



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/00 (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2022133735, 22.12.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.12.2022

Дата регистрации:
11.09.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.12.2022

(45) Опубликовано: 11.09.2023 Бюл. № 26

Адрес для переписки:

634050, Томская обл., г. Томск, пр-кт Ленина,
36, НИ ТГУ, Отдел интеллектуальной
собственности

(72) Автор(ы):

Щербакова Полина Александровна (RU),
Гавирова Лилия Андреевна (RU),
Шестакова Оксана Олеговна (RU),
Кремнёва Мария Константиновна (RU),
Елизаров Иван Михайлович (RU),
Кубланов Илья Валерьевич (RU),
Карначук Ольга Викторовна (RU),
Шестаков Андрей Иннокентьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Национальный
исследовательский Томский
государственный университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2295563 C1, 20.03.2007. RU
2593944 C2, 10.08.2016. HUGENHOLTZ J. ET
AL. Diacetyl production by different strains of
Lactococcus lactis subsp. *lactis* var. *diacetylactis*
and *Leuconostoc* spp., Appl. Microbiol.
Biotechnol., 1992, 38: 17-2. БЕЛЬМЕР С.В.,
Кисломолочные продукты: от истории к
современности, Российский вестник
перинатологии и педиатрии, (см. прод.)

(54) Штамм *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320, используемый в производстве кисломолочных продуктов

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, микробиологии, пищевой (молочной) промышленности и представляет собой новый бактериальный штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320, характеризующийся скоростью кислотообразования 70°Т в течение 7,5 ч культивирования и повышением динамической вязкости готового продукта до

25,3 мПа·с, при культивировании в обезжиренном молоке. Штамм может быть использован для производства кисломолочных продуктов, характеризующихся чистым кисломолочным вкусом и сбалансированной кислотностью, и повышенными реологическими свойствами без добавления дополнительных компонентов, повышающих вязкость готового продукта. 4 пр.

R U 2 8 0 3 2 6 6 C 1

R U 2 8 0 3 2 6 6 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 1/00 (2023.05)

(21)(22) Application: **2022133735, 22.12.2022**

(24) Effective date for property rights:
22.12.2022

Registration date:
11.09.2023

Priority:

(22) Date of filing: **22.12.2022**

(45) Date of publication: **11.09.2023** Bull. № 26

Mail address:
**634050, Tomskaya obl., g. Tomsk, pr-kt Lenina,
36, NI TGU, Otdel intellektualnoj sobstvennosti**

(72) Inventor(s):

**Shcherbakova Polina Aleksandrovna (RU),
Gavirova Liliia Andreevna (RU),
Shestakova Oksana Olegovna (RU),
Kremneva Mariia Konstantinovna (RU),
Elizarov Ivan Mikhailovich (RU),
Kublanov Iliia Valerevich (RU),
Karnachuk Olga Viktorovna (RU),
Shestakov Andrei Innokentevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Natsionalnyi issledovatel'skii
Tomskii gosudarstvennyi universitet" (RU)**

(54) **LACTOCOCCUS LACTIS 12/16/PSH VKPM B-14320 STRAIN USED IN THE PRODUCTION OF FERMENTED MILK PRODUCTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; microbiology; food (dairy) industry.

SUBSTANCE: invention is a new bacterial strain of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* 12/16/PSH VKPM B-14320 characterized by an acid formation rate of 70°T for 7.5 hours of cultivation and an increase in the dynamic viscosity of the finished product up to 25.3 MPa·c, when cultured in skim milk.

EFFECT: strain can be used for the production of fermented milk products characterized by a pure fermented taste and balanced acidity, and increased rheological properties without adding additional components that increase the viscosity of the finished product.

1 cl, 4 ex

Изобретение относится к области биотехнологии, микробиологии, пищевой промышленности и представляет собой новый бактериальный штамм *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320, характеризующийся скоростью кислотообразования 70°Т и повышению динамической вязкости готового продукта до 25,3 мПа·с после 7,5 часов культивирования в обезжиренном молоке при температуре +32±4°С. Штамм может быть использован для производства кисломолочных продуктов, обладающих чистым кисломолочным вкусом и сбалансированной кислотностью, а также повышенными реологическими свойствами без добавления дополнительных компонентов, повышающих вязкость готового продукта.

Человек, с появлением сельского хозяйства и животноводства стремился сохранять на длительный срок различные пищевые продукты (в том числе молочные), подвергая их различной микробной ферментации. В качестве примеров можно привести хлебопечение, пивоварение, виноделие, приготовление различных кисломолочных продуктов (сыр, питьевые продукты, творог и пр.) [1]. Таким образом, в пищевом рационе человека всегда присутствовали разнообразные, безопасные микроорганизмы, которые играют важную роль в его иммунологическом статусе и правильном функционировании микробиома кишечника [2] [3]. В настоящее время различные ферментированные молочные продукты являются одним из немногочисленных источников безопасных для человека микроорганизмов [4]. При этом в Российской Федерации в заквасках (в том числе прямого внесения) для кисломолочных продуктов используется ограниченный набор штаммов, произведенных как внутри страны, так и за ее пределами. В связи с этим введение новых штаммов в качестве заквасок для производства кисломолочных продуктов является важной задачей расширения микробного (штаммового) разнообразия в пищевом рационе человека. Молочнокислая бактерия *Lactococcus lactis* была обнаружена в различных традиционных ферментированных продуктах и отнесена к категории GRAS (Generally Regarded as Safe), что свидетельствует о международном признании безопасности и возможности безопасного применения в пищевой индустрии [5].

Задачей данного изобретения является получение нового штамма *Lactococcus lactis* для производства кисломолочных продуктов.

Предложены штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactisdiacetylactis* CNCM № I-4404, штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactisdiacetylactis* CNCM № I-4405 и их применение для производства ферментированного молочного продукта со сливочным вкусом и ароматом или получения 3,4-дигидрокси-3,4-диметил-2,5-гександиона, ответственного за сливочно-масляный вкус (патент РФ 2593944, приоритет 20.12.2011, опубл. 10.08.2016). Однако для данных штаммов отсутствует информация о вязкости готового молочного продукта.

Известен способ получения симбиотического кисломолочного желеобразного продукта (патент РФ 2175192, приоритет 18.12.2000, опубл. 27.10.2001). В микробный состав входит *Lactococcus lactis* как один из функциональных компонентов. Недостатком данного способа является введение в состав продукта желатина пищевого, смеси желатина и пектина или смеси желатина и крахмала как агентов, повышающих вязкость готового продукта.

Наиболее близким к заявляемому изобретению является штамм бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-8558, используемый в производстве молочных продуктов, и способ получения стартерной культуры штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-8558 (патент РФ 2295563, приоритет 12.08.2005, опубл. 20.03.2007). Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ВКПМ В-8558 может быть использован в производстве молочных

продуктов. Отличительной особенностью штамма является способность синтезировать экзополисахариды в количестве, обеспечивающем улучшение реологических показателей продукта без внесения пищевой добавки, и способность усиливать функциональные свойства продуктов, получаемых с использованием данного штамма молочнокислых бактерий. Однако для данного штамма отсутствует информация о вязкости готового кисломолочного продукта.

Техническая проблема решается новым бактериальным штаммом *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320, отличительной особенностью которого является скорость кислотообразования до 70°Т в течение 7,5 часов культивирования и повышению динамической вязкости готового продукта до 25,3 мПа·с за то же время, при культивировании в обезжиренном молоке. Штамм может быть использован для производства кисломолочных продуктов, характеризующихся чистым кисломолочным вкусом и сбалансированной кислотностью, а также повышенными реологическими свойствами без добавления дополнительных компонентов, повышающих вязкость готового продукта.

Штамм выделен из кисломолочного продукта - простокваши, приготовленной традиционным способом (естественное скисание молока без добавления заквасок и стартовых культур).

Штамм депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов ФГУП ГосНИИгенетика (ВКПМ, Москва, 1-й Дорожный пр., д.1) под регистрационным номером ВКПМ В-14320. Идентификация штамма была осуществлена на основании анализа последовательности гена 16S рРНК, а также его культурально-морфологических и физиолого-биохимических характеристик.

Полученный штамм характеризуется следующими признаками.

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки

Среда культивирования MRS агар, следующего состава (г/л): пептон из казеина 10,0; мясной экстракт 8,0; дрожжевой экстракт 4,0; глюкоза 20,0; фосфат калия двузамещенный 2,0; твин-80 1,0; аммоний лимоннокислый двузамещенный 2,0; ацетат натрия 5,0; сульфат магния 0,2; сульфат марганца 0,04; агар 14,0. Колонии светло-бежевые, круглые, блестящие с ровным краем, выпуклым профилем, диаметром от 1-3 мм, имеющие однородную структуру и мягкую консистенцию.

Клетки неподвижны, не образуют спор, положительно окрашиваются по Граму, не образуют пигмент, каталазо- и оксидазонегативны. Форма клеток круглая или слегка овальная, расположены единично, парами или цепочками различной длины. Отношение к кислороду - факультативный анаэроб.

Температурный оптимум роста штамма 32±4°С в аэробных условиях. При оценке роста при температуре 10°С и 45°С штамм демонстрирует рост при 10°С и отсутствие роста при 45°С.

Культивирование и хранение

Штамм *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320 в лабораторных условиях поддерживают двумя способами:

1. пересевами 1 раз в 10-20 суток, культивирование при 32±4°С на плотной питательной среде MRS в течение 2 суток, хранение при +4°С;

2. пассажами 1 раз в 10-15 суток в стерильном обезжиренном молоке, путем внесения 5% инокулята (продукт, полученный при культивировании штамма в обезжиренном молоке). Культивирование до формирования сгустка при 32±4°С, хранение при +4°С.

Штамм также может храниться при +5±2°С в лиофилизированном состоянии с использованием сухого обезжиренного молока в качестве защитной среды.

Возможность реализации заявляемого изобретения показана, но не ограничена, в примерах конкретного выполнения.

Пример 1. Выделение и культивирование штамма *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320.

5 Штамм выделен из кисломолочного продукта - простокваши, приготовленной традиционным способом (естественное скисание молока без добавления заквасок и стартовых культур). Район происхождения кисломолочного продукта - Архангельская область, Верхнетоемский муниципальный округ, дер. Сорокоумовская, частное подсобное хозяйство. Образец традиционного кисломолочного продукта (простокваша),
10 объемом 200 мл был транспортирован в лабораторию при температуре $+5\pm 2^\circ\text{C}$. Выделение штамма *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320 проводилось путем посева десятикратных разведений продукта на плотную среду MRS. Культивирование при температуре $+32\pm 4^\circ\text{C}$ в течение 2 суток. Колонии пересеивали не менее 3-5 раз на плотной среде MRS с контролем чистоты культуры с помощью микроскопии, далее
15 полученную чистую культуру идентифицировали на основании анализа последовательности гена 16S рРНК, а также на основе культурально-морфологических и физиолого-биохимических характеристик.

Пример 2. Способ коллекционного (долговременного) хранения штамма *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320.

20 Штамм *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320 выращивают в обезжиренном молоке путем внесения 5% инокулята (продукт, полученный при культивировании штамма в обезжиренном молоке) и культивирования в течение 6-8 часов при температуре $+32\pm 4^\circ\text{C}$. Далее полученную микробную биомассу в молоке замораживают и обезвоживают методом лиофилизации в стеклянных флаконах или в стеклянных ампулах.
25 Хранение флаконов или ампул проводят при температуре $+5\pm 2^\circ\text{C}$

Пример 3. Получение кисломолочного продукта с использованием штамма *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320.

Кисломолочный продукт получают путем внесения в молоко инокулята (продукт, полученный при культивировании штамма в обезжиренном молоке) в количестве 5%
30 и культивируют в течение 6-8 часов при температуре $32\pm 4^\circ\text{C}$. По завершению культивирования титруемая кислотность полученного продукта составляет $70\pm 5^\circ\text{T}$. Предел кислотообразования на стерильном обезжиренном молоке составляет $92\pm 5^\circ\text{T}$. После этапа культивирования полученный продукт охлаждают до температуры $+6\pm 2^\circ\text{C}$ и выдерживают при той же температуре не менее 12 часов для формирования
35 органолептических характеристик продукта.

Пример 4. Способ оценки вязкости кисломолочного продукта полученного с использованием штамма *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320.

Пробу кисломолочного продукта, объемом 200 мл, полученную согласно Примеру 3, доводили до температуры $+20\pm 1^\circ\text{C}$ в водяной бане.

40 Определение вязкости готового продукта проводили согласно ГОСТ 27709-2015 [6] с помощью прибора HAAKE Falling Ball Viscometer C (Thermo Scientific, США), при температуре образца $(+20\pm 1)^\circ\text{C}$. Пробу продукта наливали по стенке во внутреннюю стеклянную трубку вискозиметра. В зависимости от консистенции продукта подбирали требуемый калиброванный шарик с таким расчетом, чтобы время его падения в продукте на отрезке пути между двумя отметками, равном 0,1 м, находилось в диапазоне от 25
45 до 120 с. С помощью секундомера измеряли время прохождения условной середины шарика между верхней и нижней кольцевыми отметками на внутренней трубке вискозиметра. Расчет динамической вязкости (η , мПа*с) производили по следующей

формуле:

$$\eta = K(\rho_1 - \rho_2)t,$$

где:

K - индивидуальная константа шарика, мПа*с*см³/г*с;

ρ_1 - плотность шарика, г/см³;

ρ_2 - плотность образца при температуре измерения, г/см³;

t - время падения шарика в секундах.

Расчет кинематической вязкости проводили следующим образом:

$$v = \frac{\eta}{\rho},$$

где:

v - кинематическая вязкость, мм²/с;

η - динамическая вязкость, мПа*с;

ρ - плотность образца, г/см³.

Вязкость кисломолочного продукта, выработанного на обезжиренном молоке с использованием 5% инокулята (продукт, полученный при культивировании штамма в обезжиренном молоке) составляет 25,3 мПа*с.

Таким образом, получен штамм, отличительной особенностью которого является скорость кислотообразования 70°Т и повышение динамической вязкости готового продукта до 25,3 мПа*с при культивировании в обезжиренном молоке в течение 7,5 часов. Штамм может быть использован для производства кисломолочных продуктов, характеризующихся чистым кисломолочным вкусом и сбалансированной кислотностью и повышенными реологическими свойствами без добавления дополнительных компонентов, повышающих вязкость готового продукта.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Aouizerat T. et al. Isolation and characterization of live yeast cells from Ancient vessels as a tool in bio-archaeology //MBio. - 2019. - Т. 10. - №. 2. - С. e00388-19.

2. Rabia Ashraf & Nagendra P. Shah (2014) Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 54:7, 938-956,

3. Tanaka M, Nakayama J, Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life, Allergology International (2017), pp. 1-8

4. Kurmann J. A., Rasic J. L., Kroger M. Encyclopedia of fermented fresh milk products: an international inventory of fermented milk, cream, buttermilk, whey, and related products. - Springer Science & Business Media, 1992.

5. Wessels S., Axelsson L., Hansen E., De Vuyst L., Laulund S., Lähteenmäki L., Lindgren S., Mollet B., Salminen S., von Wright A. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. Trends in Food Science and Technology, 2004, vol. 15, no. 10, pp. 498-505.

6. ГОСТ 27709-2015 Консервы молочные сгущенные. Метод измерения вязкости. - М: Стандартинформ, 2019. - 5 с.

(57) Формула изобретения

Штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* 12/16/PSH ВКПМ В-14320, используемый для производства кисломолочных продуктов.