



ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к предварительному патенту Кыргызской Республики

(19) **KG** (11) **74** (13) **C1**

(51)⁵ **A23C 23/00**

(21) 950121.1

(22) 10.02.1994

(46) 01.07.1995, Бюл. №3, 1996

(71) Республиканская санитарно-эпидемиологическая станция (РСЭС), (KG)

(72)(73) Омуралиев К.Т., Похнатюк Л.Ю. (KG)

(56) Банникова Л. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. - М., 1975

(54) Способ получения кисломолочного продукта с антибиотической активностью "Лактобальзам"

(57) Изобретение относится к микробиологической, медицинской и молочной промышленности и представляет собой способ приготовления кисломолочного продукта с повышенной антибиотической активностью - "Лактобальзам". Для получения названного продукта молоко или обрат стерилизуют при 114-115°C в течение 30 мин, охлаждают до 37-40°C, смешивают в соотношении 100 : 1 с лабораторной закваской, приготовленной на основе селекционированной чистой культуры штамма *Lbm bulgaricum* тип С, выдерживают смесь при этой температуре 10-12 ч до достижения кислотности сгустка 85-90°Т с последующим доведением конечного продукта до показателя кислотности 180-190°Т при температуре 4-6°C в течение 19-22 ч. 1 пр., 4 табл.

Изобретение относится к медицине и касается получения биологически активных средств на базе натуральных молочных продуктов.

Известен способ получения простокваши мечниковской южной, по которому тепловую обработку (пастеризацию) исходного сырья - молока проводят при температуре 78-95°C, затем охлаждают до 40-43°C и вносят многоштаммовую закваску из *Lbm*

bulgaricum и *Str thermophilus* в количестве 1.5-2 %, конечный продукт (простокваша мечниковская южная) считается готовой через 3-6 ч. Этот пищевой продукт, имеющий хотя и низкую, но определенную антибиотическую активность, действует на *E. coli*, кишечную микрофлору, *Staph. aureus*.

Задача изобретения - это получение кисломолочного продукта повышенной антибиотической активности и расширение за счет этого его функциональной сферы.

Решение поставленной задачи в том, что осуществляют тепловую обработку исходного молочного сырья; охлаждение исходного продукта после тепловой обработки до температуры закрашивания с использованием молочнокислых культур для закваски; приготовление закваски; заквашивание; вызревание конечного продукта.

В известном способе тепловую обработку, т.е. пастеризацию исходного молочного сырья (молока) проводят в лимитах 75-95°C. Приведенный режим тепловой обработки (пастеризации) только снижает вегетацию патогенных микробов и микробов-загрязнителей, обеспечивая кратковременное предотвращение порчи продукта. Недостаточность пастеризации демонстрирует таблица 1. Как видно из таблицы, после пастеризации микроорганизмы сохраняют способность к регенерации уже в первые дни хранения исходного продукта. В то время как стерилизация при температуре 114-115°C в течение 30 мин (заявляемый способ) полностью убивает все патогенные и непатогенные микроорганизмы в молоке или обрате - исходном сырье для получения кисломолочного продукта с антибиотической активностью по заявляемому способу. Приведенный режим является оптимальным, поскольку стерилизованные таким образом молоко или обрат длительно сохраняют свою стерильность, даже если его хранение проводится при комнатной температуре. В известном способе охлаждение пастеризованного молока предусматривается до 40-43°C, тогда как в изобретении исходный продукт (молоко или обрат) после тепловой обработки (стерилизации) охлаждают до температуры строго определенного диапазона 37-40°C, обеспечивающей наиболее благоприятные условия жизнедеятельности штамма *Lbm bulgaricum* тип С и проявления в дальнейшем антибиотической активности конечного продукта - "Лактобальзама".

В известном способе приготовления кисломолочных продуктов используют симбиотическую комбинацию лактокультур для закваски - смесь *Str thermophilus* и *Lbm bulgaricum*, служащая для создания кисломолочного продукта с определенными пищевыми характеристиками простокваши мечниковской южной.

Приготовление закваски для лактобальзама проводят на основе селекционированной чистой культуры штамма *Lbm bulgaricum* тип С, т.е. используется одноштаммовая закваска. Выбор и использование именно этого штамма в совокупности с указанным режимом изготовления определяет повышение антибиотической активности конечного кисломолочного продукта по заявляемому способу.

Размноженные на элективной среде колонии чистой культуры штамма *Lbm bulgaricum* тип С вносят в охлажденное до 37-40°C стерильное молоко. Данная температура является оптимальной для развития культуры штамма *Lbm bulgaricum*, которая поддерживается до достижения в нем кислотности сформировавшегося сгустка 85-90°Т. Вызревание происходит в течение 19-22 ч при 4-6°C. При этом в 1 мл лабораторной закваски должно содержаться не менее 10⁶ живых *Lbm bulgaricum* тип С. Соотношение смешиваемых исходных ингредиентов - молока и лабораторной закваски является Одним из определяющих признаков для получения высококачественного конечного продукта, т.к. правильно подобранный баланс объемов обеспечивает достаточно благоприятную среду для жизнедеятельности содержащейся в закваске живой массы лактобактерий.

Отличительным признаком изобретенного способа является строгая определенность соотношения исходного продукта (молока или обрата) к объему закваски 100:1. Это соотношение является эмпирическим, выбранным в результате многочисленных экспериментов, т.к. до заявляемого способа не было описано использование чистой культуры штамма *Lbm bulgaricum* тип С для изготовления кисломолочного продукта с антибиотической активностью. Выбранное соотношение 100:1

обеспечивает оптимальные условия для вегетации вносимых живых лактобактерий. Меньший объем молока (или обрат) недостаточен для выработки антибиотических веществ. Большой объем затягивает их продуцирование. В отличие от известного в данном изобретении заквашивание проводится при 37-40°C в течение 10-12 ч. Существенность названного режима определяется жизненным циклом развития штамма *Lbm bulgaricum* тип С, постепенно приводящим к выработке антибиотических веществ. Отличительным признаком этого способа также является критерий временного режима выдержки приводимого температурного диапазона процесса заквашивания. В изобретенном способе к такому критерию отнесена кислотность сформировавшегося сгустка 85-90°Т. Известно, что накопление микрофлоры закваски при этом показателе кислотности становится наиболее активным.

Таблица 1 показывает, что, когда в течение 10-12 ч происходит интенсивное накопление массы размножающихся при 37-40°C лактобактерий, то достигается названный уровень кислотности. Антибиотическая активность при этом в зоне задержки роста тест-культуры *Staph. aureus* доходит лишь до 5-5.4 мм. Дальнейшее нарастание антибиотической активности происходит уже при вызревании конечного продукта. Помещение продукт в условия пониженной температуры 4-6° на 19-22 ч сопровождается дальнейшим нарастанием антибиотической активности. Увеличение зоны задержки роста тест-культуры до 13.5-15 мм, показанное в таблице 1, доказывает, что вызревание конечного продукта происходит именно при названном режиме. К концу технологического процесса, т.е. после выдержки в последнем температурном режиме кислотность конечного продукта достигает 180-190°Т. В последующем идет стабилизация, как антибиотической активности, так и кислотности конечного продукта, которые остаются неизменными до 29 дня хранения (таблица 1). Затем происходит повышение кислотности до 200°Т, при которой падает антибиотическая активность готового продукта.

Таким образом, срок годности готового продукта обусловлен стабильным сохранением его выраженных антибиотических свойств.

Совокупность существенных признаков заявляемого способа позволяет получить кисломолочный продукт с повышенной антибиотической активностью, названный авторами "Лактобальзам".

Ниже приводится иллюстрирующий материал для доказательства более высокой антибиотической активности "Лактобальзама" по сравнению с лечебно-профилактическим продуктом (простокваша Мечникова) и лечебным средством "Лактобактерин", изготовленным НПО "БИОМЕД" (г. Пермь). Названные продукты имеют идентичную биологическую направленность, сопоставимы по родовой характеристике триба и относятся к классу лактобактерий.

Таблица 2 демонстрирует скорость бактерицидного действия сравниваемых вышеуказанных объектов на тест-культуру патогенного стафилококка *Staph. aureus*.

Исследования проводились путем внесения в 5 мл пробы сравниваемых продуктов смыва суточной тест-культуры *Staph. aureus* в количестве 1 млн микробных тел в 1 мл. Пробы с посевом инкубировались в термостате при температуре +37°C. Контроль бактерицидного действия осуществлялся путем высева на селективную среду МРС через каждые 2 ч. Из таблицы 2 видно, что рост тест-культуры *Staph. aureus* прекращается при действии Лактобактерином (г. Пермь) через 24 ч. Простокваша Мечникова задерживает рост тест-культуры через 18 ч. При действии на тест-культуру Лактобальзамом (заявляемый способ) уже через 4 ч происходит торможение роста патогенной культуры, а через 6 ч этот рост прекращается. Скорость задержки роста патогенного стафилококка при действии Лактобальзамом превышает идентичный показатель простокваши Мечникова в 3 раза, а Лактобактерина (базовый объект) в 6 раз. Таблица 3 дополняет характеристику биологической активности продукта заявляемого способа. Антибиотические свойства Лактобальзама анализировались не только по сравнению с известными лечебными лактопродуктами, но и на фоне широко-используемых выпускаемых медицинской промышленностью синтезированных антибактериальных препаратов: эритромицина, канамицина, гентамицина. Анализ антибиотической активности проводился по оценке зон

задержки роста патогенных тест-культур *Staph. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*. Для исследования брались суточные тест-культуры, а посев и контроль осуществлялись по стандартной методике. Оценку антибиотической активности испытуемых объектов делали путем высева на активные питательные среды после суточной инкубации в условиях термостата при 37 °С по диаметру зон задержки роста тест-культур. Как видно из таблицы 3, антибиотическая активность Лактобальзама по действию на *Staph. aureus* на много превышает таковую не только простоквашу Мечникова и Лактобактерина, но и антибактериальных препаратов. Идентичная активность Лактобальзама проявляется по отношению к *E. coli*, сальмонелле тифимуриум, палочке брюшного тифа. Дизентерийная палочка, как более чувствительная к некоторым антибиотикам, имеет наибольший диаметр зоны задержки роста (16 мм) при действии Лактобальзама.

Следует отметить широкий бактерицидный спектр действия Лактобальзама по отношению ко многим возбудителям кишечных инфекций, в то время как антибактериальные препараты действуют избирательно. Так, палочки дизентерии Флекснера не чувствительны к действию полимиксина, стрептомицина, низка чувствительность сальмонеллы и палочки брюшного тифа к стрептомицину, полимиксину. На этом фоне действие Лактобальзама остается одинаковым и достаточно высоким 15-16 мм. Только в некоторых случаях антибиотическая активность Лактобальзама несколько уступает антибактериальным препаратам. Это не преуменьшает антибиотическую ценность Лактобальзама, поскольку он является натуральным природным биологически активным продуктом с широким спектром действия, в то время как названные антибиотики - суть химико-биологического синтеза со всеми вытекающими отсюда последствиями.

В таблице 4 приводится характеристика кисломолочного продукта "Лактобальзам" с антибактериальной активностью.

Для определения характера антибиотического вещества в Лактобальзаме были проведены исследования по известному методу Л.П. Титова. Результаты анализа испытания показали наличие в Лактобальзаме лизоцима порядка 45 МЕ/мл.

Условия хранения: в герметично укупоренных стерильных емкостях в течение 30 дней в темном месте при 4-6°С.

Пример.

1. Приготовление лабораторной закваски.

Берется любой кисломолочный продукт, изготовленный на базе многоштаммовой закваски из *Lbm. bulgaricum*. В данном примере - это йогурт. Для селектирования чистой культуры штамма *Lbm. bulgaricum* тип С йогурт в дозе 0.5 мл сеется на чашку Петри со средой МРС и хорошо втирается. Посев термостатируется при 39°С в течение 7-10 дней. Выросшие колонии лактобактерий исследуют под микроскопом и идентифицируют в соответствии с "Определителем микробов" Д. Берджи, 1974, раздел X "Lactobacillus", ключ 8 к определению видов рода *Lbm. bulgaricum*.

Штамм *Lbm. bulgaricum* тип С идентифицируется по следующим признакам: морфология - палочки с отрубленными концами 1.0 x 2.0 микрона, часто расположены длинными цепочками, реже единичные, неподвижные, грамположительные, индол не образуют; биохимический ряд: мальтоза -, маннит +, сахароза +, раффиноза -.

Идентифицированные колонии штамма *Lbm. bulgaricum* тип С пересевают на среду МРС для накопления в условиях термостата при 39 °С в течение 7-10 дней.

Размноженная посевная чистая культура штамма *Lbm. bulgaricum* тип С служит для приготовления лабораторной закваски. Для этого молоко или обрат стерилизуют во флаконах емкостью 400 мл в автоклаве при 114-115°С в течение 30 мин, остужают до 37-40°С и вносят в каждый флакон по 25-30 накопленных колоний чистой культуры штамма *Lbm. bulgaricum* тип С. Флаконы термостатируют при 37-40°С в течение 10-12 ч, затем выдерживают при 4-6°С от 19 до 22 ч. В 1 мл готовой лабораторной закваски должно быть не менее 10⁶ микробных тел штамма *Lbm. bulgaricum* тип С.

2. Приготовление Лактобальзама.

Исходный продукт (молоко или обрат) стерилизуют при температуре 114-115°C в течение 30 мин в стерильных флаконах емкостью 100 мл, охлаждают его до 37-40°C и вносят в каждый флакон 1 мл лабораторной закваски, приготовленной на основе чистой культуры штамма *Lbm. bulgaricum* тип С, т.е. в соотношении 100:1. Встряхиванием закрытых флаконов тщательно смешивают. Заквашенный продукт во флаконах выдерживают при 37-40°C в условиях термостата 10-12 ч. В течение этого времени во флаконах образуется стойкий сгусток с кислотностью 85-90°Т. Кислотность измеряют стандартным методом (ГОСТ 36-24-67). Затем продукт-полуфабрикат в условиях холодильника доводят до созревания при температуре 4-6°C в течение 19-22 ч. Критерием созревания является достижение кислотности конечного продукта 180 °Т. Во избежание контаминации кисломолочного продукта весь процесс его получения ведется со строжайшим требованием стерильности используемых - оборудования, флаконов, инструментов.

Лактобальзам утвержден Фармкомитетом Кыргызской Республики 28 декабря 1994 г. Начаты клинические испытания в области гинекологии. Разработаны технические условия, технико-экономические обоснования. Готов к серийному выпуску на базе Республиканской санэпидемстанции, где есть необходимая производственная база с объемом выпуска 600 л. в год, что удовлетворит нужды специализированных медицинских учреждений г. Бишкека (женские консультации, роддома). После прохождения клинических испытаний готовые формы могут использоваться амбулаторно и в домашних условиях. Перспективен для использования во многих отраслях медицины в качестве натурального антибиотического средства с широким спектром биологического действия на базе доступных и широко распространенных натуральных молочных материалов. Технология изготовления проста, не требует сложного оборудования.

Таблица 1

Показатели антибиотической активности и кислотности Лактобальзама
в процессе вызревания и хранения

Показатель	I этап температурного режима вызревания 37-40°C						
	Время в часах						
	1	2	4	6	8	10	12
Зона задержки роста (мм) <i>Staph. aureus</i>	-	-	-	3	3	5	5.4
Кислотность °Т	5	10	30	40	60	80	90

II этап температурного режима вызревания 4-6°C

Показатель	Время в часах									
	3	6	9	12	15	18	19	22	23	24
Зона задержки роста (мм) <i>Staph. aureus</i>	6.3	7	8	9	10.5	12	13.5	15	15	15
Кислотность °Т	95	100	120	130	140	160	180	190	190	190
Температурный режим хранения 4-6°C										
Показатель	Время, дни									
	2	5	10	15	20	25	29	30		

Зона задержки роста (мм) Staph. aureus	15	15	15	15	15	15	14.8	14.5
Кислотность °Т	190	190	190	190	190	190	195	200

Таблица 2

Скорость бактерицидного действия сравниваемых продуктов на тест-культуру Staph. aureus

Название продукта	Время инкубации, час								
	2	4	6	8	10	12	15	18	24
Лактобальзам (заявляемый способ)	+++	++							
Простокваша мечник, (известный способ)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
Лактобактерин, г. Пермь (базовый объект)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++

Примечание: +++ интенсивный рост тест-культуры

++ скудный рост

- отсутствие роста

Таблица 3

Показатели зон задержки роста патогенных тест-культур для сравнения антибиотической активности лактопродуктов и антибактериальных препаратов (заводские стандарты)

Тест-культуры	Диаметры (мм) зон задержки роста после 24 ч инкубации при 37°C									
	Лактопродукты в дозе 0.1 мл			Антибактериальные препараты в виде стандартных дисков						
	Лактобальзам	Простокваша Мечникова	Лактобактерин (г. Пермь)	Эритромицин	Полимиксин	Тетрациклин	Ристомин	Стрептомицин	Канамидин	Гентамицин
Staph. aureus	15	5	-	10	6	5	6	5	12	13
E. coli	15	5	-	17	16	17	10	9	10	15
S.typhimurium	15	4	-	15	3	15	8	3	9	16
S. typhi	15	4	-	15	3	15	8	3	9	16
Shigella flexneri	16	6	-	16	-	17	12	-	3	17

Таблица 4

Характеристика кисломолочного продукта "Лактобальзам",
получаемого заявляемым способом

Показатель	Характеристика
Органолептические Внешний вид и консистенция	Равномерный сгусток, плотный, не нарушенный, слегка тягучий, без следов газообразования и выделения сыворотки
Выделение сыворотки	Не выявлено
Вкус, запах	Приятный с кисловатым кисломолочным привкусом, запах чистый, кисломолочный
Цвет	Кремовый, равномерный по всей массе
Физико-химические Массовая доля жира, %	1.3 (3.2)

Массовая доля белка, %	3.0
Массовая доля углеводов, %	4.2
Кислотность, °Т	190.3
Молочной кислоты РН продукта	5.2
Температура при выпуске, °С	6
Антибиотическая активность	45 МЕ/мл

Продолжение таблицы 4

Микробиологические В мазках из кисломолочного Лактобальзама, окрашенных по Грамму	Чистая культура штамма <i>Lbm. bulgaricum</i> тип С, диаметром 1.0 x 2.0 микрона, расположены длинными цепочками с обрубленными концами, неподвижны, споры отсутствуют, аэроб термофилы Грамположительны. Растут в средах, содержащих молоко, молочную сыворотку или солод
Ферментация углеводов	Сахароза - (+) Раффиноза – Мальтоза – Глюкоза + Лактоза + Индол - Кислота: на глюкозы левулезы галактозы лактозы маннит Всегда ферментируют углеводы с образованием молочной кислоты (К) Оптимум температуры 37-40°С Максимум температуры 45°С Непатогенная для человека Через 4 ч тормозит рост патогенных культур: дизентерии, брюшного тифа, сальмонелл, патогенного стафилококка
Антибиотическая активность в сравнении с промышленными антибактериальными препаратами	Не уступает: эритромицину, полимиксину, тетрациклину, ристомину, стрептомицину, канамицину
Количество лактобактерий штамма <i>Lbm.</i> <i>bulgaricum</i> тип С КОЕ см ³	Жизнеспособных бактерий в продукте не менее 10 ⁸ КОЕ/мл
Наличие условно-патогенных и патогенных микроорганизмов	Не обнаружено
БГКП (в 0.1-10.0 мл); (в 10.0 мл)	Не обнаружено Не обнаружено
Патогенные микроорганизмы, в том числе патогенные стафилококки, сальмонеллы и др.	Не обнаружены

Формула изобретения

Способ получения кисломолочного продукта с антибиотической активностью, заключающийся в тепловой обработке исходного молочного сырья, охлаждении его до температуры заквашивания, смешивания, с закваской молочнокислых культур, создании условий для вызревания конечного продукта, отличающийся тем, что исходный

продукт, молоко или обрат, стерилизуют при температуре 114 - 115°C в течение 30 мин, охлаждают до 37 - 40°C, смешивают в соотношении 100 : 1 с лабораторной закваской, приготовленной на основе селекционированной чистой культуры штамма *Lbm. bulgaricum* тип С, выдерживают этот температурный режим 10 - 12 ч до достижения кислотности сгустка 85 - 90°Т с последующим вызреванием конечного продукта при 4 - 6°C в течение 19 - 22 ч до достижения кислотности 180 - 190°Т.

Составитель описания	Эралиев Дж.С.
Ответственный за выпуск	Ногай С.А.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03