

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390937** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.09.01

(51) Int. Cl. *A23C 9/123* (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.11.16

(54) **ШТАММ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ С УЛУЧШЕННЫМИ
ТЕКСТУРИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ**

(31) **20208145.1**

(32) **2020.11.17**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/081821**

(87) **WO 2022/106405 2022.05.27**

(71) Заявитель:

КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:

**Янсен Томас, Кристиансен Дитте
Эллегор, Бронд Йеспер, Пребнер
Виктория (DK)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новому штамму *Streptococcus thermophilus*, обладающему улучшенными текстурирующими свойствами, композициям, содержащим указанный штамм, а также ферментированным продуктам, произведенным с применением указанного штамма.

A1

202390937

202390937

A1

ШТАММ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ С УЛУЧШЕННЫМИ ТЕКСТУРИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ

Область техники

5 Настоящее изобретение относится к мутанту *Streptococcus thermophilus*, который, как было обнаружено, обладает улучшенными текстурирующими свойствами при сохранении по существу свойств своего родительского штамма. Настоящее изобретение также относится к композициям, таким как заквасочная культура, содержащим мутант, и к ферментированным продуктам, полученным с применением указанного мутанта.

10

Уровень техники

В пищевой промышленности применяют множество бактерий, в частности молочнокислые бактерии, для улучшения вкуса и текстуры пищевых продуктов, а также для продления срока хранения указанных продуктов. В молочной промышленности 15 молочнокислые бактерии интенсивно применяют для подкисления молока (путем ферментации), а также для придания текстуры продукту, в который их включают.

Среди молочнокислых бактерий (МКБ), применяемых в пищевой промышленности, преимущественно используют *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, 20 *Pediococcus* и *Bifidobacterium*. Молочнокислые бактерии вида *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) широко используют отдельно или в сочетании с другими бактериями, такими как *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*), для производства пищевых продуктов, в частности ферментированных продуктов. Их применяют, в частности, в составе заквасок, используемых для производства ферментированных молочных продуктов, 25 например, йогуртов. Некоторые из них играют доминирующую роль в формировании текстуры ферментированного продукта. Указанная характеристика тесно связана с производством экстраклеточных полимеров, которые секретируются молочнокислыми бактериями в окружающую среду.

30 Нынешняя тенденция в производстве йогуртов нацелена на получение мягкого вкуса и текстуры высокой густоты. В настоящее время это достигается путем применения культур, которые придают мягкий вкус, и добавления загустителей или белка для придания желаемой

густоты. Производители йогуртов хотели бы иметь возможность производить йогурт с такими свойствами без добавления загустителей. Такая возможность поможет им снизить затраты и обеспечить более чистый состав. Одним из очень привлекательных способов добиться этого является обеспечение заквасочной культуры, которая приводит к получению текстуры высокой густоты.

Некоторые штаммы МКБ вносят значительный вклад в улучшение текстуры, связанное с их способностью продуцировать экзо- (или экстраклеточные) полисахариды (ЭПС), которые могут являться капсульными (остаются прикрепленными к клетке в виде капсул) или секретироваться в среду. ЭПС состоит либо из одного типа сахара (гомоэкзополисахариды), либо из повторяющихся звеньев, состоящих из разных сахаров (гетероэкзополисахариды). МКБ, продуцирующие ЭПС, представляют интерес, поскольку ЭПС действуют как естественные загустители и усилители текстуры ферментированных пищевых продуктов. Кроме того, ЭПС из пищевых МКБ с заданными реологическими свойствами обладают потенциалом для разработки и применения в качестве пищевых добавок. Известно, что ЭПС улучшают реологические свойства продуктов, ферментированных МКБ, влияя на вязкость, синерезис, жесткость и органолептические свойства. Первичные структурные отличительные признаки (тип и конфигурация моносахаридов, гликозидная связь, несхарные компоненты, заряд), конформация и молекулярная масса, количество полисахарида и взаимодействие полисахарида с другими компонентами системы представляют собой факторы, которые могут вносить вклад и влиять на наблюдаемые техно-функциональные свойства (Zeidan *et al.*, 2017 FEMS Microbiol Rev 41: 168-200).

Хотя присутствие экзополисахарида не дает каких-либо очевидных преимуществ для роста или выживания *S. thermophilus* в молоке, его продуцирование указанным видом или другими молочнокислыми бактериями *in situ* обычно придает желаемую “липкую” или вязкую текстуру ферментированным молочным продуктам. Практика также показала, что *S. thermophilus*, продуцирующий экзополисахариды, может улучшать функциональные свойства сыра моцарелла. Для получения дополнительной информации см. обзорную статью Бродбента (Broadbent) *et al.* (J. dairy Sci. 86:407-423).

Для удовлетворения потребностей промышленности возникла необходимость в получении новых текстурирующих штаммов молочнокислых бактерий, в частности *S. thermophilus*, для текстурирования пищевых продуктов. В частности, существует потребность в новых текстурирующих штаммах *S. thermophilus*, которые можно применять вместе с текстурирующими штаммами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новому штамму *Streptococcus thermophilus* с улучшенными свойствами, в частности, в отношении его способности улучшать текстуру ферментированных молочных продуктов, таких как, например, йогурт, и который подходит для применения в современном высокоиндустриальном молочном производстве.

В частности, в настоящем изобретении описан новый штамм *S. thermophilus* DSM 33676.

Таким образом, один аспект настоящего изобретения относится к штамму *S. thermophilus* DSM 33676 и его мутантам и вариантам.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей штамм *S. thermophilus* DSM 33676.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного продукта, включающему ферментацию субстрата штаммом *S. thermophilus* DSM 33676 или композицией, содержащей штамм *S. thermophilus* DSM 33676.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к ферментированному продукту, который можно получать при помощи способа согласно настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к ферментированному продукту, содержащему штамм *S. thermophilus* DSM 33676.

Другой аспект относится к применению штамма *S. thermophilus* DSM 33676 для производства ферментированного продукта.

Подробное описание изобретения

5

Определения

Перед более подробным описанием настоящего изобретения предложено определение набора терминов и условных обозначений:

10

Термин “молоко” следует понимать как секрецию молочной железы, полученную при доении любого млекопитающего, такого как коровы, овцы, козы, буйволы или верблюды. В предпочтительном варианте реализации молоко представляет собой коровье молоко. Термин “молоко” также включает белково-жировые растворы, изготовленные частично или исключительно из растительных материалов.

15

Термин “молочный субстрат” может обозначать любой сырой и/или переработанный молочный материал, который можно подвергать ферментации при помощи способа согласно настоящему изобретению. Таким образом, подходящие для применения молочные субстраты включают, но не ограничиваются ими, растворы/суспензии любого молока или

20 молокоподобных продуктов, содержащих белок, таких как цельное молоко или молоко пониженной жирности, обезжиренное молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, сыворотка, сывороточный пермеат, лактоза, маточная жидкость процесса кристаллизации лактозы, концентрат сывороточного белка или сливки. Очевидно, что молочный субстрат можно получать от любого млекопитающего, например, он

25 может представлять собой по существу чистое молоко млекопитающих или восстановленное сухое молоко, или молочный субстрат можно получать из растительного материала.

30

Предпочтительно по меньшей мере часть белка в молочном субстрате представляет собой (i) белки, естественным образом встречающиеся в молоке млекопитающих, такие как казеин или сывороточный белок, или (ii) белки, естественным образом встречающиеся в растительном молоке. Тем не менее, часть белка может представлять собой белок, который не встречается естественным образом в молоке.

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

5 Термин “гомогенизация”, применяемый в настоящем документе, обозначает интенсивное перемешивание для получения растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию осуществляют до ферментации, ее можно проводить для разбивания молочного жира на более мелкие части, чтобы он не отделялся от молока. Этого можно добиться путем пропускания молока под высоким давлением через небольшие отверстия.

10

Термин “пастеризация”, применяемый в настоящем документе, обозначает обработку молочного субстрата для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно пастеризацию осуществляют путем поддержания определенной температуры в течение определенного периода времени. Указанную 15 температуру обычно достигают путем нагревания. Температуру и продолжительность можно выбирать для уничтожения или инактивации определенных бактерий, таких как вредные бактерии. Затем можно проводить стадию быстрого охлаждения.

Термин “ферментация” в способах согласно настоящему изобретению обозначает 20 превращение углеводов в спирты или кислоты под действием микроорганизма. Предпочтительно ферментация в способах согласно настоящему изобретению включает превращение лактозы в молочную кислоту.

Процессы ферментации, применяемые для производства ферментированных 25 молочных продуктов, хорошо известны, и специалисту в данной области техники известно, как выбирать подходящие условия процесса, такие как температура, содержание кислорода, количество и характеристики микроорганизма(ов) и длительность процесса. Очевидно, что условия ферментации выбирают таким образом, чтобы способствовать достижению настоящего изобретения, т.е. для получения ферментированного продукта, такого как 30 молочный или немолочный продукт в твердой или жидкой форме (ферментированный молочный продукт).

В настоящем контексте термин “заквасочная культура” представляет собой культуру, которая представляет собой состав из одного или более бактериальных штаммов (таких как штаммы молочнокислых бактерий) для содействия началу процесса ферментации при приготовлении ферментированных продуктов, таких как различные пищевые продукты, корма и напитки.

В настоящем контексте термин “йогуртовая заквасочная культура” представляет собой бактериальную культуру, которая содержит по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) и по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*). В соответствии с настоящим документом термин “йогурт” относится к ферментированному молочному продукту, получаемому путем инокуляции и ферментации молочного субстрата композицией, содержащей штамм *L. bulgaricus* и штамм *S. thermophilus*.

Под термином “резистентный к теллуриту” понимают бактериальный штамм, который способен расти (образовывать колонию) на планшетах с агаром M17, содержащих 0,1 мМ K_2TeO_3 , после 1-3 дней инкубации при 37°C.

В настоящем контексте термин “мутант” следует понимать как штамм, который получен или может быть получен из штамма согласно настоящему изобретению (или материнского штамма) при помощи, например, генной инженерии, радиационной и/или химической обработки. Мутант также может представлять собой спонтанно возникающий мутант. Предпочтительно, чтобы мутант являлся функционально эквивалентным мутантом, например, мутантом, который имеет по существу такие же или улучшенные свойства (например, в отношении вязкости, жесткости геля, обволакивания ротовой полости, вкуса, постокисления, скорости подкисления и/или устойчивости к фагам), что и материнский штамм. Такой мутант является частью настоящего изобретения. В частности, термин “мутант” относится к штамму, полученному путем подвергания штамма согласно настоящему изобретению любой обычно применяемой мутагенной обработке, включая обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (ЭМС) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ-излучением, или к спонтанно возникающему мутанту. Мутант можно подвергать нескольким мутагенным обработкам (под одной обработкой следует

понимать одну мутагенную стадию, за которой следует стадия скрининга/отбора), но в настоящее время предпочтительно проводят не более 20, или не более 10, или не более 5 обработок (или стадий скрининга/отбора). В предпочтительном в настоящее время мутанте менее 1%, менее 0,1%, менее 0,01%, менее 0,001% или даже менее 0,0001% нуклеотидов в бактериальном геноме заменены на другой нуклеотид или удалены по сравнению с материнским штаммом.

В настоящем контексте под термином “вариант” следует понимать штамм, который функционально эквивалентен штамму согласно настоящему изобретению, например, имеющий по существу такие же или улучшенные свойства, например, относительно вязкости, жесткости геля, обволакивания ротовой полости, вкуса, постокисления, скорости подкисления и/или устойчивости к фагам. Такие варианты, которые можно идентифицировать с применением соответствующих способов скрининга, являются частью настоящего изобретения.

15

Новый штамм *Streptococcus thermophilus* и его применение

Авторы настоящего изобретения неожиданно идентифицировали штамм *S. thermophilus* (т.е. DSM 33676), который удовлетворяет потребностям промышленности. Новый штамм демонстрирует улучшенные реологические свойства, такие как текстурирование, при применении отдельно или как часть смешанной культуры в молочном субстрате по сравнению с его материнским штаммом.

20

Штамм *S. thermophilus* DSM 33676 можно применять, например, в молочных культурах, таких как йогуртовые культуры, для получения улучшенных реологических параметров, таких как напряжение сдвига и жесткость геля конечного продукта.

25

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к штамму *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 и его мутантам и вариантам.

Полагают, что мутанты и варианты демонстрируют такие же или подобные характеристики напряжения сдвига и/или жесткости геля, что и DSM 33676. В настоящем контексте термин “подобное напряжение сдвига” следует понимать как диапазон,

30

охватывающий значения от 10% ниже характеристики напряжения сдвига DSM 33676 до 10% выше характеристики напряжения сдвига DSM 33676, диапазон также может быть на 9% ниже/выше характеристики напряжения сдвига DSM 33676, например, на 8% ниже/выше характеристики напряжения сдвига DSM 33676, например, на 7% ниже/выше характеристики напряжения сдвига DSM 33676, например, на 6% ниже/выше характеристики напряжения сдвига DSM 33676, например, на 5% ниже/выше характеристики напряжения сдвига DSM 33676, например, на 4% ниже/выше характеристики напряжения сдвига DSM 33676, например, на 3% ниже/выше характеристики напряжения сдвига DSM 33676, например, на 2% ниже/выше характеристики напряжения сдвига DSM 33676 или на 1% ниже/выше характеристики напряжения сдвига DSM 33676.

В настоящем контексте термин “подобная жесткость геля” следует понимать как диапазон, охватывающий значения от 10% ниже характеристики жесткости геля DSM 33676 до 10% выше характеристики жесткости геля DSM 33676, диапазон также может быть на 9% ниже/выше характеристики жесткости геля DSM 33676, например, на 8% ниже/выше характеристики жесткости геля DSM 33676, например, на 7% ниже/выше характеристики жесткости геля DSM 33676, например, на 6% ниже/выше характеристики жесткости геля DSM 33676, например, на 5% ниже/выше характеристики жесткости геля DSM 33676, например, на 4% ниже/выше характеристики жесткости геля DSM 33676, например, на 3% ниже/выше характеристики жесткости геля DSM 33676, например, на 2% ниже/выше характеристики жесткости геля DSM 33676 или на 1% ниже/выше характеристики жесткости геля DSM 33676.

Приведенный выше термин “характеристики” следует понимать в контексте части определения, где указано, как правильно измерять напряжение сдвига или жесткость геля.

Способы определения текстуры ферментированных продуктов, таких как молочные продукты, включают измерение напряжения сдвига (вязкости) или жесткости геля (комплексного модуля) ферментированного продукта, они легко доступны и известны в данной области техники и приведены в настоящем документе в качестве примеров.

В одном варианте реализации настоящего изобретения штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 обеспечивает напряжение сдвига более 20 Па, измеренное как

напряжение сдвига при 300 1/сек (Па) после 16 часов роста в обезжиренном молоке (0,5% жирности) при 43°C при инокуляции в количестве по меньшей мере 10^7 клеток на мл молока.

Напряжение сдвига более 20 Па, 22 Па, 24 Па, 26 Па, 28 Па, 30 Па, 31 Па, 32 Па, 33
5 Па, 34 Па или 35 Па при 300 сек^{-1} при измерении ферментированного продукта, полученного путем добавления DSM 33676, может являться желательным. Напряжение сдвига измеряют, как описано выше. Напряжение сдвига отдельной культуры измеряют в примере 2.

Напряжение сдвига более 35 Па, 40 Па, 45 Па, 50 Па, 60 Па, 70 Па, 80 Па, 90 Па или
10 100 Па при 300 сек^{-1} при измерении ферментированного продукта, полученного путем добавления композиции из DSM 33676 и по меньшей мере одного дополнительного штамма молочнокислых бактерий (смешанная культура), может являться желательным, так как оно соответствует органолептической вязкости/густоте в ротовой полости, которая является предпочтительной по мнению экспертной дегустационной группы. Напряжение сдвига
15 измеряют, как описано выше. Напряжение сдвига измеряют, как описано в примере 3.

В одном варианте реализации настоящего изобретения штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 обеспечивает комплексный модуль более 89 Па при измерении при помощи колебаний с частотой 1,52 Гц после 16 часов роста в обезжиренном молоке (0,5%
20 жирности) при 43°C при инокуляции в количестве по меньшей мере 10^7 клеток на мл молока.

Комплексный модуль более 90 Па, 91 Па, 92 Па, 93 Па, 94 Па, 95 Па, 96 Па, 97 Па, 98 Па, 99 Па или 100 Па при измерении при помощи колебаний с частотой 1,52 Гц ферментированного продукта, полученного путем добавления DSM 33676, может являться
25 желательным. Комплексный модуль измеряют, как описано выше. Комплексный модуль отдельной культуры измеряют в примере 2.

Комплексный модуль более 140 Па, 141 Па, 142 Па, 143 Па, 144 Па, 145 Па, 146 Па, 147 Па или 147 Па при измерении при помощи колебаний с частотой 1,52 Гц ферментированного продукта, полученного путем добавления композиции из DSM 33676 и по
30 меньшей мере одного дополнительного штамма молочнокислых бактерий (смешанная культура), может являться желательным, так как он соответствует органолептической

вязкости/густоте в ротовой полости, которая является предпочтительной по мнению экспертной дегустационной группы. Комплексный модуль измеряют, как описано выше. Напряжение сдвига измеряют, как описано в примере 3.

5 В предпочтительном варианте реализации штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 обеспечивает напряжение сдвига, которое по меньшей мере на 1% улучшено по сравнению с его материнским штаммом, например, на 2%, например, на 3%, например, на 4%,
10 например, на 5%, например, на 6%, например, на 7%, например, на 8%, например, на 9%,
например, на 10% по сравнению с его материнским штаммом, при измерении при 300 1/сек (Па) после 16 часов роста в обезжиренном молоке (0,5% жирности) при 43°C при инокуляции в количестве по меньшей мере 10^7 клеток на мл молока.

В предпочтительном варианте реализации штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 обеспечивает комплексный модуль, который по меньшей мере на 1% улучшен по сравнению с его материнским штаммом, например, на 2%, например, на 3%, например, на 4%,
15 например, на 5%, например, на 6%, например, на 7%, например, на 8%, например, на 9%,
например, на 10% по сравнению с его материнским штаммом, при измерении при помощи колебаний с частотой 1,52 Гц после 16 часов роста в обезжиренном молоке (0,5% жирности) при 43°C при инокуляции в количестве по меньшей мере 10^7 клеток на мл молока.

20 Под “текстурой” или “ощущением во рту” подразумевают физическое и химическое взаимодействие продукта в ротовой полости.

Неожиданно было обнаружено, что мутанты из штаммов *S. thermophilus*,
25 резистентных к солям теллурида, таким как K_2TeO_3 , демонстрируют повышенные реологические свойства. Таким образом, в одном варианте реализации штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 является резистентным к теллуриду и/или его солям или производным.

30 Композиции

Другой аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей или состоящей из штамма *Streptococcus thermophilus* DSM 33676.

Композицию согласно настоящему изобретению можно представлять в нескольких формах. Она может представлять собой замороженную форму, высушенную форму, сублимированную форму или жидкую форму. Таким образом, в одном варианте реализации композиции находится в замороженной, высушенной, лиофилизированной или жидкой форме.

Композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать криопротекторы, лиопротекторы, антиоксиданты, питательные вещества, наполнители, ароматизаторы или их смеси. Композиция предпочтительно содержит один или более из криопротекторов, лиопротекторов, антиоксидантов и/или питательных веществ, более предпочтительно криопротекторов, лиопротекторов и/или антиоксидантов и наиболее предпочтительно криопротекторов, или лиопротекторов, или и тех и других. Применение защитных агентов, таких как криопротекторы и лиопротекторы, известно специалистам в данной области техники. Подходящие криопротекторы или лиопротекторы включают моно-, ди-, три- и полисахариды (такие как глюкоза, манноза, ксилоза, лактоза, сахароза, трегалоза, рафиноза, мальтодекстрин, крахмал и гуммиарабик (аравийская камедь) и т.п.), многоатомные спирты (такие как эритрит, глицерин, инозит, маннит, сорбит, треит, ксилит и т.п.), аминокислоты (такие как пролин, глутаминовая кислота), сложные вещества (такие как обезжиренное молоко, пептоны, желатин, дрожжевой экстракт) и неорганические соединения (такие как триполифосфат натрия). В одном варианте реализации композиции согласно настоящему изобретению может содержать один или более криопротекторных агентов, выбранных из группы, состоящей из инозин-5'-монофосфата (IMP), аденозин-5'-монофосфата (AMP), гуанозин-5'-монофосфата (GMP), уранозин-5'-монофосфата (UMP), цитидин-5'-монофосфата (CMP), аденина, гуанина, урацила, цитозина, аденозина, гуанозина, уридина, цитидина, гипоксантина, ксантина, гипоксантина, оротидина, тимидина, инозина и производных любых таких соединений. Подходящие антиоксиданты включают аскорбиновую кислоту, лимонную кислоту и их соли, галлаты, цистеин, сорбит, маннит, мальтозу. Подходящие питательные вещества включают сахара, аминокислоты, жирные кислоты, минералы, микроэлементы, витамины (такие как витамины группы В, витамин С). Композиция необязательно может содержать дополнительные вещества, включая наполнители (такие как лактоза, мальтодекстрин) и/или ароматизаторы.

В одном варианте реализации настоящего изобретения криопротекторный агент представляет собой агент или смесь агентов, которые в дополнение к своей криопротекторной способности обладают бустерным эффектом.

5 Выражение “бустерный эффект” используют для описания ситуации, когда криопротекторный агент придает повышенную метаболическую активность (бустерный эффект) размороженной или восстановленной культуре при ее инокуляции в среду для ферментации или превращения. Жизнеспособность и метаболическая активность не являются синонимичными понятиями. Коммерческие замороженные или лиофилизированные культуры
10 могут сохранять свою жизнеспособность, хотя они могут терять значительную часть своей метаболической активности, например, культуры могут терять свою кислотообразующую (подкисляющую) активность при хранении даже в течение более коротких периодов времени. Таким образом, жизнеспособность и бустерный эффект необходимо оценивать при помощи разных анализов. В то время как жизнеспособность оценивают при помощи анализов
15 жизнеспособности, таких как определение колониеобразующих единиц, бустерный эффект оценивают путем количественного определения соответствующей метаболической активности размороженной или восстановленной культуры по отношению к жизнеспособности культуры. Термин “метаболическая активность” относится к активности удаления кислорода культурами, их кислотообразующей активности, т.е. продуцированию,
20 например, молочной кислоты, уксусной кислоты, муравьиной кислоты и/или пропионовой кислоты, или активности продуцирования их метаболитов, такой как продуцирование ароматических соединений, таких как ацетальдегид (α -ацетолактат, ацетоин, диацетил и 2,3-бутиленгликоль (бутандиол)).

25 В одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит или включает от 0,2% до 20% криопротекторного агента или смеси агентов, измеренных как масс.%/масс.% материала. Тем не менее, предпочтительно добавлять криопротекторный агент или смесь агентов в количестве, которое находится в диапазоне от 0,2% до 15%, от 0,2% до 10%, от 0,5% до 7% и от 1% до 6% по массе, включая диапазон от 2%
30 до 5% криопротекторного агента или смеси агентов, измеренных как масс.%/масс.% замороженного материала. В предпочтительном варианте реализации культура содержит примерно 3% криопротекторного агента или смеси агентов, измеренных как масс.%/масс.%

материала. Количество примерно 3% криопротекторного агента соответствует концентрациям в диапазоне 100 мМ. Следует понимать, что для каждого аспекта варианта реализации настоящего изобретения диапазоны могут представлять собой инкременты описанных диапазонов.

5

В другом аспекте композиция согласно настоящему изобретению содержит или включает аммониевую соль (например, аммониевую соль органической кислоты (такую как формиат аммония и цитрат аммония) или аммониевую соль неорганической кислоты) в качестве бустера (например, бустера роста или бустера подкисления) для бактериальных
10 клеток, таких как клетки, принадлежащие к видам *S. thermophilus*, например, (по существу) уреазо-отрицательные бактериальные клетки. Под терминами “аммониевая соль”, “формиат аммония” и т.п. следует понимать источник соли или комбинацию ионов. Термин “источник”, например, “формиата аммония” или “аммониевой соли”, относится к соединению или смеси соединений, которые при добавлении к культуре клеток приводят к получению формиата
15 аммония или аммониевой соли. В некоторых вариантах реализации источник аммония высвобождает аммоний в питательную среду, в то время как в других вариантах реализации источник аммония метаболизируется с образованием аммония. В некоторых предпочтительных вариантах реализации источник аммония является экзогенным. В некоторых особенно предпочтительных вариантах реализации молочный субстрат не
20 обеспечивает получение аммония. Разумеется, следует понимать, что вместо аммониевой соли можно добавлять аммиак. Таким образом, термин “аммониевая соль” включает аммиак (NH_3), NH_4OH , NH_4^+ и т.п.

В одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению может
25 содержать загуститель и/или стабилизатор, такой как пектин (например, пектин ВМ, пектин НМ), желатин, КМЦ, соевое волокно/соевый полимер, крахмал, модифицированный крахмал, каррагинан, альгинат и гуаровая камедь.

В одном варианте реализации, в котором микроорганизм продуцирует полисахарид
30 (такой как ЭПС), который придает текстуру высокой густоты/липкую текстуру подкисленному молочному продукту, подкисленный молочный продукт производят по существу без или полностью без какого-либо добавления загустителя и/или стабилизатора,

такого как пектин (например, пектин ВМ, пектин НМ), желатин, КМЦ, соевое волокно/соевый полимер, крахмал, модифицированный крахмал, каррагинан, альгинат и гуаровая камедь. Под фразой “по существу без” следует понимать, что продукт содержит от 0% до 20% (масс./масс.) (например, от 0% до 10%, или от 0% до 5%, или от 0% до 2%, или от 0% до 1%) загустителя и/или стабилизатора.

Композиция может представлять собой смесь или составный комплект, содержащий:

- i) штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676, и
- ii) штамм, принадлежащий к виду *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

10

Для получения наилучшего сочетания кислотности, вкуса, текстуры продукта, такого как молочный продукт, например, йогурт, часто применяют комбинацию *S. thermophilus* и *L. bulgaricus*.

15

В одном варианте реализации смесь или составный комплект может содержать штамм *S. thermophilus* DSM 33676 в комбинации со штаммом *S. thermophilus* DSM 24011 и штаммом *L. bulgaricus* DSM 33571.

20

В другом варианте реализации смесь или составный комплект может содержать штамм *S. thermophilus* DSM 33676 в комбинации со штаммом *S. thermophilus* DSM 24011 и штаммом *L. bulgaricus* DSM 24074.

25

В примере 3 представлена смешанная культура, содержащая *S. thermophilus* и *L. bulgaricus*.

Пробиотические штаммы

30

Термин “пробиотические бактерии” относится к жизнеспособным бактериям, которые вводят потребителю в достаточных количествах с целью достижения у потребителя оздоровительного эффекта. Пробиотические бактерии способны выживать в условиях желудочно-кишечного тракта после приема внутрь и колонизировать кишечник потребителя.

Следует понимать, что таксономия рода *Lactobacillus* была обновлена в 2020 г. Новая таксономия представлена в Zheng *et al.* 2020 и согласуется с таксономией, представленной в настоящем документе, если не указано иное. Для целей настоящего изобретения в таблице 1 представлен список новых и старых названий некоторых видов *Lactobacillus*, имеющих отношение к настоящему изобретению.

<i>Старое название</i>	<i>Новое название</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>Paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus animalis</i>	<i>Ligilactobacillus animalis</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
<i>Lactobacillus futsaii</i>	<i>Companilactobacillus futsaii</i>
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	<i>Latilactobacillus sakei</i> subsp.
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>

Таблица 1. Новые и старые названия некоторых видов *Lactobacillus*, имеющих отношение к настоящему изобретению

В конкретном варианте реализации настоящего изобретения пробиотический штамм согласно настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из бактерий рода *Lactobacillus*, таких как *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus reuteri* и *Lactobacillus johnsonii*, рода *Bifidobacterium*, таких как *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* и *Bifidobacterium infantis*, и т.п.

В конкретном варианте реализации настоящего изобретения пробиотический штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*,
5 *Lactobacillus lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus reuteri* и *Lactobacillus johnsonii*.

В конкретном варианте реализации настоящего изобретения пробиотический штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lacticaseibacillus rhamnosus* и штамма
10 *Lacticaseibacillus paracasei*.

В конкретном варианте реализации настоящего изобретения пробиотический штамм представляет собой штамм *Lacticaseibacillus rhamnosus* LGG®, депонированный как ATCC53103.
15

В конкретном варианте реализации настоящего изобретения пробиотический штамм представляет собой штамм *Lacticaseibacillus paracasei* CRL 431, депонированный как ATCC 55544.

20 В конкретном варианте реализации настоящего изобретения пробиотический штамм *Bifidobacterium* выбран из группы, состоящей из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* и *Bifidobacterium infantis*.

25 В конкретном варианте реализации настоящего изобретения пробиотический штамм *Bifidobacterium* представляет собой штамм *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, депонированный как DSM15954.

30 Указанные выше смеси или составные комплекты можно дополнительно объединять с другими молочнокислыми бактериями, такими как, но не ограничиваясь ими, пробиотические бактерии. В одном варианте реализации по меньшей мере одна молочнокислая бактерия выбрана из группы, состоящей из *Bifidobacterium*, такой как

Bifidobacterium animalis subsp. *Lactis* (например, BB-12®), *Lactobacillus acidophilus* (LA-5®), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (например, LGG®) и их комбинаций. Выбор из *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* и/или *Lacticaseibacillus rhamnosus* зависит от их предполагаемого применения и производимых пищевых продуктов.

5

В одном варианте реализации смесь или составный комплект может содержать штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 в комбинации со штаммом *Streptococcus thermophilus* DSM 24011, штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 33571 и штаммом *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* DSM 33443.

10

В одном варианте реализации смесь или составный комплект может содержать штамм *S. thermophilus* DSM 33676 в комбинации со штаммом *S. thermophilus* DSM 24011, штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 24074 и штаммом *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* DSM 33443.

15

В одном варианте реализации смесь или составный комплект может содержать штамм *S. thermophilus* DSM 33676 в комбинации со штаммом *S. thermophilus* DSM 24011, штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 33571, штаммом *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* DSM 33443 и штаммом *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241.

20

В одном варианте реализации смесь или составный комплект может содержать штамм *S. thermophilus* DSM 33676 в комбинации со штаммом *S. thermophilus* DSM 24011, штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 24074, штаммом *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* DSM 33443 и штаммом *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241.

25

В одном варианте реализации смесь или составный комплект может содержать штамм *S. thermophilus* DSM 33676 в комбинации со штаммом *S. thermophilus* DSM 24011, штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 33571 и штаммом *Lacticaseibacillus rhamnosus* DSM 33156.

30

В одном варианте реализации смесь или составный комплект может содержать штамм *S. thermophilus* DSM 33676 в комбинации со штаммом *S. thermophilus* DSM 24011, штаммом

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* DSM 24074 и штаммом *Lacticaseibacillus rhamnosus* DSM 33156.

5 Указанные выше смеси или составные комплекты можно дополнительно комбинировать с другими штаммами *S. thermophilus*. Такие штаммы могут представлять собой, например, DSM 32823 и/или DSM 32587.

10 Выражение “смесь” обозначает, что штамм(ы) *S. thermophilus* и штамм(ы) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* физически смешаны друг с другом. В одном варианте реализации штамм(ы) *S. thermophilus* и штамм(ы) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* находятся в одной коробке или в одном пакете.

15 Напротив, выражение “составный комплект”, содержащий штамм(ы) *S. thermophilus* и штамм(ы) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, обозначает, что культура штамма(ов) *S. thermophilus* и культура штамма(ов) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* физически разделены, но предназначены для совместного применения. Таким образом, культура штамма(ов) *S. thermophilus* и культура штамма(ов) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* находятся в разных коробках или пакетиках. В одном варианте реализации культура штамма(ов) *S. thermophilus* и культура штамма(ов) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* находятся в одном и том же виде, например, находится в замороженном виде, в форме гранул или замороженных гранул, форме порошка, такого как высушенный или лиофилизированный порошок.

25 В конкретном варианте реализации настоящего изобретения композиция содержит от 10^4 до 10^{12} КОЕ (колониеобразующих единиц)/г штамма *S. thermophilus*, например, от 10^5 до 10^{11} КОЕ/г, например, от 10^6 до 10^{10} КОЕ/г, или, например, от 10^7 до 10^9 КОЕ/г штамма *S. thermophilus*.

30 В конкретном варианте реализации композиция дополнительно содержит от 10^4 до 10^{12} КОЕ/г штамма *L. bulgaricus*, например, от 10^5 до 10^{11} КОЕ/г, например, от 10^6 до 10^{10} КОЕ/г, или, например, от 10^7 до 10^9 КОЕ/г штамма *L. bulgaricus*.

L. bulgaricus, *S. thermophilus* и другие молочнокислые бактерии обычно применяют в качестве заквасочных культур, служащих для технологических целей при производстве различных пищевых продуктов, например, в молочной промышленности, например, для ферментированных молочных продуктов. Таким образом, в другом предпочтительном варианте реализации композиция подходит для применения в качестве заквасочной культуры.

Композиция может представлять собой заквасочную культуру, такую как йогуртовая заквасочная культура.

Композиция и/или заквасочная культура могут являться замороженными, высушенными распылением, лиофилизированными, высушенными в вакууме, высушенными на воздухе, высушенными на лотках или могут находиться в жидкой форме. Обычно стабильность композиции и/или заквасочной культуры при хранении можно увеличивать путем получения продукта с низкой водной активностью. Путем контролирования водной активности (A_w) можно предсказывать и регулировать влияние миграции влаги на продукт. Следовательно, может быть предпочтительно, чтобы водная активность (A_w) высушенных композиций согласно настоящему изобретению находилась в диапазоне 0,01-0,8, предпочтительно в диапазоне 0,05-0,4.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения ферментированного продукта, включающему ферментацию субстрата штаммом *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 или композицией согласно настоящему изобретению.

В зависимости от производимого продукта субстрат может представлять собой молочный субстрат. Молочный субстрат особенно предпочтителен, когда конечным продуктом являются ферментированные молочные продукты, такие как йогурт, пахта или кефир.

Молочный субстрат может представлять собой продукт животного или растительного происхождения. Таким образом, в одном варианте реализации ферментированный продукт представляет собой молочный продукт. Молочный продукт может быть выбран из группы, состоящей из ферментированных молочных продуктов, таких как, но не ограничиваясь ими,

йогурт, пахта и кефир, или сыров, таких как, но не ограничиваясь ими, молодой сыр или паста филата.

5 Хотя ферментированный продукт и/или молочный продукт сам по себе содержит кислоту и ароматизатор, образующиеся во время ферментации, может быть желательно, чтобы ферментированный продукт и/или молочный продукт содержал ингредиент, выбранный из группы, состоящей из фруктового концентрата, сиропа, пробиотического штамма или культуры бактерий, красителя, загустителя, ароматизатора, консерванта и их смесей.

10 Аналогично, к субстрату, например, молочному субстрату, до, во время и/или после ферментации можно добавлять фермент, при этом фермент выбран из группы, состоящей из фермента, способного сшивать белки, трансглутаминазы, аспарагиновой протеазы, химозина, реннина и их смесей.

15 В одном варианте реализации ферментированный продукт может находиться в форме продукта перемешанного типа, продукта термостатного типа или питьевого продукта.

Понятно, что другой аспект настоящего изобретения относится к ферментированному продукту, который можно получать при помощи способа согласно настоящему изобретению.
20 Таким образом, аспект настоящего изобретения также представляет собой ферментированный продукт, содержащий штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676. Ферментированный продукт может представлять собой молочный продукт.

Последний аспект настоящего изобретения относится к применению штамма
25 *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 для производства ферментированного продукта. Опять же ферментированный продукт может представлять собой молочный продукт.

Применение форм единственного числа в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует истолковывать
30 как охватывающее формы единственного числа и формы множественного числа, если иное не указано в настоящем документе или явно не противоречит контексту. Термины “содержащий”, “имеющий” и “включающий” следует истолковывать как открытые термины

(т.е. означающие “включая, но не ограничиваясь ими”), если не указано иное. Указание диапазонов значений в настоящем документе предназначено исключительно для применения в качестве сокращенного способа ссылки на каждое отдельное значение, входящее в диапазон, если иное не указано в настоящем документе, и каждое отдельное значение включено в настоящее описание, как если бы оно было приведено в настоящем документе индивидуально. Все способы, описанные в настоящем документе, можно выполнять в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящем документе или иным образом явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или вводных слов перед примерами (например, “такой как”), представленных в настоящем документе, предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения и не ограничивает объем настоящего изобретения, если не заявлено иное. Никакую формулировку в настоящем описании не следует истолковывать как указывающую на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического применения настоящего изобретения.

Любое перечисление или обсуждение явно ранее опубликованного документа в настоящем описании не обязательно следует понимать, как признание того, что документ является частью уровня техники или является общеизвестным.

Предпочтения, варианты и варианты реализации для данного аспекта, отличительного признака или параметра настоящего изобретения следует, если контекст не указывает иное, рассматривать как описанные в комбинации с любыми и всеми предпочтениями, вариантами и вариантами реализации для всех других аспектов, отличительных признаков и параметров настоящего изобретения. Это особенно верно для описания микроинкапсулированной микробной культуры и всех ее отличительных признаков, которая легко может являться частью конечной композиции, получаемой при помощи способа, описанного в настоящем документе. Варианты реализации и отличительные признаки настоящего изобретения также описаны в следующих пунктах и проиллюстрированы следующими неограничивающими примерами.

30 **Депозиты и экспертные решения**

Штамм *Streptococcus thermophilus* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, Инхоффенштрассе 7B, D-38124, Брауншвейг,

Германия (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany)) под номером доступа DSM 33676 29 октября 2020 компанией Chr. Hansen A/S, Херсхольм, Дания.

5 Согласно требованию заявителя образец депонированных микроорганизмов, указанных ниже, может быть предоставлен только эксперту до даты выдачи патента.

Штамм	№ доступа	Дата депонирования
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 33676	10.29.2020

10 **Таблица 2.** Депозиты, сделанные в депозитном учреждении, получившем статус международного депозитарного органа в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры: *Институт Лейбница DSMZ-Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур*, Инхоффенштрассе 7B, 38124, Брауншвейг, Германия (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany).

Пункты

15 X1. Штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 и его мутанты и варианты.

20 X2. Штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по п. X1, отличающийся тем, что указанные мутанты и варианты демонстрируют такие же или подобные характеристики напряжения сдвига и/или жесткости геля, что и DSM 33676.

25 X3. Штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по любому из пп. X1-X2, отличающийся тем, что указанный штамм является резистентным к теллуриду и/или его солям или производным.

Y1. Композиция, содержащая штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по любому из пп. X1-X3.

Y2. Композиция по п. Y1, содержащая, в виде смеси или составного комплекта:

i) штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по любому из пп. X1-X3; и

ii) штамм, принадлежащий к виду *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

5 Y3. Композиция по любому из пп. Y1-Y2, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой заквасочную культуру.

Y4. Композиция по любому из пп. Y1-Y3, отличающаяся тем, что указанная композиция и/или заквасочная культура находится в замороженной, высушенной распылением,
10 лиофилизированной, высушенной в вакууме, высушенной на воздухе, высушенной на лотках или жидкой форме.

Z1. Способ производства ферментированного продукта, включающий ферментацию субстрата штаммом *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по любому из пп. X1-X3 или композицией по
15 любому из пп. Y1-Y4.

Z2. Способ по п. Z1, отличающийся тем, что указанный субстрат представляет собой молочный субстрат.

20 Z3. Способ по любому из пп. Z1-Z2, отличающийся тем, что указанный молочный субстрат представляет собой продукт животного или растительного происхождения.

Z4. Способ по любому из пп. Z1-Z3, отличающийся тем, что указанный ферментированный продукт представляет собой молочный продукт.

25 Z5. Способ по п. Z4, отличающийся тем, что указанный молочный продукт выбран из группы, состоящей из ферментированного молочного продукта (например, йогурта, пахты или кефира) или сыра (например, молодого сыра или пасты филата).

30 Z6. Способ по любому из пп. Z4-Z5, отличающийся тем, что указанный ферментированный продукт дополнительно содержит ингредиент, выбранный из группы, состоящей из

фруктового концентрата, сиропа, пробиотического штамма или культуры бактерий, красителя, загустителя, ароматизатора, консерванта и их смесей.

5 Z7. Способ по п. Z6, отличающийся тем, что к субстрату до, во время и/или после ферментации добавляют фермент, при этом фермент выбран из группы, состоящей из фермента, способного сшивать белки, трансглутаминазы, аспарагиновой протеазы, химозина, реннина и их смесей.

10 Z8. Способ по любому из пп. Z1-Z7, отличающийся тем, что указанный ферментированный продукт находится в форме продукта перемешанного типа, продукта термостатного типа или питьевого продукта.

Q1. Ферментированный продукт, который можно получать при помощи способа по п. Z1.

15 Q2. Ферментированный продукт по п. Q1, отличающийся тем, что указанный ферментированный продукт представляет собой молочный продукт.

P1. Ферментированный продукт, содержащий штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по любому из пп. X1-X3.

20 P2. Ферментированный продукт по п. P1, отличающийся тем, что указанный ферментированный продукт представляет собой молочный продукт.

25 W2. Применение штамма *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по любому из пп. X1-X3 для производства ферментированного продукта.

W2. Применение по п. W1, отличающееся тем, что указанный ферментированный продукт представляет собой молочный продукт.

Примеры

*Пример 1: Выделение резистентных к теллуриду мутантов из *S. thermophilus* DSM 18111 с улучшенными текстурирующими свойствами*

5

Резистентные к теллуриду мутанты выделяли из DSM 18111 (также называемого “материнским штаммом”) следующим образом.

10 Мутанты подвергали непосредственному скринингу на планшетах с агаром M17, содержащих 0,1 мМ K_2TeO_3 , путем высеивания на указанные планшеты ночных культур DSM 18111 с последующей инкубацией при 37°C в течение 1-3 дней. Набор из пятнадцати мутантов, демонстрирующих стабильный резистентный к теллуриду фенотип, очищали на планшетах с агаром M17, содержащих 0,1 мМ K_2TeO_3 . Один из теллуридных мутантов, демонстрирующий резистентный к теллуриду фенотип, называли DSM 33676.

15

Мутанты DSM 18111 инокулировали из ночной культуры в среде M17, содержащей 0,1 мМ K_2TeO_3 , в количестве 1% в молоко и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Затем определяли вязкость ферментированного молока путем измерения времени истечения из пипетки на 25 мл. Чем больше время истечения, тем выше вязкость испытываемой среды.

20 Время истечения определяли как среднее значение по трем измерениям.

25

Время истечения, т.е. вязкость, являлось увеличенным для резистентных к теллуриду мутантов. Для мутанта DSM 33676 наблюдали увеличение вязкости на 20% по сравнению с материнским штаммом DSM 18111.

При помощи указанного эксперимента продемонстрировали, что можно дополнительно улучшать текстурирующие свойства ЭПС-положительных штаммов *S. thermophilus* путем выделения мутантов, резистентных к теллуриду.

30 *Пример 2: Сравнение исходного материнского штамма DSM 18111 и DSM 33676 по напряжению сдвига и комплексному модулю*

DSM 18111 инокулировали в 9,5% восстановленное обезжиренное молоко и инкубировали при 43°C с получением ночной культуры. Затем DSM 18111 инокулировали в двух повторностях из молока с ночной культурой в количестве 1% в обезжиренное молоко (0,5% жирности) и инкубировали при 41°C в течение 16 часов. Аналогичным образом DSM 33676 инокулировали из молока с ночной культурой в количестве 1% в обезжиренное молоко (0,5%) и инкубировали при 43°C в течение 16 часов.

На следующий день после инкубации ферментированное молоко доводили до 13°C и осторожно перемешивали при помощи палочки с просверленным диском до однородности образца. Реологические свойства образца оценивали на реометре (StressTech, Reologica Instruments, Швеция), оснащенный коаксиальной измерительной системой C25.

Определение вязкости проводили при скоростях сдвига от 0,27 до 300 1/сек в 21 шаг. Скорость сдвига увеличивали, а затем уменьшали и регистрировали восходящие и нисходящие кривые напряжения сдвига и кажущейся вязкости.

Время задержки и интегрирования составляло 5 сек и 10 сек, соответственно. Для дальнейшего анализа выбирали напряжение сдвига при 300 сек⁻¹.

Результаты

Результаты для одиночного штамма:

Название образца	Напряжение сдвига	Комплексный модуль	Отношение
DSM 18111	32,9	79,2	0,502
DSM 18111	33,7	88,8	0,509
DSM 33676	30,8	90,9	0,511
DSM 33676	30,8	90,9	0,51

Таблица 3. Характеристики напряжения сдвига, комплексного модуля и отношения материнского штамма (DSM 18111) и мутантного штамма (DSM 33676)

DSM 33676 демонстрировал жесткость геля (комплексный модуль), улучшенную на 8% по сравнению с DSM 18111 (среднее значение по двум измерениям).

Результаты для смешанной культуры:

Выбор мутанта DSM 33676 для масштабирования проводили с применением обезжиренного молока с пониженным содержанием белка (3%), термически обработанного в течение 5 мин при 95°C и охлажденного до температуры ферментации перед применением.

- 5 Инокуляционный материал представлял собой ночную культуру кандидатов в стерильном молоке с добавлением дрожжевого экстракта. Мутант DSM 33676 сравнивали с уже промышленно улучшенным штаммом из того же семейства (DSM 22935).

- 10 Всех мутантов испытывали в фоновых культурах, состоящих из 50% испытываемого штамма, 10% подкисляющего *S. thermophilus*, 30% текстурирующего *S. thermophilus* и 10% *L. bulgaricus*, в результате получали 12 различных вариаций для каждого мутанта. Для проверки на повышенную вязкость измеряли сопротивление при аспирации при помощи робота компании Hamilton (TADM). Усредненные результаты для каждого мутанта сравнивали со средним значением для эталонного штамма. Чем более отрицательное давление
15 (мПа) наблюдали при аспирации, тем выше являлась вязкость образца.

Результаты можно видеть в следующей таблице:

	Падение давления при аспирации от	Падение давления при аспирации от
Смесь, содержащая DSM 33676	-1500 мПа	-2100 мПа
Смесь, содержащая DSM 22935	-1500 мПа	-1780 мПа

Таблица 4. Падение давления при аспирации для смесей, содержащих DSM 33676 и DSM 22935, соответственно.

20

Пример 3: Производство перемешанного йогурта без добавок со смесью, содержащей DSM 33676

Материалы и способы

Молочная основа: 4,0% белка, 1,5% жира. Свежее молоко с сухим обезжиренным молоком (SMP), обработанным при средней температуре, компании Arla.

5 Культуры: Культура 1 (штамм *L. bulgaricus* DSM 33571 и штаммы *S. thermophilus* DSM 24011 и DSM 33676) и F-DVS YoFlex® Premium 1.0, запатентованная культура предшествующего уровня техники, содержащая один штамм *L. bulgaricus* в сочетании с 2 различными штаммами *S. thermophilus*.

Масштаб ферментации	3 л
Смешивание порошка и регидратация молочной основы	Растворить порошок в холодном молоке (<10°C), нагреть до 58°C (±2°C) и регидратировать в течение 1 часа при 58°C (±2°C) при перемешивании
Гомогенизация	200/50 бар при 65°C
Пастеризация	95°C в течение 5 мин
Инокуляция культуры	500 ЕД/2500 л (мин. 1Е10 КОЕ/г), инокуляция при 43°C
Температура ферментации	43°C
Посл. изм. рН	рН 4,55
Постобработка	Приложить давление 2 бар перед пластинчатым теплообменником при установленной температуре на выходе 20°C (±2°C)

Результаты

10 *Комплексный модуль G^* – связь с жесткостью геля*

15 Комплексный модуль G^* оценивали путем измерения колебаний с применением ASC реометра модели DSR502 производства Anton Paar. Способ основан на шаге колебаний, при котором образец колеблется между двумя поверхностями, при этом верхняя геометрическая форма (боб) движется, а нижняя чашка остается неподвижной. Колебания проводили при частоте 0,5-8 Гц при постоянном напряжении. Для осуществления указанного оценивания результаты извлекали из измерений на частоте 1,52 Гц. Образцы выдерживали при 13°C в течение 1 часа перед измерением. Каждый образец осторожно перемешивали ложкой 5 раз снизу вверх для обеспечения однородности образца. Чашки для определения реологических

свойств заполняли до отметки и помещали в отсек для образцов. Образцы измеряли в двух повторностях с применением двух отдельных чашек для йогурта. Измерения проводили в день +7 и устанавливали температуру измерения 13°C. Образцы хранили при 5°C до дня измерения. Поскольку в указанные результаты включены три произведенные партии, всего имеется 6 точек данных.

Культура	Среднее значение комплексного модуля G^* при 1,52 Гц (Па), n = 6	STDev
F-DVS YoFlex® Premium 1.0	143,5	7,1 ¹⁰
Культура 1	140,8	7,0

Таблица 5. Результаты измерения жесткости геля по комплексному модулю G^* при колебаниях с частотой 1,52 Гц. Результаты приведены в виде средних значений, включая стандартное отклонение, по итогам 3 повторных испытаний в АТС. Измерения проводили в день +7, доводя температуру до 13°C.

Напряжение сдвига – связь с густотой в ротовой полости

Напряжение сдвига измеряли с применением ASC реометра модели DSR502 производства Anton Paar. В способе применяли ротационный шаг, который основан на ротационной деформации образца, от 10^{-3} сек⁻¹ до 300 сек⁻¹, а затем обратно до 10^{-3} сек⁻¹. Измеряли соответствующее напряжение сдвига. Для получения указанных результатов из кривой текучести извлекали четыре скорости сдвига (0,3; 30; 135; 300 сек⁻¹) (см. таблицу 4). Образцы выдерживали при 13°C в течение 1 часа перед измерением. Каждый образец осторожно перемешивали ложкой 5 раз снизу вверх для обеспечения однородности образца. Чашки для определения реологических свойств заполняли до отметки и помещали в отсек для образцов. Образцы измеряли в двух повторностях с применением двух отдельных чашек для йогурта. Измерения проводили в день +7 и устанавливали температуру измерения 13°C. Образцы хранили при 5°C до дня измерения.

СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ

Культура	0,3 сек ⁻¹	30 сек ⁻¹	135 сек ⁻¹	300 сек ⁻¹
F-DVS YoFlex [®] Premium 1.0	4,8	25,7	47,9	54,2
Культура 1	4,9	32,1	54,3	57,1

STD

Культура	0,3 сек ⁻¹	30 сек ⁻¹	135 сек ⁻¹	300 сек ⁻¹
F-DVS YoFlex [®] Premium 1.0	0,2	1,3	0,8	0,7
Культура 1	0,3	1,8	1,3	0,7

Таблица 6. Результаты измерения напряжения сдвига с применением реометра производства Anton Paar. Результаты приведены в виде средних значений, включая стандартное отклонение, по итогам 3 повторных испытаний в АТС. Измерения проводили в день +7, доводя температуру до 13°C.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 и его мутанты и варианты.
- 5 2. Штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по п. 1, отличающийся тем, что указанные мутанты и варианты демонстрируют такие же или подобные характеристики напряжения сдвига и/или жесткости геля, что и DSM 33676.
3. Штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по любому из предшествующих пунктов,
10 отличающийся тем, что указанный штамм является резистентным к теллуриду и/или его солям или производным.
4. Композиция, содержащая штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по любому из пп. 1-
3.
- 15 5. Композиция по п. 4, содержащая, в виде смеси или составного комплекта:
i) штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по любому из пп. 1-3; и
ii) штамм, принадлежащий к виду *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.
- 20 6. Композиция по любому из пп. 4-5, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой заквасочную культуру.
7. Композиция по любому из пп. 4-6, отличающаяся тем, что указанная композиция и/или заквасочная культура находится в замороженной, высушенной распылением,
25 лиофилизированной, высушенной в вакууме, высушенной на воздухе, высушенной на лотках или жидкой форме.
8. Способ получения ферментированного продукта, включающий ферментацию субстрата штаммом *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по любому из пп. 1-3 или композицией по
30 любому из пп. 4-7.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанный субстрат представляет собой молочный субстрат.
10. Способ по любому из пп. 8-9, отличающийся тем, что указанный ферментированный продукт представляет собой молочный продукт.
11. Способ по любому из пп. 8-10, отличающийся тем, что указанный ферментированный продукт дополнительно содержит ингредиент, выбранный из группы, состоящей из фруктового концентрата, сиропа, пробиотической культуры бактерий, красителя, загустителя, ароматизатора, консерванта и их смесей.
12. Способ по любому из пп. 8-11, отличающийся тем, что к субстрату до, во время и/или после ферментации добавляют фермент, при этом указанный фермент выбран из группы, состоящей из фермента, способного сшивать белки, трансглутаминазы, аспарагиновой протеазы, химозина, реннина и их смесей.
13. Ферментированный продукт, который можно получать при помощи способа по любому из пп. 8-12.
14. Ферментированный продукт, содержащий штамм *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по любому из пп. 1-3.
15. Применение штамма *Streptococcus thermophilus* DSM 33676 по любому из пп. 1-3 для производства ферментированного продукта.