



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 92287

(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**

1

(21) a200911017**(22)** 02.11.2009**(24)** 11.10.2010**(46)** 11.10.2010, Бюл.№ 19, 2010 р.**(72)** ПАСІЧНИЮК ЄВГЕНІЯ ЛЕОНІДІВНА, РОЖАН-
СЬКА ОЛЕКСАНДРА МИХАЙЛІВНА, НАУМЕНКО
ОКСАНА ВАСИЛІВНА, КІГЕЛЬ НАТАЛЯ ФЕДОРІ-
ВНА**(73)** ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ІНСТИТУТ МОЛОКА ТА
М'ЯСА УААН**(56)** SU A1 1730142, 30.04.1992

SU A1 1664838, 23.07.1991

Vanningelgem E, Zamfir M., Mozzi E. Biodiversity of
exopolysaccharides produced by Streptococcus
thermophilus strains is reflected in their production

2

and their molecular and functional characteristics//
Applied and environmental microbiology. [он-
лайн], 2004, № 2. Знайдено в Інтернет 20.07.2010
Broadbent J. R., McMahon D. J., Welker D. L. et al.
Biochemistry, genetics, and applications of
exopolysaccharide production in Streptococcus
thermophilus: A review//J of dairy science. [он-лайн],
2003, № 2. Знайдено в Інтернет 20.07.2010

US A 6056979, 02.05.2000

US 4339464, 13.07.1982

SU 603660, 25.04.1978

(57) Штам бактерій Streptococcus thermophilus IMB
B-7247, що використовується у виробництві бакте-
ріальних концентратів для кисломолочних продук-
тів.

Винахід відноситься до біотехнології і є шта-
мом термофільного стрептококу, що використову-
ється у виробництві бактеріальних препаратів і
кисломолочних продуктів.

Проблеми, які виникають при виробництві кис-
ломолочних продуктів - низька в'язкість продукту,
високий рівень синерезису, незадовільні органо-
лептичні властивості та швидке псування - часто
вирішуються збільшенням масової частки сухого
залишку молока, додаванням штучних консерван-
тів, ароматизаторів, або стабілізаторів структури,
таких як: модифікований крохмаль, пектин, гуаро-
ва камедь, желатин, тощо. Проте ці добавки мо-
жуть негативно позначатися на органолептичних
властивостях продуктів. У більшості країн Євро-
пейського Союзу у виробництві питних кисломоло-
чних продуктів без фруктових наповнювачів дода-
вання стабілізаторів заборонено.

Альтернативним методом покращення тексту-
ри кисломолочних продуктів є застосування моло-
чнокислих бактерій, здатних до продукування ек-
зополісахаридів, скорочено - ЕПС. Показово, що
ЕПС продукує культури відіграють провідну роль
у реологічній поведінці та формуванні текстури
ферментованого молока, запобігаючи руйнуванню
гелю, відділенню сироватки та збільшуючи в'яз-
кість. Це відбувається насамперед завдяки фор-
муванню зв'язків між ЕПС, поверхнею клітини та

протеїнами молока. ЕПС мають надзвичайно цінні
технологічні переваги, оскільки в розчинах пово-
дяться як загущувачі, стабілізатори, емульгатори,
гелеутворювальні та водозв'язувальні агенти
[Broadbent J. R., McMahon D. J., Welker D. L. et al.
Biochemistry, genetics, and applications of
exopolysaccharide production in Streptococcus
thermophilus: A review//J. of dairy science. - 2003. -
№86. -Р. 407-423].

Окрім того, деякі з мікробних ЕПС поряд зі
здатністю покращувати текстуру кисломолочних
продуктів, проявляють також імуномодульовальну,
антивиразкову, антиканцерогенну та холестерин-
знижувальну активності [Vanningelgem F., Zamfir M.,
Mozzi F. Biodiversity of exopolysaccharides produced
by Streptococcus thermophilus strains is reflected in
their production and their molecular and functional
characteristics// Applied and environmental
microbiology. - 2004. № 2. -Р. 900-912].

Саме тому пошук штамів молочнокислих бак-
терій, здатних продукувати ЕПС, та впровадження
їх у виробництво молочних продуктів є актуальною
проблемою сучасної біотехнології.

Відомо штам Streptococcus thermophilus ВКПМ
B-3810, який використовується у виробництві бак-
теріальних препаратів і кисломолочних напоїв
(Патент СССР 1774655 А1, С12N1/20, А23С9/12,
1991). Штам виділено з кефірних грибків та селек-

(13) C2

(11) 92287

(19) UA

ціоновано за здатністю до продукції в'язких речовин полісахаридної природи, стійкістю бактеріальних клітин під час їхнього заморожування та сублімаційного сушіння, антагоністичною активністю. Штам у молоці утворює щільний згусток з добрими органолептичними показниками, продукує до 1 % полісахаридів, при цьому в'язкість згустку становить 0,381-0,450 Па·с за градієнта швидкості зсуву 48,6 с⁻¹. Однак, штам не придатний до використання в середовищі у присутності інгібіторів росту: 2 % жовчі, 6,5 % NaCl, не відновлює лакмусове молоко. Це зменшує виробничу та функціональну цінність штаму.

Відомо штам *Streptococcus thermophilus* ВКПМ В-4463/27, який вирізняється підвищеною стійкістю до інгібіторів росту та здатністю стабільно утворювати в'язкий молочний згусток, який не руйнується за перемішування (Патент СССР 1664838 А1, С12Н1/20, А23С9/12, 1991). Штам росте в середовищі з 4 % NaCl, 40 % жовчі, 0,1 % метиленового голубого. За 3 % інокуляції та оптимальної температури (37-40) °С штам утворює упродовж (3,5-4,5) год молочний згусток в'язкої консистенції, в'язкість 0,453 Па·с за градієнта швидкості зсуву 48,6 с⁻¹. Також, штам є стійким до 0,1 од./см³ пеніциліну, бактеріофагу, добре поєднується з іншими штамми термофільного стрептококу, болгарською паличкою та мезофільним стрептококом. Недоліком штаму є те, що застосування його передбачає приготування рідких заквасок у два етапи - лабораторної та виробничої. Ці додаткові технологічні операції не тільки ускладнюють процес виробництва того чи іншого кисломолочного продукту, але й створюють сприятливі умови для контамінації сторонньою мікрофлорою та ураження бактеріофагами.

Найближчим до штаму, що заявляється, є штам *Streptococcus thermophilus* ВКПМ В-4464/66, який використовується у бактеріальних заквасках для кисломолочних продуктів (Патент СССР 1730142 А1, С12Н1/20, 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 та інкубації за температури (37-40) °С здатний стабільно утворювати щільний молочний згусток упродовж 3,5 год. Штам є стійким до 1,0 од./см³ пеніциліну та бактеріофагу, зберігає свої властивості у сухій культурі. Недоліком цього штаму є відсутність антагоністичної активності, холестерин-знижувальної активності, посередні показники реологічних властивостей.

Завданням винаходу є одержання високоактивного штаму *Streptococcus thermophilus* - скорочена назва *S. thermophilus*, - який має високу здатність до утворення капсульних екзополісахаридів, що забезпечує формування в'язкої текстури ферментованого молока, характеризується холестерин-знижувальною активністю, антагоністичною дією по відношенню до широкого кола патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, помірною

енергією кислотоутворення в молоці, резистентний до бактеріофагів.

Штам *S. thermophilus* був одержаний у результаті спрямованої селекції культури, вилученої із самоквасного 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 згідно з проведеними дослідженнями вірулентних властивостей та відповідних нормативних матеріалів належить до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи теплокровних істот (Висновок щодо дослідження вірулентності ІМВ НАНУ від 25 червня 2008р.). Штам первісно депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України і зареєстровано за номером ІМВ В-7247.

Штам *S. thermophilus* ІМВ В-7247 використовується у виробництві бактеріальних препаратів і кисломолочних продуктів.

Штам *S. thermophilus* ІМВ В-7247 характеризується такими ознаками та властивостями.

Культурально-морфологічні ознаки штаму. Грампозитивні коки, діаметром (0,7-0,8) мкм, нерухомі, не утворюють спори, розташовані переважно у вигляді диплококів і ланцюжків диплококів різної довжини. В агарі з гідролізованим молоком утворює колонії у вигляді "човників" білого кольору діаметром не більше 1,5 мм, на поверхні середовища - краплеподібні білуваті блискучі колонії діаметром (1,0-1,5) мм. У гідролізованому бульйоні та рідкому середовищі МРС росте з утворенням рівномірної каламуті та дрібнодисперсного осаду на дні пробірки: за лужних умов рН 9,6 од розвитку не помічено.

Фізіолого-біохімічні властивості штаму. Штам є факультативним анаеробом. Оптимальна температура росту (37-38) °С. Штам ферментує глюкозу, лактозу, галактозу, сахарозу, не ферментує маніт, сорбіт, рамнозу, ксилозу, гліцерин, маннозу. Штам відновлює лакмусове молоко, не утворює аміаку з аргініну. При внесенні 3 % культури в молоко за температури 37 °С молокозсідальна активність штаму становить 4,5 год.

Штам *S. thermophilus* характеризуються помірним кислотоутворенням, що є однією з найважливіших властивостей заквашувальних культур для промислового виробництва кисломолочних продуктів, оскільки не призводить до їхнього закисання упродовж зберігання. Гранична кислотність штаму становить 100 °Т.

Реологічні властивості. Структурно-механічні характеристики молока, ферментованого штамом, визначали за допомогою ротаційного віскозиметра "RHEOTEST II" з вимірювальною системою циліндр-циліндр (S/S₃). За результатами експериментальних досліджень було встановлено залежність ефективної в'язкості від напруження зсуву чи швидкості деформації та визначено індекс текучості, темп руйнування структури. Штам, що заявляється, за розвитку у знежиреному молоці утворює щільний в'язкий згусток з ефективною в'язкістю в

3,6 рази більше ніж штам-прототип - таблиця 1 «Реологічні властивості штамів *S. thermophilus*». Отримані значення індексу текучості ($0 < n < 1$) та темпу руйнування структури ($0 < m < 1$), дозволили класифікувати молочні згустки *S. thermophilus*, як псевдопластичні системи.

Штам *S. thermophilus* характеризується здатністю до утворення капсульних екзополісахаридів. Відомо, що капсульні екзополісахариди, щільно прикріплені до поверхні клітини за рахунок формування ковалентних зв'язків, тому ця форма ЕПС мало змінюється з часом. Вони виступають центрами утворення пор у казеїновій сітці, забезпечуючи у такий спосіб більшу кількість взаємодій між складниками формування мікроструктури кисломолочного згустку.

Штам *S. thermophilus* упродовж росту утворює капсули з ЕПС у 2 рази більшої товщини ніж прототип - Фіг.1 «Мікрофотографії штамів *S. thermophilus*». Так, у знежиреному молоці товщина капсули штаму-прототипу становить лише $(8,9 \pm 0,9)$ мкм - Фіг.1-I, а штаму, що заявляється - $(18,0 \pm 1,0)$ мкм - Фіг.1-II.

Здатність штаму *S. thermophilus* утворювати капсули більшої товщини ніж прототип значно поліпшує реологічні властивості ферментованого молока, зокрема, збільшуючи в'язкість, посилюючи пластичність згустку та його стійкість до синерезису за технологічного навантаження.

Ефективна в'язкість кисломолочного згустку, утвореного новим штамом *S. thermophilus*, зростає паралельно з нагромадженням клітин. Статистична обробка отриманих результатів показала, що між чисельністю клітин та ефективною в'язкістю згустків існує прямий та достатньо тісний зв'язок. Коефіцієнт кореляції Спірмена становить 0,72 і є вірогідним, оскільки фактичне значення критерію Ст'юдента перевищує його теоретичне значення на 5 %-ому рівні.

Аналіз реологічних властивостей свідчить, що штам *S. thermophilus* IMB B-7247 за текстуроутворювальною здатністю істотно перевищує показники штаму-прототипу, і є перспективним з точки зору поліпшення консистенції кисломолочних продуктів.

Функціональні властивості штаму. Штам *S. thermophilus*, що заявляється, характеризується стійкістю до інгібіторів росту. Він вигідно вирізняється від прототипу за здатністю знижувати рівень холестерину за ферментації молока та проявом антагоністичної дії щодо патогенних та умовно-патогенних тест-культур родів *Proteus*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Enterobacteria* та *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis* - таблиця 2 «Функціональні властивості штамів *S. thermophilus*». Такі характеристики нового штаму *S. thermophilus* дозволять поліпшити дієтичні та санітарні показники кисломолочних продуктів, вироблених з його застосуванням.

Штам, що заявляється, резистентний до фагів, активних щодо *S. Thermophilus*.

Сукупність зазначених біотехнологічних властивостей штаму, а саме: стійкість до інгібіторів росту, високий рівень антагоністичної, холестерин-знижувальної активності, здатність до продукції капсульних екзополісахаридів і фагостійкість, за-

безпечать високу якість та функціональну активність кисломолочних продуктів з його використанням.

Приклад 1. Одержання лабораторної закваски *S. thermophilus* IMB B-7247. У 100 см^3 стерилізованого знежиреного молока з температурою $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ вносять 1 % свіжої чистої культури *S. thermophilus* IMB B-7247 і термостатують за вказаної температури до утворення згустку, після чого охолоджують і використовують для приготування пересадкової лабораторної або виробничої закваски. Для цього в 10 дм^3 стерилізованого молока з температурою $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ вносять 3 % первинної лабораторної закваски і витримують за вказаної температури до утворення згустку упродовж (4-5) год. Кількість життєздатних клітин *S. thermophilus* IMB B-7247 у заквасці складає $6,0 \cdot 10^8$ КУО/см³. Закваска характеризується чистим кисломолочним смаком, в'язкою консистенцією, величина коефіцієнту В становить $(171,57 \pm 34,67)$ мПа, титрована кислотність згустку 90°T .

Приклад 2. Виробництво бактеріального концентрату з використанням штаму *S. thermophilus* IMB B-7247. Для приготування ростового середовища сухе знежирене молоко в кількості 30 г на 1 дм^3 розчиняють у невеликій кількості водопровідної води з температурою $(43 \pm 2)^\circ\text{C}$ упродовж (30 ± 10) хв, фільтрують через марлю, додають гарячу воду до необхідного об'єму, установлюють рН $(6,8 \pm 0,1)$. Одержане молоко підігривають до температури $(55 \pm 1)^\circ\text{C}$ та вносять ферментний препарат протосубтілін ГЗХ активністю 70 од. у кількості $(0,20 \pm 0,01)$ г на 1 дм^3 . Фермент завчасно активізують у водопровідній воді, так щоб масова частка його в розчині складала (1-5) %, за температури $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ упродовж (30 ± 5) хв. Гідроліз молока проводять за температури $(55 \pm 1)^\circ\text{C}$ упродовж $(2,5 \pm 0,5)$ год. У гідролізоване молоко вносять із розрахунку на 1 дм^3 : $(10,00 \pm 0,05)$ г тризаміщеного лимоннокислого натрію, $(20 \pm 0,5)$ см³ кукурудзяного екстракту, розведеного водою 1:1, $(0,25 \pm 0,005)$ г сірчанокислого магнію або $(0,16 \pm 0,05)$ г сірчанокислого марганцю. У середовищі встановлюють рН $(7,6 \pm 0,1)$ шляхом додавання 30%-ного розчину гідроксиду натрію та стерилізують його за температури $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ упродовж $(30,0 \pm 0,5)$ хв. Активна кислотність середовища після стерилізації повинна бути $(6,8 \pm 0,1)$ од. рН. Після стерилізації середовище охолоджують до температури $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ та вносять 1 % стерилізованого знежиреного молока.

Інокулят молочнокислих бактерій готують на стерильному знежиреному молоці шляхом культивування штаму *S. thermophilus* IMB B-7247 з посівною дозою 1 % за температури $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ упродовж 12 год. У ростове середовище вносять 3 % інокулята та старанно перемішують. Культивування проводять упродовж (9-10) год за температури $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ з періодичним перемішуванням та контролем активної кислотності ростового середовища на рівні 6,6 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 1:1 із захисним

середовищем такого складу (в г/дм³): тризаміщений лимоннокислий натрій - 50, сахароза - 100, вода - до 1 дм³. Суспензію клітин у захисному середовищі розливають у стерильні кювети шаром 5 мм, заморожують у морозильній шафі за температури мінус 40 °С упродовж (16-18) год, після чого сушать у сублімаційній сушарці протягом (18-20) год за таких режимів: початок сушіння за температури мінус 25 °С, закінчення - за температури плюс 30 °С. Чисельність життєздатних клітин молочнокислих бактерій у 1 г сухого бактеріального концентрату становить не менше $5,0 \cdot 10^{10}$ КУО. Бактеріальний концентрат швидко реактивується без додаткової стадії активізації. Стабільність властивостей концентрату зберігається тривалий час та визначається температурою зберігання - 6 місяців за (6-8) °С і 12 місяців за мінус (18-20) °С. Активність бакконцентрату при внесенні 1 г у 1 дм³ стерилізованого молока за температури (38±1) °С: тривалість зквашування молока - (4-6) год, приріст титровної кислотності через 3 години культивування (35-40) °Т.

Приклад 3. Приготування ряжанки з використанням бактеріального концентрату зі штамом *S. thermophilus* IMB B-7247.

1000 дм³ нормалізованого молока пастеризують за температури 98 °С з витримкою впродовж 2 годин, потім охолоджують до (40±2) °С. Флакон або пакет з сухим концентратом, який приготовлено за прикладом 2, з додержанням правил асептики відкривають і висипають його вміст у підготов-

лену молочну основу та старанно перемішують упродовж (20-30) хв. Бакконцентрат вносять із розрахунку (5-10) г на 1 т молока. Зквашування ведуть за температури (40±2) °С упродовж (8±2) год до утворення згустку та наростання кислотності до (70-80) °Т, охолоджують до 8 °С.

Приклад 4. Приготування ряжанки з використанням бактеріального концентрату зі штамом-прототипом *S. thermophilus* ВКПМ В-4464/66. Виробляють ряжанку аналогічно способу 3 з використанням бакконцентрату, виготовленому за способом 2 з заміною штаму *S. thermophilus* IMB B-7247, що заявляється, на штам-прототип *S. thermophilus* ВКПМ В-4464/66.

Характеристика продуктів, виготовлених за прикладами 3-4, наведена у таблиці 3 «Характеристика ряжанки». Використання штаму *S. thermophilus* IMB B-7247 значно поліпшує технологічні показники ряжанки, зокрема, ефективна в'язкість продукту збільшилась у 1,3 рази порівняно до ряжанки, виготовленої зі штамом-прототипом.

Штам *S. thermophilus* IMB B-7247 має високу здатність до утворення капсульних екзополісахаридів, що забезпечує формування в'язкої текстури ферментованого молока, характеризується холестерин-знижувальною активністю, антагоністичною дією по відношенню до широкого кола патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, помірною енергією кислотоутворення в молоці, резистентний до бактеріофагів.

Таблиця 1

Реологічні властивості штамів *S. thermophilus*

Показник	Штами <i>S. thermophilus</i>	
	ВКПМ В-4464/66 (прототип)	IMB В-7247 (заявляється)
В'язкість за градієнта швидкості зсуву 48,6 с ⁻¹ , Па·с	0,239	0,852
Індекс текучості, n	0,114	0,286
Темп руйнування, m	0,8855	0,7136

Таблиця 2

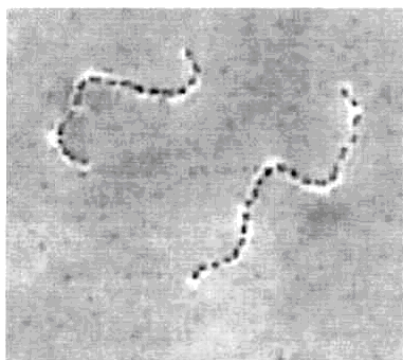
Функціональні властивості штамів *S. thermophilus*

Показник	Штами <i>St. thermophilus</i>	
	ВКПМ В-4464/66 (прототип)	IMB В-7247 (заявляється)
Ріст в гідролізованому молоці з жовчею, %		
20	+	+
40	+	+
Ріст в гідролізованому молоці з NaCl, %		
2	+	+
4	+	+
Ріст в молоці з 0,1 % метиленової сині	+	+
Здатність до зниження вмісту холестерину в молоці, %	-	21,0
Антагоністична активність (чутливі штамів ентеро-патогенних бактерій, у %)		67

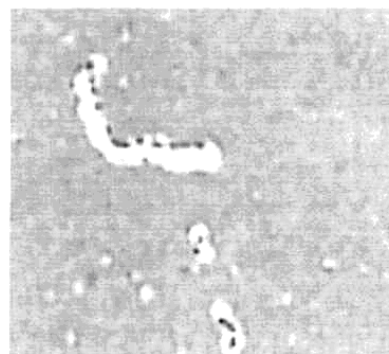
Таблиця 3

Характеристика ряжанки

Спосіб готування	Бактеріальний склад	В'язкість, коефіцієнт В мПа*с	Кислотність, °Т
Приклад 3	IMB B-7247	122,31±4,35	80,00±4,07
Приклад 4	IMB B-4464/66	96,77±3,66	85,66±3,2



I



II

Fig.1 Мікрофотографії штамів *S. thermophilus*
(збільшення $\times 1500$)

I – штам-прототип; II – штам, що заявляється