РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 544 052**(13) **C2**

(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A23C 9/12 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2013132696/10, 15.07.2013**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.07.2013

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **15.07.2013**

(43) Дата публикации заявки: **20.01.2015** Бюл. № 2

(45) Опубликовано: **10.03.2015** Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2372782 C1, 20.11.2009. RU 2218795 C2 , 20.12.2003. RU 2333655 C2, 10.02.2008. RU 2120762 C1, 27.10.1998. RU 2332019 C1, 27.08.2008**

Адрес для переписки:
670013, Республика Бурятия, г.Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в, стр. 1, ФГБОУ ВПО ВСГУТУ, Начальнику ОИС Цыбеновой Г-Х.

(72) Автор(ы):
Хамагаева Ирина Сергеевна (RU),
Хазагаева Софья Николаевна (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 КОНСОРЦИУМА ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в качестве закваски прямого внесения для приготовления пробиотической сметаны. Способ включает приготовление питательной среды, в которую дополнительно вносят селенит натрия в количестве 30-50 мкг/мл, стерилизацию и охлаждение до 35°С. Внесение в полученную питательную среду инокулята, в качестве инокулята используют комбинированную закваску на основе Bifidobacterium bifidum 8_3, Lactococcus lactis subspecies cremoris 24_4, Propionibacterium freudenreichii subspecies shermanii АС-2503, взятых в соотношении 40:30:30, наращивание биомассы и отделение биомассы от культуральной жидкости. Смешивание с защитной средой, розлив, укупорку и замораживание. Изобретение позволяет повысить органолептические свойства экзополисахаридного потенциала и срок хранения бактериального концентрата. 1 з.п. ф-лы. 5 табл. 8 ил., 3 пр.

RU 2544052 C2

RU 2544052 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 544 052**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A23C 9/12 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2013132696/10, 15.07.2013**

(24) Effective date for property rights:
15.07.2013

Priority:
(22) Date of filing: **15.07.2013**

(43) Application published: **20.01.2015** Bull. № **2**

(45) Date of publication: **10.03.2015** Bull. № **7**

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

(72) Inventor(s):
Khamagaeva Irina Sergeevna (RU),
Khazagaeva Sof'ja Nikolaevna (RU),
Zambalova Natal'ja Aleksandrovna (RU)

(73) Proprietor(s):
Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego professional'nogo obrazovanija "Vostochno-Sibirskij gosudarstvennyj universitet tekhnologij i upravlenija" (RU),
Khamagaeva Irina Sergeevna (RU)

(54) METHOD FOR PRODUCTION OF BACTERIAL CONCENTRATE OF PROBIOTIC MICROORGANISMS CONSORTIUM

(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and may be used as a direct addition starter for probiotic sour cream preparation. The method involves preparation of a nutritional medium where one additionally introduces sodium selenite in an amount of 30-50 mcg/ml, sterilisation and cooling to 35°C, inoculum introduction into the nutritional medium; the inoculum is represented by combined starter based on Bifidobacterium bifidum 8_3, Lactococcus lactis subspecies cremoris 24_4, Propionibacterium freudenreichii subspecies shermanii AC-2503 taken at a ratio of 40:30:30, biomass propagation and separation from culture liquid. One performs mixing with a protective medium, dispensing, closuring and freezing.

EFFECT: invention allows to enhance organoleptic properties of exo-polysaccharide potential and increase storage life of the bacterial concentrate.

2 cl, 5 tbl, 8 dwg, 3 ex

RU 2544052 C2

RU 2544052 C2

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в качестве закваски прямого внесения для приготовления пробиотической сметаны.

Известен способ производства бактериального концентрата, включающий приготовление питательной среды, стерилизацию, охлаждение, внесение инокулята, наращивание биомассы, отделение биомассы от культуральной жидкости, смешивание с защитной средой, розлив, укупорку, замораживание, сушку и хранение (см. ТУ 9229-001-48774768-02).

Недостатком данного способа является низкая биохимическая активность концентрата и трудоемкость его приготовления в производственных условиях.

Наиболее близким способом к заявляемому изобретению по совокупности признаков является способ производства бактериального концентрата, включающий приготовление питательной среды, стерилизацию, охлаждение, внесение инокулята, наращивание биомассы, отделение биомассы от культуральной жидкости, смешивание с защитной средой, розлив, укупорку, замораживание, хранение (см. RU №2372782, A23C 9/12, 20.11.2009 г.).

Однако недостатком данного способа является то, что при использовании данного концентрата не формируются характерные для сметаны органолептические и структурно-механические свойства и она обладает кратковременным сроком хранения.

Задачей изобретения является повышение потребительских, реологических свойств и хранимоспособности готового продукта.

Кроме того, создание консорциума пробиотических микроорганизмов из специально подобранных культур пробиотических микроорганизмов позволит повысить биохимические и функциональные свойства концентратов.

Технический результат, обеспечиваемый при осуществлении предлагаемого изобретения, заключается в повышении органолептических свойств, экзо-полисахаридного потенциала и снижении гидролитических и окислительных процессов при хранении продукта.

Указанный технический результат при осуществлении изобретения достигается тем, что в способе приготовления бактериального концентрата консорциума пробиотических микроорганизмов, включающем приготовление питательной среды, стерилизацию, охлаждение, внесение инокулята, наращивание биомассы, отделение биомассы от культуральной жидкости, смешивание с защитной средой, розлив, укупорку, замораживание, хранение, согласно изобретению в питательную среду дополнительно вводят селенит натрия в количестве 30-50 мкг/мл, а в качестве инокулята используют комбинированную закваску на основе Bifidobacterium bifidum 8_3, Lactococcus lactis subspecies cremoris 24_4 Propionibacterium freudenreichii subspecies shermanii AC-2503, взятых в соотношении 40:30:30.

Отличительными признаками заявляемого способа является оптимизация питательной среды за счет внесения селенита натрия, а также использование специально подобранных штаммов пробиотических микроорганизмов, выбор их оптимального соотношения и условий культивирования пробиотических микроорганизмов, при котором отмечены высокие органолептические, реологические свойства, снижение окислительных процессов и стабильность продукта в процессе хранения.

Для осуществления заявляемого способа были проведены экспериментальные исследования, в ходе которых были подобраны доза селенита натрия, заквасочные культуры пробиотических микроорганизмов и их оптимальное соотношение.

Отбор штаммов по производственно-ценным свойствам - важный аспект разработки пробиотического продукта. Основу заквасок для классической сметаны составляют

молочнокислые бактерии Lactococcus lactis subspecies lactis и Lactococcus lactis subspecies Cremoris. Многолетний опыт по подбору микрофлоры заквасок показывает, что лучше всего сочетаются штаммы, имеющие близкую активность кислотообразования. Поэтому в качестве основы закваски для пробиотического продукта наряду с бифидобактериями выбраны молочнокислые бактерии вида Lactococcus lactis subspecies Cremoris, так как этот вид микроорганизмов, активно развиваясь в молоке, формирует плотный сметанообразный сгусток и, являясь менее активным кислотобразователем, характеризуется низким постокислительным потенциалом.

Совместное культивирование бифидобактерий с молочнокислыми бактериями имеет ряд преимуществ. Молочнокислые бактерии связывают растворенный в молоке кислород и тем самым создают условия, благоприятные для роста бифидобактерий. Протеолитически активные штаммы лактобактерий расщепляют казеин с образованием бифидогенных факторов: пептидов и аминокислот.

С целью повышения функциональных свойств и улучшения консистенции разрабатываемого продукта в состав комбинированной закваски целесообразно ввести пропионовокислые бактерии.

Консистенция один из определяющих показателей качества сметаны. Структурно-механические свойства кисломолочных сгустков обусловлены коллоидным состоянием мицелл казеинаткальцийфосфатного комплекса, денатурацией сывороточных белков, дисперсностью и физическим состоянием жировой эмульсии, синтезом естественных стабилизаторов микроорганизмами закваски.

Накапливаемые в процессе сквашивания полисахариды соединяются с белками молока, образуя углеводно-белковые комплексы, повышая гидрофильность сгустка, и оказывают положительное влияние на консистенцию сметаны. Поэтому при отборе культур для комбинированной закваски необходимо изучить степень продуцирования полисахаридов исследуемыми штаммами. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Полисахаридный потенциал микроорганизмов

Объект исследования	Относительная вязкость культуральной жидкости, сСт	Концентрация полисахаридов, мкг/см^3
P. Freudenreichii subsp. Freudenreichii АС-2500	1,88	19,70±0,61
P. cyclohexanicum Kusano АС-2560	3,86	29,60±0,43
Propionibacterium Freudenreichii subsp. Schermanii АС-2503	4,45	30,2±0,26
Bifidobacterium longum DK-100	1,92	5,9±0,04
Bifidobacterium bifidum 8_3	2,41	7,8±0,021
Bifidobacterium longum B379M	2,4	7,5±0,03
Lactococcus lactis subsp. cremoris 24_4	4,62	23,8±0,21
Lactococcus lactis subsp. cremoris 18П	4,45	18,3±0,17
Lactococcus lactis subsp. cremoris Т-18-20	4,57	19,6±0,31

Как видно из представленных данных наиболее большую способность к продуцированию экзополисахаридов обнаружили штаммы Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii АС-2503, Bifidobacterium bifidum 8_3 и Lactococcus lactis subspecies cremoris 24_4.

Согласно современным представлениям роль естественных стабилизаторов выполняют экзополисахариды, плотность и влагоудерживающая способность сгустков, а значит консистенция продукта в определенной степени обусловлена способностью бактерий закваски вырабатывать экзополисахариды. Микробные полисахариды представлены широким спектром полимеров, самых различных по составу, строению,

типу связей.

Для получения готовых продуктов с заданными показателями качества необходимо использовать стартовые культуры со стабильным комплексом характеристик.

На начальном этапе исследований был изучен биотехнологический потенциал разных штаммов Lactococcus lactis subspecies Cremoris. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Биотехнологический потенциал различных штаммов Lactococcus lactis subsp cremoris

Показатели	Характеристика штамма		
	L.cremoris 18П	L.cremoris T-18-20	L.cremoris 24_4
Внешний вид и консистенция	Однородная, нежная, в меру вязкая, поверхность сгустка глянцевая	Однородная, в меру вязкая, поверхность сгустка глянцевая	Однородная плотная, вязкая, поверхность сгустка глянцевая
Вкус и аромат	Чистый нежный кисломолочный	Чистый кисломолочный	Чистый кисломолочный, нежный сливочный привкус
Активность ферментации, ч	12-14	10-12	10-12
Кислотность			
Титруемая, °Т	68-70	72-74	70-72
Активная, pH	4,99±0,05	4,96±0,01	4,98±0,03
Рост клеток при			
20% желчи	+	+	+
40% желчи	±	±	±
2% aCl	+	+	+
pH=4,5	+	+	+
Устойчивость к фенолу	+	+	+
Адгезивная активность:			
СПА*	3,48	3,36	3,68
КУЭ,%**	85	84	86
ИАМ***	4,14±1,1	4,08±0,06	4,28±1,12

Примечания: СПА* - средний показатель адгезии; КУЭ** - коэффициент участия эритроцитов; ИАМ*** - индекс адгезивности микроорганизмов; «-» - отсутствие роста; «±» - небольшой рост (10^5-10^6 кое/см^3); «+» - активный рост (10^8-10^9 кое/см^3)

Из данных таблицы 2 видно, что штаммы L. Cremoris обладают выраженной биохимической активностью. Закваски характеризуются хорошими органолептическими показателями. Выявлена устойчивость исследуемых культур к различным концентрациям желчи, хлорида натрия и фенолу. Изучаемые штаммы относятся к высокоадгезивным, максимальную способность к адгезивному процессу проявил штамм L.cremoris 24_4, который обладает и наиболее высоким экзополисахаридным потенциалом.

В следующей серии опытов был изучен биотехнологический потенциал бифидобактерий и пропионовокислых бактерий. Результаты представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3

Биотехнологический потенциал пропионовокислых бактерий

Показатели	Характеристика штамма		
	P. Freudenreichii AC-2500	P. cyclohexanicum Kusano AC-2560	P. shermanii AC-2503
Внешний вид и консистенция	Однородная жидковатая	Однородная густая	Однородная густая, в меру вязкая
Вкус и аромат	Чистый кисломолочный	Чистый кисломолочный	Чистый кисломолочный слегка пряный
Кислотность:			
Титруемая, °Т	76±2	70±2	72±2
Активная, pH	4,64±0,03	4,98±0,01	4,92±0,01
Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/см^3	$3\cdot10^9$	$1\cdot10^9$	$5\cdot10^9$
Рост клеток при			
20% желчи	+	+	+

40% желчи	±	±	±
2% NaCl	±	+	+
4% NaCl	±	±	+
pH=4,5	±	±	+
Устойчивость к фенолу	±	±	+
Адгезивная активность:			
СПА	3,2	3,9	4,6
КУЭ, %	79	82	85
ИАМ	4±1,5	3,7±1,8	5,4±1,1

Из данных таблицы 3 следует, что все штаммы пропионовокислых бактерий обладают высокой биохимической активностью, о чем свидетельствует быстрая ферментация молока и максимальное количество жизнеспособных клеток 10^{9-10} кое/см^3. Исследуемые культуры проявили устойчивость к высокой концентрации желчи, хлорида натрия и развивались в среде с низким значением pH, что указывает на высокую выживаемость данных культур в желудочно-кишечном тракте человека. Следует отметить, что наиболее высоким биотехнологическим потенциалом обладает P. shermanii AC-2503.

Биотехнологический потенциал бифидобактерий представлен в таблице 4.

Таблица 4

Биотехнологический потенциал бифидобактерий

Показатели	Характеристика штамма		
	B. longum ДК-100	B. bifidum 8_3	Bifidobacterium longum B 379M
Внешний вид и консистенция	Однородная жидкая	Однородная, в меру жидкая	Однородная, в меру жидкая
Вкус и аромат	Чистый, нежный кисломолочный	Чистый нежный, кисломолочный	Чистый нежный, кисломолочный
Кислотность			
Титруемая, °Т	63±2	67±2	65±2
Активная, pH	4,99±0,03	4,98±0,02	4,98±0,01
Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/см^3	2*10^9	4*10^9	3*10^9
Рост клеток при			
20% желчи	+	+	+
40% желчи	+	+	+
2% NaCl	+	+	+
4% NaCl	+	+	+
pH=4,5			
Устойчивость к фенолу	+	+	+
Адгезивная активность:			
СПА	4,3	3,3	3,8
КУЭ, %	84	82	90
ИАМ	4,1	4,22	3,42

Анализ полученных результатов показал, что изученные штаммы бифидобактерий обладают достаточно высокой биохимической активностью, о чем свидетельствует быстрая ферментация молока и значительное количество жизнеспособных клеток в закваскаx - 10^9 кое/см^3. Закваски на основе активизированных культур бифидобактерий характеризуются хорошими органолептическими показателями. Отмечено,что штамм B. bifidum 8_3 при сквашивании образует более плотный сгусток в сравнении с B. longum DK-100.

На основании проведенных исследований для создания консорциума пробиотических микроорганизмов были выбраны штаммы Bifidobacterium bifidum 8_3, Lactococcus lactis subspecies cremoris 24_4 и Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii AC-2503, обладающие высоким экзополисахаридным и биотехнологическим потенциалом.

При создании консорциума бифидо-, лакто- и пропионовокислых бактерий необходимо подобрать такие оптимальные параметры культивирования, при которых будет наблюдаться взаимное стимулирование, сбалансированный рост и стабильное равновесие выбранных культур, а также сохранение производственно-ценных свойств каждого представителя микробной ассоциации.

Сложность составления консорциума заквасочных культур в данном случае заключается в том, что культуры, составляющие конструкцию закваски, нуждаются в различных температурных оптимумах и обладают неодинаковым темпом размножения. Учитывая различные оптимальные температуры развития L. cremoris 24_4 - 25-27°С, пропионовокислых бактерий - 30°С, бифидобактерий - 36-38°С, необходимо было подобрать условия для совместного культивирования данных микроорганизмов в симбиотической закваске.

При выборе штаммов учитывали стабильность технологических и функциональных свойств, таких как органолептические свойства, способность к накоплению биомассы, способность к образованию вязких сгустков посредством синтеза экзополисахаридов, а также соответствие критериям, предъявляемым к пробиотическим микроорганизмам.

Культуры L. cremoris, бифидобактерий и пропионовокислых бактерий культивировали при 30°С, 35°С, 37°С (см. фиг.1).

Как видно из фиг.1 при промежуточной температуре 35°С значения удельных скоростей роста изучаемых микроорганизмов приближаются, следовательно, при такой температуре будет наблюдаться равномерное развитие подобранных штаммов в ассоциации.

Оптимальное соотношение микроорганизмов в консорциуме выбирали с учетом сбалансированного роста культур и органолептических показателей сгустков. Полученные результаты отражены в таблице 5.

Таблица 5

Выбор соотношения культур в комбинированной закваске

Показатели	Соотношение B.Bifidum 8_3 : L.Cremoris 24_4 : P. Shermanii АС-2503		
	20:30:50	20:40:40	40:30:30
Консистенция и внешний вид	Однородная, вязкая	Однородная, вязкая	Однородная, в меру вязкая, плотная
Вкус и аромат	Чистый, кисломолочный, пряный	Чистый, кисломолочный	Нежный, чистый, кисломолочный
Активность ферментации, ч	10-12	10-12	10-12
Кислотность, °Т	74-76	74-76	70-72
Титр жизнеспособных клеток, кое/см^3			
B. bifidum 83	$3*10^8$	$8*10^8$	$5*10^9$
L. cremoris 244	$3*10^9$	$6*10^9$	$3*10^9$
P. shermanii	$6*10^9$	$5*10^9$	$4*10^9$
Содержание ЛЖК, мг/100 г	3,2	3,6	3,8

Данные таблицы 5 свидетельствуют, что сбалансированный рост всех микроорганизмов наблюдается при соотношении B.Bifidum 8_3 : L.Cremoris 244 : P.Shermanii АС-2503, равном 40:30:30. При этом сгусток характеризуется однородной в меру вязкой консистенцией и высокими органолептическими показателями. О хорошей сочетаемости и прочных симбиотических отношениях свидетельствует высокая плотность популяций культур, которая гарантирует стабильность микробного консорциума.

Подобранные условия культивирования консорциума пробиотических

микроорганизмов обеспечивают высокую биохимическую активность и хорошие органолептические показатели комбинированной закваски.

Закваски являются основополагающим фактором качества в производстве сметаны. Именно закваски придают продукту большинство характерных особенностей - вязкость, структуру сгустка, консистенцию, аромат, а также определяют стабильность качественных показателей при хранении.

Структура и консистенция кисломолочных продуктов в значительной степени зависят от способности заквасочных культур продуцировать внеклеточные полисахариды.

Согласно литературным данным, синтез и качественный состав экзометаболитов бактерий зависят от условий культивирования. Известно, что при культивировании Bifidobacterium longum B379M и Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii штамм КМ 186 на питательной среде с добавлением селенита натрия повышается вязкость культуральной жидкости и увеличивается концентрация экзополисахаридов (RU №2333655, A23C 9/12, A23L 1/304, C12N 1/18, 20.09.2008 г.). Что касается лактококков, то такая информация в литературе отсутствует. Кроме того, установлено, что синтез биологически активных веществ зависит от видовой и штаммовой принадлежности.

Поэтому на следующем этапе было изучено влияние различных доз селенита натрия на биосинтез экзополисахаридов (ЭПС) пробиотическими микроорганизмами. Результаты исследований представлены на фиг.2.

Как видно из данных, представленных на фиг.2, добавление селенита натрия в питательную среду стимулирует синтез экзополисахаридов. Наибольший прирост экзополисахаридов наблюдается в интервале концентраций селенита натрия от 30 до 50 мкг/мл. Дальнейшее увеличение концентрации селенита более 50 мкг/мл не приводит к значительному повышению экзополисахаридов. Интересным является тот факт, что повышение концентрации селенита натрия в питательной среде не приводит к задержке роста микроорганизмов, и количество жизнеспособных клеток в конце культивирования составляет (10^{10}-10^{11}) кое/см^3. Это свидетельствует о высокой устойчивости микроорганизмов к селениту натрия. Устойчивость к селену бактерий может быть обусловлена наличием ассоциированных с клетками полисахаридов, препятствующих проникновению селена в клетки, которые затем высвобождаются в среду. Из литературных источников известно о защитных биологических функциях ЭПС микроорганизмов, которые играют главную защитную роль, поскольку действуют гораздо быстрее по сравнению с индуцибельными системами защиты.

В результате проведенных исследований выбрана оптимальная доза селенита натрия 30-50 мкг/мл, обеспечивающая высокое количество экзополисахаридов и активный рост микроорганизмов.

В дальнейших исследованиях изучали рост биомассы и синтез ЭПС при совместном культивировании B. Bifidum 8_3, L. Cremoris 24_4, и P. Shermanii АС-2503, взятых в соотношении 40:30:30 на питательной среде с добавлением селенита натрия в количестве 30 мкг/мл. Результаты исследований представлены на фиг.3 и 4.

Как видно из данных, представленных на фиг.3, синтез экзополисахаридов культурами комбинированной закваски начинается на ранних стадиях роста и продолжается в течение всего периода культивирования. Максимальное количество экзополисахаридов отмечено в стационарной фазе роста и составляет 39,6 мкг/мл.

При совместном культивировании культур B. Bifidum 8_3, L.Cremoris 24_4 и P. Shermanii АС-2503 на питательной среде с селенитом натрия отмечен сбалансированный рост микроорганизмов и количество жизнеспособных клеток через 20 часов культивирования

составляет (10^{10}-10^{11}) кое/см^3 (фиг.4).

Следует отметить, что экзополисахариды играют важную роль в формировании симбиотических систем. Так, данные, имеющиеся в литературе,свидетельствуют о том, что узнавание и первичные контакты симбионтов происходят благодаря взаимодействию полисахаридов клеточной поверхности бактерий, которые обеспечивают высокую адаптационную, физиологическую устойчивость клеток микроорганизмов.

При исследовании морфологии микроорганизмов при различных концентрациях селенита натрия было отмечено, что с увеличением селенита натрия наблюдается скопление клеток (когезия). Такая же динамика характерна и при культивировании консорциума микроорганизмов (фиг.5).

Данные, представленные на фиг.5, свидетельствуют, что при совместном культивировании микроорганизмов на среде с селенитом натрия образуются микроколонии, что обеспечивает высокую выживаемость при воздействии неблагоприятных факторов внешней среды. Вероятно, в условиях межклеточных контактов посредством агрегации клетки поддерживают свою жизнедеятельность.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что введение в состав питательной среды селенита натрия позволяет повысить синтез экзополисахаридов и усилить симбиотические взаимоотношения между пробиотическими бактериями, что повышает производственно-ценные свойства консорциума.

Для определения дозы внесения замороженного бактериального концентрата при выработке сметаны была проведена серия опытов по исследованию биохимической активности концентрата. В результате установлено, что один флакон, содержащий 5 мл (5 единиц активности) закваски прямого внесения, способен ферментировать 200 кг сливок за (12-14) ч при температуре 35°С. Замороженный бактериальный концентрат был применен для ферментации сливок.

Сметана характеризуется хорошими органолептическими показателями и содержит высокое количество жизнеспособных клеток пробиотических бактерий. Сметана относится к структурированным дисперсным системам. Характерной особенностью сметаны является то, что ее вязкостные свойства претерпевают значительные изменения не только при изменении температуры продукта, но и при изменении градиента скорости сдвига, который имеет место при различных видах механического воздействия на продукт.

Исследования эффективной вязкости разрушенной структуры опытного образца сметаны были проведены на ротационном вискозиметре при температуре 20°С. В качестве контрольного образца использовали сметану, ферментированную бактериальным концентратом без добавления селенита натрия. Результаты представлены на фиг.6.

Как видно из данных фиг.6, вязкость опытного образца сметаны на 15% выше, чем в контрольном образце. При увеличении скорости вращения шпинделя и механического воздействия наблюдается снижение эффективной вязкости. В опытном образце сметаны потери вязкости составляют 60,27, в контрольном - 73,87%.

Таким образом, структура опытного образца сметаны более устойчива к механическому воздействию, поэтому консистенция продукта будет в меньшей степени подвержена воздействию технологических факторов.

Стойкость пищевого продукта при хранении является показателем высокого качества. Сохранение органолептических показателей, биологической и пищевой ценности в течение определенного периода времени обеспечивает функциональную эффективность пробиотического продукта и его конкурентоспособность. При хранении продуктов,

содержащих значительное количество жира, происходит изменение липидов с образованием веществ, снижающих пищевую ценность и диетические качества. Это необходимо учитывать при определении сроков годности сметаны.

Поэтому в следующей серии опытов были исследованы изменения качественных характеристик сметаны при хранении. Образцы сметаны 15%-ной жирности хранили при температуре (4±2)°С. Как известно, превращение молочного жира в основном происходит в результате ферментативного гидролиза и окисления под действием кислорода воздуха. Для определения интенсивности этих процессов в исследуемых образцах были определены значения кислотного и перекисного числа. Результаты представлены на фиг.7 и 8.

Как видно из данных фиг.7, в контрольном образце отмечена более высокая скорость образования свободных жирных кислот и перекисей. Значения кислотного числа на начальном этапе в образцах различаются незначительно, так как вначале происходит накопление свободных жирных кислот, формирующих вкус и аромат сметаны. Усиление гидролиза с дальнейшим повышением концентрации свободных жирных кислот приводит к окислению освободившихся ненасыщенных жирных кислот кислородом воздуха с образованием кетонов и альдегидов, ухудшающих органолептические показатели продукта.

Значения перекисного числа в опытном образце ниже, чем в контрольном (см. фиг.8). Это можно объяснить тем, что в опытном образце сметаны сохраняется высокое количество жизнеспособных клеток микроорганизмов закваски, обладающих собственным механизмом антиокислительной защиты посредством синтеза ферментов и антиоксидантными свойствами остаточного количества селена. Комплексное воздействие этих факторов приводит к снижению скорости окислительных процессов в опытном образце сметаны.

Совокупность полученных данных свидетельствует, что сметана, выработанная с использованием бактериального концентрата, обладает хорошими органолептическими, реологическими показателями, высоким экзополисахаридным потенциалом и характеризуется повышенной стойкостью при хранении.

Заявляемый способ осуществляют следующим образом.

Для приготовления питательной среды молочную сыворотку осветляют, вносят ростовые компоненты и 30-50 мкг/мл селенита натрия, стерилизуют, охлаждают, вносят 5% инокулята консорциума микроорганизмов, состоящего из Bifidobacterium bifidum 8_3, Lactococcus lactis subspecies cremoris 24_4, Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii АС-2503, взятых в соотношении 40:30:30, наращивают биомассу в течение 20-22 часов в условиях периодического культивирования при однократной нейтрализации среды через 10 часов для поддержания pH на оптимальном уровне раствором углекислого натрия. Затем бактериальную массу отделяют от культуральной жидкости путем центрифугирования. Полученную суспензию клеток смешивают с защитной средой в соотношении 1:1, разливают во флаконы по 5 мл, замораживают при температуре минус 25°С, затем флаконы укупоривают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Замороженный концентрат хранят до 8 месяцев при температуре минус 18°С.

Примеры, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

Пример 1. Для приготовления питательной среды молочную сыворотку осветляют, вносят ростовые компоненты и 30 мкг/мл селенита натрия, стерилизуют, охлаждают до 35°С, вносят 3% инокулята консорциума микроорганизмов, состоящего из B. bifidum 8_3, L.cremoris 24_4, P. shermanii АС-2503, взятых в соотношении 40:30:30, наращивают

биомассу в течение 20 часов в условиях периодического культивирования при однократной нейтрализации среды через 10 часов для поддержания pH на оптимальном уровне раствором углекислого натрия. Затем бактериальную массу отделяют от культуральной жидкости путем центрифугирования. Полученную суспензию клеток смешивают с защитной средой в соотношении 1:1, разливают во флаконы по 5 мл, замораживают при температуре минус 25°С, затем флаконы укупоривают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Замороженный концентрат хранят до 8 месяцев при температуре минус 18°С.

Пример 2. Для приготовления питательной среды молочную сыворотку осветляют, вносят ростовые компоненты и 50 мкг/мл селенита натрия, стерилизуют, охлаждают до 35°С, вносят 5% инокулята консорциума микроорганизмов, состоящего из B. bifidum 8_3, L.cremoris 24_4, P. shermanii АС-2503, взятых в соотношении 40:30:30, наращивают биомассу в течение 22 часов в условиях периодического культивирования при однократной нейтрализации среды через 10 часов для поддержания pH на оптимальном уровне раствором углекислого натрия. Затем бактериальную массу отделяют от культуральной жидкости путем центрифугирования. Полученную суспензию клеток смешивают с защитной средой в соотношении 1:1, разливают во флаконы по 5 мл, замораживают при температуре минус 25°С, затем флаконы укупоривают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Замороженный концентрат хранят до 8 месяцев при температуре минус 18°С.

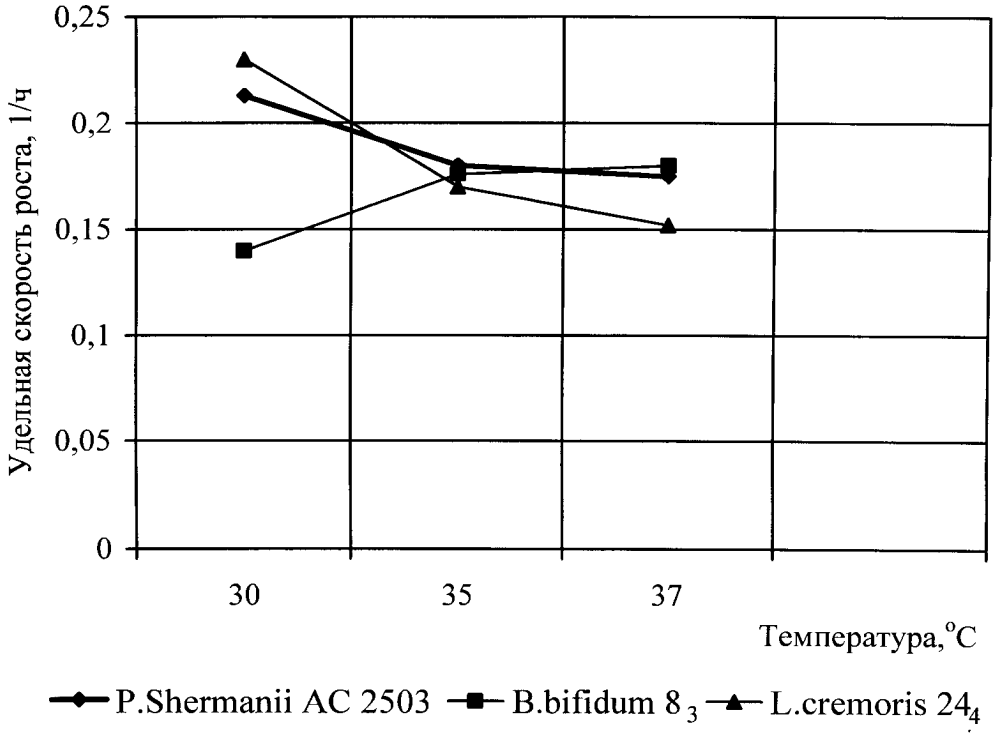
Пример 3. Для приготовления сметаны сливки нормализуют до массовой доли жира 15%, затем пастеризуют при температуре 95°С с выдержкой 5-10 мин, гомогенизируют при давлении 8-12 МПа, охлаждают до температуры 35°С, заквашивают замороженным бактериальным концентратом из расчета 5 ед. активности (5 $см^3$) на 200 л сливок, перемешивают в течение 10-15 мин и оставляют для сквашивания для образования сгустка кислотностью 55-60°Т. Продолжительность сквашивания составляет 10-12 часов. После сквашивания продукт охлаждают до 15-20°С, перемешивают, упаковывают, направляют на охлаждение и созревание, хранение при t=(4±2)°С не более 10 суток.

Формула изобретения

1. Способ получения бактериального концентрата консорциума пробиотических микроорганизмов, включающий приготовление питательной среды, стерилизацию, охлаждение, внесение инокулята, наращивание биомассы, отделение биомассы от культуральной жидкости, смешивание с защитной средой в соотношении 1:1, розлив, укупорку, замораживание, отличающийся тем, что в питательную среду дополнительно вносят селенит натрия в количестве 30-50 мкг/мл, а в качестве инокулята используют комбинированную закваску на основе Bifidobacterium bifidum 8_3, Lactococcus lactis subspecies cremoris 24_4, Propionibacterium freudenreichii subspecies shermanii АС-2503, взятых в соотношении 40:30:30.

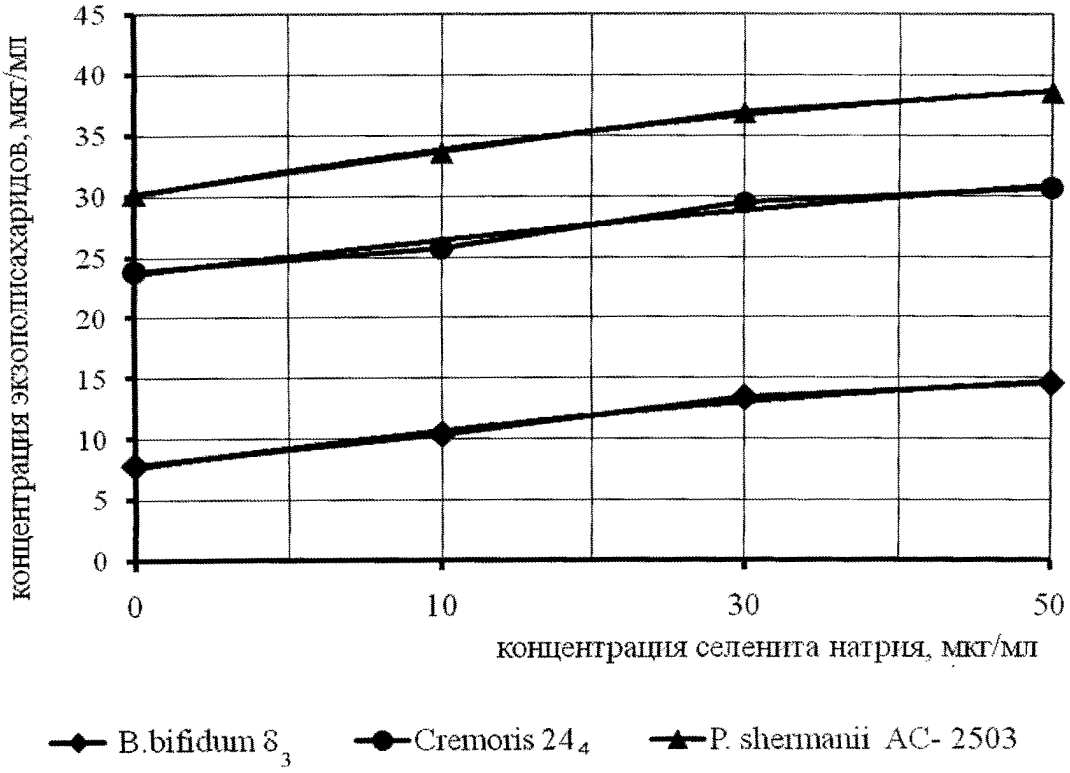
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что культивирование инокулята осуществляют при 35°С.

Зависимость удельной скорости роста культур от температуры



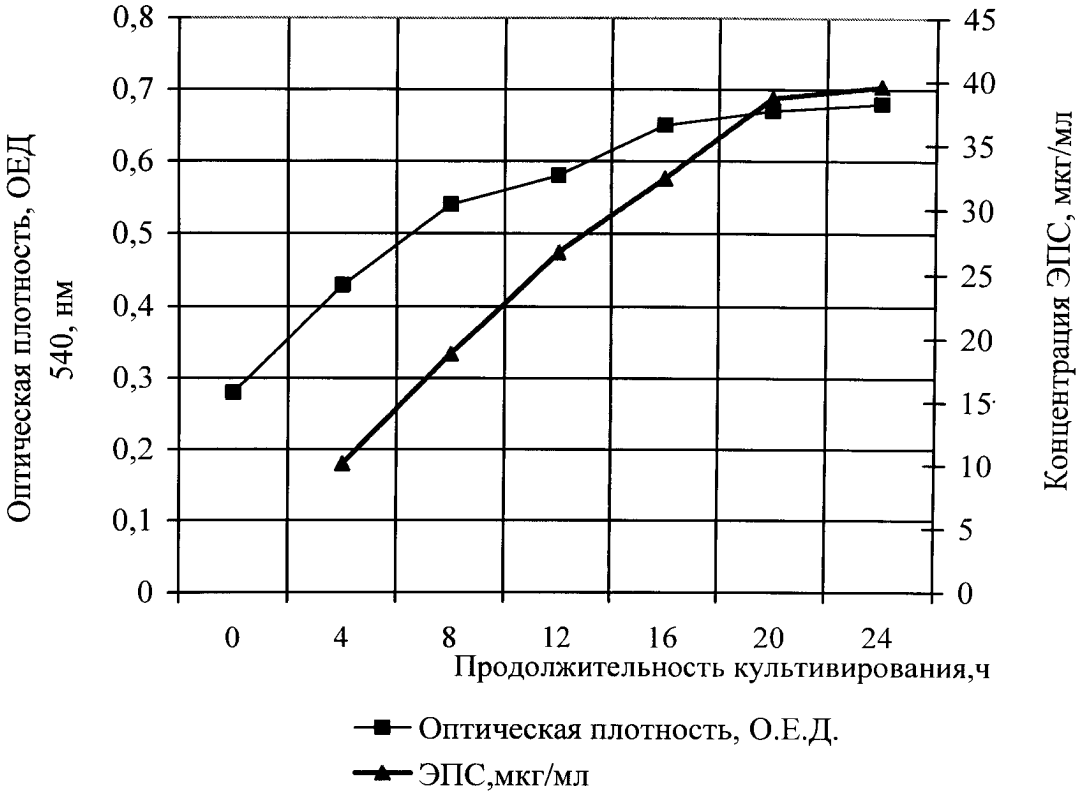
Фиг. 1

Влияние селенита натрия на биосинтез экзополисахаридов чистыми культурами B. bifidum8_3, L. cremoris 24_4 и P. shermanii AC-2503



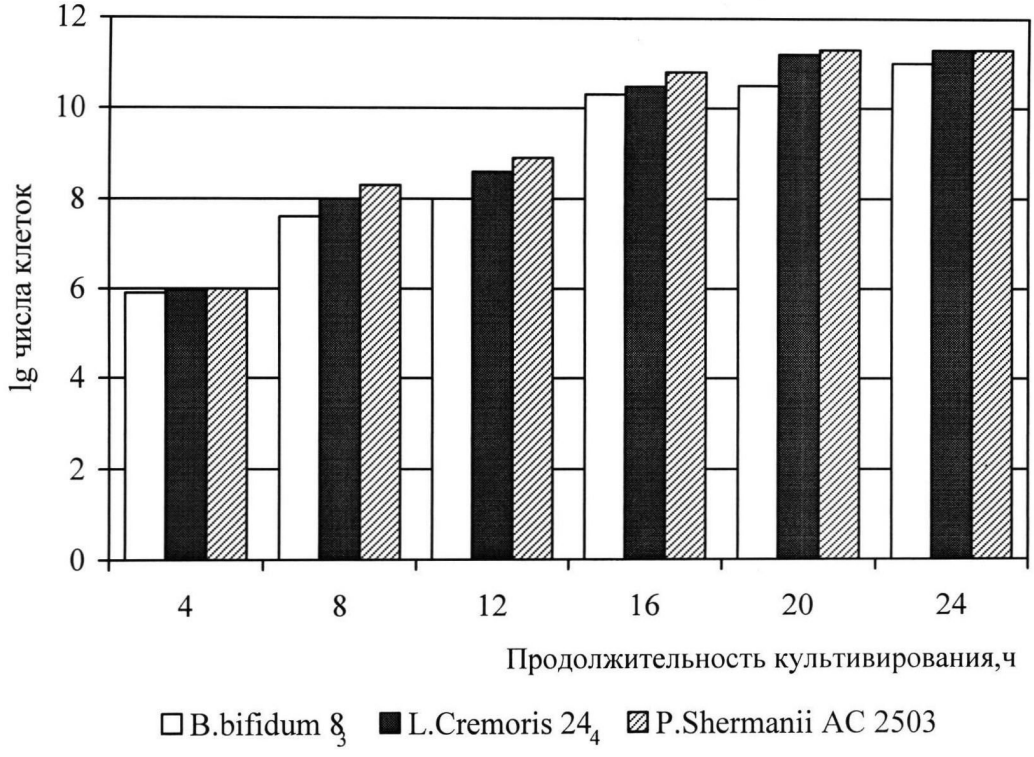
Фиг. 2

Накопление биомассы и экзополисахаридов в комбинированной закваске



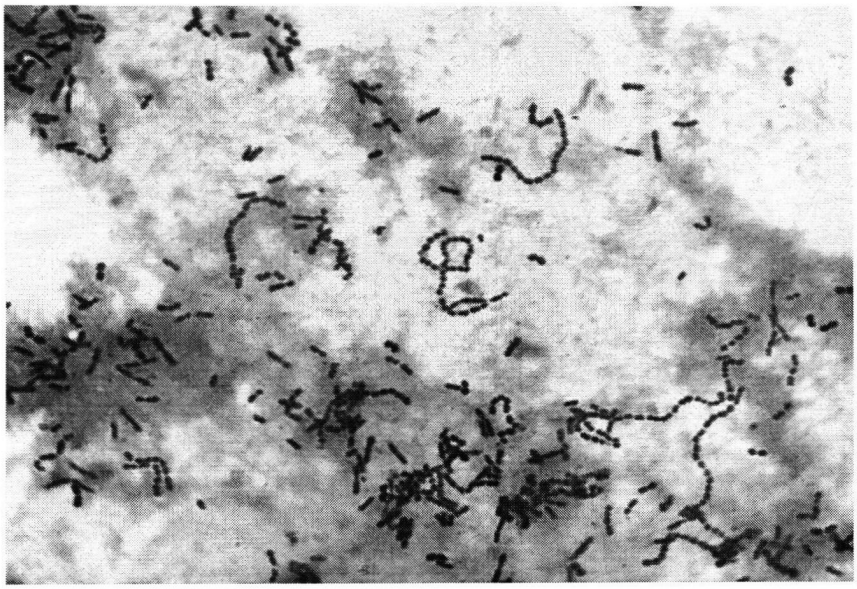
Фиг. 3

Динамика роста культур комбинированной закваски

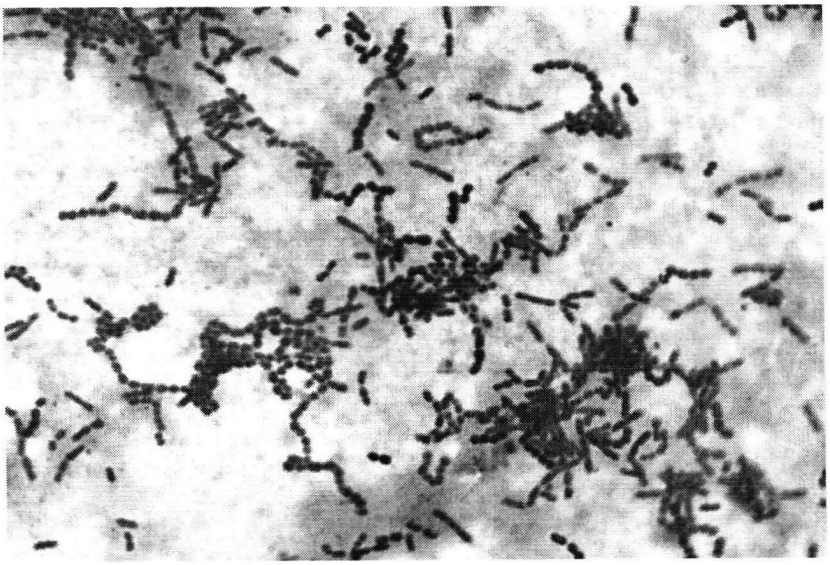


Фиг. 4

Микрокартина консорциума пробиотических бактерий



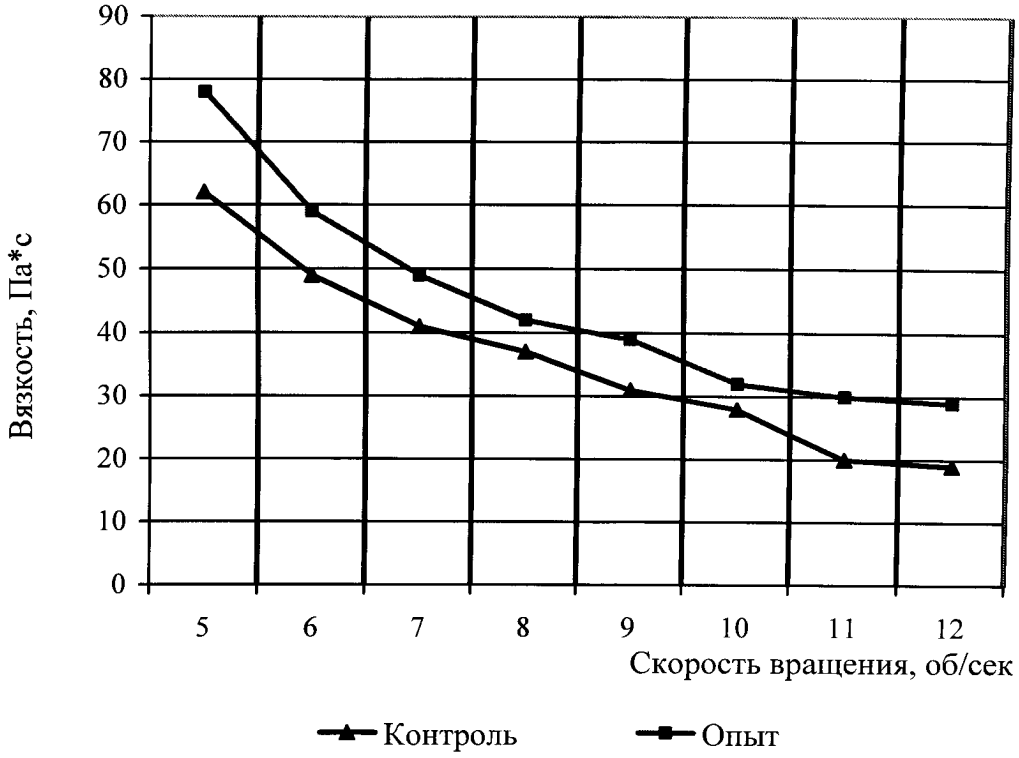
а) среда без селенита натрия



б) среда с селенитом натрия

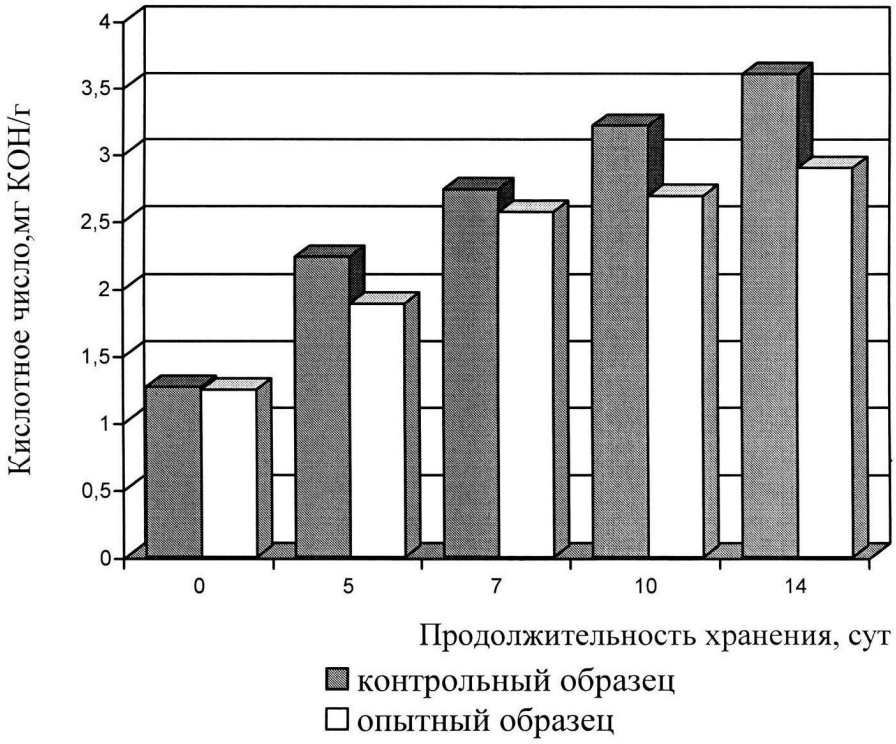
Фиг. 5

Исследование эффективной вязкости сметаны

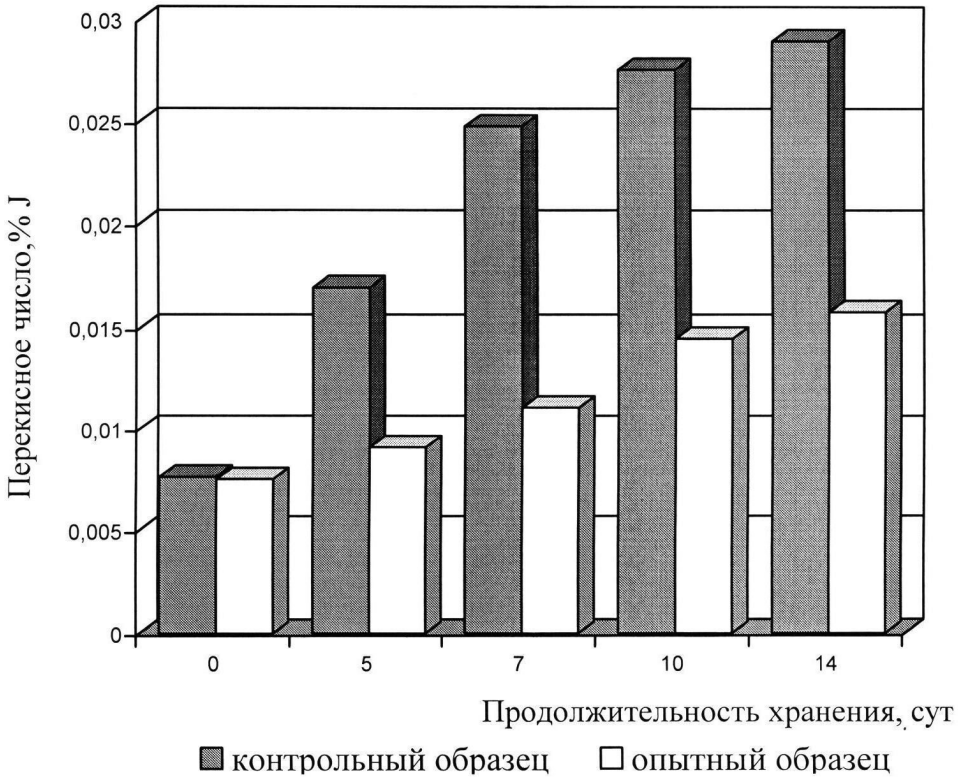


Фиг. 6

Изменение кислотного числа при хранении сметаны



Фиг. 7


Изменение перекисного числа при хранении сметаны
Перекисное число,% J
0,03
0,025
0,02
0,015
0,01
0,005
0
0
5
7
10
14
Продолжительность хранения, сут
контрольный образец
опытный образец

Фиг. 8