



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76906** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**
C12N 1/20
A23C 19/032 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

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

1

2

(21) a200501918
(22) 01.03.2005
(24) 15.09.2006
(46) 15.09.2006, Бюл. № 9, 2006 р.
(72) Кігель Наталя Федорівна, Шульга Наталя Михайлівна, Боднарчук Оксана Василівна
(73) Кігель Наталя Федорівна, Шульга Наталя Михайлівна, Боднарчук Оксана Василівна, ТЕХНО-

ЛОГІЧНИЙ ІНСТИТУТ МОЛОКА ТА М'ЯСА УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК
(56) SU A1 131774, 23.07.92.
RU C1 2063692, 20.07.96.
RU C1 2086140, 10.08.97.
(57) Штам бактерій *Lactobacillus helveticus* IMB B-7122, що використовується у виробництві заквашувальних культур для твердих сичужних сирів з високою температурою другого нагрівання.

Винахід відноситься до біотехнології та є штамом лактобацил, що використовуються у виробництві заквашувальних культур для твердих сичужних сирів з високою температурою другого нагрівання.

На цей час існує багато відомостей про значну роль молочнокислих паличок у визріванні твердих сичужних сирів. Завдяки їх потужним протеолітичним системам відбувається розщеплення білків сирної маси, а кількість продуктів їх життєдіяльності та співвідношення між ними обумовлюють ступінь зрілості сирів і специфічні органолептичні властивості готового продукту. До заквашувальних культур, які застосовуються у сироробстві, висувається низка вимог, серед яких основними є висока протеолітична активність, помірний рівень кислотоутворення та добрий синерезис молочного згустку, нагромадження ароматичних сполук, а також стійкість до технологічних режимів під час виробництва сиру: теплової обробки, високої концентрації кухонної солі, загрози враження бактеріофагами та забруднення сторонньою мікрофлорою. Крім того, штами, які є перспективними для залучення до складу сучасних ліофілізованих заквашувальних культур, повинні характеризуватися певними технологічними властивостями, а саме, забезпечувати високу врожайність під час нарощування у виробничому середовищі, демонструвати стійкість протягом заморожування і сушіння тощо.

Відомо штам *Lactobacillus casei*, який входить

до складу бактеріального препарату прямого внесення "Актив" і застосовується у виробництві твердих сичужних сирів [Патент №55091 А Україна, C12N1/20, A23C19/068, 2003]. Цей штам має помірну енергію кислотоутворення у молоці та виражені протеолітичні властивості, які дозволяють уникнути гіркого присмаку у сирі. Штам також характеризується значною антагоністичною активністю щодо сторонньої мікрофлори, що забезпечує необхідні санітарні показники сирної маси під час її визрівання та надає готовому продукту високих органолептичних показників. Однак цей штам молочнокислих паличок використовується лише у виробництві твердих сичужних сирів з низькою температурою другого нагрівання, а рівень нагромадження низькомолекулярних розчинних продуктів розщеплення білку цим штамом є недостатнім для прискорення визрівання сирів.

Найближчим до штаму, що заявляється, є штам *Lactobacillus acidophilus* неслизистих рас, яку застосовують у способі виробництва твердого сиру з високою температурою другого нагрівання [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 лактобактерії виду *L. acidophilus* є нетиповими для заквашувальної мікрофлори

(19) **UA** (11) **76906** (13) **C2**

твердих сичужних сирів з високою температурою другого нагрівання. Також штам *L. acidophilus* характеризується високою кислотоутворюючою активністю, що є небажаним, оскільки може викликати такі вади готового сиру як "кислий смак", "самокол". Крім того ацидофільні патички є непридатними для їх залучення до складу сухих заквашувальних культур внаслідок низького ступеня виживання під час ліофілізації.

Завданням винаходу є одержання високоактивного штаму *Lactobacillus helveticus* - скорочєва назва *L. helveticus*, - що має помірну енергію кислотоутворення в молоці і добрий синерезис молочного згустку, високі протеолітичну активність, здатність до утворення ароматичних сполук, солі і термостійкість, полрезистентність до дії фагів, антагоністичну активність, а також значний ступінь виживання під час ліофілізації.

Штам *L. helveticus* був одержаний в результаті спрямованої селекції культури, виділеної з домашнього сиру. Ідентифікований як вид *L. helveticus* 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 задеповано в колекції промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ і зареєстровано під номером IMB В-7122.

Штам бактерій *Lactobacillus helveticus* IMB В-7122 використовується у виробництві заквашувальних культур для твердих сичужних сирів з високою температурою другого нагрівання.

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

Культурально-морфологічні ознаки штаму. Клітини штаму паличковидні, нерухомі, грампозитивні. Мають різну довжину - від 5 до 20мкм, розміщуються у вигляді окремих клітин або ланцюжків. Структура клітин зерниста. В агаризованому середовищі з гідролізованим молоком штам утворює колонії білого кольору 1-2мм у діаметрі у вигляді "павучків". У рідкій культурі росте у вигляді каламуті, яка випадає в осад.

Фізіолого-біохімічні властивості штаму. Штам є факультативним анаеробом. Оптимальна температура росту $40\pm 1^\circ\text{C}$. Штам коагулює молоко за цієї температури і посівної дози 3% протягом 7 годин. Утворює однорідний щільний згусток відокремленням сироватки приємного кисломолочного смаку. Гранична кислотність у молоці досягає 240°T . Нагромадження клітин в молоці складає $3,5\cdot 10^8 \text{ КУО/см}^3$. Росте у бульйоні за рН 8,3 і в гідролізованому молоці з вмістом жовчі до 20% та NaCl до 4,5%. Не утворює аміаку з аргініну.

Ферментує глюкозу, лактозу, галактозу, фруктозу, мальтозу, манозу, не ферментує сахарозу, ксилулу, рафінозу, сорбіт, маніт, гліцерин, інозит, рамному, арабінозу.

Технологічні властивості штаму. Штам *L. helveticus* згортає молоко, утворюючи щільний пусток, що розколюється, з добрим виділенням сироватки та, на відміну від штаму *L. acidophilus*, характеризується помірним рівнем кислотоутворення (табл.1). Штам є термостійким і витримує

нагрівання до 60°C впродовж 60 хвилин, є нечутливим до NaCl у концентрації до 4,5% та стійкий до дії суміші бактеріофагів. За антагоністичною активністю по відношенню до патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів групи кишкових паличок штам, що заявляється, не поступається відомому штаму, а за розміром зони пригнічення розвитку *Proteus vulgaris* 2029 штам *L. helveticus* вигідно відрізнявся від *L. acidophilus*. Позитивною властивістю штаму *L. helveticus* є високий ступінь виживання бактеріальних клітин під час їхнього заморожування та сублімаційного сушіння - до 97,8%, тоді як ацидофільні палички характеризуються низькою стійкістю під час ліофілізації - не більше 72,3%.

Протеолітична активність штаму. Протеолітичну активність оцінювали за вмістом низькомолекулярних продуктів розщеплення білків молока після 24-годинної інкубації за температури $(40\pm 1)^\circ\text{C}$ (табл.2). Штам, що заявляється, характеризується активним нагромадженням вільних амінокислот і пептидів та переважає за аналогічними показниками штам-прототип. Так, кількість вільних амінокислот з ациклічною структурою, що утворилися завдяки дії протеолітичних ферментів *L. helveticus* у молочному згустку, складала до $3,562 \text{ мг/см}^3$. Це сприяє швидкому розпаду білку сирної маси та забезпечує інтенсифікацію визрівання. Висока здатність до утворення розчинних пептидів з низькою молекулярною масою дозволить уникнути формування гіркого присмаку в готовому продукті.

Ароматують активність штаму. Здатність молочнокислих бактерій до утворення ароматичних сполук оцінювали за вмістом діацетилю, летких органічних кислот і ефірів у молочному згустку після 24-годинної інкубації за температури $(40\pm 1)^\circ\text{C}$ (табл.3). Штаму *L. helveticus* властиве нагромадження речовин, що ообумовлюють смак та аромат сиру, у значно більших кількостях, ніж *L. Acidophilus*. Так, вміст діацетилю у молочному згустку, утвореному під час ферментування *L. helveticus*, становив до $2,397 \text{ мг/100см}^3$, летких органічних кислот - до $0,90 \text{ мекв/100см}^3$, складних ефірів у перерахунку на оцтовоетиловий ефір - близько $28,8 \text{ мг/100см}^3$. Такі властивості штаму, що заявляється, дозволять одержати твердий сичужний сир з вираженим ароматом.

Винахід пояснюється прикладами використаного штаму.

Приклад 1 Одержання лабораторної закваски *L. helveticus*.

В 100 см^3 стерилізованого молока з температурою $40\pm 1^\circ\text{C}$ вносять 1% свіжої чистої культури *L. helveticus* 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 $40\pm 1^\circ\text{C}$ вносять 3% первинної лабораторної закваски і термостатують за вказаної температури до утворення згустку протягом 7 годин. Кількість життєздатних клітин *L. helveticus* у заквасці складає $3,5\cdot 10^8 \text{ КУО/см}^3$.

Приклад 2. Виробництво бактеріального концентрату з використанням штаму *L. helveticus*.

У 70дм³ водопровідної води з температурою 45°C розчиняють 2,1кг сухого знежиреного молока та встановлюють рН 6,7. Одержане молоко підігривають до температури 55°C та вносять 20г протосубтіліну ГЗХ активністю 70од. у 1г. Гідроліз молока проводять за температури 55°C протягом 2,5 клін. У гідролізоване молоко додають компоненти у таких кількостях: дріжджовий екстракт - 1,40дм³, лактоза - 700г, глюкоза - 350г, натрій оцтовокислий однозаміщений - 350г, натрій лимоннокислий тризаміщений - 210г, магній сірчаноокислий - 14г. Ростове середовище стерилізують за температури 121°C протягом 25 хвилин та охолоджують до температури 31°C. Активну кислотність ростового середовища встановлюють на рівні 6,7од. рН і вносять 3,5дм³ інокуляту пропіоновокислих бактерій. Культивування проводять протягом 12 годин за температури 30°C з періодичним перемішуванням. Середовище підігривають до температури 38°C та вносять 1,0дм³ закваски *L. helveticus* і 2,0дм³ термофільних стрептококів. Наступне спільне культивування молочнокислих і пропіоновокислих бактерій ведуть за температури 38°C протягом 9 годин з періодичним перемішуванням та контролем активної кислотності ростового середовища на рівні (6,7±0,1)од. рН, застосовну і 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/дм³): тризаміщений лимоннокислий натрій - 50, сахароза - 100, вода - до 1дм³. Суспензію клітин у захисному середовищі розливають у стерильні кювети шаром 1см, заморожують у морозильній шафі за температури мінус 40°C протягом 16год, після чого сушать у сублімаційній сушарці протягом 18год за таких режимів: початок сушіння за температури мінус 25°C, закінчення - за температури плюс 30°C. Чисельність життєздатних клітин молочнокислих бактерій у 1г сухого бактеріального концентрату становить 5,0·10¹⁰, в тому числі *L. helveticus* - 1,0·10⁸. Бактеріальний концентрат використовується у виробництві твердих сичужних сирів з високою температурою другого нагрівання.

Штам рекомендується для виробництва заквашувальних культур та сухих ліофілізованих баактеріальних препаратів для твердих сичужних сирів. Застосування штаму *L. helveticus* дозволить отримати продукт з вираженим смаком та ароматом і високим рівнем протеолізу.

Таблиця 1

Технологічні властивості молочнокислих бактерій

Показник	<i>L. helveticus</i>	<i>L. acidophilus</i> (прототип)
Гранична кислотність у молоці, °Т	240	320
Синерезис молочного згустку, %	75	85
Солестійкість (розвиток у присутності NaCl):		
3,0%	+	+
4,0%	+	+
4,5%	+	-
Термостійкість температури 60°C:		
протягом 30 хвилин	+	+
протягом 60 хвилин	+	+
Фагостійкість	+	+
Антагоністична активність (величина зон затримки росту), мм		
<i>Escherichia</i> 0111	11	15
<i>Escherichia coli</i> 113	18	22
<i>Proteus vulgaris</i> 2029	18	14
Ступінь виживання під час ліофілізації, %	97,8	72,3

Таблиця 2

Протеолітична активність молочнокислих бактерій у молоці

Показник	<i>L. helveticus</i>	<i>L. acidophilus</i> (прототип)
Вміст вільних циклічних амінокислот, мг/см ³	0,298	0,417
Вміст вільних ациклічних амінокислот, мг/см ³	3,562	2,736
Вміст низькомолекулярних пептидів, мг/см ³	4,10	3,65

Таблиця 3

Здатність молочнокислих бактерій до утворення ароматичних сполук

Показник	L. helveticus	L. acidophilus (прототип)
Вміст діацетилу, мг/100см ³	2,397	1,400
Вміст летких органічних кислот, мекв/100см ³	0,90	0,55
Вміст складних ефірів у перерахунку на оцтовоетиловий ефір, мкг/100см ³	28,8	19,2