

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201491848 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2015.01.30

(22) Дата подачи заявки  
2013.04.09

(51) Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01)  
C12R 1/225 (2006.01)  
A01N 63/00 (2006.01)  
A23L 3/3571 (2006.01)  
A23C 9/123 (2006.01)  
A23C 9/158 (2006.01)  
A23L 1/30 (2006.01)  
A61K 35/741 (2015.01)

(54) БИОЗАЩИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММОВ LACTOBACILLUS PARACASEI

(31) 12163509.8; РСТ/ЕР2012/056384;  
12168971.5

(32) 2012.04.09; 2012.04.09; 2012.05.22

(33) ЕР

(86) РСТ/ЕР2013/057400

(87) WO 2013/153070 2013.10.17

(71) Заявитель:

КР. ХАНСЕН А/С (DK)

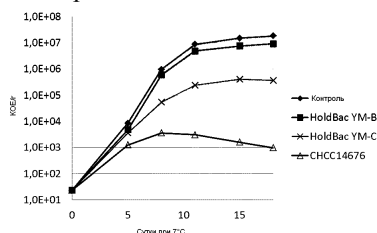
(72) Изобретатель:

Хорнбек Тина, Лисберг Майке,  
Дионер Силья Кей (DK)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к области биозащиты, в частности к штамму *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 с № доступа DSM25612. Кроме того, настоящее изобретение относится к противогрибковой композиции, содержащей штамм, к противогрибковой композиции, содержащей штамм и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus rhamnosus*, к пищевым, кормовым или фармацевтическим продуктам, содержащим такую противогрибковую композицию, к способу изготовления таких пищевых, кормовых и фармацевтических продуктов, к способу снижения содержания дрожжей и плесени в таких пищевых, кормовых и фармацевтических продуктах и к применениям противогрибковой композиции.



A1

201491848

201491848

A1

**БИОЗАЩИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММОВ *LACTOBACILLUS PARACASEI***

## ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области биозащиты, в частности, к штамму *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 с № доступа DSM25612. Более того, настоящее изобретение относится к противогрибковой композиции, содержащей штамм, к противогрибковой композиции, содержащей штамм и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus rhamnosus*, к пищевым, кормовым и фармацевтическим продуктам, содержащим такую противогрибковую композицию, к способу изготовления таких пищевых, кормовых и фармацевтических продуктов, к способу снижения содержания дрожжей и плесени в таких пищевых, кормовых и фармацевтических продуктах и к применениям противогрибковой композиции.

## ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В течение многих лет молочнокислые бактерии использовали для увеличения срока хранения пищевых продуктов. В ходе ферментации молочнокислые бактерии образуют молочные кислоты и другие органические кислоты, таким образом, снижая pH пищевого продукта, делая неблагоприятным рост нежелательных микроорганизмов, таких как патогенные бактерии, дрожжи и грибы.

Кроме того, некоторые молочнокислые бактерии образуют также метаболиты с противомикробной активностью.

Патентная заявка США № US2011/0045134 относится к использованию *Lactobacillus paracasei* для придания противогрибковых свойств ферментированным молочным продуктам.

Европейская Патентная заявка № EP1442113 относится к смесям *Propionibacterium jensenii* и *Lactobacillus* sp., таких как *Lactobacillus paracasei*, с противомикробной активностью для использования для биозащиты.

Однако, все еще существует необходимость в биозащитных средствах для улучшенного противогрибкового эффекта в форме отдельных штаммов или в комбинации с другими биозащитными штаммами.

## КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Целью настоящего изобретения является предоставление новых штаммов молочнокислых бактерий с высокой эффективностью в качестве биозащитных средств.

Авторы настоящего изобретения посредством обширного скрининга и исследования обнаружили, что конкретные штаммы *Lactobacillus paracasei* обладают значимо более высоким эффектом против дрожжей и плесени по сравнению с коммерческими биозащитными культурами на рынке.

Авторы настоящего изобретения, кроме того, обнаружили, что конкретная группа молочнокислых бактерий при комбинации с другой группой молочнокислых бактерий обладает значительным синергическим противомикробным эффектом. Противомикробный эффект двух комбинированных групп бактерий, неожиданно, превышает сумму отдельных эффектов двух групп бактерий.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фиг. 1 изображен рост плесени в йогурте с 1,5% жира, ферментированном с помощью заквасочной культуры YF-L901 отдельно (верхний ряд), вместе с HOLDBAC™ YM-B (средний ряд) и вместе с *Lactobacillus paracasei* CHCC14676. Целевые загрязнители добавляли в концентрациях, упомянутых в тексте слева направо: *Penicillium brevicompactum* (M1), *Penicillium commune* (M6), *Aspergillus versicolor* (M7) и *Penicillium glabrum* (M8), соответственно. Йогурты инкубировали при 7±1°C в течение 61 суток.

На Фиг. 2 изображены подсчеты клеток изолята *Debaryomyces hansenii*, добавленного к йогурту с 1,5% жира, ферментированного с помощью заквасочной культуры YF-L901 отдельно (контроль) или вместе с культурой HOLDBAC™ YM-B (FloldBac YM-B), вместе с культурой FIOldbac™ YM-C (HoldBac YM-C) или со штаммом *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (14676). Йогурты хранили при 7±1°C и анализировали в подходящие интервалы.

На Фиг. 3 показан рост плесени на чашках, полученных из молока, ферментированного с помощью заквасочной культуры отдельно (контроль, первая фигура), вместе с *Lb. paracasei* CHCC14676 (вторая фигура), вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC5366

(третья фигура) или вместе с комбинацией *Lb. paracasei* CHCC14676 и *Lb. rhamnosus* CHCC5366 (четвертая фигура). Целевые загрязнители добавляли в концентрациях, упомянутых в тексте, сверху слева, двигаясь по часовой стрелке вниз влево на чашке: *Penicillium naigiovense*, *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* и *Penicillium crustosum*, соответственно. Затем чашки инкубировали при  $7\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 12 суток.

На Фиг. 4 показан рост плесени на чашках, полученных из молока, ферментированного с помощью заквасочной культуры отдельно (контроль, первая фигура), вместе с *Lb. paracasei* CHCC14676 (вторая фигура), вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC14226 (третья фигура) или вместе с комбинацией *Lb. paracasei* CHCC14676 и *Lb. rhamnosus* CHCC14226 (четвертая фигура). Целевые загрязнители добавляли в концентрациях, упомянутых в тексте, сверху слева, двигаясь по часовой стрелке вниз влево на чашке: *Penicillium naigiovense*, *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* и *Penicillium crustosum*, соответственно. Затем чашки инкубировали при  $7\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 12 суток.

На Фиг. 5 показан рост *Mucor ssp.* на греческом йогурте, полученном из молока, ферментированного с помощью только заквасочной культуры (левый стакан) или из молока, ферментированного в присутствии *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (правый стакан).

На Фиг. 6 показан рост плесени *Rhizopus stolonifer* на греческом йогурте, полученном из молока, ферментированного с помощью только заквасочной культуры (R, т.е. контроль), с помощью заквасочной культуры и HOLDBAC™ YM-B (YM-B), с помощью заквасочной культуры и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366), или с помощью заквасочной культуры и комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5366+14676).

На Фиг. 7 показан рост *Penicillium brevicompactum* (M1), *Penicillium commune* (M6), *Aspergillus versicolor* (M7) и *Penicillium glabrum* (M8) на сметане, полученной из молока, ферментированного с помощью только заквасочной культуры (верхний ряд); с помощью заквасочной культуры и HOLDBAC™ YM-B

(средний ряд); или с помощью заквасочной культуры и комбинации *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (нижний ряд).

На Фиг. 8 показан рост *D. hansenii* на сметане, полученной из молока, ферментированного с помощью только заквасочной культуры (контроль); с помощью заквасочной культуры и HOLDBAC™ YM-B (YM-B); или с помощью заквасочной культуры, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (12697+14676).

На Фиг. 9 показан рост *Saccharomyces cerevisiae* на белом рассольном сыре, полученном из молока, ферментированного с помощью только заквасочной культуры (контроль); с помощью заквасочной культуры и HOLDBAC™ YM-B (YM-B); или с помощью заквасочной культуры, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366+14676).

На Фиг. 10 показан рост *Kluveromyces marxianus* на белом рассольном сыре, полученном из молока, ферментированного с помощью только заквасочной культуры (контроль); с помощью заквасочной культуры и HOLDBAC™ YM-B (YM-B); или с помощью заквасочной культуры, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366+14676).

На Фиг. 11 показан рост *Penicillium commune* на белом рассольном сыре, полученном из молока, ферментированного с помощью только заквасочной культуры (R, т.е. контроль); with заквасочная культура и HOLDBAC™ YM-B (YM-B); или с помощью заквасочной культуры, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366+14676).

На Фиг. 12 изображен рост плесени *Penicillium paneum* в йогурте с 1,5% жира, полученном из молока, ферментированного с помощью заквасочной культуры отдельно (R, т.е. контроль), с помощью заквасочной культуры и HOLDBAC™ YM-B (YM-B), с помощью заквасочной культуры и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366), или с помощью заквасочной культуры и комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5366+14676).

На Фиг. 13 показан рост плесени *Penicillium crustosum* в

йогурте с 1,5% жира, полученном из молока, ферментированного с помощью заквасочной культуры отдельно (верхний ряд), с помощью заквасочной культуры и HOLDVAC™ УМ-В (второй ряд), с помощью заквасочной культуры и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (третий ряд) или с помощью заквасочной культуры и комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (нижний ряд). Намеченный загрязнитель добавляли в концентрациях 100 спор/стакан, и йогурты инкубировали при  $7\pm 1^\circ\text{C}$  (левый столбец),  $12\pm 1^\circ\text{C}$  (центральный столбец) или  $22\pm 1^\circ\text{C}$  (правый столбец) в течение 36 суток.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### Определения:

Как применяют в настоящем документе, термин «молочнокислая бактерия» обозначает грамположительную, микроаэрофильную или анаэробную бактерию, которая ферментирует сахара с образованием кислот, включая молочную кислоту в качестве преобладающей образуемой кислоты. Наиболее пригодные с промышленной точки зрения молочнокислые бактерии обнаружены внутри порядка «Lactobacillales», который включает в себя виды *Lactococcus*, виды *Streptococcus*, виды *Lactobacillus*, виды *Leuconostoc*, виды *Pseudoleuconostoc*, виды *Pediococcus*, виды *Brevibacterium* и виды *Enterococcus*. Их часто используют в качестве пищевых культур отдельно или в комбинации с другими молочнокислыми бактериями.

Термин «пищевой продукт» предназначен, чтобы включать в себя также сыр. Термин «сыр» понимают как включающий в себя любой сыр, включая твердые, полутвердые и мягкие сыры, такие как сыры следующих типов: домашний, брынза, чеддер, пармезан, моцарелла, эменталь, данбо, гауда, эдам, сыры типа брынзы, голубые сыры, рассольные сыры, камамбер и бри. Специалисту в данной области известно, как превращать сгусток в сыр, способы можно обнаружить в литературе, см., например, Kosikowski, F. V., и V. V. Mistry, «Cheese and Fermented Milk Foods», 1997, 3rd Ed. F. V. Kosikowski, L. L. C. Westport, CT. Как применяют в настоящем документе, сыр, имеющий концентрацию NaCl ниже 1,7% (масс./масс.), обозначают как «сыр с низким содержанием соли».

Молочнокислые бактерии, включая бактерии видов

*Lactobacillus* и *Lactococcus*, в норме поставляются для молочной промышленности либо в форме замороженных, либо в форме лиофилизированных культур для размножения производственной закваски, либо в форме так называемых «готовых к применению в производстве наборов» (DVS) культур, предназначенных для прямой инокуляции в сосуд для ферментации или чан для получения молочного продукта, такого как кисломолочный продукт или сыр. Такие культуры молочнокислых бактерий, как правило, обозначают как «заквасочные культуры» или «закваски».

Термин «мезофил» в настоящем документе относится к микроорганизмам, которые лучше всего развиваются при средних температурах (15°C–40°C). Наиболее пригодные с промышленной точки зрения мезофильные бактерии включают в себя виды *Lactococcus* и виды *Leuconostoc*. Термин «мезофильная ферментация» в настоящем документе относится к ферментации при температуре между приблизительно 22°C и приблизительно 35°C. Термин «мезофильный кисломолочный продукт» относится к кисломолочным продуктам, полученным посредством мезофильной ферментации мезофильной заквасочной культуры, и включает в себя такие кисломолочные продукты как пахта, простокваша, сквашенное молоко, сметана, сквашенные сливки и свежий сыр, такой как кварк, творог и сливочный сыр.

Термин «термофильный» в настоящем документе относится к микроорганизмам, которые лучше всего развиваются при температурах выше 43°C. Наиболее пригодные с промышленной точки зрения термофильные бактерии включают в себя виды *Streptococcus* и виды *Lactobacillus*. Термин «термофильная ферментация» в настоящем документе относится к ферментации при температурах выше приблизительно 35°C, например, между приблизительно 35°C и приблизительно 45°C. Термин «термофильный кисломолочный продукт» относится к кисломолочным продуктам, полученным посредством термофильной ферментации термофильной заквасочной культуры, и включают в себя такие кисломолочные продукты, как йогурт термостатного способа производства, перемешанный йогурт и питьевой йогурт.

Термин «молоко» следует понимать как секрет молочных

желез, полученный доением любого млекопитающего, такого как коровы, овцы, козы, буйволы или верблюды. В предпочтительном варианте осуществления молоко представляет собой коровье молоко. Термин молоко включает в себя также растворы белка/жира, полученные из растительных материалов, например, соевое молоко.

Термин «молочный субстрат» представляет собой любой сырой и/или переработанный молочный материал, который можно подвергать ферментации в соответствии со способом по изобретению. Таким образом, пригодные молочные субстраты включают в себя, но без ограничения, растворы/суспензии любых молочных или подобных молочным продуктов, содержащих белок, таких как цельное молоко или молоко с низким содержанием жира, обезжиренное молоко, пахта, разведенный порошок молока, стущенное молоко, сухое молоко, сыворотка, сывороточный пермеат, лактоза, маточная жидкость от кристаллизации лактозы, концентрат сывороточного белка или сливки. Очевидно, что молочный субстрат может происходить от любого млекопитающего, например, являясь по существу чистым молоком млекопитающего или разведенным порошком молока.

Перед ферментацией молочный субстрат можно гомогенизировать и пастеризовать в соответствии со способами, известными в данной области.

«Гомогенизация», как применяют в настоящем документе, обозначает интенсивное перемешивание для получения растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию проводят до ферментации, ее можно проводить так, чтобы расщеплять молоко на частицы меньшего размера, так что их невозможно более отделять от молока. Это можно осуществлять посредством пропускания молока под высоким давлением через малые отверстия.

«Пастеризация», как применяют в настоящем документе, обозначает обработку молочного субстрата для уменьшения или исключения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно, пастеризации достигают посредством поддержания указанной температуры в течение указанного периода времени. Указанной температуры обычно



достигают посредством нагревания. Температуру и продолжительность можно выбирать, чтобы уничтожить или инактивировать конкретные бактерии, такие как опасные бактерии. Затем может следовать стадия быстрого охлаждения.

«Ферментация» в способах по настоящему изобретению обозначает превращение углеводов в спирты или кислоты посредством действия микроорганизма. Предпочтительно, ферментация в способах по изобретению включает в себя превращение лактозы в молочную кислоту.

Способы ферментации для использования в получении молочных продуктов хорошо известны, и специалисту в данной области известно, как выбирать подходящие условия способа, такие как температура, кислород, количество и характеристики микроорганизма (микроорганизмов) и время процесса. Очевидно, что условия ферментации выбирают таким образом, чтобы поддерживать достижения по настоящему изобретению, т.е. получать молочный продукт в твердой (такой как сыр) или жидкой форме (такой как кисломолочный продукт).

Композиции по изобретению обеспечивают то преимущество, что нежелательные микроорганизмы, выбранные из грибов, бактерий и их смесей, например, в пищевых, кормовых и фармацевтических продуктах, и у человека и животных, можно подавлять. Предотвращение и/или подавление роста грибов, таких как дрожжи и плесень, является, в частности, предусмотренным. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления термин «противомикробный» следует понимать как «противогрибковый».

Термин «нежелательные микроорганизмы» в настоящем документе относится к микроорганизмам, таким как бактерии и грибы, такие как дрожжи, которые являются патогенными и/или способными ухудшать пищевые, кормовые или фармацевтические продукты. Композиции по изобретению обеспечивают то преимущество, что нежелательные микроорганизмы, выбранные из грибов, бактерий и их смесей, например, в пищевых, кормовых и фармацевтических продуктах и у человека и животных, можно подавлять. Предотвращение и/или подавление роста грибов, таких как дрожжи и плесень, является, в частности, предусмотренным.

Термины «подавлять» и «подлежать подавлению» по отношению к дрожжам и плесени означает, например, что рост или количество, или концентрацию дрожжей и плесени, например, в пищевых продуктах и/или на поверхности пищевых продуктов, содержащих штаммы в соответствии с настоящим изобретением, ниже, чем в пищевых продуктах и/или на поверхности пищевых продуктов, не содержащих таких штаммов.

В настоящем контексте, термин «мутант» следует понимать как штамм, полученный из штамма по изобретению посредством, например, генной инженерии, радиоактивного облучения и/или химической обработки. Является предпочтительным, чтобы мутант представлял собой функционально эквивалентный мутант, например, мутант, обладающий по существу такими же или улучшенными, свойствами (например, по отношению к противогрибковым свойствам), как родительский штамм. Такой мутант является частью настоящего изобретения. В особенности, термин «мутант» относится к штамму, полученному подверганием штамма по изобретению любой общепринятой обработке для мутагенеза, включая обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ-светом, или к спонтанно возникшему мутанту. Мутант можно подвергать нескольким обработкам для мутагенеза (как одну обработку следует понимать одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/селекции), однако в настоящее время является предпочтительным проведение не более 20, или не более 10, или не более 5 обработок (или стадий скрининга/селекции). В предпочтительном в настоящее время мутанте менее 5%, или менее 1% или даже менее 0,1% нуклеотидов в бактериальном геноме заменено другим нуклеотидом, или deletировано, по сравнению с родительским штаммом.

Использование терминов "a" и "an" и "the" и сходных обозначений в контексте описываемого изобретения (особенно в контексте следующей ниже формулы изобретения) следует понимать как охватывающее как единственное, так и множественное число, если в настоящем документе не указано иначе или явно не противоречит контексту. Термины "включающий", "имеющий",

“включающий в себя” и “содержащий” следует понимать как неограничивающие термины (т.е. обозначающие «включающий, но без ограничения»), если не указано иначе. Перечисление диапазонов значений в настоящем документе предназначено только, чтобы служить способом сокращения индивидуального перечисления каждого отдельного значения, попадающего в пределы диапазона, если в настоящем документе не указано иначе, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было индивидуально приведено в настоящем документе. Все способы, описанные в настоящем документе, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в настоящем документе не указано иначе или иным образом явно не противоречит контексту. Использование всех без исключения примеров, или иллюстративных формулировок (например, “такой как”), представленных в настоящем документе, предназначено только для лучшего освещения изобретения и не устанавливает ограничения объема изобретения, если в формуле изобретения не указано иначе. Никакие формулировки в описании не следует рассматривать как обозначающие какой-либо не заявленный в формуле изобретения элемент как необходимый для практического осуществления изобретения.

#### Осуществление и аспекты изобретения

Авторы настоящего изобретения провели скрининг среди 200 кандидатов из *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus rhamnosus* для обнаружения наиболее эффективных комбинаций одного или двух штаммов против широкого ряда микроорганизмов, таких как дрожжи и плесень.

Скрининги проводили в модельном исследовании, насколько возможно, имитирующем мезофильные кисломолочные продукты, в средах на основе молока, к которым добавляли соответствующую заквасочную культуру с биозащитными кандидатами или без и которые ферментировали в условиях, соответствующих мезофильным кисломолочным продуктам. Намеченные организмы выделяли из мезофильных кисломолочных продуктов. Очищенные молочнокислые бактерии из культур HOLDBAC™ от Danisco A/S, Denmark, так же как полные культуры HOLDBAC™ YM-B и HOLDBAC™ YM-C, содержащие как молочнокислые бактерии, так и пропионовокислые бактерии,

использовали в качестве отправной точки исследования.

Модельное исследование описано в Европейской Патентной заявке № EP11161609.0.

Обнаружено, что семнадцать кандидатов среди *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus rhamnosus* в целом подавляют 12 индикаторных грибов так же хорошо или лучше, чем являющиеся отправной точки исследования молочнокислые бактерии при тестировании при 25°C.

При тестировании на йогурте показано, что один штамм *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus paracasei* штамм CHCC14676, депонированный в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под № доступа DSM 25612, являлся значительно лучшим для подавления дрожжей и плесени, чем коммерчески доступные биозащитные культуры.

Подавляющий эффект штамма против дрожжей и плесени можно определять посредством хранения кисломолочных продуктов при подходящей температуре в течение подходящего времени хранения, как описано в примерах ниже.

Как правило, подходящая температура, при которой следует осуществлять этот способ, зависит от температуры, при которой конкретный пищевой, кормовой или фармацевтический продукт обычно хранят и/или изготавливают. Температура, при которой продукты обычно хранят, составляет между 5°C и 26°C, предпочтительно, температура составляет приблизительно 8°C.

Время хранения при температуре зависит от времени, в течение которого пищевой, кормовой, или фармацевтический продукт обычно хранят (срока хранения). Время хранения обычно составляет 5-65, предпочтительно, 7-60 суток, более предпочтительно, 7-28 суток, и даже более предпочтительно, время хранения составляет приблизительно 21 сутки, и более предпочтительно, вплоть до 60 суток или более.

Соответственно, первый аспект настоящего изобретения относится к штамму *Lactobacillus paracasei*, выбранному из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC14676, депонированного в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под № доступа DSM 25612, и полученным

из него мутантным штаммам.

Таким образом, помимо депонированного штамма, упомянутого выше, изобретение относится также к мутантам, которые происходят из этого штамма, т.е. они получены с использованием депонированного штамма СНСС14676 в качестве исходного материала. Мутантный штамм можно получать из депонированного штамма, например, посредством генной инженерии, облучения, УФ-света, химической обработки и/или способов, индуцирующих изменения генома. Мутант по изобретению может подавлять и/или предотвращать рост конкретных бактерий или грибов, предпочтительно плесени. Является предпочтительным, чтобы мутант оказывал по существу по меньшей мере 80% или более, по меньшей мере 90% или более, по меньшей мере 95% или более, или даже вплоть до 100% или более противогрибкового эффекта по сравнению с его родительским штаммом при определении, например, в анализе, как описано в примере 1, с использованием одного из видов плесени *P. brevicompactum*, *P. commune*, *A. versicolor*, *D. hansenii* или *P. glabum* в качестве эталонного организма, рост которого необходимо подавлять.

Специалисту в данной области понятно, что с использованием депонированного штамма в качестве исходного материала, читатель – специалист в данной области – может посредством общепринятых способов мутагенеза или повторного выделения общепринятым образом получать дополнительные его мутанты или производные, сохраняющие описанные в настоящем документе признаки и преимущества. Соответственно, термин «полученные из него мутантные штаммы» из первого аспекта относится к мутантным штаммам, полученным с использованием депонированного штамма в качестве исходного материала.

Второй аспект относится к противогрибковой композиции, содержащей по меньшей мере один штамм *Lactobacillus paracasei* по первому аспекту изобретения, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* штамм СНСС14676.

При тестировании *Lactobacillus paracasei* штамма СНСС14676 в комбинации с различными штаммами *Lactobacillus rhamnosus* неожиданно обнаружено, что эти комбинации являлись даже

лучшими, чем любой из штаммов по отдельности, даже когда общие концентрации клеток являлись идентичными. В одном варианте осуществления изобретение относится к комбинации *Lactobacillus paracasei* штамма CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC5366. В другом варианте осуществления изобретение относится к комбинации *Lactobacillus paracasei* штамма CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC14226. В другом варианте осуществления изобретение относится к комбинации *Lactobacillus paracasei* штамма CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC12697. Эти комбинации, по-видимому, являются более эффективными, чем являющиеся отправной точки исследования культуры HOLDBAC™ YM-B и HOLDBAC™ YM-C от Danisco, Denmark.

Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к противомикробным и более предпочтительно, противогрибковым композициям, содержащим *Lactobacillus paracasei* штамм CHCC14676, депонированный в German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) под № доступа DSM25612 или полученный из него мутант и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus rhamnosus*. Предпочтительно, по меньшей мере один штамм *Lactobacillus rhamnosus* выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC12697 с № доступа DSM24616, *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC14226 с № доступа DSM24652, *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC5366 с № доступа DSM23035 и мутантных штаммов, полученных из этих депонированных штаммов.

Один из аспектов изобретения, таким образом, относится к противомикробной и более предпочтительно, противогрибковой композиции, содержащей *Lactobacillus paracasei* штамм CHCC14676 или полученный из него мутант и *Lactobacillus rhamnosus* штамм CHCC14226 или полученный из него мутант. В другом аспекте изобретение относится к противомикробной и более предпочтительно, противогрибковой композиции, содержащей по меньшей мере *Lactobacillus paracasei* штамм CHCC14676 или полученный из него мутант, и *Lactobacillus rhamnosus* штамм CHCC5366 или полученный из него мутант. В другом аспекте изобретение относится к противомикробной и более

предпочтительно, противогрибковой композиции, содержащей по меньшей мере *Lactobacillus paracasei* штамм СНСС14676 или полученный из него мутант и *Lactobacillus rhamnosus* штамм СНСС12697 или полученный из него мутант. Предпочтительно, комбинация штамма *Lactobacillus paracasei* и штамма *Lactobacillus rhamnosus* в композициях по изобретению действует синергически в отношении их противомикробной и/или противогрибковой активности.

Противогрибковая композиция, как правило, содержит бактерии в концентрированной форме, включая замороженные, высушенные или лиофилизированные концентраты, как правило, имеющие концентрацию жизнеспособных клеток, лежащую в диапазоне  $10^4$ - $10^{12}$  КОЕ (колониеобразующих единиц) на грамм композиции, включая по меньшей мере  $10^4$  КОЕ на грамм композиции, например, по меньшей мере  $10^5$  КОЕ/г, например, по меньшей мере  $10^6$  КОЕ/г, например, по меньшей мере  $10^7$  КОЕ/г, например, по меньшей мере  $10^8$  КОЕ/г, например, по меньшей мере  $10^9$  КОЕ/г, например, по меньшей мере  $10^{10}$  КОЕ/г, например, по меньшей мере  $10^{11}$  КОЕ/г. Таким образом, композиция по изобретению предпочтительно представлена в замороженной, высушенной или лиофилизированной форме, например, в форме готовых к применению в производстве наборов (DVS) культур. Однако, как применяют в настоящем документе, композиция может также представлять собой жидкость, полученную после суспендирования замороженных, высушенных или лиофилизированных концентратов клеток в жидкой среде, такой как вода или буфер PBS. Когда композиция по изобретению представляет собой суспензию, концентрация жизнеспособных клеток лежит в диапазоне  $10^4$ - $10^{12}$  КОЕ (колониеобразующих единиц) на мл композиции, включая по меньшей мере  $10^4$  КОЕ на мл композиции, например, по меньшей мере  $10^5$  КОЕ/мл, например, по меньшей мере  $10^6$  КОЕ/мл, например, по меньшей мере  $10^7$  КОЕ/мл, например, по меньшей мере  $10^8$  КОЕ/мл, например, по меньшей мере  $10^9$  КОЕ/мл, например, по меньшей мере  $10^{10}$  КОЕ/мл, например, по меньшей мере  $10^{11}$  КОЕ/мл.

Композиция может в качестве дополнительных компонентов содержать криопротекторы и/или общепринятые добавки, включая

пищевые добавки, такие как дрожжевые экстракты, сахара и витамины, например, витамин А, С, D, К или витамины семейства витамина В. Пригодные криопротекторы, которые можно добавлять к композициям по изобретению, представляют собой компоненты, улучшающие холодостойкость микроорганизмов, такие как маннит, сорбит, триполифосфат натрия, ксилит, глицерин, рафиноза, мальтодекстрин, эритрит, треит, трегалоза, глюкоза и фруктоза. Другие добавки могут включать в себя, например, углеводы, вкусовые добавки, минералы, ферменты (например, сычужный фермент, лактазу и/или фосфолипазу).

В композициях по изобретению, содержащих *Lactobacillus paracasei* штамм СНСС14676 и штамм *Lactobacillus rhamnosus*, соотношение между *Lactobacillus paracasei* штаммом СНСС14676 и штаммом *Lactobacillus rhamnosus*, например, соотношение концентрации или количества бактерий *Lactobacillus paracasei* и концентрации или количества бактерий *Lactobacillus rhamnosus*, предпочтительно, составляет от 1:100 до 100:1, предпочтительно, 1:10-10:1.

Противогрибковую композицию по настоящему изобретению можно использовать в связи с любым пищевым, кормовым и фармацевтическим продуктом, который является подверженным разложению микроорганизмами и/или заражением дрожжами и плесенью. Они включают в себя, но без ограничения, фрукты и овощи, включая продукты переработки, зерно и продукты переработки зерна, молочные продукты, мясо, домашнюю птицу и морепродукты. В особенно предпочтительных вариантах осуществления композицию используют в связи с молочным продуктом и/или мясом и домашней птицей. В предпочтительном варианте осуществления композиции по изобретению предназначены для использования в качестве добавки при получении молочных продуктов, таких как йогурт, творог, сметана, сливочный сыр, белые рассольные сыры и т.п.

В предпочтительном варианте осуществления композиции по изобретению используют против грибов, таких как дрожжи и плесень. Это означает, что композиции используют для подавления и/или предотвращения роста грибов, вызывающих заражение в



процессах молочной промышленности, в частности, процессах ферментации молока. Композиции по настоящему изобретению можно использовать, например, для подавления и/или предотвращения роста дрожжей, таких как дрожжи родов *Kluyveromyces* (например, *K. marxianus*, *K. lactis*), *Pichia* (например, *P. fermentans*), *Yarrowia* (например, *Y. lipolytica*), *Candida* (например, *C. sake*), и т.п.; или плесени, такой как плесень родов *Penicillium* (например, *P. nalgiovense*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. brevicompactum*, *P. glabrum*), видов *Mucor*, видов *Cladospodium*, *Aspergillus* (например, *A. versicolor*), *Debaryomyces* (например, *D. hansenii*), и т.п. Является особенно предпочтительным использовать композиции по изобретению для подавления и/или предотвращения роста видов *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Penicillium nalgiovense*, видов *Cladospodium*, *Penicillium commune*, видов *Mucor*, *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium crustosum*, *Kluyveromyces lactis* и/или *Debaryomyces hansenii*.

Противогрибковую композицию по второму аспекту настоящего изобретения можно также использовать в качестве фармацевтического продукта, предпочтительно, продукта для лечения инфекций патогенными грибами, такими как патогенные дрожжи.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к пищевому, кормовому или фармацевтическому продукту, содержащему штамм *Lactobacillus paracasei* по первому аспекту изобретения или противогрибковую композицию по второму аспекту изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления пищевой, кормовой или фармацевтический продукт представляет собой пищевой продукт.

В более предпочтительном варианте осуществления такой пищевой продукт выбран из группы, состоящей из фруктов и продуктов переработки фруктов, овощей и продуктов переработки овощей, зерна и продуктов переработки зерна, молочных продуктов, мяса, домашней птицы и морепродуктов и их смесей.

В даже более предпочтительном варианте осуществления пищевой продукт представляет собой молочный продукт,

предпочтительно, мезофильный или термофильный кисломолочный продукт, такой как свежий сыр, йогурт, сметана или творог.

В другом предпочтительном варианте осуществления пищевой продукт представляет собой мясо или домашнюю птицу.

В предпочтительном варианте осуществления пищевой, кормовой или фармацевтический продукт представляет собой фармацевтический продукт.

Предпочтительно, фармацевтический продукт представляет собой продукт, пригодный для введения противогрибковой композиции по второму аспекту настоящего изобретения человеку или животному для подавления патогенных микроорганизмов и облегчения симптомов, связанных с патогенными микроорганизмами. Примеры таких симптомов включают в себя симптомы, связанные с дрожжевой инфекцией. В таком варианте осуществления фармацевтический продукт может представлять собой единичную дозированную форму, содержащую противогрибковую композицию. Предпочтительно, единичная дозированная форма представляет собой капсулу или таблетку. Однако единичная дозированная форма может также являться пригодной для введения на слизистую оболочку или кожу и, таким образом, может находиться в форме пасты, крема, мази и т.п.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к способу изготовления пищевого, кормового или фармацевтического продукта по третьему аспекту настоящего изобретения, включающего в себя добавления по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* по первому аспекту или противогрибковой композиции по второму аспекту изобретения в ходе изготовления пищевого, кормового или фармацевтического продукта. Предпочтительно, способ также включает в себя стадию контроля параметров изготовления в ходе изготовления, так что концентрация по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* остается постоянной или увеличивается.

В предпочтительном варианте осуществления концентрация по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* составляет по меньшей мере  $1 \times 10^6$  КОЕ/г или каждого по меньшей мере  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или

каждого по меньшей мере  $1 \times 10^5$  КОЕ/см<sup>2</sup> поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта. Предпочтительно, концентрация по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* составляет по меньшей мере  $5 \times 10^6$  КОЕ/г или каждого по меньшей мере  $5 \times 10^6$  КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере  $5 \times 10^5$  КОЕ/см<sup>2</sup> поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта, например, по меньшей мере  $1 \times 10^7$  КОЕ/г или каждого по меньшей мере  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере  $1 \times 10^6$  КОЕ/см<sup>2</sup> поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта, например, по меньшей мере  $5 \times 10^7$  КОЕ/г или каждого по меньшей мере  $5 \times 10^7$  КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере  $5 \times 10^6$  КОЕ/см<sup>2</sup> поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта.

Когда пищевой, кормовой или фармацевтический продукт изготавливают посредством добавления композиции, содержащей *Lactobacillus paracasei* штамм СНСС14676 или полученный из него мутант и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus rhamnosus*, концентрация *Lactobacillus paracasei* штамма СНСС14676 или полученного из него мутанта и/или концентрация по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus rhamnosus* составляет каждого по меньшей мере  $1 \times 10^6$  КОЕ/г или каждого по меньшей мере  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере  $1 \times 10^5$  КОЕ/см<sup>2</sup> поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта. Предпочтительно, концентрация *Lactobacillus paracasei* штамма СНСС14676 или полученного из него мутанта и/или концентрация по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus rhamnosus* составляет каждого по меньшей мере  $5 \times 10^6$  КОЕ/г или каждого по меньшей мере  $5 \times 10^6$  КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере  $5 \times 10^5$  КОЕ/см<sup>2</sup> поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта. В следующем варианте осуществления концентрация *Lactobacillus paracasei* штамма СНСС14676 или полученного из него мутанта и/или концентрация по

меньшей мере одного штамма *Lactobacillus rhamnosus* составляет каждого по меньшей мере  $1 \times 10^8$  КОЕ/г или каждого по меньшей мере  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере  $1 \times 10^7$  КОЕ/см<sup>2</sup> поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта.

В предпочтительном варианте осуществления параметры изготовления контролируют в ходе изготовления, так что концентрация *Lactobacillus paracasei* штамма СССС14676 (или полученного из него мутанта) и по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus rhamnosus* увеличивается или остается постоянной.

Противогрибковую композицию в соответствии с настоящим изобретением наиболее просто используют посредством смешивания с пищевым, кормовым или фармацевтическим продуктом и/или нанесения на смешивающийся пищевой, кормовой или фармацевтический продукт, но она должна также являться эффективной для обработки поверхности твердых пищевых продуктов, или внутренней части таких продуктов, например, посредством инъекции. В других вариантах осуществления композицию можно наносить в форме маринада, панировки, приправ для натирания, глазури, смеси красителей, и т.п., где ключевыми критериями является то, что противогрибковая композиция является доступной на поверхности, подверженной бактериальному разложению и заражению дрожжами и плесенью. В других вариантах осуществления композицию можно опосредованно приводить в контакт с поверхностью пищевого продукта посредством нанесения композиции на упаковку пищевого продукта и затем применения упаковки для поверхности пищевого продукта. Оптимальное количество для использования может зависеть от состава конкретного пищевого продукта, подлежащего обработке, и способа, используемого для нанесения композиции на поверхность пищевого продукта, но его можно определять простыми экспериментами.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления способ включает в себя одну или несколько стадий ферментации, и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus paracasei*, или противогрибковую композицию можно добавлять к пищевому,

кормовому или фармацевтическому продукту до, во время или после таких одной или нескольких стадий ферментации.

Предпочтительно, способ включает в себя ферментацию субстрата, такого как молочный субстрат, в присутствии по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* по изобретению в течение периода времени, достаточного для появления противогрибковой активности по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* по изобретению. Эта противогрибковая активность оказывает эффект подавления развития дрожжей и/или плесени в продукте, ферментированном с помощью меньшей мере одного штамма.

В даже более предпочтительном варианте осуществления способ включает в себя ферментирование молочного субстрата с помощью заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один штамм из родов, выбранных из *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc*, например, по меньшей мере один штамм *Lactobacillus bulgaricus* и по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus* или например, по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis* подвида *lactis*, по меньшей мере один штамм *Leuconostoc mesenteroides* подвида *cremoris* и по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis* подвида *diacetylactis*.

Пятый аспект по изобретению относится к пищевому продукту, который можно получать способом по четвертому аспекту изобретения.

Шестой аспект настоящего изобретения относится к использованию штамма *Lactobacillus paracasei* по первому аспекту или противогрибковой композиции по второму аспекту для получения пищевого, кормового или фармацевтического продукта. Предпочтительно, пищевой продукт, полученный посредством использования штамма *Lactobacillus paracasei* по первому аспекту или противогрибковой композиции по второму аспекту, представляет собой сыр, такой как домашний, брынза, чеддер, пармезан, моцарелла, эмменталь, данбо, гауда, эдам, сыр типа брынзы, голубой сыр, рассольный сыр, камамбер или бри.

Последний аспект изобретения относится к использованию штамма *Lactobacillus paracasei* по первому аспекту или

противогрибковой композиции по второму аспекту для подавления роста дрожжей и плесени, в частности, в пищевых и кормовых продуктах.

Варианты осуществления настоящего изобретения описаны ниже посредством неограничивающих примеров.

#### ПРИМЕРЫ

**Пример 1:** Исследование заражения йогурта с *Lactobacillus paracasei* CFICC14676

Для визуального исследования подавляющего эффекта штамма *Lactobacillus paracasei* CFICC14676 на различные виды плесени, *P. brevicompactum*, *P. commune*, *A. versicolor* и *P. glabrum*, получали йогурт с 1,5% жира:

Гомогенизированное молоко (1,5% жира) подвергали тепловой обработке при  $95^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин. в 1 л бутылках в водяной бане и немедленно охлаждали. Коммерческую заквасочную культуру (F-DVS YF-L901, которую можно получать из Chr. Flansen A/S, Denmark) инокулировали при 0,02%. Затем молоко инокулировали HОLDBАС™ YM-B (20 DCU/100 л) или *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 ( $1\times 10^7$  КОЕ/мл), и одну бутылку использовали в качестве контроля и инокулировали только заквасочной культурой.

Молоко подвергали ферментации при  $43^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  до достижения pH  $4,60\pm 0,1$ . Полученный йогурт разливали в стаканы (100 г) и хранили при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Через сутки после получения йогурта различную плесень инокулировали в форме заражения поверхности в двух повторах стаканов йогурта с одним пятном на поверхности йогурта с намеченными 100 спорами/пятно. Рост плесени оценивали визуально после хранения в течение 45 суток при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Результат теста йогурта представлен на фигуре 1, показывающей, что *P. brevicompactum* (M1), *P. commune* (M6), *A. versicolor* (M7) и *P. glabrum* (M8) хорошо растут на йогурте, полученном из молока, ферментированного только с заквасочной культурой YF-L901 (верхний ряд) или с заквасочной культурой и культурой FIOЛDBАС™ YM-B (средний ряд). В отличие от этого, когда *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 присутствовал во время ферментации молока (нижний ряд), рост всех тестируемых видов

плесени был подавлен.

**Пример 2:** Количественные определения подавляющего эффекта *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 против *Debaryomyces hansenii*

Для количественной оценки подавляющего эффекта *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 на *D. hansenii* получали йогурт:

Гомогенизированное молоко (1,5% жира) подвергали тепловой обработке при  $95^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин. в 1 л бутылках в водяной бане и охлаждали немедленно. Коммерческую заквасочную культуру (F-DVS YF-L901, которую можно получать из Chr. Hansen A/S, Denmark) инокулировали при 0,02%. Затем молоко инокулировали HOLDBAC™ YM-B (20 DCU/100 л), HOLDBAC™ YM-C (10 DCU/100 л) или *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 ( $1\times 10^7$  КОЕ/г), и одну бутылку использовали в качестве контроля и инокулировали только заквасочной культурой.

Молоко ферментировали при  $43^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  до достижения pH  $4,60\pm 0,1$ . Полученный йогурт разливали в стаканы (100 г) и хранили при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Через сутки после получения йогурта в стаканы инокулировали в двух повторах 1,00 мл/стакан дрожжей с намеченными 20 КОЕ/г. Дрожжи равномерно распределяли в йогурте. Стаканы хранили под крышкой при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  и в подходящие интервалы уровень заражения *D. hansenii* посредством посева 1 мл йогурта и дальнейших соответствующих 1-кратных разведений, полученных в солевом растворе пептона, на агар с дрожжевым экстрактом, глюкозой и хлорамфениколом (YGC) с последующей аэробной инкубацией в течение 5 суток при  $25^{\circ}\text{C}$ .

Как проиллюстрировано на фигуре 2, рост *D. hansenii* был подавлен в присутствии штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 при инокуляции вместе с заквасочной культурой YF-L901 перед ферментацией. Штамм вызывал значительно более высокое подавление, чем коммерческие культуры, HOLDBAC™ YM-B и HOLDBAC™ YM-C.

**Пример 3:** Полуколичественные определения подавляющего эффекта *Lb. Paracasei* CHCC14676 и *Lb. rhamnosus* CHCC5366 отдельно и в комбинации против заражения различными видами

плесени.

Для полуколичественных оценок *Lb. paracasei* CHCC14676 и *Lb. rhamnosus* CHCC5366 отдельно и в комбинации, использовали анализ на агаре, напоминающий способ изготовления и продукт йогурта:

Гомогенизированное молоко (1,5% жира масс./об.) подвергали тепловой обработке при 95°C в течение пяти минут и немедленно охлаждали. Коммерческую заквасочную культуру (F-DVS YC-350, которую можно получать из Chr. Hansen A/S, Denmark), инокулировали при 0,02%, и молоко распределяли по 220 мл бутылкам. В бутылки дополнительно инокулировали *Lb. paracasei* CHCC14676, *Lb. rhamnosus* CHCC5366 и комбинацию двух штаммов, соответственно, в общей концентрации  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл. Одну бутылку без дополнительной инокуляции помимо заквасочной культуры, использовали в качестве контроля. Более того, 5% индикатора pH из бромкрезолового пурпурного и бромкрезолового зеленого добавляли во все бутылки для получения показателей скорости закисления, и для получения синей/зеленой окраски среды, что облегчало детекцию последующего роста дрожжей и плесени – мишеней. Все бутылки инкубировали в водяной бане при  $43 \pm 1^\circ\text{C}$  и подвергали ферментации в этих условиях до достижения pH  $4,60 \pm 0,1$ . После ферментации бутылки немедленно охлаждали на льду и интенсивно встряхивали, чтобы разбить сгусток. Затем кисломолочный продукт нагревали до температуры 40°C и добавляли до 40 мл 5% стерильного раствора агара, расплавленного и охлажденного до 60°C. Затем этот раствор разливали в стерильные чашки Петри, и чашки высушивали на рабочем столе с ламинарным воздушным потоком в течение 30 мин.

Суспензии полностью проросших спор в соответствующих разведениях из выбранных видов плесени *Penicillium nalgiovense* (10x), *Penicillium commune* (100x), *Aspergillus versicolor* (100x) и *Penicillium crustosum* (100x) наносили пятнами на чашки. Чашки инкубировали при 7°C и проверяли рост плесени в подходящие, регулярные интервалы.

Результаты анализа на агаре представлены на фигуре 3, показывающей, что все тестируемые виды плесени росли очень



хорошо на чашках с агаром из молока, ферментированного только с заквасочной культурой (контроль). Однако, когда *Lb. paracasei* CHCC14676 или *Lb. rhamnosus* CHCC5366 присутствовали во время ферментации молока, на полученных чашках сильно снижался рост всех видов плесени. Более того, когда *Lb. paracasei* CHCC14676 и *Lb. rhamnosus* CHCC5366 присутствовали в комбинации во время ферментации молока, наблюдали даже более сильное подавление, в частности, для *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* и *Penicillium crustosum*, нанесенных пятнами на чашки.

**Пример 4:** Полуколичественные определения подавляющего эффекта *Lb. paracasei* CHCC14676 и *Lb. rhamnosus* CHCC14226 отдельно и в комбинации против заражения различными видами плесени

Для полуколичественных оценок *Lb. paracasei* CHCC14676 и *Lb. rhamnosus* CHCC14226 отдельно и в комбинации использовали анализ на агаре, напоминающий способ изготовления и продукт йогурта:

Гомогенизированное молоко (1,5% жира масс./об.) подвергали тепловой обработке при 95°C в течение пяти минут и немедленно охлаждали. Коммерческую заквасочную культуру (F-DVS Yoflex® Mild, которую можно получать из Chr. Hansen A/S, Denmark) инокулировали при 0,02%, и молоко распределяли по 220 мл бутылкам. В бутылки дополнительно инокулировали *Lb. paracasei* CHCC14676, *Lb. rhamnosus* CHCC14226 и комбинацию двух штаммов, соответственно, в общей концентрации  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл. Одну бутылку без дополнительной инокуляции помимо заквасочной культуры, использовали в качестве контроля. Кроме того, 5% индикатора pH из бромкрезолового пурпурного и бромкрезолового зеленого добавляли во все бутылки для получения показателей скорости закисления, и для получения синей/зеленой окраски среды, что облегчало детекцию последующего роста дрожжей и плесени – мишеней. Все бутылки инкубировали в водяной бане при  $43 \pm 1^\circ\text{C}$  и подвергали ферментации в этих условиях до достижения pH  $4,60 \pm 0,1$ . После ферментации бутылки немедленно охлаждали на льду и интенсивно встряхивали, чтобы разбить сгусток. Затем кисломолочный продукт нагревали до температуры 40°C и добавляли

до 40 мл 5% стерильного раствора агара, расплавленного и охлажденного до 60°C. Затем этот раствор разливали в стерильные чашки Петри, и чашки высушивали на рабочем столе с ламинарным воздухопотоком в течение 30 мин.

Суспензии полностью проросших спор в соответствующих разведениях из выбранных видов плесени *Penicillium nalgiovense* (10x), *Penicillium commune* (100x), *Aspergillus versicolor* (100x) и *Penicillium crustosum* (100x) наносили пятнами на чашки. Чашки инкубировали при 7°C и проверяли рост плесени в подходящие, регулярные интервалы.

Результаты анализа на агаре представлены на фигуре 4, показывающей, что все тестируемые виды плесени росли очень хорошо на чашках с агаром из молока, ферментированного только с заквасочной культурой (контроль). Однако, когда *Lb. paracasei* CHCC14676 или *Lb. rhamnosus* CHCC14226 присутствовали во время ферментации молока, на полученных чашках сильно снижался рост всех видов плесени. Более того, когда *Lb. paracasei* CHCC14676 и *Lb. rhamnosus* CHCC14226 присутствовали в комбинации во время ферментации молока, наблюдали даже более сильное подавление для *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* и *Penicillium crustosum*, нанесенных пятнами на чашки.

**Пример 5:** Исследование заражения греческого йогурта с *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 в комбинации

Для визуального исследования подавляющего эффекта *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 в комбинации на виды *Mucor* греческий йогурт получали по существу следующим образом:

В пастеризованное молоко с 1,5% жира инокулировали коммерческую заквасочную культуру (F-DVS YF-L901, которую можно получать из Chr. Flansen A/S, Denmark) при 0,02%. Одну партию, инокулированную только заквасочной культурой, использовали в качестве контроля. В другую партию дополнительно инокулировали комбинацию *Lactobacillus rhamnosus* штамма CFICC5366 ( $5 \times 10^6$  КОЕ/г) и *Lactobacillus paracasei* штамма CHCC14676 ( $5 \times 10^6$

КОЕ/г).

Молоко подвергали ферментации при  $43^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  до конечного pH 4,55 (6-7 часов). Затем йогурт охлаждали до  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  с обратным давлением 2 бар (200000 Па) и хранили при  $6^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Через сутки после получения йогурта виды *Mucor* инокулировали в форме заражения поверхности в двух повторях стаканов йогурта посредством нанесения одного пятна на поверхность йогурта с намеченной концентрацией при инокуляции 100 спор/пятно. Рост плесени оценивали визуально после хранения в течение 15 суток при  $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Результаты теста греческого йогурта представлены на фигуре 5, показывающей, что виды *Mucor* хорошо растут на йогурте, полученном из молока, ферментированного только с заквасочной культурой (левый стакан). В отличие от этого, когда *Lactobacillus rhamnosus* CFICC5366 и *Lactobacillus paracasei* CFICC14676 присутствовали во время ферментации молока (правый стакан), рост видов *Mucor* был подавлен.

**Пример 6:** Второе исследование заражения греческого йогурта с комбинацией *Lactobacillus rhamnosus* CFICC5366 и *Lactobacillus paracasei* CFICC14676

Для визуального исследования подавляющего эффекта комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CFICC5366 и *Lactobacillus paracasei* CFICC14676 на плесень черного хлеба *Rhizopus stolonifer* греческий йогурт получали по существу следующим образом:

В пастеризованное молоко с 1,5% жира инокулировали коммерческую заквасочную культуру (F-DVS YF-L901, которую можно получать из Chr. Flansen A/S, Denmark) при 0,02%. В молоко дополнительно инокулировали FIOldbac™ УМ-В (10 DCU/100 л), с *Lactobacillus rhamnosus* штамм CHCC5366 ( $1\times 10^7$  КОЕ/г), или комбинацию *Lactobacillus rhamnosus* штамм CHCC5366 ( $5\times 10^6$  КОЕ/г) и *Lactobacillus paracasei* штамм CFICC14676 ( $5\times 10^6$  КОЕ/г). Одну партию использовали в качестве контроля и инокулировали только заквасочной культурой.

Молоко ферментировали при  $43^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  до конечного pH 4,55

(6-7 часов). Затем йогурт охлаждали до  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  с обратным давлением 2 бар (200000 Па) и хранили при  $6^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Через сутки после получения йогурта *Rhizopus stolonifer* инокулировали в форме заражения поверхности в двух повторях стаканов йогурта посредством нанесения одного пятна на поверхность йогурта с намеченным заражением 100 спор/пятно. Рост плесени оценивали визуально после хранения в течение 42 суток при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Результаты теста греческого йогурта представлены на фигуре 6, показывающей, что *Rhizopus stolonifer* хорошо растет на йогурте, полученном из молока, ферментированного только с заквасочной культурой («R», т.е. контроль) или с заквасочной культурой и культурой FIOldbac™ YM-B (YM-B). Однако, когда *Lactobacillus rhamnosus* CFICC5366 (5366) присутствовал, рост *Rhizopus stolonifer* был значительно подавлен. Когда *Lactobacillus rhamnosus* CFICC5366 и *Lactobacillus paracasei* CFICC14676 оба присутствовали во время ферментации молока (5366+14676), рост *Rhizopus stolonifer* был подавлен почти полностью.

**Пример 7:** Исследование заражения сметаны с *Lactobacillus paracasei* CFICC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CFICC12697 в комбинации

Для визуального исследования подавляющего эффекта комбинации *Lactobacillus paracasei* CFICC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CFICC12697 на рост различных видов плесени сметану получали по существу следующим образом:

Пастеризованное молоко с высоким содержанием жира инокулировали гетероферментативной коммерческой заквасочной культурой (F-DVS DSG-2000, которую можно получать из Chr. Flansen A/S, Denmark) при 0,01%. Молоко дополнительно инокулировали FIOldbac™ YM-B (10 DCU/100 л) или комбинацией *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 ( $2,5\times 10^6$  КОЕ/г) и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 ( $2,5\times 10^6$  КОЕ/г). Одну партию использовали в качестве контроля и инокулировали только заквасочной культурой.

Молоко подвергали ферментации при  $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  до достижения рН  $4,60\pm 0,05$ , и сметану подвергали последующей обработке. Сметану перемешивали и охлаждали до  $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  и хранили при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Через сутки после получения сметаны различные виды плесени инокулировали в форме заражения поверхности в двух повторях стаканов сметаны посредством нанесения одного пятна на поверхность сметаны с намеченной концентрацией 100 спор/пятно. Рост плесени оценивали визуально после хранения в течение 61 суток при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Результаты теста сметаны представлены на фигуре 7, показывающей, что *Penicillium brevicompactum* (M1), *Penicillium commune* (M6), *Aspergillus versicolor* (M7) и *Penicillium glabrum* (M8) хорошо растут на сметане, полученной из молока, ферментированного только с заквасочной культурой (верхний ряд) или с заквасочной культурой и культурой HOLDVAC™ YM-B (средний ряд). В отличие от этого, когда *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 присутствовали во время ферментации молока (нижний ряд) рост всей тестируемой плесени был подавлен.

**Пример 8:** Количественные определения подавляющего эффекта комбинации *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 против *Debaryomyces hansenii* в сметане

Для количественной оценки подавляющего эффекта комбинации *Lactobacillus paracasei* CFICC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CFICC12697 против *Debaryomyces hansenii* сметану получали по существу следующим образом:

Пастеризованное молоко с высоким содержанием жира инокулировали гетероферментативной коммерческой заквасочной культурой (F-DVS DSG-2000, которую можно получать из Chr. Flansen A/S, Denmark) при 0,01%. Молоко дополнительно инокулировали FIOldbac™ YM-B (10 DCU/100 л) или комбинацией *Lactobacillus paracasei* CFICC14676 ( $2,5\times 10^6$  КОЕ/г) и *Lactobacillus rhamnosus* CFICC12697 ( $2,5\times 10^6$  КОЕ/г). Одну партию использовали в качестве контроля и инокулировали только

заквасочной культурой.

Молоко подвергали ферментации при  $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  до достижения рН  $4,60\pm 0,05$  и сметану подвергали последующей обработке. Сметану перемешивали и охлаждали до  $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , и хранили при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Через сутки после получения сметаны стаканы в двух повторях инокулировали 1,00 мл/стакан дрожжей с намеченными 20 КОЕ/г. Дрожжи равномерно распределяли в сметане. Стаканы хранили под крышкой при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  и анализировали в подходящие интервалы уровень заражения *D. hansenii* посредством посева 1 мл сметаны и дальнейших соответствующих 1-кратных разведений, полученных в солевом растворе пептона, на агар с дрожжевым экстрактом, глюкозой и хлорамфениколом (YGC) с последующей аэробной инкубацией в течение 5 суток при  $25^{\circ}\text{C}$ .

Как проиллюстрировано на фигуре 8, рост *D. hansenii* был подавлен в присутствии комбинации *Lactobacillus paracasei* CFICC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CFICC12697 при инокуляции вместе с заквасочной культурой DSG-2000 перед ферментацией. Штамм вызывал значительно более высокое подавление, чем коммерческая культура, HOLDBAC™ YM-B.

**Пример 9:** Исследование заражения белого рассольного сыра с *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 в комбинации

Для количественной оценки подавляющего эффекта *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 в комбинации против *Saccharomyces cerevisiae*, получали белый рассольный сыр:

Пастеризованное и стандартизированное молоко инокулировали коммерческой заквасочной культурой (FD-DVS SafeIT-1, которую можно получать из Chr. Hansen A/S, Denmark) при 40 Ед. на 1000 л молока. Молоко дополнительно инокулировали HOLDBAC™ YM-B (10 DCU/100 л) или комбинацией *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC5366 ( $5\times 10^6$  КОЕ/г) и *Lactobacillus paracasei* штамма CHCC14676 ( $5\times 10^6$  КОЕ/г). Одну партию использовали в качестве контроля и инокулировали только заквасочной культурой. Молоко обрабатывали сычужным ферментом при  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  с использованием

Chy-Max plus (которую можно получать из Chr. Hansen A/S, Denmark) при 220 мл на 1000 л в течение 90 мин перед нарезанием. При pH 6,0 сырный стусток подавали насосом к плесени и оставляли для стекания жидкости до конечного 4,8-4,7 (20-24 часов). Сыры помещали в банки с холодным рассолом (8%) и хранили при  $5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Через сутки после получения белого рассольного сыра в банки инокулировали дрожжи в двух повторах с намеченными 20 КОЕ/мл. Дрожжи равномерно распределяли в рассоле. Банки хранили под крышкой при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  в течение вплоть до 40 суток, и по 10 г анализировали в подходящие интервалы по уровню заражения *Saccharomyces cerevisiae* посредством посева соответствующих 1-кратных разведений, полученных в солевом растворе пептона, на агар с дрожжевым экстрактом, глюкозой и хлорамфениколом (YGC) с последующей аэробной инкубацией в течение 5 суток при  $25^{\circ}\text{C}$ .

Как проиллюстрировано на фигуре 9, рост *Saccharomyces cerevisiae* был подавлен в присутствии *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 в комбинации при инокуляции вместе с заквасочной культурой SafeIT-1. Штаммы вызывали значительно более высокое подавление, чем коммерчески доступная культура, HOLDVAC™ YM-B.

**Пример 10:** Второе исследование заражения белого рассольного сыра с *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 в комбинации

Для количественной оценки подавляющего эффекта *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 в комбинации против *Kluveromyces marxianus* получали белый рассольный сыр, как описано в примере 1, за исключением того, что в банки инокулировали *Kluveromyces marxianus* в качестве заражения дрожжами.

Как проиллюстрировано на фигуре 10, рост *Kluveromyces marxianus* был подавлен в присутствии *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 в комбинации при инокуляции вместе с заквасочной культурой SafeIT-1. Штаммы вызывали значительно более высокое подавление, чем коммерчески доступная культура, HOLDVAC™ YM-B.

**Пример 11:** Второе исследование заражения белого рассольного сыра с *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 в комбинации

Для визуального исследования подавляющего эффекта *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 в комбинации против *P. commune* получали белый рассольный сыр, как описано в примере 1.

Через 7 суток после получения белого рассольного сыра, сыр вынимали из рассола и *P. commune* инокулировали в двух повторах образцов сыра в форме заражения поверхности с тремя пятнами на поверхности сыра с намеченными 100 спорами/пятно. Рост двух различных изолятов *P. commune* оценивали визуально после хранения в течение 12 суток при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  и, затем 16 суток при  $12^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Результаты белого рассольного сыра представлены на фигуре 11, показывающей, что два изолята *P. commune* хорошо растут на белом рассольном сыре, полученном из молока, инокулированного только заквасочной культурой (слева). В отличие от этого, когда *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 присутствовали во время изготовления сыра (справа), рост *P. commune* был сильно подавлен.

**Пример 12:** Исследование заражения йогурта с *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и CHCC14676 против *Penicillium paneum*

Для визуального исследования подавляющего эффекта *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC5366 отдельно или в комбинации с *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 на плесень *P. paneum* получали йогурт с 1,5% жира:

Гомогенизированное молоко (1,5% жира) подвергали тепловой обработке при  $95^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин в 1 л бутылках в водяной бане и немедленно охлаждали. Коммерческую заквасочную культуру (F-DVS YF-L901, которую можно получать из Chr. Hansen A/S, Denmark) инокулировали при 0,02%. В молоко дополнительно инокулировали HOLDVAC™ YM-B (20DCU/100 л), с *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 ( $1\times 10^7$  КОЕ/мл) отдельно или комбинацию *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 ( $5\times 10^6$  КОЕ/мл) и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 ( $5\times 10^6$  КОЕ/мл). Одну бутылку использовали в



качестве контроля и инокулировали только заквасочной культурой.

Молоко подвергали ферментации при  $43^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  до достижения pH  $4,60\pm 0,1$ . Полученный йогурт разливали в стаканы (100 г) и хранили при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Через сутки после получения йогурта различные виды плесени инокулировали в форме заражения поверхности в двух повторах стаканов йогурта с одним пятном на поверхности йогурта с намеченными 100 спорами/пятно. Рост плесени оценивали визуально после хранения в течение 28 суток при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$

Результат теста йогурта представлен на фигуре 12, показывающей, что *P. paneum* хорошо растет на йогурте, полученном из молока, ферментированного только с заквасочной культурой YF-L901 или с заквасочной культурой и культурой HOLDVAC™ YM-B. В отличие от этого, когда *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 присутствовал во время ферментации молока, рост *P. paneum* был сильно снижен, и комбинация *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 вызывала даже более сильное подавление роста *P. paneum*.

**Пример 13:** Исследование заражения йогурта с *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и CHCC14676 при различных температурах хранения

Для визуального исследования подавляющего эффекта *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC5366 отдельно или в комбинации с *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 на плесень *P. crustosum* при различных температурах хранения получали йогурт с 1,5% жира:

Гомогенизированное молоко (1,5% жира) подвергали тепловой обработке при  $95^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин в 1 л бутылках в водяной бане и немедленно охлаждали. Коммерческую заквасочную культуру (F-DVS YF-L901, которую можно получать из Chr. Hansen A/S, Denmark) инокулировали при 0,02%. Молоко дополнительно инокулировали HOLDVAC™ YM-B (20 DCU/100 л), *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 ( $1\times 10^7$  КОЕ/мл) отдельно или комбинацией *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 ( $5\times 10^6$  КОЕ/мл) и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 ( $5\times 10^6$  КОЕ/мл). Одну бутылку использовали в качестве контроля и инокулировали только заквасочной культурой.

Молоко подвергали ферментации при  $43^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  до достижения рН  $4,60\pm 0,1$ . Полученный йогурт разливали в стаканы (100 г) и хранили при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Через сутки после получения йогурта *Penicillium crustosum* инокулировали в форме заражения поверхности в двух повторах стаканов йогурта с одним пятном на поверхности йогурта с намеченными 100 спорами/пятно. Рост плесени оценивали визуально после хранения в течение 36 суток при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $12^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  или  $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$

Результаты теста йогурта представлены на фигуре 13, показывающей, что *P. crustosum* хорошо растет на йогурте, полученном из молока, ферментированного только с заквасочной культурой YF-L901 или с заквасочной культурой и культурой FIOldbac™ УМ-В при всех температурах хранения. В отличие от этого, когда *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, отдельно или в комбинации с *Lactobacillus paracasei* CHCC14676, присутствовал во время ферментации молока, рост *P. crustosum* был полностью предотвращен при хранении как при  $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , так и при  $12^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  в течение 36 суток. При хранении при  $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  рост *P. crustosum* был сильно снижен в присутствии *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и даже сильнее - в присутствии комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

#### ДЕПОЗИТЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ ЭКСПЕРТА

Заявитель ходатайствует, чтобы образец депонированных микроорганизмов, указанных ниже, мог становиться доступным только для эксперта, до даты выдачи патента.

*Lactobacillus paracasei* штамм CHCC14676 депонирован 2012-02-02 в German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, и ему присвоен № доступа: DSM25612.

*Lactobacillus rhamnosus* штамм CHCC5366 депонирован 2009-10-14 в German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, и ему присвоен №

доступа: DSM23035.

*Lactobacillus rhamnosus* штамм CHCC12697 депонирован 2011-03-01 в German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, и ему присвоен № доступа: DSM24616.

*Lactobacillus rhamnosus* штамм CHCC14226 депонирован 2011-03-15 в German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, и ему присвоен № доступа: DSM24652.

Депонирование выполнено согласно положениям Будапештского соглашения о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

#### ССЫЛКИ

US2011/0045134

EP1442113

EP11161609.0

Kosikowski, F.V. and Mistry, V.V., «Cheese and Fermented Milk Foods», 1997, 3rd Ed. F.V. Kosikowski, L.L.C. Westport, CT

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Штамм *Lactobacillus paracasei*, выбранный из группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei* штамма CHCC14676, депонированного в German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) под № доступа DSM25612, и полученных из него мутантных штаммов.

2. Противогрибковая композиция, содержащая по меньшей мере один штамм *Lactobacillus paracasei* по п.1.

3. Противогрибковая композиция, содержащая по меньшей мере один штамм *Lactobacillus paracasei* по п.1 и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus rhamnosus*.

4. Противогрибковая композиция по п.3, где по меньшей мере один штамм *Lactobacillus rhamnosus* выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 с № доступа DSM24616, *Lactobacillus rhamnosus* CHCC14226 с № доступа DSM24652, *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 с № доступа DSM23035 и полученных из них мутантных штаммов.

5. Пищевой, кормовой или фармацевтический продукт, содержащий штамм *Lactobacillus paracasei* по п.1 или противогрибковую композицию по любому из пп. 2-4.

6. Пищевой продукт по п.5, содержащий количество штамма *Lactobacillus paracasei* по п.1, эффективное для придания противогрибковых свойств пищевому продукту.

7. Пищевой продукт по п. 5 или п.6, где пищевой продукт выбран из группы, состоящей из фруктов и продуктов переработки фруктов, овощей и продуктов переработки овощей, зерна и продуктов переработки зерна, молочных продуктов, мяса, домашней птицы и морепродуктов, и их смесей.

8. Пищевой продукт по п.7, где пищевой продукт представляет собой молочный продукт, и молочный продукт представляет собой мезофильный или термофильный кисломолочный продукт, такой как йогурт или сметана.

9. Способ изготовления пищевого, кормового или фармацевтического продукта, включающий в себя добавление по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* по п.1 или противогрибковой композиции по любому из пп. 2-4 к пищевому,

кормовому или фармацевтическому продукту в ходе изготовления и контроль параметров изготовления в ходе изготовления, так что концентрация по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* остается постоянной или увеличивается.

10. Способ по п.9, где концентрация по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* составляет по меньшей мере  $1 \times 10^6$  КОЕ/г или каждого по меньшей мере  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или по меньшей мере  $1 \times 10^5$  КОЕ/см<sup>2</sup> поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта.

11. Способ по п.9, включающий в себя

(а) добавление противогрибковой композиции по любому из пп.2-4 в ходе изготовления пищевого, кормового или фармацевтического продукта, так что концентрация по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus rhamnosus* и/или по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* каждая составляет по меньшей мере  $1 \times 10^6$  КОЕ/г или по меньшей мере  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или по меньшей мере  $1 \times 10^5$  КОЕ/см<sup>2</sup> поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта, и

(b) контроль параметров изготовления в ходе изготовления, так что концентрация по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus rhamnosus* и/или по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus* увеличивается или остается постоянной.

12. Способ по любому из пп. 9-11, где способ включает в себя одну или несколько стадий ферментации.

13. Способ по п.12, где способ включает в себя ферментацию молочного субстрата с заквасочной культурой, содержащей по меньшей мере один штамм родов, выбранных из *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc*.

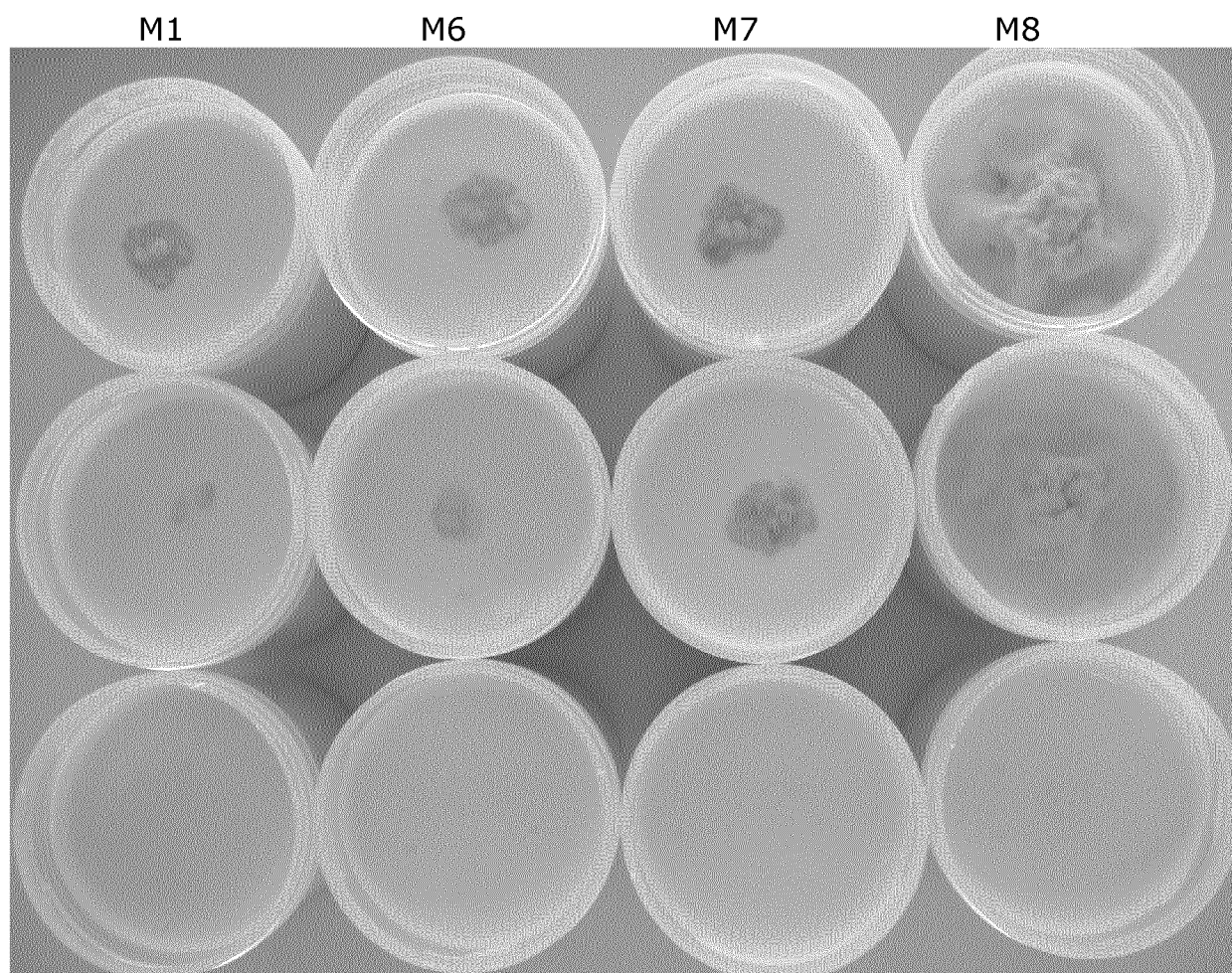
14. Пищевой продукт, который можно получать способом по любому из пп. 9-13.

15. Применение штамма *Lactobacillus paracasei* по п.1 или противогрибковой композиции по любому из пп. 2-4 для получения пищевого, кормового или фармацевтического продукта.

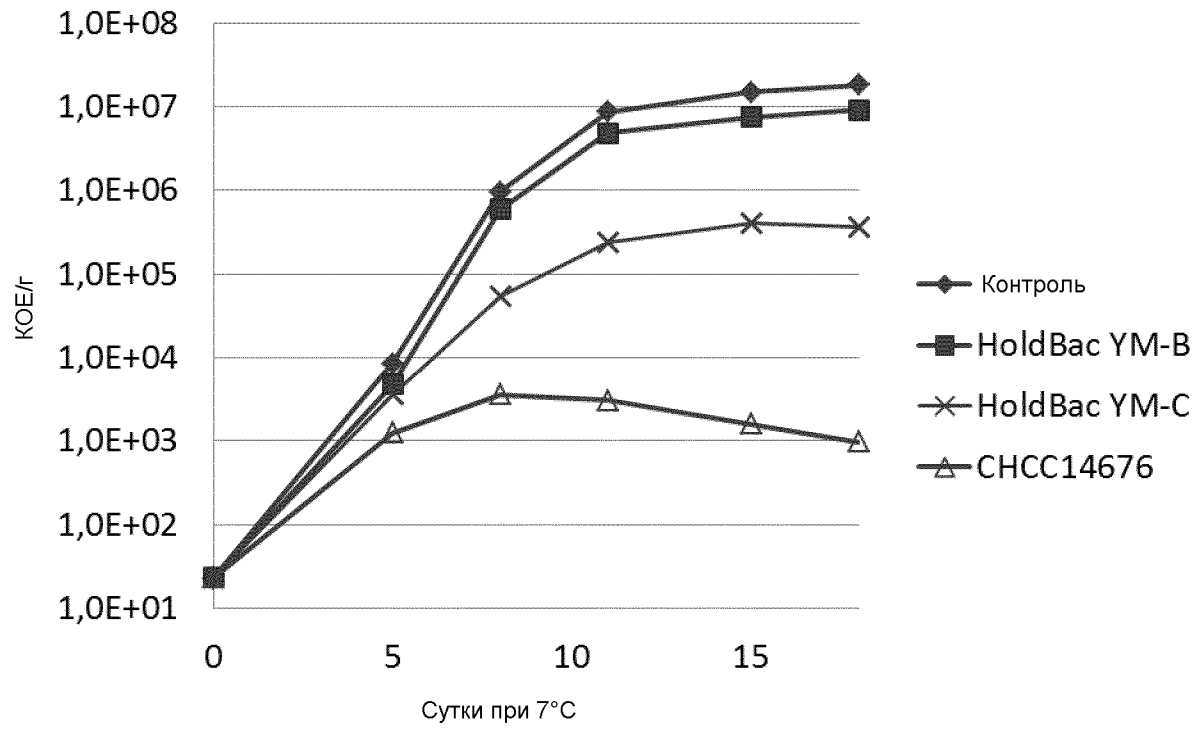
16. Применение штамма *Lactobacillus paracasei* по п.1 или

противогрибковой композиции по любому из пп. 2-4 для подавления роста дрожжей и плесени.

По доверенности

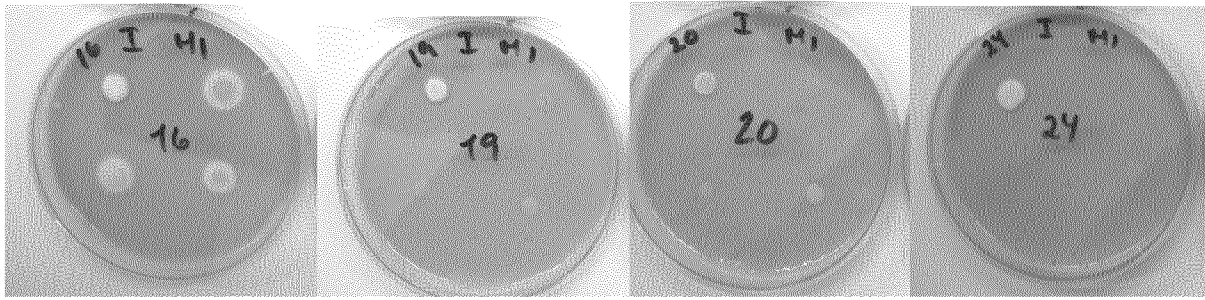


Фиг. 1

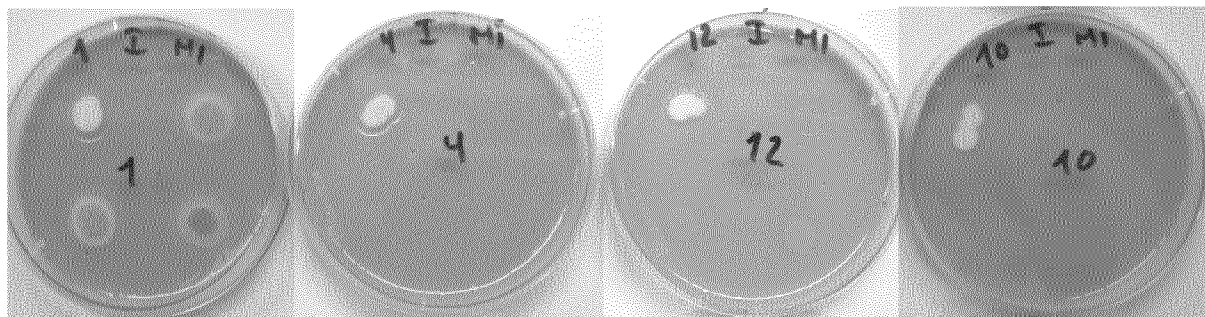


Фиг.2

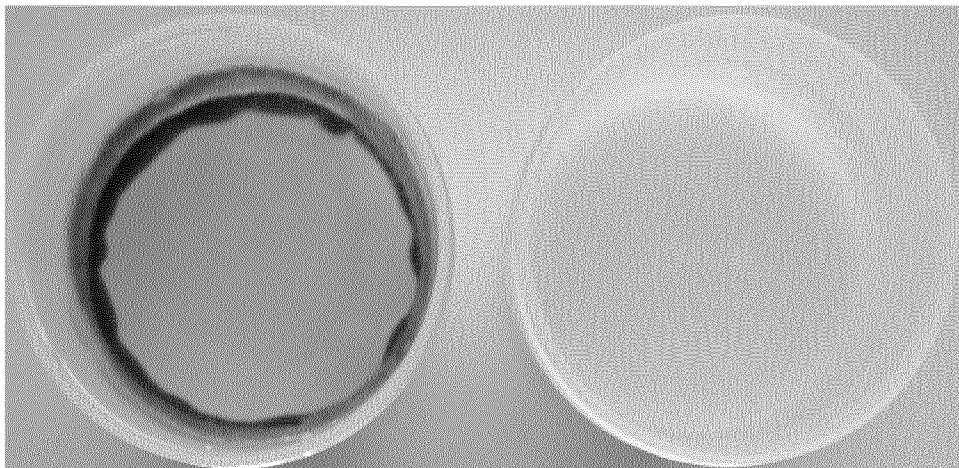




Фиг.3



Фиг.4



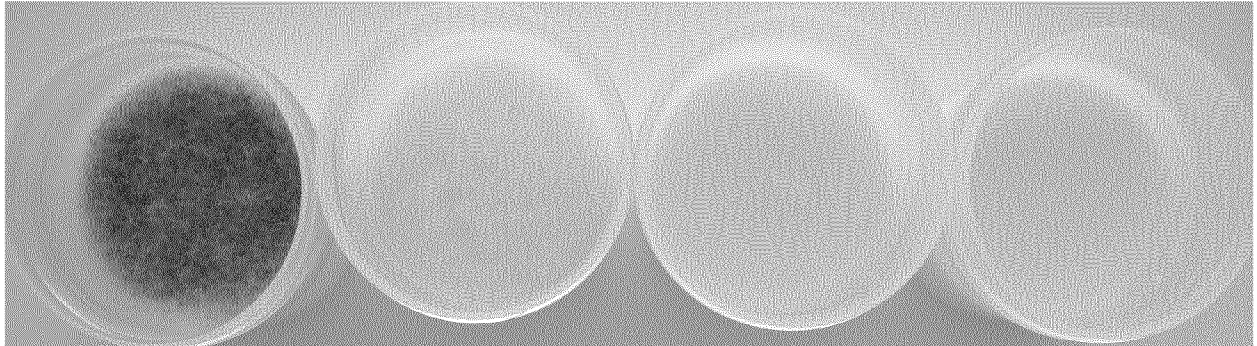
Фиг.5

R

YM-B

5366

5366+14676



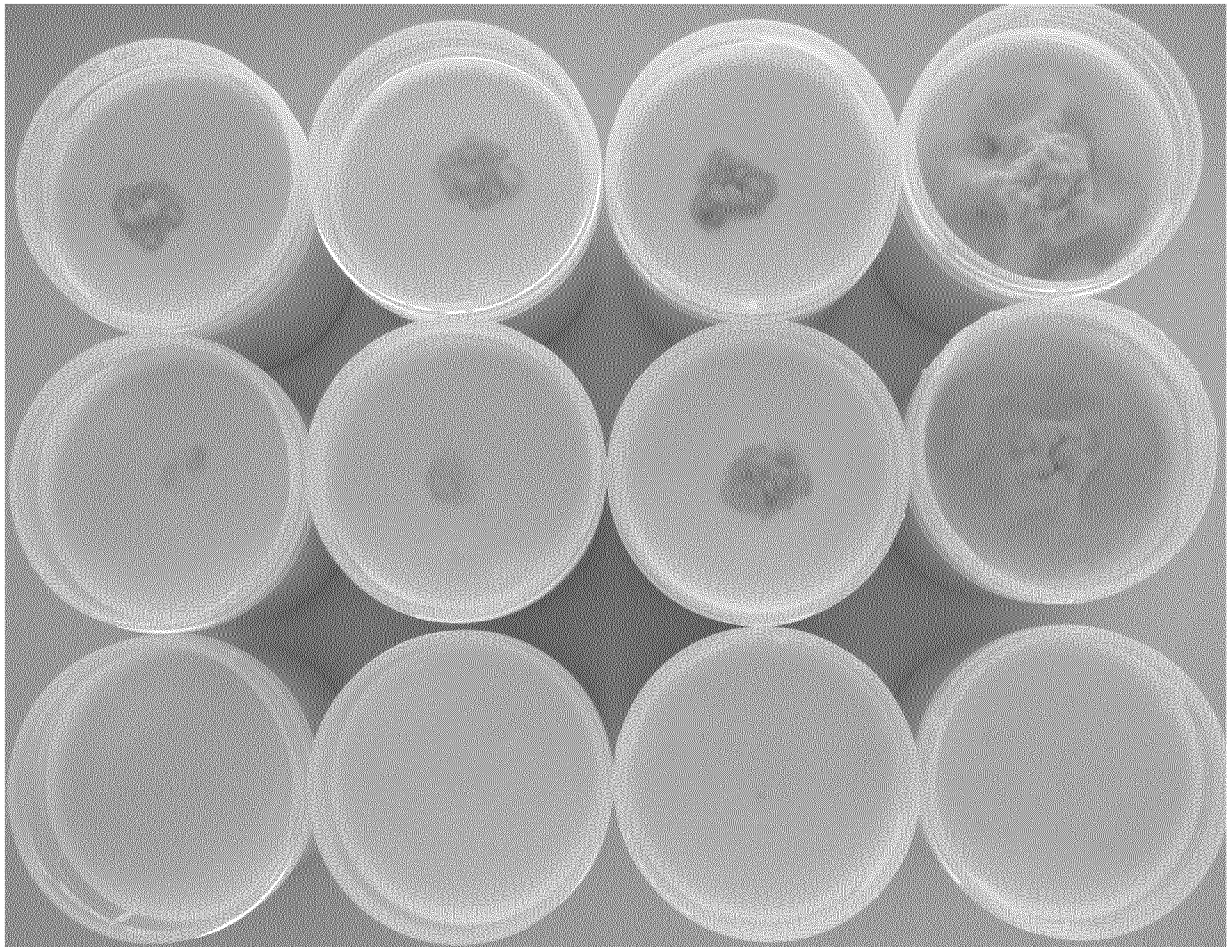
Фиг.6

M1

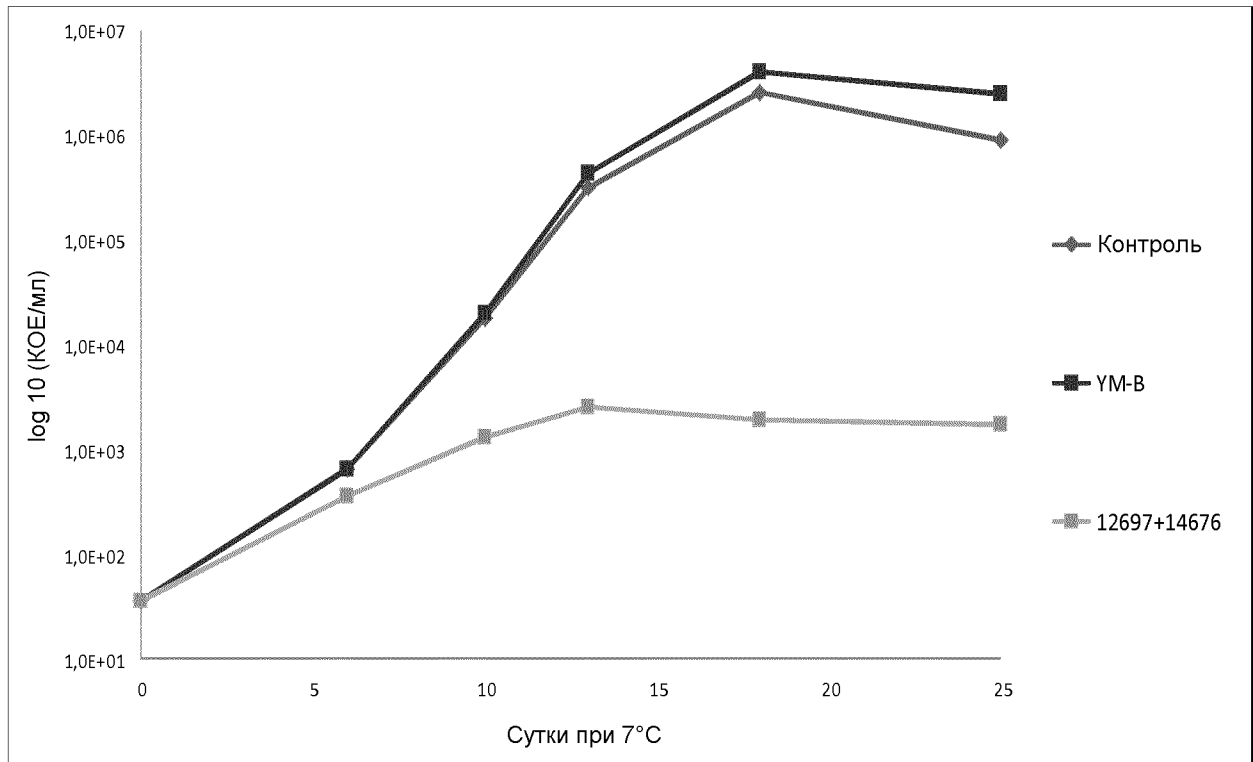
M6

M7

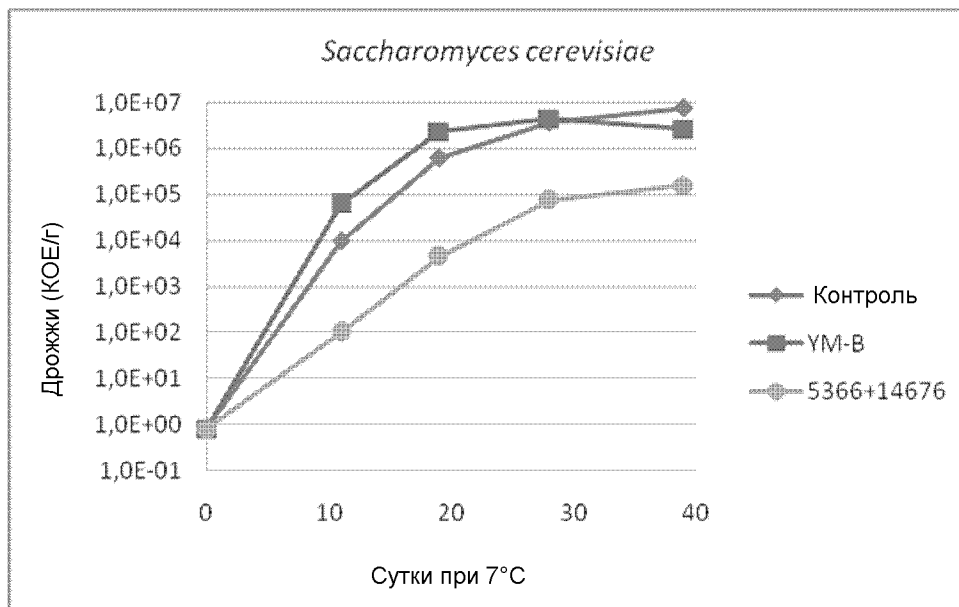
M8



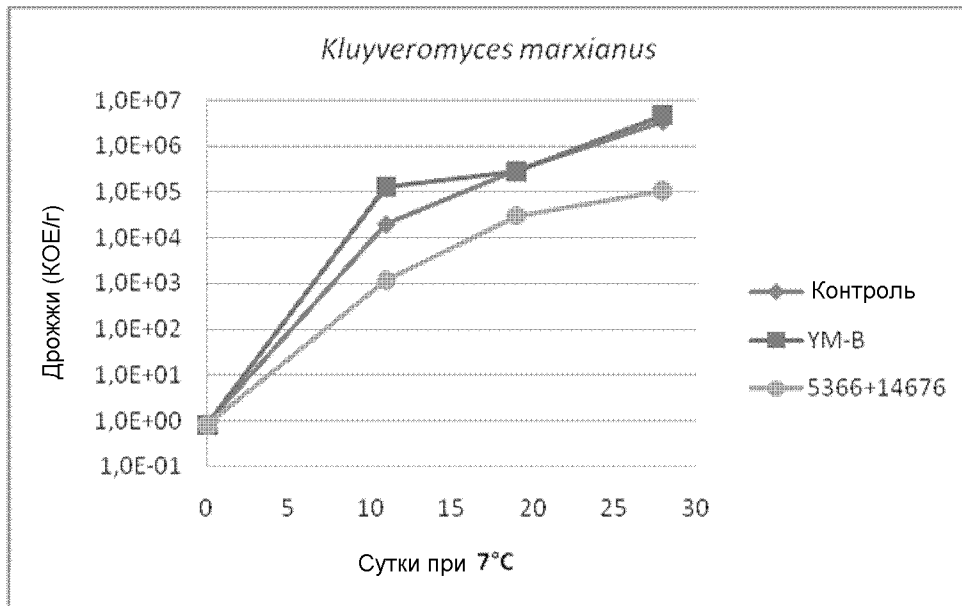
Фиг.7



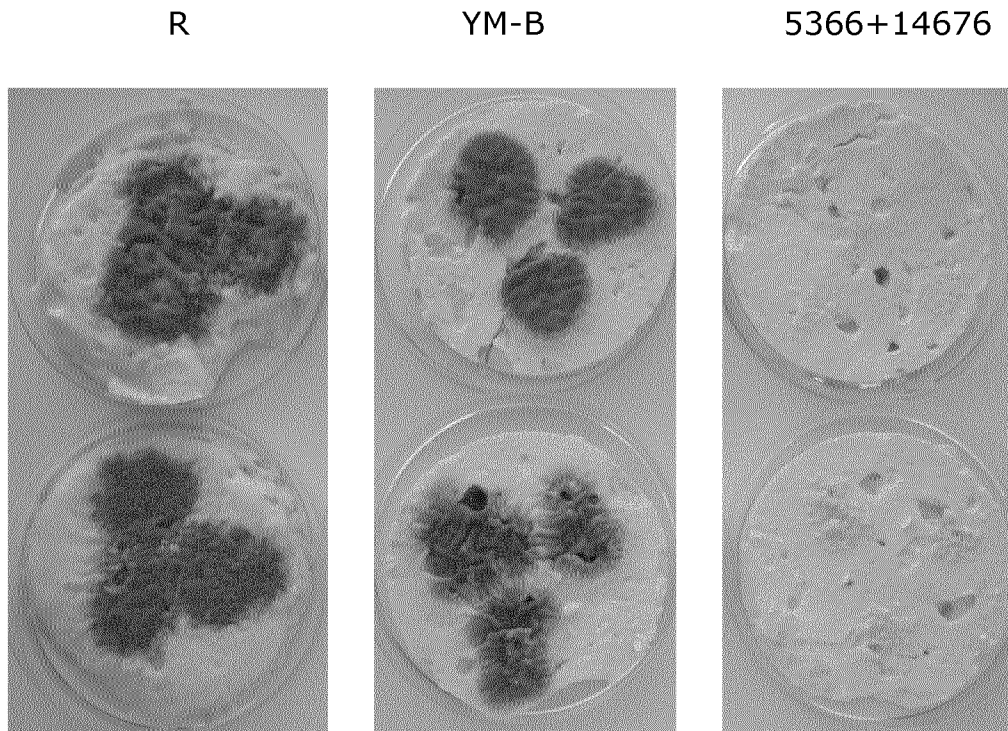
Фиг.8



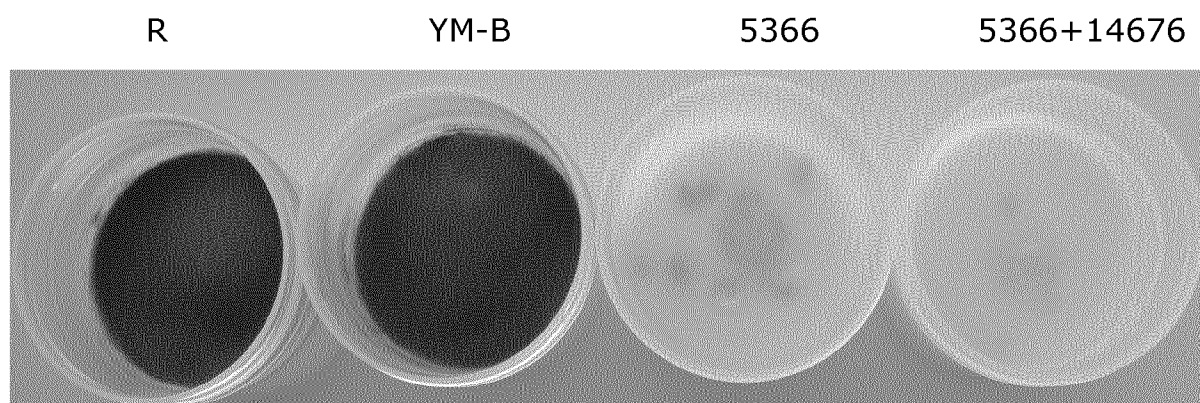
Фиг.9



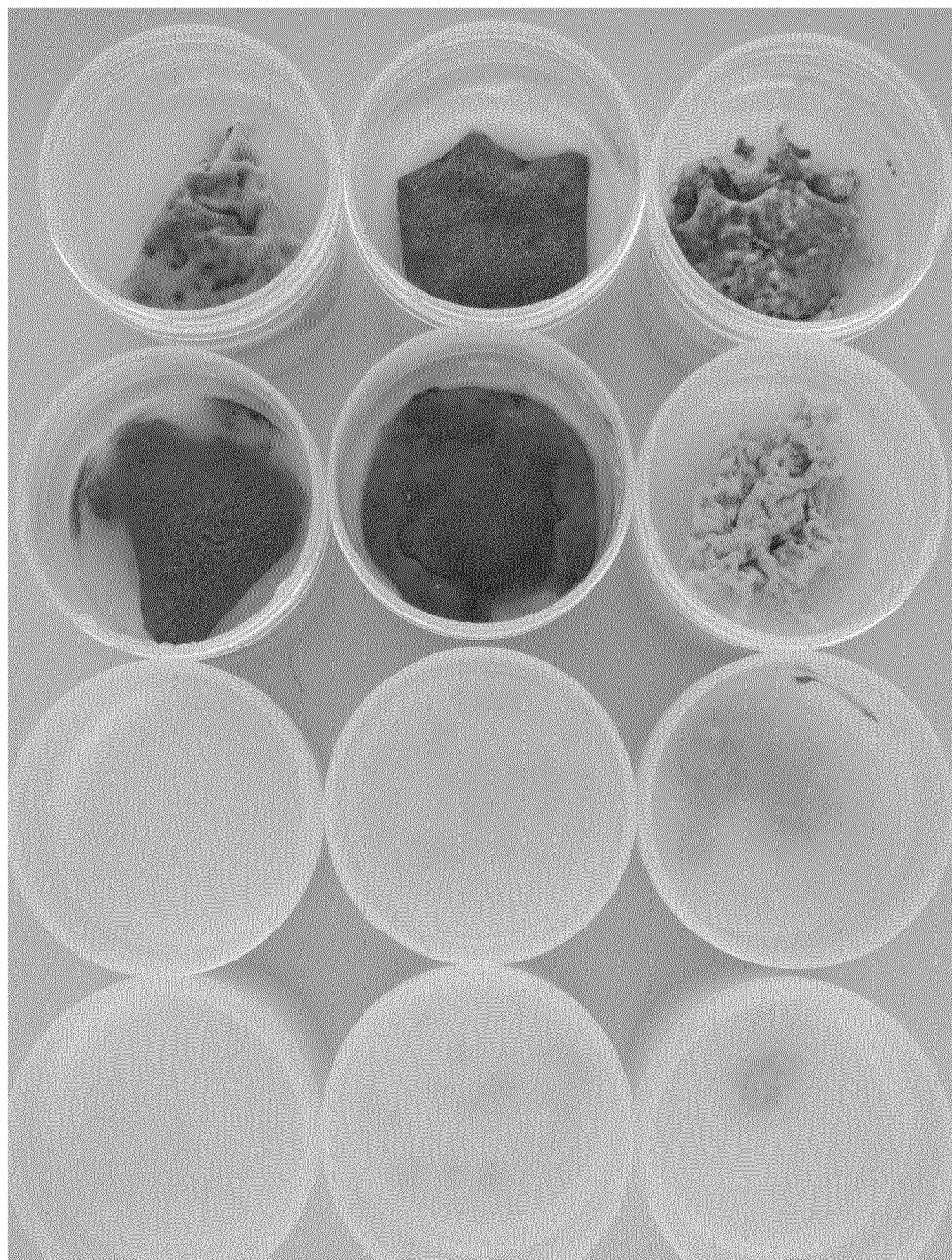
Фиг.10



Фиг.11



Фиг.12



Фиг.13