

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045075**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.27**

(51) Int. Cl. *A23C 9/12* (2006.01)  
*A23C 9/127* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**202091476**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.01.15**

---

(54) **ФЕРМЕНТИРОВАННЫЙ ПРОДУКТ НА ОСНОВЕ МОЛОКА МЛЕКОПИТАЮЩЕГО ИЛИ РАСТИТЕЛЬНОЙ МОЛОЧНОЙ ОСНОВЕ И ЕГО ПРИГОТОВЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОСФОЛИПАЗЫ**

---

(31) **18151641.0**

(56) US-A1-2009285934

(32) **2018.01.15**

JP-A-S57189638

(33) **EP**

WO-A1-03070013

(43) **2020.10.27**

US-A1-2008299252

(86) **PCT/EP2019/050874**

(87) **WO 2019/138121 2019.07.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**КХР. ХАНСЕН А/С (DK)**

(72) Изобретатель:  
**Ди Тэкко Тьерри, Лоу Ван Мэй (SG),  
Русель Себастьян (DK)**

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

---

(57) Изобретение относится к применению фосфолипазы А или фосфолипазы А и химозина (ЕС 3.4.23.4) для повышения вязкости продукта, выбранного из ферментированного продукта на основе молока млекопитающего и ферментированного продукта на растительной молочной основе. В изобретении также предложен полученный при указанном применении продукт и набор, содержащий заквасочную культуру и фосфолипазу А.

---

**B1**

**045075**

**045075 B1**

### Область изобретения

Настоящее изобретение по существу относится к способам получения кисломолочных продуктов.

#### Предшествующий уровень техники

Молочные продукты, такие как кисломолочные продукты, известны в данной области техники. Для молочных продуктов текстура является очень важным параметром качества. Многие потребители желают, чтобы продукт имел мягкую консистенцию и прочность геля, дающую приятное вкусовое впечатление.

Стандартной методикой улучшения текстуры кисломолочных продуктов является добавление белка, как правило, сухого обезжиренного молока или белков молочной сыворотки. Часто используют загустители или другие агенты, придающие текстуру, такие как модифицированный крахмал, кукурузный крахмал, пектин, желатин или агар. Тем не менее добавляемые белки или агенты, придающие структуру, могут иметь высокую стоимость. Таким образом, преимуществом обладает разработка способа получения кисломолочного продукта, в котором добавление таких агентов можно сократить или исключить. Это желательно и в связи с тем, что на рынке растет потребность в кисломолочных продуктах, подходящих под определение "чистой этикетки", т.е. без добавления стабилизирующих или придающих текстуру агентов.

Другой распространенной методикой придания кисломолочным продуктам хорошей текстуры является гомогенизация. Ее проводят перед ферментацией для дробления молочного жира до более мелких размеров. Жировые глобулы более мелкого размера, образующиеся в этом процессе, могут легко суспендироваться в растворе, поэтому не присутствуют в молоке в виде отдельного слоя. Гомогенизация может быть выполнена, например, путем форсированного пропускания молока через тонкий фильтр или ограничительный клапан при высоких давлениях, в результате чего формируется эмульсия с уменьшенным размером частиц. Давление гомогенизации, обычно применяемое в молочной промышленности, составляет около 150-250 бар в зависимости от продукта. Тем не менее гомогенизация требует больших затрат, поскольку требует значительных расходов энергии. Таким образом, преимуществом обладает разработка способа, в котором сокращена потребность в гомогенизации, тем самым позволяющего снизить эксплуатационные расходы производителя.

Были предприняты попытки решения этой проблемы. Многие из них относятся к разработке новых штаммов молочнокислых бактерий, в результате чего можно получить лучшую текстуру. Например, в WO 2007/095958A1 (Chr. Hansen) раскрыто применение некоторых заквасочных культур, которые продуцируют внеклеточные полисахариды, для улучшения текстуры кисломолочных продуктов. В данной области техники сохраняется постоянная потребность в улучшении органолептических свойств кисломолочных продуктов, в частности вкусового впечатления и формирования покрытия в полости рта.

#### Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение отчасти основано на неожиданном обнаружении, что фосфолипазы оказывают положительное влияние на органолептические качества кисломолочных продуктов. За счет использования фосфолипазы (фосфолипаз) в способе приготовления можно сократить или даже исключить использование белков, придающих текстуру агентов или стабилизирующих агентов в кисломолочных продуктах. Можно также сократить затраты на гомогенизацию, требующуюся в процессе производства.

В настоящем изобретении предложено новое применение фосфолипазы в способе приготовления кисломолочного продукта. Кисломолочный продукт, такой как йогурт, может быть получен из гомогенизированной и обработанной нагреванием молочной основы со стандартизованным содержанием жира и белка. Затем молоко засевают заквасочной культурой и подвергают ферментации.

Наблюдали, что фосфолипаза может активно участвовать в процессе ферментации под действием молочнокислых бактерий, в результате чего увеличивается вязкость готового продукта ферментации. В настоящем изобретении, таким образом, предложен способ получения кисломолочного продукта, в котором содержащую фосфолипазу молочную основу подвергают ферментации.

В данной заявке предложен способ, включающий добавление заквасочной культуры к молочной основе, ферментации этой молочной основы в течение такого периода времени, чтобы достичь целевого pH, при котором к молочной основе добавляют по меньшей мере одну фосфолипазу. Фосфолипазу можно добавлять до, в начале или во время ферментации. Предпочтительно фосфолипазу добавляют до или в начале ферментации. После достижения целевого pH может быть получен кисломолочный продукт.

В настоящей заявке предложен способ получения кисломолочного продукта, включающий стадии:

- а) добавления к молочной основе заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один штамм кисломолочной бактерии,
- б) ферментации молочной основы в течение такого периода времени, чтобы достичь целевого pH, и
- в) добавления к молочной основе по меньшей мере одной фосфолипазы до, в начале или в течение периода ферментации.

Фосфолипаза, которую можно использовать для настоящей заявки, включает фосфолипазу А, такую как фосфолипаза А1 (ЕС 3.1.1.32) и фосфолипаза А2 (ЕС 3.1.1.4), и фосфолипазу В (ЕС 3.1.1.5), фосфолипазу С (ЕС 3.1.4.3) и фосфолипазу D (ЕС 3.1.4.4).

В настоящую заявку включен кисломолочный продукт, полученный раскрытыми в настоящем до-

кументе способами. В другом аспекте в настоящем изобретении предложен кисломолочный продукт, содержащий фосфолипазу.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложен набор, содержащий заквасочную культуру и по меньшей мере одну фосфолипазу, полезную для изготовления кисломолочных продуктов.

Другие признаки и преимущества изобретения станут очевидными по прочтении приведенного ниже описания в сочетании с сопроводительными графическими материалами.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 изображена кривая гистерезиса для кисломолочных продуктов, приготовленных в примере 1, показывающая зависимость напряжения сдвига от скоростей сдвига.

На фиг. 2 изображено влияние факторов на переменную ответа (вязкость при 60 1/с) в кисломолочных продуктах, приготовленных в примере 2.

На фиг. 3 изображено влияние факторов на переменную ответа (вязкость при 300 1/с) в кисломолочных продуктах, приготовленных в примере 2.

На фиг. 4 изображена кривая гистерезиса для кисломолочных продуктов, приготовленных в примере 3, показывающая зависимость напряжения сдвига от скоростей сдвига.

#### **Подробное описание изобретения**

Данное изобретение относится к кисломолочным продуктам, полученным путем ферментации молока выбранными микроорганизмами. Различные виды ферментированного молока могут быть охарактеризованы по конкретным заквасочным культурам, используемым в ферментации. Например, симбиотические культуры *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* применяют в качестве заквасочной культуры для йогурта, тогда как *Lactobacillus acidophilus* применяют для получения ацидофильного молока. Для получения кварка или мягкого сыра низкой жирности применяют другие мезофильные молочнокислые бактерии.

Для приготовления продуктов в соответствии с настоящей заявкой прежде всего обеспечивают молочную основу в качестве исходного материала. "Молочная основа" широко используется в настоящей заявке при ссылке на композицию на основе молока или компоненты молока, которые можно применять в качестве среды для роста и ферментации заквасочной культуры. "Молоко" в целом относится к секреции молока, полученной путем доения любого млекопитающего, такого как коровы, овцы, козы, буйволы или верблюды. Молочная основа может быть получена как из любого сырого и/или обработанного молочного материала, так и из восстановленного сухого молока. Молочная основа может также представлять собой растительную основу, т.е. может быть приготовлена из растительного материала, например соевого молока.

Полезные молочные основы включают без ограничений растворы/суспензии любых содержащих белок молочных или подобных молоку продуктов, таких как цельное молоко или молоко низкой жирности, обезжиренное молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко.

В способах и продуктах по настоящему изобретению молочную основу предпочтительно готовят из молока или компонентов молока коров.

В зависимости от нужд потребителей молочная основа также может иметь пониженное содержание лактозы. Молоко с пониженным содержанием лактозы может быть получено в соответствии с любым известным в данной области техники способом, включающим гидролиз лактозы до глюкозы и галактозы ферментом лактазой, или методами нанофильтрации, электродиализа, ионообменной хроматографии и центрифугирования.

#### **Пастеризация**

Перед ферментацией молочную основу предпочтительно пастеризуют в соответствии с известными в данной области техники способами. При использовании в настоящем документе "пастеризация" означает обработку молочной основы, позволяющую сократить или устранить присутствие живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно пастеризация достигается путем поддержания заданной температуры в течение заданного периода времени. Заданная температура обычно достигается путем нагревания. Специалисты средней квалификации в данной области техники способны подобрать такую температуру и продолжительность, чтобы уничтожить или инактивировать определенные микроорганизмы. За этим может следовать стадия быстрого охлаждения.

#### **Гомогенизация**

"Гомогенизация" относится к процессу гомогенизации смеси с получением однородной жидкой композиции из несмешиваемых компонентов. В процессе гомогенизации молочный жир разрушается до частиц меньшего размера таким образом, что уже не отделяется от молока. Это может быть выполнено путем форсированного пропускания молока через мелкие отверстия под высоким давлением. В молочной промышленности гомогенизацию обычно применяют после пастеризации или одновременно с ней. Как станет очевидным из последующего описания, в настоящем изобретении предложены способы, в которых потребность в гомогенизации сокращается. Таким образом, в некоторых воплощениях изобретения молочную основу гомогенизируют, хотя и при более низком давлении, чем требуется обычно, а в других воплощениях изобретения молочную основу не гомогенизируют.

### Ферментация

Для ферментации молочной основы добавляют заквасочную культуру. При использовании в настоящем контексте термин "закваска" или "заквасочная культура" относится к культуре одного или более микроорганизмов пищевых сортов, в частности молочнокислых бактерий, ответственных за подкисление молочной основы. Заквасочные культуры могут быть свежими, замороженными или лиофилизированными. Определение используемой заквасочной культуры и ее количеств находится в рамках компетенции обычных практических работников.

"Ферментация" в целом означает преобразование углеводов в спирты или кислоты под действием микроорганизма. В настоящем изобретении ферментация в способах по изобретению относится к преобразованию лактозы в молочную кислоту.

### Заквасочная культура

В соответствии с настоящим изобретением заквасочная культура содержит по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий. Молочнокислые бактерии широко применяются для получения ферментированных пищевых продуктов, и их применение хорошо известно в данной области техники. В контексте настоящей заявки термин "молочнокислая бактерия", или LAB (lactic acid bacteria) используют при ссылке на пригодные для применения в пищевой промышленности бактерии, продуцирующие молочную кислоту в качестве продукта ферментации углеводов как основного конечного продукта метаболизма. Эти бактерии родственны по своим общим метаболическим и физиологическим характеристикам и обычно представляют собой грамположительные, устойчивые к кислотам, не образующие спор, не дышащие палочковидные бациллы или кокки с низким содержанием GC-пар в ДНК. На стадии ферментации потребление лактозы этими бактериями вызывает образование молочной кислоты, снижение pH и приводит к образованию белкового коагулята.

Заквасочная культура, полезная для настоящего изобретения, может иметь композицию штаммов любой традиционной заквасочной культуры молочнокислых бактерий, включая одноштамбовую культуру или смешанные культуры в зависимости от конкретного типа кисломолочного продукта. В дополнение к заквасочной культуре в ферментацию можно также включать другие полезные бактерии, включая бактерии-пробиотики *Bifidobacterium* spp.

В одном воплощении изобретения заквасочная культура содержит термофильные бактерии для получения термофильного кисломолочного продукта. Термин "термофильный кисломолочный продукт" относится к кисломолочным продуктам, приготовленным путем термофильной ферментации термофильной заквасочной культуры, примеры которых включают такие кисломолочные продукты, как термостатный йогурт, резервуарный йогурт и питьевой йогурт, например якульт. В промышленном масштабе наиболее полезные термофильные бактерии ("термофилы") включают *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. Термин "термофильная ферментация" в настоящем документе относится к ферментации при температуре выше, чем около 35°C, например от около 35 до около 45°C. "Термофилы" в целом представляют собой микроорганизмы, которые лучше всего растут и развиваются при температурах выше 35°C.

В другом воплощении изобретения заквасочная культура содержит мезофильные бактерии для получения мезофильного кисломолочного продукта.

Термин "мезофильный кисломолочный продукт" относится к кисломолочным продуктам, приготовленным путем мезофильной ферментации мезофильной заквасочной культуры, примеры которых включают такие кисломолочные продукты, как пахта, кислое молоко, сквашенное молоко, сметана, кислые густые сливки, кефир и молодой сыр, такой как квार्к, творог и сливочный сыр. Полезные мезофильные бактерии ("мезофилы") включают *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp. Термин "мезофильная ферментация" в настоящем документе относится к ферментации при температуре от около 22 до около 37°C. Термин "мезофилы" в целом относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут и развиваются при умеренных температурах (15-35°C).

Молочнокислые бактерии, полезные для изготовления кисломолочного продукта, охватывают без ограничений бактерии, относящиеся к роду *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., такие как *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium breve* и *Leuconostoc* spp. Выбор конкретных штаммов в заквасочной культуре будет зависеть от конкретного типа производимого молочного продукта.

В предпочтительном воплощении изобретения заквасочная культура содержит по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*.

В предпочтительном воплощении изобретения молочнокислые бактерии выбраны из группы, состоящей из бактерий родов *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc*.

В конкретном воплощении изобретения кисломолочный продукт представляет собой продукт, полученный с применением одного или более штаммов молочнокислых бактерий, выбранных из группы, состоящей из *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

### Способ ферментации

После добавления заквасочной культуры и доведения молочной культуры до подходящих условий, начинают выполнять способ ферментации и продолжают его в течение некоторого периода времени. Специалисту средней квалификации в данной области техники известно, как подобрать подходящие условия технологического процесса, такие как температура, подача кислорода, добавление углеводов, количество и характеристики микроорганизма(ов) и время, которое занимает технологический процесс. Этот процесс может занимать от трех, четырех, пяти, шести часов или дольше.

Эти условия включают установку температуры, подходящей для конкретных штаммов заквасочной культуры. Например, если заквасочная культура содержит мезофильные молочнокислые бактерии, температура может быть установлена на примерно 30°C, а если культура содержит термофильные штаммы молочнокислых бактерий, температуру поддерживают в диапазоне от примерно 35 до 50°C, таком как от 40 до 45°C. Установка температуры ферментации также зависит от добавляемого(ых) в ферментацию фермента(ов), как может легко определить специалист средней квалификации в данной области техники. В конкретном воплощении изобретения температура ферментации составляет от 35 до 45°C, предпочтительно от 37 до 43°C и более предпочтительно от 40 до 43°C.

Ферментацию можно останавливать любыми известными в данной области техники способами. Как правило, в зависимости от различных параметров технологического процесса ферментацию можно останавливать, делая молочную основу неподходящей для роста штамма(ов) заквасочной культуры. Например, остановку можно осуществить путем быстрого охлаждения кисломолочного продукта при достижении целевого pH. Известно, что во время ферментации происходит подкисление, которое приводит к образованию трехмерной сети, состоящей из кластеров и цепей казеинов. Термин "целевой pH" означает pH, при котором заканчивается стадия ферментации. Целевой pH зависит от кисломолочного продукта, который должен быть получен, и может быть легко определен специалистом средней квалификации в данной области техники.

В конкретных воплощениях изобретения ферментацию проводят до достижения pH 5,0, в том числе до pH 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0, 3,9, 3,8 или 3,7. Предпочтительно ферментацию проводят до достижения целевого pH от 4,0 до 5,0 и более предпочтительно от 4,0 до 4,6. В предпочтительном воплощении изобретения ферментацию проводят до достижения целевого pH ниже 4,6.

### Фосфолипаза

Молоко содержит фосфолипиды. Фосфолипиды ассоциированы с молочным жиром благодаря своим неполярным липофильным свойствам. Фосфолипиды, такие как лецитин или фосфатидилхолин, состоят из глицерина, этерифицированного двумя жирными кислотами во внешнем (sn-1) и среднем (sn-2) положениях и этерифицированного фосфорной кислотой в третьем положении. Фосфорная кислота, в свою очередь, может быть этерифицирована до аминок спирта. Фосфолипиды могут подвергаться гидролизу под действием фосфолипазы до лизофосфолипида, который, в свою очередь, может подвергаться гидролизу под действием лизофосфолипазы.

Фосфолипазы являются основными ферментами, играющими критическую роль у живых организмов в целом и в метаболизме и биосинтезе фосфолипидов в частности. Эти ферменты участвуют в гидролизе фосфолипидов, и можно различать несколько типов активности фосфолипазы. Фосфолипазу А можно дополнительно классифицировать как фосфолипазу А1 (ЕС 3.1.1.32) или А2 (ЕС 3.1.1.4.), которые гидролизуют одну жирную ацильную группу (в положениях sn-1 и sn-2 соответственно) с образованием лизофосфолипида. Фосфолипаза В (ЕС 3.1.1.5) гидролизует оставшуюся жирную ацильную группу в лизофосфолипиде. Другими фосфолипазами являются фосфолипаза С (ЕС 3.1.4.3) и фосфолипаза D (ЕС 3.1.4.4). Фосфолипаза для применения в способе по изобретению может представлять собой любую фосфолипазу или любую комбинацию фосфолипаз.

В предпочтительном воплощении изобретения фосфолипазой(ами), полезной(ыми) для настоящей заявки, является фосфолипаза А. Более предпочтительно фосфолипаза представляет собой фосфолипазу А1 (ЕС 3.1.1.32) и/или фосфолипазу А2 (ЕС 3.1.1.4). В других воплощениях изобретения фосфолипаза представляет собой фосфолипазу В (ЕС 3.1.1.5) или С (ЕС 3.1.4.3).

В соответствии со стандартной классификацией ферментов фосфолипаза А1 определена как ЕС 3.1.1.32.

Официальное название: Фосфолипаза А1

Катализируемая реакция: фосфатидилхолин + вода  $\rightleftharpoons$  2-ацилглицерофосфатидилхолин + анион жирной кислоты

Примечание: обладает значительно более широкой специфичностью, чем ЕС 3.1.1.4.

В соответствии со стандартной классификацией ферментов фосфолипаза А2 определена как ЕС 3.1.1.4

Официальное название: Фосфолипаза А2

Альтернативные названия: фосфатидилхолин-2-ацилгидролаза, лецитиназа а; фосфатидаза или фосфатидолипаза.

Катализируемая реакция: фосфатидилхолин + вода  $\rightleftharpoons$  i-ацилглицерофосфохолин + анион жирной

кислоты

Примечание: также действует на фосфатидилэтаноламин, холиновый плазмалоген и фосфатиды с удалением жирной кислоты, присоединенной в 2-положении.

Фосфолипаза может иметь любое происхождение, например животное происхождение (такое как, например, из млекопитающих), например из поджелудочной железы (например поджелудочной железы крупного рогатого скота или свиней), либо из змеиного или пчелиного яда. Альтернативно фосфолипаза может иметь происхождение из микроорганизмов, например из нитевидных грибов, дрожжей или бактерий, например из рода или вида *Aspergillus*, например *A. niger*; *Dictyostelium*, например *D. discoideum*; муко́ра, например *M. javanicus*, *M.ucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, например *N. crassa*; *Rhizomucor*, например *R. pusillus*; *Rhizopus*, например *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, например *S. libertiana*; *Trichophyton*, например *T. rubrum*; *Whetzelinia*, например *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, например *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Citrobacter*, например *C. freundii*; *Enterobacter*, например *E. aerogenes*, *E. cloacae*; *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Ergwinia*, например *E. herbicola*; *Escherichia*, например *E. coli*; *Klebsiella*, например *K. pneumoniae*; *Proteus*, например *P. vulgaris*; *Providencia*, например *P. stuartii*; *Salmonella*, например *S. typhimurium*; *Serratia*, например *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, например *S. flexneri*; *Streptomyces*, например *S. violaceoruber*; *Yersinia*, например *Y. enterocolitica*. Фосфолипаза может иметь происхождение из грибов, например класса *Pyrenomycetes*, таких как род *Fusarium*, например штамм *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, *F. venenatum* или штамм *F. oxysporum*. Фосфолипаза может также иметь происхождение из штамма нитевидных грибов в пределах рода *Aspergillus*, такого как штамм *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* или *Aspergillus oryzae*. Предпочтительная фосфолипаза получена из штамма рода *Fusarium*, в частности *F. venenatum* или *F. oxysporum*, например, из штамма DSM 2672, как раскрыто в WO 98/26057, в частности раскрыто в пункте 36 формулы изобретения WO 98/26057. В дополнительных воплощениях изобретения фосфолипаза представляет собой фосфолипазу, раскрытую в WO 00/32758 (*Novozymes A/S*, Дания). Другой предпочтительной фосфолипазой А является фосфолипаза А2 из стрептомицетов, такая как PLA2 из *S. violaceoruber*.

Фосфолипазы имеются в продаже. Фосфолипаза А1 из *Thermomyces lanuginosus*/*Fusarium oxysporum*, экспрессируемая в *Aspergillus oryzae*, имеется в продаже под товарным знаком *Lecitase®Ultra* (*Novozymes A/S*, Дания). Другая предпочтительная фосфолипаза А1 имеется в продаже под товарным знаком *YieldMAX®* или *YieldMAX®PL* (*Chr. Hansen A/S*, Дания), которая получена путем глубинной ферментации штамма *Aspergillus oryzae*.

Особенно предпочтительной фосфолипазой А является фосфолипаза А1 из *Fusarium spp.*

Фосфолипазу А2 можно найти под разными торговыми названиями. Например, фосфолипаза А2 животного происхождения (из поджелудочной железы свиней), разработанная для дегуммирования растительных масел, имеется в продаже под названием *Lecitase®10L* (*Novozymes A/S*, Дания). *Maхарal® А2* (*DSM Food Specialties*, Нидерланды) получена путем микробной ферментации определенного штамма *Aspergillus niger*, разработанного для улучшения эмульгирующих свойств куриного яйца и яичного желтка. *SakeZyme®* и *BakeZyme®* также представляют собой фосфолипазу А2 производства компании *DSM Food Specialties* (Нидерланды). Дополнительные примеры включают микробную фосфолипазу А2 *Rohalase®MPL* (*AB Enzymes*, Германия) и *LysoMax®* (*Genencor*, США).

В предпочтительном воплощении изобретения фосфолипаза представляет собой *YieldMAX®* или *YieldMAX®PL* (*Chr. Hansen A/S*, Дания). Другие пригодные для применения в пищевой промышленности фосфолипазы хорошо известны специалистам в данной области техники и их можно найти, например, в работе Casado, Victor, et al. "Phospholipases in food industry: a review". *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols* (2012): 495-523.

В некоторых воплощениях изобретения фосфолипаза(ы), применяемая(ые) в способе по изобретению, получена или может быть получена из любого указанного в настоящем документе источника. В данном контексте термин "получен" означает, что фосфолипаза может быть выделена из организма, где она присутствует в нативном виде, т. е. аминокислотная последовательность этого фермента идентична аминокислотной последовательности нативного фермента. В данном контексте термин "получен" также означает, что ферменты можно продуцировать рекомбинантным методом в организме-хозяине, при этом полученный рекомбинантным методом фермент имеет идентичную нативному ферменту или модифицированную аминокислотную последовательность, например, имеющую делецию, вставку и/или замену одной или более аминокислот, т. е. полученный рекомбинантным методом фермент представляет собой мутант и/или фрагмент нативной аминокислотной последовательности. В значение нативного фермента включены природные варианты. Кроме того, термин "получен" включает ферменты, полученные синтетическим путем, например методом пептидного синтеза. Термин "получен" также охватывает ферменты, которые были модифицированы, например, гликозилированием, фосфорилированием и т.д., либо *in vivo*, либо *in vitro*. В данном контексте термин "получаемый" означает, что фермент имеет аминокислотную последовательность, идентичную последовательности нативного фермента. Этот термин охватывает фермент, который был выделен из организма, где он присутствует в нативном виде, или экспрессирован рекомбинантным методом в организме того же или другого типа, или ферменты, полученные синтетиче-

ским путем, например, методом пептидного синтеза. По отношению к продуцируемому рекомбинантным методом ферменту термины "получаемый" и "получен" относятся к идентичности фермента, но не относятся к идентичности организма-хозяина, в котором он продуцируется рекомбинантным методом.

Соответственно, фосфолипаза может быть получена из микроорганизма путем применения любого подходящего метода. Например, препарат фермента фосфолипазы может быть получен путем ферментации подходящего микроорганизма и последующего выделения фосфолипазы из полученной в результате жидкой ферментационной среды или из микроорганизма способами, известными в данной области техники. Фосфолипаза может быть также получена с использованием методов рекомбинантных ДНК. Такой способ обычно включает культивирование клетки-хозяина, трансформированной рекомбинантным ДНК-вектором, содержащим последовательность ДНК, кодирующую интересующую фосфолипазу, и последовательность ДНК, функционально связанную с соответствующим сигналом экспрессии таким образом, что эта клетка способна к экспрессии фосфолипазы в культуральной среде в условиях, допускающих экспрессию фермента и извлечение фермента из культуры. Последовательность ДНК может быть также встроена в геном клетки-хозяина. Последовательность ДНК может иметь геномное, кДНК или синтетическое происхождение или любые их комбинации и может быть выделена или синтезирована в соответствии с известными в данной области техники способами. Такая фосфолипаза может быть очищенной. В используемый в настоящем документе термин "очищенный" входит фермент фосфолипаза, не содержащий компонентов организма, из которого он получен. В используемый в настоящем документе термин "очищенный" также входит фермент фосфолипаза, не содержащий компонентов организма, из которого он получен; его также обозначают термином "по существу чистая" фосфолипаза, и он может быть особенно подходящим для фосфолипаз, встречающихся в природе и не модифицированных генетически, например, путем делеции, замены или вставки одного или более аминокислотных остатков. Очистку можно выполнять, например, путем фильтрации, осаждения или хроматографии.

Используемые в настоящей заявке фосфолипазы могут иметь любую подходящую форму, например форму сухого порошка или гранулята, не образующего пыль гранулята, жидкости, стабилизированной жидкости или защищенного фермента. Грануляты могут быть получены, например, как раскрыто в патенте США № 4106991 и в патенте США № 4661452, и могут быть возможно покрыты известными в данной области техники способами. Жидкие препараты фермента могут быть стабилизированы в соответствии с хорошо изученными способами, например, путем добавления стабилизаторов, таких как сахар, сахарный спирт или другой полиол, молочная кислота или другая органическая кислота. Защищенные ферменты могут быть получены в соответствии со способом, раскрытым в Европейском патенте № 238216.

Активность фосфолипазы можно определять как скорость расхода гидроксида натрия при нейтрализации жирной кислоты. Такая активность может быть выражена в единицах лецитазы (LEU) относительно стандартного образца лецитазы (фосфолипазы). Эти методики известны в данной области техники. Например, активность фосфолипазы A1 можно измерить относительно стандартного образца фосфолипазы, используя лецитин в качестве субстрата. Фосфолипаза A1 катализирует гидролиз лецитина до лизолецитина и свободной жирной кислоты. Высвободившуюся жирную кислоту титруют 0,1 н. раствором гидроксида натрия в стандартных условиях (рН 8,0;  $40^{\circ} \pm 0,5$ ). 1 LEU определяют как количество фермента, которое в стандартных условиях (рН 8,0;  $40^{\circ} \pm 0,5$ ) приводит к такой же скорости расхода гидроксида натрия (в микроэкв./мин), как стандартный образец лецитазы, разведенный до номинальной активности 1 LEU/г. Эту методику можно выполнять, используя либо автоматическую систему, либо стандартное лабораторное оборудование для проведения экспериментов по титрованию.

#### **Добавление фосфолипазы**

Фосфолипазу можно добавлять к молочной основе до, в начале или в течение периода ферментации. Выражение "в начале ферментации" означает за короткое время до, одновременно или спустя короткое время после добавления заквасочной культуры к молочной основе. В данном случае термин "короткое время" означает менее 30 мин. Выражение "в течение периода ферментации" означает любое время в течение периода ферментации после начала и до окончания ферментации.

В одном воплощении настоящего изобретения фосфолипазу добавляют к молочной основе до стадии ферментации. В другом воплощении настоящего изобретения фосфолипазу добавляют к молочной основе в начале стадии ферментации. В другом воплощении настоящего изобретения фосфолипазу добавляют к молочной основе в течение периода ферментации. Стадию ферментации можно останавливать путем обработки охлаждением.

Количество фосфолипазы для добавления к молочной основе зависит от ряда параметров, включая активность фосфолипазы и композицию молочной основы, например, содержание жира и т.д. Такое количество можно определить путем проведения стандартных экспериментов.

Подходящие условия для выполнения обработки фосфолипазой может определить специалист в данной области техники, используя хорошо известные в данной области техники методы оптимизации ферментативных реакций. Специалисту в данной области техники должно быть известно, как отрегулировать такие параметры, как рН, температура и количество липазы, для достижения требуемых результа-

тов с учетом требуемых свойств кисломолочного продукта. Количество фосфолипазы для применения в способе по изобретению может зависеть от активности конкретной фосфолипазы на присутствующих фосфолипидах в конкретных условиях обработки. Например, при применении фосфолипазы А, как показано в примере, количество добавляемой фосфолипазы может составлять от 0,1 до 50 LEU на один грамм жира, например от 0,5 до 25 или от 1 до 10 LEU на один грамм жира.

#### **Кисломолочные продукты**

Термин "кисломолочный продукт" является термином, по существу определенным в соответствии с действующими официальными нормативами и стандартами, хорошо известными в данной области техники. Выражение "кисломолочный продукт" означает пищевой или кормовой продукт, где в приготовлении этого пищевого или кормового продукта задействована ферментация молочной основы молочнокислой бактерией. При использовании в настоящем документе "кисломолочный продукт" включает без ограничений продукты, такие как термофильные кисломолочные продукты (например, йогурт) и мезофильные кисломолочные продукты (например, кислые густые сливки и пахта, а также кислая молочная сыворотка, кварк и мягкий сыр низкой жирности). В отличие от сырных продуктов кисломолочные продукты в целом имеют более низкий целевой pH в конце ферментации.

Более конкретно раскрытый в настоящем документе способ можно применять для получения термофильных кисломолочных продуктов, таких как йогурт и, в частности, термостатный йогурт, и мезофильных кисломолочных продуктов, таких как кварк.

В одном воплощении изобретения кисломолочный продукт представляет собой йогуртовый продукт. Термин "йогурт" имеет обычное значение и по существу определен в соответствии с действующими официальными нормативами и стандартами, хорошо известными в данной области техники. Йогуртовый продукт может быть выбран из группы, состоящей из "резервуарного продукта", "термостатного продукта" или "питьевого продукта".

"Резервуарный продукт" представляет собой кисломолочный продукт, который выдерживает механическую обработку после ферментации. Механическую обработку, как правило, но не исключительно, получают путем перемешивания, перекачивания насосом, фильтрования или гомогенизации геля или путем смешивания с другими ингредиентами. "Термостатный продукт" представляет собой продукт на основе молока, который засеян заквасочной культурой, упакован, и его ферментация осуществляется в упаковке. Термин "питьевой продукт" включает напитки, такие как "питьевой йогурт", "разбавленный питьевой йогурт" и подобные им, которые могут представлять собой молочный продукт, полученный путем ферментации под действием комбинации термофилов из различных видов лактобацилл и стрептококков.

В предпочтительном воплощении изобретения кисломолочный продукт выбран из группы, состоящей из кварка, сливочного сыра, мягкого сыра низкой жирности, греческого йогурта, соевого йогурта, скира, лабне, пахты, кислого молока, сквашенного молока, кефира, ласси, айрана, прессованного творога, тана, сметаны, якульта и дахи. Более предпочтительно кисломолочный продукт представляет собой кислое молоко, сквашенное молоко, кефир, ласси, айран, тан, якульт или дахи.

#### **Содержание белка**

Кисломолочные продукты, полученные раскрытым в настоящем документе способом, могут содержать белок в концентрации от 0,5% по массе до 10% по массе. Кисломолочный продукт может также представлять собой продукт с низким содержанием белка, в котором концентрация белка составляет от 1% по массе до 4,0% по массе. Альтернативно кисломолочный продукт может представлять собой продукт с высоким содержанием белка, в котором концентрация белка составляет более 3,5% по массе.

В конкретном воплощении изобретения молочная основа характеризуется содержанием белка (мас./мас.) менее 0,5%, менее 0,7%, менее 0,9%, менее 1,0%, менее 1,3%, менее 1,5%, менее 2,0%, менее 2,5%, менее 3,0%, менее 3,5%, менее 4,0%, менее 4,5%, менее 5,0%, менее 5,5%, менее 6,0%, менее 6,5%, менее 7,0%, менее 7,5%, менее 8,0%, менее 8,5%, менее 9,0%, менее 9,5%, менее 10,0%, менее 10,5%, менее 11,0%, менее 11,5%, менее 12,0%, менее 12,5%, менее 13,0%, менее 13,5%, менее 14,0%, менее 14,5% или менее 15,0%.

#### **Содержание жира**

Авторы настоящей заявки обнаружили положительные воздействия фосфолипаз на текстуру кисломолочных продуктов. Они наблюдали, что их воздействие тем больше, чем выше содержание жира в молочной основе, поэтому они особенно подходят для применения в продуктах ферментации, содержащих высокую концентрацию жира.

В конкретных воплощениях изобретения молочная основа характеризуется содержанием жира (мас./мас.) по меньшей мере 0,5%, например по меньшей мере 0,6%, по меньшей мере 0,7%, по меньшей мере 0,8%, по меньшей мере 0,9%, по меньшей мере 1,0%, по меньшей мере 1,1%, по меньшей мере 1,3%, по меньшей мере 1,5%, по меньшей мере 2,0%, по меньшей мере 2,5%, по меньшей мере 3,0%, по меньшей мере 3,5%, по меньшей мере 4,0%, по меньшей мере 4,5%, по меньшей мере 5,0%, по меньшей мере 5,5%, по меньшей мере 6,0%, по меньшей мере 6,5%, по меньшей мере 7,0%, по меньшей мере 7,5%, по меньшей мере 8,0%, по меньшей мере 8,5%, по меньшей мере 9,0%, по меньшей мере 9,5%, по меньшей мере 10,0%, по меньшей мере 10,5%, по меньшей мере 11,0%, по меньшей мере 11,5%, по



меньшей мере 12,0%, по меньшей мере 12,5%, по меньшей мере 13,0%, по меньшей мере 13,5%, по меньшей мере 14,0%, по меньшей мере 14,5% или по меньшей мере 15,0%. В некоторых воплощениях изобретения содержание жира составляет по меньшей мере 16,0%, по меньшей мере 17,0%, по меньшей мере 18,0%, по меньшей мере 19,0%, по меньшей мере 20,0%, по меньшей мере 21,0%, по меньшей мере 22,0%, по меньшей мере 23,0%, по меньшей мере 24,0%, по меньшей мере 25,0%, по меньшей мере 26,0%, по меньшей мере 27,0%, по меньшей мере 28,0%, по меньшей мере 29,0%, по меньшей мере 30,0%, по меньшей мере 35,0%, по меньшей мере 40,0%, по меньшей мере 45,0%, по меньшей мере 50,0% или более. Специалисту в данной области техники известно регулирование содержания жира в молочной основе, например, путем добавления к молочной основе сливок.

В предпочтительных воплощениях изобретения молочная основа характеризуется содержанием жира от 0,5 до 10,0% (мас./мас.), предпочтительно от 1,0 до 9,0%, предпочтительно от 3,0 до 7,0%, предпочтительно от 4,0 до 6,0% и более предпочтительно от 4,5 до 5,5%. Было обнаружено, что чем выше содержание жира, тем выше эффект фосфолипаз(ы) для текстуры.

#### **Гомогенизация**

Следуя положениям настоящего изобретения, можно обеспечить кисломолочные продукты, где уровень гомогенизации, обычно требующийся для таких продуктов, можно сократить или даже исключить, снижая тем самым эксплуатационные расходы производителя. Таким образом, в одном воплощении изобретения молочную основу, применяемую для приготовления такого продукта, не гомогенизируют. Тем не менее в некотором предпочтительном воплощении изобретения в зависимости от типов кисломолочных продуктов молочную основу можно все же гомогенизировать. Уровень гомогенизации предпочтительно составляет ниже 250 бар, в том числе менее 240 бар, менее 220 бар, менее 200 бар, менее 190 бар, менее 180 бар, менее 170 бар, менее 160 бар, менее 150 бар, менее 140 бар, менее 130 бар, менее 120 бар, менее 110 бар, менее 100 бар, менее 90 бар, менее 80 бар, менее 70 бар, менее 60 бар, менее 50 бар. В контексте настоящей заявки, если гомогенизацию проводят в несколько этапов, уровень гомогенизации относится к общему давлению, применяемому на всех этапах. Например, если гомогенизацию проводят в два этапа, первый при 120 бар, а второй при 60 бар, уровень гомогенизации молочной основы составляет 180 бар.

#### **Химозин**

Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что дополнительное добавление химозина (ЕС 3.4.23.4) может обладать преимуществом для улучшения текстуры кисломолочного продукта. Химозин представляет собой аспарагиновую протеазу, относящуюся к широкому классу пептидаз, и часто используется в производстве сыра в качестве молокосвертывающего фермента.

Бычий химозин, в частности телячий химозин, имеется в продаже, как в виде экстрактов ферментов желудка (сычуг; содержит нативно вырабатываемый химозин), так и в виде продуцируемого рекомбинантными методами химозина (который, как правило, экспрессируют в бактериальных, дрожжевых или грибных клетках-хозяевах) (см., например, WO 95/29999). Химозины других животных, кроме крупного рогатого скота, таких как *Camelus dromedarius*, или их варианты раскрыты в WO 2002036752, WO 2013174840 и WO 2015/128417. Предпочтительные химозины включают имеющиеся в продаже химозины, такие как CHY-MAX®, CHY-MAX® M и CHY-MAX® Plus (Chr. Hansen A/S, Дания).

В предпочтительном воплощении изобретения способ дополнительно включает стадию добавления химозина к молочной основе до, в начале или в течение периода ферментации. Количество химозина для добавления к молочной основе зависит от ряда параметров, включающих активность химозина, композицию молочной основы, например содержание белка, такое как содержание казеина, и т.д. Подходящие условия могут быть подобраны специалистом в данной области техники и в соответствии со способами, известными в данной области техники для оптимизации ферментативных реакций. Анализы по определению активности химозина известны в данной области техники. Ее можно измерять в соответствии со стандартизованным методом и выражать в международных молокосвертывающих единицах на грамм (International Milk Clotting Units (IMCU)/г).

В одном предпочтительном воплощении изобретения способ получения кисломолочного продукта включает добавление к молочной основе заквасочной культуры с по меньшей мере одним штаммом молочнокислых бактерий, ферментацию молочной основы в течение такого периода времени, чтобы достичь целевого pH, причем фосфолипазу и химозин добавляют к молочной основе одновременно или поочередно в начале периода ферментации.

В одном предпочтительном воплощении изобретения способ получения термофильного кисломолочного продукта включает добавление к молочной основе заквасочной культуры с по меньшей мере одним штаммом молочнокислых бактерий, ферментацию молочной основы в течение периода времени для достижения целевого pH, причем фосфолипазу и химозин добавляют к молочной основе по отдельности до начала периода ферментации.

Еще в одном предпочтительном воплощении изобретения способ получения йогуртового продукта включает добавление к молочной основе заквасочной культуры по меньшей мере с одним штаммом молочнокислых бактерий, ферментацию молочной основы в течение периода времени для достижения целевого pH, причем фосфолипазу и химозин добавляют к молочной основе одновременно в течение пе-

риода ферментации.

### **Хранение**

Кисломолочный продукт предпочтительно хранят в течение по меньшей мере двух дней, например по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 4 дней, более предпочтительно по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней и по меньшей мере 14 дней. В производстве свежих молочных продуктов продукты, как правило, достигают потребителя в пределах около 3-5 дней и, как правило, не позднее 7 дней после производства.

Используемый в настоящем документе термин "хранение" или "хранившийся" относится к выдерживанию продуктов в подходящих условиях до их отправки потребителям для потребления. Такие условия известны в промышленности и могут быть определены практикующим специалистом.

### **Набор**

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен набор, содержащий заквасочную культуру и одну или более фосфолипаз. Заквасочная культура содержит одну или более молочнокислых бактерий, полезных для получения кисломолочного продукта, как упоминается в настоящей заявке. Содержащиеся в наборе молочнокислые бактерии могут включать, например, бактерии *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. Они могут быть представлены в форме замороженных или лиофилизированных культур для размножения производственной закваски или так называемых культур "для прямого внесения" (Direct Vat Set; DVS), предназначенных для непосредственного засева сосуда или резервуара для ферментации для производства кисломолочного продукта. Фосфолипаза, включенная в набор, может представлять собой фосфолипазу А, фосфолипазу А1, фосфолипазу А2, фосфолипазу В или фосфолипазу С, либо их комбинацию. Набор может дополнительно содержать один или более химозинов.

### **Текстура кисломолочных продуктов**

В настоящем изобретении также предложено новое применение фосфолипазы для улучшения текстуры кисломолочных продуктов. Текстура может быть охарактеризована по реологическим свойствам хорошо известными в данной области техники методами, включающими измерение "напряжения сдвига (вязкости)" или "прочности геля" продукта. Единицей измерения СИ сдвигового напряжения и прочности геля является Паскаль (Па). Авторы изобретения наблюдали, что можно улучшить и прочность геля, и вязкость.

В конкретных воплощениях изобретения применение позволяет увеличить вязкость кисломолочного продукта, такого как йогурт, измеряемую при 13°C при скорости сдвига 60 1/с после 7 дней хранения.

Термин "напряжение сдвига" определяет вязкость. Вязкость (единицей измерения является Па в с) определяют как "напряжение сдвига" (Па)/скорость сдвига (1/с). Величину сдвигового напряжения можно регистрировать в различных точках. Эксперименты по определению органолептических свойств показали, что наилучшие корреляции между реологическими показателями и органолептическими свойствами обнаруживаются при измерении вязкости при скорости сдвига 60 1/с (высокая корреляция с первым вкусовым впечатлением) и при скорости сдвига 300 1/с (корреляция когезивности с трудностью при проглатывании).

"Прочность геля" кисломолочных продуктов можно измерять по так называемому качанию частоты, измеряя суммарный модуль ( $G^*$ ) геля в зависимости от частоты осцилляции. Величину  $G^*$  при 1,52 Гц можно использовать как "прочность геля" продукта. Вязкость продукта можно измерять путем измерения так называемой константы скорости, определяющей сдвиговое напряжение продукта в зависимости от скорости сдвига.

При получении кисломолочного продукта в соответствии с положениями настоящего изобретения можно достичь увеличения его вязкости или прочности геля, измеряемых при скорости сдвига 60 1/с или 300 1/с, по сравнению с контрольным продуктом, представляющим собой кисломолочный продукт, полученный таким же путем, но без применения фосфолипазы.

В одном воплощении применение фосфолипазы создает вязкость кисломолочного продукта, измеренную при скорости сдвига 60 1/с (Па), которая на по меньшей мере около 5% выше, на по меньшей мере около 10% выше, на по меньшей мере около 15% выше, на по меньшей мере около 20% выше, на по меньшей мере около 25% выше, на по меньшей мере около 30% выше, на по меньшей мере около 35% выше, на по меньшей мере около 40% выше, на по меньшей мере около 50% выше, чем вязкость, создаваемая в продукте, полученном без применения фосфолипазы.

В другом воплощении применение фосфолипазы создает вязкость кисломолочного продукта, измеренную при скорости сдвига 300 1/с (Па), которая на по меньшей мере около 5% выше, на по меньшей мере около 10% выше, на по меньшей мере около 15% выше, на по меньшей мере около 20% выше, на по меньшей мере около 25% выше, на по меньшей мере около 30% выше, на по меньшей мере около 35% выше, на по меньшей мере около 40% выше, на по меньшей мере около 50% выше, чем вязкость, создаваемая в продукте, полученном без применения фосфолипазы.

В другом воплощении применение фосфолипазы создает прочность геля ( $G^*$  при 1,52 Гц) кисломолочного продукта, которая на по меньшей мере около 5% выше, на по меньшей мере около 10% выше, на по меньшей мере около 15% выше, на по меньшей мере около 20% выше, на по меньшей мере около 25%

выше, на по меньшей мере около 30% выше, чем прочность геля, создаваемая в продукте, полученном без применения фосфолипазы.

В контексте описания изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) следует понимать, что использование терминов и аналогичных ссылок единственного числа охватывает как единственное, так и множественное число, если в настоящем документе не указано иное и нет явного противоречия контексту. Термины "включающий в себя", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует понимать в открытом смысле (т.е. в значении "включающий без ограничений"), если не отмечено иное. В настоящем документе указание диапазонов величин предназначено исключительно как способ сокращенного индивидуального обозначения каждой отдельной величины в пределах этого диапазона, если в настоящем документе не указано иное, и каждая отдельная величина включена в описание так же, как если бы она была указана в настоящем документе индивидуально. Все раскрытые в настоящем документе способы можно выполнять в любом порядке, если в настоящем документе не указано иное и нет явного противоречия контексту. Если не указано иное, все приведенные в настоящем документе точные величины являются представителями соответствующих приблизительных величин (например, все точные иллюстративные величины, приведенные в отношении конкретного фактора или показателя, можно считать также обозначающими соответствующий приблизительный показатель, в случае целесообразности измененный понятием "около"). Использование любых и всех приведенных в настоящем документе примеров или иллюстративных формулировок (например, "такой как") предназначено исключительно для лучшего освещения изобретения и не налагает ограничений на объем изобретения, если иное не указано в формуле изобретения. Ни одну формулировку в описании изобретения не следует рассматривать как указание на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического осуществления изобретения.

### Примеры

Описанное и заявленное в настоящем документе изобретение не должно быть ограничено объемом раскрытых в настоящем документе конкретных аспектов, поскольку эти аспекты предназначены в качестве иллюстрации нескольких аспектов изобретения. Любые эквивалентные аспекты предназначены для включения в объем данного изобретения. Действительно, на основании приведенного выше описания и следующих ниже примеров специалисту в данной области техники станут очевидными различные модификации изобретения в дополнение к показанным и раскрытым в настоящем документе. Такие модификации также предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения. В случае конфликта преимущество будут иметь определения настоящего описания изобретения.

#### Пример 1.

Готовили йогуртовые продукты, содержащие 1,5 или 5,0% жира. На 7-й и 30-й день проводили оценку влияния фосфолипазы на реологические свойства.

### Приготовление молочной основы

Для приготовления молочной основы для приведенных ниже примеров использовали сухое обезжиренное молоко и сухое цельное молоко (Fonterra Co-operative Group Limited, Новая Зеландия).

Таблица 1. Композиция молочной основы (мас./мас.)

Образец	Сухое обезжиренное молоко	Сухое цельное молоко	Вода
1	8,60%	5,30%	86,10%
2	8,60%	5,30%	86,10%
3	8,10%	9,00%	82,90%
4	8,10%	9,00%	82,90%

Ингредиенты смешивали с водой с помощью смесителя Silverson при 45-50°C. Время гидратации составляло 20 мин. Молочную основу гомогенизировали с помощью гомогенизатора GEA Lab в два этапа (первый этап 150 бар и второй этап 50 бар; всего: 200 бар) и пастеризовали при 85°C в течение 30 мин и охлаждали.

Заквасочная культура:

Заквасочная культура состояла из *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Фосфолипаза:

Фосфолипазу A1 (YieldMAX®PL производства Chr. Hansen A/S, Дания; средняя активность 2600 LEU/мл, дозировка 0,021650% на 5% жира) добавляли в начале ферментации. Содержание жира и белка определяли с помощью анализатора MilkoScan.

Ферментация:

Ферментацию проводили при 43°C в течение 4 ч и 50 мин, и был достигнут конечный pH  $4,55 \pm 0,05$ . Ферментированный продукт охлаждали после обработки посредством теплообменника пластинчатого типа до 23-25°C и доводили до однородности с помощью обратного клапана при давлении 1 бар на выходе из охладителя.

Образцы хранили в холодном помещении при температуре 5-7°C.

Таблица 2. Композиция и описание ферментации

Образец	Содержание белка	Содержание жира	Фосфолипаза	Конечный pH	Время ферментации
1	4,00%	1,50%	--	4,51	4 часа 50 мин
2	4,00%	1,50%	0,00345%	4,49	4 часа 50 мин
3	4,00%	5,00%	--	4,51	4 часа 50 мин
4	4,00%	5,00%	0,01265%	4,49	4 часа 50 мин

На 7-й и 30-й дни хранения образцы тестировали на вязкость и прочность геля.

#### Измерение сдвигового напряжения и прочности геля

Оценку реологических свойств образца проводили с помощью реометра (Anton Paar Modular Compact Rheometer MCR 302, Anton Paar® GmbH, Австрия). На время измерений реометр был установлен на постоянную температуру 13°C. Использовали программу Stirred\_oscillation+Up\_DownFlow.

Напряжение сдвига при 60 1/с и при 300 1/с было выбрано для анализа в связи с тем, что оно коррелировало с ощущением текстуры в полости рта (первое вкусовое впечатление) и когезивностью (при проглатывании кисломолочного продукта).

Оценку прочности геля (суммарный модуль  $G^*$  при 1,52) проводили с помощью реометра (Anton Paar Modular Compact Rheometer MCR 302, Anton Paar® GmbH, Австрия).

Результаты представлены ниже, а кривая гистерезиса показана на фиг. 1.

Таблица 3. Реологическая оценка образца на 7-й день

Образец	Первое вкусовое впечатление (вязкость при 60 1/с)	Когезивность
		Трудность при проглатывании (вязкость при 300 1/с)
1	422,71	119,44
2	475,66	128,50
3	907,30	196,31
4	1092,9	212,45

Таблица 4. Реологическая оценка образца на 30-й день

Образец	Первое вкусовое впечатление (вязкость при 60 1/с)	Когезивность
		Трудность при проглатывании (вязкость при 300 1/с)
1	412,25	110,38
2	495,85	128,72
3	966,16	202,41
4	1078,80	207,96

Как показано в табл. 3 и 4, вязкость образцов, обработанных фосфолипазой (образцы 2 и 4) при 60 1/с (первое вкусовое впечатление) и при 300 1/с (когезивность) была улучшена по сравнению с контрольными образцами (образцы 1 и 3). Эффекты были сильнее в образце с повышенным содержанием жира (образец 4).

Пример 2.

#### 1. Экспериментальная модель

Для проверки 5-ти описанных ниже факторов в 16-ти испытаниях был выбран дизайн факторного эксперимента с дробными репликами. Цель состоит в подтверждении эффекта фосфолипаз для текстуры в более обширном дизайне и в проверке статистической значимости, взаимодействия с уровнем давления гомогенизации и взаимодействия с ферментом химозином, а также взаимодействия с заквасочными культурами.

Таблица 5. Экспериментальная модель: факторы

Факторы кодировали ортогонально:

Факторы	-1	+1
1 — Давление гомогенизации	150 бар	300 бар
2 — Заквасочная культура	1	2
3 — Содержание белка	2,50%	4,50%
4 — Химозин	нет	есть
5 — Фосфолипаза	нет	есть

Таблица 6. Экспериментальная модель: дизайн

Номер испытания	Фактор 1 Давление гомогенизации	Фактор 2 Заквасочная культура	Фактор 3 Содержание белка	Фактор 4 Химозин	Фактор 5 Фосфолипаза
1	-	-	-	-	+
4	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+
7	-	+	+	-	+
2	+	-	-	+	+
3	-	+	-	+	+
5	-	-	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	-	-	-	+	-
10	+	-	-	-	-
11	-	+	-	-	-
12	+	+	-	+	-
13	-	-	+	-	-
14	+	-	+	+	-
15	-	+	+	+	-
16	+	+	+	-	-

Таблица 7. Структура совмещения

1	2345
2	1345
3	1245
4	1235
12	345
13	245
14	235
23	145
24	135
34	125
123	45
124	35
134	25
234	15
1234	5

Пятый фактор исследуют по взаимодействию третьего порядка ( $5 = 1234$ ). Таким образом, все взаимодействия первого порядка можно рассчитать с достаточной точностью с учетом высокой вероятности очень незначительного или пренебрежимо малого взаимодействия второго порядка.

## 2. Методика

Йогуртовые продукты, содержащие 5% жира, готовили с различными параметрами.

Приготовление молочной основы:

Для приготовления описанной ниже молочной основы использовали сухое обезжиренное молоко и сухие сливки (Fonterra Co-operative Group Limited, Новая Зеландия).

Таблица 8. Композиция молочной основы 1 (белок = 2,50%, жир = 5,00%)

Ингредиент	Доза (%)
Сухое обезжиренное молоко	3,39
Сухие сливки	9,07
Вода	87,54

Таблица 9. Композиция молочной основы 2 (белок = 4,50%, жир = 5,00%)

Ингредиенты	Доза (%)
Сухое обезжиренное молоко	9,68
Сухие сливки	8,98
Вода	81,34

Сухое обезжиренное молоко, сухие сливки и воду смешивали с помощью смесителя Silverson при 8-10°C в течение по меньшей мере 2 ч. Молочную основу гомогенизировали с помощью гомогенизатора GEA Lab. В зависимости от модели эксперимента гомогенизацию проводили при 150 бар (первый этап 120 бар и второй этап 30 бар) или при 300 бар (первый этап 240 бар и второй этап 60 бар). Затем гомогенизированную молочную основу пастеризовали при 85°C в течение 30 мин и охлаждали.

#### Пастеризация и ферментация

В зависимости от модели эксперимента в начале ферментации вместе с заквасочной культурой добавляли фосфолипазу и/или химозин.

#### Заквасочная культура

Использовали заквасочную культуру из примера 1 (заквасочная культура 1, уровень -1). Для сравнения включали вторую заквасочную культуру (заквасочная культура 2, уровень +1) с другой кинетикой ферментации. Обе заквасочные культуры состояли из *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

#### Фосфолипаза и химозин

Фосфолипаза A1 (YieldMAX®PL производства Chr. Hansen A/S, Дания; средняя активность 2600 LEU/мл, дозировка 0,021650% на 5% жира)

Бычий химозин (CHY-MAX® Plus производства Chr. Hansen A/S, Дания; средняя активность 200 IMCU/мл, дозировка 0,00026% для 2% казеина). Содержание жира и белка определяли с помощью анализатора MilkoScan.

Таблица 10. Композиция и описание ферментации образцов 1-16

Испытание	Гомогенизация (бар)	Заквасочная культура	Белок	Химозин (%)	Фосфолипаза (%)	Время ферм.	Конечный pH
1	150	1	2,50%	0	0,01265	3 ч 55 мин	4,47
2	300	1	2,50%	0,00026	0,01265	3 ч 55 мин	4,47
3	150	2	2,50%	0,00026	0,01265	4 ч 35 мин	4,52
4	300	2	2,50%	0	0,01265	4 ч 35 мин	4,54
5	150	1	4,50%	0,00046	0,01265	5 ч 30 мин	4,52
6	300	1	4,50%	0	0,01265	5 ч 00 мин	4,51
7	150	2	4,50%	0	0,01265	6 ч 25 мин	4,56
8	300	2	4,50%	0,00046	0,01265	6 ч 25 мин	4,52
9	150	1	2,50%	0,00026	0	4 ч 10 мин	4,52
10	300	1	2,50%	0	0	4 ч 10 мин	4,52
11	150	2	2,50%	0	0	4 ч 20 мин	4,54
12	300	2	2,50%	0,00026	0	4 ч 20 мин	4,55
13	150	1	4,50%	0	0	5 ч 00 мин	4,54
14	300	1	4,50%	0,00046	0	5 ч 00 мин	4,53
15	150	2	4,50%	0,00046	0	6 ч 35 мин	4,54
16	300	2	4,50%	0	0	6 ч 35 мин	4,53

Ферментацию проводили при 43°C до достижения pH  $4,55 \pm 0,05$ . Регистрировали время ферментации. Ферментированный продукт охлаждали после обработки посредством теплообменника пластинчатого типа до 23-25°C и доводили до однородности с помощью обратного клапана при давлении 1 бар на выходе из охладителя.

Образцы хранили в холодном помещении при температуре 5-7°C.

Образцы после хранения на 7-й день тестировали на вязкость и прочность геля, как в примере 1. Результаты представлены ниже.

Таблица 11. Реологическая оценка образцов на 7-й день

	Гомогениза-ция (бар)	Заквасочная культура	Белок	Химозин (%)	Фосфолипаза (%)	Прочность геля (G*)	Вязкость при 60 1/с	Вязкость при 300 1/с
1	150	1	2,50%	0	0,01265	129,22	425,4	97,0
2	300	1	2,50%	0,00026	0,01265	230,46	578,0	110,9
3	150	2	2,50%	0,00026	0,01265	198,86	715,3	150,6
4	300	2	2,50%	0	0,01265	156,17	633,7	168,3
5	150	1	4,50%	0,00046	0,01265	725,84	1559,6	261,2
6	300	1	4,50%	0	0,01265	531,91	1378,3	275,3
7	150	2	4,50%	0	0,01265	527,07	1745,6	375,4
8	300	2	4,50%	0,00046	0,01265	814,83	2255,2	416,2
9	150	1	2,50%	0,00026	0	173,49	441,4	88,1
10	300	1	2,50%	0	0	156,15	454,4	100,1
11	150	2	2,50%	0	0	128,64	538,7	139,1
12	300	2	2,50%	0,00026	0	218,96	726,7	154,6
13	150	1	4,50%	0	0	387,86	1066,2	237,4
14	300	1	4,50%	0,00046	0	779,04	1694,5	292,9
15	150	2	4,50%	0,00046	0	655,44	1816,1	354,5
16	300	2	4,50%	0	0	561,71	1889,3	387,7

Реологические ответы анализируют с использованием анализа пошаговой регрессии с многолинейной моделью, включающей основные эффекты и взаимодействия первого порядка:

Ответ = cste + a.F1 + b.F2 + c.F3 + d.F4 + e.F5 + f.F1 .F2 + g F1 .F3... Все эффекты, где риск ошибки составлял 5% (значение P более 0,05), были исключены.

Вязкость при 60 1/с

Сводные данные модели:

S	R-sq	R-sq (корр.)	R-sq (предп.)
46,9055	99,78%	99,44%	98,41%

Эта модель объясняет более 98% экспериментальной вариации.

Коэффициенты:

Показатель	Коэф.	SE коэф.	Значение T	Значение P
Константа	1119,9	11,7	95,50	0,000
Гомоген.	81,4	11,7	6,94	0,000
Культура	170,2	11,7	14,51	0,000
Белок	555,7	11,7	47,39	0,000
Химозин	103,5	11,7	8,82	0,000
Фосфолипаза	41,5	11,7	3,54	0,012
Гомог.*Белок	47,4	11,7	4,04	0,007
Гомог.*Фосф.	-31,5	11,7	-2,68	0,036
Культ.*Белок	80,8	11,7	6,89	0,000
Белок*Хим.	52,3	11,7	4,46	0,004

Эффекты различных факторов представлены графически на фиг. 2.

Вязкость при 300 1/с

Сводные данные модели:

S	R-sq	R-sq (корр.)	R-sq (предп.)
8,81291	99,64%	99,41%	98,87%

Эта модель объясняет более 98% экспериментальной вариации.

Коэффициенты:

Показатель	Коэф.	SE коэф.	Значение T	Значение P
Константа	225,57	2,20	102,38	0,000
Гомоген.	12,68	2,20	5,75	0,000
Культура	42,71	2,20	19,39	0,000
Белок	99,49	2,20	45,16	0,000
Фосф.	6,28	2,20	2,85	0,019
Гом.*Белок	5,29	2,20	2,40	0,040
Культ.*Белок	15,67	2,20	7,11	0,000

Эффекты различных факторов представлены графически на фиг. 3.

Прочность геля на 7-й день (G\*)

Сводные данные модели:

S	R-sq	R-sq (корр.)	R-sq (предп.)
9,66033	99,96%	99,86%	99,38%

Эта модель объясняет более 99% экспериментальной вариации.

Коэффициенты:

Показатель	Коэф.	SE коэф.	Значение Т	Значение Р
Константа	398,48	2,42	165,00	0,000
Гомоген.	32,68	2,42	13,53	0,000
Культура	9,23	2,42	3,82	0,019
Белок	224,48	2,42	92,95	0,000
Химозин	76,14	2,42	31,53	0,000
Фофолипаза	15,82	2,42	6,55	0,003
Гомог.*Белок	16,23	2,42	6,72	0,003
Гомог.*Фосф.	-13,63	2,42	-5,64	0,005
Культ.*Белок	7,57	2,42	3,13	0,035
Культ.*Хим.	-11,82	2,42	-4,90	0,008
Белок*Хим.	44,69	2,42	18,50	0,000
Белок*Фосф.	11,13	2,42	4,61	0,010

Как очевидно на основании приведенных выше данных, влияние фосфолипазы, измеренное в обеих точках измерения вязкости, было подтверждено на высоком уровне значимости (значение  $p = 0,012$  и  $0,019$ ), что свидетельствует о ее положительном эффекте для вкусовых впечатлений и когезивности. Эффект фосфолипазы был выше при более низком уровне гомогенизации (значимое отрицательное взаимодействие, значение  $p = 0,036$ ). Максимальный прирост вязкости составляет +145 мПа с при уровне гомогенизации 150 бар. Взаимодействия с культурой не наблюдалось; по-видимому, фосфолипаза действует одинаково независимо от кинетики ферментации. Отсутствие отрицательного взаимодействия между фосфолипазой и химозином показывает, что их сочетанный эффект является исключительно аддитивным, и максимальный прирост может достигать +457 мПа·с. Это подтверждает, что добавление химозина может способствовать дополнительному улучшению текстуры.

Что касается ответа прочности геля, можно наблюдать подобные сильные эффекты и сделать те же выводы.

Пример 3.

Готовили соевый йогурт, содержащий 2,03% жира и 4,05% белка. На 7-й день проводили оценку влияния фосфолипазы на реологические свойства.

Таблица 12. Композиция, используемая для приготовления соевого йогурта (мас./мас.)

Ингредиент	Спецификация	Доза (%)
Порошок китайской сои	Redman	22,50
Сахар	KSL, рафинированный сахар	5,00
Вода	City Water, PUB	72,50

Таблица 13. Образцы примера 3

Образец	Культура	Доза	Фермент	
S1	YF-L DA01	200 Ед./МТ	-	
S2	YF-L DA01	200 Ед./МТ	Yieldmax® PL	0,0046%

### Пастеризация и ферментация

В зависимости от модели эксперимента фосфолипазу добавляли до, в начале или в течение периода ферментации.

В примере 3 использовали описанный ниже метод. Композицию, представленную в табл. 12, смешивали с помощью смесителя Silverson. Температура смешивания/время гидратации составляли 45-50°C/20 мин. Гомогенизацию проводили с помощью гомогенизатора GEA Lab с подогревом до 65-70°C, и давление составляло 150 бар для 1-го этапа и 50 бар для 2-го этапа и суммарно составляло 200 бар. Процесс проводили на водяной бане Scandinox в условиях пастеризации 85°C/30 мин и при температуре охлаждения менее 10°C. Ферментацию проводили на водяной бане Scandinox при температуре 43°C и конечном pH  $4,55 \pm 0,05$ .

Последующая обработка соевого йогурта состояла в следующем: использовали экспериментальную технологическую установку (PTU) с обратным давлением 1,0 бар и температурой охлаждения 23-25°C.

Реологические исследования образцов, полученных в примере 3, проводили, как описано ниже. Реологические исследования проводили с помощью модульного компактного реометра Anton Paar MCR 302. Температура измерения составляла 13°C, а используемая программа представляла собой программу Stirred oscillation+Up\_DownFlow.



Таблица 14. Описание ферментации

Рецептура	S1	S2
Конечный pH	4,60	4,58
Время ферментации	9 ч 10 мин	9 ч 10 мин
pH при D+7	4,52	4,53

Таблица 15. Осцилляция и кривая гистерезиса после периода хранения D+7 дней

Срок хранения	Образец	Осцилляция	Кривая гистерезиса			Площадь
		G* при 1,52 Гц (Па)	Vis pt 1	Vis pt 5	Vis pt 21	
D+7	S1	452,43	74453	1178,8	295,65	6396,17
	S2	537,42	86539	1342,8	317,83	7145,82

Vis pt 1: Вязкость (мПа·с) при 0,271 1/с (исходное состояние, сопротивление при заборе йогурта ложкой)

Vis pt 5: Вязкость при 60 1/с (хорошо коррелирует с ощущением текстуры в полости рта)

Vis pt 21: Вязкость при 60 1/с (когезивность (трудность при проглатывании)/густота в полости рта)

Площадь гистерезиса: коррелирует с сопротивлением сдвигу.

Осцилляция G\* при 1,52 Гц: коррелирует с прочностью геля

Как очевидно из приведенных выше данных для соевого йогурта, добавление фосфолипазы (YieldMAX®PL) оказывает положительный эффект для текстуры соевого йогурта, при этом Vis pt 5 образца S2 на 13,9% выше по сравнению с S1.

Органолептическая оценка соевого йогурта показала, что S2 характеризовался более густой кремообразной текстурой и меньшей остротой вкуса по сравнению с S1. Таким образом, добавление фосфолипазы (YieldMAX®PL) улучшает текстуру и вкус соевого йогурта.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение фосфолипазы А для повышения вязкости продукта, выбранного из ферментированного продукта на основе молока млекопитающего и ферментированного продукта на растительной молочной основе.

2. Применение по п.1, включающее процесс получения продукта, включающий стадии:

а) добавление к молочной основе, характеризующейся содержанием жира по меньшей мере 1,5% (мас./мас.), заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один штамм кисломолочной бактерии,

б) ферментация молочной основы в течение периода времени до достижения целевого pH, где целевой pH составляет 5,0 или ниже, и

в) добавление к молочной основе по меньшей мере одной фосфолипазы А в начале периода ферментации, где молочная основа представляет собой основу из молока млекопитающего или растительную молочную основу.

3. Применение фосфолипазы А и химозина (ЕС 3.4.23.4) для повышения вязкости продукта, выбранного из ферментированного продукта на основе молока млекопитающего и ферментированного продукта на растительной молочной основе.

4. Применение по п.3, включающее процесс получения продукта, включающий стадии:

а) добавление к молочной основе, характеризующейся содержанием жира по меньшей мере 1,5% (мас./мас.), заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один штамм кисломолочной бактерии,

б) ферментация молочной основы в течение периода времени до достижения целевого pH, где целевой pH составляет 5,0 или ниже, и

в) добавление к молочной основе по меньшей мере одной фосфолипазы А в начале периода ферментации, и дополнительно включающий добавление к молочной основе химозина (ЕС 3.4.23.4) до, в начале или в течение периода ферментации, где молочная основа представляет собой основу из молока млекопитающего или растительную молочную основу.

5. Применение по любому из пп.1-4, где фосфолипаза представляет собой фосфолипазу А1 (ЕС 3.1.1.32).

6. Применение по любому из пп.1-4, где фосфолипаза представляет собой фосфолипазу А2 (ЕС 3.1.1.4).

7. Применение по любому из пп.2 и 4-6, где целевой pH составляет 4,6 или ниже.

8. Применение по любому из пп.2 и 4-7, где молочная основа характеризуется содержанием жира по меньшей мере 2,0% (мас./мас.).

9. Применение по любому из пп.2 и 4-8, где молочнокислые бактерии выбраны из группы, состоящей из бактерий родов *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc*.

10. Применение по п.2 или 4, где заквасочная культура содержит по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*.

11. Применение по любому из пп.1-10, где ферментированный продукт на основе молока млекопитающего выбран из группы, состоящей из квarka, сливочного сыра, мягкого сыра низкой жирности, кислого молока, сквашенного молока, кефира, ласси, айрана, тана, якульта, дахи, и ферментированный продукт на растительной молочной основе представляет собой соевый йогурт.

12. Применение по любому из пп.2 и 4-11, где молочную основу гомогенизируют при 150 бар ( $15 \times 10^6$  Па) или менее.

13. Продукт, выбранный из ферментированного продукта на основе молока млекопитающего и ферментированного продукта на растительной молочной основе, полученный при применении по любому из пп.1-12, содержащий лизофосфолипиды и имеющий вязкость, которая по меньшей мере на 5% выше, чем вязкость продукта, полученного без применения фосфолипазы.

14. Набор для получения продукта по п.13, содержащий по меньшей мере одну фосфолипазу А и заквасочную культуру, содержащую по меньшей мере один штамм кислomолочной бактерии.



