

УДК 663.18:579.67

О.Н. Гора, И.Н. Павлов**ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ОСНОВНЫХ ФАКТОРОВ,
ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ПОЛУЧЕНИЕ СУХИХ ПРЕПАРАТОВ
ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

Уделено внимание проблеме получения сухих форм пробиотического препарата на основе пропионово-кислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii*. Отмечено, что при культивировании бактерий в качестве фоновой среды принята питательная среда, применяемая для развития бифидобактерий. Для данной питательной среды определены условия накопления максимальной биомассы бактерий, при этом в качестве основных факторов проведения процесса рассматривались: температура проведения процесса, продолжительность и содержание ионов кобальта, используемого в качестве предшественника при синтезе витамина В₁₂. Полученная жидкая закваска с максимальным накоплением биомассы пропионовокислых бактерий высушена методом распылительной сушки. При проведении процесса отработаны режимы, при которых достигается минимальная гибель и сохраняется достаточное количество живых бактерий по отношению к жидкой закваске.

Пропионовокислые бактерии, питательная среда, витамин В₁₂, сухая закваска, распылительная сушка.

Введение

В последние годы все большее внимание уделяется созданию продуктов функционального питания, способных оказывать определенное регулирующее действие на организм в целом или на его конкретные системы и органы или на их функции. Большое внимание исследователей привлекают пропионовокислые бактерии (ПКБ), отличительной способностью которых является широкий синтез витамина В₁₂ и высокие иммуногенные и антимутогенные свойства. ПКБ приживаются в кишечнике людей и снижают генно-токсичное действие ряда химических соединений и ультрафиолетовых лучей [1]. В связи с этим оказывается актуальным создание препарат-пробиотиков на основе ПКБ. Поэтому одним из направлений при решении задач, ориентированных на оздоровление населения, является проведение исследований в области разработки новых эффективных пробиотических продуктов, в частности, на основе ПКБ, а также совершенствование выпускаемых форм этих препаратов и интенсификация производства для получения качественного продукта с наилучшими свойствами.

Для использования этих препаратов в пищевой промышленности необходимо создать условия для продления сроков их хранения, что определяется экономическими условиями производства. Подобные препараты приобретают различные конечные формы. Их использование возможно и в виде жидкого концентрата, и в суспензированной форме, и виде сухих концентрированных форм. Получение препарата в той или иной форме продиктовано условиями последующего применения, наилучшего сохранения целевых свойств, поддержания микроорганизмов в биологически активном состоянии, сохранности полезных активных веществ (аминокислот, органических кислот, витаминов и т.д.). Исключением не является и получение сухих концентрированных препаратов.

Поэтому цель данной работы состоит в опробировании методики получения сухого концентрата пропионовокислых бактерий. С помощью данных научной литературы по культивированию пропионово-кислых бактерий был определен состав основной пи-

тательной среды, которая принята в качестве контрольной при последующей отработке по повышению накопления биомассы ПКБ и режимов процесса сушки. В состав этой среды входят следующие компоненты: молочная сыворотка, дрожжевой автолизат, гидролизованное молоко и хлорид кобальта. В качестве инокулята используется концентрат пропионовокислых бактерий, который содержит клетки селективных штаммов *Propionibacterium freudenreichii* (подвиды *shermanii* и *globosum*) с высокой температурой второго нагревания. Количество жизнеспособных бактерий в одной порции концентрата составляет не менее $(2,8 \pm 0,8)$ млрд КОЕ. Концентрат приобретен на ООО «Барнаульская биофабрика». Основные условия накопления: соотношение компонентов, температура культивирования, количество вносимой закваски, добавки к среде, продолжительность культивирования продуцента.

На первом этапе работы проводилась оптимизация состава ростовых компонентов питательной среды для культивирования *Propionibacterium freudenreichii*.

Установлено, что пропионовокислые бактерии и бифидобактерии относятся к актиномицетной группе микроорганизмов. Так, для количественного учета этих бактерий применяются идентичные среды, вследствие чего для накопления биомассы пропионовокислых бактерий была взята фоновая среда на основе сыворотки с добавлением ростовых компонентов дрожжевого автолизата и гидролизованного молока для культивирования бифидобактерий с последующей оптимизацией.

Материалы и методы

В данной работе использовались методы для определения биомассы, витамина В₁₂ и колониеобразующих единиц (КОЕ). Биомассу находили методом взвешивания, витамин В₁₂ – спектрофотометрическим методом. Суть метода заключается в отделении и промывке клеток бактерий с переводом кобаламинов в водный раствор путем гидролиза, в воздействии света на полученный гидролизат для перевода кобалами-

на в оксикобаламин и определении оптической плотности при длине волны 530 нм. Оптическая плотность раствора пропорциональна содержанию кобаламина. А количество микроорганизмов выявляли «высевом на плотные питательные среды – методом Коха». Метод широко применяют для определения численности жизнеспособных клеток в различных естественных субстратах и лабораторных культурах. В его основе лежит принцип Коха, согласно которому каждая колония является потомством одной клетки. Это позволяет на основании числа колоний, выросших после посева на плотную питательную среду определенного объема исследуемой суспензии, судить об исходном содержании в ней клеток микроорганизмов. Результаты количественного исследования микроорганизмов, проведенного по методу Коха, часто выражают не в числе клеток, а в условных, так называемых колониеобразующих единицах. Каждая колония на чашке с питательной средой вырастает из одной колониеобразующей единицы, которая может представлять собой бактериальную, дрожжевую клетку, спору, кусочек мицелия актиномицета или гриба.

Определение числа микроорганизмов этим методом включает три этапа: приготовление разведений, посев на плотную среду в чашки Петри и подсчет выросших колоний.

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали методами математического и корреляционного анализа на ЭВМ, используя пакет стандартных программ.

Результаты и их обсуждение

Пропионовокислые бактерии являются активными продуцентами витамина B_{12} . Следует отметить, что синтез витамина зависит от условий культивирования. Известно, что корриноиды включают в группу тетрапиррольных соединений, выполняющих жизненно важные функции. Ионы металлов в этих соединениях находятся в комплексе с органическими лигандами, а в коферментах B_{12} атом кобальта связан с углеродом. Энзиматический гемолиз Co-C связи приводит к образованию реактивных веществ. Эти вещества провоцируют протекание реакций, которые в иных случаях должны быть подавлены. Однако в естественных питательных средах содержание кобальта минимально, поэтому в фоновую питательную среду мы также добавляли ионы Co^{2+} , которые влияют на выход биомассы и синтез витамина B_{12} [2] (рис. 1).

Из рис. 1 видно, что оптимальной питательной средой для накопления биомассы *Propionibacterium freudenreichii* является среда следующего химического состава: ТС + 5 % дрожжевого автолизата + 5 % гидролизованного молока + $CoCl_2$ (20 мг/л), поскольку позволяет бактериям накапливать значительную биомассу. Определение количества витамина B_{12} осуществлялось спектрофотометрическим методом, а биомассы – методом взвешивания [3].

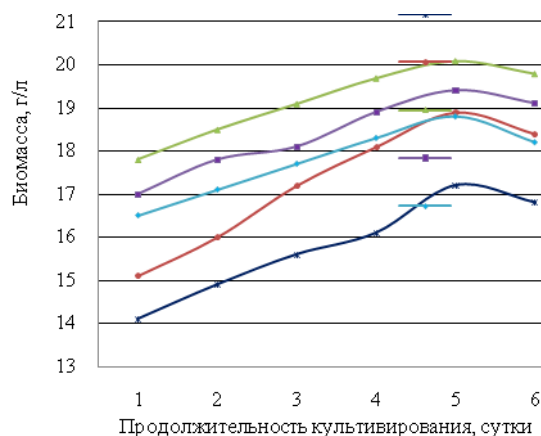


Рис. 1. Динамика накопления биомассы бактериями *Pr. freudenreichii* в зависимости от состава питательной среды: 1 –творожная сыворотка + дрожжевой автолизат + гидролизованное молоко; 2 –творожная сыворотка + дрожжевой автолизат + гидролизованное молоко + $CoCl_2$ (10 мг/л); 3 –творожная сыворотка + дрожжевой автолизат + гидролизованное молоко + $CoCl_2$ (20 мг/л); 4 –творожная сыворотка + дрожжевой автолизат + гидролизованное молоко + $CoCl_2$ (30 мг/л); 5 –творожная сыворотка + дрожжевой автолизат + гидролизованное молоко + $CoCl_2$ (40 мг/л)

Установлена корреляционная зависимость между количеством ионов кобальта и максимальным накоплением биомассы и витамина B_{12} , которое фиксируется на 5-е сутки культивирования.

Для биомассы уравнение имеет вид:

$$y = 0,0278x^3 - 0,4429x^2 + 1,9508x + 17,314.$$

Коэффициент корреляции составляет: $R^2 = 0,9525$.

Для накопления витамина уравнение имеет вид:

$$y = 0,0361x^3 - 0,7095x^2 + 3,8187x + 8,8714.$$

Коэффициент корреляции составляет: $R^2 = 0,9217$.

Приведенные данные позволяют рассчитать выход продукта по биомассе или витамину B_{12} в зависимости от концентрации ионов Co^{2+} в период максимального накопления на 5-е сутки культивирования.

Метод распылительной сушки широко применяется в пищевой промышленности, например, при получении сухого молока. Однако применение его для сушки бактериальных препаратов в настоящее время не получило распространения из-за сильного снижения жизнеспособности бактерий при сушке. Пропионовокислые бактерии относятся к микроорганизмам, способным развиваться в области средних температур и выдерживать действие температуры до $60^\circ C$. Такой факт дает возможность разработать технологию процесса приготовления сухих форм этих бактерий с применением распылительной сушки. Отработка включает в себя прежде всего определение условий проведения процесса с оптимальным сочетанием факторов, позволяющих достичь максимальной сохранности живых бактерий по окончании процесса сушки. К факторам, определяющим получение такого эффекта, относятся: высокая концентрация бактерий в культуральной жидкости, подбор защитных сред и режимы процесса сушки.

Поэтому дальнейшим развитием изучаемой темы является получение сухой концентрированной закваски на основе концентрата сохранных в активном состоянии бактерий и витаминов.

В основном сухие закваски получают с помощью сублимационной сушки, мы же предлагаем получать сухие закваски с помощью распылительной сушки, которая является более экономным видом сушки и менее энергоемким. Этот вид сушки обладает большими конкурентными преимуществами по сравнению с сублимационной сушкой, а продукт получается на порядок дешевле.

К числу преимуществ следует отнести прежде всего высушивание непосредственно из раствора, развитую поверхность диспергирования, интенсивный тепло- и массообмен. Поэтому распылительная сушка по отношению с сублимационной дает такие плюсы, как меньшие затраты энергии, сокращение парка используемого дорогостоящего оборудования. Иными словами, применяя данный способ получения пробиотического продукта производитель приобретает высокую конкурентоспособность препарата по сравнению со стандартными заквасками и их способом получения.

Далее рассмотрен вариант получения сухих видов заквасок из живых микробных культур пропионово-кислых бактерий с помощью распылительной сушки, которая является альтернативным методом обезвоживания. Реализация этого варианта требует отработки технологии получения сухой формы препарата, при которой обеспечится сохранность накопленного продукта и повышенная стабильность препарата при хранении.

Первичную отработку режимов сушки проводили на апробированной контрольной среде. Полученные данные свели в табл. 1.

Таблица 1

Показатели сухих и жидкой заквасок

Показатели	Виды заквасок			
	Сухие			Жидкая
	Выбор температуры сушки			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	
Физико-химические:				
pH	5,95	5,95	5,95	5,95
Титруемая кислотность, °Т	43	43	43	43
Витамин В12, мкг/мл	80,987	75,432	58,221	87,229
Активность сквашивания, ч	14	14	14	14
Влажность, %	10,09	7,03	3,46	–
Микробиологические:				
Биомасса, г/л	43,4	40,1	37,4	58,2
Определение общего количества пробиотиков, КОЕ/см ³	10×10 ⁸	8×10 ⁸	9×10 ⁷	10×10 ¹⁰
Органолептические:				
Консистенция и внешний вид	Порошок молочно-белого цвета			Жидкая, однородная
Цвет				Молочно-белый, равномерный по всей массе

Осуществленные исследования показали, что сухая закваска незначительно уступает жидкой по наличию

витамина В₁₂ и произошло незначительное снижение КОЕ. Таким образом, проведенный ряд исследований по использованию распылительного обезвоживания применительно к сушке пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii* продемонстрировал удовлетворительный результат. Имеющиеся данные подтверждают возможность получения сухой формы пробиотика с высоким содержанием живых бактерий, что достигается сокращением потерь микроорганизмов при выборе наиболее благоприятного режима сушки.

В основном сухие закваски получают с помощью сублимационной сушки. В настоящее время существуют разработанные сухие формы пробиотических препаратов («Бифиформ», «Линекс», «Бактисубтил» и др.), произведенные из живых микробных культур, таких как бифидобактерий и лактобактерий, которые используются также в технологии изготовления жидких концентратов и находят широкое применение в качестве средств, предназначенных для коррекции микрофлоры человека и лечения ряда заболеваний. Существуют разработки получения сухих форм пробиотических препаратов на основе пропионовокислых бактерий, но в их технологии приготовления используется сублимационный способ обезвоживания.

В данной статье показаны удовлетворительные результаты, полученные при отработке метода распылительного высушивания ПКБ. Таким образом, предлагается получать сухие закваски с помощью распылительной сушки, которая является более экономным видом сушки и менее энергоемким. Этот вид сушки обладает явными конкурентными преимуществами по сравнению с сублимационной сушкой, а продукт имеет меньшую себестоимость. К числу таковых преимуществ следует отнести прежде всего высушивание непосредственно из раствора, развитую поверхность диспергирования, интенсивный тепло- и массообмен. Поэтому распылительная сушка по отношению с сублимационной дает такие плюсы, как меньшие затраты энергии, сокращение парка используемого дорогостоящего оборудования. Таким образом, используя данный способ получения пробиотического продукта производитель получает высокую конкурентоспособность препарата по сравнению со стандартными заквасками.

Известно, что для оказания лечебного воздействия на организм человека, т.е. для закрепления бактерий в кишечнике, их концентрация в сухих препаратах должна быть не менее 10¹⁰⁻¹² живых бактерий в 1 грамме сухого порошка. Поэтому в данном случае столь высокой концентрации живых бактерий при распылительной сушке возможно добиться с учетом того, что 10–25 % популяций бактерий-пробиотиков гибнет при условии получения значительного накопления биомассы бактерий при культивировании на оптимизированной питательной среде. Особого внимания также требует отработка технологии проведения процесса распылительного высушивания с подбором наиболее благоприятных температурных и гидродинамических режимов распыления и применения защитных сред для снижения уровня гибели бактерий.

Список литературы

1. Хамагаева, И.С. Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий / И.С. Хамагаева. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006. – 172с.
2. Воробьева, Л.И. Пропионовокислые бактерии/ Л.И. Воробьева. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 288с.
3. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии: учеб.пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; под. ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

Бийский технологический институт (филиал)
ГОУ ВПО «Алтайский государственный
технический университет им. И.И. Ползунова»,
659305, Россия, Алтайский край, г. Бийск, ул. Трофимова, 27.
Тел./факс: (3854) 43-22-85
e-mail:info@bti.secna.ru

SUMMARY

O.N. Gora, I.N. Pavlov

**THE INVESTIGATION ON SOME BASIC FACTORS DETERMINING THE MANUFACTURE
OF PROPIONIC ACID BACTERIA OF DRY PREPARATIONS**

The attention to the problem of manufacturing the dry forms of a propionic preparation based on propionic acid bacteria "Propionibacterium freudenreichii" has been given. The nutrient medium used for the bifidobacteria growth is reported to be employed as a background medium for culturing bacteria. Some conditions to accumulate bacteria biomass for the nutrient medium have been determined. The following points were considered to be the main factors of the process: temperature maintained, duration, cobalt ion content used as a precursor for B₁₂ vitamin synthesis. The resulting liquid ferment with a maximum accumulation of propionic bacteria biomass was dried by a spray drying method. While performing the process the manufacture modes were developed that could lead to the minimum bacteria destruction and the survival of a sufficient quantity of live bacteria relative to a liquid ferment.

Propionic acid bacteria, nutrient medium, B₁₂ vitamin, dry ferment, spray drying.

State Educational Establishment of Higher Vocational Training
"Biysk Technological Institute",
27, Trofimova street, Biysk, 659305, Russia
Phone/Fax: (3854) 43-22-85
e-mail:info@bti.secna.ru

