



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **91417** (13) **C2**  
(51) **МПК (2009)**  
**C12N 1/20**  
**A23C 19/032 (2006.01)**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS, ЩО ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ У ВИРОБНИЦТВІ ЗАКВАШУВАЛЬНИХ КУЛЬТУР ДЛЯ СИЧУЖНИХ СИРІВ**

1

2

**(21)** а200812216

**(22)** 16.10.2008

**(24)** 26.07.2010

**(46)** 26.07.2010, Бюл.№ 14, 2010 р.

**(72)** КІГЕЛЬ НАТАЛЯ ФЕДОРІВНА, ШУЛЬГА НАТАЛІЯ МИХАЙЛІВНА

**(73)** ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ІНСТИТУТ МОЛОКА ТА М'ЯСА УААН

**(56)** UA C2 82447, 10.04.2008

UA C2 82082, 11.03.2008

RU A 93032722, 20.01.1997

**(57)** Штам бактерій *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7174, що використовується у виробництві заквашувальних культур для сичужних сирів.

Винахід відноситься до біотехнології та є штамом лактобацил, що використовують у виробництві заквашувальних культур для натуральних сирів.

Ефективним шляхом біологічного захисту сичужних сирів є використання для їх виробництва спеціальних бактеріальних культур. Це досягається за рахунок залучення до складу заквашувальних препаратів штамів молочнокислих бактерій, активність яких забезпечує не лише бажані для сирів характеристики, але певний рівень показників безпеки. Зокрема, застосування у сироробстві селекціонованих штамів лактобацил має позитивний вплив на якісні характеристики зрілих сирів. Молочнокислі палички володіють вираженою антагоністичною активністю відносно широкого кола аеробних та факультативно-анаеробних грам-позитивних і грамнегативних бактерій. Спектр мікроорганізмів, які є чутливими до дії продуктів метаболізму лактобацил, налічує сальмонели, кластрідії, стафілококи, стрептококи, лістерії, деякі види грибів. Найвираженішою ця активність є у представників виду *Lactobacillus acidophilus*. Окрім того, використання термофільних лактобацил у складі заквашувальних культур у виробництві сичужних сирів має позитивний ефект завдяки термостабільності перших під час другого нагрівання сирного зерна, нечутливості до дії бактеріофагів, вищій стійкості до інгібуючих речовин молока та високих концентрацій кухонної солі під час соління у розсолі порівняно з мезофільними лактококами. Наявність потужних протеолітичних систем у *Lactobacillus acidophilus* забезпечує утворення широкого спектру низькомолекулярних білкових сполук та великої кількості амінокислот, що дає змогу

скоротити тривалість визрівання сиру, надати готовому продукту специфічних органолептичних якостей.

Відомо штам *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-6257, що використовується для одержання сухого бактеріального препарату на молочній основі (Патент Росії А 93032722, С12N1/20, А23С9/12, 1997). Цей штам володіє високими антимікробними властивостями та кислотоутворюючою здатністю. Штам сквашує молоко за 4,5-5,0 годин, має граничну кислотність 400°Т, характеризується мінімальною температурою росту 20°С, та максимальною 45°С, а оптимальна температура росту цих бактерій становить 36°С. *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-6257 проявляє високу антагоністичну активність щодо *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*. Недоліком даного штаму є надто висока кислотоутворююча активність, що є небажаним у сироробстві, оскільки може спричинити такі вади готового сиру як "кислий смак", "самокол".

Відомо штам *Lactobacillus acidophilus* неслизистих рас, який застосовують у способі виробництва твердого сиру (Патент України №3921, А23С19/068, 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 запропонований штам характеризується низьким ступенем виживання під час ліофілізації, що обмежує вико-

(19) **UA** (11) **91417** (13) **C2**

ристання даної культур у складі сухих заквашувальних препаратів.

Найближчим до штаму, що заявляється, є штам *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-7770, що використовується у складі заквашувальних культур та функціональних молочних продуктів (Патент України №51170, С12N1/20, С12R 1:23, 2002). Цей штам характеризується високим рівнем антагоністичної активності щодо широкого кола патогенних і умовно-патогенних тест-культур, стримуючи розвиток бактерій родів *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Ptoieus*, *Vacillus*, *Pseudomonas*. Штам є стійким до дії інгібує речовин, антибіотиків, високих концентрацій солі. *Lactobacillus acidophilus* ВКПМ В-7770 коагулює молоко за оптимальної температури росту 37°C упродовж 4-5 годин, забезпечуючи нагромадження клітин на рівні  $2 \cdot 10^8$ - $5 \cdot 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>. Штам придатний для залучення до складу ліофілізованих бактеріальних препаратів. Однак даний штам під час культивування у молоці створює однорідний щільний згусток без відокремлення сироватки, тоді як необхідною характеристикою заквашувальних культур для сирів є добрий синерезис та формування молочного згустку, що розколюється.

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

Штам *L. acidophilus* В-7174 був одержаний у результаті спрямованої селекції культури, вилученої з кисломолочного продукту домашнього приготування. Ідентифікований як вид *L. acidophilus* за основними морфологічними, культуральними і фізіолого-біохімічними властивостями (Краткий определитель Берги, 1982; Л.А. Банникова. Селекція молочнокислих бактерій и их применение в молочной промышленности, 1975). Штам первісно депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України і зареєстровано за номером ІМВ В-7174.

Штам *Lactobacillus acidophilus* ІМВ В-7174 використовується у виробництві заквашувальних культур для натуральних сирів.

Штам *L. acidophilus* В-7174 характеризується такими ознаками та властивостями.

Культурально-морфологічні ознаки штаму. Клітини штаму паличкоподібні, нерухомі, грам-позитивні. Мають товщину від 1 до 3 мкм та довжину від 8 до 20 мкм, розміщуються у вигляді окремих клітин або ланцюжків. Структура клітин незерниста. Штам росте на поверхні агару з гідролізованим молоком та агаризованому середовищі МРС, створюючи пасмовидні колонії, глибинні колонії мають форму шматочків вати. У рідкій культурі

штам росте у вигляді рівномірної каламуті та дрібнодисперсного осаду на дні.

Фізіолого-біохімічні властивості штаму. Штам є факультативним анаеробом. Штам росте за температури від +12°C до +48°C, оптимальна температура росту -  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Штам коагулює білки молока за цієї температури і посівної дози 3% упродовж 4-5 годин. Нагромадження клітин у молоці складає  $(4,0-5,0) \cdot 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>. Штам ферментує глюкозу, лактозу, галактозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, манозу, не ферментує ксилозу, рамнозу, мелібіозу, маніт, арабінозу, рафінозу, гліцерин. Росте за присутності NaCl та жовчі не вище 4,0% та 40% відповідно, не росте у м'ясопептонному бульйоні з активною кислотністю, вищою за рН 9,6; не утворює аміаку з аргініну.

Технологічні властивості штаму - табл. 1. Штам *L. acidophilus* В-7174 згортає молоко, утворюючи щільний згусток, що розколюється, з синерезисом на рівні 25% та помірним рівнем граничної кислотності до 240°Т. Штам, що заявляється, на відміну від штаму *L. acidophilus* В-7770, забезпечує утворення молочного згустку з невисокою 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 температурами другого нагрівання. Позитивною властивістю штаму *L. acidophilus* В-7174 є його низька чутливість до дії нітрату калію, який часто використовують у виробництві сирів з тривалим терміном визрівання для пригнічення розвитку маслянокислих бактерій. Втрата активності штаму, що заявляється, за внесення у молоко максимально дозволеної кількості KNO<sub>3</sub> - 300 г на 1 т молочної суміші - становить не більше 5%. Ступінь виживання бактеріальних клітин *L. acidophilus* В-7174 під час заморожування та сублімаційного сушіння на рівні 74,0% дає змогу одержувати активний сухий бактеріальний концентрат та препарат прямого внесення.

Штам, що заявляється, характеризується помірним приростом активної кислотності за температурних режимів, що застосовують під час виробництва сирів. Залежність кислотоутворювальної активності *L. acidophilus* В-7174 від температури - Фіг. Штам *L. acidophilus* В-7174 забезпечує достатній рівень кислотоутворення на всіх стадіях технологічного процесу виробництва сирів голландської чи швейцарської груп: сичужного зсідання молока та розрізання згустку за температури 32-34°C, другого нагрівання до 40-42°C чи 48-54°C і вимішування сирного зерна за цієї ж температури, формування та пресування за умов поступового охолодження сирної маси, соління і визрівання сиру за температури 12-14°C. За температури зберігання 4-6°C нагромадження кислотності штамом не перевищує 0,05 од. рН, що гарантує стабільність показників якості готового продукту.

Антагоністична активність штаму - табл. 2. Штам *L. acidophilus* В-7174 характеризується висо-

кою антагоністичною активністю щодо патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, що визначали за методом лунок, оцінюючи розмір зони затримки росту відповідної тест-культури після 24-годинної інкубації за температури 37°C. Штам, що заявляється, за рівнем пригнічення таких тест-культур, як *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter* не поступається відомому, а за інтенсивністю дії щодо *Escherichia coli* перевершує його. Штам *L. acidophilus* B-7174 вигідно відрізняється від прототипу здатністю до стримування росту споруотворювальних бактерій виду *Bacillus subtilis*, що є частим представником сторонньої мікрофлори молочних продуктів. Такі характеристики штаму *L. acidophilus* B-7174 дозволяють поліпшити санітарні показники сирів, вироблених з його застосуванням.

Біохімічні властивості штаму. Штам *L. acidophilus* B-7174 характеризується високою протеолітичною активністю, гідролізуючи 17,5% фракції  $\alpha_S$ -казеїну та 4,6%  $\beta$ -казеїну сирної маси упродовж 45 діб визрівання. Штам забезпечує розщеплення 3,8% пептидів з молекулярною масою 120-67 кДа, що дозволяє уникнути формування гіркого присмаку в готовому продукті, а також нагромадження 4,5% пептидів з молекулярною масою 30-20 кДа, 3,2% пептидів з молекулярною масою 20-15 кДа та 8,4% пептидів з молекулярною масою 15-10 кДа. Штам дає змогу одержати сир із вмістом вільних амінокислот на рівні 4,2%, що є достатнім для досягнення зрілості сиру. Такі властивості штаму, що заявляється, здатні забезпечити одержання сичужних сирів з вираженими смаковими якостями та прискорити визрівання сирної маси.

Приклад 1. Одержання лабораторної закваски *L. acidophilus* B-7174.

В 100 см<sup>3</sup> стерилізованого молока з температурою (38±1)°C вносять 1% свіжої чистої культури *L. acidophilus* B-7174 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±1)°C вносять 3% первинної лабораторної закваски і витримують за вказаної температури до утворення згустку упродовж 6-8 годин. Кількість життєздатних клітин *L. acidophilus* B-7174 у заквасці складає 5·10<sup>8</sup> КУО/см<sup>3</sup>.

Приклад 2. Виробництво бактеріального концентрату *L. acidophilus* B-7174.

У 100 дм<sup>3</sup> водопровідної води з температурою 45°C розчиняють 3,0 кг сухого знежиреного молока та встановлюють рН 6,7. Одержане молоко підігривають до температури 55°C та вносять 50 г протосубтіліну ГЗХ активністю 70 од/г. Гідроліз молока проводять за температури 55°C упродовж 3 годин. У гідролізоване молоко додають компоненти у таких кількостях:

сухе знежирене молоко	1000 г,
лактоза	1000 г,
глюкоза	500 г,
дріжджовий екстракт	500 г,
натрій лимоннокислий три заміщений	500 г,
натрій оцтовокислий одно заміщений	300 г,

магній сірчанокислий

20 г.

Ростове середовище стерилізують за температури 121°C упродовж 25 хвилин та охолоджують до температури 39°C. Активну кислотність ростового середовища встановлюють на рівні 6,7 од. рН і вносять 5,0 дм<sup>3</sup> закваски *L. acidophilus* B-7174. Культивування проводять упродовж 8 годин за температури 39°C з періодичним перемішуванням та контролем активної кислотності ростового середовища на рівні 6,7 од. 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 зі захисним середовищем такого складу (в г/дм<sup>3</sup>):

тризаміщений лимоннокислий натрій	50,
сахароза	100,
вода	до 1 дм <sup>3</sup> .

Суспензію клітин у захисному середовищі розливають у стерильні ковоти шаром 1 см, заморожують у морозильній шафі за температури мінус 40° С упродовж 6 год, після чого сушать у сублімаційній сушарці протягом 30 год за таких режимів: початок сушіння за температури мінус 25°C, закінчення - за температури плюс 30°C. Чисельність життєздатних клітин молочнокислих бактерій у 1 г сухого бактеріального концентрату становить 1,0·10<sup>10</sup> КУО. Бактеріальний концентрат використовують у виробництві твердих і напівтвердих сичужних сирів.

Приклад 3. Виробництво напівтвердого сиру з використанням сухого бактеріального концентрату *L. acidophilus* B-7174.

100 кг незбираного коров'ячого молока нормалізують за масовою часткою жиру 2,8 % і масовою часткою білку 3,0% та пастеризують за температури 72°C упродовж 20 с. Пастеризоване молоко охолоджують до температури 34°C, вносять 1 г сухого бактеріального концентрату *L. acidophilus* B-7174 та 5 г сухого бактеріального концентрату мезофільних молочнокислих бактерій і витримують 30 хв за цієї температури. У заквашену молочну суміш додають 25 г сичужного ферменту у вигляді 2,5% водного розчину та 35 г хлориду кальцію у вигляді 40%-ного водного розчину. Через 40 хв витримки за температури 34°C розрізають утворений сичужний згусток, перемішують упродовж 20 хв та видаляють 30% сироватки. Титровна кислотність сироватки становить 15°Т. Сирне зерно вимішують упродовж 20 хв та додають пастеризовану питну воду з температурою 65°C у кількості 15% від маси молочної суміші. Проводять друге нагрівання сирного зерна упродовж 20 хв з підвищенням температури зі швидкістю не більше 1°C на хвилину, за інтенсивного перемішування, до 42°C та продовжують вимішування сирного зерна за цієї температури упродовж 40 хв. Готове сирне зерно вивантажують у форми, витримують під шаром сироватки упродовж 40 хв та здійснюють пресування упродовж 4 год за поступового збільшення тиску від 10 кПа до 40 кПа. Активна кислотність сиру після пресування становить 5,6 од. рН. Соління сиру проводять у розсолі з концентрацією кухонної солі 20% за температури 12°C. Визрівання сиру здійснюють за температури 12°C та відносній вологості повітря 85% упродовж 45 діб. Гото-

7

91417

8

вий сир характеризується такими показниками: активна кислотність - 5,25 од.рН, загальна чисельність молочнокислих бактерій -  $8 \cdot 10^8$  КУО/г, в тому числі *L. acidophilus* -  $5 \cdot 10^7$  КУО/г, бактерії групи кишкової палички відсутні у 0,01 г сиру.

Штам рекомендується для виробництва за-квашувальних культур та сухих ліофілізованих

бактеріальних препаратів для твердих і напівтвердих сичужних сирів. Застосування штаму *L. acidophilus* B-7174 дозволить уникнути забруднення сиру сторонньою мікрофлорою та дасть змогу отримати продукт з достатнім ступенем визрівання.

Таблиця 1

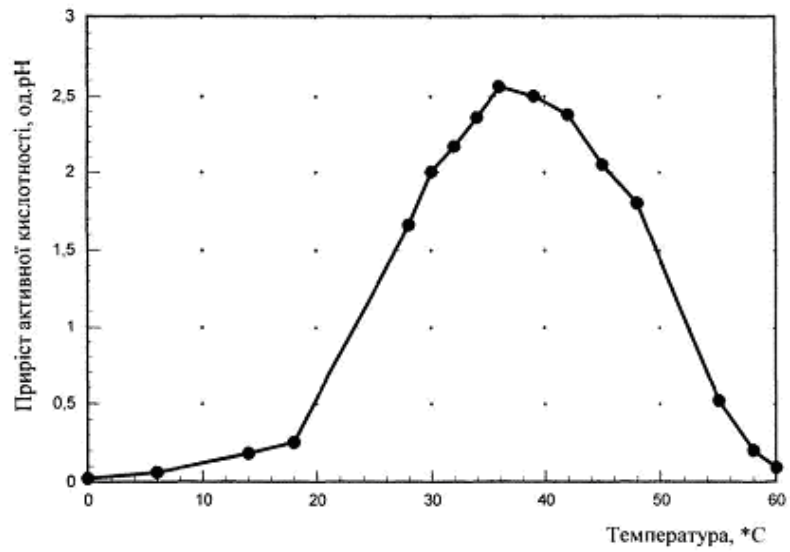
## Технологічні властивості молочнокислих бактерій

Показник	<i>L. acidophilus</i> B-7174	<i>L. acidophilus</i> B-7770 (прототип)
Гранична кислотність у молоці, °Т	240	265
Синерезис молочного згустку, %	25	5
Кінетична в'язкість молочного згустку за температури 20°C, Па·с	$8,0 \cdot 10^{-3}$	$23,7 \cdot 10^{-3}$
Вміст білкових сполук у сироватці, мг/см <sup>3</sup>	2,7	8,6
Термостійкість упродовж 60 хвилин: за температури 50°C за температури 60°C	+ +	+ +
Рівень інгібування KNO <sub>3</sub> , %: 200 г на 1 т молока 300 г на 1 т молока	0 5	0 8
Фагостійкість	+	+
Ступінь виживання під час ліофілізації, %	73,0	74,8

Таблиця 2

## Антагоністична активність молочнокислих бактерій

Тест-культури	Величина зон затримки росту тест-культури, мм	
	<i>L. acidophilus</i> B-7174	<i>L. acidophilus</i> B-7770 (прототип)
<i>Escherichia coli</i>	23-26	17-18
<i>Staphylococcus aureus</i>	16-18	18
<i>Proteus vulgaris</i>	16-18	16-18
<i>Enterobacter</i> sp.	14	12
<i>Proteus rettgeri</i>	13-15	15-16
<i>Proteus vulgaris</i>	18-20	16-18
<i>Bacillus subtilis</i>	20-22	-



**Фіг.** – Залежність кислотоутворювальної активності  
*L. acidophilus* B-7174 від температури