



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 91441

(13) C2

(51) МПК (2009)

C12N 1/20

A23C 9/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS, ЩО ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ У ВИРОБНИЦТВІ БАКТЕРІАЛЬНИХ КОНЦЕНТРАТІВ ДЛЯ КИСЛОМОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ДІЇ

1

(21) а200815252

(22) 30.12.2008

(24) 26.07.2010

(46) 26.07.2010, Бюл.№ 14, 2010 р.

(72) КІГЕЛЬ НАТАЛЯ ФЕДОРІВНА, НАУМЕНКО  
ОКСАНА ВАСИЛІВНА(73) ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ІНСТИТУТ МОЛОКА ТА  
М'ЯСА УААН

2

(56) UA A 52122, 16.12.2002

UA A 56385, 15.05.2003

SU A1 1730142, 30.04.1992

(57) Штам бактерій Streptococcus thermophilus IMB  
B-7179, що використовується у виробництві бакте-  
ріальних концентратів для кисломолочних продук-  
тів функціональної дії.

Винахід відноситься до біотехнології і є штамом лактобактерій, що використовується у виробництві біологічно активних бактеріальних препаратів для молочних продуктів функціональної дії.

Одним із різновидів функціональних продуктів, що на сьогодні динамічно розвивається є молочні продукти ферментовані або неферментовані, які виготовляють із застосуванням спеціально підібраних штамів молочнокислих, біфідобактерій чи інших груп мікроорганізмів природного походження з певним набором пробіотичних властивостей. Ефективність застосування функціональних молочних продуктів залежить від здатності цих бактеріальних культур пригнічувати розвиток ентеропатогенів, впливати на вміст холестерину в сироватці крові, регулювати імунологічний захист організму людини тощо. Залучення до раціону харчування продуктів функціональної дії дозволяє без використання лікувальних препаратів поліпшити загальний стан здоров'я людини шляхом впливу біологічно активної мікрофлори на мікроекологію кишечника, перетравлювання та засвоєння їжі.

Відомо штам Streptococcus thermophilus ВКПМ В-4464/66, який використовується у бактеріальних заквасках для кисломолочних продуктів (Патент СССР 1730142 А1, С12N1/20, А23С9/12, 1992). Цей штам володіє стійкістю до інгібіторів росту: росте у середовищі з 4% NaCl, 40% жовчі, 0,1% метиленового голубого. Завдяки такій підвищеній

стійкості до факторів зовнішнього середовища штам не змінює своїх властивостей під впливом сезонних коливань якості молока, при внесенні у молоко 3% культури за температури (37-40)°C здатний стабільно утворювати щільний молочний згусток упродовж 3,5 год. Крім того, штам є стійким до пеніциліну - 1,0 од./см<sup>3</sup> та бактеріофагу, зберігає свої властивості у сухій культурі. Завдяки своїм біологічним властивостям, насамперед, підвищеній стійкості до інгібіторів росту та здатності утворювати згустки з високою в'язкістю штам є промислово-цінним для молочної галузі. Проте цей штам не проявляє пробіотичні властивості, що обмежує рівень його функціональної активності та сферу застосування.

Відомо штам Streptococcus thermophilus DN 001 116, задепонований у Національній Колекції Культур Мікроорганізмів (CNCM, США) під номером 1-1477 (Патент США 6428829, 426/34, 426/42, 426/583, 435/253.4, 2002). Упродовж 10 років на молочних підприємствах авторами було ізольовано 60 фагів S. thermophilus, які за спектром літичної активності розподілили у 7 підгруп. Штам DN-001 116 характеризується стійкістю до всіх випробуваних фагів з цих 7 підгруп (φ15, φ57, φ47, φ77, φ76, φ29, φ65) навіть за їхнього високого титру (10<sup>7</sup> БУО/см<sup>3</sup>). Цей штам є помірним кислотоутворювачем і стійкий до цукрів (9-13% сахарози). Активна кислотність ферментованого ним молочного про-

(13) C2

(11) 91441

(19) UA

дукту становить не менше 4,6од.рН, яка під час зберігання продукту за температури 8°C упродовж 28 діб не знижується більше ніж на 0,2од. рН. Штам застосовують як у монокультури, так і з молочнокислими паличками *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* та біфідобактеріями для виробництва різноманітних продуктів: сирів, йогуртів, ферментованих молочних продуктів, пробіотиків для людей та тварин. Однак в описі винаходу відсутні результати досліджень (in vitro, або in vivo), що встановлюють можливість та ефективність застосування штаму як пробіотика.

Найближчим до штаму, що заявляється, є штам *Streptococcus thermophilus* ВКПМ В-7331, який використовується для одержання бактеріального концентрату прямого внесення для продуктів спеціального призначення (Пат. України № 56385 А, 7 С12Н1/20, А23С9/12, 2003 - прототип). Цей штам виділено з природних джерел та відібрано на основі лабораторних досліджень з урахуванням вимог, що висуваються до пробіотиків.

Штам стійкий до продуктів метаболізму травної системи (30% жовчі, 6,5% NaCl, 0,5 фенолу) та характеризується високою адгезивністю - індекс адгезивності ІА -  $7,2 \pm 0,1$ .

Штам проявляє антагоністичну активність щодо патогенних та умовно-патогенних тест-культур родів *Proteus*, *Escherichia* та *Staphylococcus* з колекції мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського МОЗ України (зони затримки росту 11-15мм). Штам є технологічним: межа кислотоутворення не перевищує 115°C, характеризується високим ступенем виживання під час ліофілізації та зберігання. Недоліком цього штаму є відсутність холестеразної активності, низькі показники адгезивності, антагоністичної активності та реологічних властивостей.

Завданням винаходу є отримання біологічно активного штаму термофільного стрептококу з комплексом технологічних і пробіотичних властивостей, що забезпечує формування в'язкої текстури ферментованого молока та підвищує функціональну дію цільових продуктів.

Штам *Streptococcus thermophilus* - скорочена назва *S. thermophilus*, - був одержаний у результаті спрямованої селекції культури, вилученої із самоквашеного молочного продукту. Ідентифікований як вид *S. thermophilus* 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 первісно депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України і зареєстровано за номером IMBB-7179.

Штам *Streptococcus thermophilus* 1MB В-7179 використовується у виробництві біологічно активних бактеріальних препаратів для молочних продуктів функціональної дії.

Штам *S. thermophilus* 1MB В-7179 характеризується такими ознаками та властивостями.

Культурально-морфологічні ознаки штаму. Грампозитивні коки, діаметром 0,5-0,6мкм, неру-

хомі, не утворюють спори, розташовані переважно у вигляді звивистих ланцюжків різної довжини. В агарі з гідролізованим молоком утворює колонії білого кольору діаметром 1,2-1,5мм у вигляді "човників", на поверхні середовища - краплеподібні білуваті блискучі колонії діаметром 1,0-1,5мм. В гідролізованому бульйоні та рідкому середовищі МРС росте з утворенням рівномірної каламуті та дрібнодисперсного осаду на дні пробірки: за лужних умов рН 9,6од. розвиток не помічено.

Фізіолого-біохімічні властивості штаму. Штам є факультативним анаеробом. Оптимальна температура росту 37°C. Штам ферментує глюкозу, лактозу, галактозу, сахарозу, не ферментує маніт, сорбіт, рамнозу, ксилозу, гліцерин. Штам відновлює лакмусове молоко, не утворює аміаку з аргініну. При внесенні 3% культури в молоко за температури 37°C молокозгортаюча активність штаму становить 4,5год. Основний продукт бродіння - молочна кислота.

Біотехнологічні властивості штаму подані у таблиці 1.

Штам на відміну від штаму-прототипу, характеризується більшою стійкістю до високих концентрацій жовчі до 40%. Позитивною властивістю порівняно з прототипом є його здатність знижувати рівень холестерину під час ферментації молока - кількість зв'язаного холестерину становить більше 30% від початкового вмісту. Крім того, штам є високоадгезивним, індекс адгезивності ІА= $11,2 \pm 1,4$ , що у 1,5 рази вище порівняно з прототипом.

Штам, що заявляється, характеризується помірним рівнем енергії кислотоутворення, гранична кислотність становить 100°Т. Штам за розвитку у знежиреному молоці утворює щільний в'язкий згусток з ефективною в'язкістю в 1,9 рази більшою ніж штам-прототип. Реологічні властивості визначали за допомогою приладу Реотест 2.

Останнім часом збільшилася кількість випадків вад ферментацій, спричинених фагами, активними до штамів *S. Thermophilus*, які є головними компонентами заквасок для йогуртів, сметани, кисломолочних напоїв та багатьох сичужних сирів. Тому встановлення фагочутливості є обов'язковим етапом при добірї культур. Штам, що заявляється, характеризується стійкістю до фагів, активних щодо *S. thermophilus*.

Антагоністична активність штаму - таблиця 2. Штам, що заявляється, характеризується більшою інтенсивністю антагоністичної дії щодо патогенних та умовно-патогенних тест-культур родів *Proteus*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Enterobacteria* та *Pseudomonas* порівняно з прототипом. Зони затримки росту становлять від 12 до 18мм. Крім того штам відрізняється від прототипу здатністю до стримування росту спороутворювальних бактерій виду *Bacillus subtilis*, що є частим представником сторонньої мікрофлори молочних продуктів.

Означені властивості штаму, що заявляється, а саме: високі показники холестеразної і антагоністичної активності, здатність до адгезії, стійкість до агресивних сполук шлунково-кишкового тракту забезпечать успішний транзит штаму через травну систему, закріплення в кишечнику та протидію його небажаній мікрофлорі, корегування ліпідного

обміну макроорганізму, санітарний рівень продукту в процесі його виробництва та зберігання тощо.

Структурно-механічні характеристики молока, ферментованого штамом *S. thermophilus* 1MB B-7179 показано на кресленні (Рис.). Руйнування молочного згустку, що утворює штаб, відбувається за високих значень показників швидкості деформації та напруження зсуву. Отримані значення індекса текучості ( $n=0,3$ ), дозволили класифікувати молочні згустки *S. thermophilus* 1MB B-7179, як псевдопластичні системи. Аналіз реологічних властивостей за темпом руйнування структури ( $m=0,8$ ) свідчать, що штаб *S. thermophilus* 1MB B-7179 є перспективним з точки зору покращення консистенції молочних згустків.

Сукупність зазначених пробіотичних та технологічних властивостей штаму забезпечить високу якість та функціональну активність молочного продукту з його використанням.

#### Приклад 1.

Одержання лабораторної закваски 5'. *thermophilus* 1MB B-7179. В 100см<sup>3</sup> стерилізованого молока з температурою (37±1)°C вносять 1% свіжої чистої культури *S. thermophilus* 1MB B-7179 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 (37±1)°C вносять 3% первинної лабораторної закваски і витримують за вказаної температури до утворення згустку упродовж 4-5 годин. Кількість життєздатних клітин *S. thermophilus* 1MB B-7179 у заквасці складає 1,0·10<sup>8</sup> КУО/см<sup>3</sup>.

#### Приклад 2.

Виробництво бактеріального концентрату з використанням *S. thermophilus* 1MB B-7179. Готують ростове середовище. Для цього у 100дм<sup>3</sup> водопровідної води з температурою 45°C розчиняють 3,0кг сухого знежиреного молока та встановлюють рН 6,6. Одержане молоко підігрівають до температури 55°C та вносять 50г протосубтіліну ГЗХ активністю 70од./г. Гідроліз молока проводять за температури 55°C упродовж 3 годин. У гідролізоване молоко додають компоненти у таких кількостях: сухе знежирене молоко - 1000г, лактоза -1000г, глюкоза -500г, дріжджовий екстракт - 500г, натрій лимоннокислий тризаміщений - 500г, натрій оцтовокислий однозаміщений - 300г, магній сірчано-кислий - 20г. Одержане ростове середовище стерилізують за температури 121°C упродовж 25 хвилин та охолоджують до температури 37°C. Активну кислотність ростового середовища встановлюють на рівні 6,6од. рН і вносять 5,0дм<sup>3</sup> закваски *S. thermophilus* 1MB B-7179. Культивування проводять упродовж 10 годин за температури 37°C з періодичним перемішуванням та контролем активної кислотності ростового середовища на рівні 6,6од. рН, застосовуючи 25%-ний водний розчин аміаку. Після закінчення культивування ростове середовище охолоджують до температури 10°C та відокремлюють біомасу. Одержану біомасу змі-

шують у співвідношенні 1:2 із захисним середовищем такого складу (в г/дм<sup>3</sup>): тризаміщений лимоннокислий натрій -50, сахароза -100, вода - до 1дм<sup>3</sup>. Суспензію клітин у захисному середовищі розливають у стерильні кювети шаром 1см, заморожують у морозильній шафі за температури мінус 40°C упродовж 16-18 годин, після чого сушать у сублімаційній сушарці протягом 18-20 годин 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 1,0·10<sup>10</sup> КУО. Бактеріальний концентрат швидко реактивується без додаткової стадії активізації. Стабільність властивостей концентрату зберігається тривалий час та визначається температурою зберігання - 6 місяців за 6-8°C і 12 місяців за мінус 18°C. Бактеріальний концентрат використовують у виробництві молочних продуктів функціональної дії.

#### Приклад 3.

Приготування функціонального молочного продукту з використанням штаму *S. thermophilus* 1MB B-7179. Молоко із вмістом жиру 2,5%, пастеризують за температури 86°C із витримкою 20 хвилин, охолоджують до температури заквашування 37°C та вносять бактеріальний концентрат штаму *S. thermophilus* 1MB B-7179 в кількості 1г/т та бактеріальний концентрат молочнокислих бактерій *L. casei* в кількості 4г/т. Сквашують протягом 6-7 годин. Титрована кислотність готового продукту - 70°Т, активна - 4,6од. рН. Кількість життєздатних клітин *S. thermophilus* в продукті - 1,0·10<sup>8</sup> КУО/см<sup>3</sup>, загальна чисельність молочнокислих бактерій в грамі продукту складає 1,0-109 клітин. Рівень холестерину у кисломолочному продукті на 42% знижено у порівнянні з вихідним молоком. Продукт проявляє антагоністичну активність по відношенню до бактерій групи кишкових паличок - зона затримки росту *Escherichia coli* 113 - (20±1)мм, *Proteus vulgaris* 2029 - (14±2)мм, *Staphylococcus aureus* 209 - (15±2)мм, *Enterococcus cloaceae* - (18±3)мм, *Bacillus subtilis* - (16±1)мм. Продукт має чистий кисломолочний смак, щільну, в'язку консистенцію, яка не псується в процесі зберігання. Активна кислотність протягом 14 діб знижується усього на 0,2од. рН.

Штам *Streptococcus thermophilus* 1MB B-7179 характеризується низкою пробіотичних властивостей: стійкістю до продуктів метаболізму травної системи людини, здатністю до адгезії, має виражену антагоністичну дію по відношенню до широкого кола патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, високу холестеразну активність. Штам є високотехнологічним: фагостійкий, має помірну енергію кислотоутворення в молоці, утворює згустки з високою в'язкістю. Штам проявляє високу біотехнологічну активність, що дає змогу одержувати молочні продукти функціональної дії.

Таблиця 1

Характеристика біотехнологічних властивостей штамів *S.thermophilus*

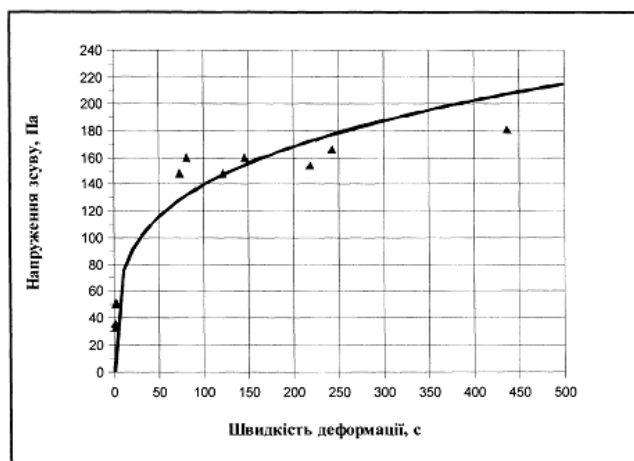
Показник	<i>S. thermophilus</i> (що заявляється)	<i>S. thermophilus</i> (прототип)
Розвиток в присутності: 40% жовчі	+	-
30% жовчі	+	+
6,5% NaCl	+	+
0,5% фенолу	+	+
Зниження рівня холестерину в молоці, мкг/мл	60,1	-
%	35,4	
Індекс адгезивності, (IA)	11,2±1,4	7,2±0,1
Гранична кислотність у молоці, °T	100±5	110±5
Ефективна в'язкість молочного згустку за температури 20°C, мПа*с	74,4±0,3	40,2±0,4
Фагостійкість	+	нд

Примітка: \* нд - дані відсутні

Таблиця 2

Антагоністична активність штамів *S.thermophilus*  
щодо тест-культур патогенних та умовно патогенних бактерій

Тест-культури	Величина зон затримки росту тест-культури, мм	
	<i>S.thermophilus</i> (що заявляється)	<i>S.thermophilus</i> (прототип)
<i>Escherichia coli</i> 111	17	12
<i>Escherichia coli</i> 113	18	14
<i>Proteus vulgaris</i> 2029	15	15
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	16	10
<i>Ps. aeruginosa</i> 9027	13	10
<i>Proteus morganii</i>	15	11
<i>Proteus rectgeri</i>	13	10
<i>Enterobacteria cloacae</i> 186	12	7
<i>Bacillus subtilis</i>	15	-

Примітка: метод лунок, розмір зони відсутності росту тест-культури в мм, похибка середнього арифметичного 5%,  $p < 0,05$ Рис. 1 - Залежність напруження зсуву від швидкості деформації згустків, утворених штамом *S. thermophilus* 1MB B-7179