

(19)



(10) **LT 4900 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **4900**

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 1/20**

(21) Paraiškos numeris: **2000 045**

A23C 9/12

A23C 9/20

A23L 1/03

(22) Paraiškos padavimo data: **2000 05 26**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2001 12 27**

(45) Patento paskelbimo data: **2002 03 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Algis RAŠKAUSKAS, LT

(73) Patento savininkas:

**Green Group LLC, 208 H Plaza Centre Building, 3505 Silverside Road,
Wilmington, Delaware 19801, US**

Natalja RAŠKAUSKIENĖ, Žirmūnų g. 62-32, 2012 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis:

Tanla STERLINA, Naugarduko g. 32/2, LT-2600 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

**Simbiotinis mišinys, sudarytas iš penkių bifidobakterijų, ir maisto produktai,
turintys šio mišinio**

(57) Referatas:

Išradimas yra iš maisto pramonės srities ir apima plataus asortimento pieno produktus, pagamintus iš nerauginto arba rauginto pieno bei nefermentuotus maisto produktus, tokius kaip alus arba majonezas, savo sudėtyje turinčius gyvybingų žmogaus žarnyne paplitusių bifidobakterijų simbiotinį mišinį. Šis mišinys sudarytas iš *Bifidobacterium bifidum* AS 1 padermės (deponuotos Latvijos tarptautiniame mikroorganizmų muziejuje, kolekcijos Nr. P569) ir AS 6 padermės (deponuotos ten pat, kolekcijos Nr. P573), *Bifidobacterium breve* AS 4 padermės (deponuotos ten pat, kolekcijos Nr. P572), *Bifidobacterium adolescentis* AS 3 padermės (deponuotos ten pat, kolekcijos Nr. P571) ir *Bifidobacterium longum* AS 2 padermės (deponuotos ten pat, kolekcijos Nr. P570), esančių vienodu masės santykiu, kurių koncentracija maisto produkte yra 10^6 - 10^7 V/ml. Tokie maisto produktai tinka vartoti įvairaus amžiaus žmonėms, norintiems sustiprinti organizmo imuninę sistemą, jie veikia prieš

LT 4900 B

žmogaus žarnyne besiveisiančią nuo įvairių žalingų poveikių patogeninę mikroflorą.

Išradime pateikiamas maisto produktų, turinčių šio bifidobakterijų simbiotinio mišinio, gamybos būdas.

5

Šis išradimas yra iš mikrobiologijos srities, kuriame pateikiamas bifidobakterijų simbiotinis mišinys, sudarytas iš penkių gyvybingų bifidobakterijų, kuris gali būti panaudojamas gamyboje įvairaus asortimento maisto produktų, turinčių šio mišinio. Be to, išradime pateikiami maisto produktai, turintys šio mišinio, bei jų gamybos būdas.

10

Tarp žmogaus sveikatos ir jo žarnyno mikrofloros yra labai glaudus ryšys. Sveiko žmogaus mikrofloroje vyrauja bifidobakterijos, kurios atlieka įvairias fiziologines funkcijas, iš kurių svarbiausiomis yra apsauginė ir sintezuojamoji. Jos taip pat dalyvauja galutiniame virškinamojo proceso etape (Dallas G. Hoover, Food Technology, 1993, June, 120-124).

15

Yra žinoma, kad Europoje gyvenančių žmonių organizme sutinkamos pagrindiniai penkių rūšių bifidobakterijos. Tai *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve* ir *Bifidobacterium infantis*. Pirmosios trys suaugusio žmogaus žarnyno floroje sudaro pagrindinę bifidobakterijų dalį (nuo 40 iki 75 %). Žmogaus organizme šios bifidobakterijos nyksta, kadangi dabartiniu metu žmonija vartoja daug sterilizuoto maisto, be to organizmas patiria įvairius stresus, jį nepalankiai veikia ekologinės sąlygos, persirgtos ligos, gydymasis antibiotikais, spindulių terapija arba chemoterapija. Bifidobakterijų sumažėjimas - vienas iš disbakteriozės požymių. Normalią žarnyno mikrobiocenozę galima palaikyti vartojant biologiškai vertingus produktus su bifidobakterijomis, gebančiomis apsigyventi žarnyne, neleidžiančiomis vystytis puvinio ir patogeninei mikroflorai (US patentas Nr. 4298619). Todėl jau eilę metų žmonija vartoja įvairius maisto produktus, turinčius minėtų bifidobakterijų, kad atstatytų susidariusią organizme disbakteriozę. (US patentai Nr. Nr. 4298619, 4645667, 4806368; EP - 0667107, FR - 2560046).

25

30

Yra žinomi rauginto pieno produktai, turintys bifidobakterijų, kurie pagaminti iš rauginto nenugriebto arba nugriebto pieno. Pieno rauginimui kaip pieno raugas naudojamos tokios bifidobakterijos: *B. adolescentis* padermė VKPM B-1987 (buv. SU

aut. I. Nr. 863639), *B. adolescentis* padermė MC-42 B-1987 (VNIIGenetika kolecija) (LT patentas Nr. 3955), (*B. longum* padermė VKPM B-2000 (buv. SU aut. I. Nr. 849779), *B. bifidum* padermė VKPM B-3300 (buv. SU aut. I. Nr. 1347221).

Pagrindinis šių produktų trūkumas yra tas, kad įvairiems žmonėms produktai
5 nevienodai suteikia gydomąjį efektą, nes kiekviename individualiame žmogaus organizme dominuoja tik tam tikras žarnyno bifidobakterijų arba jų kombinacijų tipas.

Šis trūkumas dalinai pašalinamas naudojant dviejų bifidobakterijų simbiotinį raugą, sudarytą iš *B. bifidum* padermės VKPM B-3300 ir *B. longum* padermės VKPM B-2000 (buv. SU aut. I. Nr. 1817185). Aprašoma, kad naudojant 2 bifidobakterijų
10 raugą sutrumpėja rauginimo laikas ir aktyvių bifidobakterijų kiekis padidėja iki 10^{10} vnt/ml.

Taip pat žinomi rauginto pieno produktai, kuriuose yra trys pagrindiniai bifidobakterijų tipai - *B. bifidum* (VKPM B-3300 padermė), *B. longum* (VKPM B-2000 padermė) ir *B. adolescentis* (VKPM B-1987 padermė), kurių kiekvieno tipo
15 koncentracija rauginto produkto terpėje yra ne mažesnė kaip 10^8 vnt/ml. (LT patentas Nr. 3972).

Išeinant iš gyvosios gamtos optimalaus vientisumo principo yra netikslinga ilgą laiką gaminti fiksuotų mono arba dviejų tipų bifidobakterijas turinčius produktus, kadangi tai gali iššaukti milijonams žmonių bendro mikrobino stovio ir žarnyno floros
20 neigiamus pokyčius. Šių pokyčių padariniai praktiškai gali būti menkai prognozuojami, nes gali pasireikšti net ir po daugelio metų nuo produkto vartojimo pradžios. Produkto su gyvomis bifidobakterijomis vartojimo laikas priklausomai nuo nuo įpakavimo būdo trunka nuo 2 iki 7 dienų (kai kurie produktai, pvz., jogurtas gali būti vartojami ir ilgiau). Iš čia seka, kad produktą gaminti turi kiekvieno regiono
25 nacionalinės įmonės, nes produkto eksportas-importas gali būti ribojamas ne tik trumpu produkto realizacijos laiku, bet ir muitinės formalumais bei įvairiomis kontrolėmis.

Šio išradimo tikslas yra pateikti gyvybingų bifidobakterijų simbiotinį mišinį, sudarytą iš penkių dažniausiai žmogaus organizme sutinkamų bifidobakterijų
30 padermių, kuris gali būti pridedamas (įterpiamas) į plataus asortimento maisto produktus, tokius kaip įvairūs nerauginto pieno produktai, įvairūs rauginto pieno produktai ir nefermentuoti maisto produktai (visų rūšių alus ir majonezas ir kt.) bei pateikti šių produktų gamybos būdą.

Tikslas pasiekiamas tuo, kad pateikiamas gyvybingų bifidobakterijų simbiotinis mišinys, sudarytas iš 5 bifidobakterijų padermių, tokių kaip *Bifidobacterium bifidum* AS 1 padermės (deponuotos Latvijos tarptautiniame mikroorganizmų muziejuje, kolekcijos Nr. P569) ir AS 6 padermės (deponuotos ten pat, kolekcijos Nr P573),

5 *Bifidobacterium breve* AS 4 padermės (deponuotos ten pat, kolekcijos Nr. P572), *Bifidobacterium adolescentis* AS 3 padermės (deponuotos ten pat, kolekcijos Nr. P571) ir *Bifidobacterium longum* AS 2 padermės (deponuotos ten pat, kolekcijos Nr. P570), kurios sudaro mišinį paimtos lygiomis dalimis. Visos šios bifidobakterijų padermės yra saugomos ir dauginamos AB "Bakteriniai preparatai" Kaune. Jų

10 analizė atliekama pagal "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", V. 2, 1986, 1424-1430 pp. nurodytas metodikas.

Bifidobakterijų simbiotinis mišinys yra gaunamas sumaišant aukščiau minėtas penkias gyvybingų bifidobakterijų padermes, kurios yra artimos pagal savo kultūrinės ir fiziologines-biochemines savybes. Bifidobakterijų simbiotinis mišinys pasižymi tuo,

15 kad jis turi bendrą kompleksą savybių, kurios būdingos atskiroms bifidobakterijų padermėms, todėl toks mišinys greičiau prigyja žmogaus žarnyne ir dėl savo plataus specifinio poveikio greičiau normalizuoja žarnyno mikroflorą. Simbiotinio mišinio analizė atlikta pagal įprastas metodikas, aprašytas "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", V. 2, 1986, 1424-1430 pp.

20 Simbiotinio mišinio, sudaryto iš penkių gyvybingų bifidobakterijų: *B. bifidum* AS1 padermės, *B. longum* AS 2 padermės, *B. adolescentis* AS 3 padermės, *B. breve* AS 4 padermės, *B. bifidum* AS 6 padermės kultūrinės ir morfologinės savybės pateikiamos 1 lentelėje.

25 1 lentelė

Kokybės rodikliai	Reikalavimai pagal normatyvinę-techninę dokumentaciją	Analizės rezultatai
Aprašymas	Puri, rusvos spalvos masė	Atitinka
Tirpumas	Ne > 5 min.	3 min.
pH	5,7 ± 1,3	6,32
Liekamoji drėgmė	Ne > 3,5 %	2,07 %
Tapatybė	<u>Morfologinės savybės:</u> tepinėliuose gramo metodu - gr ⁺ nesporinės lazdelės su išsišakojimais ir sustorėjimais galuose arba grūdėtos lazdelės su sustorėjimais galuose.	Atitinka

	<u>Kultūrinės savybės</u>: tioglikolio terpėje auga vinių, grūdų (80 %) ir trupinių (20 %) formos pavidalo kolonijos; aerobinėmis sąlygomis neauga standžių terpių paviršiuje. <u>Biocheminės savybės</u>: katalizės reakcija - neigiama, ureazės neturi, želatinos neskystina, fermentuoja gliukozę, laktozę, sacharozę; nefermentuoja manitolio, maltozės, salicino, ksilozės, arabinozės, celobiozės, manozės, melocitozės, rafinozės, sorbitolio, ramnozės, trehalozės. <u>Jautrumas antibiotikams</u>: jautrus penicilinui, kefzolui, gentomicinui.	Atitinka Atitinka, nustatyta "Api - 20A" sistema Atitinka
Kontaminacija pašaline mikroflora	Neturi būti pašalinės mikrofloros	Nėra
Toksiškumas	Turi būti netoksiškas	Netoksiškas
Specifinis aktyvumas (gyvybingų ląstelių kiekis 1 ml)	$Ne < 5 \times 10^7$	$11,35 \times 10^8$
Rūgščių sudarymas	$Ne < 90^\circ T$	$131,6^\circ T$
Antagonistinis aktyvumas testo padermių <i>S. flexneri</i> 170, <i>S. flexneri</i> 337, <i>S. sonnei</i> 5063 atžvilgiu	Mišrioje kultūroje išgyvenusių testo kultūrų ląstelių kiekis ne didesnis kaip 2 %, lyginant su kontrolinėmis kultūromis.	Testo kultūros neišaugo mišrių kultūrų pasėliuose

Bifidobakterijas kultivuoti pramoniniu būdu pieno terpėje yra gana sudėtinga, nes tam reikia griežtai anaerobinių sąlygų, o tas reikalauja brangiai kainuojančios aparatūros bei aukšto lygio kultivavimo technikos. Bifidobakterijos neauga gryname karvės piene, joms reikia augimo stimuliatorių. Šiame išradime buvo naudotos trys bifidobakterijų augimą stimuliuojančios terpės:

- 1. kukurūzų-laktozės;
- 2. tioglikolio; ir
- 3. Blauroko terpė.

Labiausiai pageidautina yra tioglikolio terpė, nes ji patogi paruošti ir naudoti. Jos sudėtyje yra visi bifidobakterijų augimui ir dauginimui reikalingi ingredientai.

Šiose terpėse atgaivinti liofilizuoti penki bifidobakterijų kamienai padauginami iki reikiamo kiekio, po to sumaišomi ir įterpiami į reikalingą paruoštą maisto produktą. Maisto produkte bifidobakterijų koncentracija sudaro 10^6 - 10^7 V/ml. Tokia

bifidobakterijų koncentracija yra pakankama teigiamam poveikiui į žmogaus organizmą ir be to nesukelia nerauginto pieno produktų padidintą rūgimo greitį. Produktai, turintys penkis bifidobakterijų kamienus turi profilaktinių gydomųjų savybių, pasižymi homeopatinio poveikio į patogeninius mikroorganizmus plačiu
5 spektru, esant disbakteriozei atstato bifidobakterijų florą virškinamajame trakte bei sustiprina žmogaus imuninę sistemą.

Šiame išradime patentuojamas gyvybingų bifidobakterijų simbiotinis mišinys panaudojamas gaminant tokius plataus asortimento nerauginto pieno produktus kaip natūralus pasterizuotas pienas, liesas pasterizuotas pienas, pasterizuotas pienas
10 (0,5 %, 1,0 %, 2,0 %, 2,5 % ir 3,2 % riebumo), pasterizuotas baltymingas pienas (1,0 % ir 2,0 % riebumo), rauginto pieno produktai, tokie kaip kefyras (1,0 %, 2,5 %, 3,2 % riebumo), grietinė (25 % ir 30 % riebumo) bei jogurtas, nefermentuotus maisto produktus, tokius kaip visų rūšių alus arba majonezas.

Siūlomas nerauginto pieno produktų gamybos būdas atliekamas taip:
15 pasterizuoto, šutinto, baltymingo arba kitokio pieno gamybai žaliava pagal riebumą normalizuojama separuojant pieną iki reikiamo riebumo, arba pilant į liesą pieną grietinėlę arba riebesnį pieną. Baltymingo pieno gamybai atrinktas pienas normalizuojamas nurodytais būdais iki reikiamo riebumo, o po to iki reikiamo sausųjų medžiagų kiekio. Baltymų kiekis didinamas pilant paskaičiuotą sutirštinto lieso pieno,
20 ištirpintų lieso pieno arba pieno miltelių kiekį.

Po to normalizuotas pagal riebumą ir sausąsias medžiagas pienas pašildomas ir išvalomas išcentriniais valytuvais. Skoniui pagerinti visas didesnio negu 2,5 % riebumo pienas homogenizuojamas prieš pasterizaciją arba po pasterizacijos. Išvalytas 45-47 °C temperatūros pienas homogenizuojamas 10-15 MPa slėgimu.

25 Toliau normalizuotas arba natūralus, homogenizuotas arba nehomogenizuotas pienas pasterizuojamas 74-78 °C temperatūroje 20 sek. Pienas atšaldomas iki 15-17 °C, įterpiamas bifidobakterijų simbiotinio mišinio koncentratas (1,0 l/tonai) ir mišinys maišomas 5-10 minučių. Po to visų rūšių pienas atvėsinaamas iki 6 °C temperatūros ir išpilstomas į standartines pakuotes.

30 Gauti produktai laikomi ne aukštesnėje kaip 6-8 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 72 valandas. Priklausomai nuo pakuotės, realizacijos laikas gali būti prailgintas.

Pasterizuoto pieno su bifidobakterijomis organoleptiniai rodikliai:
Išvaizda ir konsistencija: vienalytis skystis, neturintis nuosėdų ir dribsnių.

Spalva: balta arba gelsvo atspalvio balta; lieso - melsvo atspalvio; šutinto - kreminio atspalvio.

Skonis ir kvapas: charakteringas pienui, be pašalinio skonio ir kvapo; šutinto pieno - raiškus pasterizacijos prieskonis; pieno su sausu arba sutirštintu produktu - saldokas prieskonis. Gali jaustis silpnas priedų prieskonis.

Pasterizuoto pieno mikrobiologiniai rodikliai pateikiami 2 lentelėje.

2 lentelė

Rodiklio pavadinimas	Norma
Bendras bifidobakterijų skaičius 1 ml produkto, ne mažiau kaip	1×10^6
Bendras kitų bakterijų skaičius 1 ml produkto, ne mažiau kaip	1×10^5
Koliforminių bakterijų 1 ml produkto (turi nebūti)	0,1
Enteropatogeninių bakterijų 1 ml produkto (turi nebūti)	25
<i>S. aureus</i> 1 ml produkto (turi nebūti)	0,01

Pasterizuoto pieno fizikiniai-cheminiai rodikliai pateikiami 3 lentelėje.

3 lentelė

Pieno rūšis	Riebalai %, ne mažiau kaip	Sausų medžiagų %, ne mažiau kaip	Rūgštingumas, T°, ne daugiau kaip	Fosfatazė	Švarumo laipsnis, ne žemesnės grupės kaip	Tankis kg/m ³ , ne mažiau kaip
natūralus	3,5	-	18	-	1	1027
liesas	-	-	21	-	1	1030
1,0 % riebumo	1,0	-	21	-	1	1029
2,0 % riebumo	2,0	-	21	-	1	1027
2,5 % riebumo	2,5	-	21	-	1	1027
3,2 % riebumo	3,2	-	21	-	1	1027
pasterizuotas baltymingas pienas 1,0 %	1,0	12,6	21	-	1	1037

riebumo						
pasterizuotas baltymingas pienas 2,0 % riebumo	2,0	11,2	21	-	1	1036

Rauginto pieno produktai (kefyras, jogurtas, grietinė) gaminami pagal valstybės nustatytus standartus, o į pagamintą produktą įterpiama 0,1 masės % penkių gyvybingų bifidobakterijų simbiotinio mišinio. Tokie produktai yra ypatingai
5 vertingi, nes be gyvybingų bifidobakterijų jie dar turi ir pienarūgščių kultūrų raugo.

Kefyro su bifidobakterijomis fizikiniai-cheminiai rodikliai pateikiami 4 lentelėje.

4 lentelė

10

Kefyro rūšis	Riebumas, ne mažiau, %	Rūgštingumas, °T	Temperatūra, ne aukštesnė, °C	Peroksidazė
1,0 % riebumo	1,0	85-120	8	Nėra
2,5 % riebumo	2,5	85-120	8	Nėra
3,2 % riebumo	3,2	85-120	8	Nėra
liesas	-	85-130	8	Nėra

Kefyro su bifidobakterijomis organoleptiniai rodikliai:

Konsistencija ir išvaizda: vienalytė su nevienodais dribsniais; gali būti burbuliukų, paviršiuje gali būti išrūgų (ne daugiau
15 2 kefyro tūrio %).

Spalva: pieno baltumo, švelniai kreminė.

Skonis ir kvapas: pienarūgštis, gaivus, aštrokas, be pašalinio skonio ir kvapo.

100 g kefyro su bifidobakterijomis maistinė ir energetinė vertė pateikta 4
lentelėje.

20

4 lentelė

Kefyro rūšis	Baltymai, g	Riebalai, g	Angliavandeniai, g	Energetinė vertė, kkal
1,0 % riebumo	3,5	1,0	5,3	42
2,5 % riebumo	3,4	2,5	3,8	51
3,2 % riebumo	3,4	3,2	4,1	59
liesas	3,0	0,05	3,8	27,6

Grietinės su bifidobakterijomis fizikiniai-cheminiai rodikliai pateikti 5 lentelėje.

5

5 lentelė

Grietinės rūšis	Riebumas, ne mažiau, %	Rūgštingumas, °T	Temperatūra, ne aukštesnė, °C	Peroksidazė
25 % riebumo	25	60-100	8	Nėra
30 % riebumo	30	60-100	8	Nėra

Grietinės su bifidobakterijomis (abiejų riebumų) organoleptiniai rodikliai:

10

Konsistencija ir išvaizda: klampi, pakankamai tiršta, blizganti.

Salva: balta, gelsvo atspalvio, vienoda visame tūryje.

Skonis ir kvapas: pienarūgštis, charakteringas pasteurizuotam produktui aromatas.

100 g grietinės su bifidobakterijomis maistinė ir energetinė vertė pateikta 6 lentelėje.

15

6 lentelė

Grietinės rūšis	Baltymai, g	Riebalai, g	Angliavandeniai, g	Energetinė vertė, kkal
25 % riebumo	26	25	2,9	247
30 % riebumo	26	30	2,8	291

Išradimo aprašymą iliustruoja sekantys pavyzdžiai.

1 pavyzdys**1. Bifidobakterijų auginimo terpių paruošimas****1.1. Kukurūzų-laktozės terpės paruošimas**

	<u>Sudėtis:</u>	<u>g/l</u>
5	peptonas	10,0
	laktozė	10,0
	kukurūzų ekstrakto tirpalas vandenyje 1:6	50 ml
	natrio citratas	6,0
	magnio sulfatas	0,12
10	kalio dihidrofosfatas	2,0
	natrio dihidrofosfatas	1,0
	cistino hidrochloridas	0,15
	arba askorbo rūgštis	0,5
	agaras	1,0
15	distiliuotas vanduo	kas lieka iki 1000 ml.
	pH 7,0-7,2.	

Paruošimas:

Į 150-200 ml distiliuoto vandens įdedama 1 g agaro, kuris išlydomas vandens vonioje iki kol visiškai ištirpsta. Į likusį (800-850 ml) distiliuotą vandenį sudedama 10 g peptono, 50 ml vandeniui atskiesto kukurūzų ekstrakto, 6 g natrio citrato, 0,12 g magnio sulfato, 2 g kalio dihidrofosfato ir 1 g natrio dihidrofosfato. Gautas mišinys šildomas iki 85-90 °C temperatūros, po to sumaišomas su išlydytu agaru, pridedama 10 g laktozės ir 0,15 g cistino hidrochlorido arba 0,5 g askorbo rūgšties. (Cistinas iš anksto ištirpinamas 20-30 ml distiliuoto vandens, maišant lašais pridedama 30-40 % NaOH tirpalo, kol viskas ištirpsta).

Gautas tirpalas užpilamas karštu distiliuotu vandeniu iki 1 l ir jo pH sureguliuojamas iki 7,0-7,2 naudojant 30-40 % NaOH tirpalą (apie 10 ml).

Terpė sterilizuojama 30 minučių dviejų litrų talpos induose 0,05 mPa slėgyje, du kartus su ne trumpesne, negu 8 val. ir ne ilgesne, negu 20 val. petrauka.

Paruošta terpė laikoma ne ilgiau kaip 1 mėnesį iki 20 °C temperatūroje. Prieš vartojimą terpė pašildoma 10-15 minučių verdančio vandens vonioje, o po to atvėsinama iki 37-38 °C.

1.2. Tioglikolio terpės paruošimas

	<u>Sudėtis:</u>	<u>g/l</u>
	kazeino fermentinis hidrolizatas	15,0
	mielių ekstraktas (vitamininis preparatas)	5,0
	natrio chloridas	2,5
5	gliukozė	5,0
	natrio tioglikoliatas	0,5
	cisteino dihydrochloridas	0,75
	agaras	0,75
	natrio karbonatas	0,6-1,0.
10	pH 6,8-7,2.	

Naudojami OXOID firmos sausi milteliai. Terpė ruošama taip: į 1 litrą distiliuoto vandens patalpinama natrio tioglikoliatas ir agaras. Mišinys pašildomas, kol viskas ištirpsta, po to sudedami likę komponentai, natrio karbonato pagalba sureguliuojamas terpės pH iki 6,8-7,2. Paruošta terpė išpilstoma į flakonus arba mėgintuvėlius, sterilizuojama 15 minučių 121 °C temperatūroje. Paruošta terpė laikoma šaldytuve ne ilgiau kaip 1 mėnesį.

1.3. Blauroko terpės paruošimas

	<u>Sudėtis:</u>	<u>g/l</u>
	kepenų nuoviras	1,0 l
20	natrio chloridas	5,0
	peptonas	10,0
	agaras	0,75
	laktozė	10,0
	L-cisteino hidrochloridas	0,1.
25	pH 7,2-7,4	

Kepenų nuoviro gamyba:

Imamos šviežios nešaldytos gyvulio kepenys, nupjaunamos plėvės, nulupamas apvalkalas, išimami tulžies latakai. Paruoštos kepenys supjaustomos gabaliukais, pasveriamos. 1 kg kepenų užpilamas 2 l distiliuoto vandens ir virinamas 1 valandą. Po to viralas perfiltruojamas per popierinį filtrą į butelius, užkemšamas kamščiais ir sterilizuojamas autoklave 112 °C temperatūroje 30 minučių tekančiais garais.

Kepenų nuoviras gali būti laikomas iki 1 metų ne aukštesnėje kaip 20 °C temperatūroje.

Terpės paruošimas:

- Paruoštas kepenų nuoviras, peptonas, natrio chloridas ir agaras sudedami
- 5 nurodytais kiekiais, pašildoma, kol ištirpsta agaras, sureguliuojamas pH iki 7,8-7,9, po to pavirinamas 20 minučių ant silpnos ugnies, paliekama nusistovėti ir perfiltruojamas. Gautas tirpalas skiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 1 l. Po to sudedama laktozė ir L-cisteino hidrochloridas, gerai išmaišoma ir išpilstoma į flakonus arba mėgintuvėlius ir sterilizuojama 112 °C temperatūroje 30 minučių.
- 10 Taip gauta Blauroko terpė tinka naudoti 1 mėnesį.

2 pavyzdys

Gyvybingų bifidobakterijų simbiotinio mišinio koncentrato paruošimas

2.1. Bifidobakterijų kamienų atgaivinimas:

- 15 Bifidobakterijų kamienai atgaivinami naudojant kukurūzų-laktozės, tioglikolio arba Blauroko terpes.

Į kiekvieną buteliuką (gerai nuvalius kamštelį spiritu), kuriame yra 4 ml liofilizuotų bifidobakterijų įpilama po 4 ml mitybinės terpės. Gerai išmaišoma ir perkeliama po 1 ml bakterijų suspensijos į 10 ml mitybinės terpės. Gerai išmaišoma

20 ir po 1 ml bakterijų suspensijos perkeliama į sekantį mėgintuvėlį su 10 ml mitybinės terpės, o iš jo 1 ml - į trečią mėgintuvėlį su 10 ml mitybinės terpės.

Mėgintuvėliai laikomi termostate 37 °C temperatūroje 48-72 valandas, kol terpė pradeda drumstis (ryškus augimas).

- Taip atgaivinami visi penki bifidobakterijų kamienai, kurie gali būti saugomi 2-8
- 25 °C temperatūroje iki 30 parų, prieš tai suregulavus pH iki 6,2-7,0. pH koreguojama 5 % NaOH tirpalu. Į išaugusios bifidobakterijų kultūros 10 ml pridedama po 0,3 ml 5 % NaOH. Gerai išmaišoma, paliekama kelioms valandoms kambario temperatūroje, o po to dedama į šaldytuvą laikymui.

2.2. Gyvybingų bifidobakterijų simbiotinio mišinio koncentrato paruošimas:

- 30 Iš 2.1. stadijoje paruoštų (atgaivintų) bifidobakterijų gaminamas priedas pienui, kefyrai, grietinei arba kitokiems nefermentuotiems produktams.

1. Į 100 ml tioglikolio mitybinės terpės pridedama 5 ml atgaivintų bifidobakterijų terpės. Auginama 16-24 valandas 37 °C temperatūroje.

2. Iš išaugusio bifidobakterijų "inokulianto" (apie 105 ml) ruošiamas reikiamas kiekis bifidobakterijų, gautą terpę supilant į 2 l naujos mitybinės tepės, kad 1 tonai pieno produkto būtų įdedama 1 l bifidobakterijų mišinio.

Jeigu yra 10 tonų pieno produkto (pieno, kefyro, grietinės arba kitokio nefermentuoto produkto), tai reikia pasigaminti, pvz., tioglikolio mitybinėje terpėje po 2 litrus kiekvieno kamieno suspensijos, kad būtų gauta 10 l 5-kių bifidobakterijų gyvibingas simbiotinis mišinys, kuris įterpiamas į 10 tonų atšaldyto pieno, kefyro, grietinės arba kitokio nefermentuoto produkto, tokio kaip alus, majonezas talpas, po to gerai išmaišoma (apie 5-10 minučių), produktai atšaldomi ir išpilstomi į atitinkamas tam produktui pakuotes.

3 pavyzdys

Majonezo, turinčio gyvybingų bifidobakterijų simbiotinio mišinio, gamybos būdas

Į 1 toną paruošto vartojimui majonezo (sumažinto riebumi iki 60 %) įterpiamas 1 litras simbiotinio bifidobakterijų mišinio, pagaminto pagal 2 pavyzdį. Naujai gautas produktas rūpestingai maišomas (6-7 minutes), išpilstomas į vartotojui skirtą tarą, atšaldomas iki 2-6 °C temperatūros, kurioje laikomas visą realizacijos laiką. 100 g energetinė vertė - 388 kcal.

4 pavyzdys

Jogurto, turinčio gyvybingų bifidobakterijų simbiotinio mišinio, gamybos būdas

Į 1 toną paruošto vartojimui jogurto įterpiama 1 litras simbiotinio bifidobakterijų mišinio, pagaminto pagal 2 pavyzdį. Naujai gautas produktas rūpestingai maišomas (6-7 minutes), išpilstomas į vartotojui skirtą tarą, atšaldomas iki 2-6 °C temperatūros, kurioje laikomas visą realizacijos laiką. 100 g tokio jogurto yra: baltymų - 0,7 g; riebalų - 1,0 g; angliavandenių - 8,2 g.

5 pavyzdys

Alaus, turinčio gyvybingų bifidobakterijų simbiotinio mišinio, gamybos būdas

Į 10 tonų paruošto išpilstymui šviežio nepasterizuoto stipraus alaus pripilama 10 l simbiotinio bifidobakterijų mišinio, pagaminto pagal 2 pavyzdį. Naujai gautas produktas rūpestingai maišomas (6-7 minutes), išpilstomas į vartotojui skirtą tarą, atšaldomas iki 2-12 °C temperatūros, kurioje laikomas visą realizacijos laiką.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Gyvybingų bifidobakterijų simbiotinis mišinys, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis sudarytas iš penkių gyvybingų bifidobakterijų, tokių kaip *Bifidobacterium bifidum* AS 1 padermės (deponuotos Latvijos tarptautiniame mikroorganizmų muziejuje, kolekcijos Nr. P569) ir AS 6 padermės (deponuotos ten pat, kolekcijos Nr. P573), *Bifidobacterium breve* AS 4 padermės (deponuotos ten pat, kolekcijos Nr. P572), *Bifidobacterium adolescentis* AS 3 padermės (deponuotos ten pat, kolekcijos Nr. P571) ir *Bifidobacterium longum* AS 2 padermės (deponuotos ten pat, kolekcijos Nr. P570), esančių vienodu masės santykiu.
2. Nerauginto pieno produktas, turintis bifidobakterijų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi 0,1 masės % gyvybingų bifidobakterijų simbiotinio mišinio pagal 1 punktą, kurio koncentracija produkte yra 10^6 - 10^7 V/ml.
3. Nerauginto pieno produktas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad juo gali būti nerauginto pieno produktas, toks kaip natūralus pasterizuotas pienas, liesas pasterizuotas pienas, 1 %, 2 %, 2, 5 % arba 3,2 % riebumo pienas arba 1 % ir 2 % riebumo pasterizuotas baltymingas pienas, turintis gyvybingų bifidobakterijų simbiotinio mišinio pagal 1 punktą.
4. Rauginto pieno produktas, turintis bifidobakterijų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi 0,1 masės % gyvybingų bifidobakterijų simbiotinio mišinio pagal 1 punktą, kurio koncentracija produkte yra 10^6 - 10^7 V/ml.
5. Rauginto pieno produktas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad juo gali būti rauginto pieno produktas, toks kaip 1 % , 2,5 % , 3,2 % riebumo kefyra arba 25 % ir 30 % riebumo grietinė arba įvairių rūšių jogurtas, turintis gyvybingų bifidobakterijų simbiotinio mišinio pagal 1 punktą.
6. Nefermentuotas maisto produktas, turintis bifidobakterijų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi 0,1 masės % gyvybingų bifidobakterijų simbiotinio mišinio pagal 1 punktą, kurio koncentracija produkte yra 10^6 - 10^7 V/ml.

7. Nefermentuotas maisto produktas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad juo gali būti įvairių rūšių majonezas arba alus.

8. Maisto produktų pagal 2-7 punktus gamybos būdas, apimantis maisto produkto pagal nustatyto valstybės standarto pagaminimą ir jo atšaldymą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į paruoštą ir atšaldytą iki 15-17 °C temperatūros maisto produktą įterpia 0,1 masės % gyvybingų bifidobakterijų simbiotinio mišinio pagal 1 punktą, gerai išmaišo 6-7 minučių laikotarpyje, ir gautą produktą laiko 6-8 °C temperatūroje.

10

15

20

25

30