



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 115108

(13) C2

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

A23C 19/032 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2016 06265**
- (22) Дата подання заявки: **09.06.2016**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **11.09.2017**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **26.12.2016, Бюл.№ 24**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **11.09.2017, Бюл.№ 17**
- (72) Винахідник(и):
**Шугай Мирослава Олександрівна (UA),
Чорна Наталія Анатоліївна (UA)**
- (73) Власник(и):
**ІНСТИТУТ ПРОДОВОЛЬЧИХ РЕСУРСІВ
НААН,
вул. М. Раскової, 4-а, м. Київ, 02660 (UA)**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
B. Bogovič Matijašić. Inhibition of Clostridium tyrobutyricum in cheese by Lactobacillus gasseri / B. Bogovič Matijašić, M. Koman Rajšp, B. Perko, I. Rogelj // International Dairy Journal. – February 2007. – Volume 17, Issue 2. – P.157-166
UA 102803 C2, 12.08.2013
El-Ziney, M.G., Debevere, J.M., 1998. The effect of reuterin on Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 in milk and cottage cheese // Journal of Food Protection – 1998. – № 61. – P. 1275- 1280
UA 91417 C2, 26.07.2010
UA 55091 A, 17.03.2003
UA 85149 C2, 25.12.2008
UA 76906 C2, 15.09.2006
UA 62303 U, 25.08.2011
UA 96270 C2, 25.11.2011
UA 112303 C2, 25.08.2016
UA 96103790, публ. 31.08.1998
RU 2208320 C1, 20.07.2003
Шугай М.О. Ферментування
молоказаквашувальними препаратами у
поєднанні з допоміжними культурами
лактобацили / М.О. Шугай, Н.А. Чорна // Програма і матеріали четвертої міжнар. наук.-техн. конф. «Перспективи розвитку м'ясної, молочної та олієжирової галузей у контексті євроінтеграції», Київ, 24 — 25 березня 2015 р. / НУХТ. – К., 2015р. – С. 194-195
Шаптала В.В. Відбір молочнокислих бактерій для сироробства за антагоністичною активністю щодо технічно шкідливої мікрофлори / В.В. Шаптала, Н.М. Шульга, Н.Ф. Кігель // Наукові вісті НТУУ "КПІ". – 2010. – 3. – С. 38-41
Шугай М. О. Пошук і характеристика молочнокислих бактерій, перспективних для виробництва сиру / Збірник наукових праць Вінницького національного аграрного університету. Серія: Технічні науки. – 2015. - № 1 (89). – С.153-158
Шугай М. Селекція штамів Lactobacillus spp. для захисних композицій при виробництві сирів / М. Шугай, Н. Чорна // Товари і ринки. Дослідження якості харчових продуктів. – 2015. – №2. – С. 73-84

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ LACTOBACILLUS CASEI SUBSP. CASEI ІМВ В-7554 ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА АНТАГОНІСТИЧНОЇ ЗАКВАСКИ ДЛЯ ТВЕРДИХ І НАПІВТВЕРДИХ СИЧУЖНИХ СИРІВ

(57) Реферат:

UA 115108 C2

Винахід стосується штаму бактерій *Lactobacillus casei subsp. casei* IMB B-7554 для виробництва антагоністичної закваски та сухих бактеріальних препаратів для твердих і напівтвердих сичужних сирів.

Винахід належить до біотехнології та є штамом лактобацил, що використовується у виробництві антагоністичної закваски для твердих і напівтвердих сичужних сирів з метою пригнічення розвитку коліформ та поліпшення смаку продукту.

Якість молочної сировини, зокрема її мікробіологічні показники, є одним із визначальних факторів безпечності та якості отриманого сиру. Важливе значення має як видовий спектр наявної в молоці мікрофлори, так і кількісні показники. Внаслідок дефіциту сиропридатної молочної сировини доводиться на виробництві використовувати молоко неналежної мікробіологічної чистоти. Порівняно м'який режим термічної обробки молока, прийнятий у сироробстві, створює умови для виживання та подальшого розвитку сторонньої мікрофлори, серед якої можуть виявитися технічно шкідливі й умовно-патогенні мікроорганізми. Їх надмірний розвиток у сирі призводить до виникнення вад отриманого продукту та загрожує зниженням його мікробіологічної безпеки.

Перспективним шляхом вирішення цієї проблеми є використання біологічного методу боротьби зі сторонньою мікрофлорою, який ґрунтується на явищі міжмікробного антагонізму і полягає у використанні біологічно активних культур, що вносяться одночасно з закваскою і пригнічують розвиток небажаної мікрофлори, не впливаючи на ферментацію.

Пригнічувальний вплив молочнокислих бактерій на розвиток небажаної мікрофлори зумовлений здатністю цих мікроорганізмів синтезувати спектр сполук різноманітної хімічної природи, що виявляють бактеріостатичну чи бактерицидну дію. Насамперед, це молочна кислота, що є основним метаболітом лактобактерій, а також оцтова кислота та жирні кислоти, діацетил, перекис водню - тобто сполуки, які зумовлюють неспецифічний антагонізм. Крім того, молочнокислі бактерії здатні до продукції специфічних поліпептидів (бактеріоцинів), що відрізняються інтенсивністю і спектром антибіотичної дії.

Серед молочнокислих бактерій значною антагоністичною активністю відомі бактерії роду *Lactobacillus*, зокрема види *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*. Чутливість до метаболітів лактобацил виявлено у ентеробактерій, стафілококів, сальмонел, лістерій, бацил, клостридій, деяких видів плісень та дріжджів. Однак, не зважаючи на високий біологічний потенціал перелічених видів лактобацил, спектр та інтенсивність їх антагоністичного впливу значною мірою є штамоспецифічною ознакою.

Завдяки здатності лактобактерій пригнічувати розвиток умовно-патогенних та патогенних для людини мікроорганізмів на їх основі створено чимало профілактичних та лікувальних бактеріальних препаратів. Лактобацили активно залучають і до виробництва молочних ферментованих продуктів, у тому числі сирів. У сичужних сирах ці мікроорганізми значною мірою визначають спрямованість біотехнологічних процесів та завдяки наявності різноманітних ферментативних систем беруть участь у процесах протеолізу й ліполізу, продукуючи ряд ароматичних сполук, які формують смаковий букет того чи іншого виду сиру.

Відомий штам *Lactobacillus gasseri*, що використовується у виробництві твердих сичужних сирів для пригнічення розвитку спор *Clostridium tyrobutyricum* (Matijašić B.B., Koman Rajšp M., Perko B., Rogelj I. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri* // International Dairy Journal. - 2007. - № 17(2). - P. 157-166).

Відомий штам *Lactobacillus plantarum* IMB B-7371 (Патент UA № 102803, C2, C12N 1/20, C12R 1/225, A23C 19/032, 2006), який виявляє високий рівень антагонізму до маслянокислих бактерій, зокрема, *Clostridium tyrobutyricum* і використовується у виробництві твердих сичужних сирів.

Відомий штам *Lactobacillus reuteri* 12002, що пригнічує розвиток *Escherichia coli*, у тому числі високопатогенного *E. coli* O157:H7, а також *Listeria monocytogenes* у сирах (El-Ziney, M.G., Devere, J.M., 1998. The effect of reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese // Journal of Food Protection - 1998. - № 61. - P. 1275-1280).

Найближчим до штаму, що заявляється, є штам *L. acidophilus* B-7174, який використовується у виробництві заквашувальних культур для твердих сичужних сирів (Патент UA № 91417, C2, C12N 1/20, A23C 19/032, 2006). Штам *L. acidophilus* B-7174 характеризується високою протеолітичною активністю і термостійкістю, під час культивування в молоці утворює згусток з невисокої в'язкості з достатнім рівнем синерезису. Штам виявляє достатньо високу антагоністичну активність до *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* та *Bacillus subtilis*, однак посередньо пригнічує розвиток представників роду *Enterobacter*, зокрема, виду *E. aerogenes*. Зауважимо, що штами *E. aerogenes* відомі високою газоутворювальною здатністю і часто виявляються у сичужних сирах, спричиняючи вади рисунку та смаку. Крім того *L. acidophilus* B-7174 має досить високу кислотоутворюючу активність та граничну кислотність у молоці - 34°Т і 240°Т, відповідно, що дещо обмежує його використання у складі антагоністичних заквасок.

Задачею винаходу є одержання біологічно активного штаму *Lactobacillus casei* з вираженою антагоністичною активністю до умовно-патогенних і технічно шкідливих мікроорганізмів, придатного для виробництва антагоністичної закваски для твердих і напівтвердих сичужних сирів. Штам має задовольняти низку технологічних вимог, що висувуються до культур у сироробстві: помірна енергія кислотоутворення в молоці та добрі синеретичні властивості, термо-, соле- та фагостійкість, стабільність під час заморожування і сублімаційного сушіння. Бажаними характеристиками штаму є помірна протеолітична активність та здатність синтезувати смако-ароматичні сполуки, що беруть участь у формуванні смакового букету сиру.

Штам бактерій *Lactobacillus casei* B-7554, що використовується у виробництві антагоністичної закваски для твердих і напівтвердих сичужних сирів.

Пропонований штам був вилучений самостійно в лабораторних умовах з сиру домашнього приготування. Штам ідентифікований як вид *Lactobacillus casei* за основними морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями (Краткий определитель Берги, 1982; Л.А. Банникова. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности, 1975). Штам депоновано 11 грудня 2015 року в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного ПАН України і зареєстровано під номером IMB B-7554.

Скорочена назва штаму - *L. casei*. Штам використовується у виробництві антагоністичної закваски для твердих і напівтвердих сичужних сирів з метою пригнічення розвитку сторонньої мікрофлори, насамперед коліформ, та поліпшення смаку продукту.

Культурально-морфологічні властивості

Клітини нерухомі, грампозитивні, не здатні до спороутворення, паличкоподібної форми. Мають товщину від 0,5 до 0,7 мкм та довжину від 2,0 до 4,0 мкм, можуть розташовуватися поодинокі, або утворювати короткі ланцюжки.

В агаризованих середовищах - МРС та гідролізованому молоці - утворює колонії білого кольору діаметром 1-1,5 мм у вигляді "човників" чи дисків, на поверхні агару - дрібні й плоскі. У рідкій культурі росте у вигляді однорідної каламуті та дрібнодисперсного осаду на дні.

Штам вирощують за температури 37 ± 1 °C протягом 18-24 годин у поживному рідкому середовищі МРС. Штам здатен розвиватися у середовищі з відновленого знежиреного молока та з гідролізованого знежиреного молока. Для отримання щільного середовища в МРС чи гідролізоване знежирене молоко додають 2 % агару.

Фізіолого-біохімічні властивості

Штам є факультативним анаеробом, росте в температурному діапазоні від +12 до +45 °C, оптимальна температура росту становить 37 ± 1 °C. За оптимальної температури та інокуляції 3 % штам коагулює білки молока упродовж 18-24 годин з утворенням щільного однорідного згустку приємного кисломолочного смаку. Гранична кислотність у молоці становить 210°T. Нагромадження клітин у молоці складає $5,0 \times 10^8$ КУО/см³.

Штам зброджує глюкозу без утворення вуглекислого газу. Ферментує широкий спектр вуглеводів і спиртів: галактозу, глюкозу, лактозу, мальтозу, манітол, рибозу, цукрозу, сорбітол, фруктозу.

Не ферментує: арабінозу, ксилолу, рамнозу, рафінозу.

Штам можна зберігати у відновленому знежиреному молоці, частота пересівів становить 3 тижні. Довготривало зберігається в сублімованому стані - 2 роки і більше.

Антагоністичні властивості штаму

Запропонований штам *L. casei* виявляє високу антагоністичну активність до технічно шкідливих мікроорганізмів виробництва сиру. *L. casei* здатен пригнічувати розвиток грамнегативних і грампозитивних бактерій, які належать до основних груп мікробних забрудників твердих і напівтвердих сирів: коліформ, золотистого стафілококу, мікроорганізмів роду *Bacillus*. Однак найбільш інтенсивно пригнічує ріст коліформ, зокрема, видів *Escherichia coli* та *Enterobacter aerogenes*: величина зон затримки росту тест-культур за методом "лунок" становить 24-25 мм. Антагоністичні властивості штаму представлено в таблиці 1. "Антагоністична активність штаму *L. casei* B-7554".

Технологічні властивості штаму

L. casei ферментує молоко з утворенням однорідного помірно в'язкого згустку достатнього рівня синерезису - 38 %. Невисока кінематична в'язкість згустку та повніша коагуляція білків сприяє зменшенню вмісту білкових сполук у сироватці та мінімізує втрату сухих речовин внаслідок утворення сирного пилу.

Через 6 годин ферментування штам підвищує титровану кислотність молока до 30 °T. Така помірна кислотоутворююча активність, а також невисоке значення граничної кислотності утвореного згустку - 200°T, дає змогу використовувати штам без ризику надмірного

закислення молочної суміші та сирної маси. Ця властивість вигідно відрізняє запропонований штам від прототипу.

Ще однією позитивною характеристикою *L. casei* є здатність розщеплювати пептиди молока з утворенням низки смако-ароматичних сполук. Так, у ферментованому штамом молоці кількість летких органічних кислот становила 466,2 мкекв/100 г, діацетилу - 0,177 мг/100 г, а серед вільних амінокислот значну частку (понад 48 %) становили пролін, гліцин та аланін, які поліпшують смак сиру, надаючи йому приємного солодкуватого присмаку.

L. casei є термостійким - більшість клітин популяції зберігають життєздатність за температури 60 °C упродовж 1 години. Таким чином, штам можна ефективно використовувати у виробництві сирів як з низькою, так і з високою температурою другого нагрівання. Позитивною характеристикою штаму порівняно з прототипом є його вища солестійкість, що дозволяє використовувати *L. casei* у технологіях часткового соління сиру в зерні та розсільних сирів.

Високий ступінь виживання клітин штаму, що заявляється, під час сублімаційного сушіння - 89-91 %, дає змогу отримати високоактивний бактеріальний концентрат і препарат прямого внесення. Найважливіші технологічні властивості штаму представлено в таблиці 2. "Технологічні властивості штаму *L. casei* B-7554".

Приклад 1. Одержання лабораторної закваски *L. casei* B-7554. Лабораторну закваску готують на стерильному цільному або знежиреному молоці. У 100 см³ стерилізованого за температури 121 °C з витримкою 15-20 хв молока, охолодженого до температури (37±1)°C, стерильно вносять 1 % активізованої чистої культури *L. casei* та термостатують за вказаної температури до утворення згустку. Молочний згусток охолоджують не перемішуючи і зберігають охолодженим до використання. Термін зберігання лабораторної закваски за температури 3-6 °C становить 72 год., а за температури 8-10 °C - 24 год. Лабораторну закваску використовують для приготування лабораторної або виробничої закваски. Для цього стерильне молоко за температури (37±1) °C інокують первинною лабораторною закваскою у кількості 3 % і витримують за тієї ж температури упродовж 18-24 годин до утворення згустку. Чисельність життєздатних клітин *L. casei* у заквасці становить 5×10⁸ КУО/см³.

Приклад 2. Виробництво сухого бактеріального концентрату *L. casei* B-7554

У 100 дм³ водопровідної води температури 45 °C розчиняють 3,0 кг сухого знежиреного молока та встановлюють рН на рівні 6,7 одиниць. Молоко підігривають до температури 55 °C та вносять 50 г протосубтиліну ГЗХ активністю 70 од. Гідроліз молока проводять за температури 55 °C протягом 3 год. У гідролізоване молоко додають, компоненти у таких кількостях: 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 26 хвилин та охолоджують до температури 39 °C. Активну кислотність середовища встановлюють на рівні 6,7 одиниць рН і вносять 5,0 дм³ лабораторної чи виробничої закваски *L. casei*. Культивування проводять протягом 18 годин за температури 37 °C та за періодичного перемішування, контролюючи активну кислотність на рівні 6,7 од. рН за допомогою 25 %-го водного розчину аміаку. Після закінчення культивування середовище охолоджують до температури 10 °C та відокремлюють біомасу. Одержану біомасу змішують у співвідношенні 1:2 із захисним середовищем такого складу (в г/дм³): лимоннокислий натрій - 50, сахароза - 100, вода - до 1 дм³. Суспензію клітин у захисному середовищі розливають у стерильні кювети шаром 1 см, заморожують у морозильній камері за температури мінус 40 °C упродовж 6 год., після чого сушать у сублімаційній сушарці протягом 30 год. за 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 6,0×10¹⁰ КУО. Бактеріальний концентрат використовують у виробництві антагоністичної закваски для твердих і напівтвердих сичужних сирів.

Приклад 3. Виробництво сиру з використанням штаму *L. casei* B-7554

Незбиране коров'яче молоко не нижче першого ґатунку пастеризують за температури 72±2 °C упродовж 15-20 с та охолоджують до температури 34 °C. Вносять сухий заквашувальний препарат для виробництва сиру та лабораторну закваску або сухий бактеріальний концентрат *L. casei* B-7554 з розрахунку, щоб чисельність клітин *L. casei* у молоці становила 2÷4×10⁵ КУО/см³. Витримують 30 хв за температури 34 °C. У заквашену молочну суміш додають у вигляді водних розчинів сичужний фермент та хлорид кальцію з розрахунку 30-40 г сухої речовини на 100 кг молока. Через 40-60 хвилин витримки за температури 34 °C розрізають утворений згусток; перемішують упродовж 20 хв після чого видаляють 30 % сироватки. Титрована кислотність сироватки становить 15°Т. Проводять друге нагрівання сирного зерна поступово піднімаючи температуру до 42 °C, при цьому продовжують вимішування сирного зерна за цієї температури упродовж 40 хв. Готове сирне зерно

вивантажують у форми та проводять його пресування. Активна кислотність сиру після пресування становить 5,5-5,6 од. рН. Соління сиру проводять у розсолі з концентрацією кухонної солі 18-20 % за температури 20 °С. Визрівання сиру здійснюють за температури 12 °С та відносній вологості повітря 85 % упродовж 35-40 діб. Готовий сир характеризується такими показниками: 5,36 од. рН, загальна чисельність молочнокислих бактерій - 8×10^8 КУО/г, бактерії групи кишкової палички відсутні.

Штам *L. casei* B-7554 рекомендується для виробництва антагоністичної закваски та сухих бактеріальних препаратів для твердих і напівтвердих сичужних сирів. Застосування штаму дозволяє зменшити рівень забруднення сиру коліформами та іншими видами, сторонньої мікрофлори, а також збагатити смаковий букет продукту.

Таблиця 1

Антагоністична активність штаму *L. casei* B-7554

| Тест-культура | Діаметр зони затримки росту тест-культури, мм | |
|-------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|
| | <i>L. casei</i> B-7554 | <i>L. acidophilus</i> B-7174 (прототип) |
| <i>Escherichia coli</i> | 24-25 | 23-26 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 24-25 | 15-16 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 19-20 | 16-18 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 24 | 16-18 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 22-23 | 18-20 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 21-22 | 20-22 |

Таблиця 2

Технологічні властивості штаму *L. casei* B-7554

| Показник | <i>L. casei</i> B-7554 | <i>L. acidophilus</i> B-7174 (прототип) |
|--------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|
| Гранична кислотність у молоці, °Т | 210 | 240 |
| Титрована кислотність через 6 год. ферментування, °Т | 30 | 34 |
| Активна кислотність через 24 год. культивування | 4,28 | 3,9 |
| Синерезис молочного згустка, % | 38 | 25 |
| Кінетична в'язкість молочного згустку (за температури 20 °С), Па·с | $3,0 \cdot 10^{-3}$ | $8,0 \cdot 10^{-3}$ |
| Вміст білкових сполук у сироватці, мг/см ³ | 2,3 | 2,7 |
| Солестійкість (розвиток за наявності NaCl) | | |
| 5,0 % | + | - |
| 6,0 % | + | - |
| Термостійкість упродовж 60 хв за температури 60 °С | + | + |
| Фагостійкість | + | + |
| Вживання після ліофілізації, % | 89-91 | 73 |

15

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Штам бактерій *Lactobacillus casei subsp. casei* IMB B-7554 для виробництва антагоністичної закваски для твердих і напівтвердих сичужних сирів.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601