



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85149** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**
C12N 1/20
A23C 19/00
A23C 19/068 (2008.01)
C12R 1/245 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ ЛАКТОБАЦИЛЛУС CASEI SSP. RHAMNOSUS, ЩО ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ У ВИРОБНИЦТВІ ЗАКВАШУВАЛЬНИХ КУЛЬТУР ДЛЯ ТВЕРДИХ І НАПІВТВЕРДИХ СИЧУЖНИХ СИРІВ

1

2

(21) а200712472
(22) 12.11.2007
(24) 25.12.2008
(46) 25.12.2008, Бюл.№ 24, 2008 р.
(72) КІГЕЛЬ НАТАЛЯ ФЕДОРІВНА, UA, ШУЛЬГА НАТАЛІЯ МИХАЙЛІВНА, UA
(73) ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ІНСТИТУТ МОЛОКА ТА М'ЯСА УААН, UA
(56) UA 55091 A, 17.03.2003
UA 10134 A, 30.09.1996
UA 74726 C2, 16.01.2006
UA 12788 U, 17.10.2005

UA a200508098, 11.03.2008
UA 76906 C2, 15.09.2006
UA 10310 U, 15.11.2005
Кігель Н.Ф. Технології бактеріальних препаратів для функціональних продуктів і біологічно активних добавок. Автореферат на здобуття наукового ступеня доктора технічних наук. Київ-2003
(57) Штам бактерій *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* IMB B-7059, що використовується у виробництві заквашувальних культур для твердих і напівтвердих сичужних сирів.

Винахід відноситься до біотехнології та є штамом лактобацил, що використовують у виробництві заквашувальних культур для твердих і напівтвердих сичужних сирів.

Мезофільні факультативно-гетероферментативні молочнокислі палички часто залучають до складу мікрофлори багатьох сирів. Вони беруть участь у перетворенні основних складових компонентів сирної маси (лактози, білків та жиру) на сполуки, що впливають на формування органолептичних показників продукту. Характер та інтенсивність їхнього впливу на якість сирів залежать від індивідуальних властивостей культур. Використання у складі заквашувальних культур спеціально селекціонованих штамів лактобацил дає змогу інтенсифікувати визрівання завдяки спрямованому продукуванню розчинних азотовмісних фракцій та легких вільних жирних кислот, мінімізувати кількість похідних β -казеїну (гірких пептидів), урегулювати текстуру зрілого сиру. Зброджуючи лактозу, більшість штамів виду *Lactobacillus casei* утворюють не лише молочну кислоту, але й невеликі кількості оцтової кислоти, ацетоїну, діацетилу, вуглекислого газу, позитивно впливаючи на аромат продукту та формування у ньому рисунку. Лактобацили володіють вираженою

антагоністичною активністю відносно широкого кола аеробних та факультативно-анаеробних грампозитивних і грамнегативних бактерій, що поліпшує показники безпеки продукту. Крім того, штами, які залучають до складу заквашувальних культур для виробництва сирів, поряд з вираженою протеполітичною активністю та здатністю до утворення смако-ароматичних речовин, повинні характеризуватися помірним рівнем кислотоутворення, добрим синерезисом молочного згустку, стійкістю до режимів теплової обробки сирного зерна, високої концентрації кухонної солі, загрози враження бактеріофагами та забруднення сторонньою мікрофлорою.

Відомо штам *Lactobacillus acidophilus* неслизистих рас, який застосовують у способі виробництва твердого сиру [Патент України №3921, A23C19/068, 1994]. Цей штам вирізняється високим рівнем антагонізму до сальмонел, стафілококів та кишкової палички у сирній масі. Внесення ацидофільної палички у молочну суміш у кількості 1-2% забезпечує скорочення технологічного процесу і прискорення визрівання сиру з поліпшеними органолептичними показниками. Однак штам *L. acidophilus* характеризується високою кислотоутворюючою активністю, що є небажаним, оскільки

(13) **C2**

(11) **85149**

(19) **UA**

може викликати такі вади готового сиру як "кислий смак", "самокол". Крім того, ацидофільні палички не є вдалим складником сухих заквашувальних культур внаслідок низького ступеня їх виживання під час ліофілізації.

Найближчим до штаму, що заявляється, є штам *Lactobacillus helveticus*, що використовують у виробництві заквашувальних культур для твердих сичужних сирів [Патент №76906 Україна, С12N1/20, А23С19/032, С12R1/225, 2006]. Цей штам характеризується високим рівнем протеолітичної активності, утворенням щільного згустку, що розколюється, з добрим виділенням сироватки, термостійкістю та полірезистентністю до бактеріофагів, значним ступенем виживання бактеріальних клітин під час їхнього заморожування та сублімаційного сушіння. Застосування штаму *L. helveticus* дозволяє отримувати тверді сичужні сири з високою температурою другого нагрівання з вираженим смаком та ароматом і високим ступенем визрівання. Однак даний штам є стійким до NaCl у концентрації лише до 4,5%, що робить його непридатним для застосування у виробництві напівтвердих сирів з частковим солінням у зерні та розсольних сирів. Окрім того, штам *Lactobacillus helveticus* володіє антагоністичною активністю щодо обмеженого числа грамнегативних бактерій.

Завданням винаходу є одержання високоактивного штаму *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* - скорочена назва *L. rhamnosus*, - що має виражену антагоністичну дію по відношенню до широкого кола патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, помірну енергію кислотоутворення в молоці і добрий синерезис молочного згустку, високі здатність до утворення ароматичних сполук і низькомолекулярних пептидів, соле- і термостійкість, низьку чутливість до нітрату калію, а також стійкість до таких технологічних операцій як заморожування та сублімація.

Штам *L. rhamnosus* був одержаний в результаті спрямованої селекції культури, виділеної з домашнього сиру гірських районів Карпат. Ідентифікований як вид *L. rhamnosus* за основними морфологічними, культуральними і фізіолого-біохімічними властивостями [Краткий определитель Берги, 1982; Л.А. Банникова. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности, 1975]. Штам задепоновано в колекції промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ і зареєстровано під номером 1МВ В-7059.

Штам *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* 1МВ В-7059 використовується у виробництві заквашувальних культур для твердих і напівтвердих сичужних сирів.

Штам *L. rhamnosus* характеризується такими ознаками та властивостями.

Культурально-морфологічні ознаки штаму. Клітини штаму паличкоподібні, нерухомі, грампозитивні. Мають товщину від 0,5 до 0,7 мкм та довжину від 3 до 5 мкм, розміщуються у вигляді окремих клітин або коротких ланцюжків. В агаризованому середовищі з гідролізованим молоком, агаризованому середовищі МРС утворює колонії білого кольору 1,0-2,0 мм в діаметрі у вигляді

"човників" або дисків, на поверхні агару - дрібні, білуваті, плоскі колонії. У рідкій культурі росте у вигляді рівномірної каламуті та дрібнодисперсного осаду на дні.

Фізіолого-біохімічні властивості штаму. Штам є факультативним анаеробом. Штам росте за температури від +15°C до +45°C, оптимальна температура росту - (38±1)°C. Штам коагулює білки молока за цієї температури і посівної дози 3% упродовж 12-14 годин. Утворює однорідний щільний згусток з відокремленням сироватки приємного кисломолочного смаку. Гранична кислотність у молоці досягає 210°Т. Нагромадження клітин в молоці складає 8,0-10⁸ КУО/см. Штам ферментує рамнозу, глюкозу, лактозу, галактозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, маніт, сорбіт, манозу, не ферментує ксилозу, мелібіозу, арабінозу, рафінозу, гліцерин. Росте за присутності NaCl та жовчі не вище 6,0% та 40% відповідно, не росте у м'ясоптонному бульйоні з активною кислотністю, вищою за рН 9,6; не утворює аміаку з аргініну.

Технологічні властивості штаму. Штам *L. rhamnosus* згортає молоко, утворюючи щільний згусток, що розколюється, з добрим синерезисом та помірним рівнем граничної кислотності (табл. 1). Через 3 години ферментування титровна кислотність молочної суміші не перевищує 30°C. Такий темп кислотоутворення, властивий штаму *L. rhamnosus*, сприяє поступовому підкисленню сирної маси до нормованих значень, уникаючи надмірного нагромадження кислоти та необхідності внесення додаткової кількості води для промивання сирного зерна. Штам, що заявляється, на відміну від штаму *L. helveticus*, забезпечує утворення молочного згустку з меншою кінематичною в'язкістю та повнішою коагуляцією білку, за рахунок чого вміст білкових сполук у сироватці нижчий. Такі показники гарантують формування сирного зерна з інтенсивним відділенням сироватки та мінімізують втрати сухих речовин за рахунок утворення сирного пилу. Штам, що заявляється, є термостійким і витримує обробку впродовж 60 хвилин як за 50°C, так і за 60°C, що дає можливість застосовувати його у виробництві сирів з низькою і високою температурою другого нагрівання. Позитивною властивістю штаму порівняно з прототипом є його стійкість до високих концентрацій NaCl до 6%, завдяки чому штам *L. rhamnosus* можна залучати до складу заквашувальної мікрофлори сирів з частковим солінням у зерні та розсольних сирів. Крім того, штам *L. rhamnosus* вигідно відрізняється від штаму *L. helveticus* за чутливістю до дії нітрату калію, який часто використовують у виробництві сирів з тривалим терміном визрівання для пригнічення розвитку споруутворювальних бактерій. Втрата активності штаму, що заявляється, за внесення у молоко максимально дозволеної кількості KNO₃ - 300г на 1т молочної суміші - становить не більше 8%. Високий ступінь виживання бактеріальних клітин *L. rhamnosus* під час заморожування та сублімаційного сушіння - 97,5% - дає змогу одержувати високоактивний сухий бактеріальний концентрат та препарат прямого внесення.

Антагоністична активність штаму. Штам *L. rhamnosus* значно перевищує штам *L. helveticus* як

за ширшим спектром чутливої мікрофлори, так і за інтенсивністю дії (табл. 2). Зокрема, штам, що заявляється, ефективніше пригнічує розвиток *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus morganii*, *Proteus rettgeri*, *Enterobacteria cloacae*, *Bacillus subtilis*, а за розміром зони затримки росту *Proteus vulgaris* 2029 не поступається відомому штамму. Такі характеристики штамму *L. rhamnosus* дозволяють поліпшити санітарні показники продуктів, вироблених з його застосуванням.

Біохімічні властивості штамму. Штамм *L. rhamnosus* характеризувався достатньо високою протеолітичною активністю та здатністю до нагромадження речовин, які впливають на смак і аромат сиру (табл. 3). Протеолітичну активність оцінювали за вмістом низькомолекулярних продуктів розщеплення білків молока після 24-годинної інкубації за температури $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$, а здатність до синтезу ароматичних сполук - за вмістом діацетилу, легких органічних кислот і ефірів у молочному згустку. Хоча за кількістю вільних амінокислот штамм *L. rhamnosus* дещо поступається штамму *L. helveticus*, однак за рівнем утворення низькомолекулярних пептидів, кількість яких у молоці досягає $4,88\text{мг}/\text{см}^3$, він переважає прототип. Така висока здатність до нагромадження розчинних білкових сполук з низькою молекулярною масою дозволить уникнути формування гіркої присмаку в готовому продукті, а кількість вільних амінокислот є достатньою для досягнення зрілості сиру на 45 добу. Штамму *L. rhamnosus* властиве нагромадження речовин, що обумовлюють смак та аромат сиру, у значно більших кількостях, ніж *L. helveticus*. Так, вміст діацетилу у молочному згустку, утвореному під час ферментування *L. rhamnosus*, становив до $3,75\text{мг}/100\text{см}^3$, легких органічних кислот - до $1,6\text{мекв}/100\text{см}^3$, складних ефірів у перерахунку на оцтовоетиловий ефір - близько $36,3\text{мг}/100\text{см}^3$. Такі властивості штамму, що заявляється, здатні забезпечити одержання сичужних сирів з вираженими смаковими якостями та приємним ароматом. Винахід пояснюється прикладами використання штамму.

Приклад 1. Одержання лабораторної закваски *L. rhamnosus*.

В 100см^3 стерилізованого молока з температурою $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ вносять 1% свіжої чистої культури *L. rhamnosus* і термостатують за вказаної температури до утворення згустку, після чого охолоджують і використовують для приготування пересадкової лабораторної або виробничої закваски. Для цього в стерилізоване молоко з температурою $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ вносять 3% первинної лабораторної за-

кваски і витримують за вказаної температури до утворення згустку протягом 14-16 годин. Кількість життєздатних клітин *L. rhamnosus* у заквасці складає $8 \cdot 10^8 \text{КУО}/\text{см}^3$.

Приклад 2. Виробництво бактеріального концентрату *L. rhamnosus*.

У 100дм^3 водопровідної води з температурою 45°C розчиняють 3,0кг сухого знежиреного молока та встановлюють рН 6,7. Одержане молоко підігривають до температури 55°C та вносять 50г протосубтіліну ГЗХ активністю 70од/г. Гідроліз молока проводять за температури 55°C протягом 3 годин. У гідролізоване молоко додають компоненти у таких кількостях: лактоза - 1000г, глюкоза - 500г, дріжджовий екстракт - 500г, натрій лимоннокислий тризаміщений - 500г, натрій оцтовокислий однозаміщений - 300г, магній сірчанокислий - 20г. Ростове середовище стерилізують за температури 121°C упродовж 25 хвилин та охолоджують до температури 39°C . Активну кислотність ростового середовища встановлюють на рівні 6,7од. рН і вносять $5,0\text{дм}^3$ закваски *L. rhamnosus*. Культивування проводять протягом 16 годин за температурою 39°C з періодичним перемішуванням та контролем активної кислотності ростового середовища на рівні 6,7од. рН, застосовуючи 25%-ний водний розчин аміаку. Після закінчення культивування ростове середовище охолоджують до температури 10°C та відокремлюють біомасу. Одержану біомасу змішують у співвідношенні 1:2 із захисним середовищем такого складу (в $\text{г}/\text{дм}^3$): тризаміщений лимоннокислий натрій - 50, сахароза - 100, вода - до 1дм^3 . Суспензію клітин у захисному середовищі розливають у стерильні кювети шаром 1см, заморожують у морозильній шафі за температури мінус 40°C упродовж 6год, після чого сушать у сублімаційній сушарці протягом 30год за таких режимів: початок сушіння за температурою мінус 25°C , закінчення - за температури плюс 30°C . Чисельність життєздатних клітин молочнокислих бактерій у 1г сухого бактеріального концентрату становить $8,0 \cdot 10^{10} \text{КУО}$. Бактеріальний концентрат використовують у виробництві твердих і напівтвердих сичужних сирів.

Штамм рекомендується для виробництва заквашувальних культур та сухих ліофілізованих бактеріальних препаратів для твердих і напівтвердих сичужних сирів. Застосування штамму *L. rhamnosus* дозволить уникнути забруднення сиру сторонньою мікрофлорою та дасть змогу отримати продукт з вираженим смаком і ароматом з достатнім ступенем визрівання.

Таблиця 1

Технологічні властивості молочнокислих бактерій

Показник	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. helveticus</i> (прототип)
Гранична кислотність у молоці, $^\circ\text{T}$	210	240
Титрова кислотність у молоці через 3 години ферментування, $^\circ\text{T}$	30	45
Синерезис молочного згустку, %	70	75

Продовження таблиці 1

Кінетична в'язкість молочного згустку за температури 20°C Па·с	5,3·10 ⁻⁵	7,7·10 ⁻⁵
Вміст білкових сполук у сироватці, мг/см ³	2,27	2,96
Солестійкість (розвиток у присутності NaCl):		
4,5%	+	+
5,0%	+	-
6,0%	+	-
Термостійкість упродовж 60 хвилин: за температури 50°C	+	+
за температури 60°C	+	+
Рівень інгібування KNO ₃ , %:		
200г на 1т молока	0	15
300г на 1т молока	8	20
Фагостійкість	+	+
Ступінь виживання під час ліофілізації, %	97,5	97,8

Таблиця 2

Антагоністична активність молочнокислих бактерій

Тест-культури	Величина зон затримки росту тест-культури, мм	
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. helveticus</i> (прото-тип)
<i>Escherichia coli</i> 111	17	11
<i>Escherichia coli</i> 113	26	18
<i>Proteus vulgaris</i> 2029	18	18
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	16	12
<i>Bacillus subtilis</i>	13	10
<i>Proteus morganii</i>	25	12
<i>Proteus rettgeri</i>	13	10
<i>Enterobacteria cloacae</i>	12	10

Таблиця 3

Біохімічні властивості молочнокислих бактерій у молоці

Показник	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. helveticus</i> (прото-тип)
Вміст вільних циклічних амінокислот, мг/см ³	0,21	0,29
Вміст вільних ациклічних амінокислот, мг/см ³	2,92	3,56
Вміст низькомолекулярних пептидів, мг/см ³	4,88	4,10
Вміст діацетилу, мг/100см ³	3,75	2,39
Вміст летких органічних кислот, мекв/100см ³	1,6	0,9
Вміст складних ефірів у перерахунку на оцтовоетиловий ефір, мкг/100см ³	36,3	28,8