

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090443** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.08

(51) Int. Cl. *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
A23B 4/22 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.08.29

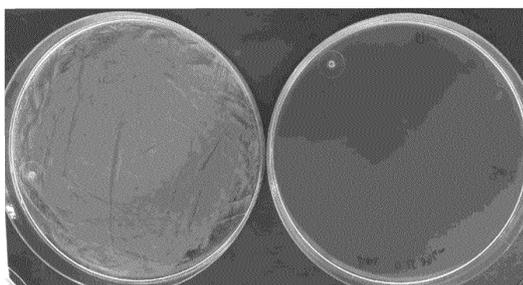
(54) НОВЫЕ ШТАММЫ LACTOBACILLUS CURVATUS, ПОЛЕЗНЫЕ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ LISTERIA

(31) **17188899.3**
(32) **2017.08.31**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2018/073227**
(87) **WO 2019/043055 2019.03.07**
(71) Заявитель:
КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:
**Стрэман Пер (DK), Эльмсхойзер
Кристиан (DE), Соэренсен Ким Иб
(DK), Зайберт Тим Мартин (DE),
Невес Руте (DK)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**

(57) Штамм *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM 18775, применяют в качестве биоконсервирующей культуры в широком диапазоне мясных продуктов благодаря продуцированию им бактериоцина. Настоящее изобретение относится к штаммам *Lactobacillus curvatus*, имеющим продленную лаг-фазу, составляющую по меньшей мере 24 ч при 30°C, по сравнению с DSM 18775. В предпочтительном на данный момент воплощении штаммы представляют собой мутанты DSM 18775, такие как штамм *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM 32590, и штамм *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM 32591. Кроме того, изобретение относится к способу подавления *Listeria* в пищевом продукте, включающему добавление бактерий штамма *Lactobacillus curvatus* по изобретению к пищевому продукту в концентрации по меньшей мере 10⁵ КОЕ/г.



A1

202090443

202090443

A1

C12R 1/225 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

A23B 4/22 (2006.01)

НОВЫЕ ШТАММЫ *LACTOBACILLUS CURVATUS*, ПОЛЕЗНЫЕ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ *LISTERIA*

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штамм *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM 18775, применяют в качестве биоконсервирующей культуры в широком диапазоне мясных продуктов, благодаря продуцированию им бактериоцина.

Настоящее изобретение относится к штаммам *Lactobacillus curvatus*, имеющим продленную лаг-фазу, составляющую по меньшей мере 24 часа при 30°C, по сравнению с DSM 18775. В предпочтительном на данный момент воплощении штаммы представляют собой мутанты DSM 18775, такие как штамм *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM 32590 (TrG3), и штамм *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM 32591 (TrG57).

Кроме того, изобретение относится к способу подавления *Listeria* в пищевом продукте, включающему добавление бактерий штамма *Lactobacillus curvatus* по изобретению к пищевому продукту в концентрации по меньшей мере 10⁵ КОЕ/г (колониеобразующих частиц/г).

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Lactobacillus curvatus представляет собой, вероятно, наиболее распространенный вид молочнокислых бактерий, обнаруженный в ферментированных мясных продуктах, и известный своим возможным применением в сохранении пищи, благодаря продуцированию противомикробных компонентов или пептидов. Большая часть этих ингибирующих пептидов представляет собой тип бактериоцинов, которые относятся к классу II лантибиотиков, и некоторые из которых приводятся под названием курвацин (curvacin), а другие – под общим названием сакацин (sakasin) P или G, или сакацин X, T или R. Способ действия связан главным образом с изменением барьера проницаемости клеточной мембраны и, благодаря этому, распадом или разрушением системы силы транспорта ионов внутрь и вовне клетки вызывающих порчу бактерий. Бактериоцины действуют главным образом против других близкородственных грамположительных видов, но было показано, что клеточные экстракты, выделенные из некоторых штаммов

Lactobacillus curvatus, обладают противомикробным действием против грамотрицательных бактерий.

Штамм *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM 18775, продуцирует бактериоцин, который демонстрирует бактерицидный способ действия в отношении других грамположительных штаммов, что сделало этот штамм важным для защиты от вызывающих порчу бактерий в мясной промышленности.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В идеале, культура для защиты мяса должна демонстрировать ограниченный рост при температуре соответствующего применения и достаточное продуцирование бактериоцина для ограничения роста вызывающих порчу бактерий, таких как *Listeria* spp. Кроме того, культура не должна производить посторонний привкус или демонстрировать высокий уровень подкисления при распространении на (приготовленных) мясных продуктах.

Настоящее изобретение относится к штаммам *Lactobacillus curvatus*, которые имеют продленную лаг-фазу при 30°C, составляющую по меньшей мере 24 часа, по сравнению с DSM 18775.

На данный момент предпочтительные штаммы по изобретению представляют собой мутанты штамма *Lactobacillus curvatus* DSM 18775. Создание двух мутантов подробно описывается в примерах. После восьми недель переноса клеток через сутки и всего четырех УФ-обработок скрининг приблизительно 4000 изолятов приводил в результате к медленно растущему мутанту TrG3 с продленной лаг-фазой, составляющей 24 часа, по сравнению с материнским штаммом при инкубировании при 30°C (Фиг. 1). Продуцирование противомикробного агента бактериоцина для мутанта TrG3 показано в Таблице 1.

Дополнительный цикл адаптивной лабораторной эволюции (ALE) с мутантом TrG3 выполняли в течение периода 2 недель при 15°C с клеточным переносом через сутки, включая одну УФ-обработку. Это привело к выделению дополнительного изолята TrG57 с существенно продленной лаг-фазой, составляющей более чем 48 часов, по сравнению с диком типом *Lactobacillus curvatus* DSM 18775. Продуцирование бактериоцина проверяли посредством анализов на планшетах с *Micrococcus luteus* DSM 1790 и, было показано, что оно сравнимо с продуцированием противомикробного бактериоцина TrG3.

Неожиданно было обнаружено, что эти два мутанта не растут во время лаг-фазы, но, тем не менее, они были метаболически активными и даже имели

противолистериальный эффект, который был примерно в 64 раза более высоким по сравнению с материнским штаммом при выращивании в одинаковых условиях при 20°C.

Исследования применимости продемонстрировали, что оба мутанта были способны подавлять рост *Listeria* в такой же степени, как DSM 18775, и что образцы ветчины, засеянные количеством клеток 1,0E+05 КОЕ/г TrG3 и TrG57, были значительно лучше с точки зрения запаха и вкуса (нет кислого привкуса), чем образцы ветчины, засеянные количеством клеток 1,0E+07 КОЕ/г TrG3 и TrG57, и образцы, засеянные DSM 18775 (Таблица 2). Мутантные штаммы TrG3 и TrG57 имели более медленное снижение pH и более высокое значение pH в конце срока хранения (Фиг. 2).

Таким образом, штамм *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM 32590 (TrG3), и штамм *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM32591 (TrG57), могут быть еще более полезными для биоконсервации пищевых продуктов, чем штамм DSM 18775, из которого они были получены.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Известно, что бактериальная контаминация пищевых продуктов является ответственной за передачу расстройств пищевого происхождения. Эта проблема является особенно важной для мясных и молочных продуктов, которые не подогреваются повторно потребителями перед приемом пищи и которые хранятся в течение продолжительных периодов времени в холодильниках при 2-10°C. Этот период хранения часто называют "сроком хранения". При использовании в настоящем описании термин "срок хранения" обозначает период времени, в течение которого пищевой продукт остается годным к продаже розничным покупателям. При традиционной переработке мяса срок хранения мяса и мясных субпродуктов равен приблизительно от 30 до 40 суток после того как животное было забито. Ожидается, что охлаждение мяса в течение этого периода времени в значительной степени угнетает и/или задерживает рост патогенных бактерий и в меньшей степени - вызывающих порчу бактерий. Однако примерно через от 30 до 40 суток охлаждение больше не способно эффективно контролировать размножение вызывающих порчу бактерий ниже приемлемых уровней.

Штаммы по настоящему изобретению являются особенно полезными для хранения, ферментирования, созревания или выдерживания пищевого продукта, которые имеют место при температуре от 2°C до 45°C, например, при температуре от 10°C до 30°C, такой как при температуре от 10°C до 25°C. Хранение, ферментирование, созревание или выдерживание пищевого продукта может продолжаться в течение от 8 часов до нескольких суток/недель.

Штамм(ы) молочнокислых бактерий, добавленный(е) к пищевому продукту для подавления патогенов, а также вызывающих порчу бактерий, и/или продлевающий(е) срок хранения без изменения органолептических свойств продукта, называют “биозащитной(ыми) культурой(ами)”. Защитные культуры не предназначены изменять органолептические свойства продукта. Их применение или применение их метаболитических продуктов (органических кислот, перекиси водорода, ферментов и бактериоцинов) часто называют “биозащитой”. В контексте настоящего изобретения термин “биозащитная культура” и композиция по изобретению используются взаимозаменяемо, если в контексте не указано иное.

Важным аспектом в оценке применения штамма в качестве биозащитной культуры является способность штамма работать в пищевом продукте, для которого он предназначен. В этом отношении является важным не только то, что штамм способен подавлять любые нежелательные пищевые патогенные или вызывающие порчу бактерии в продукте в соответствующих условиях хранения, но также то, что он не вызывает какие-либо нежелательные органолептические эффекты (посторонний привкус, посторонний запах или нежелательные изменения цвета).

Изготовление ферментированного пищевого продукта часто регулируется и осуществляется посредством стартовой культуры. Стартовая культура является ответственной за развитие неограничивающей группы качественных параметров, таких как подкисление, уменьшение связывания воды и водной активности, общий внешний вид, цвет, консистенция, запах, аромат, вкус, вкусовой и ароматический букет и другие органолептические и технологические параметры. Таким образом, должно быть обеспечено минимальное влияние или, предпочтительно, отсутствие влияния на качественные параметры от биозащитной культуры.

Стартовые культуры для ферментации мяса обычно состоят из одной или более молочнокислых бактерий. Обычно стартовая культура размножается во время процесса ферментации. Во время процесса ферментации молочнокислые бактерии главным образом продуцируют молочную кислоту, вследствие чего рН снижается до желательного значения рН в зависимости от культуры и условий переработки (температуры, типа/содержания сахара и так далее) и, что важно, органолептические свойства продукта отчетливо изменяются до желаемого профиля аромата и вкуса, характерного для продукта.

С целью снижения концентрации вызывающих порчу и патогенных бактерий, желательно, чтобы это снижение могло быть обеспечено без значительного изменения

качества конечного пищевого продукта, то есть производитель продуктов питания может использовать биозащитную культуру в своей предлагаемой или предпочтительной рецептуре без изменения иным образом рецептуры или условий переработки. Для получения желательного эффекта культура продуцирующего бактериоцин вида может быть применена к пищевому веществу в качестве биозащитной культуры, которая отделяется от стартовой культуры. В контексте настоящего изобретения "биозащитная культура" представляет собой культуру, которую добавляют к пищевому веществу или объединяют со стартовой культурой, но которая не образует часть стартовой культуры, то есть биозащитная культура представляет собой дополнительную культуру, не пытающуюся "производить" ферментированный пищевой продукт, но обеспечивающую дополнительное технологическое преимущество; в этом случае уничтожение, инактивирование или подавление действует по отношению к патогенным или вызывающим порчу бактериям. В данном контексте термины "биозащитная культура" и "бактериоцин-продуцирующие виды" используются взаимозаменяемо, если в контексте не указано иное.

В настоящем изобретении предлагается способ подавления количества патогенных и вызывающих порчу бактерий в пищевом продукте. В контексте настоящего изобретения термин "подавление количества" относится к подавлению количества патогенных и/или вызывающих порчу бактерий. Подавление может быть обеспечено уничтожением, инактивированием или подавлением роста вызывающих порчу или патогенных бактерий. В одном воплощении настоящего изобретения 100% патогенных и/или вызывающих порчу бактерий уничтожают, инактивируют или подавляют, например, по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 75%, например по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 30%, например по меньшей мере 25%, например по меньшей мере 20%, например по меньшей мере 10%, например по меньшей мере 5%, например по меньшей мере 1%. В предпочтительном воплощении уже присутствующие бактерии уничтожают или их количество снижают до количества, которое ниже предела качественного выявления.

Термин "вызывающие порчу бактерии" при использовании в настоящем описании относится к любому типу бактерий, которые портят пищу. Вызывающие порчу бактерии могут расти и размножаются до такой степени, что делают пищевой продукт непригодным или нежелательным для потребления человеком или животным. Бактерии способны размножаться на поверхностях продуктов питания, таких как поверхности мясных продуктов, усваивая сахара и белки на таких поверхностях. В результате

метаболизирования этих компонентов вызывающие порчу бактерии образуют побочные продукты, включающие углекислый газ, метан, азотистые соединения, масляную кислоту, пропионовую кислоту, молочную кислоту, муравьиную кислоту, соединения серы и другие нежелательные газы и кислоты. Образование таких побочных продуктов изменяет цвет поверхностей мясных продуктов, часто превращая цвет мясного продукта с красного на коричневый, серый или зеленый цвет. Газообразные побочные продукты, образованные вызывающими порчу бактериями, также придают испорченному мясному продукту нежелательный запах. Изменения цвета и запаха мяса из-за роста вызывающих порчу бактерий на поверхности мясного продукта часто делают такой пищевой продукт не пригодным для продажи потребителям.

Кроме контроля вызывающих порчу бактерий другой серьезной проблемой в пищевой промышленности является контролирование роста пищевых патогенных бактерий. При использовании в настоящем описании термин "пищевые патогенные бактерии" относится к любым отравляющим пищу бактериям, которые способны вызывать заболевание или расстройство у животных или людей. Понятно, что термин "пищевые патогенные бактерии" включает бактерии, которые инфицируют пищевой продукт (например, мясо) и тем самым вызывают заболевание или расстройство, а также бактерии, которые продуцируют токсины, которые вызывают заболевание или расстройство. Пищевые патогенные бактерии, подлежащие подавлению, могут представлять собой одну или более из бактерий *Aeromonas caviae*; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas sobria*; *Bacillus cereus*; *Campylobacter jejuni*; *Citrobacter* ssp.; *Clostridium botulinum*; *Clostridium perfringens*; *Enterobacter* ssp.; *Enterococcus* ssp.; энтероинвазивные штаммы *Escherichia coli*; энтеропатогенные штаммы *Escherichia coli*; энтеротоксигенные штаммы *Escherichia coli*; *Escherichia coli* O157:H7; *Klebsiella* ssp.; *Listeria monocytogenes*; *Plesiomonas shigelloides*; *Salmonella* ssp.; *Shigella* ssp.; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus* ssp.; *Vibrio cholerae*; *Yersinia enterocolitica*. Более предпочтительно, патогенные бактерии представляют собой *Listeria monocytogenes*.

В настоящем изобретении предлагается способ подавления количества вызывающих порчу или патогенных бактерий в пищевом продукте, включающий добавление бактерий штамма *Lactobacillus curvatus* по изобретению или композиции, содержащей штамм *Lactobacillus curvatus* по изобретению, к пищевому продукту в концентрации по меньшей мере 10^5 КОЕ/г.

Бактериальный "штамм", при использовании в настоящем описании, относится к бактерии, которая сохраняется генетически неизменной при выращивании или

размножении.

В контексте настоящего изобретения термин “штамм, имеющий продленную лаг-фазу, составляющую по меньшей мере 24 часа при 30°C, по сравнению с DSM 18775,” означает, что когда штамм выращивают в одинаковых условиях с DSM 18775, наблюдается отсутствие видимого роста для штамма, имеющего продленную лаг-фазу, через 24 часа в условиях, когда наблюдается хороший рост для DSM 18775. Это может быть испытано на чашках с агаром для культивирования лактобактерий по Ману, Рогозе и Шарпу (агар MRS), как описано в Примере 1 и иллюстрируется на Фиг. 1. В некоторых воплощениях настоящего изобретения продленная лаг-фаза является даже более длительной, такой как по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 72 часа или по меньшей мере 96 часов.

В данном контексте термин “мутант” относится к бактериальному штамму, полученному из депонированного штамма с помощью, например, геной инженерии, облучения и/или химической обработки, который представляет собой функционально эквивалентный мутант, то есть мутант, который имеет по существу такие же или улучшенные свойства, относительно влияния на концентрацию уратов в крови субъекта, как и материнский штамм. Термин “мутант” относится к штамму, полученному путем подвергания штамма *Lactobacillus curvatus*, депонированного как DSM 32590, или его мутантного штамма, депонированного как DSM 32591, общепринятой обработке для мутагенизации, включая обработку химическим мутагеном, таким как этилметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ-излучением с последующей стадией скрининга/селекции, а также к спонтанно возникшему мутанту. У предпочтительного на данный момент функционально эквивалентного мутанта менее 5%, или менее 1% или даже менее 0,1% нуклеотидов в бактериальном геноме было заменено другим нуклеотидом или делетировано по сравнению со штаммом, депонированным как *Lactobacillus curvatus* DSM 18775.

Штаммы *Lactobacillus curvatus* по настоящему изобретению могут быть полезными для биозащиты ферментированных, а также неферментированных пищевых продуктов.

Примеры ферментированных пищевых продуктов включают, но без ограничения, молочные продукты, такие как различные сырны продукты, ферментированные мясные продукты, такие как колбасы, например пастообразные и вяленые колбасы и ветчина, ферментированную рыбу и ферментированные овощи.

Термин "пищевой продукт" при использовании в настоящем описании относится к любому пищевому продукту, который подвержен бактериальному росту и размножению

патогенных или вызывающих порчу бактерий. Такие пищевые продукты включают, но без ограничения, мясо, молочные продукты, овощи, фрукты, готовые к употреблению продукты и крупы.

При использовании здесь термин "мясо" относится к любому мясному продукту или мясному субпродукту (включая подвергаемые обработке) из животного, которое употребляется в пищу людьми или животными, включая, без ограничения, мясо крупного рогатого скота, овец, свиней, домашней птицы, рыбу и ракообразные морепродукты. Примеры ферментированных мясных продуктов представляют собой колбасы, например, пастообразные и вяленые колбасы, ветчину и ферментированную рыбу.

Термин "молочный продукт" предназначен для включения любого пищевого продукта, изготовленного с использованием молока, или продуктов из молока, включая, но без ограничения, молоко, йогурт, мороженое, сыр, масло и сливки.

Примеры "фруктов" представляют собой виноград, такой как столовый сорт винограда.

Примеры готовых к употреблению продуктов (ГКУ) представляют собой ГКУ салаты, например свежие салаты из зелени, салат из рукколы, морковные палочки, кукурузу, сухие приправы для салатов, куриные палочки, морепродукты, салаты из овощей, салаты с макаронами и так далее, а также кускус, рис, хумус и так далее.

В настоящем изобретении также предлагается композиция, содержащая бактерии штамма *Lactobacillus curvatus* по изобретению. Предпочтительно, штамм *Lactobacillus curvatus* присутствует в концентрации по меньшей мере 10^5 КОЕ/г.

В культуре, используемой в Примере 4 настоящей заявки на патент, присутствует только один продуцирующий бактериоцин штамм. В некоторых воплощениях композиция содержит бактерии штамма *Lactobacillus curvatus* в качестве единственных бактерий, присутствующих в композиции.

Однако следует иметь в виду, что для некоторых применений будет полезным более чем один продуцирующий бактериоцин штамм.

Примеры бактерий, продуцирующих бактериоцины класса IIa, представляют собой *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium piscicola*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc gelidium*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*.

В объем настоящего изобретения входит композиция, содержащая по меньшей мере два штамма, продуцирующих бактериоцины класса IIa. Если применяется более чем

один штамм, то штаммы предпочтительно продуцируют разные бактериоцин(ы) класса Па и/или действуют на разные мишени

Композиции по изобретению могут содержать бактерии штамма *Lactobacillus curvatus* и бактерии одного или более видов *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc carnosum*, *Staphylococcus carnosus*.

Предпочтительные дополнительные продуцирующие бактериоцин штаммы представляют собой штамм *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM 18775, штамм *Pediococcus acidilactici*, депонированный как DSM 28307, *Lactobacillus sakei*, депонированный как DSM 14022, штамм *Lactococcus lactis*, депонированный как DSM 11037, и *Leuconostoc carnosum* LC1043, имеющиеся в продаже от Датского института исследования мяса (Danish Meat Research Institute).

В предпочтительных воплощениях настоящего изобретения композиция содержит штамм *Lactobacillus curvatus* по изобретению и штамм *Pediococcus acidilactici*, депонированный как DSM 28307, штамм *Lactobacillus curvatus* по изобретению и *Lactobacillus sakei*, депонированный как DSM 14022, штамм *Lactobacillus curvatus* по изобретению и штамм *Lactococcus lactis*, депонированный как DSM 11037, или штамм *Lactobacillus curvatus* по изобретению и *Leuconostoc carnosum* LC1043.

В еще одном воплощении композиция может содержать по меньшей мере три продуцирующих бактериоцин класса Па штамма. Предпочтительно, они представляют собой штамм *Lactobacillus curvatus* по изобретению, штамм *Pediococcus acidilactici*, депонированный как DSM 28307, и *Leuconostoc carnosum* LC1043.

В еще одном воплощении культура содержит четыре или более продуцирующих бактериоцин класса Па штаммов. Предпочтительно один из них представляет собой штамм *Lactobacillus curvatus* по изобретению, штамм *Pediococcus acidilactici*, депонированный как DSM 28307, или тот и другой.

Как объясняется выше, общеизвестно использование молочнокислых бактерий для индуцирования ферментации пищевых продуктов, обычно сырых засоленных мясных продуктов, для получения требуемого изменения характеристик пищевой матрицы во время ферментации (например, требуемого подкисления и некоторых других органолептических и технологических параметров). Во время процесса ферментации молочнокислые бактерии сначала продуцируют молочную кислоту, вследствие чего pH понижается до целевого значения pH, зависящего от штамма(ов) и условий переработки (температуры, типа/содержания сахара и так далее), и, что важно, органолептические свойства продукта отчетливо изменяются.

При использовании в описании настоящего изобретения термин “ферментация” относится к процессу биохимических изменений, например подкисления, в животном и/или растительном сырье (то есть в пищевой матрице), в котором используется активность живых микробных клеток в аэробных и/или анаэробных условиях с получением пищевого продукта требуемого качества.

Термин “выдерживание” относится к созреванию, сушке, формированию вкусового букета, ферментной активности, подобной липолизу или протеолизу, приводящей к комплексному формированию вкусового букета, в особенности для дольше созревающих продуктов, таких как салями.

При необходимости в дополнение к по меньшей мере одному продуцирующему бактериоцин штамму, композиция может содержать по меньшей мере один штамм ферментации, который содействует по меньшей мере одному продуцирующему бактериоцин штамму в улучшении качественных параметров, таких как подкисление, уменьшение связывания воды и водной активности, общий внешний вид, цвет, консистенция, запах, аромат, вкус, вкусовой и ароматический букет и другие органолептические и технологические параметры. Примеры таких штаммов ферментации представляют собой *Staphylococcus carnosus* и *Staphylococcus xylosus*. Ожидается, что для мясных продуктов с быстрым выдерживанием только один продуцирующий(е) бактериоцин штамм(ы) будет(ут) достаточен(ными) для получения соответствующего ферментированного мясного продукта, а также продуцирующие бактериоцин штаммы вносят свой вклад во вкус. Однако при необходимости по меньшей мере один штамм *Staphylococcus* или *Micrococccaceae* может быть добавлен по соображениям вкуса и окрашивания.

В предпочтительных воплощениях настоящего изобретения композиция содержит штамм по изобретению *Lactobacillus curvatus*, штамм *Pediococcus acidilactici*, депонированный как DSM 28307, и *Staphylococcus carnosus*, штамм по изобретению *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, депонированный как DSM 14022, и *Staphylococcus carnosus*, штамм по изобретению *Lactobacillus curvatus*, штамм *Lactococcus lactis*, депонированный как DSM 11037, *Staphylococcus carnosus*, или штамм по изобретению *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc carnosum* LC1043 и *Staphylococcus carnosus*.

При использовании в настоящем описании выражение “эффективное количество” относится к количеству бактерий *Lactobacillus curvatus* по изобретению, которое вызывает подавление бактериального роста или уменьшение числа других бактерий в пищевом

продукте.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения штамм или штаммы биозащитной композиции добавляют в концентрации в диапазоне 10^2 - 10^{10} КОЕ/г продукта, например в диапазоне от 10^2 - 10^9 КОЕ/г продукта, таком как диапазон 10^3 - 10^9 КОЕ/г продукта, например в диапазоне 10^4 - 10^9 КОЕ/г продукта, таком как диапазон 10^2 - 10^8 КОЕ/г продукта, например в диапазоне 10^2 - 10^7 КОЕ/г продукта, таком как диапазон 10^3 - 10^7 КОЕ/г продукта, например в диапазоне 10^4 - 10^7 КОЕ/г продукта, таком как диапазон 10^5 - 10^7 КОЕ/г продукта, например в диапазоне 10^6 - 10^7 КОЕ/г продукта, таком как диапазон 10^3 - 10^6 КОЕ/г продукта, например в диапазоне 10^3 - 10^5 КОЕ/г продукта, таком как диапазон 10^2 - 10^4 КОЕ/г продукта для каждого из штаммов в случае более чем одного штамма. В предпочтительном воплощении настоящего изобретения штамм *Lactobacillus curvatus* по изобретению добавляют в концентрации 10^5 КОЕ/г продукта.

В настоящем изобретении предлагается композиция по настоящему изобретению, содержащая бактерии штаммов *Lactobacillus curvatus* по изобретению, такие как *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM 32590, или его мутантный штамм, такой как штамм, депонированный как DSM 32591, в сухой, замороженной или лиофилизированной форме.

В одном предпочтительном воплощении настоящего изобретения предлагается композиция по настоящему изобретению, содержащая бактерии *Lactobacillus curvatus*, депонированного как DSM 32590, и *Lactobacillus curvatus*, депонированного как DSM 32591, которые могут быть представлены в сухой, замороженной или лиофилизированной форме.

Если бактерии лиофилизируют, их обычно смешивают с криопротектантом перед их лиофилизацией, чтобы получить высокую жизнеспособность. Термин “криопротектант” используют в контексте настоящего изобретения для обозначения вещества, которое способно улучшать выживаемость во время замораживания и/или сушки и улучшать стабильность бактерий при хранении. Криопротектант, используемый здесь, предпочтительно содержит сахарид.

Сахарид может представлять собой моно-, ди-, олиго- или полисахарид или смесь по меньшей мере двух сахаридов. Полезные моносахариды включают глюкозу (также известную как декстрозу), фруктозу, рибозу и галактозу, и полезные дисахариды включают в числе других сахарозу, трегалозу, мальтозу и лактозу. Композиция может содержать один или более моно- или дисахаридов, например один, два, или три, или даже более различных сахаридов.

В качестве примера криопротектант может содержать смесь дисахарида, такого как сахароза, и полисахарида, такого как мальтодекстрин.

Криопротектант может дополнительно содержать пептид, белок, гидролизат белка или их смесь. Примеры используемых пептидов и белков представляют собой казеин, горох, молочную сыворотку, альбумин, соевый белок, глутаминовую кислоту или желатин и любой их изолят или гидролизат. Также могут присутствовать другие добавки, например антиоксиданты, такие как аскорбат, цитрат натрия, пропилгаллат.

Использование единственного числа в контексте описания изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) следует истолковывать как включающие и единственное число и множественное число, если иное не указано в настоящем документе или не противоречит явно контексту. Термины "содержащий", "имеющий" и "имеющий в своем составе" истолковывают как неограничивающие термины (то есть означающие "включающий, но без ограничения,"), если не указано иное. Перечисление диапазонов значений в настоящем документе служит только в качестве способа сокращения обращения индивидуально к каждому отдельному значению, попадающему в диапазон, если иное не указано в настоящем документе, и каждое отдельное значение включается в описание изобретения, как если бы оно было раскрыто индивидуально в настоящем описании. Использование любого и всех примеров или относящихся к примерам слов, раскрытых в настоящем описании, предназначено только для лучшего освещения изобретения и не является ограничением объема изобретения, если не заявлено иное. Ни одно слово в описании изобретения не следует истолковывать как указывающее, что какой-либо незаявленный элемент является существенно важным для практической реализации изобретения.

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ В ГРАФИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛАХ

Фиг. 1

Результат роста TrG3

Правая чашка, TrG3 после 24 часов инкубации при 30°C; левая чашка, DSM 18775, инкубированный в таких же условиях. Посев выполняли эквивалентным количеством клеток (200 мкл: 0,25 OD₆₀₀; диаметр чашки Петри 14 см).

Фиг. 2

Изменение pH образцов приготовленной ветчины (n=3) во время хранения при +7°C.

Ось Y показывает pH. Снижение pH на 0,3 единицы обычно считается органолептически приемлемым.

Фиг. 3

Общее количество клеток образцов приготовленной ветчины (n=3) во время хранения при +7°C.

Ось Y показывает общее количество клеток в КОЕ/г. Предел обнаружения равен 1,0E+02 КОЕ/г.

Фиг. 4

Количество клеток молочнокислых бактерий в образцах приготовленной ветчины (n=3) во время хранения при +7°C.

Ось Y показывает количество клеток молочнокислых бактерий в КОЕ/г. Предел обнаружения равен 1,0E+02 КОЕ/г.

Фиг. 5

Количество клеток *Listeria spp.* в образцах приготовленной ветчины (n=3) во время хранения при +7°C.

Ось Y показывает количество клеток *Listeria spp.* в КОЕ/г. Предел обнаружения равен 1,0E+02 КОЕ/г.

ДЕПОНИРОВАНИЕ И ЭКСПЕРТНОЕ РЕШЕНИЕ

Штамм *Lactobacillus curvatus* TrG3 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур), Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) под номером доступа DSM 32590 с датой депонирования 16 августа 2017 г. Chr. Hansen A/S, Дания. Депонирование было осуществлено в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Штамм *Lactobacillus curvatus* TrG57 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) под номером доступа DSM 32591 с датой депонирования 16 августа 2017 г. Chr. Hansen A/S, Дания. Депонирование было осуществлено в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Штамм *Pediococcus acidilactici* HP был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) под номером доступа DSM 28307 с датой депонирования 30 января 2014 г. by Chr. Hansen A/S, Дания. Депонирование было осуществлено в соответствии с условиями

Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Штамм *Lactobacillus sakei* BJ-33 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) под номером доступа DSM 14022 с датой депонирования 31 января 2001 г. Chr. Hansen A/S, Дания. Депонирование было осуществлено в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Для идентифицированных выше депонированных микроорганизмов применяют следующие дополнительные указания:

Что касается соответствующих патентных ведомств соответствующих указанных государств, заявители ходатайствуют о том, чтобы образец депонированных микроорганизмов, приведенных выше, был доступен только эксперту, назначенному заявителем, вплоть до даты, когда патент будет выдан, или даты, когда заявка будет отозвана или признана отозванной.

Ссылка на штамм *Lactobacillus curvatus* DSM 18775 приведена в европейском патенте EP2132297.

Ссылка на штамм *Lactococcus lactis* DSM 11037 приведена в выданном европейском патенте EP928333.

Ссылка на штамм *Pediococcus acidilactici* DSM 10313 приведена в европейском патенте EP1716258.

Leuconostoc carnosum LC1043 доступен от Danish Meat Research Institute или имеется в продаже от Chr. Hansen A/S (Дания).

Штамм *Listeria innocua* Seeliger был депонирован как ATCC33090.

Штамм *Micrococcus luteus* был депонирован как DSM 1790.

Воплощения настоящего изобретения описаны ниже в виде неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

Материалы и способы:

Агар ALOA (Oxoid)

Lactobacilli MRS Broth™ (Difco)

Lactobacilli MRS Agar agar™ (Difco)

Агар с сердечно-мозговым экстрактом (ВНІ) (Oxoid CM375)

Среда ВНІ, Merck

Бульон с экстрактом сердца (BD) Васто™ Difco
Микротитрационные планшеты (МТР) NUNC, Denmark
Агар M17 (Oxoid)
Агар MRS (Oxoid)
Среда MRS (Merck)

ПРИМЕР 1

Индукция мутантов *Lactobacillus curvatus* DSM 18775, имеющих продленную лаг-фазу при 30°C

Адаптивная лабораторная эволюция (АЛЭ) DSM 18775

Для эксперимента АЛЭ клетки *Lactobacillus curvatus* выращивали в бульоне MRS (10 мл) и инкубировали в течение 2 x 24 часов при 15°C, при этом выполняли перенос (2%) в свежий бульон MRS и непрерывную инкубацию при перmissive температуре 15°C. Такой клеточный перенос повторяли каждые 48 часов в течение периода 8 недель. Каждую 2-ую неделю в ходе периода инкубации образец клеток подвергали УФ-излучению для ускорения роста предполагаемых чувствительных к температуре (ТЧ) мутантов. Вместо 2% переноса 7 мл аликвоту экспоненциально растущих клеток разводили до значения OD₆₀₀ (оптическая плотность при 600 нм) 0,25 в чашке Петри. Выполняли УФ-мутагенез, подвергая клеточный слой воздействию УФ (ультрафиолетового излучения) при 70 мДж/см² в течение 10 мин. Один миллилитр обработанных УФ клеток переносили затем в 10 мл свежего бульона MRS и непрерывно инкубировали при 15°C до следующего переноса. В конце восьминедельного периода отбирали образец и осуществляли скрининг на ТЧ варианты, как описано ниже.

Скрининг чувствительных к температуре мутантов DSM 18775

Скрининг чувствительных к температуре (ТЧ) мутантов выполняли путем посева аликвот ТЧ клеток на агар MRS в подходящем разведении с получением приблизительно от 150 до 200 колоний на чашку после инкубации при 15°C в течение 3 x 24 часов. Одиночные колонии переносили затем в отдельные лунки МТР (96-луночных планшетов), содержащие 100 мкл свежего бульона MRS, и инкубировали в течение других 3x24 часов при 15°C. ТЧ колонии идентифицировали посредством способа отпечатков на других МТР с 100 мкл бульона MRS и инкубировали аэробно в течение 24 часов при 30°C, при этой температуре ТЧ мутанты идентифицировали как показывающие рост с более долгой лаг-фазой, чем у дикого типа. Скрининг ТЧ мутантов выполняли также способом отпечатков

отдельных колоний из МТР на агаре MRS с последующей аэробной инкубацией в течение 24 часов при 30°C. В заключение, ТЧ колонии культивировали в бульоне MRS при 20°C.

Результаты

Через восемь недель после переноса *Lactobacillus curvatus* при 15°C и четырех УФ-обработок проводили скрининг приблизительно 4000 мутантов на их неспособность расти при 30°C. Один такой мутант, TrG3, демонстрировал пониженную скорость роста по сравнению с материнским штаммом в течение периода 24 часов при 30°C. Такую же пониженную скорость роста наблюдали в результате повторного тестирования предполагаемого ТЧ штамма в большем объеме 10 мл бульона MRS в течение периода 72 часов при 30°C. На чашках с агаром MRS наблюдали отсутствие роста вообще после 24 часов инкубации, в то время как наблюдали хороший рост для DSM 18775 (Фиг. 1).

ПРИМЕР 2

Отбор дополнительных мутантов *Lactobacillus curvatus* DSM 18775, имеющих продленную лаг-фазу при 30°C

Второе поколение мутантов, полученных из TrG3

Для дальнейшего продления лаг-фазы выбирали мутант TrG3 *Lactobacillus curvatus* DSM 18775 и подвергали непрерывно АЛЭ при 15°C в течение периода 2 недель с клеточными переносами (2%) через день в дополнение к одной УФ-мутагенной обработке, как описано в Примере 1. Из приблизительно 500 скринированных колоний выделили только 2 мутанта, показывающих замедленный рост при 30°C с продленной лаг-фазой, составляющей более чем 48 часов, по сравнению с материнским штаммом, DSM 18775. Было решено продолжать с одним из этих двух мутантов, TrG57 (DSM 32591).

ПРИМЕР 3

Обнаружение противомикробного продукта мутантов, имеющих продленную лаг-фазу при 30°C

Тест на активность бактериоцина

Чувствительный к бактериоцину индикаторный штамм *Micrococcus luteus* DSM 1790 амплифицировали путем инкубации при 30°C в бульоне ВНІ (BD) при интенсивном встряхивании (125 об/мин). Для теста на образование бактериоцинов выполняли серии 2-кратных разведений супернатантов прекультур (истощенная питательная среда) в МТР и порцию этих разведений (50 мкл) применяли к индикаторному штамму *Micrococcus luteus* DSM 1790. Оптическую плотность [OD] при 600 нм регистрировали каждые 30 минут в течение периода 20 часов при 30°C. Активность представляли в относительных единицах (AU/мл) (Таблица 1), и определяли как величину, обратную наибольшему двукратному

разведению, показывающему 50% подавление роста чувствительных к температуре штамма.

Результаты

Результаты, представленные в Таблице 1, показывают подавление чувствительного к бактериоцину штамма *Micrococcus luteus* (DSM 1790) при использовании истощенной питательной среды от штаммов *Lactobacillus curvatus* DSM 32590 и DSM 18775 и с положительным контролем *Pediococcus acidilactici* DSM 10313, выращенного в течение 20 часов при 20°C. OD₆₀₀ представляет собой плотность клеток *Micrococcus* после инкубации с различными разведениями истощенной питательной среды (бактериоцина).

Таблица 1

| Степень разведения истощенной питательной среды | OD ₆₀₀ после 20 часов роста | | |
|---|--|-----------|-----------|
| | DSM 32590 | DSM 18775 | DSM 10313 |
| Неразведенная | 0 | 0 | 0 |
| 1/2 | 0 | 0,216 | 0 |
| 1/4 | 0 | 0,483 | 0 |
| 1/8 | 0 | 0,612 | 0 |
| 1/16 | 0 | 0,713 | 0 |
| 1/32 | 0 | 0,734 | 0 |
| 1/64 | 0 | 0,744 | 0 |
| 1/128 | 0,256 | 0,744 | 0,309 |
| 1/256 | 0,554 | 0,743 | 0,679 |
| 1/512 | 0,677 | 0,732 | 0,703 |
| 1/1024 | 0,677 | 0,732 | 0,707 |
| Нет бактериоцина | 0,698 | 0,732 | 0,698 |
| ----- | | | |
| Активность образца (AU/мл) | 2560 | 40 | 2560 |

Анализ продуцирования бактериоцина продемонстрировал, что ТЧ штамм продуцировал значительно больше бактериоцина, чем материнский штамм DSM 18775, в течение периода 20 часов при 20°C. Для DSM 32590 и DSM 10313 (бактериоцин-

положительный контрольный штамм) регистрировали 50% подавление при разведении 1/128 у образца “нет бактериоцина” без истощенной питательной среды, добавленной в инокулят *Micrococcus shuteus* DSM 1790. В Таблице 1 DSM 18775 показано 50% подавление при разведении 1/2 с совокупной 40 AU/мл [2/0,05]. AU/мл для TrG3 было зарегистрировано как 2560 AU/мл [128/0,05]. Таким образом, зарегистрированная активность для TrG3 в 64 раза выше, чем у материнского штамма [AU-TrG3/AU-DSM 18775 = 2560/40 = 64].

ПРИМЕР 4

Тест с нагрузкой TrG3 и TrG57 на приготовленной ветчине

TrG3 и TrG57 тестировали для проверки обоих штаммов в отношении их способности подавлять *Listeria spp.*, а также органолептических характеристик и положительных эффектов на хранящейся приготовленной ветчине.

Получение прекультуры *Listeria innocua*

Штамм *L. innocua*, который использовали для получения распыляемой культуры для посева, хранили при -50°C. За 3 суток до начала испытания на удерживание один замороженный шарик штамма *L. innocua* помещали в пробирку, которая содержала 9 мл среды ВНИ, и инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующий день 0,1 мл ночной культуры переносили в 9 мл свежей среды ВНИ и инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующее утро прекультуру хранили при 4°C до использования. Одновременно подсчитывали количество клеток *L. innocua* конечной прекультуры на агаре ALOA. Чашку инкубировали при 37°C в течение ночи и подвергали подсчету для вычисления количества клеток распыляемого раствора, подлежащего применению.

Получение прекультур *Lactobacillus curvatus*

Прекультуры TrG3 и TrG57, соответственно, получали в 150 мл среды MRS и инкубировали при 30°C в течение ночи (без встряхивания). Количество активных клеток ночной культуры подсчитывали с помощью проточного цитометра и подходящее разведение использовали в пептонно-солевом растворе с целью получения распыляемого раствора.

Образцы

100 г нарезанной приготовленной ветчины упаковывали в вакуумный пакет для получения образца. Все пакеты засеивали путем распыления на поверхности ломтиков приготовленной ветчины 100 КОЕ/г *Listeria innocua* и одним из тестируемых штаммов (за исключением контрольной партии) с количеством клеток 1,0E+07 КОЕ/г или 1,0E+05 КОЕ/г как представлено ниже:

Партия 1 – Контроль

Партия 2 – *Lactobacillus curvatus* DSM 18775 (1,0E+07 КОЕ/г)

Партия 3 – TrG3 (1,0E+07 КОЕ/г)

Партия 4 – TrG57 (1,0E+07 КОЕ/г)

Партия 5 – TrG3 (1,0E+05 КОЕ/г)

Партия 6 – TrG57 (1,0E+05 КОЕ/г)

Затем вакуумные пакеты запаковывали в модифицированной атмосфере (70% N₂/30% CO₂) и хранили при +7°C в течение по меньшей мере 28 суток.

Анализы

Подсчет *Listeria spp.* и измерение pH каждой партии выполняли каждую неделю в трех повторах. Как подсчет общего количества клеток, так и подсчет молочнокислых бактерий выполняли каждую вторую неделю также в трех повторах. Количество клеток тестируемых штаммов подсчитывали на агаре MRS, а количество клеток *Listeria* подсчитывали на агаре ALOA, согласно соответствующим способам ISO (число клеток на чашке: ISO 4833-2:2013, молочнокислые бактерии: ISO15214:1998, *Listeria spp.*: ISO 11290-2:2017). Для того чтобы измерить значение pH приготовленной ветчины материал образца измельчали и гомогенизировали с помощью бытового миксера (Moulinette от Moulinex). Кроме того, органолептическую оценку с акцентированием внимания на запах и вкус образцов выполняли каждую неделю в дополнение к микробиологическим анализам и для их подтверждения.

Результаты

Результаты изменения pH образцов приготовленной ветчины, общего количества клеток, количества клеток молочнокислых бактерий количество клеток и количества клеток *Listeria spp.* представлены на Фиг. 3-6.

Результаты органолептической оценки образцов приготовленной ветчины (n=2) во время хранения при +7°C представлены в Таблице 2.

Таблица 2

| Партия | Штамм | Сутки 0 | | Сутки 7 | | Сутки 14 | | Сутки 21 | | Сутки 28 | |
|--------|-----------------------------|--------------|------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Вкус | Аромат/ запах | Вкус | Аромат/ запах | Вкус | Аромат/ запах | Вкус | Аромат/за пах | Вкус | Аромат/ запах |
| 1 | Контроль | хоро- ший | хоро- ший | хоро- ший | хороший | еще хоро- ший | 1 хоро- ший/ 2 лохой | старый | старый | старый | старый |
| 2 | DSM 18775 | хоро- ший | хоро- ший | хоро- ший | хороший | еще хоро- ший | слегка кислый | слегка кислый | еще хороший | кислый | кислый |
| 3 | TrG3 (1.0E+07 KOE/г) | хоро- ший | хоро- ший | хоро- ший | хороший/ более ин- тенсивный | хоро- ший | хороший | хоро- ший | слегка кислый | кислый | кислый |
| 4 | TrG57 (1.0E+07 KOE/г) | хоро- ший | хоро- ший | хоро- ший | слегка кислый | хоро- ший | нехоро- ший | горький | слегка кислый / свежий | слегка кислый / сухой | слегка кислый / свежий |
| 5 | TrG3 (1.0E+05 KOE/г) | хоро- ший | хоро- ший | хоро- ший/ менее вкусный | хороший | хоро- ший | хороший/ более вкусный | вкусный +/ сочный | хороший | слегка кислый / свежий | хороший |
| 6 | TrG57 (1.0E+05 KOE/г) | хоро- ший | хоро- ший | слегка кислый | хороший | хоро- ший | хороший | хоро- ший | хороший/ слегка кислый | слегка кислый | слегка кислый |

Заключение

Во всех образцах, где использовали TrG3 или TrG57, флора молочнокислых бактерий была однородной и соответствующий штамм идентифицировали по его морфологии с высокой вероятностью. Во всех партиях количества клеток достигли $1,0E+08$ – $1,0E+09$ КОЕ/г через 28 суток при 7°C , также как и в партиях с уровнем посева $1,0E+05$ КОЕ/г а также в контрольной партии. Что касается эффекта подавления *Listeria spp.*, то наблюдали отсутствие существенных различий между партиями. Важно отметить, что партии с более низким уровнем посева $1,0E+05$ КОЕ/г демонстрируют такой же эффект подавления роста *Listeria spp.*, как и партии с количеством клеток для посева $1,0E+07$ КОЕ/г. Количество клеток *Listeria spp.* во всех партиях, на которые наносили TrG3 или TrG57, оставалось равным примерно пределу обнаружения $1,0E+02$ КОЕ/г в течение всего теста с нагрузкой, в то время как количество клеток *Listeria spp.* контрольной партии повышалось приблизительно до $1,0$ - $5,0E+06$ КОЕ/г через 28 суток (Фиг. 5).

Снижение pH партий с более низким уровнем посева $1,0E+05$ КОЕ/г было более медленным по сравнению с партиями с высоким количеством клеток посева $1,0E+07$ КОЕ/г и достигало немного более высокого значения pH через 28 суток. Возможно вследствие более медленного подкисления и немного более высокого конечного значения pH партий, засеянных $1,0E+05$ КОЕ/г, во время всего испытания на удерживание наблюдали всего лишь незначительные органолептические отклонения соответственно негативному воздействию на органолептические характеристики продукта (Фиг. 2). В отношении дегустации партия TrG3 с начальным количеством клеток $1,0E+05$ КОЕ/г давала лучшие результаты, за ней следует партия TrG57 с начальным количеством клеток $1,0E+05$ КОЕ/г, а также партия с TrG3 с количеством клеток $1,0E+07$ КОЕ/г была органолептически приемлемой до 28 дня (конец исследования) (Таблица 2).

Подводя итоги, при использовании мутантов с начальным количеством клеток $1,0E+05$ КОЕ/г снижение pH партий было более медленным и достигало немного более высокого значения pH через 28 суток, что имело результатом менее негативное воздействие на органолептические характеристики продукта. В отношении дегустации эти партии были намного лучше, чем партии с более высоким количеством клеток посева, а также обеих партий, засеянной DSM 18775 и контрольной партии, и при этом

эффект подавления роста *Listeria spp.* практически таким, как для партий, засеянных $1,0E+07$ КОЕ/г.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм *Lactobacillus curvatus*, представляющий собой мутант DSM 18775, где указанный штамм имеет продленную лаг-фазу, составляющую по меньшей мере 24 часа при 30°C, по сравнению с DSM18775.

2. Штамм *Lactobacillus curvatus* по п. 1, где продленная лаг-фаза составляет по меньшей мере 48 часов при 30°C, по сравнению с DSM18775.

3. Штамм *Lactobacillus curvatus* по любому из пп. 1-2 для подавления листерий.

4. Штамм *Lactobacillus curvatus* по п. 1 или п. 3, который депонирован как DSM 32590.

5. Штамм *Lactobacillus curvatus* по любому из пп. 1-3, который депонирован как DSM 32591.

6. Композиция, содержащая бактерии штамма *Lactobacillus curvatus* по любому из пп. 1-5.

7. Композиция по п. 6, содержащая штамм *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM 32590, и штамм *Lactobacillus curvatus*, депонированный как DSM 32591.

8. Композиция по любому из пп. 6-7, где штамм *Lactobacillus curvatus* присутствует в концентрации по меньшей мере 10^5 КОЕ/г (колониеобразующих единиц/г).

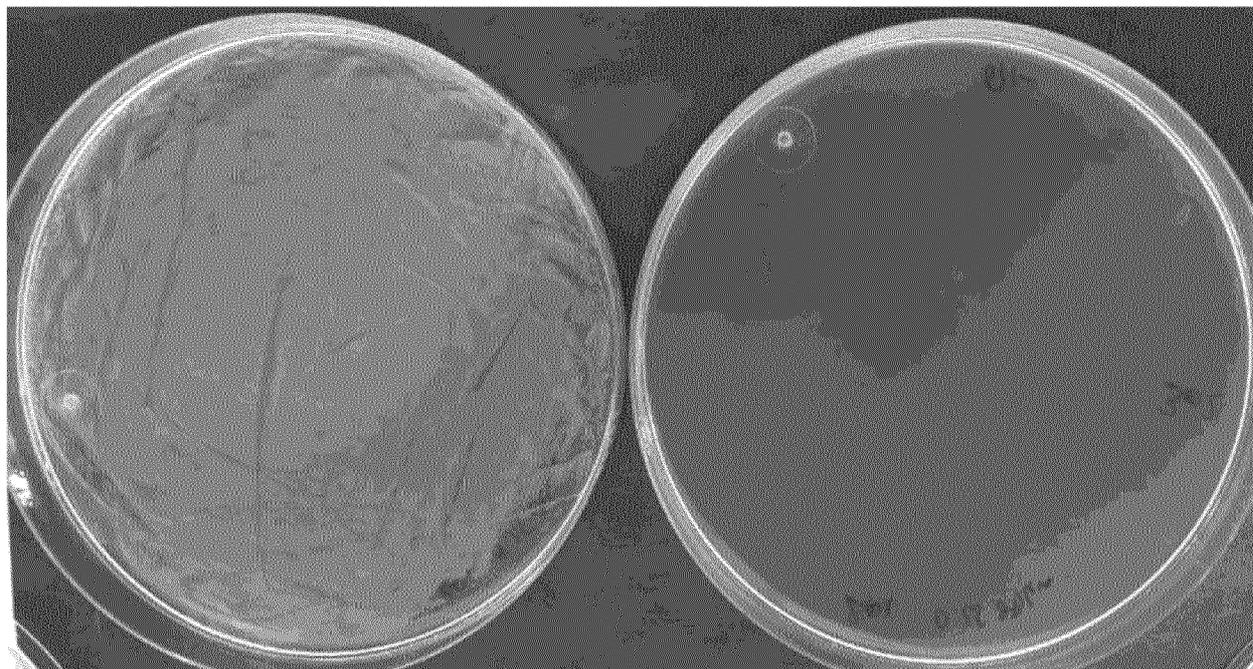
9. Композиция по любому из пп. 6-8, содержащая бактерии штамма *Lactobacillus curvatus* в качестве единственных бактерий, присутствующих в композиции.

10. Композиция по любому из пп. 6-9, содержащая бактерии штамма *Lactobacillus curvatus* и бактерии одного или более видов *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc carnosum*, *Staphylococcus carnosus*.

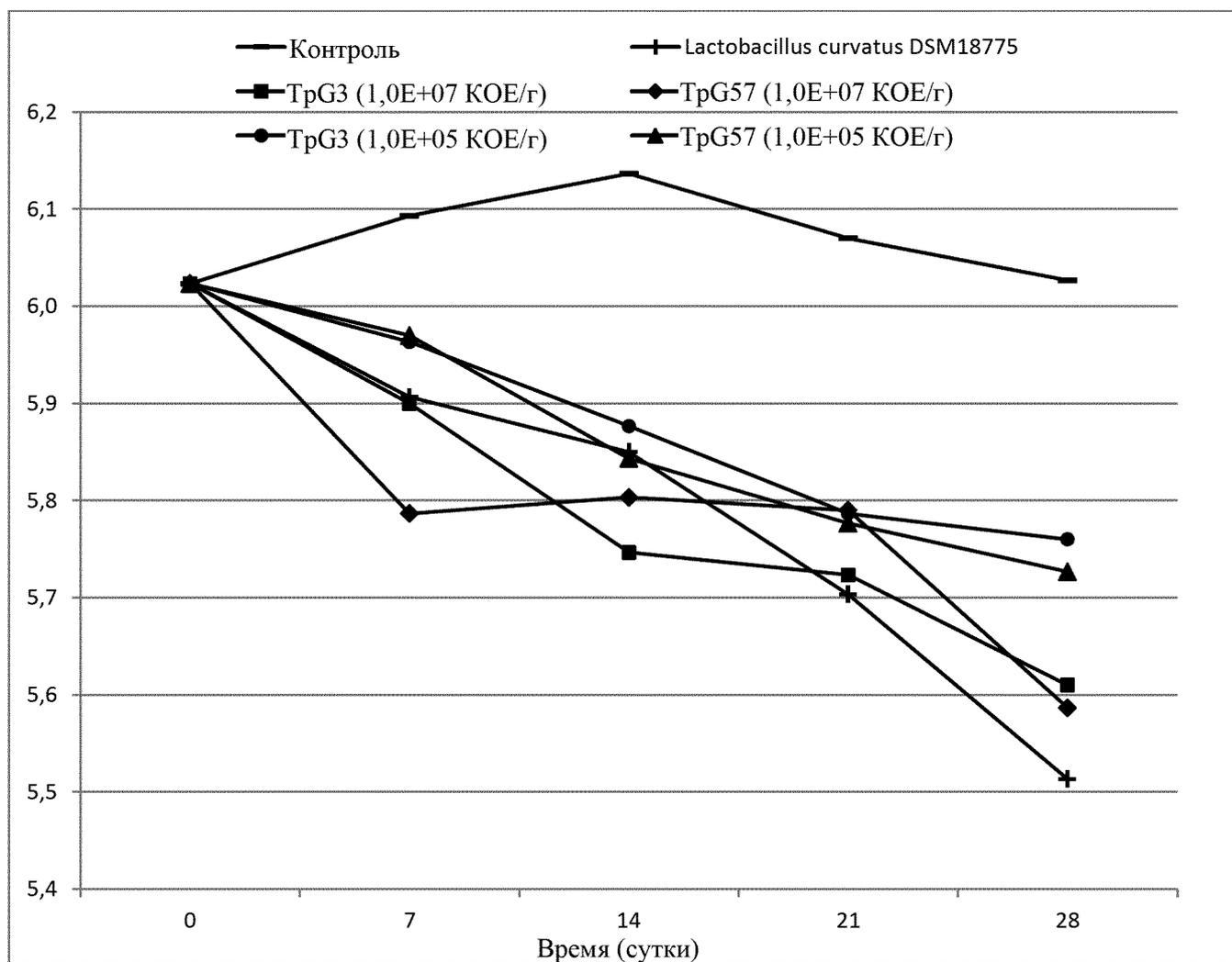
11. Композиция по п. 10, где бактерии одного или более видов *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc carnosum*, *Staphylococcus carnosus* представляют собой *Pediococcus acidilactici*, депонированный как DSM 28307, *Lactobacillus sakei*, депонированный как DSM 14022, *Lactococcus lactis*, депонированный как DSM 11037, или *Leuconostoc carnosum* LC1043.

12. Способ подавления количества вызывающих порчу или патогенных бактерий в пищевом продукте, включающий добавление бактерий штамма *Lactobacillus curvatus* по любому из пп. 1-5 или композиции по любому из пп. 6-9 к пищевому продукту в концентрации по меньшей мере 10^5 КОЕ/г.

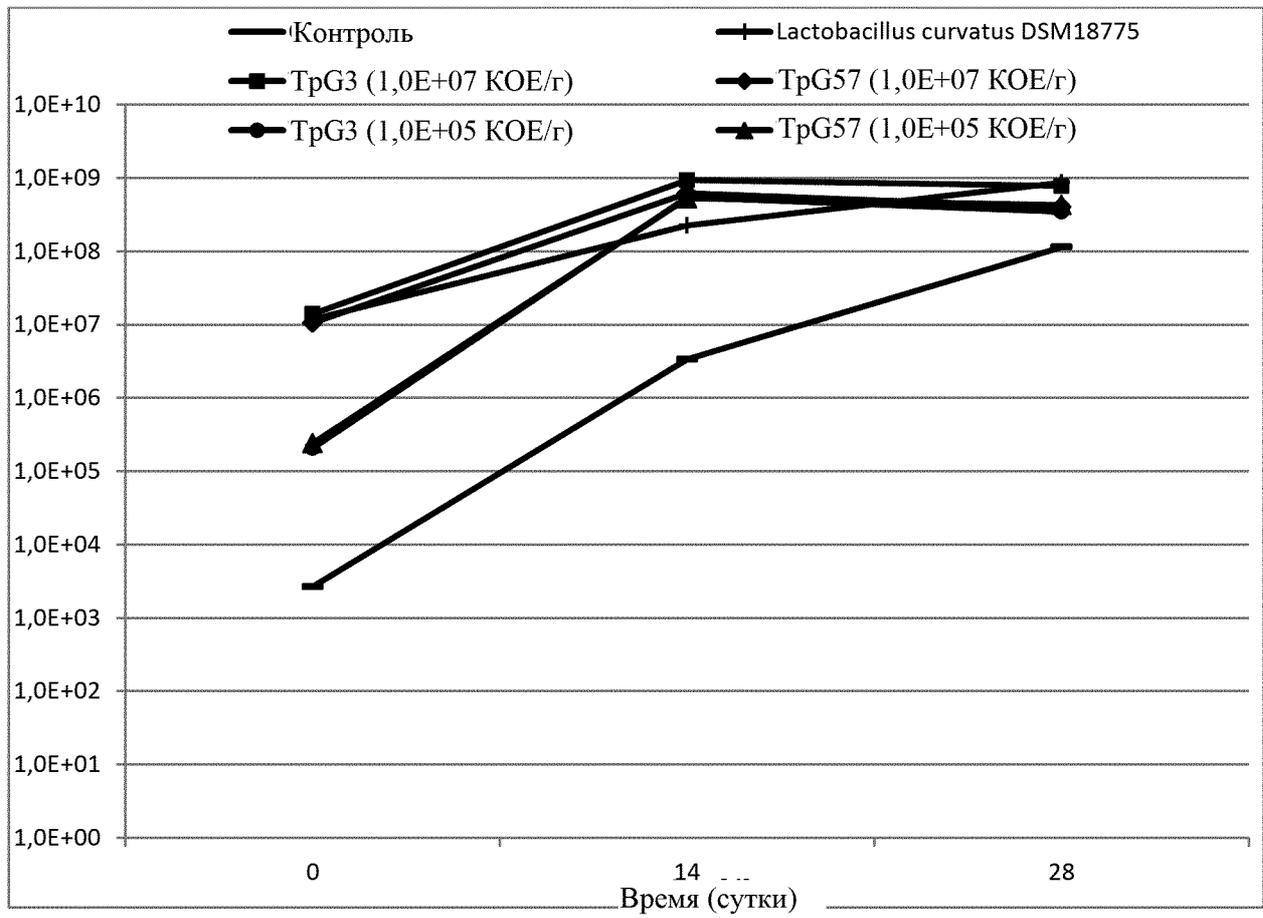
13. Способ по п. 12, где патогенные бактерии представляют собой *Listeria*.



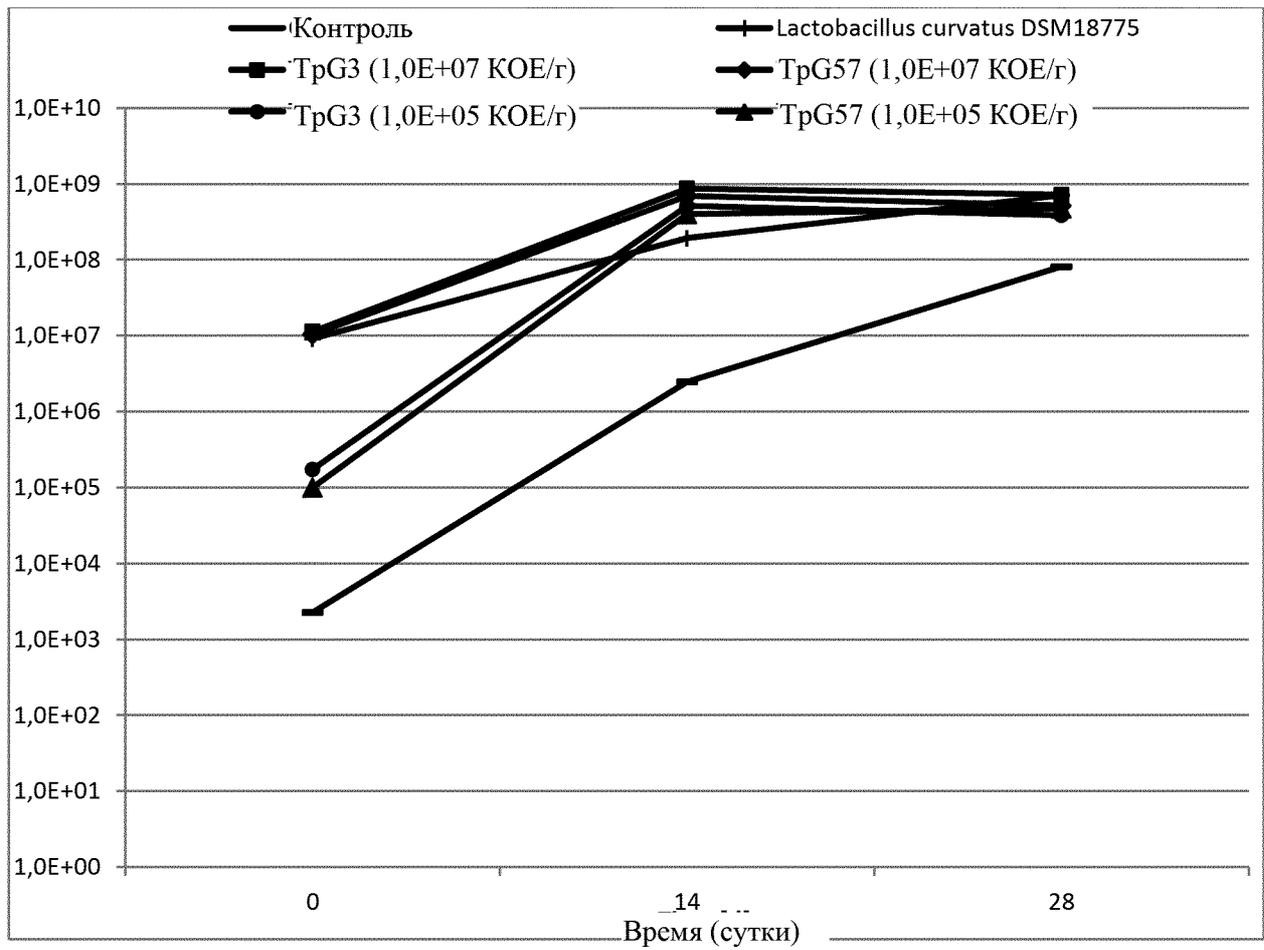
Фигура 1



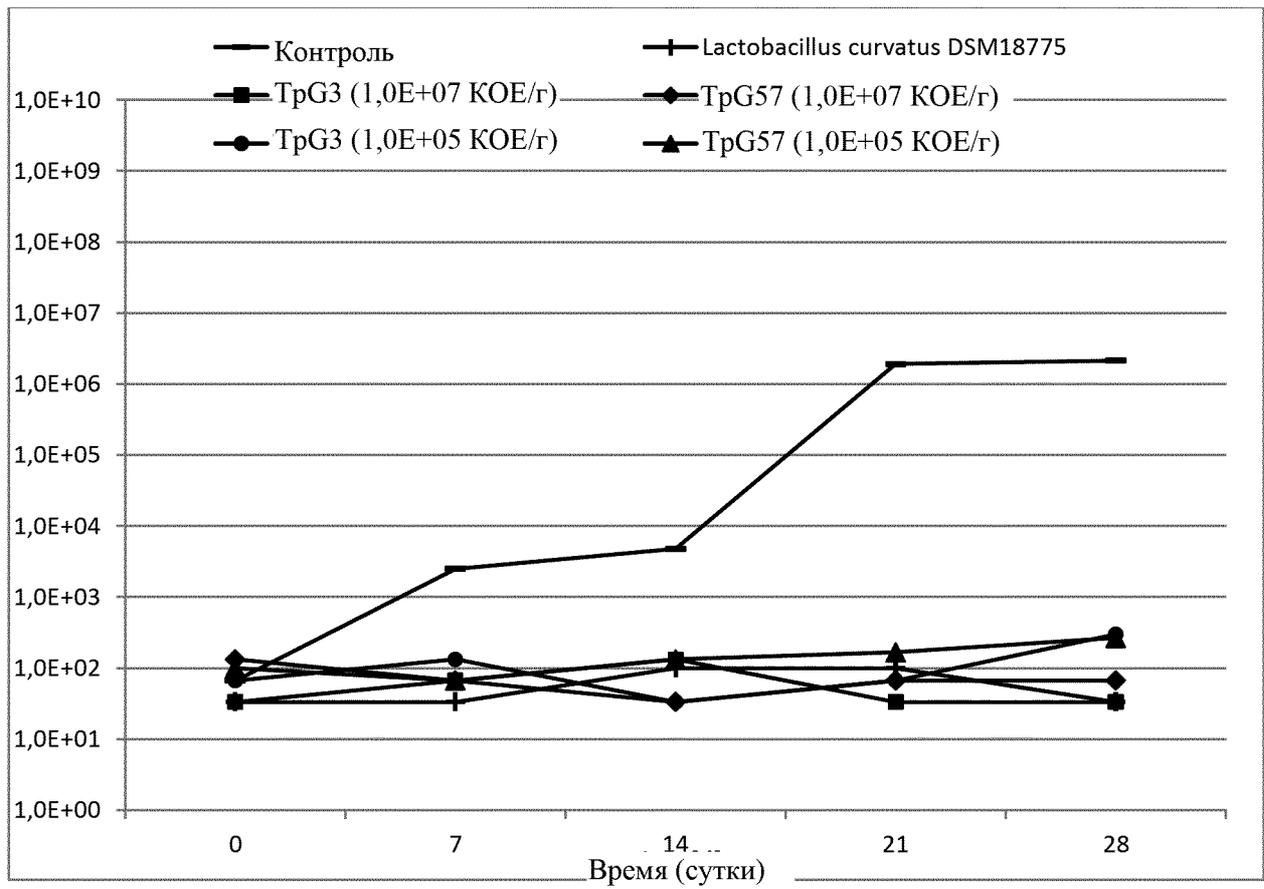
Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5