

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235353**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **423972**

(22) Data zgłoszenia: **20.12.2017**

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

A21D 13/00 (2017.01)

(54) **Szczep *Leuconostoc mesenteroides*, zawierająca go kultura starterowa do prowadzenia zakwasu i zastosowanie szczepu oraz kultury starterowej do wytwarzania pieczywa**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

01.07.2019 BUP 14/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

29.06.2020 WUP 08/20

(73) Uprawniony z patentu:

NOSEK TOMASZ PIEKARNIA, Grabie, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KATARZYNA PIASECKA-JÓŹWIAK,
Warszawa, PL**

BEATA CHABŁOWSKA, Warszawa, PL

ELŻBIETA SŁOWIK, Piaseczno, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Zbigniew Liszkowski

PL 235353 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep *Leuconostoc mesenteroides* Sz 127, zdeponowany w Kolekcji Kultur Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie pod numerem KKP 2064p oraz zawierająca go kultura starterowa.

W mące i zakwasach piekarskich stwierdza się obecność około 50 gatunków bakterii fermentacji mlekowej (LAB), w tym głównie z rodzajów *Lactobacillus*, *Weissella* i *Pediococcus*.

Właściwości LAB z tych rodzajów umożliwiają im adaptację do środowiska ciasta, a ich metabolity przyczyniają się do kształtowania właściwości reologicznych i organoleptycznych ciasta oraz jakości sensorycznej pieczywa. Związane jest to z możliwością wykorzystywania przez LAB różnych źródeł węgla i akceptorów elektronów, a także przekształcaniem aminokwasów w związki tworzące aromat pieczywa.

Jedną z właściwości niektórych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, wykorzystywaną w produkcji (technologii) żywności, jest zdolność do syntezy egzopolisacharydów (EPS). EPS są polimerami sacharydowymi, które pełnią rozmaite funkcje w komórkach bakteryjnych, między innymi chronią je przed niekorzystnym wpływem środowiska, czynnikami biologicznymi lub ułatwiają kolonizację nowego środowiska. Syntetyzowane przez bakterie egzopolisacharydy (EPS) działając jako naturalne hydrokoloidy, zapobiegają utracie wody i poprawiają teksturę żywności bez zmiany właściwości produktu. W żywności EPS stanowią dobrą alternatywę w stosunku do innych dodatków z grupy hydrokoloidów i wpływają na poprawę lepkości i stabilności produktów. Obecność egzopolisacharydów pochodzenia mikrobiologicznego w żywności zarówno konwencjonalnej jak i ekologicznej może być szczególnie cenna z uwagi na tendencję do ograniczania wszelkich dodatków – zasada „clean label”. Opisane zostały ponadto właściwości prozdrowotne EPS polegające na selektywnym stymulowaniu wzrostu i metabolizmu bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* bytujących w jelitach człowieka, i w efekcie na stymulację układu odpornościowego. Struktura, skład i lepkość EPS zależą przede wszystkim od szczepu bakterii, a ponadto od składu podłoża hodowlanego, obecności soli mineralnych i pierwiastków śladowych, a także warunków hodowli – pH i temperatury. Zdolność bakterii do syntezy EPS koduje grupa (cluster) specyficznych genów *eps* o dużej zmienności. Kluczową rolę w produkcji EPS odgrywają enzymy z grupy glukanosacharaz, na których aktywność wpływa skład węglowodanów mąki, zwłaszcza obecność efektywnych akceptorów węglowodanów – jak maltoza i fruktoza.

Szczep bakterii fermentacji mlekowej będący przedmiotem wynalazku wyizolowano z mąki pszennej całościowej poddanej fermentacji spontanicznej. W wyniku tej selekcji otrzymano grupę nowo wyizolowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej (LAB) należących do gatunku *Leuconostoc mesenteroides* i blisko spokrewnionego gatunku *Leuconostoc citreum*. Na podstawie badania zdolności do syntetyzowania egzopolisacharydów nieoczekiwanie stwierdzono, że nowy, nieopisany wcześniej szczep *Leuconostoc mesenteroides* wykazuje zdolność do syntezy EPS-dekstranu z wysoką efektywnością, a także nadaje zakwasowi piekarskiemu korzystne cechy reologiczne i następnie wpływa pozytywnie na teksturę pieczywa.

Szczep *Leuconostoc mesenteroides* Sz 127 KKP 2064p. według wynalazku został wyizolowany z zakwasu przygotowanego z mąki pszennej (wydajność zakwasu 200% tj. mąka i woda w stosunku 1:1). Zakwas utrzymywano w temperaturze 22°C i odnawiano co 24 h poprzez zaszczerpienie nowej porcji mąki i wody dojrzałym zakwasem, w ilości 20%. Izolację szczepu przeprowadzono poprzez wielokrotne pasażowanie (selekcję) pojedynczych kolonii rosnących na podłożu MRS zawierającym maltozę jako źródło węgla. Afiliację taksonomiczną szczepu bakterii do gatunku *Leuconostoc mesenteroides*, potwierdzono na podstawie porównania z sekwencjami bakteryjnych odcinków 16S rDNA, zdeponowanymi w bazie GenBank i stwierdzenia ich zgodności w 99%. Wyniki analizy genetycznej odcinka 16S rDNA określonego niniejszym wynalazkiem szczepu *Leuconostoc mesenteroides* przedstawia SEQ ID NO.1.

Bakterie należące do gatunku *Leuconostoc* tworzą (łącznie *Oenococcus* i *Weissella*) w obrębie bakterii fermentacji mlekowej (lactic acid bacteria -LAB) tak zwaną leuconostoc group. Bakterie należące do tego gatunku są Gram-dodatnie, nie tworzą przetrwalników, ich kształt jest okrągły lub wydłużony, są beztlenowe lub mikroaerofilne. Metabolizm węglowodanów ma w ich przypadku charakter heterofermentatywny, a jego głównym produktem jest kwas mlekowy. Powstające w wyniku heterofermentacji cukrowców kwas octowy i inne uboczne produkty fermentacji mają wpływ na właściwości technologiczne zakwasów i ciast takie jak kwasowość miareczkową i pH.

Biorąc pod uwagę doniesienia literatury naukowej można stwierdzić, że wysoki poziom syntezy EPS jest cechą spotykaną u szczepów bakterii z gatunku *Leuconostoc mesenteroides* jednak dotyczy przede wszystkim szczepów charakterystycznych dla takich środowisk jak mleko i przetwory mleczne, kapusta kiszona, *L. mesenteroides* występuje również w napojach gdzie może być przyczyną ich psucia się.

Szczep *Leuconostoc mesenteroides* Sz 127 KKP 2064p. według wynalazku charakteryzuje się zdolnością do wzrostu w temperaturze 22°C na takim samym poziomie jak w standardowej dla bakterii mezofilnych temperaturze 30°C. Wzrost tego szczepu w podłożu MRS, w porównaniu do innych szczepów należących do gatunku *Leuconostoc mesenteroides*, wyizolowanych uprzednio ze środowisk mąki i ciast zakwasowych, przedstawiono na rysunku 1.

Efektywność syntezy egzopolisacharydów badanych szczepów LAB oceniano po hodowli w podłożu zawierającym sacharozę jako jedyne źródło sacharydów tj. zmodyfikowanym podłożu MRS o składzie w g l⁻¹: sacharoza 20 g bactopecton 5 g, ekstrakt drożdżowy 5 g, K₂HPO₄ 15 g, MnCl₂ 0,01 g, NaCl 0,01, CaCl₂ 0,05, pH ustalone na 6,5 przed sterylizacją). Hodowle prowadzono w podłożu MRS płynnym przez 18 godzin w temperaturze 30°C, następnie obliczano liczbę bakterii, przy pomocy komory Thoma, zawiesinę doprowadzono do liczby 1 x 10⁷ jtk/ml, następnie rozprowadzono po 0,5 ml na 3 płytki Petriego (90 mm śr) zawierające podłoże MRS z agarem. Po 48 h inkubacji w 22°C lub 30°C, EPS zmywano z płytek przy użyciu 30 ml wody destylowanej do sterylnych probówek wirowniczych. Komórki bakterii oddzielano przez wirowanie następnie EPS wytrącano poprzez precypitację etanolem, egzopolisacharydy liofilizowano i ważono.

Na rysunku 2 przedstawiono wyniki efektywności syntezy EPS przez szczep *Leuconostoc mesenteroides* Sz 127 KKP 2064p w porównaniu, do innych, wyizolowanych z mąki i zakwasów, szczepów gatunku *Leuconostoc mesenteroides*. Efektywność syntezy EPS przedstawiona została jako masa EPS zsyntetyzowanych przez bakterie w stosunku do masy podłoża MRS. W przypadku *Leuconostoc mesenteroides* Sz 127 2064p stwierdzono wyjątkowo dużą masę otrzymanego liofilizatu EPS w 22°C tj. 440 mg/kg podłoża.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest kultura starterowa do pieczywa pszennego, zawierająca szczep bakterii fermentacji mlekowej *Leuconostoc mesenteroides* Sz 127.KKP 2064p, charakteryzujący się korzystnym wpływem na jakość, rozumianą jako utrzymywanie się pożądanych właściwości organoleptycznych w czasie 3 dni, zwłaszcza miękkości miękiszu oraz tekstury bułek (pieczywa pszenego).

Kultura starterowa ma także pozytywny wpływ na walory odżywcze/prozdrowotne pieczywa, co wynika z naturalnej zawartości prebiotyku – oligosacharydu syntetyzowanego w nieoczekiwanej dużej ilości.

Kultury starterowe składające się z bakterii fermentacji mlekowej (lactic acid bacteria, LAB) są w przemyśle spożywczym wykorzystywane w celu inicjowania i zapewnienia właściwego przebiegu fermentacji (mlekowej) w takich produktach jak pieczywo, kiszonki warzywne, wyroby mleczarskie, co jest efektem opanowywania środowiska przez drobnoustroje zawarte w kulturach. Stosowanie kultur starterowych przyczynia się do podniesienia bezpieczeństwa produkcji żywności. Mikroorganizmy, włączane do kultur starterowych, mogą być dobierane z kolekcji kultur na podstawie ich poznanych właściwości oraz ustalonych warunków prawidłowego przebiegu procesu produkcyjnego jednak prowadzi to do ujednolicenia smaku i utraty tradycyjnych cech organoleptycznych wielu produktów m.in. pieczywa.

W kulturach starterowych do zakwasów piekarskich powinny być wykorzystywane autochtoniczne szczepy bakterii fermentacji mlekowej, które są lepiej przystosowane do specyficznych warunków panujących w ekosystemie ciast i dostępnych w nich substratów.

W komercyjnych kulturach starterowych do pieczywa najpowszechniej stosowanymi szczepami bakterii są *L. plantarum*, *L. sanfranciscensis*, *L. brevis* oraz *L. reuteri*, *L. pontis*. Według aktualnego stanu wiedzy i technologii dla piekarstwa korzystne są kultury starterowe o specyficznych właściwościach, np. zapewniające wydłużenie czasu przydatności pieczywa do spożycia dzięki zastosowaniu szczepów bakterii wykazujących aktywność przeciwpleśniową. Takie kultury starterowe znane są z patentów WO 2009141427 A2 (zawierająca szczep *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280) oraz PL 225 277 B1 (zawierająca szczep *Weissella cibaria* KKP 2058).

Wykazano, że niektóre właściwości bakterii fermentacji mlekowej, opisane dla szczepów określonych gatunków, mają charakter szczepowy, a nie gatunkowy dlatego badane są i włączane do kultur konkretne szczepy bakterii.

W przemysłowym procesie produkcji pieczywa pszennego zastosowanie kultury starterowej do otrzymania zakwasu zapewnia powtarzalną jakość zakwasu i ciasta.

Wykorzystanie szczepów LAB syntetyzujących egzopolisacharydy w kulturach starterowych do pieczywa oprócz poprawy jego jakości, ma również na celu standaryzację pieczywa.

W badaniach i znanych patentach nie opisano zastosowania bakterii *Leuconostoc mesenteroides* o wysokiej efektywności syntezy egzopolisacharydów jako monokultury starterowej do inicjowania fermentacji zakwasów.

Wykorzystanie szczepów należących do rodzaju *Leuconostoc* jest treścią patentu koreańskiego KR20150128365 (A)-z 18.11.2015. Szczepy *Leuconostoc lactis* EFEL005 i/lub *Leuconostoc citreum* EFEL006 oraz *Lactobacillus brevis* zastosowane do zakwasu są odpowiednie do uzyskania smaku odpowiadającego specyfice koreańskiej. Według twórców zakwas może być stosowany jako źródło probiotyków.

Kryteria selekcji szczepów bakterii do opracowania nowej kultury starterowej stanowiły: zdolność do syntezy egzopolisacharydów oraz zdolność do syntezy wybranych metabolitów takich jak kwas mlekowy, octowy, a także produkty fermentacji wpływające na aromat pieczywa (diacetyl, acetoina, octan etylu, aldehyd octowy). Od innych szczepów gatunku *Leuconostoc mesenteroides* oraz *Leuconostoc citreum* szczep *Leuconostoc mesenteroides* Sz 127 KKP 2064p według wynalazku odróżnia wysoka efektywność wytwarzania egzopolisacharydów, tym (in situ) w zakwasach, co zwiększa ich lepkość. Nieoczekiwanie okazało się również, że zastosowanie szczepu *Leuconostoc mesenteroides* ZFS127 KKP 2064p według wynalazku jako (mono) kultury starterowej (to jest kultury złożonej z jednego szczepu) do inicjowania fermentacji mlekowej zakwasu pszennego wpływa korzystanie na aromat i twardość miękiszu pieczywa (powoduje tworzenie się przestrzennej sieci zatrzymującej związek lotne wpływające na aromat pieczywa). W efekcie polepszeniu uległa percepcja sensoryczna zakwasu i pieczywa otrzymanego z udziałem tego szczepu jako kultury starterowej.

Przedmiotem wynalazku jest również **kultura starterowa** do inicjowania fermentacji zakwasów, w szczególności pszennych, zawierająca (mono) kulturę szczepu *Leuconostoc mesenteroides* ZFS7 KKP 2064p według wynalazku i, ponadto, **zastosowanie szczepu i kultury starterowej** otrzymanej na jego bazie do wytwarzania pieczywa, dzięki czemu możliwe jest uzyskanie pieczywa o wysokiej zawartości EPS, co skutkuje brakiem konieczności dodawania substancji dodatkowych (hydrokoloidów, enzymów) aby uzyskać pieczywo o wyższej wilgotności i mniejszej twardości od tradycyjnych bułek pszennych.

Zaletą opracowanej kultury starterowej zawierającej nowy szczep *Leuconostoc mesenteroides* Sz 127 KKP 2064p według wynalazku, jest więc możliwość otrzymywania zakwasowego pieczywa pszennego o wysokiej zawartości egzopolisacharydów pochodzenia mikrobiologicznego.

P r z y k ł a d 1: Zastosowania (mono) kultury starterowej zawierającej szczep bakterii *Leuconostoc mesenteroides* ZFS127 KKP 2064p w postaci liofilizatu zawierającego $2,1 \times 10^{11}$ jtk/g.

Kulturę starterową do inicjowania fermentacji zakwasu pszennego do pieczywa otrzymano poprzez hodowlę czystej kultury szczepu *Leuconostoc mesenteroides* Sz 127 KKP 2064p poprzez namnażanie bakterii w podłożu płynnym optymalnym dla bakterii fermentacji mlekowej (MRS lub w podłożu glukozowym zawierającym niezbędne składniki odżywcze: sole, witaminy), w temperaturze 30°C, w fermentorze utrzymywano poziom pH 6,5. Bakterie oddzielano od podłoża poprzez wirowanie i utrwalono poprzez suszenie biomasy metodą **liofilizacji** otrzymując preparat **zawierający** $2,1 \times 10^{11}$ jtk/g bakterii.

Porównano zastosowanie kultury starterowej szczepu *Leuconostoc mesenteroides* Sz 127 KKP 2064p w postaci liofilizatu zawierającego $2,1 \times 10^{11}$ jtk/g bakterii *Leuconostoc mesenteroides* ZFS7 KKP do kultury starterowej komercyjnej (LV1), zawierającej szczepu fermentacji mlekowej, oraz kultury starterowej według wynalazku **RP**. Nr 217701, zawierającej szczepu *Weisselle cibaria*. KKP 2058 do otrzymania zakwasu pszennego z mąki typ 750.

Fermentację zakwasu prowadzono 18 godzin w temperaturze 22°C.

Przeprowadzono badania porównawcze poprzez oznaczenie wpływu rodzaju różnych kultur starterowych- znanych i według wynalazku- na ukwaszanie zakwasu pszennego.

Otrzymane danie porównawcze przedstawiono w poniższej tabeli.

(Dane w tabeli stanowią średnie z trzech niezależnych oznaczeń).

Składniki	Rodzaj zastosowanej kultury starterowej do inicjowania fermentacji zakwasu		
	LV1	LM	W
Mąka pszenna typ 750, g	400	400	400
Woda, cm ³	320	320	320
Cukier, g	-	4,0	4,0
Kultura starterowa, g	2,0	2,0	2,0
Kwasowość zakwasu	Po fermentacji 18 h w 22°C		
Kw.miareczkowa	3,44±0,02	4,05±0,01	3,92±0,01
pH	10,1±0,02	11,6±0,1	9,7±0,02

Leuconostoc mesenteroides Sz127 KKP 2064p (LM.), *Weissella cibaria* KKP 2058 (W), komercyjna kultura starterowa LV1.

Zastosowanie szczepu *Leuconostoc mesenteroides* KKP 2064p jako kultury starterowej do ukwaszania mąki pszennej pozwala na otrzymanie zakwasu o lepszych (bardziej korzystnych) właściwościach technologicznych w porównaniu do kultury starterowej komercyjnej LV1 oraz kultury według wynalazku RP. Nr 217701.

LISTA SEKWENCJI

SEQ ID NO.1.

<110> IBPRT

Szczep *Leuconostoc mesenteroides* Sz127

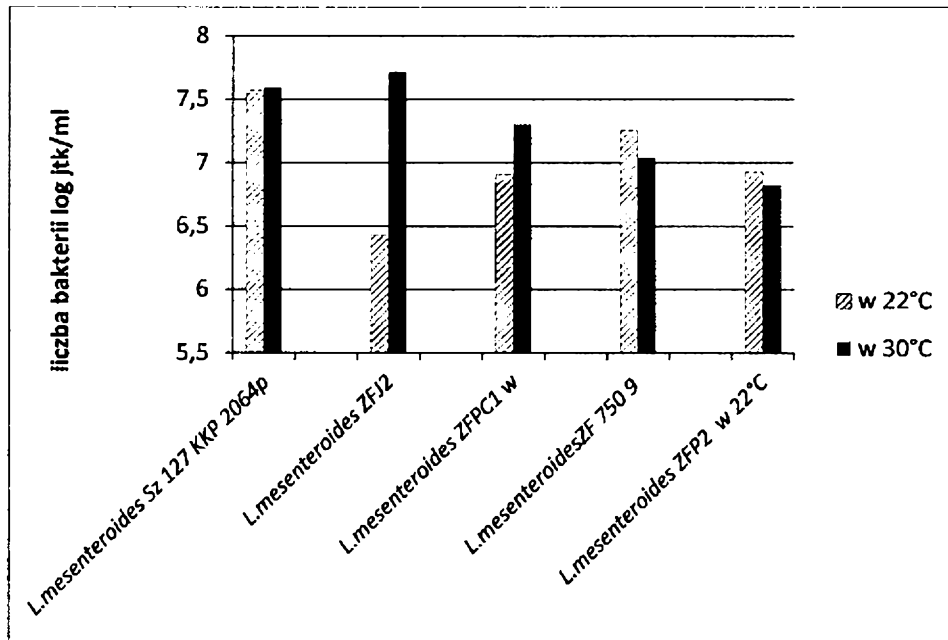
tgcagtcgaa cgcacagcga aagggtgcttg cacctttcaa gtgagtgggc aacgggtgag 60
taacacgtgg acaacctgcc tcaaggctgg ggataacatt tggaaacaga tgctaatacc 120
gaataaaaact tagtgctgca tgacacaaaag ttaaaaggcg cttcggcgtc acctagagat 180
ggatccgcgg tgcattagtt agttgggtgg gtaaaggcct accaagacaa tgatgcatag 240
ccgagttgag agactgatcg gccacattgg gactgagaca cggcccaaac tcctacggga 300
301 ggctgcagta gggaatcttc cacaatgggc gaaagcctga tggagcaacg ccgcgtgtgt
361 gatgaaggct ttcgggtcgt aaagcactgt tgtatgggaa gaacagctag aataggaaat
421 gatttttagtt tgacggtacc ataccagaaa gggacggcta aatacgtgcc agcagccgcg
481 gtaatacgtg tgtcccagac gttatccgga tttattgggc gtaaagcgag cgcagacggt
541 ttattaagtc tgatgtgaaa gcccgagct caactccggg aatggcattg gaaactggtt
601 aacttgagtg cagtagaggt aagtggaact ccatgtgtag cggtggaatg cgtagatata
661 tggagaaca ccagtggcga aggcggctta ctggactgca actgacgttg aggctcga
721 gtgtgggtag caaacaggat tagataccct ggtagtcac accgtaaagc atgaacacta
781 ggtgtagga ggtttccgcc tcttagtgcc gaagctaagc cattaagtgt tccgcctggg
841 gagtacgacc gcaaggttga aactcaaagc aattgacggg gaccgcaca agcggtgag
901 catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga accttaccag gtcttgacat cctttgaagc
961 ttttagagat agaagtgttc tcttcggaga caaagtgaca ggtggtgcat ggtcgtcgtc
1021 agctcgtgtc gtgagatggt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt attgtagtt
1081 gccagcattc agatgggcac tctagcgaga ctgccggtga caaacggag gaaggcggg
1141 acgacgtcag atcatcatgc ccctatgac ctgggctaca cacgtgctac aatggcgtat
1201 acaacgagtt gccaacccgc gagggtgagc taatctetta aagtacgtct cagttcggat
1261 tgtagtctgc aactcgacta catgaagtcg gaatcgctag taatcgcgga tcagcacgcc
1321 gcggtgaata cgttcccggg tcttgtagac accgcccgtc acaccatggg agtttgaat
1381 gcccaaagcc ggtggcctaa cc

Zastrzeżenia patentowe

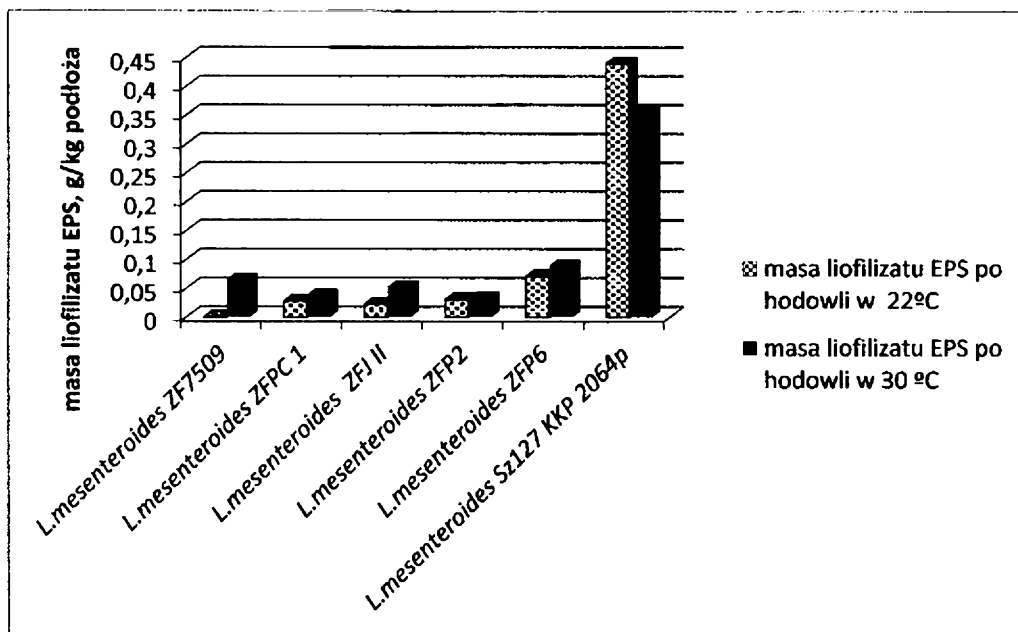
1. Nowy szczep *Leuconostoc mesenteroides* Sz127, zdeponowany w Kolekcji Kultur Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie pod numerem KKP 2064p.
2. Kultura starterowa, **znamienna tym**, że zawiera nowy szczep *Leuconostoc mesenteroides* Sz127 określony w zastrz. nr 1, zawierająca co najmniej $2,0 \times 10^{11}$ jtk/g bakterii *Leuconostoc mesenteroides* Sz127 KKP 2064p w postaci biomasy lub co najmniej $1,0 \times 10^{11}$ jtk/g tych bakterii w postaci liofilizatu.
3. Zastosowanie szczepu *Leuconostoc mesenteroides* Sz127 zdeponowanego w Kolekcji Kultur Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława

Dąbrowskiego w Warszawie pod nr KKP 2064p i kultury starterowej określonej w zastrz. nr 2 do wytwarzania pieczywa, zwłaszcza pieczywa pszennego.

Rysunki



Rysunek 1. Wzrost wybranych szczepów *Leuconostoc mesenteroides* w temperaturach 22°C i 30°C.



Rysunek 2. Efektywność syntezy EPS jako masa EPS zsyntetyzowanych przez szczepy bakterii gatunku *Leuconostoc mesenteroides*, na podłożu MRS.