

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045126**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.30

(21) Номер заявки
201892599

(22) Дата подачи заявки
2017.06.07

(51) Int. Cl. *A23C 9/12* (2006.01)
A23C 9/154 (2006.01)
A23C 9/156 (2006.01)

(54) **ФЕРМЕНТИРОВАННЫЙ МОЛОЧНЫЙ ПРОДУКТ С Пониженным
СОДЕРЖАНИЕМ ЛАКТОЗЫ**

(31) **16174288.7; 16194075.4**

(32) **2016.06.14; 2016.10.17**

(33) **EP**

(43) **2019.05.31**

(86) **PCT/EP2017/063814**

(87) **WO 2017/216000 2017.12.21**

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

(72) Изобретатель:
**Риис Соэрен Нг, Войнович Воислав,
Гиллеладен Кристиан (DK)**

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

(56) **WO-A1-2009071539**

(57) Кисломолочный продукт, который имеет рН от 3,0 до 5,0 и содержание лактозы по меньшей мере 1,5 мг/мл, содержащий лактазу, которая сохраняет свою активность при рН 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном рН лактазы.

045126

B1

045126

B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к кисломолочному продукту с пониженным содержанием лактозы.

Предшествующий уровень техники

В WO 2009/071539 раскрыта лактаза, происходящая из *Bifidobacterium bifidum*, которая способна к очень эффективному гидролизу в молоке, и которая является активной в широком интервале pH, включая низкий pH, например pH менее 5. Эта лактаза может использоваться в процессах производства молока и ферментированных молочных продуктов, таких как сыр, йогурт, масло, пахта, сметана и т.д., для уменьшения содержания лактозы.

В WO 2013/160413 раскрыт способ производства ферментированного молочного продукта с использованием комбинации глюкозонегативных штаммов молочнокислых бактерий и традиционной лактазы с целью уменьшения содержания лактозы в ферментированном молочном продукте при увеличении содержания глюкозы.

В EP-A1-2957180 раскрыт способ производства ферментированного молочного продукта с использованием комбинации заквасочных культур и традиционной лактазы с целью уменьшения содержания лактозы и уровня последующего закисления в ферментированном молочном продукте.

Краткое изложение сущности изобретения

Целью настоящего изобретения является предложение улучшенного кисломолочного продукта с пониженным содержанием лактозы.

Цель настоящего изобретения достигается посредством кисломолочного продукта, который имеет pH от 3,0 до 5,0 и содержание лактозы по меньшей мере 1,5 мг/мл, где указанный продукт содержит лактазу, которая сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы pH.

Настоящее изобретение предоставило возможность осуществления модификации лактозосодержащего пищевого продукта с pH от 3,0 до 5,0 в фазе хранения при температуре окружающей среды, т.е. без необходимости охлаждения, после завершения производства в месте производства, например, во время транспортировки и хранения на предприятии розничной торговли, таким образом, чтобы снизить уровень лактозы. Настоящее изобретение основано на признании того, что для продукта, имеющего низкий pH и предназначенного для транспортировки и хранения при температуре окружающей среды, например, ферментированных молочных продуктов после пастеризации, возможно осуществлять уменьшение содержания лактозы после завершения производства в месте производства посредством добавления лактазы, активной при низком pH, и после завершения обычного способа производства пищевого продукта, и позволяя лактазе превращать лактозу в галактозу и глюкозу во время последующих фаз жизни продукта вплоть до его конечного потребления конечным потребителем. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает получение стадии превращения лактозы простым и рентабельным способом вне места производства, и, следовательно, способ производства ферментированного молочного продукта в месте производства может быть упрощен посредством исключения стадии завершения превращения лактозы, посредством этого сохраняя время жизни и производительность производственного оборудования.

Кроме того, при добавлении лактазы после термической обработки ферментированного молочного продукта можно использовать менее количество лактазы, чем когда лактаза является активной во время ферментации, поскольку может обеспечиваться активность лактазы в течение длительного периода времени, в то время как в случае способа ферментации в производстве желательно осуществить этот способ как можно быстрее для того, чтобы снизить затраты. Большая часть лактазы будет инактивироваться во время термической обработки, и, следовательно, не будет активной после термической обработки. Таким образом, настоящее изобретение предоставило возможность уменьшения количества лактазы, необходимой для достижения удаления лактозного содержимого ферментированного молочного продукта. Также, при добавлении лактазы после термической обработки ферментированного молочного продукта уровень реакции Майяра, вызванной термической обработкой ферментированного молочного продукта, снижается, так как лактоза приводит к реакции Майяра в меньшей степени, чем углеводные метаболиты лактозы. Наконец, при добавлении лактазы после термической обработки ферментированного молочного продукта можно избежать любого вредного эффекта молочнокислых бактерий, используемых при ферментации, на активность лактазы.

Во всем мире значительное число потребителей не переносят или являются чувствительными к лактозе. Следовательно, в настоящее время существует высокий спрос на молочные продукты, включая ферментированные молочные продукты, с пониженным содержанием лактозы, или которые по существу не содержат лактозу. В настоящем изобретении предложен новый подход для производства такого продукта простым и рентабельным способом.

Подробное описание изобретения

Лактаза.

Лактаза ферментированного молочного продукта по изобретению может представлять собой любую лактазу, которая сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы pH.

Согласно настоящему изобретению активность лактазы в LAU (единицах лактазной активности) измеряется, как определено в разделе "Определения" ниже.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения лактаза сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 10%, предпочтительно по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы pH.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения лактаза сохраняет свою активность при pH 4,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5%, предпочтительно по меньшей мере 10%, более предпочтительно по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы pH.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения лактаза сохраняет свою активность при pH 3,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5%, предпочтительно по меньшей мере 10%, более предпочтительно по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы pH.

Согласно настоящему изобретению оптимальный pH лактазы определяют посредством измерения лактазной активности при различных pH с использованием способа, указанного ниже в разделе "Определения", и определения pH с оптимальной активностью. В частности, лактазную активность при разных pH измеряют в М-буфере и при 37°C. Альтернативно, лактазную активность, указанную в настоящей заявке как процентную долю от активности при оптимальном для лактазы pH, рассматривают как процентную долю лактазной активности при pH 6,5.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения лактаза сохраняет свою активность при температуре 10°C и pH 6,0 на уровне по меньшей мере 10%, по сравнению с ее активностью при оптимальной для лактазы температуре. Предпочтительно лактаза сохраняет свою активность при температуре 10°C и pH 6,0 на уровне по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80% по сравнению с ее активностью при оптимальной для лактазы температуре.

Согласно настоящему изобретению оптимальную температуру лактазы определяют посредством измерения лактазной активности при различных температурах с использованием способа, указанного ниже в разделе "Определения", и определения температуры с оптимальной активностью. Альтернативно, лактазную активность, указанную в настоящей заявке в виде процентной доли активности при оптимальной для лактазы температуре, рассматривают как процентную долю лактазной активности при температуре 37°C.

В предпочтительном воплощении лактаза, которая должна использоваться в продукте по настоящему изобретению, имеет лактазную активность при 37°C и pH 5, которая составляет по меньшей мере 55%, как, например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 75% от ее лактазной активности при 37°C и pH 6.

В другом предпочтительном воплощении лактаза, которая должна использоваться в продукте по настоящему изобретению, имеет лактазную активность при 37°C и pH 4,5, которая составляет по меньшей мере 10%, как, например, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35% или по меньшей мере 40% от ее лактазной активности при 37°C и pH 6.

В другом предпочтительном воплощении лактаза, которая должна использоваться в продукте по настоящему изобретению, имеет оптимум pH лактазной активности при 37°C, который выше pH 5,5.

В другом предпочтительном воплощении лактаза, которая должна использоваться в продукте по настоящему изобретению, имеет лактазную активность при температуре 52°C и pH 6,5, которая составляет по меньшей мере 50%, как, например, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80% от ее лактазной активности при температуре 38°C и pH 6,5.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения K_m (константа Михаэлиса) лактазы при 5°C составляет менее 25 мМ, например менее 20 мМ, менее 15 мМ или менее 10 мМ. В другом предпочтительном воплощении K_m лактазы при 37°C составляет менее 25 мМ, например менее 20 мМ или менее 15 мМ. Специалисту будет известно как определять K_m для лактазной активности при конкретной температуре. K_m может быть определена способом, описанным в WO 2009/071539.

В другом предпочтительном воплощении при гидролизе лактозы в молочном продукте данный фермент имеет отношение лактазной к трансгалактозилазной активности больше, чем 1:1, например больше, чем 2:1, или больше, чем 3:1. В другом предпочтительном воплощении ферментативную обра-

ботку проводят в условиях, когда лактазная активность у фермента выше, чем трансгалактозилазная активность, например по меньшей мере в два раза выше или по меньшей мере в три раза выше.

Отношение лактазной к трансгалактозилазной активности в молочном продукте, например, может быть определено анализом HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография). В другом предпочтительном воплощении ферментативную обработку проводят в условиях, когда по меньшей мере 50% (% мас./мас.) гидролизованной лактозы превращается в свободную галактозу. В другом предпочтительном воплощении ферментативную обработку проводят в условиях, когда гидролизованная лактоза превращается в равные количества свободной глюкозы и свободной галактозы.

Лактаза в контексте настоящего изобретения представляет собой гликозидгидролазу, имеющую способность гидролизовать дисахарид лактозу на составляющие мономеры - галактозу и глюкозу. Группа лактаз, к которой принадлежит лактаза по изобретению, содержит ферменты, приписанные к подклассу ЕС 3.2.1.108, но не ограничивается ими. Ферменты, приписанные к другим подклассам, таким как, например, ЕС 3.2.1.23, также могут представлять собой лактазы в контексте настоящего изобретения. Лактаза в контексте настоящего изобретения может иметь другие активности, отличные от лактозогидролизующей активности, такие как, например, трансгалактозилирующая активность. В контексте настоящего изобретения лактозогидролизующая активность лактазы может называться ее лактазной активностью или ее бета-галактозидазной активностью.

Ферменты, имеющие лактазную активность, которые должны использоваться в способе по настоящему изобретению, могут иметь животное, растительное или микробное происхождение. Предпочтительные лактазы получают из микробных источников, в частности из нитчатого грибка, или дрожжей, или из бактерии.

Этот фермент, например, может происходить из штамма *Agaricus*, например *A. bisporus*; *Ascovaginopora*; *Aspergillus*, например *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. oryzae*; *Candida*; *Chaetomium*; *Chaetotomastia*; *Dictyostelium*, например *D. discoideum*; *Kluveromyces*, например *K. fragilis*, *K. lactis*; *Mucor*, например *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, например *N. crassa*; *Rhizomucor*, например *R. pusillus*; *Rhizopus*, например *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, например *S. libertiana*; *Torula*; *Torulopsis*; *Trichophyton*, например *T. rubrum*; *Whetzelinia*, например *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, например *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. novalis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis*; *Bifidobacterium*, например *B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis*; *Chryseobacterium*; *dtrobacter*, например *C. freundii*; *Clostridium*, например *C. perfringens*; *Diplodia*, например *D. gossypina*; *Enterobacter*, например *E. aerogenes*, *E. cloacae* *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, например *E. herbicola*; *Escherichia*, например *E. coli*; *Klebsiella* например, *K. pneumoniae*; *Miriococcum*; *Myrothesium*; *Mucor*; *Neurospora*, например *N. crassa*; *Proteus*, например *P. vulgaris*; *Providencia*, например *P. stuartii*; *Ruспорogus*, например *Ruспорogus cinnabarinus*, *Ruспорogus sanguineus*; *Ruminococcus*, например *R. torques*; *Salmonella*, например *S. typhimurium*; *Serratia*, например *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, например *S. flexneri*; *Streptomyces*, например *S. antibioticus*, *S. castaneoglobisporus*, *S. violeceoruber*; *Trametes*; *Trichoderma*, например *T. reesei*, *T. viride*; *Yersinia*, например *Y. enterocolitica*.

В предпочтительном воплощении лактаза происходит из бактерии, например, из семейства *Bifidobacteriaceae*, например из рода *Bifidobacterium*, например из штамма *B. bifidum*, *B. animalis* или *B. longum*. В более предпочтительном воплощении лактаза происходит из *Bifidobacterium bifidum*.

В предпочтительном воплощении фермент, имеющий лактазную активность, который должен использоваться в продукте по настоящему изобретению, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислот 28-1931 SEQ ID NO: 1, аминокислот 28-1331 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и их фрагментов с лактазной активностью. В более предпочтительном воплощении фермент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислот 28-1931 SEQ ID NO: 1, аминокислот 28-1331 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и их фрагментам с лактазной активностью.

Предпочтительным ферментом является лактаза, имеющая последовательность, которая по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична аминокислотам 28-1931 SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент с лактазной активностью. Такой фрагмент SEQ ID NO: 1 с лактазной активностью может представлять собой любой фрагмент SEQ ID NO: 1, имеющий лактазную активность. Фрагмент SEQ ID NO: 1 с лактазной активностью, например, может представлять собой аминокислоты 28-979, аминокислоты 28-1170, аминокислоты 28-1323, аминокислоты 28-1331 или аминокислоты 28-1600 SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном воплощении фермент, имеющий лактазную активность, который должен использоваться в продукте по настоящему изобретению, содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 50% идентичной аминокислотам 28-1331 SEQ ID NO: 2. В более предпочтительном воплощении этот фермент содержит аминокислотную последовательность, которая

является по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичной аминокислотам 28-1331 SEQ ID NO: 2.

В другом воплощении фермент, имеющий лактазную активность, который должен использоваться в продукте по настоящему изобретению, имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 50% идентичной SEQ ID NO: 3. Предпочтительно этот фермент имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичной SEQ ID NO: 3.

В другом воплощении фермент, имеющий лактазную активность, который должен использоваться в продукте по настоящему изобретению, имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 50% идентичной SEQ ID NO: 4. Предпочтительно данный фермент имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичной SEQ ID NO: 4.

Для целей настоящего изобретения степень идентичности между двумя аминокислотными последовательностями определяется с использованием алгоритма Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453) в том виде, в котором он осуществляется в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al. (2000) Trends in Genetics 16: 276-277), предпочтительно версии 3.0.0 или более поздней. Необязательные используемые параметры представляют собой gap open penalty (штраф за открытие пробела) 10, gap extension penalty (штраф за удлинение пробела) 0,5 и матрица замен EBLOSUM62 (EMBOSS версия BLOSUM62).

В качестве процента идентичности используется вывод данных Needle, отмеченный как "самая длинная идентичность" (полученный при использовании опции - no brief (не короткий)), и он рассчитывается следующим образом:

$(\text{Идентичные остатки} \times 100) / (\text{Длина выравнивания} - \text{Общее число пробелов в выравнивании})$

Конкретной имеющейся в продаже лактазой, подходящей для применения в настоящем изобретении, является лактаза F "Amano" 100SD, доступная от Amano Enzyme Europe.

Лактазы, которые должны использоваться в способе по настоящему изобретению, могут быть внеклеточными. Они могут иметь сигнальную последовательность на их N-конце, которая отщепляется во время секреции.

Лактазы, которые должны использоваться в способе по настоящему изобретению, могут происходить из любых упомянутых здесь источников. Термин "происходящий" в данном контексте означает то, что фермент может быть выделен из организма, где он присутствует в природе, т.е. природа аминокислотной последовательности фермента является идентичной нативному ферменту. Термин "происходящий" также означает то, что ферменты возможно были рекомбинантно продуцированы в организме-хозяине, причем рекомбинантно продуцированный фермент либо имеет природу, идентичную нативному ферменту, либо имеет модифицированную аминокислотную последовательность, например имеет одну или более чем одну аминокислоту, которая удалена, вставлена и/или заменена, т.е. представляет собой рекомбинантно продуцированный фермент, который является мутантом и/или фрагментом нативной аминокислотной последовательности. В пределы значения "нативный фермент" включены природные варианты. Кроме того, термин "происходящий" включает ферменты, продуцированные синтетически, например посредством пептидного синтеза. Термин "происходящий" также охватывает ферменты, которые были модифицированы, например посредством гликозилирования, фосфорилирования и т.д., либо *in vivo*, либо *in vitro*. В том, что касается рекомбинантно продуцированного фермента, термин "происходящий из" относится к природе фермента, а не к природе организма-хозяина, в котором он рекомбинантно продуцируется.

Лактаза может быть получена из микроорганизма посредством применения любой подходящей методики. Например, лактазный ферментативный препарат может быть получен посредством ферментации подходящего микроорганизма и последующего выделения препарата лактазы из образующегося ферментационного бульона или микроорганизма посредством способов, известных в данной области. Лактаза также может быть получена посредством применения технологий рекомбинантных ДНК. Такой способ обычно включает культивирование клетки-хозяина, трансформированной вектором на основе рекомбинантной ДНК, содержащим последовательность ДНК, кодирующую рассматриваемую лактазу, причем данная последовательность ДНК функционально связана с подходящим экспрессионным сигналом таким образом, что она способна экспрессировать лактазу в культуральной среде в условиях, обеспечивающих экспрессию этого фермента и выделение этого фермента из культуры. Эта последовательность ДНК также может быть включена в геном клетки-хозяина. Эта последовательность ДНК может быть геномной, представлять собой кДНК или иметь синтетическое происхождение, или представлять собой их любые комбинации, и может быть выделена или синтезирована согласно способам, известным в данной области.

Лактазы, которые должны использоваться в способе по настоящему изобретению, могут быть очищены. Термин "очищенный" в том виде, в котором он здесь используется, охватывает белок фермента

лактазы, по существу не содержащий нерастворимых компонентов из продуцирующего организма. Термин "очищенный" также охватывает белок фермента лактазы, по существу не содержащий нерастворимых компонентов из природного организма, из которого он получен. Предпочтительно он также отделен от некоторых из растворимых компонентов организма и культуральной среды, из которых он происходит. Более предпочтительно он отделяется посредством одной или более чем одной отдельной операции: фильтрование, осаждение или хроматография.

Соответственно, фермент, имеющий лактазную активность, может быть очищен, то есть присутствуют лишь незначительные количества других белков. Выражение "другие белки", в частности, относится к другим ферментам. Термин "очищенный" в том виде, как он здесь используется, также относится к удалению других компонентов, в частности, других белков и, наиболее конкретно, других ферментов, присутствующих в клетке происхождения лактазы. Лактаза может быть "по существу чистой", т.е. не содержащей других компонентов из организма, в котором она продуцируется, т.е., например, организма-хозяина для рекомбинантно продуцируемой лактазы. Предпочтительно лактаза представляет собой по меньшей мере 40%-ный (мас./мас.) чистый ферментативный белковый препарат, более предпочтительно имеющий по меньшей мере 50%-ную, 60%-ную, 70%-ную, 80%-ную или даже по меньшей мере 90%-ную чистоту.

Термин "фермент, имеющий лактазную активность" включает какие бы то ни было вспомогательные соединения, которые могут быть необходимыми для каталитической активности фермента, такие как, например, подходящий акцептор или кофактор, который может присутствовать или может не присутствовать в природе в реакционной системе.

Этот фермент может находиться в любой форме, подходящей для рассматриваемого применения, такой как, например, в форме сухого порошка или гранулята, непылящего гранулята, жидкости, стабилизированной жидкости или защищенного фермента.

Кисломолочный продукт.

В конкретном воплощении изобретения подкисленный продукт по изобретению имеет рН от 3,2 до 4,8, более предпочтительно от 3,4 до 4,6 и наиболее предпочтительно от 3,6 до 4,4.

В одном воплощении изобретения кисломолочный продукт представляет собой химически подкисленный молочный продукт. Подкисление могут проводить посредством любого подкисляющего агента, одобренного для пищевых продуктов, такого как молочная кислота, лимонная кислота, яблочная кислота, винная кислота, фосфорная кислота, фумаровая кислота, фруктовый сок, плодовая мякоть и фруктовый компаунд.

В другом воплощении изобретения кисломолочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт, полученный ферментацией с использованием заквасочной культуры. Заквасочная культура может быть любой традиционной заквасочной культурой молочнокислых бактерий, включая одноштаммовую культуру и смеси культур, используемой для получения конкретного типа ферментированного молочного продукта. Другие полезные бактерии, которые можно добавлять в продукт помимо заквасочной культуры включают пробиотические бактерии *Bifidobacterium spp.*

В предпочтительном воплощении изобретения ферментированный молочный продукт после ферментации был подвергнут термической обработке таким образом, чтобы снизить количество бактерий заквасочной культуры до не более чем 1×10^2 КОЕ (колониеобразующих единиц) на грамм, и лактаза была добавлена после термической обработки.

Заквасочная культура может представлять собой любую традиционную заквасочную культуру молочнокислых бактерий, включая одноштаммовую культуру и смеси культур, используемую для получения конкретного типа ферментированного молочного продукта. В предпочтительном воплощении продукта по изобретению ферментацию проводят таким образом, чтобы получить рН от 3,0 до 5,0, предпочтительно от 3,2 до 4,8, более предпочтительно от 3,4 до 4,6 и наиболее предпочтительно от 3,6 до 4,4.

Термическую обработку для снижения количества бактерий заквасочной культуры до не более чем $1,0 \times 10^2$ КОЕ/г ферментированного молока предпочтительно проводят посредством подвергания заквасочной культуры ферментированного молочного продукта воздействию температуры от 50°C до 110°C, предпочтительно от 50°C до 100°C, предпочтительно от 50°C до 90°C, предпочтительно от 60°C до 85°C, более предпочтительно от 65°C до 82°C, и наиболее предпочтительно от 70°C до 80°C. Термическую обработку предпочтительно проводят в течение периода от 5 секунд до 180 секунд, предпочтительно от 5 секунд до 120 секунд, более предпочтительно от 5 секунд до 90 секунд, более предпочтительно от 5 секунд до 60 секунд, более предпочтительно от 8 секунд до 50 секунд и наиболее предпочтительно от 10 до 40 секунд. Предпочтительно количество бактерий заквасочной культуры снижается до не более чем $1,0 \times 10$ КОЕ/г ферментированного молока, более предпочтительно до 0 КОЕ/г.

Фермент добавляется в количестве, подходящем для достижения требуемой степени гидролиза лактозы при выбранных реакционных условиях. В конкретном воплощении изобретения молочный продукт содержит лактазу в количестве от 100 до 20000 LAU на литр молочного продукта, предпочтительно от 100 до 10000 LAU на литр молочного продукта, предпочтительно от 100 до 5000 LAU на литр молочного продукта, предпочтительно менее, чем 3000, например менее, чем 1500, менее, чем 1000, менее, чем 750

или менее, чем 500 LAU на литр молочного продукта.

В предпочтительном воплощении лактазу добавляют в концентрации от 5 до 400 LAU на г лактозы в молочном продукте, предпочтительно от 5 до 200 LAU на г лактозы в молочном продукте, предпочтительно от 5 до 100 LAU на г лактозы в молочном продукте, предпочтительно менее, чем 50, например менее, чем 40, менее, чем 30, менее, чем 20 или менее, чем 10 LAU на г лактозы в молочном продукте.

В предпочтительном воплощении изобретения кисломолочный продукт имеет содержание лактозы от 2,0 мг/мл до 50 мг/мл, предпочтительно от 5 мг/мл до 48 мг/мл, более предпочтительно от 10 мг/мл до 46 мг/мл и наиболее предпочтительно от 20 мг/мл до 45 мг/мл.

В предпочтительном воплощении изобретения кисломолочный продукт содержит дополнительный пищевой продукт, выбранный из группы, состоящей из фруктового напитка, ферментированных злаковых продуктов, химически подкисленных злаковых продуктов, продуктов на основе соевого молока и любой их смеси.

Кисломолочный продукт обычно содержит белок в количестве от 2,0% по массе до 3,5% по массе. Кисломолочный продукт также может представлять собой продукт с низким содержанием белка - с уровнем белка от 1,0% по массе до 2,0% по массе. Альтернативно, молочнокислый продукт может представлять собой продукт с высоким содержанием белка - с уровнем белка более 3,5% по массе. В конкретном воплощении кисломолочный продукт по изобретению представляет собой смесь кисломолочного продукта и злакового продукта, например овсяного продукта, где указанный злаковый продукт может представлять собой ферментированный злаковый продукт, например ферментированный овсяный продукт.

В конкретном воплощении изобретения кисломолочный продукт содержит ферментированный злаковый продукт. Указанный ферментированный злаковый продукт может быть получен посредством размола зерен исходного злакового биологического материала с получением злаковой муки, которую затем подвергают ферментации. Ферментацию злаковой муки могут проводить с использованием тех же молочнокислых бактерий (заквасочной культуры), что и используемые для ферментации молочного субстрата, как описано в других местах в настоящей заявке.

В конкретном воплощении изобретения кисломолочный продукт содержит фруктовый напиток. Фруктовые напитки могут дополнительно содержать, например, овес, сою, миндаль, молочную сыворотку и/или неферментированное молоко, например в виде сухого молока.

В конкретном воплощении изобретения кисломолочный продукт по изобретению представляет собой химически подкисленный продукт. Подкисление могут проводить с использованием любого подкисляющего агента, подходящего для добавления в пищевые продукты, такого как молочная кислота, лимонная кислота, фруктовый сок, плодовая мякоть и фруктовый компаунд. В конкретном воплощении кисломолочный продукт подкисляется фруктовым соком.

В конкретном воплощении изобретения кисломолочный продукт содержит химически подкисленный злаковый продукт. Химически подкисленный злаковый продукт может быть получен посредством размола зерен исходного злакового биологического материала с получением злаковой муки, которую затем используют для получения водной суспензии, и pH указанной суспензии затем доводят до требуемого уровня.

Кисломолочный продукт, содержащий кислую сыворотку или пермеат кислой сыворотки.

В конкретном аспекте настоящего изобретения кисломолочный продукт содержит кислый сывороточный продукт, выбранный из группы, состоящей из кислой сыворотки и пермеата кислой сыворотки. В частности, кислый сывороточный продукт получают в результате концентрирования ферментированного молочного продукта с разделением его на концентрированную фракцию и отделенную фракцию кислой сыворотки.

Кислая сыворотка и пермеат кислой сыворотки представляют собой побочные продукты производства ряда молодых сыров, таких как домашний сыр, рикотта, скир, греческий йогурт, творог, творог-кварк и лабне. Кислая сыворотка и пермеат кислой сыворотки имеют pH менее, чем 5,1 в 10%-ном растворе, и исторически было трудно найти применение для побочных продуктов, например из-за их кислотности. Кислую сыворотку получают посредством концентрирования йогурта в сепараторе. Кислый пермеат получают концентрированием йогурта при ультрафильтрации.

Этот настоящий аспект изобретения предоставил возможность использования кислой сыворотки и пермеата кислой сыворотки с получением молочного продукта, например, молочного напитка. Данный аспект основывается на признании того, что кислая сыворотка и пермеат кислой сыворотки подходят для производства молочного продукта по изобретению с пониженным содержанием лактозы, так как производство данного продукта требует ферментативного гидролиза лактозы при низком pH.

В конкретном воплощении третьего аспекта способа по изобретению молочный продукт, ферментированный с использованием заквасочной культуры, подвергают стадии концентрирования для разделения молочного продукта, ферментированного с использованием заквасочной культуры, на концентрированную фракцию и отделенную фракцию кислой сыворотки, где отделенную фракцию кислой сыворотки, но не концентрированную фракцию, подвергают последующим этапам данного способа.

Способ получения ферментированного молочного продукта.

В первом аспекте настоящее изобретение также относится к способу получения кисломолочного

продукта, включающему стадии обеспечения базового кисломолочного продукта, который имеет рН от 3,0 до 5,0 и содержание лактозы по меньшей мере 1,5 мг/мл, добавление в указанный базовый кисломолочный продукт лактазы, которая сохраняет свою активность при рН 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы рН, с получением лактазосодержащего кисломолочного продукта, и хранение указанного лактазосодержащего кисломолочного продукта при температуре по меньшей мере 2°C в течение по меньшей мере 1 суток.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к способу получения кисломолочного продукта, включающему стадии обеспечения базового кисломолочного продукта, который имеет рН от 3,0 до 5,0 и содержание лактозы по меньшей мере 1,5 мг/мл, подвергание указанного базового кисломолочного продукта термической обработке таким образом, чтобы снизить количество бактерий до не более чем 1×10^2 КОЕ/г, с получением термически обработанного кисломолочного продукта, добавление в указанный термически обработанный кисломолочный продукт лактазы, которая сохраняет свою активность при рН 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы рН, с получением лактазосодержащего кисломолочного продукта, и хранение указанного лактазосодержащего кисломолочного продукта при температуре по меньшей мере 2°C в течение по меньшей мере 1 суток.

Другими словами, вторым аспектом является конкретное воплощение первого аспекта, включающее стадии подвергания базового кисломолочного продукта термической обработке, таким образом, чтобы снизить количество бактерий до не более чем 1×10^2 КОЕ/г, с получением термически обработанного кисломолочного продукта, добавление в указанный термически обработанный кисломолочный продукт лактазы, которая сохраняет свою активность при рН 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы рН, с получением лактазосодержащего кисломолочного продукта, и хранение указанного лактазосодержащего кисломолочного продукта при температуре по меньшей мере 2°C в течение по меньшей мере 1 суток.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему стадии ферментации молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий с получением ферментированного заквасочной культурой молочного продукта, который имеет рН от 3,0 до 5,0 и содержание лактозы по меньшей мере 1,5 мг/мл, подвергание указанного ферментированного заквасочной культурой молочного продукта термической обработке таким образом, чтобы снизить количество бактерий до не более чем 1×10^2 КОЕ/г, с получением термически обработанного ферментированного молочного продукта, добавление в указанный термически обработанный ферментированный молочный продукт лактазы, которая сохраняет свою активность при рН 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы рН, с получением лактазосодержащего ферментированного молочного продукта, и хранение указанного лактазосодержащего ферментированного молочного продукта при температуре по меньшей мере 2°C в течение по меньшей мере 1 суток.

Другими словами, третьим аспектом является конкретное воплощение первого аспекта, в котором полученный кисломолочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт, и где способ включает стадии ферментации молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий с получением ферментированного заквасочной культурой молочного продукта, который имеет рН от 3,0 до 5,0 и содержание лактозы по меньшей мере 1,5 мг/мл, подвергание указанного ферментированного заквасочной культурой молочного продукта термической обработке таким образом, чтобы снизить количество бактерий до не более чем 1×10^2 КОЕ/г, с получением термически обработанного ферментированного молочного продукта, добавление в указанный термически обработанный ферментированный молочный продукт лактазы, которая сохраняет свою активность при рН 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы рН, с получением лактазосодержащего ферментированного молочного продукта, и хранение указанного лактазосодержащего ферментированного молочного продукта при температуре по меньшей мере 2°C в течение по меньшей мере 1 суток.

В одном воплощении способа по изобретению кисломолочный продукт представляет собой химически подкисленный молочный продукт. В другом воплощении изобретения кисломолочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт, произведенный посредством ферментации с использованием заквасочной культуры.

В одном воплощении способа по изобретению базовый кисломолочный продукт или ферментированный заквасочной культурой молочный продукт может быть подвергнут термической обработке таким образом, чтобы снизить количество бактерий до не более чем 1×10^2 КОЕ/г. Такой термически обработанный подкисленный продукт также называют постпастеризованным продуктом, посредством чего указывается то, что данный продукт подвергали пастеризации после получения химически подкисленного молочного продукта или ферментированного молочного продукта. Такой термически обработанный подкисленный продукт не нужно хранить при низкой температуре, и, следовательно, он подходит для транспортировки и хранения при температуре окружающей среды.

Таким образом, в предпочтительном воплощении способа по изобретению лактазосодержащий подкисленный или ферментированный молочный продукт выдерживают при температуре по меньшей мере 5°C, предпочтительно по меньшей мере 10°C, более предпочтительно по меньшей мере 15°C и наиболее предпочтительно по меньшей мере 20°C.

В конкретном воплощении способа по изобретению лактазосодержащий подкисленный или ферментированный молочный продукт выдерживают в течение по меньшей мере двух суток, предпочтительно по меньшей мере 3 суток, более предпочтительно по меньшей мере 4 суток, более предпочтительно по меньшей мере 5 суток, более предпочтительно по меньшей мере 6 суток и наиболее предпочтительно по меньшей мере 7 суток.

В конкретном воплощении изобретения лактазосодержащий подкисленный или ферментированный молочный продукт имеет после выдерживания содержание лактозы менее, чем 40 мг/мл, предпочтительно менее, чем 35 мг/мл, более предпочтительно менее, чем 30 мг/мл, более предпочтительно менее, чем 25 мг/мл, более предпочтительно менее, чем 20 мг/мл, более предпочтительно менее, чем 15 мг/мл, более предпочтительно менее, чем 10 мг/мл, более предпочтительно менее, чем 5 мг/мл, более предпочтительно менее, чем 3 мг/мл и наиболее предпочтительно менее, чем 1,5 мг/мл.

Заквасочная культура может представлять собой любую традиционную заквасочную культуру молочнокислых бактерий, включая одноштаммовую культуру и смеси культур, используемую для производства конкретного типа ферментированного молочного продукта. В предпочтительном воплощении продукта по изобретению ферментация проводится таким образом, чтобы получить pH от 3,0 до 5,0, предпочтительно от 3,2 до 4,8, более предпочтительно от 3,4 до 4,6 и наиболее предпочтительно от 3,8 до 4,4.

Термическую обработку для снижения уровня бактерий заквасочной культуры до не более чем $1,0 \times 10^2$ КОЕ/г ферментированного молочного продукта предпочтительно проводят посредством подвергания молочного продукта, ферментированного заквасочной культурой, температуре от 50°C до 110°C, предпочтительно от 50°C до 100°C, предпочтительно от 50°C до 90°C, предпочтительно от 60°C до 85°C, более предпочтительно от 65°C до 82°C и наиболее предпочтительно от 70°C до 80°C. Термическую обработку предпочтительно проводят в течение периода от 5 секунд до 180 секунд, предпочтительно от 10 секунд до 180 секунд, предпочтительно от 12 секунд до 120 секунд, более предпочтительно от 14 секунд до 90 секунд, более предпочтительно от 16 секунд до 60 секунд, более предпочтительно от 18 секунд до 50 секунд и наиболее предпочтительно от 20 до 40 секунд. Предпочтительно количество бактерий заквасочной культуры снижается до не более чем 10 КОЕ/грамм ферментированного молока, более предпочтительно до 0 КОЕ/г. Ферментированные молочные продукты, подвергнутые термической обработке таким образом, чтобы снизить уровень бактерий до не более чем 1×10^2 КОЕ/г, подходят для применения с хранением при температуре окружающей среды, как, например, для хранения при температуре по меньшей мере 5°C, предпочтительно по меньшей мере 10°C, более предпочтительно по меньшей мере 15°C и наиболее предпочтительно по меньшей мере 20°C.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему стадии ферментации молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий с получением ферментированного заквасочной культурой молочного продукта, который имеет pH от 3,0 до 5,0 и содержание лактозы по меньшей мере 1,5 мг/мл, подвергание данного ферментированного заквасочной культурой молочного продукта термической обработке таким образом, чтобы снизить уровень бактерий до не более чем 1×10^8 КОЕ/г с получением термически обработанного ферментированного молочного продукта, добавление в указанный термически обработанный ферментированный молочный продукт лактазы, которая сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы pH с получением лактазосодержащего ферментированного молочного продукта, и хранение указанного лактазосодержащего ферментированного молочного продукта при температуре по меньшей мере 2°C в течение по меньшей мере 1 суток. Предпочтительно уровень бактерий заквасочной культуры снижается до не более чем $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г ферментированного молока, более предпочтительно до не более чем $1,0 \times 10^6$ КОЕ/г ферментированного молока и наиболее предпочтительно до не более чем $1,0 \times 10^5$ КОЕ/г ферментированного молока. Ферментированные молочные продукты, подвергнутые термической обработке таким образом, чтобы снизить уровень бактерий до не более чем, например, 1×10^8 КОЕ/г, имеют увеличенный срок хранения при низкой температуре.

Фермент добавляют в подходящем количестве для достижения требуемой степени гидролиза лактозы при выбранных условиях реакции. В конкретном воплощении изобретения молочный продукт содержит лактазу в количестве от 100 до 20000 LAU на литр молочного продукта, предпочтительно от 100 до 10000 LAU на литр молочного продукта, предпочтительно от 100 до 5000 LAU на литр молочного продукта, предпочтительно менее, чем 3000, например менее, чем 1500, менее, чем 1000, менее, чем 750 или менее, чем 500 LAU на литр молочного продукта.

В предпочтительном воплощении лактазу добавляют в концентрации от 5 до 400 LAU на г лактозы в молочном продукте, предпочтительно от 5 до 200 LAU на г лактозы в молочном продукте, предпочтительно от 5 до 100 LAU на г лактозы в молочном продукте, предпочтительно менее, чем 50, например

менее, чем 40, менее, чем 30, менее, чем 20 или менее, чем 10 LAU на г лактозы в молочном продукте.

В предпочтительном воплощении изобретения молочнокислый продукт имеет содержание лактозы от 2,0 мг/мл до 45 мг/мл, предпочтительно от 5 мг/мл до 40 мг/мл, более предпочтительно от 10 мг/мл до 37 мг/мл и наиболее предпочтительно от 20 мг/мл до 37 мг/мл.

В предпочтительном воплощении изобретения кисломолочный продукт, в который нужно добавлять лактазу, имеет вязкость, которая обеспечивает легкое распространение лактазы в кисломолочном продукте, например, посредством смешивания. В предпочтительном воплощении способа по изобретению лактаза, которая должна быть добавлена в ферментированный молочный продукт, предоставляется в стерильном препарате. В другом предпочтительном воплощении способа по изобретению лактазу добавляют в ферментированный молочный продукт при асептических условиях, например, посредством стерилизующего фильтрования раствора лактазы.

В предпочтительном воплощении способа по изобретению лактазу добавляют в кисломолочный продукт посредством дозирования в потоке. Согласно настоящему изобретению термин "дозирование в потоке" означает дозирование непосредственно в трубопровод, через который течет кисломолочный продукт. В настоящем описании термин "трубопровод" означает трубопровод или любой его синоним, включая канал, трубу, желоб, трубку, линию, напорный трубопровод, проход и шланг. Примерами имеющих в продаже систем дозирования в потоке, подходящих для применения в настоящем изобретении, являются асептическая система дозирования в потоке Tetra FlexDos" и асептическая система дозирования в потоке Tetra Aldose".

В предпочтительном воплощении способа по изобретению лактазу добавляют в кисломолочный продукт посредством дозирования в потоке в трубопровод, и затем лактаза смешивается с йогуртом в трубопроводе посредством смешивающего устройства. Предпочтительно смешивающее устройство выбрано из группы, состоящей из по меньшей мере одного изгиба трубы, пружины обратного клапана, статического миксера или ротора / статического миксера. Примером имеющегося в продаже ротора / статического миксера является гомогенизатор Ytron-Z (насос-диспергатор).

Двухэтапное добавление лактазы.

В конкретном воплощении третьего и четвертого аспекта способа по изобретению лактазу добавляют ранее термической обработки затравочной культуры ферментированного молочного продукта. Добавленная ранее лактаза может быть любой лактазой, включая лактазу, выбранную из группы, состоящей из На-лактазы и лактазы, используемой в способе по изобретению, т.е. лактазы, которая сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы pH. На-лактаза представляет собой лактазу, полученную из дрожжей из рода *Kluyveromyces*, в частности, выбранных из группы, состоящей из *Kluyveromyces lactis* и *Kluyveromyces fragilis*.

В конкретном воплощении добавленную ранее лактазу добавляют в начале ферментации вместе с заквасочной культурой. В данном случае добавленная ранее лактаза предпочтительно представляет собой На-лактазу.

В другом конкретном воплощении добавленную ранее лактазу добавляют после начала ферментации.

В случае добавления лактазы как в начале ферментации, так и после термической обработки ферментированного заквасочной культурой молочного продукта, часть лактозы будет гидролизироваться во время стадии ферментации, а остальная часть лактозы будет гидролизироваться во время выдерживания термически обработанного ферментированного молочного продукта. В случае добавления лактазы как в начале ферментации, так и после термической обработки ферментированного заквасочной культурой молочного продукта, можно снижать общее количество добавленной лактазы для того, чтобы снизить концентрацию лактозы в ферментированном молочном продукте до требуемого уровня по сравнению со случаем добавления лактазы только после термической обработки ферментированного заквасочной культурой молочного продукта. Таким образом, лактаза, добавленная в начале ферментации, будет активна при более высоком pH, чем pH от 3,0 до 5,0, например, при pH от 5,0 до 7,0, и большинство лактаз имеют более высокую активность при таком более высоком pH. Следовательно, определенное количество лактазы, добавленной в начале ферментации, будет приводить к большему гидролизу лактозы, чем такое же количество лактазы, добавленной после термической обработки молочного продукта, ферментированного заквасочной культурой.

Применение.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению лактазы, которая сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы pH, для добавления в кисломолочный продукт, который имеет pH от 3,0 до 5,0 и содержание лактозы по меньшей мере 1,5 мг/мл, для того, чтобы снизить содержание указанной лактозы во время хранения.

Определения.

Согласно настоящему изобретению применяются следующие определения.

"LAU" означает "лактозные единицы", и 1 лактазная единица (1 LAU) представляет собой количе-

ство фермента, которое высвобождает 1 микромоль глюкозы в минуту в М-буфере при pH 6,5 и 37°C с концентрацией лактозы 4,75% масс./об. М-буфер получают посредством растворения 3,98 г $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, 8,31 г лимонной кислоты, 0,9 г K_2SO_4 , 2,6 г K_2HPO_4 , 7,35 г KH_2PO_4 , 5,45 г KOH, 4,15 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 3,75 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ и 1,4 г $NaHCO_3$ в 4 литрах воды, добавляя 12,5 мл 4 н. NaOH, доводя pH до 6,5 с использованием HCl и добавляя воду вплоть до общего объема 5 литров.

Активность в LAU конкретной лактазы может быть определена посредством прямого измерения глюкозы, высвобожденной из лактозы, в условиях, описанных выше. Специалист в данной области будет знать, как определять такую активность. В качестве альтернативы, активность может быть определена с использованием анализа лактазной активности, описанного в Примере 1 настоящей заявки. Активность получают сравнением стандартной кривой, полученной с лактазой с известной активностью, и активность неизвестного образца рассчитывается из этого. Лактазой с известной активностью, например, может быть лактозим (Lactozym), приобретенный у Novozymes A/S, Дания.

Выражение "термическая обработка" означает любую обработку с использованием любой температуры в течение любого периода времени и любыми средствами или оборудованием, которая инактивирует по меньшей мере часть бактерий заквасочной культуры. В связи с этим термин "инактивировать" означает любую остановку, уменьшение или ингибирование роста бактерий, например лизирование клеток.

Выражение "молочнокислые бактерии" обозначает грамположительные микроаэрофильные или анаэробные бактерии, которые ферментируют сахара с образованием кислот, включающих молочную кислоту в качестве преимущественно образующейся кислоты, уксусную кислоту и пропионовую кислоту. Самые полезные с производственной точки зрения молочнокислые бактерии находятся в пределах порядка "Lactobacillales", который включает *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. и *Propionibacterium* spp. Они часто используются в качестве пищевых культур, одни или в комбинации с другими молочнокислыми бактериями.

Молочнокислые бактерии, включая бактерии вида *Lactobacillus* sp. и *Lactococcus* sp., обычно поставляются для молочной промышленности либо в виде замороженных, либо лиофилизированных культур для объемного размножения закваски, или в виде так называемых культур "для прямого внесения" (DVS), предназначенных для прямой инокуляции в ферментационный сосуд или чан для производства молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт или сыр. Такие культуры молочнокислых бактерий, в общем, называются "заквасочные культуры" или "закваски". Типично заквасочная культура для йогурта содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, и в большинстве стран йогурт по закону определяется как ферментированный молочный продукт, произведенный с использованием заквасочной культуры, содержащей два указанных штамма.

Термин "молоко" следует понимать как секрет молочных желез, получаемый дойкой любого животного, такого как коровы, овцы, козы, буйволы или верблюды. В предпочтительном воплощении молоко представляет собой коровье молоко. Термин "молоко" также включает белковые/жировые растворы, сделанные из растительных веществ, например, соевое молоко.

Термин "молочный субстрат" может относиться к любому сырому и/или переработанному молочному веществу, которое можно подвергать ферментации согласно способу по изобретению. Таким образом, полезные молочные субстраты включают растворы/суспензии любого молока или молокоподобных продуктов, содержащие белок, такие как цельное молоко или молоко пониженной жирности, обезжиренное молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, сыворотка, кислая сыворотка, пермеат сыворотки, включая пермеат кислой сыворотки, сухую сыворотку, включая сухую кислую сыворотку, сухую сладкую сыворотку, деминерализованную сухую сыворотку и безлактозную сухую сыворотку, лактоза, маточная жидкость от кристаллизации лактозы, концентрат белка сыворотки или крем, но не ограничиваются ими. Очевидно то, что молочный субстрат может происходить от любого млекопитающего, например, являясь по существу чистым молоком млекопитающего или восстановленным сухим молоком.

Термин "пермеат кислой сыворотки" означает пермеат сыворотки, полученный в результате концентрирования ферментированного молочного продукта посредством ультрафильтрации при производстве молодого сыра, такого как домашний сыр, рикотта, скир, греческий йогурт, творог, творог кварк и лабне, полученного посредством кислотной коагуляции за счет ферментации молочнокислой бактерией, и где pH пермеата кислой сыворотки в 10%-ном растворе меньше, чем 5,1.

Термин "кислая сыворотка" означает фракцию сыворотки, полученную в результате концентрирования ферментированного молочного продукта в сепараторе при производстве молодого сыра, такого как домашний сыр, рикотта, скир, греческий йогурт, творог, творог кварк и лабне, полученного посредством кислотной коагуляции посредством ферментации молочнокислой бактерией, и где pH фракции кислой сыворотки в 10%-ном растворе меньше, чем 5,1.

До ферментации молочный субстрат может быть гомогенизирован и пастеризован в соответствии со способами, известными в данной области.

Термин "гомогенизация" в том виде, в котором он здесь используется, означает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. При проведении гомогенизации перед

ферментацией ее можно проводить таким образом, чтобы разрушать молочный жир до меньших размеров таким образом, что он больше не отделяется от молока. Это можно осуществлять посредством пропускания молока под высоким давлением через маленькие отверстия.

Термин "пастеризация" в том виде, в котором он здесь используется, означает обработку молочного субстрата для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно пастеризация достигается поддержанием определенной температуры в течение определенного периода времени.

Определенная температура обычно достигается посредством нагревания. Температуру и продолжительность можно выбирать для того, чтобы умерщвлять или инактивировать определенные бактерии, такие как вредные бактерии. Затем может следовать стадия быстрого охлаждения.

"Ферментация" в способах по настоящему изобретению означает превращение углеводов в спирты или кислоты посредством действия микроорганизма. Предпочтительно ферментация в способах по изобретению включает превращение лактозы в молочную кислоту.

Способы ферментации, которые должны использоваться в производстве молочных продуктов, хорошо известны, и специалисту в данной области будет известно, как выбирать подходящие условия процесса, такие как температура, содержание кислорода, количество и характеристики микроорганизма(ов) и время процесса. Очевидно, условия ферментации выбирают таким образом, чтобы поддерживать достижение настоящего изобретения, т.е. получать молочный продукт в твердой (такой как сыр) или жидкой форме (такой как ферментированный молочный продукт).

Применение терминов в единственном числе в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте последующей формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее термины и в единственном, и во множественном числе, если не указано иное, или это явно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "вмещающий" следует истолковывать как открытые термины (т.е. означающие "включающий, но не ограничивающийся"), если не указано иное. Перечисление интервалов значений в настоящей заявке предназначено только для того, чтобы служить в качестве краткого способа ссылки индивидуально на каждое отдельное значение, попадающее в данный интервал, если здесь не указано иное, и каждое отдельное значение включается в настоящее описание изобретения, как если бы оно было индивидуально перечислено. Все описанные в настоящем описании способы могут осуществляться в любом подходящем порядке, если не указано иное, или, в ином случае, это явно не противоречит контексту. Использование любых приведенных в настоящем описании и всех примеров или описывающих примеры формулировок (например, "такой как") предназначено только для лучшего иллюстрирования изобретения и не накладывает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании изобретения не следует истолковывать как указывающие на любой незаявленный элемент, существенный для воплощения настоящего изобретения на практике.

Выражение "ферментированный молочный продукт" означает пищевой или кормовой продукт, где получение пищевого или кормового продукта включает ферментацию молочного субстрата молочнокислыми бактериями. Термин "ферментированный молочный продукт" в том виде, в котором он здесь используется, включает такие продукты, как термофильно ферментированные молочные продукты, например, йогурт, мезофильно ферментированные молочные продукты, например, сметану и пахту, а также ферментированную сыворотку, но не ограничивается ими.

Термин "термофил" в настоящем описании относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при температурах выше 35°C. Самые полезные с промышленной точки зрения термофильные бактерии включают *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. Термин "термофильная ферментация" здесь относится к ферментации при температуре выше примерно 35°C, как, например, от примерно 35°C до примерно 45°C. Термин "термофильно ферментированный молочный продукт" относится к ферментированным молочным продуктам, полученным посредством термофильной ферментации с использованием термофильной заквасочной культуры, и он включает такие ферментированные молочные продукты, как йогурт термостатного способа производства, йогурт с нарушенным сгустком и питьевой йогурт, например, например Yakult.

Термин "мезофильный" в настоящем описании относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при умеренных температурах (15°C-35°C). Наиболее полезные с промышленной точки зрения мезофильные бактерии включают *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp. Термин "мезофильная ферментация" относится здесь к ферментации при температуре от примерно 22°C до примерно 35°C. Термин "мезофильно ферментированный молочный продукт" относится к ферментированным молочным продуктам, полученным посредством мезофильной ферментации с использованием мезофильной заквасочной культуры, и он включает такие ферментированные молочные продукты, как пахта, простокваша, сквашенное молоко, сметана, сквашенные сливки, кефир и молодой сыр, такой как творог кварк, творог и сливочный сыр.

Графические материалы

На фиг. 1 показаны количества остаточной лактозы в образцах, обработанных лактазой, добавленной в йогурт после постпастеризации, для количеств лактазы 1000, 2000 и 3000 LAU/л.

На фиг. 2 показаны количества остаточной лактозы в образцах, обработанных лактазой, добавленной в йогурт после постпастеризации, для количеств лактазы 200, 400, 600, 800, 1000 и 1200 LAU/л в 8,

24, 48 и 76 часов.

На фиг. 3 показаны данные фиг. 2 в точке 48 часов.

На фиг. 4 показаны данные фиг. 2 в точке 76 часов.

Примеры

Пример 1.

Анализ лактазной активности в пробирках Эппендорфа при 37°C, pH 6,5.

Принцип.

Лактаза гидролизует лактозу до глюкозы и галактозы. Глюкозу измеряют согласно модифицированной версии обычного глюкозооксидазного/пероксидазного аналитического метода (Werner, W. et al. (1970) *Z. analyt. Chem.* 252: 224.).

LAU определяется как количество фермента, высвобождающее 1 микромоль глюкозы в мин при 37°C, pH 6,5 в М-буфере (М-буфер определяется в описании настоящей патентной заявки). В качестве альтернативы, активность в LAU для конкретной лактазы может быть определена описанным в настоящем описании способом. Полученное значение сравнивается со стандартной кривой, полученной с лактазой с известной активностью, и активность неизвестного образца рассчитывается из этого. Лактазой с известной активностью, например, может быть лактозим, приобретенный у Novozymes A/S, Дания.

Растворы.

Буфер для анализа: 50 mM сукцинат, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,01% Triton X100, pH 6,5.

Раствор GOD-Perid: 65 mM фосфат натрия, pH 7, 0,4 г/л глюкозооксидазы, 0,013 г/л HRP (пероксидаза хрена), 0,65 г/л ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)).

Субстрат.

160 mM лактоза, 50 mM сукцинат, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 6,5.

Стандарт.

Лактозим (доступный от Novozymes A/S, Дания) с известной активностью в LAU/г используется в качестве стандарта при разведении в буфере для анализа в интервале 0,09-0,7 LAU/г.

Образцы.

Образцы фермента разводятся подходящим образом в буфере для анализа.

Методика.

1. 375 мкл субстрата инкубируют 5 минут при 37°C.

2. Добавляют 25 мкл фермента, разведенного в буфере для анализа.

3. Реакцию останавливают через 30 минут посредством добавления 60 мкл 1 M NaOH.

4. 20 мкл переносят в 96-луночный планшет для микротитрования и добавляют 200 мкл раствора GOD-Perid. После 30 минут при комнатной температуре измеряют поглощение при 420 нм.

Пример 2.

100 мл 15% или 30% (мас./мас.) пермеата сыворотки, содержащего, преимущественно, лактозу и ионы, получали смешиванием 15 или 30 г высушенного распылением сухого пермеата сыворотки (Vario-lac, Arla) в 85 или 70 мл содержащей ионы воды, соответственно. Этот раствор выливали в колбу, содержащую якорь магнитной мешалки, и помещали в водяную баню при 37°C. Через 15 мин добавляли фермент. Тестируемыми ферментами были лактозим - имеющаяся в продаже лактаза от Novozymes A/S, Дания, имеющая активность 3060 LAU/г, и экспериментальная лактаза из *Bifidobacterium bifidum*, имеющая кодируемую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, и активность 295 LAU/г.

Дозировки были следующие: 4225 LAU/л молока лактозима и 2025 LAU/л молока лактазы *Bifidobacterium*. Образцы молока отбирали с регулярными интервалами вплоть до 5,5 ч, и фермент инактивировали нагреванием до 99°C в течение 10 мин в термомиксере. Образцы подходящим образом разводили и фильтровали через 0,20 мкм фильтр.

Гидролиз лактозы измеряли с использованием Dionex BioLC, оснащенной колонкой Dionex PA1 и импульсным амперометрическим детектором (PAD). Пики идентифицировали и количественно измеряли посредством сравнения с известными стандартами лактозы, глюкозы и галактозы.

Результаты приведены ниже.

Таблица 1

Лактоза, глюкоза и галактоза в 15% DS пермеате сыворотки после обработки лактозимом или лактазой *Bifidobacterium*

Время мин	Лактозим			Лактаза <i>Bifidobacterium</i>		
	Лактоза мМ	Глюкоза мМ	Галактоза мМ	Лактоза мМ	Глюкоза мМ	Галактоза мМ
0	499	1	2	499	1	2
30	312	135	106	410	61	63
60	211	224	155	349	119	122
120	110	295	221	220	199	202
180	66	324	249	149	281	290
240	50	346	279	84	336	348
330	37	372	312	31	350	368

Таблица 2

Лактоза, глюкоза и галактоза в 30% DS пермеате сыворотки после обработки лактозимом или лактазой *Bifidobacterium*.

Время мин	Лактозим			Лактаза <i>Bifidobacterium</i>		
	Лактоза мМ	Глюкоза мМ	Галактоза мМ	Лактоза мМ	Глюкоза мМ	Галактоза мМ
0	848	1	4	848	1	4
30	824	109	75	819	43	45
60	615	253	150	788	86	83
120	420	370	242	651	159	158
180	291	459	300	625	232	230
240	246	559	373	501	283	273
330	154	544	367	391	333	324
1440	54	649	545	20	727	739

Также при тестировании при более высоких концентрациях лактозы, таких как в 15% или в 30% пермеате сыворотки, не продуцируется или продуцируется очень мало галактоолигосахаридов. К тому же, уровни продуцированной галактозы и глюкозы являются равными и соответствуют количеству гидролизованной лактозы. Для сравнения, лактозим продуцирует меньше галактозы, чем глюкозы, ясно показывая то, что были продуцированы галактоолигосахариды.

Пример 3.

pH профиль (при 37°C) и температурный профиль (при pH 6,5) экспериментальной лактазы из *Bifidobacterium bifidum*, определенные с использованием лактозы в качестве субстрата.

Принцип.

Лактаза гидролизует лактозу, и образуется глюкоза и галактоза. Глюкозу измеряют согласно модифицированной версии обычного глюкозооксидазного/пероксидазного метода (Werner, W. et al. (1970) *Z. analyt. Chem.* 252: 224.).

Профиль pH.

Субстрат.

167 мМ лактоза, 50 мМ сукцинат, 50 мМ HEPES, 50 мМ CHES, 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, и pH доводится до pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 с использованем NaOH.

Образец фермента.

Экспериментальную лактазу из *Bifidobacterium bifidum*, имеющую кодированную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, подходящим образом разводили в 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,01% Triton X100.

Методика.

10 мкл образца фермента, разведенного в буфере для разведения фермента, добавляли в пробирки для ПЦР (полимеразная цепная реакция) при комнатной температуре.

90 мкл субстрата добавляли при комнатной температуре и быстро помещали в термоциклер Пельтье (PST-200, MJ research) при 37°C и инкубировали в течение 30 мин и затем помещали на лед.

Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,25 М NaOH.

20 мкл переносили в 96-луночный планшет для микротитрования, и добавляли 230 мкл 65 мМ фосфата натрия, pH 7, 0,4 г/л глюкозооксидазы, 0,013 г/л HRP, 0,65 г/л раствора ABTS. После 30 минут при комнатной температуре измеряли поглощение при 420 нм.

Таблица 3

pH	Относительная активность лактазы <i>B. bifidum</i> (% от активности при pH6)
3	0
4	4
5	75
6	100
7	85
8	39
9	10
10	4

Температурный профиль.

Субстрат.

167 mM лактоза, 50 mM сукцинат, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, и pH доводится до pH 6,5 с использованием NaOH.

Образец фермента.

Экспериментальную лактазу из *Bifidobacterium bifidum*, имеющую кодированную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, подходящим образом разводили в 50 mM сукцинате, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 150 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,01% Triton X100, и pH довели до pH 6,5.

Методика: 10 мкл образца фермента, разведенного в буфере для разведения фермента, добавляли в пробирки для ПЦР при комнатной температуре.

90 мкл предварительно нагретого (в термоциклере Пельтье, 30-70°C) субстрата добавляли, и инкубацию проводили с температурным градиентом от 30 до 70°C за 30 мин, и затем помещали на лед.

Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,25 M NaOH.

20 мкл переносили в 96-луночный планшет для микротитрования, и добавляли 230 мкл 65 mM фосфата натрия, pH 7, 0,4 г/л глюкозооксидазы, 0,013 г/л HRP, 0,65 г/л раствора ABTS. После 30 минут при комнатной температуре измеряли поглощение при 420 нм.

Таблица 4

Темп. °C	Относительная активность лактазы <i>B. bifidum</i> (% от активности при 38,1°C)
20	54
21	63
22	64
24	68
26	73
29	81
31	88
34	94
36	96
38	100
43	96
48	91
52	83
57	76
62	58
66	32
69	20
70	17

Пример 4.

Определение K_m для лактазных ферментов при 5°C.

Принцип.

Лактаза гидролизует лактозу, и образуется глюкоза и галактоза. Глюкозу измеряют согласно модифицированной версии обычного глюкозооксидазного/пероксидазного метода (Werner, W. et al. (1970) Z. analyt. Chem. 252: 224.).

Субстрат.

Разные концентрации лактозы, варьирующие от $K_m/5$ до $10 \cdot K_m$, 50 мМ сукцинат, 50 мМ HEPES, 50 мМ CHES, 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, и pH доводится до pH 6,5 с использованием NaOH.

Образец фермента.

Экспериментальную лактазу из *Bifidobacterium bifidum*, имеющую кодированную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2, подходящим образом разводили в 50 мМ сукцинате, 50 мМ HEPES, 50 мМ CHES, 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 0,01% Triton X100, и pH доводили до pH 6,5 NaOH.

12 г/л лактозима (лактаза, имеющаяся в продаже у Novozymes A/S, Дания) разводили в 6000 раз в том же самом буфере.

Методика.

10 мкл образца фермента (5°C) добавляли в 96-луночный планшет для микротитрования на льду.

Добавляли 90 мкл субстрата (5°C) и инкубировали в течение 2 часов при 5°C.

Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,25 М NaOH.

20 мкл переносили в 96-луночный планшет для микротитрования, и добавляли 230 мкл 65 мМ фосфата натрия, pH 7, 0,4 г/л глюкозооксидазы, 0,013 г/л HRP, 0,65 г/л раствора ABTS. После 30 минут при комнатной температуре измеряли поглощение при 420 нм.

Определение K_m .

Использовали компьютеризированную нелинейную аппроксимацию методом наименьших квадратов и уравнение Михаэлиса-Ментена:

$$V = (V_{max} \cdot S) / (K_m + S).$$

Определили то, что K_m для лактазы *Bifidobacterium* и лактозима составляет 8 и 30 мМ соответственно.

В аналогичном анализе, проведенном при 37°C, определили то, что K_m для лактазы *Bifidobacterium* и лактозима составляет 13 мМ и 30 мМ соответственно.

Пример 5.

Получение постпастеризованного йогурта, содержащего лактазу, добавленную после пастеризации.

Молочный субстрат.

Количество жира 2,8%*.

Количество белка 2,8%*.

Лактоза 3,0%.

Сахароза 5,0% (добавлена).

Модифицированный крахмал E1442 Cargill типа 75720 1,50%.

Пектин типа LMA CP Kelco типа LM 106 AS-YA 0,25%.

Камедь геллан типа Kelcogel YSS 0,05%.

*Количество в конечном продукте, т.е. после термической обработки, добавления штамма для хранения при температуре окружающей среды и хранения в течение 150 суток.

Заквасочная культура.

Заквасочная культура YoFlex® типа FD-DVS YF-L904, содержащая два штамма *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

Лактаза.

Лактаза из *Bifidobacterium bifidum*, имеющая кодированную последовательность SEQ ID NO. 2 и активность 295 LAU/г.

Методика для производства продукта.

1. Диспергирование сухих ингредиентов в молоке.
2. Нахождение в состоянии покоя в течение 3 часов с легким перемешиванием.
3. Нагревание молока до достижения температуры 65°C.
4. Гомогенизация при 150 бар (15 МПа).
5. Обработка нагреванием до 95°C в течение 5 мин.
6. Охлаждение до температуры ферментации 43°C.
7. Закачивание молока в бродильный чан.
8. Инокуляция культуры YoFlex типа YF-L904.
9. Ферментация до достижения pH 4,30.
10. Разрушение коагулята и перемешивание до получения однородной структуры.
11. Термическая обработка при 75°C в течение 30 с.
12. Охлаждение до 25°C.
13. Добавление лактазы в количестве 1420 LAU/л йогуртового продукта, и медленное перемешива-

ние йогурта таким образом, чтобы равномерно распределить лактазу в йогурте.

14. Заполнение йогуртом контейнеров.

15. Выдерживание йогурта при температуре 20°C в течение периода 7 суток.

Пример 6.

Последующее добавление лактазы в постпастеризованный йогурт.

Целью проведенной экспериментальной работы была демонстрация того, что возможно добавление подходящей лактазы после последней термической обработки постпастеризованного йогурта с достижением остаточных количеств лактозы менее 0,01%.

Был произведен постпастеризованный йогурт с 2,9% белка и 2,8% жира. Молочный субстрат ферментировали до pH 4,30 с использованием культуры YoFlex типа YF-L904. После достижения pH 4,30 йогурт охлаждали до 15°C в теплообменнике пластинчатого типа и выдерживали в теплоизолированной буферной емкости при 15°C в течение трех часов перед проведением конечной термической обработки. Конечную термическую обработку проводили при 74°C в течение 20 с в теплообменнике пластинчатого типа, и продуктом заполняли стерильные стаканы при 25°C. Образцы выдерживали при температуре окружающей среды (22°C) в течение одних суток до добавления стерильной лактазы.

Молочный субстрат.

Ингредиенты	Спецификация	Дозировка
Свежее молоко	3,5% жира, имеющееся в продаже молоко, Arla Foods	74,15%
Вода		16,6%
Сахароза		7,0%
Концентрат сывороточного белка	Nutrilac YO-7830, Arla Food Ingredients	0,60%
Модифицированный крахмал	Clearam CJ 5025, Roquette	1,50%
Пектин LM	LM 106-AS YA, CP Kelco	0,12%
Камедь геллан	Kelcogel YSS, CP Kelco	0,03%
Культуры	FD-DVS YF-L904	200 единиц/ метрические тонны

Анализ Milkoscan: уровень жира 2,8%, уровень белка 2,9%.

Для ферментации и переработки использовали следующие параметры.

Температура перемешивания: 10°C.

Время гидратации: 3 часа с легким перемешиванием.

Лактаза.

Лактаза из *Bifidobacterium bifidum*, имеющая кодированную последовательность SEQ ID NO. 2.

Заквасочная культура.

Культура YoFlex® типа YF-L904 из линейки продуктов YoFlex® Chr. Hansen, содержащая два вида: *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

Способ производства йогурта.

Давление гомогенизации: 150 бар (15 МПа).

Условия пастеризации: 95°C, 5 минут.

Температура ферментации: 43°C.

Конечный pH: 4,30.

Коагулят разрушают вручную и перемешивают, пока не получается гомогенная структура.

Охлаждение до 15°C в теплообменнике пластинчатого типа.

Термизация в теплообменнике пластинчатого типа, ток 414 л/ч.

Давление гомогенизации: 0 Па.

Условия термизации: 74°C, 20 с.

Заполнение стерильных 100 мл чашек, температура заполнения 25°C.

Добавление лактазы.

Лактазу подвергали стерилизующему фильтрованию и добавляли в 100 мл стаканы с постпастеризованным йогуртом в следующих дозировках:

а) 0 LAU/л - контроль,

б) 1000 LAU/л,

в) 3000 LAU/л,

г) 10000 LAU/л.

Образцы выдерживали при комнатной температуре (22°C), и образцы отбирали для анализа остаточной лактозы в следующие моменты времени: 24 часа, 48 часов и 1 неделя.

Результаты.

На фиг. 1 показана остаточная лактоза образцов с добавлением лактазы. Остаточная лактоза контрольного образца была измерена как составляющая 2,4% остаточной лактозы. Как будет видно из фиг. 1, концентрация лактозы снижалась до уровня примерно 0,005% при концентрациях лактазы 3000 LAU/л и 10000 LAU/л через 24 часа с момента добавления. Также концентрация лактозы снижалась до уровня примерно 0,005% для всех трех концентраций лактазы через 48 часов и через 1 неделю с момента добавления.

Пример 7.

Последующее добавление лактазы в постпастеризованный йогурт.

Целью проведенной экспериментальной работы была демонстрация того, что возможно добавлять подходящую лактазу после конечной термической обработки постпастеризованного йогурта с достижением уровней остаточной лактозы менее 0,1%.

Был произведен постпастеризованный йогурт с 2,87% белка и 2,89% жира. Молочный субстрат ферментировали до pH 4,30 с использованием культуры YoFlex типа YF-L904. После достижения pH 4,30 йогурт охлаждали до 15°C в теплообменнике пластинчатого типа и выдерживали в теплоизолированной буферной емкости при 15°C в течение трех часов до проведения конечной термической обработки. Конечную термическую обработку проводили при 74°C в течение 20 с в теплообменнике пластинчатого типа, и продуктом заполняли стерильные стаканы при 25°C. Образцы выдерживали при 25°C в течение одних суток до добавления стерильной лактазы.

Молочный субстрат.

Ингредиенты	Спецификация	Дозировка
Свежее молоко	3,5% жира, имеющееся в продаже молоко, Arla Foods	74,15%
Вода		16,6%
Сахароза		7,0%
Концентрат сывороточного белка	Nutrilac YO-7830, Arla Food Ingredients	0,60%
Модифицированный крахмал	Clearam CJ 5025, Roquette	1,50%
Пектин LM	LM 106-AS YA, CP Kelco	0,12%
Камедь геллан	Kelcogel YSS, CP Kelco	0,03%
Культуры	FD-DVS YF-L904	200 единиц/ метрические тонны

Анализ Milkoscan: уровень жира 2,87%, уровень белка 2,89%.

Для ферментации и переработки использовали следующие параметры.

Температура перемешивания: 10°C.

Время гидратации: 3 часа с легким перемешиванием.

Лактаза.

Лактаза из *Bifidobacterium bifidum*, имеющая кодированную последовательность SEQ ID NO. 2.

Заквасочная культура.

Культура YoFlex® типа YF-L904 из линейки продуктов YoFlex® Chr. Hansen, содержащая два вида: *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

Способ производства йогурта.

Давление гомогенизации: 150 бар (15 МПа).

Условия пастеризации: 95°C, 5 минут.

Температура ферментации: 43°C.

Конечный pH: 4,30.

Коагулянт разрушают вручную и перемешивают, пока не получается однородная структура.

Охлаждение до 15°C в теплообменнике пластинчатого типа.

Термизация в теплообменнике пластинчатого типа, ток 414 л/ч.

Условия термизации: 74°C, 20 с.

Заполнение стерильных 100 мл чашек, температура заполнения 25°C.

Добавление лактазы.

Лактазу подвергали стерилизующему фильтрованию и добавляли в 100 мл стаканы с постпастери-

зованным йогуртом в следующих дозировках:

- а) 0 LAU/л - контроль,
- б) 200 LAU/л,
- в) 400 LAU/л,
- г) 600 LAU/л,
- д) 800 LAU/л,
- е) 1000 LAU/л,
- ж) 1200 LAU/л.

Образцы выдерживали при 25°C, и отбирали образцы для анализа остаточной лактозы в следующие моменты времени: 8 часов, 24 часа, 48 часов и 76 часов.

Результаты.

На фиг. 2-4 показана остаточная лактоза образцов с добавлением лактазы. Остаточная лактоза контрольного образца была измерена как составляющая 2,4% остаточной лактозы. Горизонтальные линии на уровне остаточной лактозы 0,1 и 0,5 означают уровень лактозы, который согласно регулятивному законодательству по пищевым продуктам квалифицируется как не содержащий лактозу в ЕС (Европейском Союзе) и Китае соответственно.

Как будет видно из фиг. 2-4, концентрация лактозы через 24 часа снижалась до уровня примерно 0,355% при концентрации лактазы 400 LAU/л и до уровня менее 0,01% при более высоких концентрациях лактазы. Через 48 часов концентрация лактозы падала до уровня 0,015% при концентрации лактазы 400 LAU/л и до уровня менее 0,01% при более высоких концентрациях лактазы. Через 76 часов концентрация лактозы падала до уровня менее 0,01% при концентрации лактазы 400 LAU/л и более высоких концентрациях лактазы.

Таким образом, настоящие эксперименты показывают то, что возможно соответствовать целевому уровню остаточной лактозы 0,01% или менее при использовании дозы лактазы 600 LAU/л через 48 часов и дозы лактазы 400 LAU/л через 76 часов.

Пример 8.

Последующее добавление лактазы в постпастеризованный йогурт при разных уровнях pH (от 4,0 до 4,4).

Целью проведенной экспериментальной работы была демонстрация того, что в способе удаления лактозы в постпастеризованном йогурте (PPY) с использованием лактазы возможно получение требуемого удаления лактозы для PPY с разным pH в интервале от 4,0 до 4,4.

Молочный субстрат.

Ингредиенты	Спецификация	Дозировка со стандартным уровнем лактозы	Дозировка с высоким уровнем лактозы
Свежее молоко	3,5% жира, имеющееся в продаже молоко, Arla Foods	74,30%	74,0%
Вода		16,45%	15,95%
Сахароза	Nutrilac YO-7830, Arla Food Ingredients	7,0%	7,0%
Концентрат сывороточного белка		0,60%	0,60%
Модифицированный крахмал	Clearam CJ 5025, Roquette	1,50%	1,5%
Пектин LM	LM 106-AS YA, CP Kelco	0,12%	0,12%
Камедь геллан	Kelcogel YSS, CP Kelco	0,03%	0,03%
Культуры	FD-DVS YF-L904	200 единиц/ метрические тонны	200 единиц/ метрические тонны

Анализ Milkoscan.

Молочная основа со стандартным уровнем лактозы: уровень жира 2,88%, уровень белка 2,91%.

Молочная основа с высоким уровнем лактозы: уровень жира 2,91%, уровень белка 2,94%.

Лактаза.

Лактаза из *Bifidobacterium bifidum*, имеющая кодированную последовательность SEQ ID NO. 2.

Способ производства йогурта.

Давление гомогенизации: 150 бар (15 МПа) при 60°C.

Условия пастеризации: 95°C, 5 минут.

Температура ферментации: 43°C.

Конечный pH для молочной основы со стандартным уровнем лактозы: 4,0; 4,1; 4,2; 4,3 и 4,4.

Конечный pH для молочной основы с высоким уровнем лактозы: 4,3.

Коагулят разрушают вручную и перемешивают, пока не получается однородная структура.

Охлаждение до 15°C в теплообменнике пластинчатого типа.

Термизация в теплообменнике пластинчатого типа, ток 414 л/ч.

Условия термизации: 74°C, 20 с.

Заполнение стерильных 100 мл чашек, температура заполнения 25°C.

Добавление лактазы.

Лактазу подвергали стерилизующему фильтрованию и добавляли в 100 мл стаканы с постпастеризованным йогуртом в следующих дозировках:

- а) 0 LAU/л - контроль,
- б) 200 LAU/л,
- в) 400 LAU/л,
- г) 600 LAU/л,
- д) 800 LAU/л.

Образцы выдерживали при 15°C, 20°C, 25°C и 30°C, и отбирали образцы для анализа остаточной лактозы в следующие моменты времени: 24 часа, 48 часов и 72 часа.

Результаты.

Для краткости показаны только результаты образцов, хранящихся при 25°C.

Соответствующие результаты были получены для образцов, хранящихся при 15°C, 20°C и 30°C.

Таблица 5

Остаточные уровни лактозы для образцов, хранящихся при 25°C

Молочная основа	Конечный pH	Дозировка лактазы (LAU/л)	24 часа (%)	48 часов (%)	72 часа (%)
Стандартный	4,4	200	0,918	0,220	0,034
Стандартный	4,4	400	0,106	0,004	0,003
Стандартный	4,4	600	0,077	0,003	0,003
Стандартный	4,4	800	0,009	<0,002	0,002
Стандартный	4,4	1000	0,004	0,002	0,002
Стандартный	4,3	200	1,322	0,567	0,223
Стандартный	4,3	400	0,566	0,043	0,008
Стандартный	4,3	600	0,063	0,005	0,004
Стандартный	4,3	800	0,015	0,003	0,003
Стандартный	4,3	1000	0,007	<0,002	0,002
Стандартный	4,2	200	1,422	0,0803	0,356
Стандартный	4,2	400	0,671	0,071	0,013
Стандартный	4,2	600	0,177	0,008	0,004
Стандартный	4,2	800	0,128	0,005	0,003
Стандартный	4,2	1000	НО (не определен)	НО	НО

Стандартный	4,1	200	1,719	1,177	0,808
Стандартный	4,1	400	0,923	0,266	0,051
Стандартный	4,1	600	0,572	0,066	0,019
Стандартный	4,1	800	0,245	0,010	0,005
Стандартный	4,1	1000	0,108	0,005	0,003
Стандартный	4,0	200	1,725	1,196	0,933
Стандартный	4,0	400	1,236	0,589	0,265
Стандартный	4,0	600	0,773	0,187	0,039
Стандартный	4,0	800	0,502	0,049	0,010
Стандартный	4,0	1000	НО	НО	НО
Высокий	4,3	200	2,011	1,139	0,584
Высокий	4,3	400	0,876	0,121	0,018
Высокий	4,3	600	0,250	0,009	0,005
Высокий	4,3	800	0,053	0,006	0,003
Высокий	4,3	1000	0,017	0,004	0,003

Таблица 6

Уровень остаточной лактозы без добавления лактазы

Молочная основа	pH	Дозировка лактазы (LAU/л)	24 часа (%)
Стандартный	4,4	0	2,6
Стандартный	4,3	0	2,7
Стандартный	4,2	0	2,6
Стандартный	4,1	0	2,5
Стандартный	4,0	0	2,5
Высокий	4,3	0	3,2
Стандартный (до ферментации)		0	3,3
Высокий (до ферментации)		0	4,0

Как будет видно из таблицы 5 и 6, чем ниже конечный уровень pH йогурта, тем выше содержание остаточной лактозы. Данные результаты также показывают то, что при наименьшем конечном уровне pH возможно достигнуть целевого уровня остаточной лактозы менее 0,1% при дозе лактазы 800 LAU/л через 48 часов. Кроме того, при конечном уровне pH 4,1 возможно достигнуть уровня остаточной лактозы 0,108% при дозе лактазы 1000 LAU/л через 24 часа.

Пример 9.

Последующее добавление лактазы в постпастеризованный йогурт при низких уровнях добавленной лактазы.

Целью проведенной экспериментальной работы было тестирование эффективности низких дозировок лактазы в способе удаления лактозы в постпастеризованном йогурте (РРУ) с использованием лактазы для того, чтобы установить минимальную дозу, требующуюся для получения требуемого целевого уровня остаточной лактозы.

Молочный субстрат.

Ингредиенты	Спецификация	Дозировка
Свежее молоко	3,5% жира, имеющееся в продаже молоко, Arla Foods	74,30%
Вода		16,45%
Сахароза		7,0%
Концентрат сывороточного белка	Nutrilac YO-7830, Arla Food Ingredients	0,60%
Модифицированный крахмал	Clearam CJ 5025, Roquette	1,50%
Пектин LM	LM 106-AS YA, CP Kelco	0,12%
Камедь геллан	Kelcogel YSS, CP Kelco	0,03%
Культуры	FD-DVS YF-L904	200 единиц/ метрические тонны

Анализ Milkoscan.

Молочная основа: уровень жира 2,81%, уровень белка 3,11%.

Лактаза.

Лактаза из *Bifidobacterium bifidum*, имеющая кодированную последовательность SEQ ID NO. 2.

Способ производства йогурта.

Давление гомогенизации: 150 бар (15 МПа) при 60°C.

Условия пастеризации: 95°C, 5 минут.

Температура ферментации: 43°C.

Конечный pH для молочной основы со стандартным уровнем лактозы: 4,15; 4,20; 4,25 и 4,30.

Конечный pH для молочной основы с высоким уровнем лактозы: 4,3.

Коагулят разрушают вручную и перемешивают, пока не получается однородная структура.

Охлаждение до 15°C в теплообменнике пластинчатого типа.

Термизация в теплообменнике пластинчатого типа, ток 414 л/ч.

Условия термизации: 74°C, 20 с.

Заполнение стерильных 100 мл чашек, температура заполнения 25°C.

Добавление лактазы.

Лактазу подвергали стерилизующему фильтрованию и добавляли в 100 мл стаканы с постпастеризованным йогуртом в следующих дозировках:

- а) 0 LAU/л - контроль,
- б) 50 LAU/л,
- в) 100 LAU/л,
- г) 200 LAU/л,
- д) 300 LAU/л.

Образцы выдерживали при 25°C, и отбирали образцы для анализа остаточной лактозы в следующие моменты времени: 24 часа, 48 часов и 72 часа.

Результаты.

Для краткости показаны только результаты для образцов, хранящихся при 25°C. Соответствующие результаты были получены для образцов, хранящихся при 15°C, 20°C и 30°C.

Молочная основа	Конечный pH	Дозировка лактазы (LAU/л)	24 часа (%)	48 часов (%)	72 часа (%)
Стандартный	4,30	50	2,1	1,8	1,5
Стандартный	4,25	100	1,8	1,3	0,9
Стандартный	4,20	100	1,9	1,4	1,1
Стандартный	4,15	100	1,9	1,5	1,2
Стандартный	4,30	200	1,2	0,4	0,087
Стандартный	4,25	200	1,1	0,5	0,119
Стандартный	4,20	200	1,4	0,7	0,237

Стандартный	4,15	200	1,4	0,7	0,317
Стандартный	4,30	300	0,7	0,055	0,010
Стандартный	4,25	300	0,8	0,102	0,017
Стандартный	4,20	300	0,9	0,2	0,037
Стандартный	4,15	300	1,0	0,3	0,081

Пастеризованная иогуртовая основа с pH 4,3; 4,25; 4,20 и 4,15 и без добавленной лактазы имела уровень лактозы 2,57; 2,52; 2,47 и 2,40, соответственно.

Как будет видно из табл. 7, возможно достижение целевого уровня остаточной лактозы менее 0,5% с использованием дозы лактазы 200 LAU/л через 48 часов для образцов с pH 4,3 и 4,25, и с уровнем лактозы менее 0,3% с использованием дозы лактазы 300 LAU/л через 48 часов для всех протестированных образцов.

Пример 10.

Производство напитка на основе кислой сыворотки с низким уровнем лактозы посредством добавления лактазы.

Целью проведенной экспериментальной работы была демонстрация того, что возможно удалить лактозу из пермеата кислой сыворотки и исследовать эффект разных дозировок лактазы, времени реакции и температур.

Молочный субстрат.

Ингредиенты	Спецификация	Дозировка (г/1000 г)
Кислая сыворотка	Пермеат кислой сыворотки (побочный продукт от производства скира)	800
Сахароза	Nordic Sugar	70
Вода (ионизированная)		90
Пектин НМ	YM-115-H, CP-Kelco	4,5
Сумма		979,5

Пермеат кислой сыворотки (от ультрафильтрации) представляет собой побочный продукт от производства скира. Пермеат кислой сыворотки имел следующий состав: белок 0,2%, сахара 3,7%, жир 0,01%, зола 0,8%, влажность 94,7%, pH 4,27.

Лактаза.

Лактаза из *Bifidobacterium bifidum*, имеющая кодированную последовательность SEQ ID NO. 2.

Способ.

1. Нагреть кислый пермеат до 72°C/2 мин.
2. Охладить до:
 - а) 5°C (2 × 1000 мл),
 - б) 40°C (3 × 1000 мл).
3. Дозирование лактазы:
 - а) 5°C: 2500 и 5000 LAU/л (2 × 1000 мл),
 - б) 40°C: 500, 1000 и 2500 LAU/л (3 × 1000 мл).
4. Образцы для проведения анализа лактозы.
 - а) До добавления лактазы.
 - б) При 40°C и 2500 LAU/л: каждый 1 час с 3 до 7 часов и 24 часа.
 - в) Другие образцы: 24 часа.
5. Переработка напитка на основе кислой сыворотки.
 - а) Добавление раствора пектина НМ, корригента и сахарозы.
 - б) Доведение pH до 3,9 лимонной кислотой.
 - в) Нагревание до 80°C 2 мин.
 - г) Гомогенизация при 15 МПа при 80°C.
 - д) Заполнение в бутылки.

Результаты.

Таблица 8

Остаточные уровни лактозы (г/л) для тестируемых образцов

Темп.		5°C	5°C		40°C	40°C	40°C
Лактаза (LAU/л)	0	2500	5000	0	500	1000	2500
0 часов	2,7235			2,7235			
1 час							
2 часа							
3 часа							1,7793
4 часа							0,5527
5 часов							0,3117
6 часов							0,1681
7 часов							0,1376
24 часа		0,5646	0,1018		0,4381	0,0830	0,0378

Как будет видно из табл. 8, было возможным снижение уровня лактозы до количества около 0,1 г/л для тестируемых образцов при температуре 40°C и для концентраций лактазы 1000 и 2500 LAU/л, а также при температуре 5°C для концентрации лактазы 5000 LAU/л. Для двух других образцов было возможным снижение уровня лактозы до уровней менее 0,5 г/л.

Перечень последовательностей.

SEQ ID NO. 1: показывает последовательность мутанта SEQ ID NO. 4.

SEQ ID NO. 2: показывает последовательность мутанта SEQ ID NO. 4.

SEQ ID NO. 3: показывает последовательность лактазы из *Bifidobacterium bifidum* DSM20215.

SEQ ID NO. 4: показывает последовательность лактазы из *Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171, нуклеотидная последовательность которой указана в NCBI (Национальный центр биотехнологической информации США) с номером доступа DQ448279.

SEQ ID NO. 4 обсуждается в следующих ссылках, где она называется bbgIII:

Appl Microbiol Biotechnol (2007) 76:1365-1372, T K Goulas et al,

Appl Microbiol Biotechnol (2009) 82:1079-1088, T Goulas et al,

Appl Microbiol Biotechnol (2009) 84:899-907, T Goulas et al.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения ферментированного молочного продукта, включающий стадии:

а) ферментация молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий с получением ферментированного заквасочной культурой молочного продукта, который имеет pH от 3,0 до 5,0 и содержание лактозы по меньшей мере 1,5 мг/мл,

б) подвергание указанного ферментированного заквасочной культурой молочного продукта термической обработке таким образом, чтобы снизить количество бактерий заквасочной культуры до не более чем 1×10^2 КОЕ/г (колониеобразующих единиц), с получением термически обработанного ферментированного молочного продукта,

в) добавление в указанный термически обработанный ферментированный молочный продукт лактазы, которая сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы pH 6,5, с получением лактазосодержащего ферментированного молочного продукта, и

г) выдерживание указанного лактазосодержащего ферментированного молочного продукта при температуре от 2 до 25°C в течение от 1 до 7 суток для гидролиза лактозы.

2. Способ по п.1, где лактазосодержащий ферментированный молочный продукт выдерживают при температуре 15°C.

3. Способ по п.1 или 2, где лактазосодержащий ферментированный молочный продукт выдерживают в течение 7 суток.

4. Способ по любому из пп.1-3, где ферментированный заквасочной культурой молочный продукт подвергают стадии концентрирования для разделения указанного ферментированного заквасочной культурой молочного продукта на концентрированную фракцию и фракцию отделенной кислой сыворотки, где указанную фракцию отделенной кислой сыворотки, но не концентрированную фракцию, подвергают последующим стадиям данного способа.

5. Лактазосодержащий ферментированный молочный продукт, полученный способом по п.1, где

указанный продукт содержит лактазу, которая сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы pH 6,5, и содержит не более чем 1×10^2 КОЕ/г (колониеобразующих единиц) бактерий заквасочной культуры.

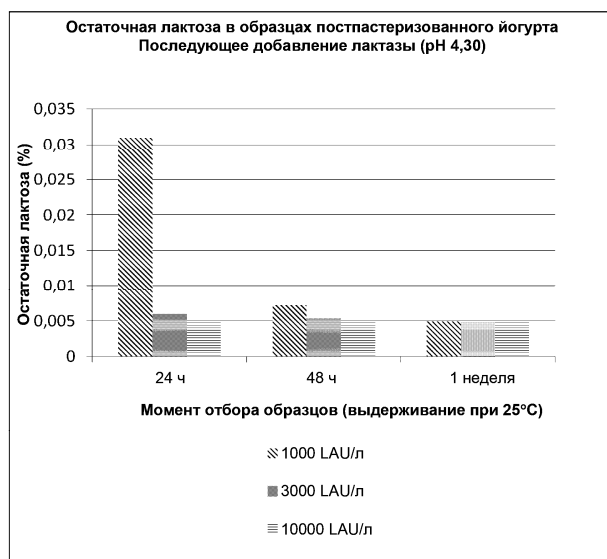
6. Лактазосодержащий ферментированный молочный продукт по п.5, где лактаза сохраняет свою активность при температуре 10°C и pH 6,0 на уровне по меньшей мере 10% по сравнению с ее активностью при оптимальной для лактазы температуре.

7. Лактазосодержащий ферментированный молочный продукт по п.5 или 6, содержащий лактазу в количестве от 100 до 20000 LAU (единиц лактазной активности) на литр молочного продукта.

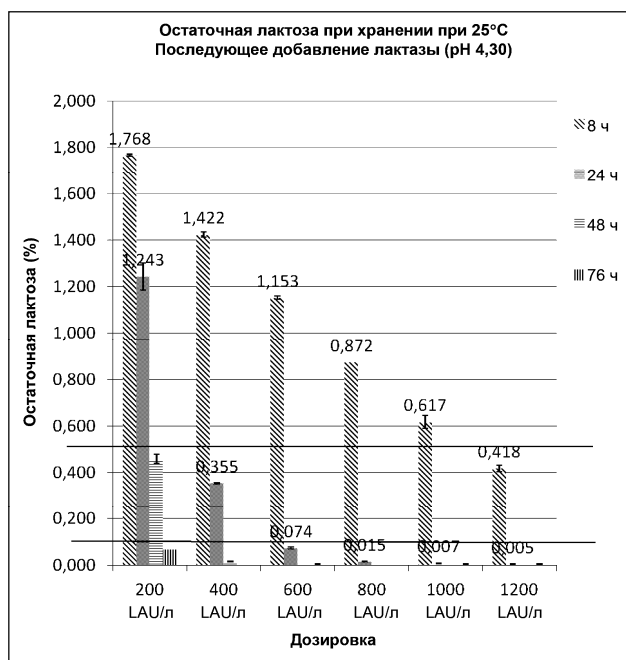
8. Лактазосодержащий ферментированный молочный продукт по любому из пп.5-7, где лактаза представляет собой лактазу, происходящую из *Bifidobacterium bifidum*.

9. Лактазосодержащий ферментированный молочный продукт по п.8, где лактаза, происходящая из *Bifidobacterium bifidum*, имеет SEQ ID NO: 2 или последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 28-1331 SEQ ID NO: 2.

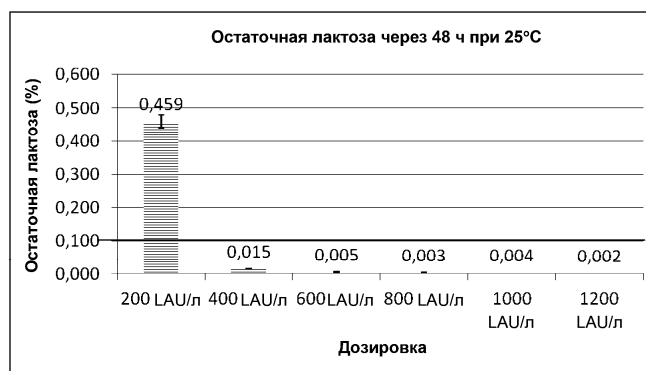
10. Способ получения лактазосодержащего кисломолочного продукта, включающий стадии обеспечения кисломолочного продукта, который имеет pH от 3,0 до 5,0 и содержание лактозы по меньшей мере 1,5 мг/мл, подвергания указанного кисломолочного продукта термической обработке таким образом, чтобы снизить количество бактерий заквасочной культуры до не более чем 1×10^2 КОЕ/г, с получением термически обработанного кисломолочного продукта, добавления в указанный термически обработанный кисломолочный продукт лактазы, которая сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению с ее активностью при оптимальном для лактазы pH 6,5, с получением лактазосодержащего кисломолочного продукта, и выдерживания указанного лактазосодержащего кисломолочного продукта при температуре от 2 до 25°C в течение от 1 до 7 суток для гидролиза лактозы.



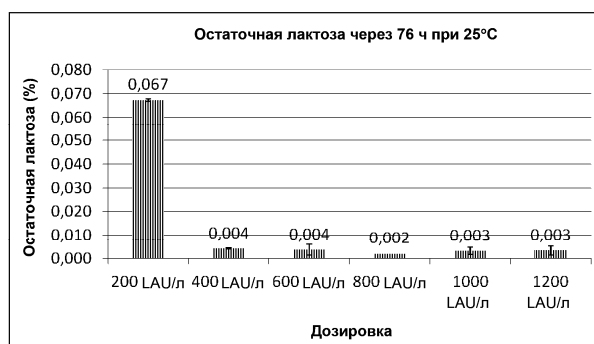
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2