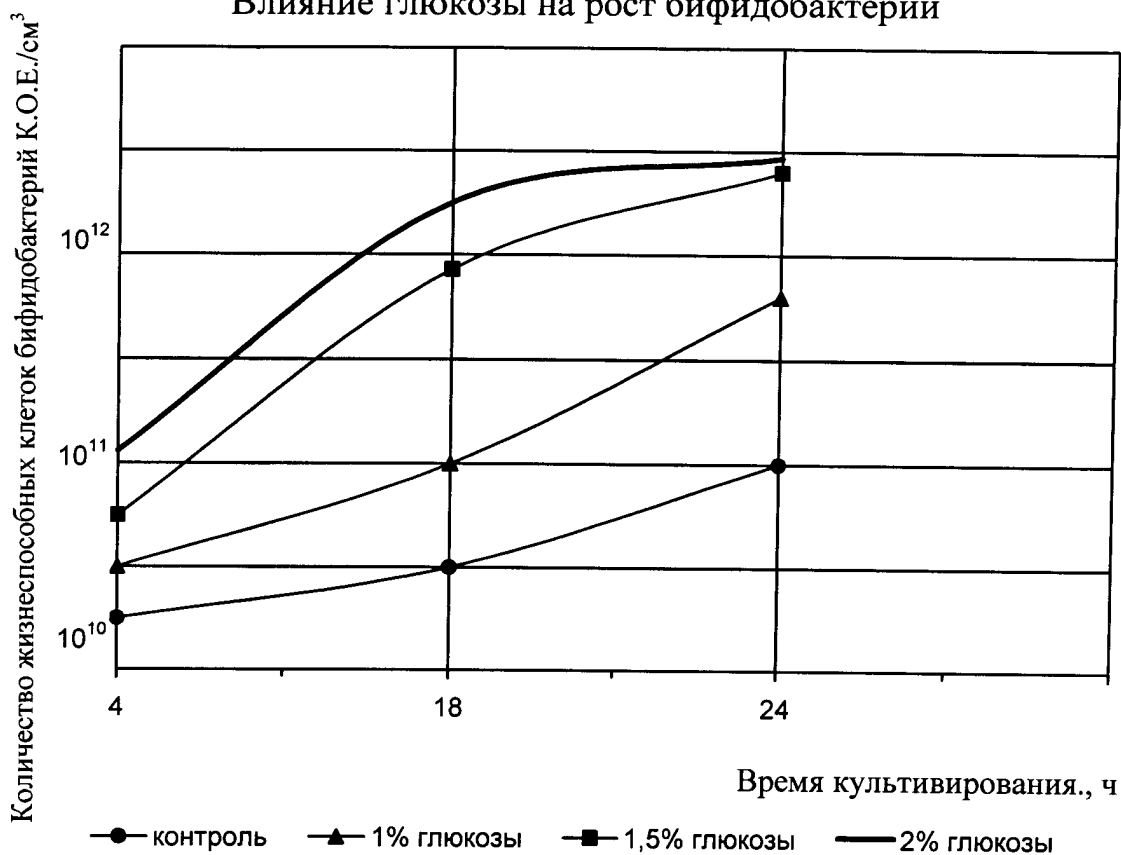
45

Влияние различных доз глюкозы на скорость роста бифидобактерий



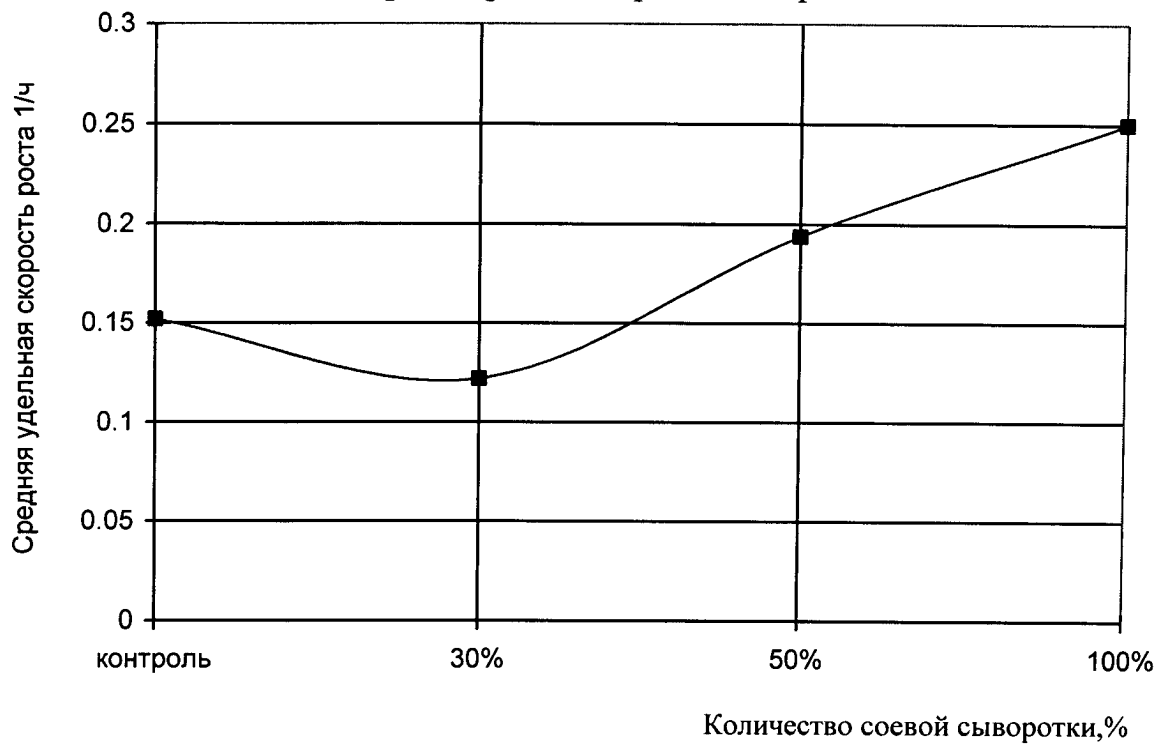
Фиг. 1

Влияние глюкозы на рост бифидобактерий



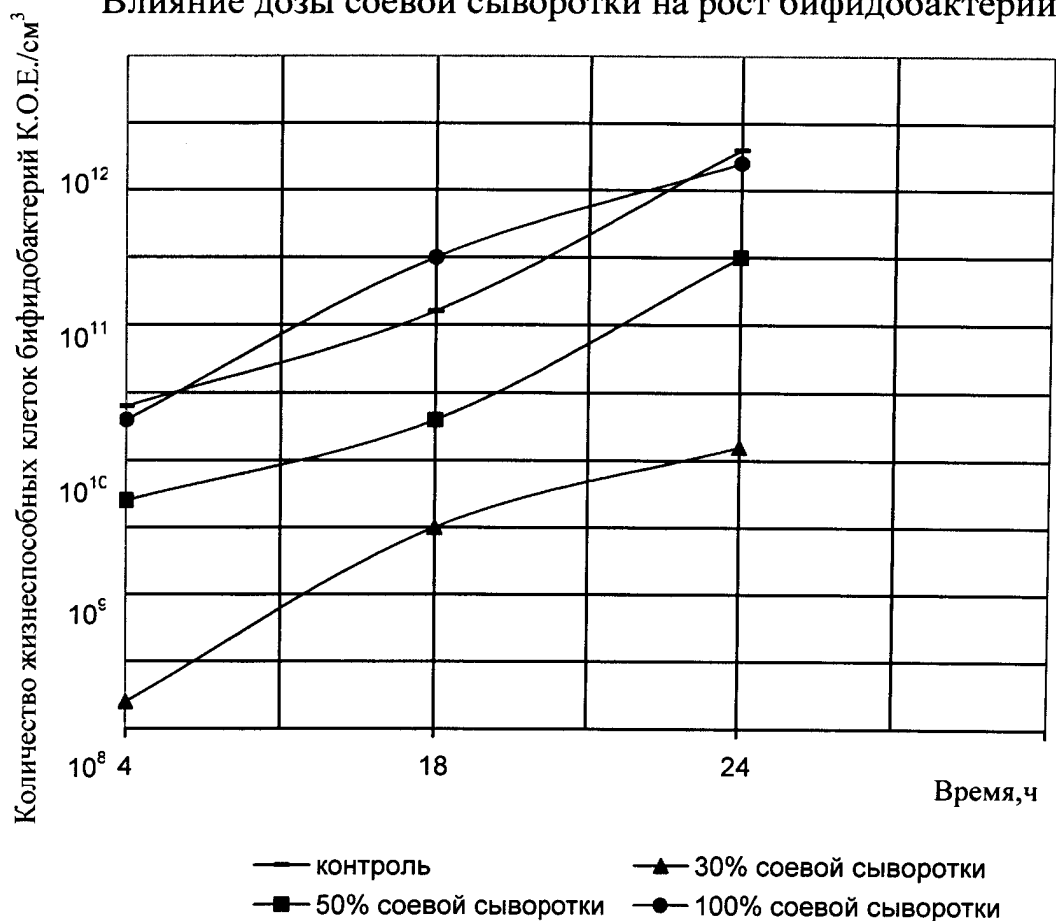
Фиг. 2

Влияние различных доз соевой сыворотки
на скорость роста бифидобактерий



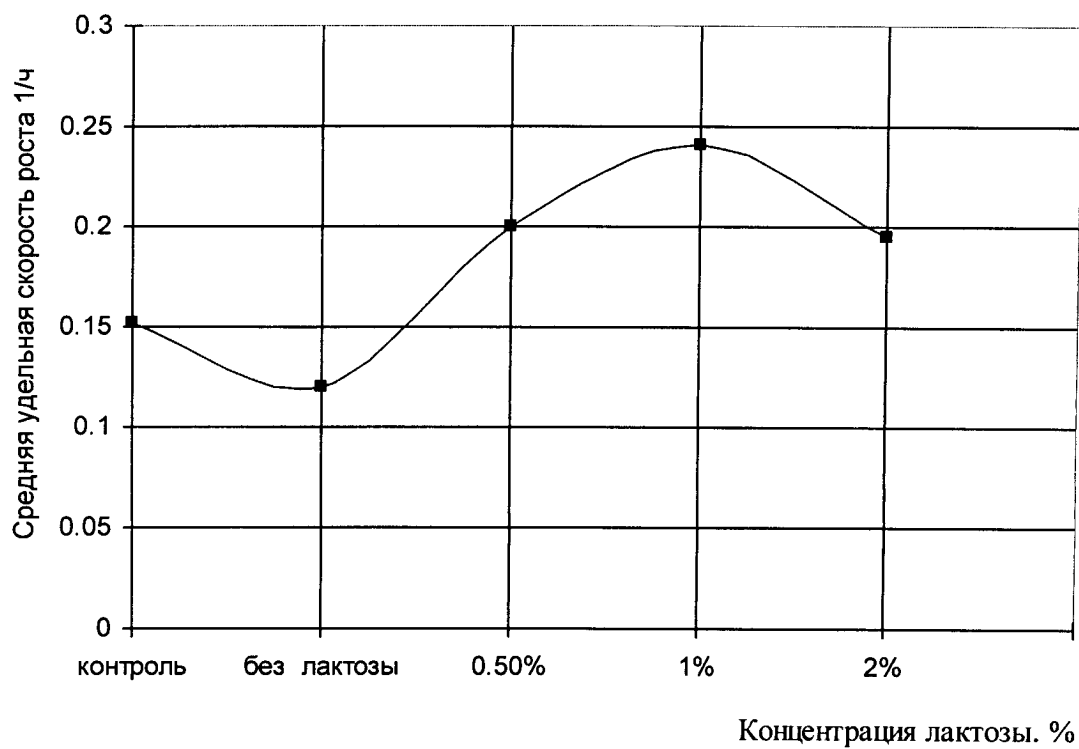
Фиг. 3

Влияние дозы соевой сыворотки на рост бифидобактерий



Фиг. 4

Влияние дозы лактозы на рост бифидобактерий



Фиг. 5