

НОТ ОРЕД.
254
ОДЕСЬКА ДЕРЖАВНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

ЯМБОРКО ГАННА ВАЛЕНТИНІВНА

A. Yamborko

УДК [579.864:637.146].33:66.047

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ СУХОГО КОНЦЕНТРАТУ
МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Одеса - 2002

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі мікробіології та вірусології Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Іваниця Володимир Олексійович,
Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова
Міністерства освіти і науки України,
завідуючий кафедрою мікробіології та вірусології

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, професор
Безусов Анатолій Тимофійович,
Одеська державна академія харчових технологій
Міністерства освіти і науки України,
завідуючий кафедрою технології консервування

ОНАХТ 18.04.12
Розробка технології



v017446

кандидат хімічних наук, доцент
Юкало Володимир Глібович,
Тернопільський державний технічний університет ім. Івана Пулюя
Міністерства освіти і науки України,
завідуючий кафедрою харчової біотехнології і хімії

Провідна установа: Технологічний інститут молока та м'яса Української академії аграрних наук, відділ біотехнології, м. Київ

Захист відбудеться 14 березня 2002 р. о 11 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 41.088.02 Одеської державної академії харчових технологій (65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеської державної академії харчових технологій (Україна, 65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112).

12
Віннікова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Підтримка природного мікробіоценозу кишечника є однією із умов функціонування організму в цілому. З великим успіхом для даних цілей можуть бути використані кисломолочні продукти, які містять молочнокислі бактерії, що пригнічують ріст гнильної та патогенної мікробіоти, і живильні компоненти в легко засвоюваній формі. Якість цих продуктів значною мірою залежить від якості застосовуваних заквасок.

В даний час мікробіологічна служба, що діє на заводах, не завжди може забезпечити стабільність заквасок. Це відбувається тому, що закваска в процесі пересівів втрачає свої якості з ряду причин: наявність бактеріофага, забруднення сторонньою мікробіотою, випадання того чи іншого штаму зі складу композиції.

В сучасних умовах найбільш широке використання одержують концентровані закваски. Їх застосування виключає необхідність приготування материнської і виробничої заквасок, що суттєво зменшує вірогідність вторинної контамінації та матеріальні витрати на виробництво молочної продукції і збільшує можливості випуску кисломолочних продуктів гарантованої якості. Крім цього, концентрати в малих кількостях можуть замінити великі обсяги лікувально-дієтичних продуктів з одночасним збільшенням їх терапевтичного ефекту.

Таким чином, проблема одержання концентратів молочнокислих бактерій з високим титром клітин, стійких при збереженні в доступних умовах, є важливою ланкою в стабілізації та поліпшенні якості кисломолочних продуктів, у підвищенні їхнього лікувально-дієтичного призначення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась в рамках науково-дослідних робіт кафедри мікробіології та вірусології Одеського національного університету ім. І.І.Мечникова (проект № 140 "Вивчення взаємовідносин мікроорганізмів з поліюантами і їх адгезивної мінливості в природних і штучних умовах", № держреєстрації 0100V001493 та проект "Вивчення таксономічного складу представників мікробних ценозів людини", № реєстрації ОНУ 189).

Мета і задачі досліджень. Метою дисертаційної роботи був пошук перспективного штаму серед лактобактерій, поширених у некомерційних ферментованих продуктах, виготовлених в Одеській області, та створення на його основі технології сухого бактеріального концентрату для застосування у виробництві кисломолочного продукту лікувально-профілактичної дії.

Для досягнення поставленої мети вирішувались наступні задачі:

- провести виділення штамів бактерій роду *Lactobacillus* із некомерційних кисломолочних продуктів, виготовлених в Одеській області, їх ідентифікацію та створити колекцію культур молочнокислих бактерій;

№ 17446

ОДАХТ

- провести дослідження комплексу фізіолого-біохімічних і технологічних ознак виділених штамів лактобацил та здійснити відбір перспективного штаму для виробництва закваски;
- розробити живильне середовище, яке забезпечує максимальне накопичення біомаси клітин лактобацил та опрацювати умови культивування, що сприяють підвищенню урожайності біомаси;
- визначити робочі режими експлуатації ультрафільтраційної мембрани для концентрування бактеріальної маси;
- розробити спосіб висушування бактеріального концентрату в киплячому шарі інертного матеріалу;
- розробити технологічну схему одержання сухого концентрату молочнокислих бактерій;
- провести промислову апробацію та визначити економічну ефективність розробленої технології сухого бактеріального концентрату;
- визначити ефективність застосування сухого бактеріального концентрату у профілактиці та лікуванні дисбактеріозів.

Об'єктами досліджень були штами бактерій роду *Lactobacillus*, ізольовані із некомерційних ферментованих продуктів.

Предмети досліджень – біологічні та фізико-хімічні властивості штамів лактобактерій з точки зору можливості їх застосування для приготування бактеріального концентрату.

Методами досліджень властивостей штамів були традиційні та модифіковані мікробіологічні, технологічні, біохімічні, математичні та статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше визначено видовий склад бактерій роду *Lactobacillus*, представлених в некомерційних кисломолочних продуктах Одеської області. На основі вивчення комплексу біологічних властивостей штамів лактобацил, ізольованих із природних і виробничих субстратів, був відібраний штам *Lactobacillus acidophilus* OL4, який являється найбільш перспективним для застосування в харчових технологіях при виробництві закваски. Оптимізовано склад живильного середовища для культивування штаму *L. acidophilus* OL4 з максимальним накопиченням біомаси, і захисного середовища для висушування бактеріального концентрату. Показано, що застосування процесу ультрафільтрації для концентрування бактеріальної маси дозволяє одержати суспензію клітин високої якості та активності. Встановлено, що висушування бактеріального концентрату в киплячому шарі інертного матеріалу забезпечує високу ступінь виживання бактерій та тривале зберігання бактеріального препарату.

Практичне значення одержаних результатів. За результатами дисертаційної роботи створена колекція бактерій роду *Lactobacillus*, розповсюджених в Одеському регіоні. Розроблена промислова технологія виробництва концентрованих сухих бактеріальних заквасок, яка була

апробована на Одеському підприємстві по виробництву бактерійних та вірусних препаратів. Отримані дані увійшли в основу розроблених проектів нормативно-технічної документації на виробництво сухого бактеріального концентрату ацидофільної палички. Запропонована технологія сухої закваски дозволяє знизити енергоємність процесу в 2 рази. Річний економічний ефект склав 295,97 тис. грн при річному обсязі продукції 100 тон. Результати медико-біологічних досліджень *in vivo* дозволили рекомендувати сухий бактеріальний концентрат для профілактики та лікування дисбактеріозів.

Особистий внесок здобувача полягає в забезпеченні методичного оформлення роботи, у виконанні основних аналітичних та експериментальних досліджень, аналізі й узагальненні отриманих даних, формуванні висновків і рекомендацій, підготованні матеріалів досліджень і публікацій, розробці нормативно-технічної документації, промислової апробації розробленої технології. Особистий внесок здобувача підтверджений представленими документами та науковими публікаціями.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були обговорені та схвалені на засіданнях кафедри мікробіології та вірусології Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова, на Першій Балканській мікробіологічній конференції (Пловдив, листопад, 1999), на наукових конференціях професорсько-викладацького складу Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова (1999-2001), на науковій конференції професорсько-викладацького складу Одеської державної академії харчових технологій (2000), на засіданні Одеської філії Українського мікробіологічного товариства (2001), на міжнародній науковій конференції "Екологія та біогеохімічна діяльність мікроорганізмів" (Одеса, вересень, 2001).

Публікації. Різні аспекти досліджуваної проблеми відображено в дев'яти публікаціях (із них 8 статей у збірниках наукових праць і 1 - в тезах доповідей).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із вступу, чотирьох розділів, висновків, списку літератури та додатків. Зміст роботи викладено на 203 сторінках машинописного тексту, включаючи 38 таблиць (16 сторінок), 22 ілюстрації (8 сторінок), 6 додатків (24 сторінки). Бібліографічний список містить 181 літературне джерело, в тому числі 67 – іноземних авторів.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обгрунтовано актуальність та доцільність дисертаційної роботи, визначено мету, предмет та основні задачі дослідження, показано наукову новизну та практичне застосування одержаних результатів, наведено відомості про особистий внесок здобувача, апробацію, структуру та обсяг роботи.

У першому розділі, що являє собою аналітичний огляд літератури, наведений огляд літературних та патентних джерел з впливу кисломолочних продуктів та пробіотичних препаратів, створених на основі лактобактерій, на мікробіоту кишкового тракту людини, детально розглянуто сучасні уявлення про лікувально-профілактичні властивості лактобактерій, їх таксономічне положення та біологічні ознаки, а також мікробіологічні та технологічні підходи до виробництва заквасок на основі бактерій роду *Lactobacillus*. Обґрунтовано актуальність досліджень із створення сухих бактеріальних концентратів для одержання кисломолочних продуктів функціонального харчування.

У другому розділі представлено схему проведення досліджень (рис.1), викладено відомості про об'єкти, обладнання та методи досліджень.



Рис. 1. Схема проведення досліджень.

Об'єктами досліджень були 40 штамів бактерій роду *Lactobacillus*, ізольованих із сирого молока, некомерційних кисломолочних продуктів та квашених овочів, виготовлених в Одеській області. Штамами порівняння служили 20 штамів лактобактерій, що використовуються в харчових технологіях та 6 типових та колекційних штамів із колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології та вірусології ОНУ та кафедри мікробіології Чорноморського технічного університету (Трабзон, Туреччина).

Основну частину досліджень проведено на кафедрі мікробіології та вірусології ОНУ, окремі дослідження було виконано на кафедрі біохімії та мікробіології ОДАХТ, кафедрі технології молока та сушіння харчових продуктів ОДАХТ, а також на Центральній санітарно-епідеміологічній станції водного транспорту України.

Виділення штамів бактерій роду *Lactobacillus* із природних джерел здійснювали шляхом первинного посіву в середовище накопичення (знежирене молоко) з подальшим висівом на елективне середовище МРС.

Видова ідентифікація лактобактерій здійснена за Визначником Бергі (1984) та підтверджена за допомогою мікробіологічного аналізатора "Auto-SCAN-4" фірми "Baxter Dade".

Антагоністичну активність вивчали в дослідах *in vitro*, використовуючи модифікований лунково-дифузійний метод (Tagg et al., 1976), та в експерименті *in vivo* на щурах.

Чутливість до антимікробних препаратів вивчали диско-дифузійним методом (Єгоров, 1986).

Вивчення адгезивної активності проводили з використанням клітин букального епітелію здорових людей (Гладка, Мотика, 1990).

Якість отриманого сухого продукту оцінювали за його розчинністю, активністю зсідання молока і мікробіологічними характеристиками згідно методичних рекомендацій.

Статистичну обробку даних виконано за програмою STATISTICA ©5.XX for Windows (StatSoftInc., USA).

В третьому розділі наведено результати власних експериментальних досліджень чисельності та видового складу бактерій роду *Lactobacillus*, представлених в некомерційних ферментованих продуктах Одеської області. Найбільш придатним для виділення лактобацил із природних субстратів було середовище, запропоноване Є.І.Квасніковим, до складу якого входили дріжджовий екстракт (1%), капустяний відвар (10%), пептон (1%), глюкоза (2%) та етиловий спирт (8-16%), додавання якого значно підвищувало кількість лактобактерій та викликало повне пригнічення росту мікроорганізмів родів *Leuconostoc*, *Pediococcus* та *Streptococcus*.

Встановлено, що найбільша чисельність лактобактерій виявлена в пробах кислого молока ($3,5 \times 10^7$ КУО/см³) та квашених овочів ($1,4-3,8 \times 10^6$ КУО/см³), де вони здійснювали провідну роль в процесі ферментації. В сирі чисельність лактобацил становила $6,0 \times 10^3$ КУО/см³, в

сметані - $2,0 \times 10^3$ КУО/см³, в сирому молоці - $1,2 \times 10^3$ КУО/см³. Розвиток бактерій роду *Lactobacillus* в цих продуктах обумовлює їх надлишкову кислотність.

В подальшому проведено виділення чистих культур лактобактерій із досліджуваних продуктів. Всього було отримано 40 штамів бактерій роду *Lactobacillus*, які відносились до 6 видів. Показано, що максимальним числом штамів представлений вид *L. acidophilus* (частка його становить 30 %). Частка штамів виду *L. casei subsp. rhamnosus* в досліджуваних продуктах складала 20,0 %, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* – 15,0 %, *L. plantarum* – 10,0 %, *L. brevis* – 7,5 %, *L. fermentum* – 7,5 %, *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* – 5,0 % и *L. casei subsp. tolerans* – 5,0 %.

Проведено вивчення біологічних особливостей ізолюваних штамів лактобацил. У комплекс скрінінгових досліджень по відбору перспективного штаму лактобацил для виробництва закваски в певній послідовності були включені такі критерії: антагоністична активність по відношенню до умовно-патогенних мікроорганізмів, адгезивні властивості, низька чутливість до впливу антибіотичних препаратів, поведження в модельних умовах шлунково-кишкового тракту, показники кислотоутворення та органолептичні властивості.

При вивченні антагоністичних властивостей лактобактерій було встановлено, що ізолювані штами виявляли антагоністичну активність по відношенню до збудників кишкових та уrogenітальних інфекцій на рівні, а в деяких випадках вище, ніж промислові та колекційні штами лактобацил. Достовірно ($p \leq 0,05$) відзначено, що найбільш виражена антагоністична активність була виявлена для гомоферментативних бактерій виду *L. acidophilus*. Частка антагоністів серед інших видів лактобацил, була меншою і складала для *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 81,8 %, *L. fermentum* – 80,0, *L. casei subsp. rhamnosus* - 72,7, *L. plantarum* – 75,0. Ступінь виявленої антагоністичної дії серед штамів одного й того же виду залежала не тільки від біологічних властивостей лактобактерій, але й виду індикаторного штаму. Велику кількість лактобактерій високого ступеня активності спостерігали в експерименті з індикаторними мікроорганізмами *S. aureus* ATCC 25923 і *P. aeruginosa* ATCC 19145, відповідно 68,3 % и 65,0 %.

При цьому для більшості штамів лактобацил спостерігали достовірно ($p \leq 0,05$) зменшення зон затримки росту індикаторних мікроорганізмів при нейтралізації рН культуральної рідини карбонатом кальцію. Цей факт свідчить про те, що антагоністична активність лактобацил по відношенню до патогенів у більшості випадків обумовлена дією органічних кислот.

Встановлено, що основними субстратами, в яких переважно виявлені штами лактобактерій з яскраво вираженими антагоністичними ознаками, були кисле молоко та квашені овочі.

Визначення чутливості штамів лактобацил, виділених із природних і виробничих субстратів, до 16 антибіотичних препаратів 11 груп сполук, які характеризуються різними механізмами дії на мікробну клітину, показало, що на досліджувані штами лактобактерій

найбільшою мірою впливали антибіотики, що інгібують синтез білка, макроліди та тетрацикліни, а також антибіотики групи рифаміцинів, що пригнічують транскрипцію і реплікацію нуклеїнових кислот. Частка штамів, стійких до макролідів, склала 6,6 %, до тетрациклінів – 11,6 %, до рифаміцинів – 10,0 %. Інші антибіотичні препарати не виявили бактерицидної дії до більшості досліджуваних штамів лактобацил, що дає можливість при лікуванні та профілактиці дисбактеріозів кишечника застосовувати антибіотикотерапію в сукупності з препаратами і продуктами, що містять живі культури лактобацил.

З огляду на те, що штам, який входить до складу закваски для готування кисломолочного продукту лікувально-профілактичного напрямку, повинен володіти вираженими властивостями адгезивності, але при цьому не конкурувати за місця адгезії з індигенними лактобацилами, пошук перспективного штаму проводили серед лактобацил, що виявляють адгезивність на рівні середнього ступеня активності. Серед вивчених лактобактерій середнім рівнем адгезивної активності характеризувались 45,0 % штамів. Середній показник адгезії бактерій роду *Lactobacillus* склав для *L.casei* subsp. *rhannosus* – $4,0 \pm 1,3$; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* – $3,4 \pm 0,6$; *L. acidophilus* – $3,2 \pm 1,3$; *L. fermentum* – $2,6 \pm 1,2$; *L. plantarum* – $2,6 \pm 0,1$.

Виходячи із одержаних результатів, вважали за доцільне подальші дослідження проводити з чотирма штамми лактобактерій – *L. casei* subsp. *rhannosus* OL1, *L. acidophilus* OL4, *L. acidophilus* OL7, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OL32, які характеризувались найбільшою антагоністичною активністю по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, середнім ступенем адгезивності та високою антибіотикорезистентністю.

Модельюючи поведінку лактобацил в організмі людини, вважали за необхідне дослідити вплив кислотності середовища, секреторних рідин (жовчі та шлункового соку) і деяких хімічних сполук (хлориду натрію і фенолу) на життєздатність відібраних штамів лактобактерій. Експериментально було встановлено, що штам *L. acidophilus* OL4 при рості на середовищах з 40 % жовчі, 6 % шлункового соку, 0,5 % фенолу і 6 % хлориду натрію, а також в умовах різної кислотності середовища (рН 2,0 та 8,5) показав високу стійкість, а, отже, можливість більш пролонгованої дії в організмі.

Проведені дослідження динаміки росту лактобактерій в залежності від часу ферментації не виявили достовірних розходжень в прирості біомаси штамми лактобацил при культивуванні на живильних середовищах різного походження. Однак, найбільш дешевим і достатньо ефективним середовищем для нарощування біомаси лактобактерій виявилась просвітлена сироватка кисломолочного сиру, розведена водою, з додаванням стимуляторів росту і буферних солей.

Ріст культур на сироватковому середовищі продемонстрував, що lag-фаза у *L.acidophilus* OL4 значно коротша, ніж у *L. casei* subsp. *rhannosus* OL1, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OL32 і

L.acidophilus OL7, і складає 0...4 год. В промислових умовах скорочення часу технологічного процесу є економічно виправданим, тому для створення закваски нами обрано штам *L.acidophilus* OL4, який найбільш ефективно веде процес ферментації.

Розвиток *L.acidophilus* OL4 на знежиреному молоці характеризувався високими показниками кислотоутворення: швидкість накопичення кислот складала $12,6 \pm 1,4$ °Т/ч, кислотність молока після 48 годин росту популяції досягала значення $390,5 \pm 1,5$ °Т, активність згортання молока $3,8 \pm 0,5$ год., а органолептичні властивості згустків дозволяють рекомендувати цей штам для виробництва.

Таким чином, в результаті послідовного відбору і зіставлення біологічних особливостей штамів лактобацил, які вже застосовуються у промисловості, з ізольованими нами штамми із природних джерел, було встановлено, що штам *L.acidophilus* OL4 має ряд переваг і може бути рекомендований для використання як стартова культура для приготування кисломолочного продукту лікувально-профілактичного призначення (табл. 1).

Таблиця 1

Біологічні властивості досліджуваних штамів лактобактерій

Властивості	<i>L.acidophilus</i> OL4	<i>L. acidophilus</i> 317/402	<i>L. johnsonii</i> Lal	<i>L.</i> plantarum 8P-A3	<i>L. delbrueckii</i> subsp. bulgaricus N2
	Кисле молоко	Кисломолоч- ний продукт «Наріне»	Пробіотичний йогурт «Nestle- Mis-Lc1»	«Лактобак- терін» сухий	Йогурт «Фармасайнс Инк», Канада
Активність згор- тання молока, год	$3,8 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,5$	$4,3 \pm 0,6$	$5,5 \pm 0,3$
Межа кислото- утворення, °Т	$390,5 \pm 1,5$	$396,2 \pm 3,4$	$398,5 \pm 4,3$	$340,6 \pm 4,4$	$286,4 \pm 2,8$
Швидкість кислотоутворення °Т/час	$12,6 \pm 1,4$	$9,6 \pm 1,2$	$8,7 \pm 1,8$	$7,2 \pm 1,6$	$11,4 \pm 1,2$
Антагоністична активність, мм <i>Escherichia coli</i>	$32,3 \pm 0,4$	$30,2 \pm 1,1$	$20,5 \pm 0,5$	$26,4 \pm 0,3$	$19,8 \pm 0,4$
<i>P. aeruginosa</i>	$32,5 \pm 0,2$	$26,5 \pm 0,5$	$19,0 \pm 0,0$	$31,2 \pm 0,0$	$23,1 \pm 0,4$
<i>S. aureus</i>	$24,1 \pm 0,2$	$23,0 \pm 0,0$	$18,3 \pm 0,5$	$19,3 \pm 0,1$	$15,4 \pm 0,7$
<i>H. pylori</i>	$18,0 \pm 0,0$	$16,5 \pm 0,6$	$14,2 \pm 0,4$	$9,2 \pm 0,5$	$11,2 \pm 0,1$
Середній показ- ник адгезії	$2,8 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,2$
Адгезивна активність	середня	середня	середня	низька	низька
Антибіотикоре- зистентність, %	68,7	56,2	56,2	43,7	37,5

В четвертому розділі наведено технологічну та процесно-апаратурну схеми виробництва сухого бактеріального концентрату ацидофільної палички, описання технологічних процесів його отримання, дані про фізико-хімічні, мікробіологічні та антагоністичні властивості

сухого продукту, а також результати медико-біологічних досліджень *in vivo* для визначення ефективності застосування сухого бактеріального концентрату у профілактиці та лікуванні дисбактеріозів на моделі щурів.

З урахуванням експериментальних даних розроблено технологічну схему процесу отримання сухого бактеріального концентрату *L. acidophilus* OL4, яка передбачала підготовку інокуляту та живильного середовища; накопичення бактеріальної маси; відокремлення біомаси від культурального середовища методом ультрафільтраційного концентрування; змішування отриманої суспензії із стерильним захисним середовищем; сушіння та пакування сухого продукту. На рис. 2 наведена комплексна апаратурно-технічна схема отримання сухого бактеріального концентрату, що включає вищеперелічені стадії.

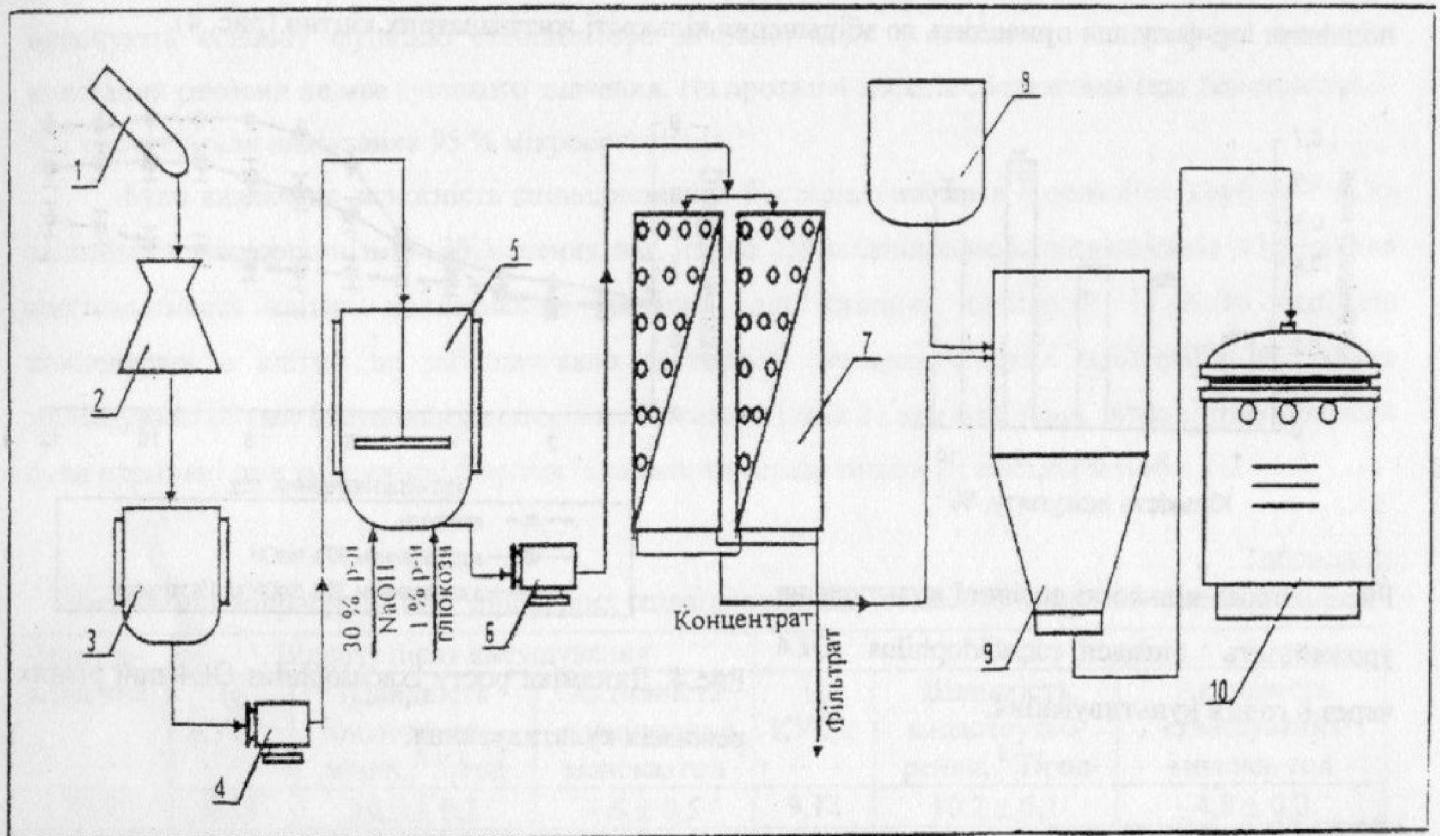


Рис. 2. Процесно-апаратурна схема отримання сухого бактеріального концентрату *L. acidophilus* OL4: 1 – пробірка з культурою-продуцентом; 2 – колба із стерильним знежиреним молоком; 3 – маточник; 4,6 – насоси; 5 – ферментер; 7 - ультрафільтраційна установка; 8 – ємність із захисним середовищем; 9 – сушильна установка; 10 – фасувальний апарат.

Методом математичного планування експерименту проведено оптимізацію складу живильного середовища для штаму *L. acidophilus* OL4 (%): просвітлена сирна сироватка - 20,0, гідролізоване молоко - 15,0, натрій оцтовокислий - 2,0, кукурудзяний екстракт- 1,5, марганець сірчаноокислий - 0,02. Концентрацію цих складових було закладено як вихідні параметри при оптимізації живильного середовища.

сірчаноокислий – 0,02. Концентрацію цих складових було закладено як вихідні параметри при оптимізації живильного середовища.

Встановлено, що збільшення посівної дози підвищує вихід біомаси. Оптимальною виявилася доза, що дорівнює 5 % від обсягу живильного середовища (рис.3). Подальше збільшення кількості інокуляту є недоцільним, оскільки вихід біомаси не зростає.

Визначено, що періодична (тричі, кожні 2 години) нейтралізація культуральної рідини 30 %-ним розчином NaOH для підтримки рН на рівні 5,7-6,0 дозволяє збільшити титр клітин лактобацил в процесі культивування (рис.4).

Вивчення закономірностей росту лактобактерій показало, що внесення 1 % глюкози в середовище в момент зниження експоненціального росту (одночасно з останнім розкисленням) подовжує log-фазу, що приводить до збільшення кількості життєздатних клітин (рис. 4).

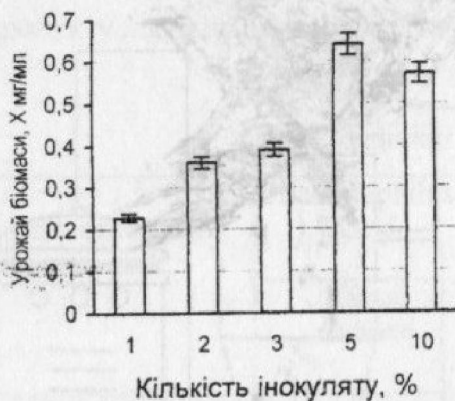


Рис.3. Вплив кількості засівної культури на урожайність біомаси *L.acidophilus* OL4 через 8 годин культивування.

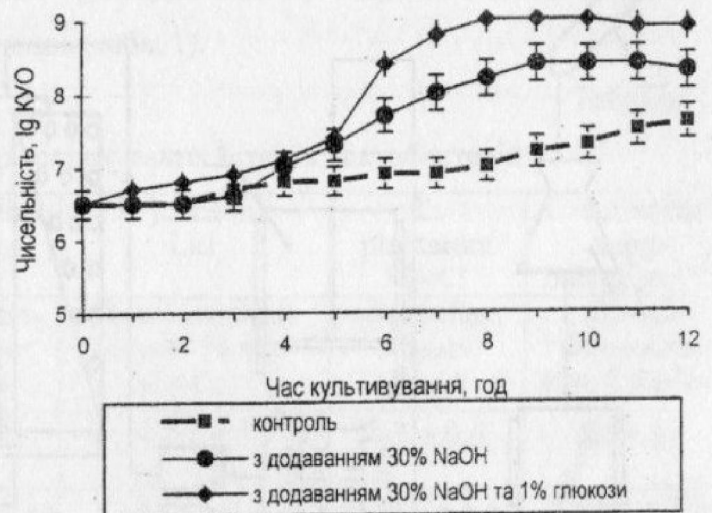


Рис.4. Динаміка росту *L.acidophilus* OL4 при різних режимах культивування.

Концентрування бактеріальної маси ацидофільної палички здійснювали наприкінці логарифмічної фази росту в сироватковому середовищі, коли в 1 мл культуральної рідини містилось 10^7 життєздатних клітин. Проведені дослідження показали, що оптимальними режимами експлуатації напівпроникної мембрани при ультрафільтраційному концентруванні бактеріальної маси клітин *L. acidophilus* OL4 є тиск фільтрації 0,35...0,50 МПа, температура фільтрації 40 °С та швидкість потоку культуральної рідини – не більше 2,0 м/с. Аналіз експериментальних даних показав, що при збільшенні даних параметрів проникливість мембрани знижується.

Отриманий бактеріальний концентрат являв собою однорідну, щільну з тягучою консистенцією рідину та мав такі характеристики: вміст сухих речовин – 20 ± 3 %, активність згортання молока при внесенні 1 г концентрату на 1 л при температурі 40 °С – 3,8-4,5 год..

КУО. Стороння молочнокисла та патогенна мікробіота відсутня. Вихід бактеріальної маси із культуральної рідини складає 1,8-2,2 %.

В процесі сушіння бактеріального концентрату на установці киплячого шару на інертних носіях найкраще сполучення збереження життєздатності клітин, найкращої розчинності та оптимального вмісту сухих речовин в продукті спостерігали при температурі сушильного агенту 76 °С. Вихід із 1 л живильного середовища склав $7,5 \pm 0,5$ г сухого препарату.

Як захисні досліджували комбіновані середовища, до складу яких вводили різні компоненти: знежирене молоко, сироватку, гліцерин, сахарозу, желатин, натрій оцтовокислий, аскорбінову кислоту, глутамат натрію, апілак. В ході досліджень встановлено, що найбільшою мірою забезпечує захисний ефект середовище, що містить сахарозу (10 %), желатин (1 %), натрій оцтовокислий (1%). Очевидно, це пов'язано з тим, що моноцукри і білки в захисних середовищах виконують основну функцію стабілізатора зв'язаної води у клітинах, і додаткове введення колоїдних речовин не має суттєвого значення. На протязі 4 місяців збереження при температурі 3-5°С спостерігали виживання 95 % мікроорганізмів.

Було визначено залежність співвідношення бактеріальної маси і захисного середовища на виживання мікроорганізмів. Збільшення від 1:1 до 1:8 співвідношень підвищувало збереження життєздатності клітин ацидофільної палички, але сушіння суспензій з надто низькою концентрацією клітин не забезпечувало достатньої активності сухих препаратів та значно збільшувало об'єми висушеного матеріалу. Показано (табл.2), що найбільш активні сухі закваски були отримані при змішуванні біомаси із захисним середовищем у співвідношеннях 1:2 і 1:3.

Таблиця 2

Вживання мікроорганізмів при різних співвідношеннях біомаси із захисним середовищем

Співвідношення	Відразу після висушування			Через 30 діб		
	Ig КУО/г	Швидкість кислотоутворення, °Т/год	Активність сквашування молока, год	Ig КУО/г	Швидкість кислотоутворення, °Т/год	Активність сквашування молока, год
1 : 1	9,16	$10,5 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,5$	9,12	$10,2 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,2$
1 : 2	9,24	$12,6 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,6$	9,04	$12,4 \pm 0,6$	$5,3 \pm 1,4$
1 : 3	9,27	$12,2 \pm 0,6$	$4,9 \pm 0,5$	9,02	$12,1 \pm 0,6$	$5,2 \pm 0,5$
1 : 4	9,30	$11,4 \pm 1,2$	$5,5 \pm 0,3$	9,14	$10,5 \pm 1,8$	$5,8 \pm 1,1$
1 : 5	9,34	$8,4 \pm 1,1$	$6,7 \pm 0,5$	8,95	$7,2 \pm 0,6$	$7,8 \pm 1,6$
1 : 6	9,46	$7,2 \pm 1,8$	$7,5 \pm 0,6$	9,22	$6,6 \pm 1,4$	$8,5 \pm 0,5$
1 : 7	9,41	$6,3 \pm 0,6$	$7,4 \pm 0,3$	9,28	$6,2 \pm 0,1$	$8,0 \pm 1,5$
1 : 8	9,28	$6,9 \pm 1,2$	$7,8 \pm 0,6$	9,20	$6,3 \pm 1,8$	$8,6 \pm 0,4$

Одержаний сухий препарат являв собою дрібнодисперсний порошок і мав такі характеристики: загальна чисельність лактобактерій в 1 г становила $(2,0 \pm 0,2) \times 10^9$ КУО. вміст води - 3,0 %, індекс розчинності - $0,5 \pm 0,2$ мл сирого осаду, швидкість кислотоутворення - $12,6 \pm 1,4$ °Т/год, тривалість утворення згустку при внесенні 1 г концентрату на 1 л молока - 4,5-5,5 год, кислотність згустку - 100 ± 4 °Т.

Збереження антагоністичних властивостей мікробіоти закваски після висушування є найважливішою ознакою якості сухого препарату. Лабораторними дослідженнями *in vitro* встановлено, що сухий препарат *L.acidophilus* OL4 інгібує розвиток патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів (табл. 3).

Таблиця 3

Антагоністична активність штаму *L.acidophilus* OL4, що входить до складу закваски

Індикаторний мікроорганізм	Зона затримки росту індикаторних штамів, мм		Збереження антагоністичних ознак після сушіння, %
	Рідка закваска	Суха закваска	
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,1 \pm 0,2	16,2 \pm 0,1	90,0
<i>Escherichia coli</i>	16,3 \pm 0,4	15,8 \pm 0,2	96,9
<i>Proteus mirabilis</i>	6,2 \pm 0,5	5,5 \pm 0,4	89,6
<i>Serratia marcescens</i>	12,2 \pm 0,2	11,2 \pm 0,5	91,8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10,1 \pm 0,5	9,5 \pm 0,4	94,0
<i>Enterobacter cloaceae</i>	10,0 \pm 0,0	9,4 \pm 0,7	94,0
<i>Helicobacter pylori</i>	7,0 \pm 0,0	7,0 \pm 0,0	100,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26,5 \pm 0,2	20,1 \pm 0,8	75,1

В експерименті *in vivo* на щурах доведено, що отриманий сухий бактеріальний концентрат *L.acidophilus* OL4 здатний досить швидко коректувати порушення нормобіоти кишечника, викликані антибіотикотерапією, знижуючи кількісний вміст умовно-патогенних представників кишкової мікробіоти і одночасно збільшуючи чисельність лактобактерій. При цьому не було виявлено несприятливої дії сухого продукту на організм експериментальних тварин. Отримані результати дозволяють зробити попередній висновок про можливість самостійного застосування сухої концентрованої закваски штаму *L.acidophilus* OL4 як лікувально-профілактичного засобу для корекції дисбіотичних порушень шлунково-кишкового тракту. На моделі щурів показано, що штам *L.acidophilus* OL4, який входить до складу концентрованої закваски, може бути ефективно використаний для колонізації вагінальної екосистеми, де він підтримує стабільну популяцію лактобацил та суттєво знижує кількість умовно-патогенних мікроорганізмів екзогенного походження.

Апробацію сухого бактеріального концентрату було проведено у виробництві кисломолочного продукту функціонального харчування. Рекомендованою до застосування дозою визначено 0,3 % від обсягу молочної основи.

ВИСНОВКИ

1. Визначено видовий склад бактерій роду *Lactobacillus*, представлених в некомерційних кисломолочних продуктах, сирому молоці і квашених овочах, виготовлених в Одеській області. На підставі вивчених біологічних ознак ізольовані штами лактобактерій віднесені до 6 видів: *L. acidophilus* (30 %), *L. casei* subsp *rhaunus* (20 %), *L. casei* subsp. *tolerans* (5 %), *L.*

- області. На підставі вивчених біологічних ознак ізольовані штами лактобактерій віднесені до 6 видів: *L. acidophilus* (30 %), *L. casei* subsp. *rhamnosus* (20 %), *L. casei* subsp. *tolerans* (5 %), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (15 %), *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (5 %), *L. plantarum* (10 %), *L. brevis* (7,5 %), *L. fermentum* (7,5 %).
- Показано, що штам *Lactobacillus acidophilus* OL4 характеризується найбільшим ступенем антагоністичної активності та середньою адгезивністю. Даний штам виявляє найкращі показники кислотоутворення: максимум накопичення кислот в молоці становить $390,5 \pm 1,5$ °Т, активність згортання молока - $3,8 \pm 0,5$ год. *L. acidophilus* OL4 має низьку чутливість до впливу антибіотиків груп пеніцилінів, цефалоспоринів, хінолонів, аміноглікозидів, левоміцетинів, поліміксинів і сульфаніламідів. При рості на середовищі МРС с додаванням 40 % жовчі, 6 % шлункового соку, 0,5 % фенолу і 6 % хлориду натрію, а також в умовах різної кислотності (рН 2,0; 3,0; 8,5) він виявляє високу стабільність і антагоністичні властивості по відношенню до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. *L. acidophilus* OL4 є найбільш перспективним для виробництва закваски серед усіх досліджених штамів.
 - Методом математичного моделювання оптимізовано склад живильного середовища для культивування штаму *L. acidophilus* OL4 (%): просвітлена сирна сироватка - 20,0, гідролізоване молоко - 15,0, натрій оцтовокислий - 2,0, кукурудзяний екстракт - 1,5, марганець сірчаноокислий - 0,02, рН 6,2; кількість засівної культури - 5 %, і експериментально встановлені технологічні режими культивування з підтримкою енергетичних ресурсів середовища в процесі росту популяції, що забезпечують високий врожай клітин лактобактерій.
 - Оптимізовано режими експлуатації мембрани УПЛ-0,6 при ультрафільтраційному концентруванні бактеріальної маси клітин *L. acidophilus* OL4: тиск фільтрації - 0,35-0,50 МПа, температура фільтрації - 40°С, швидкість потоку рідини - 2,0 м/с.
 - Встановлено, що в процесі висушування концентрату лактобактерій в киплячому шарі інертного матеріалу, оптимальною для збереження життєздатності клітин є температура 76°С, при цьому залишкова вологість сухого продукту становить 3,0 %, індекс його розчинності - $0,5 \pm 0,2$ мл сирого осаду, загальна чисельність мікроорганізмів, КУО/г - $1-2 \times 10^9$. Розроблено захисне середовище для збереження життєздатної біомаси лактобактерій (%): сахароза - 10, желатин - 1, оцтовокислий натрій - 1, яке забезпечувало максимальне виживання бактерій, і показано, що сухі препарати мають гарантований термін придатності до використання: при температурі зберігання від 3 до 5°С - 4 місяці.
 - Розроблено технологію одержання сухого бактеріального концентрату *L. acidophilus* OL4 і розроблено проекти нормативно-технічної документації на його отримання.

8. Досліджено функціонування сухого бактеріального концентрату у виробництві кисломолочного продукту при прямому внесенні у молоко. До застосування рекомендовано дозу препарату у кількості 0,3 %. Вироблений продукт відповідає мікробіологічним і органолептичним вимогам.
9. Проведено промислову апробацію розробленої технології на Одеському підприємстві по виробництву бактерійних і вірусних препаратів. Розрахована собівартість отриманого продукту складає 377,83 грн/кг у цінах 2001 р. Використання розробленої технології дозволяє отримати річний економічний ефект 295,97 тис. грн при річному обсязі продукції 100 тон.

Основний зміст роботи викладено в наступних публікаціях:

1. Ямборко Г.В., Пауліна Я.Б. Біологічна характеристика штамів лактобацил, перспективних для виробництва біопрепарату // Наукові праці ОДАХТ. – Одеса: ОДАХТ, 2001. – Вип. 22. – С. 113-117.
2. Ямборко А.В. Микробиологические и технологические подходы к производству бактеріального концентрата молочнокислых бактерий // Холодильна техніка і технологія. – Одеса: ОДАХ, 2001. – Т. 71, № 2. – С. 52-54.
3. Ямборко Г.В. Приготування сухого бактеріального концентрату для виробництва кисломолочного продукту // Обладнання та технології харчових виробництв. – Донецьк: ДонДУЕТ, 2001. – Вип. 6. – С. 89-94.
4. Швець Г.В., Донцова Т.А., Іваниця В.О. Антагоністичні властивості бактерій роду *Lactobacillus*, виділених від породіль та немовлят, у поєднанні з їх антибіотикорезистентністю // Вісник Одеського державного університету. – Одеса: ОДУ, 1999. – Т. 4, Вип. 3. – С. 99-103.
5. Dontsova T.A., Shvets A.V., Ivanitsa V.A., Kilic A.O. Colonization of the rat vagina by lactobacilli // Вісник Одеського державного університету. – Одеса: ОДУ, 1999. – Т. 4, Вип. 3. – С. 104-107.
6. Shvets A.V., Dontsova T.A., Ivanitsa V.A., Kilic A.O. Antimicrobial substance from a dairy *Lactobacillus* strain // Вісник Одеського державного університету. – Одеса: ОДУ, 1999. – Т. 4, Вип. 3. – С. 108-113.
7. Донцова Т.А., Швець Г.В., Іваниця В.О. Антагоністичні властивості бактерій роду *Lactobacillus* // Вісник Одеського державного університету. – Одеса: ОДУ, 2000. – Т. 5, Вип. 1. – С. 235-240.
8. Донцова Т.А., Ямборко Г.В., Іваниця В.О. Вплив антибіотиків на адгезію бактерій роду *Lactobacillus* // Вісник Одеського національного університету. – Одеса: ОНУ, 2001. – Т. 6, Вип. 1. – С. 146-150.

9. Shvets A.V., Dontsova T.A., Ivanitsa V.A., Kilic A.O. In vitro antimicrobial activity of *Lactobacillus johnsonii* La1 strain against common pathogens // First Balcan conference of microbiology. – Plovdiv (Bulgaria). – 1999. – P. 92.

АНОТАЦІЯ

Ямборко Г.В. Розробка технології отримання сухого концентрату молочнокислих бактерій. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Одеська державна академія харчових технологій, Одеса, 2002.

Робота присвячена вивченню лактобактерій, ізольованих із сирого молока, некомерційних кисломолочних продуктів і квашених овочів, виготовлених в Одеській області і розробці технології отримання сухої концентрованої закваски на основі лактобактерій із стабільними властивостями і високим титром клітин, стійкої при збереженні в доступних умовах, призначеної для виробництва кисломолочних продуктів лікувально-профілактичного призначення.

У результаті скрінінгу 40 штамів лактобактерій був відібраний штам *L. acidophilus* OL4, перспективний для виробництва закваски, який мав більш виражену антагоністичну активність, ніж уже відомі промислові штами, середній ступінь адгезивної активності та полірезистентність до антибіотичних препаратів, що використовуються в медичній практиці, а також зберігав життєздатність у модельних умовах шлунково-кишкового тракту.

Розроблено й оптимізовано живильне середовище, яке забезпечувало високий врожай клітин *L. acidophilus* OL4, і встановлені оптимальні технологічні режими культивування. Встановлено робочі режими експлуатації ультрафільтраційної мембрани для концентрування бактеріальної маси. Показано можливість висушування бактеріального концентрату в киплячому шарі на інертному матеріалі і розроблено захисне середовище для максимального збереження життєздатності клітин лактобактерій.

Проведено промислову апробацію розробленої технології в умовах Одеського підприємства по виробництву бактерійних і вірусних препаратів. Використання даної технології дозволяє одержати суху концентровану закваску лактобактерій високої якості та активності, і знизити енергоємність процесу одержання сухого бактеріального концентрату в 2 рази.

Показано, що сухий бактеріальний концентрат *L. acidophilus* OL4 має здатність досить швидко корегувати порушення нормобіоти кишечника експериментальних тварин, викликані антибіотикотерапією, а також колонізувати екосистему вагіни, підтримуючи стабільну популяцію лактобацил.

Ключові слова: лактобацили, живильні та захисні середовища, культивування, концентрування, сушіння, сухий бактеріальний концентрат.

ANNOTATION

Yamborko A.V. Working-out the technology of production of dry concentrate the lactic acid bacteria. - Manuscript.

This thesis is subject for the granting of a degree of candidate of technical sciences in the speciality 03.00.20 – biotechnology. – The Odessa State Academy of Food Technologies, Odessa, 2002.

The thesis is devoted to the studies of lactobacteria isolated from raw milk, noncommercial dairy products and fermented vegetables produced in the Odessa region and the technology of obtaining the dry concentrated starter on the basis of lactobacilli with constant properties and high titer of cells, steady at storage in accessible conditions and intended for manufacturing dairy products of preventive assigning.

In the result of screening biological and technical characteristics of 40 Lactobacillus strains the strain L. acidophilus OL4, perspective for manufacturing starter has been selected. It has more intensive antagonistic activity and polyresistance to antibiotic drugs used in medical practice than some other industrial Lactobacillus strains, and it saves viability in model conditions of a gastrointestinal tract.

The nutrient medium ensuring a high crop of cells L. acidophilus OL4 has been worked out and optimized and the best technological regimes of cultivation have been established. The operational modes of exploitation of an ultrafiltrational membrane for concentrating bacterial mass have been established. The capability desiccating of a bacterial concentrate in a fluidized layer on the inert stuff has been shown and the shielding medium for maximum preservation of viability of a Lactobacillus has been worked out.

The industrial testing of the developed has been conducted at the Odessa plant of the bacteria and virus drugs. The usage of given technology allows to lower energy output while obtaining a dry bacterial concentrate in 2 times.

The dry bacterial concentrate L. acidophilus OL4 has the capacity to correct normal biota of intestine of rats caused by antibiotic therapy. Also it colonizes vaginal ecosystem of rats, supporting constant population of lactobacilli.

The key words: lactobacilli, nutrient and shielding media, cultivation, concentration, desiccating, dry bacterial concentrate.

АННОТАЦИЯ

Ямборко А.В. Разработка технологии получения сухого концентрата молочнокислых бактерий. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. - Одесская государственная академия пищевых технологий, Одесса, 2002.

Работа посвящена изучению лактобактерий, изолированных из сырого молока, некоммерческих кисломолочных продуктов и квашеных овощей, и разработке технологии.

получения сухой концентрированной закваски на основе лактобактерий со стабильными свойствами и высоким титром клеток, стойкой при хранении в доступных условиях, предназначенной для производства кисломолочных продуктов лечебно-профилактического назначения.

Основными задачами работы явились: выделение штаммов рода *Lactobacillus* из природных и промышленных субстратов; видовая идентификация лактобактерий с использованием биохимических и физиологических тестов; исследование физиолого-биохимических и технологических свойств выделенных штаммов лактобацилл для осуществления отбора перспективного штамма для производства закваски.

В результате скрининга из 40 штаммов лактобактерий, изолированных из сырого молока, самоквасных кисломолочных продуктов и квашеных овощей, изготовленных в Одесском регионе, по показателям биологических и технологических характеристик, был отобран штамм *L.acidophilus* OL4, перспективный для производства закваски. Данный штамм имеет максимум накопления кислот в молоке $390,5 \pm 1,5$ °Т, сквашивает молоко за $3,8 \pm 0,5$ часа с образованием ровного, плотного сгустка с вязкой консистенцией и чистым кисломолочным вкусом. Штамм *L.acidophilus* OL4 обладает более выраженной антагонистической активностью, чем уже известные промышленные штаммы, характеризуется средней степенью адгезивной активности и полирезистентностью к антибиотическим препаратам, используемым в медицинской практике. а также сохраняет жизнеспособность в модельных условиях желудочно-кишечного тракта.

Разработана и оптимизирована питательная среда, обеспечивающая высокий урожай клеток *L.acidophilus* OL4, и установлены оптимальные технологические режимы культивирования. Установлены рабочие режимы эксплуатации ультрафильтрационной мембраны для концентрирования бактериальной массы. Показана возможность высушивания бактериального концентрата во взвешенном слое на инертном материале и разработана защитная среда для максимального сохранения жизнеспособности клеток лактобактерий.

Осуществлена промышленная апробация разработанной технологии в условиях Одесского завода бактериальных и вирусных препаратов. Сухой бактериальный концентрат *L.acidophilus* OL4 обладает способностью достаточно быстро корригировать нарушения нормобиоты кишечника, вызванные антибиотикотерапией, а также колонизировать вагинальную экосистему, поддерживая стабильную популяцию лактобацилл. При этом не было выявлено неблагоприятного действия исследуемого продукта на организм опытных животных.

Ключевые слова: лактобациллы, питательные и защитные среды, культивирование, концентрирование, высушивание, сухой бактериальный концентрат.

Лактоз

микроорганизмов

№. В. 17446

ОДАХТ
Бібліотека