



УКРАЇНА

(19) UA (11) 39535 (13) A

(51) 7 C12N1/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ ПРЯМОГО ВНЕСЕННЯ ДЛЯ СМЕТАНИ

(21) 2000105623

(22) 03.10.2000

(24) 15.06.2001

(46) 15.06.2001, Бюл. № 5, 2001 р.

(72) Кігель Наталія Федорівна, Насирова Гузель
Фургатівна, Рожанська Олександра Михайлівна,
Романчук Ірина Олегівна(73) ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ІНСТИТУТ МОЛОКА ТА
М'ЯСА УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК(57) Спосіб одержання бактеріального препарату
прямого внесення для сметани, який передбачає
приготування ростового середовища на основі
гідролізату знежиреного молока з додаванням
нативного молока та стимуляторів росту, внесення

посівного матеріалу, культивування, відокремлення біомаси, змішування її з захисним середовищем, заморожування і сушіння, який відрізняється тим, що у живильне середовище додатково вносять нативне молоко, кукурудзяний екстракт та лактозу, внесення посівного матеріалу проводять у 2 етапи: спочатку вносять мезофільні лактококи, а через 6-7 годин культивування - термофільні стрептококи, що забезпечує чисельне співвідношення при культивуванні між кислото- та ароматоутворюючими групами мезофільних лактококів і термофільними стрептококами 4,0 : 3,5 : 2,5, біомасу змішують із захисним середовищем, яке містить 22% сухої речовини, у співвідношенні 1,0:(1,5-2,0).

Винахід відноситься до біотехнології і може бути використаний у молочній промисловості при виробництві кисломолочних продуктів.

Відомо спосіб одержання ліофілізованого бактеріального концентрату мезофільних молочнокислих стрептококів для виробництва кисломолочних продуктів, який дозволяє підвищити вихід та активність концентрату завдяки використанню у складі ростового середовища 0,5-0,8% амінокислотно-вітамінного комплексу AMIBIT, а у складі захисного середовища - хлориду натрію, желатину, фітину та апілака (А.с. СРСР № 1159949, С12N1/04, А23С9/12, 1982).

Недоліком цього способу можна вважати високу собівартість компонентів, необхідних для одержання концентрату, та складність приготування ростового та захисного середовищ.

Відомо також спосіб одержання закваски "Истринская" для сметани, сиру кисломолочного, молочних напоїв та молочнотвірних концентратів (Патент RU № 2052940, А23С9/12, 1996). Спосіб передбачає вивільнення мезофільних та ароматоутворюючих стрептококів природного симбіозу кефірних грибків від термофільних та мезофільних молочнокислих паличок, стрептобактерій, оцтовокислих бактерій та дріжджів шляхом послідовного інкубування грибкового зливу у молоці. Передбачено 3-6 етапів терміном від 16 до 18 годин з різною температурою на кожному етапі. Спо-

сіб забезпечує одержання закваски з високою стійкістю до антибіотиків та інших інгібуючих речовин і гарантованими властивостями щодо згортання молока. Але у цьому способі трудомістка багатостадійна процедура одержання закваски.

Існує спосіб одержання бактеріального концентрату для сквашування молока при виробництві маргарину. Для інокулювання ростового середовища використовують в'язкі штами мезофільних стрептококів з підвищеною здатністю до утворення діацетилу. В момент заквашування та в стадії активного росту клітин до ростового середовища вносять спиртовий екстракт соняшникового лушпиння у кількості 0,3-0,5%. Захисним середовищем є 16% водний розчин сухого знежиреного молока з двозаміщеним фосфорнокислим натрієм (1%). При цьому співвідношення біомаси та захисного середовища встановлюють 1:3-1:5. Спосіб дозволяє одержувати сухий концентрат з титром клітин $5 \cdot 10^{11}$ КУО/г (А.с. СРСР № 1510350, С12N1/20, А23С9/12, 1987).

Недоліком цього способу є висока енергоємність технології цього процесу.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб виробництва бактеріального концентрату "Дніпрянский-2" для сметани та кисломолочних напоїв (Концентрат бактеріальний сухой "Днепрский-2", ТУ У 46.39.088-96) - прототип.

(19) UA (11) 39535 (13) A

Відповідно до цього способу в ростове середовище на основі освітленої сироватки, яке містить гідролізоване молоко (5%), цитрат натрію (1%), сірчаноокислий марганець (0,016%) та солі фосфорної кислоти, вносять інокулянт молочнокислих та оцтовокислих бактерій. Накопичення біомаси проводять 12–14 год при температурі 30°C, біомасу відокремлюють від культуральної рідини і змішують із захисним середовищем у співвідношенні 1:1. Захисне середовище готується на гідролізованому молоці і містить сахарозу (10%), цитрат натрію (1%) та гліцерин (2%). Суспензію заморожують та ліофілічно висушують.

Однак застосування одержаного за відомим способом концентрату передбачає його активізацію та приготування пересадкових заквасок. Багатостадійність процесу вироблення продукту підвищує вимоги до його вторинної контамінації, а наявність оцтовокислих бактерій у складі мікрофлори концентрату призводить до погіршення якості готового продукту за рахунок переокисання та надмірного слизоутворення, особливо у літній період.

Завданням винаходу, що пропонується, є забезпечення високого рівня реактивації бактеріального препарату для сметани, більш тривалого терміну зберігання ліофілізованого препарату та інтенсифікації технологічного процесу виробництва сметани при його використанні.

Це досягається тим, що, згідно з винаходом, одержання бактеріального препарату передбачає приготування живильного середовища, внесення посівного матеріалу, що містить мезофільні та термофільні штами лактобактерій, культивування, відокремлення біомаси, змішування її з захисним середовищем, заморожування і сушіння. При цьому як живильне середовище застосовують гідролізоване протосубтіліном відновлене знежирене молоко з додаванням нативного молока, кукурудзяного екстракту, лактози та стимуляторів росту, а як посівний матеріал використовують відібрані за здатністю до кислотоутворення, ароматизування та синтезу в'язких полімерів штами мезофільних лактококів і термофільних стрептококів, які вносять у 2 етапи. Це забезпечує необхідне чисельне співвідношення при культивуванні між кислото- та ароматизуючими групами мезофільних лактококів і термофільними стрептококами – 4:0,3:5:2,5. Як захисне середовище використовують водний розчин сахарози (16%) і тризаміщеного пімоннокислого натрію (6%). Змішування біомаси із захисним середовищем ведуть у співвідношенні 1:0 (1,5–2,0).

До складу мікрофлори препарату введено культури мезофільних молочнокислих бактерій *Lactococcus lactis* ssp *lactis* штам 1103, *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* штам 1218, які характеризуються високою активністю згортання молока та помірним кислотоутворенням, *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* штам 1313 з високим рівнем ароматизування та сполучення в'язкого штаму *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* 1220 та не-в'язкого штаму *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* 2136, що утворюють при розвитку в молоці гомогенний згусток щільної, в'язкої консистенції.

Забезпечення високої якості цільового продукту досягається певним співвідношенням чи-

сельності у бактеріальному препараті кислотоутворюючих мезофільних лактококів (не більше 40%), ароматизуючих бактерій (у межах 35%) та термофільних стрептококів (не менше, ніж 25% від загальної кількості клітин).

Ростове середовище для накопичення бактеріальної маси складене з урахуванням живильних потреб кожного з компонентів бактеріального препарату. Інтенсифікація розвитку молочнокислих бактерій сприяють гідролізат молока, який містить легко засвоювані небілкові азотисті сполуки, кукурудзяний екстракт, що є фактором росту, додаткова кількість лактози та мікроелементи – магній та марганець. Розвиток термофільних стрептококів стимулюється наявністю у ростовому середовищі нативного молочного білка, а ароматизуючих лактококів – цитрату натрію.

Внесення посівного матеріалу у 2 етапи спочатку мезофільні лактококи, а через 6–7 годин культивування термофільні стрептококи, – дозволяє одержати клітини всіх видів бактерій, що знаходяться у логарифмічній фазі росту і мають найвищий рівень фізіологічно-біохімічних процесів. Це сприяє більш швидкій реактивації лактобактерій після висушування.

Одержана при культивуванні бактеріальна маса змішується із захисним середовищем, що містить збільшену кількість сухої речовини (22%), у співвідношенні 1:0 (1,5–2,0). При цьому підвищується здатність молочнокислих бактерій до виживання під час сублімаційного сушіння – кількість життєздатних клітин в бактеріальному препараті після реактивації складає 97–99% від початкового.

Сухий препарат вироблений за запропонованим способом, відрізняється підвищеною здатністю до зберігання.

Спосіб здійснюється таким чином:

Для приготування ростового середовища сухе знежирене молоко в кількості 30 г на 1 дм³ розчиняють у водопровідній воді, встановлюють активну кислотність (6,8±0,2) од рН, підігрівують до температури 55°C, вносять 0,02% ферментного препарату протосубтілін Т3Х та видержують при цій температурі 2,5–3,0 години. До гідролізату молока додають кукурудзяний екстракт (0,25%), цитрат натрію (0,5%), сірчаноокислий магній (0,05%) та сірчаноокислий марганець (0,02%). Стерилізують середовище при температурі (121±2)°C протягом (30,0±1,0) хвилин. Активна кислотність ростового середовища після стерилізації повинна бути (6,7±0,2) од рН. Середовище охолоджують до (34,0±0,5)°C та вносять 1% стерильного знежиреного молока.

Культури молочнокислих мікроорганізмів готують окремо кожний штам в 10% стерильному знежиреному молоці з посівною дозою кожного 0,5%. Нарощування ведуть при температурі 30°C для мезофілів та 37°C для термофілів до утворення згустка, після чого використовують для інокулювання ростового середовища.

Спочатку вносять інокулянт мезофільних молочнокислих бактерій у кількості 3% при співвідношенні між штамми:

шт 1218 шт 1103 шт 1313 – 2:0,5:0,5

Культивують мікроорганізми протягом 6–7 год при температурі 34°C, потім вносять інокулянт термофільних стрептококів у кількості 2% (співвід-

ношення між штамми 1:1). Одночасно до ростового середовища додають 2% лактози. Продовжують культивування протягом 6,5–7,0 годин.

Накопичення біомаси проводять з періодичною або безпосередньою нейтралізацією культурального середовища 25% розчином аміаку до активної кислотності ($6,5 \pm 0,2$) од. рН. При періодичній нейтралізації перше розкислення проводять через 3 години, потім через кожні 1,5–2,0 години.

Наприкінці культивування між кислото- та ароматутворюючими лактококами і термофільними стрептококами встановлюється співвідношення 4,0:3,5:2,5.

Після закінчення процесу культуральну рідину охолоджують до температури $(12 \pm 2)^\circ\text{C}$. Біомасу відокремлюють від культуральної рідини на суперцентрифузі та змішують із захисним середовищем у співвідношенні 1,0 (1,5–2,0). Захисним середовищем є водний розчин, який містить 16% сахарози та 6% цитрату натрію. Суспензію клітин розливають в стерильні кювети шаром 5–7 мм, заморожують в морозильній шафі при температурі мінус $(35 \pm 5)^\circ\text{C}$ протягом 14–18 годин, а потім висушують у сублімаційній сушарці з початковою температурою процесу мінус $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ та кінцевою – плюс $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$ протягом 16–20 годин.

Вихід біомаси – $(2,0 \pm 0,2)$ кг, а сухого препарату – $(1,2 \pm 0,1)$ кг з кожних 100 л культурального середовища.

Сухий концентрат подрібнюють у порошок та фасують у флакони або пакети. В 1 г ліофілізованого препарату міститься більше, ніж $1,0 \cdot 10^{11}$ КУО молочнокислих бактерій.

Препарат має високу здатність до реактивації, при його використанні не потрібна стадія активізації.

Стабільність властивостей концентрату зберігається тривалий час та визначається температурою зберігання – 6 місяців при $6-8^\circ\text{C}$ і 12 місяців при мінус 18°C .

Приклади здійснення способу.

Приклад 1.

Для приготування основи ростового середовища 3 кг сухого знежиреного молока розчиняють у 100 л підігрітої до температури 40°C водопровідної води. 20 г протосубтіліна ГЗХ завчасно активізують у 1 л водопровідної води 30 хвилин при 25°C , потім вносять у підігріте до температури 55°C відновлене молоко. Гідроліз ведуть протягом 3 годин. У 100 л гідролізованого молока вносять (кг) цитрат натрію – 1, кукурудзяний екстракт – 0,25, магній сірчаноокислий – 0,05 та марганець сірчаноокислий – 0,02. Середовище стерилізують при температурі 121°C протягом 0,5 години, потім охолоджують до 34°C . Вносять 1% стерильного відновленого знежиреного молока. Активну кислотність ростового середовища встановлюють 6,7 од. рН.

Культури молочнокислих мікроорганізмів готують окремо кожний штам на 10% стерильному знежиреному молоці з посівною дозою кожного 0,5%. Нарощування ведуть при температурі 30°C для мезофілів та 37°C для термофілів до утворення згустка, після чого використовують для інокулювання ростового середовища.

В ростове середовище вносять інокулат мезофільних лактококів у кількості 3% від маси ростового середовища з об'ємною часткою для кожної культури.

шт 1218 : шт. 1103 : шт 1313 = 2,0:5:0,5

Культивування мікроорганізмів проводять протягом 6 год при температурі 34°C з періодичною нейтралізацією культуральної рідини 25% розчину аміаку до активної кислотності 6,5 од. рН. Першу нейтралізацію проводять через 3 години, далі – через кожні 1,5–2,0 години.

Через 6 годин культивування вносять по 1% інокулату кожного з штамів термофільних стрептококів. Одночасно разом з термофілами до ростового середовища додають 2% лактози. Перед центрифугуванням чисельне співвідношення між кислото- та ароматутворюючими лактококами і термофільними стрептококами у культуральній рідині складає 4,0:3,5:2,5.

Після закінчення процесу культивування рідину охолоджують до температури 12°C , біомасу відокремлюють від культуральної рідини на суперцентрифузі і змішують із стерильним захисним середовищем у співвідношенні 1:2 по масі. 1 л захисного середовища містить 160 г сахарози та 60 г цитрату натрію, решта – вода.

Одержану суспензію розливають у стерильні кювети шаром у 6–7 см, заморожують при температурі мінус 35°C протягом 14 годин та висушують у сублімаційній сушарці з початковою температурою процесу мінус 25°C та кінцевою – плюс 30°C протягом 20 годин.

Вихід біомаси становить 2,1 кг, а сухого препарату – 1,2 кг.

Чисельність лактобактерій у 1 г сухого препарату складає $1,2 \cdot 10^{11}$ КУО молочнокислих бактерій. Препарат не потребує активізації.

Сухий концентрат подрібнюють у порошок та фасують у флакони або пакети.

При внесенні препарату у кількість 1 г у 1 л стерилізованого молока термін сквашування дорівнює 7 годин. Титрована кислотність через 3 години дорівнює 30°T . Препарат у кількості 1 г згортає 1000 л молока за 13,5 годин, а 5 г препарату – за 12 годин. При цьому кислотність згустка становить 72°T . Продукт має щільний, в'язкий згусток, приємний сметаний аромат та смак.

Приклад 2.

Спосіб здійснюють аналогічно прикладу 1 за винятком того, що інокулат термофільних стрептококів вносять разом з інокулатом мезофільних лактококів. При цьому через 13 годин культивування співвідношення між кислото- та ароматутворюючими лактококами і термофільними стрептококами становить 5,2:2,9:1,9.

Зменшення відносної чисельності ароматутворюючих та термофільних лактобактерій відбивається на якості кінцевого продукту – погіршуються органолептичні показники та консистенція сметани.

Зі 100 л ростового середовища одержують 1,7 кг біомаси, після висушування – 0,95 кг препарату.

Чисельність лактобактерій у 1 г сухого препарату складає $1,0 \cdot 10^{11}$ КУО молочнокислих бактерій. Препарат не потребує активізації перед використанням.

Препарат згортає молоко за 7 годин при внесенні його у кількості 1 г у 1 л стерилізованого молока, титрована кислотність через 3 години дорівнює 32°Т.

Приклад 3.

Спосіб здійснюють аналогічно прикладу 1, але у складі ростового середовища відсутні нативне молоко та лактоза, але міститься підвищена кількість кукурудзяного екстракту (2%). Інокулянт вносять у ростове середовище одностадійно в кількості 5%.

Співвідношення між кислото- та ароматотворюючими лактококами і термофільними стрептококами через 13 годин культивування складає 4,8:3,6:1,6.

Вихід біомаси становить 1,2 кг, а сухого препарату – 0,75 кг. В 1 г ліофілізованого препарату міститься $9 \cdot 10^{10}$ КУО молочнокислих бактерій.

При використанні препарат потребує активізації впродовж 2,0–2,5 годин. 1 г препарату згортає молоко за 8 годин при внесенні його у 1 л

стерилізованого молока, при цьому титрована кислотність через 3 години дорівнює 25°Т.

Порівняльна характеристика бактеріальних препаратів, виготовлених за відомим та заявленим способами, подана у таблиці 1.

Характеристика продуктів, що одержані з використанням відомого та заявленого препарату, представлена у таблиці 2. Продукт, одержаний з використанням запропонованого препарату, має щільну, в'язку консистенцію, згусток рівний, блискучий, смак ароматний, сметаний. Кислотність продукту нижча, а рівень ароматичних сполук (діацетилу) вищий, ніж при використанні бакконцентрату "Дніпрянський".

Таким чином, винахід дозволяє одержати ліофілізований бактеріальний препарат молочнокислих бактерій для сметани, який здатний до швидкої реактивації та подовженого терміну зберігання.

Таблиця 1

Характеристика бактеріальних препаратів, які вироблені за запропонованим та відомим способами

Показники	За відомим способом	За запропонованим способом	За Прикладом 1	За Прикладом 2	За прикладом 3
Загальна чисельність молочнокислих бактерій, КУО/г	1.0×10^{11}	1.1×10^{11}	1.2×10^{11}	1.0×10^{11}	9.0×10^{10}
Активність:					
Кислотність через 3 год. (1 г/л), °Т					
Термін сквашування молока (1 г/л), год.	35	30	30	32	25
Термін зберігання, міс. 6–8°С	6	7	7	7	8
18°С	3	6	6	6	6
Необхідність стадії активізації при виготовленні продукту	Потрібна, 3–3.5 год.	Не потрібна	Не потрібна	Не потрібна	Потрібна, 2.0–2.5 год.

Таблиця 2

Характеристика продукту (сметана, 20% жирн.), виробленого з використанням заявленого препарату прямого внесення та відомого "Дніпрянський-2"

Показники	З використанням відомого	З використанням заявленого
Молокозгортуюча активність при внесенні концентрату (год.)		
1 г в 1000 л	–	13,5
1 г в 2000 л	15,0	–
5 г в 1000 л	–	12,0
Кислотність згустка при сквашуванні, °Т	85 ± 5	70 ± 5
Гранична кислотність, °Т	102 ± 5	90 ± 5
Ступінь ароматоутворення за лужною пробю, хв.	15	12
Органолептика	Згусток в'язкий, тягучий, смак чистий, кисло-молочний	Згусток плотний, смак приємний, ароматний, сметаний

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03