

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391073** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.30

(51) Int. Cl. *A23C 9/127* (2006.01)
A23C 13/16 (2006.01)
A23C 17/02 (2006.01)
A23C 19/032 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.08.30

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЗОФИЛЬНО ФЕРМЕНТИРОВАННОГО МОЛОЧНОГО ПРОДУКТА

(31) **17188549.4**

(74) Представитель:

(32) **2017.08.30**

Билык А.В., Поликарпов А.В.,

(33) **EP**

Соколова М.В., Дмитриев А.В.,

(62) **202090442; 2018.08.30**

Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев

(71) Заявитель:

А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.

КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

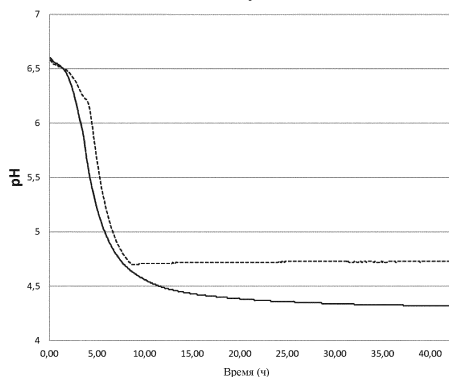
(RU)

(72) Изобретатель:

**Блок Virginie (FR), Янсен Томас,
Биркелунд Мими (DK), Жимене
Люсьяна, Одино Жан-Мари, Пируа-
Блин Сабрина (FR), Гулдагер Хелле
Сков (DK)**

(57) Изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему стадии 1) добавления к молочной основе заквасочной культуры молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, способный метаболизировать углевод, отличный от лактозы, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis*, способный метаболизировать углевод, отличный от лактозы, и 2) ферментации молока в течение периода времени до достижения желаемого pH с получением ферментированного молочного продукта.

Закисление при 34°C



----- DSM28952+DSM32605+0,5% сахара

—— XPL-30

A2

202391073

202391073

A2

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЗОФИЛЬНО ФЕРМЕНТИРОВАННОГО МОЛОЧНОГО ПРОДУКТА

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Мезофильно ферментированные молочные продукты получают при температуре от примерно 22°C до примерно 35°C, и как правило используют мезофильные молочнокислые бактерии *Lactococcus spp.* и *Leuconostoc spp.* Мезофильно ферментированные молочные продукты включают пахту, кислое молоко, сквашенное молоко, сметану, кислые сливки, кефир и молодой сыр, такой как кварк, творог и творожный сыр.

В EP-A1-2 957 180 раскрыт способ продукции ферментированного молочного продукта с использованием лактозодефицитных молочнокислых бактерий, в частности лактозодефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* и штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить улучшенный способ получения мезофильно ферментированного молочного продукта.

Задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить способ получения ферментированного молочного продукта, включающий стадии:

1) добавления к молочной основе заквасочной культуры молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать углевод, отличный от лактозы, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis*, который способен метаболизировать углевод, отличный от лактозы, и

2) ферментации молока в течение периода времени до достижения желаемого значения pH с получением ферментированного молочного продукта.

Лактозодефицитные молочнокислые бактерии как правило растут на источнике углевода, отличном от лактозы, таком как сахароза, галактоза и глюкоза, добавляемом в молоко в таком количестве, чтобы прекратить процесс ферментации и рост молочнокислых бактерий за счет исчерпания добавляемого источника углевода. Таким образом, последующее закисление во время последующего хранения значительно

уменьшается или даже полностью предотвращается.

Настоящее изобретение основано на понимании того, что возможно уменьшить или предотвратить последующее закисление во время хранения в мезофильно ферментированном молочном продукте путем использования комбинации мезофильного лактозодефицитного штамма *Lactococcus lactis* и лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*.

Настоящее изобретение дополнительно основано на экспериментальном обнаружении того, что применение указанной комбинации штаммов также обладает множеством преимуществ при получении мезофильно ферментированного молочного продукта. Во-первых, в способе получения мезофильно ферментированного молочного продукта применение указанной комбинации штаммов позволяет избежать стадию охлаждения ферментированного молочного продукта после ферментации и до заполнения в контейнеры для потребления конечным пользователем. Таким образом, поскольку последующее закисление отсутствует или является лишь минимальным после окончания ферментации вследствие истощения углеводного источника роста, охлаждение для уменьшения последующего закисления не является необходимым. Во-вторых, неожиданно обнаружено, что указанная комбинация штаммов приводит к улучшенной текстуре мезофильно ферментированного молочного продукта относительно соответствующей культуральной смеси, содержащей лактозоположительные штаммы.

ГРАФИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

Фиг. 1 демонстрирует профили закисления культур С1-С4 при 34°C.

Фиг. 2 демонстрирует профили закисления культур С1-С4 при 30°C.

Фиг. 3 демонстрирует профили закисления культуры С5 при 34°C.

Фиг. 4 демонстрирует профили закисления культуры С6 при 34°C.

Фиг. 5 демонстрирует профили закисления культуральных смесей LC5 + ST1 и LC7 + ST1 при 30°C.

Фиг. 6 демонстрирует профили закисления культуральных смесей LACcr1 + ST1 и LACcr2 + ST1 при 30°C.

Фиг. 7 демонстрирует профили закисления культуральных смесей С1-С4 и контроля при 30°C.

Фиг. 8 демонстрирует профили закисления культуральных смесей С1-С4 и контроля при 35°C.

Фиг 9 демонстрирует профили закисления С1-С3 и контроля при 30°C.

Фиг 10 демонстрирует профили закисления С1-С3 и контроля при 35°C.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Лактозодефицитные молочнокислые бактерии

Термины “дефицит по метаболизму лактозы” и “лактозный дефицит” используются в контексте настоящего изобретения для того, чтобы охарактеризовать LAB, которые частично или полностью утратили способность использовать лактозу в качестве источника для клеточного роста или поддержания жизнеспособности клеток. Соответствующие LAB способны метаболизировать один или несколько углеводов, выбранных из сахарозы, галактозы и/или глюкозы, или другого ферментируемого углевода. Поскольку эти углеводы не представлены в молоке в природе в достаточных количествах, для того, чтобы поддержать ферментацию лактозодефицитными мутантами, необходимо добавлять эти углеводы в молоко. Лактозодефицитные и частично дефицитные LAB могут быть охарактеризованы в виде белых колоний на среде, содержащей лактозу и X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид).

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм способен метаболизировать углевод, отличный от лактозы, выбранный из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы, предпочтительно сахарозы. В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм способен метаболизировать галактозу.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* является положительным в отношении сахарозы.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* является положительным в отношении глюкозы.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из:

(а) (1) штамма, депонированного в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 12.06.2014 под регистрационным номером DSM 28952;

(2) штамма, полученного из DSM 28952, который дополнительно отличается тем, что способен образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу

и X-Gal;

(б) (1) штамма, депонированного в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 12.06.2014 под регистрационным номером DSM 28953;

(2) штамма, полученного из DSM 28953, который дополнительно отличается тем, что способен образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(в) (1) штамма, депонированного в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 22.08.2017 под регистрационным номером DSM 32599;

(2) штамма, полученного из DSM 32599, который дополнительно отличается тем, что способен образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal; и

(г) (1) штамма, депонированного в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 22.08.2017 под регистрационным номером DSM 32600; и

(2) штамма, полученного из DSM 32600, который дополнительно отличается тем, что способен образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из:

(а) (1) штамма, депонированного в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 12.06.2014 под регистрационным номером DSM 28952;

(2) штамма, полученного из DSM 28952, который дополнительно отличается тем, что способен образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal; и

(б) (1) штамма, депонированного в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und

Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 12.06.2014 под регистрационным номером DSM 28953; и

(2) штамма, полученного из DSM 28953, который дополнительно отличается тем, что способен образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из:

(в) (1) штамма, депонированного в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 22.08.2017 под регистрационным номером DSM 32599;

(2) штамма, полученного из DSM 32599, который дополнительно отличается тем, что способен образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal; и

(г) (1) штамма, депонированного в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 22.08.2017 под регистрационным номером DSM32600; и

(2) штамма, полученного из DSM 28953, который дополнительно отличается тем, что способен образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением штамм *Lactococcus lactis* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* и штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis* выбран из группы, состоящей из

- 1) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32398,
- 2) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 18882,
- 3) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32399,
- 4) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 18893,
- 5) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32601,
- 6) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32602,
- 7) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32603,

- 8) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32604,
- 9) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32605,
- 10) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32829,
- 11) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32830,
- 12) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32832, и
- 13) мутанта любого из штаммов (1)-(12).

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis* выбран из группы, состоящей из

- 1) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32398,
- 2) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 18882,
- 3) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32399,
- 4) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 18893,
- 5) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32829,
- 6) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32830,

и

- 7) мутанта любого из штаммов (1)-(6).

Вышеприведенные штаммы (1)-(6) являются глюкозоположительными и сахарозоотрицательными.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* выбран из группы, состоящей из

- 1) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32398,
- 2) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 18882,
- 3) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 18893,
- 4) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32829,
- 5) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32830,

и

- 6) мутанта любого из штаммов (1)-(5).

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* выбран из группы, состоящей из

- 1) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM

32399, и

2) его мутанта.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* выбран из группы, состоящей из

- 1) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32601,
- 2) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32602,
- 3) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32603,
- 4) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32604,
- 5) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32605,
- 6) штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32832,

и

7) мутанта любого из штаммов (1)-(6).

Вышеприведенные штаммы (1)-(6) являются глюкозоотрицательными и сахарозоположительными. Указанные штаммы (1)-(6) являются предпочтительными в том, что когда их используют в способе в соответствии с изобретением, они продуцируют ферментированные молочные продукты с повышенной однородностью.

Стадии способа в соответствии с изобретением

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитные штаммы способны метаболизировать углевод, отличный от лактозы, выбранный из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы, предпочтительно сахарозы.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением, углевод, отличный от лактозы добавляют к молочной основе в начале стадии ферментации.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением стадию ферментации останавливают при помощи способа, выбранного из группы, состоящей из 1) закисления ферментированного молока, что приводит к тому, что по меньшей мере один штамм заквасочной культуры не способен расти, 2) охлаждающей обработки и 3) израсходования углевода, отличного от лактозы.

Предпочтительно, углевод, отличный от лактозы, добавляют к молочной основе в количестве, отмеренном так, чтобы он израсходовался, и следовательно это привело в результате к прекращению роста молочнокислых бактерий и к прекращению ферментации. Предпочтительно, углевод, отличный от лактозы добавляют к молочной основе в количестве, отмеренном так, чтобы он израсходовался при желаемом рН и следовательно привело в результате к прекращению роста молочнокислых бактерий и к

прекращению ферментации.

Количество углевода, отличного от лактозы, добавляемого к молочной основе, зависит от множества параметров, включая штаммы молочнокислых бактерий, используемые в заквасочной культуре, композицию молочной основы, температуру ферментации и желаемое значение pH. Количество углевода, отличного от лактозы, добавляемого к молочной основе, может быть определено экспериментально, и оно находится в пределах знаний специалиста в данной области техники, способного осуществить такой эксперимент.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением желаемый pH составляет от 3,2 до 4,8, более предпочтительно от 4,0 до 5,2, более предпочтительно от 4,2 до 5,0 и наиболее предпочтительно от 4,4 до 4,8.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением температура ферментации составляет от 15°C до 35°C, предпочтительно от 24°C до 35°C, более предпочтительно от 26°C до 35°C, более предпочтительно от 28°C до 35°C и более предпочтительно от 30°C до 34°C.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением ферментированный молочный продукт не подвергают стадии охлаждения после окончания стадии ферментации и до упаковывания.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением ферментированный молочный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением величину pH ферментированного молочного продукта поддерживают в диапазоне 0,3 единиц pH, предпочтительно в диапазоне 0,2 единиц pH и наиболее предпочтительно в диапазоне 0,1 единиц pH при хранении после прекращения ферментации при температуре, используемой для ферментации в течение периода 20 часов.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением количество добавленного отличного от лактозы углевода составляет от 1 мг/г до 30 мг/г, предпочтительно от 2 мг/г до 20 мг/г, и более предпочтительно от 3 мг/г до 10 мг/г молочной основы.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением количество добавленного отличного от лактозы углевода составляет от 0,1% до 10%, предпочтительно от 0,2% до 8%, предпочтительно от 0,3% до 2%, предпочтительно от 0,4% до 1,5%, и более предпочтительно от 0,5% до 1,2%, где % (масс./масс.) взят от

молочной основы.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением заквасочная культура дополнительно содержит один или более чем один штамм, выбранный из группы, состоящей из *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* биовар. *diacetylactis*, *Leuconostoc spp.* и *Bifidobacterium spp.* Также заквасочная культура может содержать дрожжи. В конкретном воплощении в соответствии с изобретением *Leuconostoc spp.* выбран из группы, состоящей из *Leuconostoc mesenteroides* и *Leuconostoc pseudomesenteroides*. В конкретном воплощении в соответствии с изобретением *Bifidobacterium spp.* выбран из группы, состоящей из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium catemulatum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium pseudocatemulatum* и *Bifidobacterium infantis*.

В предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением молочная основа в начале стадии ферментации имеет содержание лактозы от 30,0 мг/мл до 70 мг/мл, предпочтительно от 35 мг/мл до 65 мг/мл, более предпочтительно от 40 мг/мл до 60 мг/мл, и наиболее предпочтительно от 50 мг/мл до 60 мг/мл.

Ферментированный молочный продукт

Настоящее изобретение дополнительно относится к ферментированному молочному продукту, получаемому способом в соответствии с изобретением.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением ферментированный молочный продукт представляет собой продукт, который может быть получен с использованием штамма заквасочной культуры молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis*.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением ферментированный молочный продукт выбран из группы, состоящей из пахты, кислого молока, сквашенного молока, сметаны, кислых сливок, высокожирных сливок, сквашенных сливок, юмера, ферментированной молочной сыворотки, кефира, японского биоюгурта и молодого сыра, такого как варк, творог и творожный сыр. В частности, ферментированный молочный продукт выбран из группы, состоящей из варка, кислых сливок и кефира.

В предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением ферментированный молочный продукт содержит дополнительный пищевой продукт, выбранный из группы, состоящей из плодово-ягодного напитка, зерновых продуктов,

ферментированных зерновых продуктов, химически закисленных зерновых продуктов, соевых молочных продуктов, ферментированных соевых молочных продуктов и любой их смеси.

Ферментированный молочный продукт как правило содержит белок на уровне от 1,0 масс.% до 12,0 масс.%, предпочтительно от 2,0 масс.% до 10,0 масс.%. В конкретном воплощении кислые сливки содержат белок на уровне от 1,0 масс.% до 5,0 масс.%, предпочтительно от 2,0 масс.% до 4,0 масс.%. В конкретном воплощении кварк содержит белок на уровне от 4,0 масс.% до 12,0 масс.%, предпочтительно от 5,0 масс.% до 10,0 масс.%.

Композиция в соответствии с изобретением

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis*.

В конкретном воплощении композиция содержит по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* и один лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis*. В конкретном воплощении композиция содержит один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis*.

В конкретном воплощении композиция содержит два или более чем два лактозодефицитных штамма *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один лактозодефицитный *Lactococcus lactis*. В конкретном воплощении композиция содержит по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* и два или более чем два лактозодефицитных штамма *Lactococcus lactis*.

В конкретном воплощении композиция содержит два или более чем два лактозодефицитных штамма *Streptococcus thermophilus* и один лактозодефицитный *Lactococcus lactis*. В конкретном воплощении композиция содержит один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* и два или более чем два лактозодефицитных штамма *Lactococcus lactis*.

В конкретном воплощении композиция содержит два лактозодефицитных штамма *Streptococcus thermophilus* и один лактозодефицитный *Lactococcus lactis*. В конкретном воплощении композиция содержит один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* и два лактозодефицитных штамма *Lactococcus lactis*.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением композиция содержит

штамм, депонированный в DSMZ под регистрационным номером DSM 32398, и
штамм, депонированный в DSMZ под регистрационным номером DSM 18882.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением композиция содержит
штамм, депонированный в DSMZ под регистрационным номером DSM 32398, и
штамм, депонированный в DSMZ под регистрационным номером DSM 18893.

Применение в соответствии с изобретением

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать углевод, отличный от лактозы, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactococcus lactis*, который способен метаболизировать углевод, отличный от лактозы, в способе получения ферментированного молочного продукта, включающем стадии

- 1) добавления штамма заквасочной культуры молочнокислых бактерий к молочной основе, и
- 2) ферментации молока в течение периода времени до достижения желаемого рН с получением ферментированного молочного продукта.

Конкретное воплощение применения в соответствии с изобретением относится к применению для улучшения текстуры ферментированного молочного продукта по сравнению с применением заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один лактозоположительный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать лактозу, и по меньшей мере один лактозоположительный штамм *Lactococcus lactis*, который способен метаболизировать лактозу.

Определения

В связи с настоящим изобретением применяются следующие определения:

Выражение "молочнокислые бактерии" ("LAB") обозначает грамположительные, микроаэрофильные или анаэробные бактерии, которые сбраживают сахара с получением кислот, включающих молочную кислоту, в качестве преимущественно продуцируемой кислоты, уксусную кислоту и пропионовую кислоту. Наиболее полезные для промышленности молочнокислые бактерии обнаружены в отряде "Lactobacillales", которые 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 сами по себе или в комбинации с другими молочнокислыми бактериями.

Молочнокислые бактерии, включая бактерии видов *Lactobacillus* sp. и *Lactococcus* sp., обычно поставляются в молочную промышленность в виде замороженных или лиофилизированных культур для культивирования производственной закваски или в виде так называемых культур "для прямого внесения" (DVS), предназначенной для прямой инокуляции в ферментирующий сосуд или резервуар для получения молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт или сыр. Такие культуры молочнокислых бактерий обычно называют "заквасочными культурами" или "заквасками". Как правило, заквасочная культура для йогурта содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, и в большинстве стран йогурт законодательно установлен как ферментированный молочный продукт, получаемый с использованием заквасочной культуры, содержащей два указанных штамма.

Под термином "молоко" понимают секрецию молока, получаемого путем доения какого-либо млекопитающего, таких как коровы, овцы, козы, буйволы или верблюды. Термин "молоко" также включает белковые/жировые растворы, получаемые из растительных материалов, например соевое молоко.

Термин "молочная основа" может представлять собой любой не обработанный или обработанный молочный материал, который может быть подвергнут ферментации в соответствии со способом по изобретению. Таким образом, полезные молочные основы включают растворы/суспензии какого-либо молока или подобных молоку продуктов, содержащих белок, таких как цельное молоко или молоко с пониженным содержанием жира, обезжиренное молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, молочная сыворотка, сывороточный пермеат, лактозу, маточную жидкость в результате кристаллизации лактозы, белковый концентрат молочной сыворотки или молочные сливки, но не ограничиваются ими. Очевидно, что молочная основа может иметь происхождение от любого млекопитающего, например, представлять собой по существу чистое молоко млекопитающего или восстановленное сухое молоко.

Перед ферментацией молочная основа может быть гомогенизирована или пастеризована в соответствии со способами, известными в области техники.

Использованный здесь термин "гомогенизация" обозначает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию осуществляют перед ферментацией, тогда она может быть осуществлена таким образом, чтобы разрушить молочный жир до меньшего размера для

предотвращения того, чтобы жировой компонент отделялся от молока. Последнее может быть осуществлено путем пропускания молока при высоком давлении через небольшие отверстия.

Используемый здесь термин "пастеризация" обозначает обработку молочной основы для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно, пастеризацию осуществляют путем поддержания определенной температуры в течение определенного периода времени. Определенную температуру обычно достигают путем нагревания. Температура и длительность могут быть выбраны для того чтобы убить или инактивировать некоторые бактерии, такие как вредные бактерии. За этим может последовать стадия быстрого охлаждения.

“Ферментация” в способах в соответствии с настоящим изобретением обозначает превращение углеводов в спирты или кислоты путем действия микроорганизма. Предпочтительно, ферментация в способах в соответствии с изобретением включает превращение лактозы в молочную кислоту.

Способы ферментации, используемые в производстве молочных продуктов, хорошо известны, и специалист в данной области техники осведомлен о том, каким образом выбрать подходящие для способа условия, такие как температура, кислород, количество и характеристики микроорганизма(ов) и длительность способа. Очевидно, что условия ферментации выбраны таким образом, чтобы способствовать осуществлению настоящего изобретения, т.е. получения молочного продукта в твердой (такой как сыр) или жидкой форме (такой как ферментированный молочный продукт).

Выражение “ферментированный молочный продукт” обозначает пищевой или кормовой продукт, где получение пищевого или кормового продукта включает ферментацию молочной основы при помощи молочнокислых бактерий. Используемый здесь “ферментированный молочный продукт” включает продукты, такие как термофильно ферментированные молочные продукты, например йогурт, мезофильно ферментированные молочные продукты, например кислые сливки и пахту, а также ферментированную молочную сыворотку, но не ограничиваются ими.

Используемый здесь термин “термофил” относится к микроорганизмам, которые лучше всего развиваются при температурах выше 35°C. Наиболее полезные для промышленности термофильные бактерии включают *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. Используемый здесь термин “термофильная ферментация” относится к ферментации при температуре выше примерно 35°C, такой как от примерно 35°C до

примерно 45°C. Термин “термофильно ферментированный молочный продукт” относится к ферментированным молочным продуктам, получаемым путем термофильной ферментации термофильной заквасочной культуры, и включают такие ферментированные молочные продукты как йогурт термостатного способа производства, йогурт с нарушенным сгустком и питьевой йогурт, например японский биойогурт.

Используемый здесь термин “мезофил” относится к микроорганизмам, которые лучше всего развиваются при умеренных температурах (15°C-35°C). Наиболее полезные для промышленности мезофильные бактерии включают *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp. Используемый здесь термин “мезофильная ферментация” относится к ферментации при температуре от примерно 22°C до примерно 35°C. Термин “мезофильно ферментированный молочный продукт” относится к ферментированным молочным продуктам, получаемым путем мезофильной ферментации мезофильной заквасочной культуры, и включают такие ферментированные молочные продукты, как пахта, кислое молоко, сквашенное молоко, сметана, кислые сливки, высокожирные сливки, сквашенные сливки, юмер, ферментированная молочная сыворотка, кефир, японский биойогурт и молодой сыр, такой как варк, творог и творожный сыр.

В связи с настоящим изобретением “напряжения сдвига” может быть измерено при помощи следующего способа:

Через семь суток после получения ферментированный молочный продукт доводили до 13°C и вручную осторожно перемешивали при помощи ложечки (5 раз) до гомогенного состояния образца. Реологические свойства образца оценивали при помощи реометра (Anton Paar Physica Rheometer с ASC, автоматическая смена образца, Anton Paar® GmbH, Austria) с использованием чашки с грузом. Во время измерения реометр устанавливали до постоянной температуры 13°C. Установки были следующими:

Время ожидания (для восстановления в некоторой степени исходной структуры):

5 минут без какого-либо физического напряжения (качание или вращение), приложенного к образцу

Стадия качания (для измерения модуля упругости и модуля вязкости, G и G'' , соответственно, таким образом, рассчитывая суммарный модуль G^*)

Постоянное напряжение = 0,3%, частота (f) = [0,5...8] Гц

6 точек измерения в течение 60 с (по одной каждые 10 с)

Стадия вращения (для измерения напряжения сдвига при 300 1/с)

Разработали две стадии:

Скорость сдвига = [0,3-300] 1/с и 2) Скорость сдвига = [275-0,3] 1/с.

Каждая стадия включала 21 точку измерения в течение 210 с (каждые 10 с).

Напряжение сдвига при 300 1/с выбрано для дальнейшего анализа, поскольку оно коррелирует с загущением во рту при проглатывании ферментированного молочного продукта.

В связи с настоящим изобретением "твердость геля" может быть измерена при помощи следующего способа:

Твердость геля измеряют при помощи теста обратной экструзии с использованием анализатора текстуры (TA.XT Plus, Stable Micro System, Surrey, UK), оборудованного параллельным планшетом 35 мм. Путь пробега устанавливали равным 15 мм, и скорость пробега равной 2 мм/с. Тест осуществляют через 7 суток после получения. Ферментированный молочный продукт доводили до 13°C и вручную осторожно перемешивали, и измерения проводили в пластиковом контейнере на 250 г. Максимальную силу (Н или g), полученную при помощи кривых зависимости дистанции от силы, используют в качестве параметра "твердости геля", положительная площадь (Н*мм) как степень деформации, максимальное отрицательное усилие (Н) как вязкость

Используемый здесь термин "лактаза, стабильная при низком значении pH" относится к лактазе, которая сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению со своей активностью при оптимальном для лактазы pH.

Термин "активность при оптимальном pH" означает активность лактазы при таком значении pH, при котором лактаза имеет оптимальную активность.

Термин "углевод, отличный от лактозы" означает любой углевод, который не представляет собой лактозу, и который лактозодефицитная молочнокислая бактерия, используемая в способе в соответствии с изобретением, способна метаболизировать.

Термин "израсходование" в отношении углевода, отличного от лактозы, означает то, что концентрация углевода, отличного от лактозы, равна нулю или является настолько низкой, что заквасочная культура больше не способна расти.

Выражение "в начале стадии ферментации" означает в течение короткого времени до, в то же самое время или в течение короткого времени после добавления заквасочной культуры к молочной основе. Используемый здесь термин "в течение короткого времени" означает меньше чем 30 минут".

Выражение "во время стадии ферментации" означает любое время во время ферментации после начала и до окончания ферментации.

Выражение "в конце стадии ферментации" означает в течение короткого времени до, в то же самое время или в течение короткого времени после достижения желаемого рН. Здесь термин "в течение короткого времени" означает меньше чем 30 минут".

Термин "желаемый рН" означает рН, при котором завершается стадия ферментации. В зависимости от различных параметров способа стадию ферментации останавливают при помощи способа, выбранного из группы, состоящей из 1) закисления ферментированного молока, приводящего к тому, что по меньшей мере один штамм заквасочной культуры не способен расти, 2) охлаждающей обработки и 3) истощения углевода, отличного от лактозы.

Термин "мутантный штамм" следует понимать как штамм, который получен, или как штамм, который может быть получен из штамма (или материнского штамма) в соответствии с изобретением путем, например генетической инженерии, радиационной и/или химической обработки. "Штаммы, полученные из него", также могут представлять собой спонтанно возникающие мутанты. Предпочтительно, чтобы "штаммы, полученные из него", представляли собой функционально эквивалентные мутанты, например мутанты, которые по существу обладают теми же самыми или улучшенными свойствами, как и материнский штамм. В частности, термин "мутантные штаммы" относится к штаммам, полученным путем того, что штамм в соответствии с изобретением подвергают какой-либо обычно используемой мутагенной обработке, включающей обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ излучение, или к спонтанно возникшему мутанту. Мутант может быть подвергнут нескольким мутагенным обработкам (единичную обработку следует понимать как одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/отбора), но в настоящее время предпочтительно осуществлять не более чем 20, или не более чем 10 или не более чем 5 обработок (или стадий скрининга/отбора). В предпочтительном в настоящее время мутанте меньше чем 1%, меньше чем 0,1%, меньше чем 0,01%, в частности меньше чем 0,001%, и даже в частности меньше чем 0,0001% нуклеотидов в бактериальном геноме заменены на другой нуклеотид или подвергнуты делеции по сравнению с материнским штаммом.

ДЕПОНИРОВАНИЯ И ЭКСПЕРТНОЕ СУЖДЕНИЕ

По требованию заявителя образец депонированного микроорганизма должен

быть доступен только эксперту, одобренному заявителем.

Штамм *Streptococcus thermophilus* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 12.06.2014 под регистрационным номером DSM 28952.

Штамм *Streptococcus thermophilus* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 12.06.2014 под регистрационным номером DSM 28953.

Штамм *Streptococcus thermophilus* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 22.08.2017 под регистрационным номером DSM 32599.

Штамм *Streptococcus thermophilus* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 22.08.2017 под регистрационным номером DSM 32600.

Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 06.12.2016 под регистрационным номером DSM 32398.

Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 19.12.2006 под регистрационным номером DSM 18882.

Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 19.12.2006 под регистрационным номером DSM 18893.

Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 06.12.2016 под регистрационным номером DSM 32399.

Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 22.08.2017 под регистрационным номером DSM 32601.

Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 22.08.2017 под регистрационным номером DSM 32602.

Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 22.08.2017 под регистрационным номером DSM 32603.

Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 22.08.2017 под регистрационным номером DSM 32604.

Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 22.08.2017 под регистрационным номером DSM 32605.

Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 05.06.2018 под регистрационным номером DSM 32829.

Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 05.06.2018 под регистрационным номером DSM 32830.

Штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* был депонирован в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 05.06.2018 под регистрационным номером DSM 32832.

Депонирование было осуществлено в соответствии с Будапештским договором о

международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

*Получение перемешанных кислых сливок с использованием сахарозы в качестве источника углерода и культуры, состоящей из одного лактозодефицитного *S. thermophilus* (ST) и одного или двух лактозодефицитных *L. lactis* subsp. *cremoris* (CR)*

Штаммы

ST1: *Streptococcus thermophilus* DSM 28952

CR1: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 32398

CR7: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 18893

Композиции культур

Таблица 1

	ST1 (%)	CR1 (%)	CR7 (%)
M1	72,2	27,8	0,0
M2	72,2	13,9	13,9

В качестве основы для сравнения использовали контрольную культуру, содержащую обычный лактозоположительный штамм *Streptococcus thermophilus* и обычный лактозоположительный штамм *Lactococcus lactis*.

Молочная основа

Молочная основа для контрольной культуры содержала 3,5% белка и 15% жира.

Молочная основа для культур в соответствии с изобретением содержала 3,2% белка и 15% жира.

Таблица 2: Композиция молочной основы

	Молочная основа для изобретения (%)	Молочная основа для контроля (%)
Молоко	50,74	50,63
Молочные сливки	46,87	46,87
Обезжиренное сухое молоко	1,67	2,49
Сахар (Сахароза)	0,71	0,0

Процедура

Ферментацию осуществляли при температурах 30°C и 34°C.

Образцы полученных перемешанных кислых сливок заполняли в чашки и

хранили при 6°C, и pH измеряли в конце ферментации и на 7, 14, 21, 28, 35 и 42 сутки после окончания ферментации.

Контрольный образец охлаждали до 16°C перед заполнением в чашки.

Образцы, полученные в соответствии с изобретением, не охлаждали перед заполнением в чашки.

Измерения

Измеряли последующее закисление, твердость геля и напряжения сдвига.

Уровни жира и белка определяли с использованием анализа MilkoScan.

Испытание на сжатие (коррелируемое с твердостью геля на ложке, оцениваемое в соответствии с тренированной сенсорной панелью)

Тест обратной экструзии осуществляли для оценки твердости геля. Образцы регулировали до 13°C в течение одного часа перед измерениями напряжения сдвига. Использовали перемешивание ложкой для получения гомогенного образца, т.е. перемешивали пять раз. Измерение осуществляли при помощи TA-XТ plus, программное обеспечение Texture Expert Exceed v6.1.9.0. Цилиндрический акриловый зонд (диаметр 40 мм) погружали в йогурт на глубину 15 мм со скоростью 2 мм/с и усилием срабатывания 5 г. Положительную площадь использовали в качестве измерения твердости.

Напряжение сдвига

Через семь суток после инкубирования ферментированный молочный продукт доводили до 13°C и вручную осторожно перемешивали при помощи ложки (5 раз) до гомогенного состояния образца. Реологические свойства образца оценивали при помощи реометра (Anton Paar Physica Rheometer с ASC, автоматическая смена образца, Anton Paar® GmbH, Austria) с использованием чашки с грузом. Во время измерения реометр устанавливали до постоянной температуры 13°C. Установки были следующими:

Время ожидания (для восстановления в некоторой степени исходной структуры):

5 минут без какого-либо физического напряжения (качение или вращение), приложенного к образцу

Стадия качания (для измерения модуля упругости и модуля вязкости, G и G'' , соответственно, таким образом, рассчитывая суммарный модуль G^*)

Постоянное напряжение = 0,3%, частота (f) = [0,5...8] Гц

6 точек измерения в течение 60 с (по одной каждые 10 с)

Стадия вращения (для измерения напряжения сдвига при 300 1/с)

Разработали две стадии:

1) Скорость сдвига = [0,3-300] 1/с и 2) Скорость сдвига = [275-0,3] 1/с.

Каждая стадия включала 21 точку измерения в течение 210 с (каждые 10 с).

Напряжение сдвига в точке максимума реологических кривых выбирали для дальнейшего анализа.

Суммарный модуль G^* представляет собой параметр, который отражает твердость геля.

Напряжение сдвига при 300 1/с выбрано для дальнейшего анализа, поскольку оно коррелирует с загущением во рту при проглатывании ферментированного молочного продукта.

Результаты

Последующее закисление

Таблица 3

	0 сутки (конечный рН)	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки	35 сутки	42 сутки
Контроль при 30°C	4,50	4,46	4,43	4,41	4,45	4,43	4,41
М1 при 30°C	4,48	4,48	4,47	4,45	4,45	4,45	4,45
М2 при 30°C	4,50	4,52	4,49	4,49	4,49	4,49	4,49
Контроль при 34°C	4,50	4,48	4,42	4,40	4,40	4,39	4,40
М1 при 34°C	4,45	4,44	4,44	4,42	4,37	4,37	4,40
М2 при 34°C	4,50	4,52	4,44	4,44	4,42	4,42	4,42

Как видно из результатов, представленных в Таблице 3, для образцов, ферментированных при 30°C, последующее закисление образцов, получаемых в соответствии со способом по изобретению, было меньше, чем закисление контрольного образца. Для образцов, ферментированных при 34°C, последующее закисление образца М2, полученного в соответствии со способом по изобретению, было меньше чем контрольного образца, тогда как последующее закисление образца М1 находилось на том же самом уровне, как и для контрольного образца.

Твердость геля

Таблица 4

	Положительная площадь (г.с)
Контроль при 30°C	526,8
M1 при 30°C	560,01
M2 при 30°C	648,28
Контроль при 34°C	510,58
M1 при 34°C	639,0
M2 при 34°C	999,55

Как видно из Таблицы 4, твердость геля для образцов, полученных в соответствии со способом по изобретению, была существенно увеличена по сравнению с соответствующими контрольными образцами.

Напряжение сдвига

Таблица 5

	Напряжение сдвига (Па)
Контроль при 34°C	148
M1 при 34°C	156
M2 при 34°C	170

Как видно из Таблицы 5, напряжение сдвига для образцов, полученных в соответствии со способом по изобретению, было существенно увеличено по сравнению с контрольным образцом.

Отсутствие охлаждения перед заполнением

Как видно из вышеприведенных результатов, образцы, полученные в соответствии со способом по изобретению, обладали превосходными характеристиками в отношении последующего закисления и структуры по сравнению с контрольным образцом, хотя образцы в соответствии с изобретением не охлаждали перед заполнением в противоположность контрольным образцам. Таким образом, представленные результаты демонстрируют то, что с использованием способа в соответствии с изобретением возможно исключить стадию охлаждения ферментированных молочных продуктов перед заполнением в контейнеры для использования конечным пользователем.

ПРИМЕР 2

*Получение кварка с использованием сахарозы в качестве источника углеводов и культуры, состоящей из одного лактозодефицитного *S. thermophilus* (ST) и одного или двух лактозодефицитных *L. lactis* subsp. *cremoris* (CR)*

Задача этого эксперимента заключалась в получении кварка с содержанием желаемого белка 7,5 %. Молочная основа состоит из чистого молока с 3,2% белка и 0% жира. Сахарозу добавляют в молочные основы для использования с культурами в соответствии с изобретением. Сахарозу не добавляют в молочную основу для контрольной культуры. Штаммы, композиции культур, способ и измерения являются такими же как для примера 1.

Результаты

Последующее закисление

Таблица 6

	0 сутки (конечный рН)	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки
Контроль при 30°C	4,55	4,37	4,35	4,30	4,28
M1 при 30°C	4,53	4,50	4,50	4,50	4,50
M2 при 30°C	4,55	4,51	4,51	4,50	4,50
Контроль при 34°C	4,54	4,45	4,43	4,40	4,39
M1 при 34°C	4,47	4,50	4,47	4,47	4,47
M2 при 34°C	4,53	4,50	4,48	4,48	4,48

Как видно из результатов, представленных в Таблице 6, последующее закисление образцов, полученных в соответствии со способом по изобретению, было меньше чем для соответствующих контрольных образцов.

Твердость геля

Таблица 7

	Положительная площадь (г.с)
Контроль при 30°C	264,12
M1 при 30°C	283,21
M2 при 30°C	415,88
Контроль при 34°C	113,46
M1 при 34°C	127,71
M2 при 34°C	126,97

Как видно из Таблицы 7, твердость геля для образцов, полученных в соответствии со способом по изобретению, была существенно увеличена по сравнению с соответствующими контрольными образцами.

ПРИМЕР 3

*Получение перемешанных кислых сливок с использованием глюкозы в качестве источника углеводов и культуры, состоящей из одного лактозодефицитного *S. thermophilus* (ST) и одного или двух лактозодефицитных *L. lactis* subsp. *cremoris* (CR)*

В этом эксперименте в качестве источника углеводов использовали глюкозу. Температуры ферментации составляли 30°C и 35°C. Процедура и измерения были такими же, как в примере 1.

Штаммы

ST1: *Streptococcus thermophilus* DSM 28952

CR1: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 32398

CR2: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 18882

CR7: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 18893

Композиции культур

Таблица 8

	ST1 (%)	CR1 (%)	CR2 (%)	CR7 (%)
M1.2	72,2	13,9	13,9	0,0
M1.7	72,2	13,9	0,0	13,9

В качестве основы для сравнения использовали контрольную культуру, содержащую обычный лактозоположительный штамм *Streptococcus thermophilus* и обычный лактозоположительный штамм *Lactococcus lactis*.

Молочная основа

Молочная основа для контрольной культуры содержала 3,5% белка и 15% жира.

Молочная основа для культур в соответствии с изобретением содержала 3,2% белка и 15% жира.

Таблица 9: Композиция молочной основы

	Молочная основа для изобретения (кг)	Молочная основа для контроля (кг)
Молоко	18,34	19,66
Молочные сливки	16,40	17,34
Обезжиренное сухое молоко	0,025	0,002
Сахар (Глюкоза)	0,228	0,0

Результаты*Последующее закисление*

Таблица 10

	0 сутки (конечный рН)	7 сутки	21 сутки	28 сутки
Контроль при 30°C	4,57	4,47	4,46	4,46
М1.2 при 30°C	4,54	4,58	4,64	4,62
М1.7 при 30°C	4,58	4,62	4,68	4,65
Контроль при 35°C	4,57	4,48	4,50	4,47
М1.2 при 35°C	4,58	4,60	4,65	4,62
М1.7 при 35°C	4,56	4,60	4,66	4,64

Как видно из результатов, представленных в Таблице 10, последующее закисление образцов, полученных в соответствии со способом по изобретению, было меньше, чем для соответствующих контрольных образцов.

Твердость геля

Таблица 11

	Положительная площадь (г.с)
Контроль при 30°C	1650,46
М1.2 при 30°C	1718,41
М1.7 при 30°C	1658,08
Контроль при 35°C	1880,56
М1.2 при 35°C	2494,80
М1.7 при 35°C	1970,33

Как видно из Таблицы 11, твердость геля для образцов, полученных в соответствии со способом по изобретению, была существенно увеличена по сравнению

с соответствующими контрольными образцами.

ПРИМЕР 4

*Получение кварка с использованием глюкозы в качестве источника углеводов и культуры, состоящей из одного лактозодефицитного *S. thermophilus* (ST) и одного или двух лактозодефицитных *L. lactis* subsp. *cremoris* (CR)*

В этом эксперименте глюкозу использовали в качестве источника углеводов. Температура ферментации составляла 30°C. Штаммы, композиции культур, способ и измерения были такими же как в примере 3.

Молочная основа

Таблица 12

	Молочная основа для изобретения (кг)
Молоко	59,61
Глюкоза	0,390

Результаты

Последующее закисление

Таблица 13

	0 сутки (конечный pH)	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки	36 сутки	42 сутки	49 сутки
Контроль при 30°C	4,63	4,45	4,39	4,37	4,35	4,38	4,38	4,35
M1.2 при 30°C	4,68	4,78	4,78	4,78	4,74	4,80	4,80	4,74
M1.7 при 30°C	4,65	4,82	4,78	4,78	4,78	4,78	4,77	4,76

Как видно из результатов, представленных в Таблице 13, последующее закисление образцов, полученных в соответствии со способом по изобретению, было меньше чем для соответствующих контрольных образцов.

Твердость геля

Таблица 14

	Положительная площадь (г.с)
Контроль при 30°C	88,2
M1.2 при 30°C	104,53
M1.7 при 30°C	132,44

Как видно из Таблицы 14, твердость геля для образцов, полученных в соответствии со способом по изобретению, была существенно увеличена по сравнению с соответствующими контрольными образцами.

ПРИМЕР 5

*Получение кварка с использованием глюкозы и сахарозы в качестве источника углеводов и культуры, состоящей из одного лактозодефицитного *S. thermophilus* (ST) и одного или двух лактозодефицитных *L. lactis* subsp. *cremoris* (CR)*

Молочная основа состояла из обезжиренного молока, содержащего 0,7% глюкозу или 0,6% сахарозу. Ферментацию осуществляли при 30°C до достижения желаемого pH 4,6. Образцы перемешивали и охлаждали в ледяной воде в течение примерно 15 минут и затем хранили при 5°C. Структуру (напряжение сдвига) измеряли на 7 сутки.

Штаммы

ST2: *Streptococcus thermophilus* DSM 32599.

Композиции культур

Таблица 15

	ST1 (%)	ST2 (%)	CR1 (%)	CR7 (%)
M1.7_ST1	72,2		13,9	13,9
M1.7_ST2		72,2	13,9	13,9

Результаты

Напряжение сдвига

Таблица 16

	Углевод	Напряжение сдвига (Па)
M1.7_ST1	Глюкоза	30,55
M1.7_ST2	Глюкоза	31,15
M1.7_ST1	Сахароза	42,00
M1.7_ST2	Сахароза	39,40

Как видно из Таблицы 16, культуры с двумя *Streptococcus thermophilus* продуцировали кварк с тем же самым напряжением сдвига. Кроме того, образцы, выращенные на сахарозе, имели более высокий уровень напряжения сдвига, чем образцы, выращенные на глюкозе.

ПРИМЕР 6

*Профили закисления культур, состоящих из одного лактозодефицитного *S. thermophilus* (ST) и одного или двух лактозодефицитных сахарозоположительных *L.**

lactis subsp. *lactis* (LC)

Штаммы

ST1: *Streptococcus thermophilus* DSM 28952

ST2: *Streptococcus thermophilus* DSM 32599

LC1: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32603

LC2: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32604

LC3: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32601

LC4: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32602

LC5: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32605

Композиции культур

Таблица 17

	ST (%)	ST2 (%)	LC1 (%)	LC2 (%)	LC3 (%)	LC4 (%)	LC5 (%)
C1	72,2		27,8				
C2	72,2			27,8			
C3	72,2				27,8		
C4	72,2					27,8	
C5	72,2						27,8
C6		72,2	27,8				

В качестве основы для сравнения использовали контрольную культуру, содержащую обычный лактозоположительный штамм *Streptococcus thermophilus* и обычный лактозоположительный штамм *Lactococcus lactis*.

Способ

Ночные культуры, выращенные на среде M17, содержащей 1% сахарозу, инокулировали в 200 мл В-молока, содержащего 0,5% сахарозу и 0,02 г/л Na-формат, и инкубировали в водяной бане при 30°C или 34°C. pH отслеживали в течение длительного периода времени после достижения желаемого pH.

Результаты

На фиг. 1 представлены профили закисления C1-C4 при 34°C.

На фиг. 2 представлены профили закисления C1-C4 при 30°C.

На фиг. 3 представлены профили закисления C5 при 34°C.

На фиг. 4 представлены профили закисления C6 при 34°C.

Как видно на фиг. 1 и 3, для всех культур C1-C5 при 34°C pH падает до желаемого уровня, составляющего примерно 4,7- 4,8 в течение примерно 8 часов. Как видно на фиг.

2, для культур С1-С4 при 30°C рН падает до желаемого уровня, составляющего примерно 4,7- 4,8 в течение примерно 14 часов. Как видно на фиг. 4, для культуры С6 при 34°C рН падает до желаемого уровня, составляющего примерно 4,7- 4,8 в течение примерно 10 часов. После достижения желаемого рН рН остается почти постоянным в течение всего периода, пока измеряют рН, т.е. последующее закисление не происходит.

Для сравнения, для контрольного продукта рН продолжает уменьшаться в течение всего периода, пока отслеживают рН, т.е. происходит последующее закисление.

ПРИМЕР 7

*Профили закисления двух лактозодефицитных сахарозоположительных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LC) и двух лактозодефицитных глюкозоположительных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis cremoris* (LACcr).*

Штаммы

LC5: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32605

LC7: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32832

LACcr1: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32829

LACcr2: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32830

ST1: *Streptococcus thermophilus* DSM 28952

Композиции культур

LC5 + ST1

LC7 + ST1

LACcr1 + ST1

LACcr2 + ST1

Способ

Ночные культуры LC5 и LC7 выращивали в автоклавированном молоке (А-молоко), содержащем 2%, и использовали для инокулирования 200 мл обезжиренного молока, содержащего 0,5% сахарозы. ST1 инокулировали 0,0065%. Ферментацию осуществляли при 30°C в течение 24 часов.

Штаммы LACcr1 и LACcr2 инокулировали непосредственно из преинокуляционного материала (ПИМ), соответствующего 1,1E+09 клеток/200 мл молока. ST1 инокулировали 0,0065%. Ферментацию осуществляли в обезжиренном молоке, содержащем 0,5% глюкозы, при 30°C в течение 47 часов.

Результаты

На фиг. 5 представлены профили закисления для LC5 + ST1 и LC7 + ST1 при 30°C.

На фиг. 6 представлены профили закисления для LACcr1 + ST1 и LACcr2 + ST1 при 30°C.

Как видно из фиг. 5 и 6, pH падает до стабильного уровня, что говорит о прекращении ферментации вследствие уменьшения/израсходования добавленного источника углевода. После достижения стабильного pH он остается полностью постоянным в течение всего периода, пока измеряют pH, т.е. последующее закисление не происходит.

ПРИМЕР 8

*Профили закисления и последующее закисление культуральных смесей, состоящих из одного лактозодефицитного сахарозоположительного штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LC), одного лактозодефицитного глюкозоположительного *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (LACcr), одного лактозодефицитного *S. thermophilus* (ST) и одного умеренного(mild) *S. thermophilus*.*

Штаммы

LC5: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32605

LC7: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32832

LACcr1: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 32829

LACcr2: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 32830

ST1: *Streptococcus thermophilus* DSM 28952

STMild: Имеющийся в продаже штамм *Streptococcus thermophilus* с низкой закисляющей способностью.

Композиции культур

Таблица 18

	ST1	ST mild	LC5	LC7	LACcr1	LACcr
C1	x	x	x		x	
C2	x	x	x			x
C3	x	x		x	x	
C4	x	x		x		x

В качестве основы для сравнения использовали контрольную культуру, содержащую обычный лактозоположительный штамм *Streptococcus thermophilus* и обычный лактозоположительный штамм *Lactococcus lactis*.

Способ

Культуральные смеси С1-С4 подкисляли в обезжиренном молоке, содержащем 0,6% сахарозу. Ферментацию осуществляли при 30°C в течение 18 часов. Образцы перемешивали и охлаждали в ледяной воде в течение примерно 15 минут и затем хранили при 5°C. Последующее закисление (рН) измеряли после периода хранения на холоде в течение 28 суток, и напряжение сдвига измеряли на 7 сутки с использованием способа, описанного в примере 1.

Результаты

На фиг. 7 представлены профили закисления для С1- С4 и контроля при 30°C.

На фиг. 8 представлены профили закисления для С1- С4 и контроля при 35°C.

Как видно на фиг. 7 (30°C), рН стабилизируется на уровне 4,55 для культуральных смесей С1–С3 через примерно 13 часов и для С4 через примерно 17 часов. Профили закисления при 35°C (фиг. 8) демонстрируют стабилизацию рН на уровне рН примерно 4,60 через 11 часов для всех культуральных смесей С1-С4. Для контрольной культуры рН продолжает падать в течение всего периода контроля (18 часов) при 30°C и 35°C.

Таблица 19: Длительное последующее закисление и напряжение сдвига

	Температура	рН 28 сутки	Напряжение сдвига при 300 1/с
С1	30°C	4,45	39,90
С2		4,53	43,45
С3		4,44	41,65
С4		4,48	48,00
Контроль		4,31	40,35
С1	35°C	4,43	46,80
С2		4,54	47,45
С3		4,52	50,75
С4		4,52	48,65
Контроль		4,38	40,85

Как видно из таблицы 19, значения рН для культуральных смесей С1-С4, которые хранили в течение 28 суток при 30°C, были на 0,13-0,22 единиц рН выше чем рН контрольной культуры. Значения рН для культуральных смесей С1-С4, которые хранили в течение 28 суток при 35°C, были на 0,05-0,16 единиц рН выше чем для контроля.

Для образцов, которые хранили при 30°C и при 35°C, напряжение сдвига было на том же самом уровне или выше для культуральных смесей С1-С4, чем напряжение сдвига для контрольной культуры.

ПРИМЕР 9

Получение перемешанных кислых сливок с использованием сахарозы в качестве источника углеводов и культуры, состоящей из одного лактозодефицитного, сахарозоположительного штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LC), одного лактозодефицитного глюкозоположительного *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (CR / LACcr, одного лактозодефицитного *S. thermophilus* (ST) и одного умеренного *S. thermophilus* (STmild).

Штаммы

LC7: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 32832

LACcr1: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 32829

LACcr2: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 32830

CR7: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 18893

ST1: *Streptococcus thermophilus* DSM 28952

STmild1: Имеющийся в продаже штамм *Streptococcus thermophilus* с низкой закисляющей способностью.

STmild2: Имеющийся в продаже штамм *Streptococcus thermophilus* с низкой закисляющей способностью.

Композиции культур

Таблица 20

	ST1	STmild1	STmild2	LC7	LACcr1	LACcr2	CR7
C1	x		x	x	x		
C2	x	x		x		x	
C3	x		x	x			x

В качестве основы для сравнения использовали контрольную культуру, содержащую обычный лактозоположительный штамм *Streptococcus thermophilus* и обычный лактозоположительный штамм *Lactococcus lactis*.

Молочная основа

Молочная основа для контрольной культуры содержала 2,7% белка и 15% жира.

Молочная основа для культур в соответствии с изобретением содержала 2,4 % белка, 15% жира и 0,45% сахарозы.

Таблица 21: Композиция молочной основы

	Молочная основа для изобретения (%)	Молочная основа для контроля (%)
Молоко	46,00	52,96
Молочные сливки	46,87	46,88
Обезжиренное сухое молоко		0,16
Сахар (Сахароза)	0,45	
Вода	6,68	
Обработка	Гомогенизация: 200/40 бар (20000 кПа/4000 кПа) при 70°C Термическая обработка: 92°C / 6 мин	

Методика

Ферментацию осуществляли при температурах 30°C и 35°C.

Контроль затем обрабатывали с использованием обратного давления 2 бар (200 кПа) и охлаждения до 18°C. Образцы, полученные в соответствии с изобретением, затем обрабатывали с использованием обратного давления 2 бар (200 кПа) при температуре ферментации (30°C и 35°C).

Образцы хранили при 6°C.

Последующее закисление (рН) измеряли после периода хранения на холоде в течение 28 суток, и твердость геля измеряли через 7 суток. Способы для измерения текстуры (твердость геля) были такими же как в примере 1.

Измерения

Измеряли последующее закисление и твердость геля.

Таблица 22: Последующее закисление

рН	0 сутки (конечный рН)	1 сутки	7 сутки	14 сутки	28 сутки	1 сутки минус 35 сутки
Контроль при 30°C	4,55	4,53	4,5	4,45	4,41	-0,12
С1 при 30°C	4,48	4,48	4,48	4,49	4,46	-0,02
С2 при 30°C	4,53	4,52	4,52	4,52	4,52	-0,00
С3 при 30°C	4,44	4,44	4,43	4,42	4,41	-0,03
Контроль при 35°C	4,55	4,54	4,52	4,50	4,46	-0,08
С1 при 35°C	4,56	4,55	4,53	4,52	4,49	-0,06
С2 при 35°C	4,51	4,5	4,49	4,48	4,46	-0,04
С3 при 35°C	4,56	4,55	4,52	4,52	4,49	-0,06

Как видно из результатов, представленных в таблице 22, последующее закисление образцов, полученных в соответствии со способом по изобретению, было меньше, чем соответствующих контрольных образцов.

Таблица 23: Твердость геля

	Твердость геля Положительная площадь (г.с)
Контроль при 30°C	1299
C1 при 30°C	2164
C2 при 30°C	2789
C3 при 30°C	2832
Контроль при 35°C	1272
C1 при 35°C	2885
C2 при 35°C	2684
C3 при 35°C	3130

Как видно из таблицы 23, твердость геля для образцов, полученных в соответствии со способом по изобретению, была существенно увеличена по сравнению с соответствующими контрольными образцами.

ПРИМЕР 10

*Получение перемешанного кварка с использованием сахарозы в качестве источника углеводов и культуры, содержащей один лактозодефицитный сахарозоположительный штамм *Lactococcus lactis subsp. lactis* (LC), один лактозодефицитный глюкозоположительный *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (CR / LACcr, один лактозодефицитный *S. thermophilus* (ST) и один умеренный *S. thermophilus* (STmild).*

Штаммы и композиции культур, были такими же как в примере 9.

Молочная основа

Обезжиренное молоко использовали в качестве молочной основы.

Молочная основа для контрольной культуры содержала 3,2% белка и 0,05% жира.

Молочная основа для культур в соответствии с изобретением содержала 3,2% белка, 0,05% жира и уровни сахарозы от 0,45% до 0,65%, выбранные таким образом, чтобы быть оптимизированными для конкретной композиции культуры.

Способ

Ферментацию осуществляли при температурах 30°C и 35°C. Процент инокуляции культуры составлял 0,01%.

Образцы хранили при 6°C.

Результаты

На фиг. 9 представлены профили закисления для С1- С3 и контроля при 30°C.

На фиг. 10 представлены профили закисления для С1- С3 и контроля при 35°C

Как видно на фиг. 9 (30°C), рН стабилизируется для культуральных смесей С1–С3 после примерно 12 часов. Профили закисления при 35°C (фиг. 10) демонстрируют стабилизацию рН после примерно 11 часов ферментации. Для контрольной культуры рН падает до существенно меньшего значения в течение периода времени контроля при 30°C и 35°C.

Последующее закисление измеряли в течение различных периодов времени хранения на холоду (6°C).

Таблица 24: Последующее закисление

рН	0 сутки (конечный рН)	3 сутки	8 сутки	9 сутки	13 сутки
Контроль при 30°C	4,68	Н.Д.	4,37	Н.Д.	4,38
С1 при 30°C	4,71	Н.Д.	4,70	Н.Д.	4,70
С2 при 30°C	4,68	Н.Д.	4,73	Н.Д.	4,73
С3 при 30°C	4,64	Н.Д.	4,68	Н.Д.	4,69
Контроль при 35°C	4,60	4,47	Н.Д.	4,48	Н.Д.
С1 при 35°C	4,60	4,60	Н.Д.	4,60	Н.Д.
С2 при 35°C	4,59	4,62	Н.Д.	4,61	Н.Д.
С3 при 35°C	4,58	4,59	Н.Д.	4,59	Н.Д.

н.д.: нет данных.

Как видно из результатов в таблице 24, последующее закисление образцов, полученных в соответствии со способом по изобретению, было меньше, чем для соответствующих контрольных образцов.

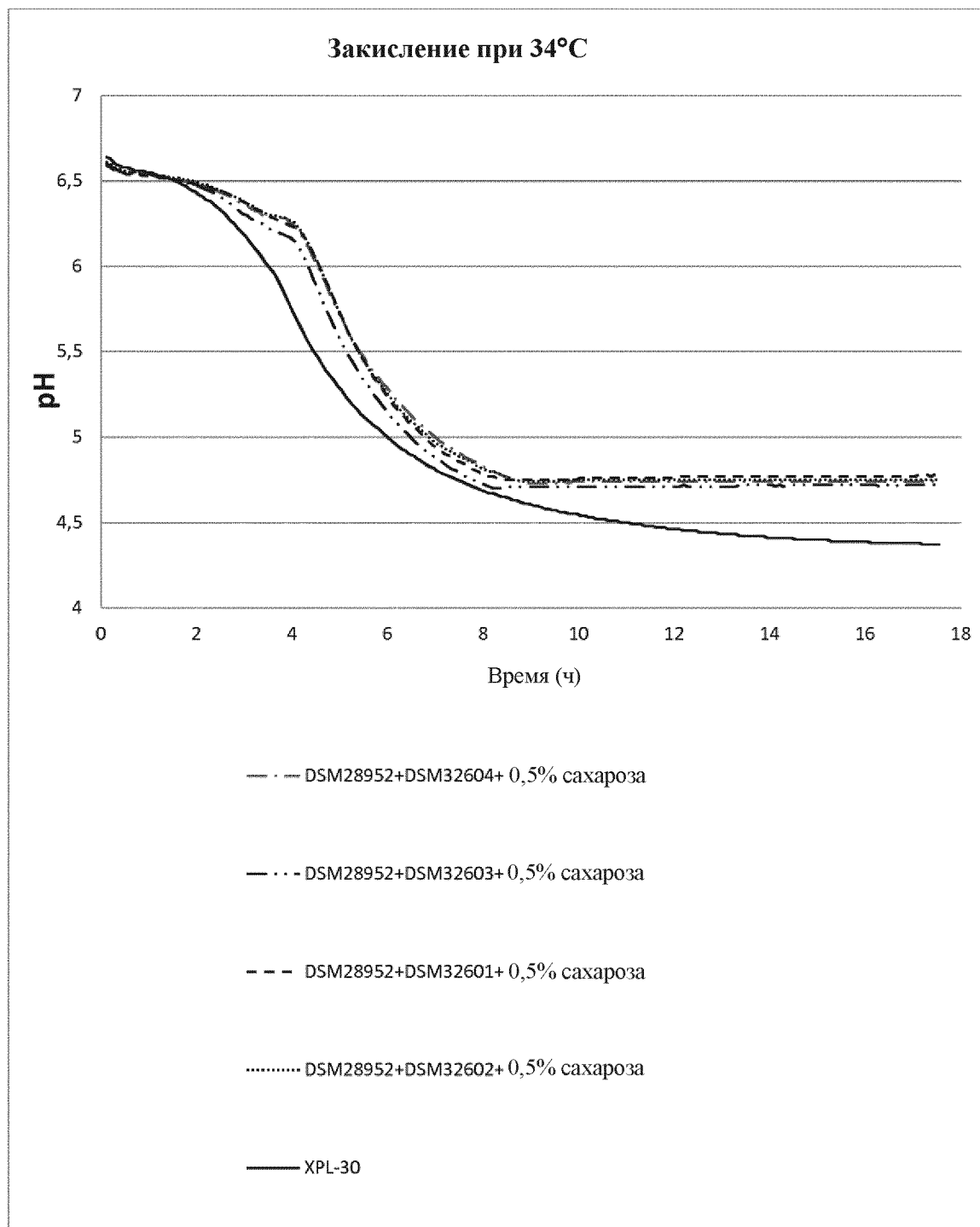
Таблица 25: Твердость геля

	Твердость геля Положительная площадь (г.с)
Контроль при 30°C	594,96
С1 при 30°C	744,85
С2 при 30°C	578,39
С3 при 30°C	712,14

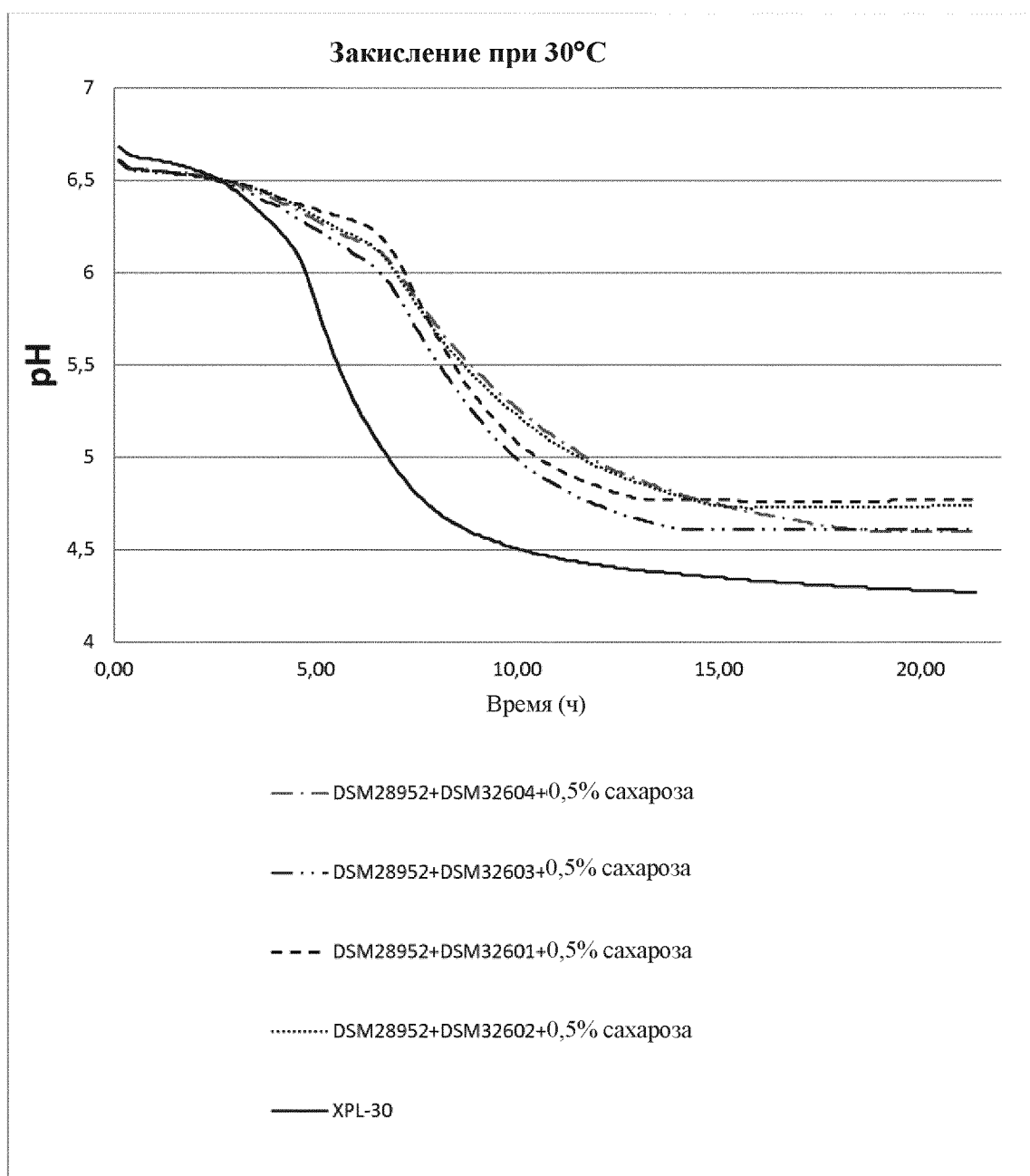
Как видно из таблицы 25, твердость геля для образцов, полученных в соответствии со способом по изобретению при 30°C, была существенно увеличена по сравнению с соответствующим контрольным образцом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

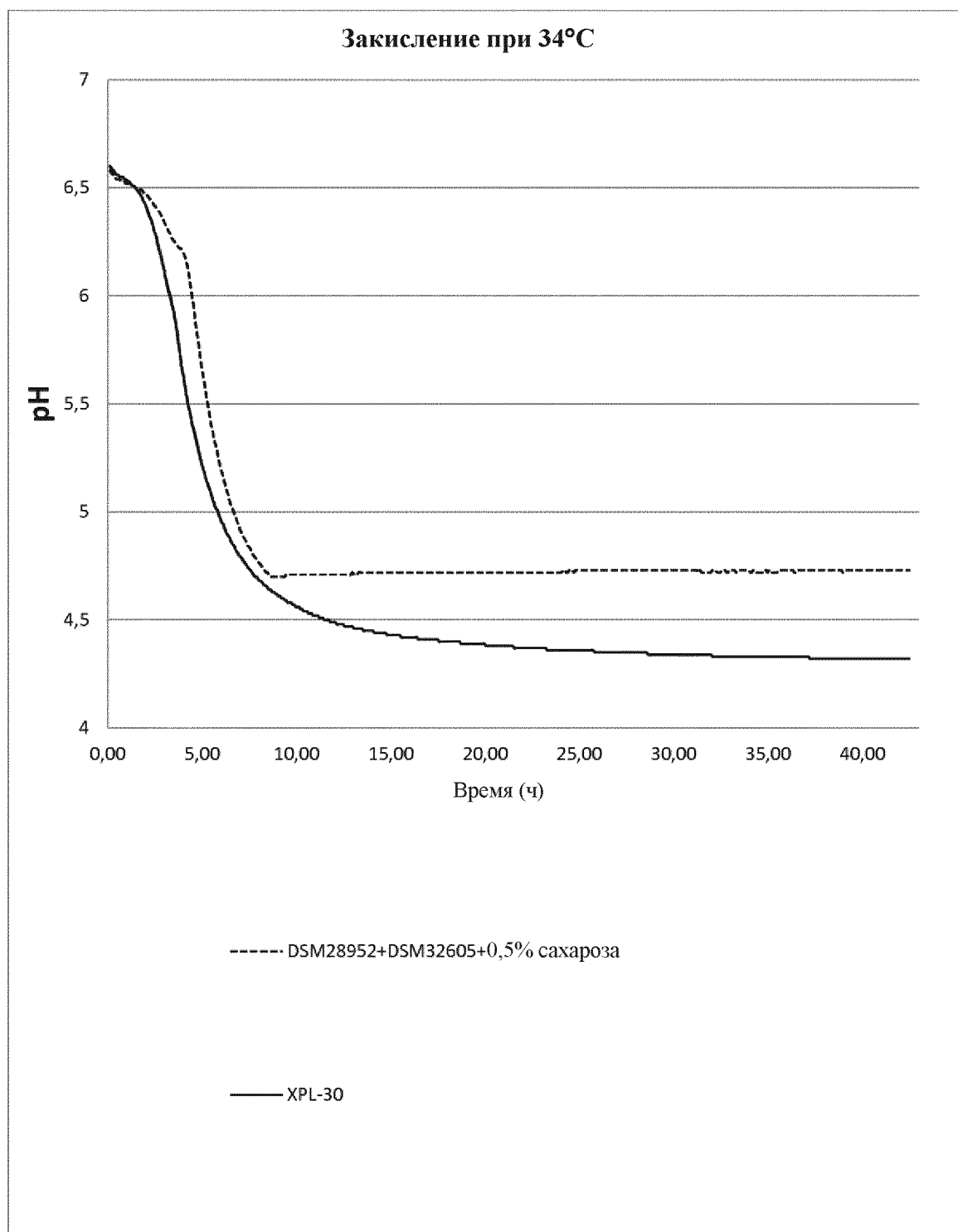
1. Лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, выбранный из группы, состоящей из: штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32599; штамма, депонированного в DSMZ под регистрационным номером DSM 32600; и его мутанты и полученные из него штаммы.



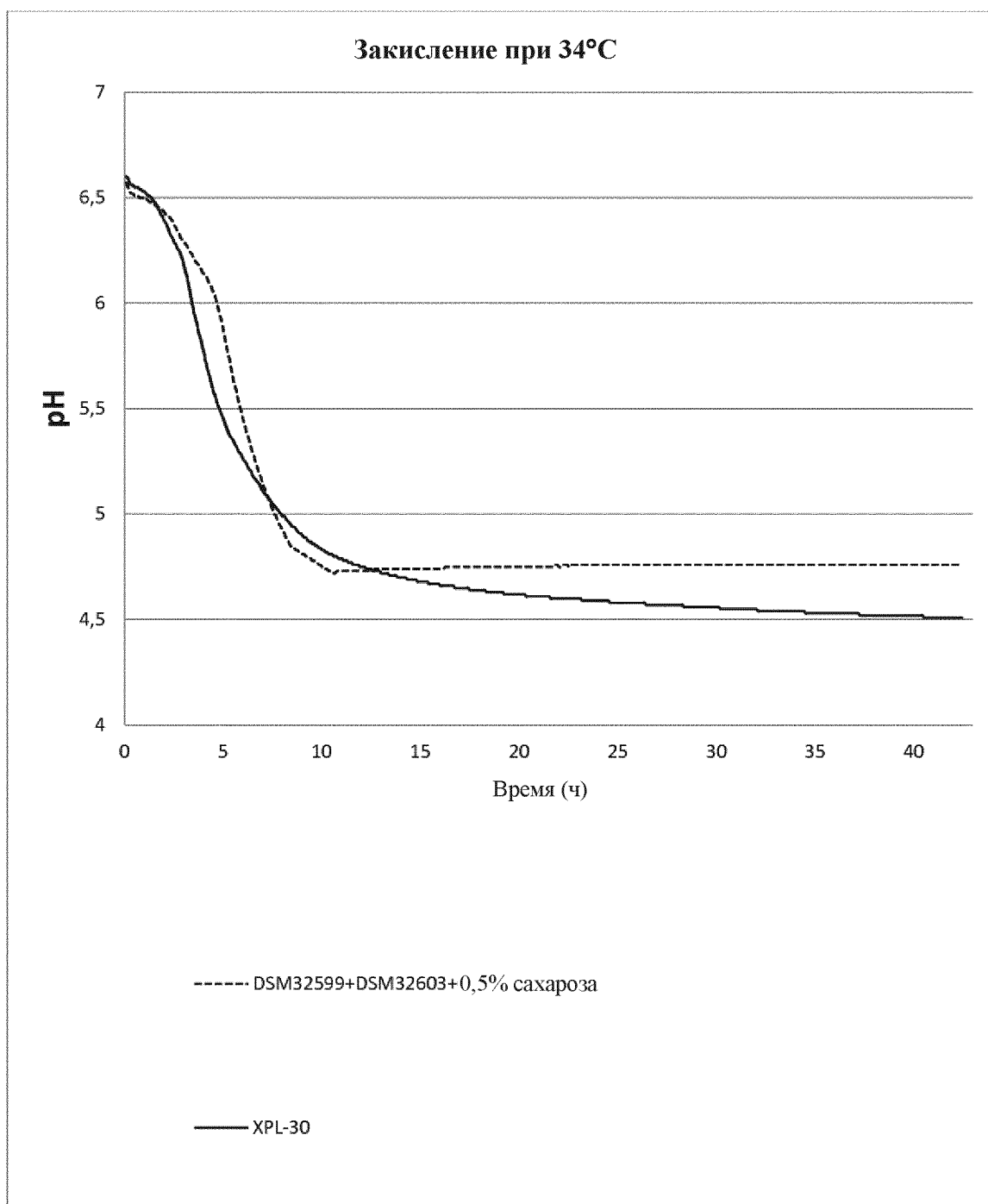
Фиг. 1



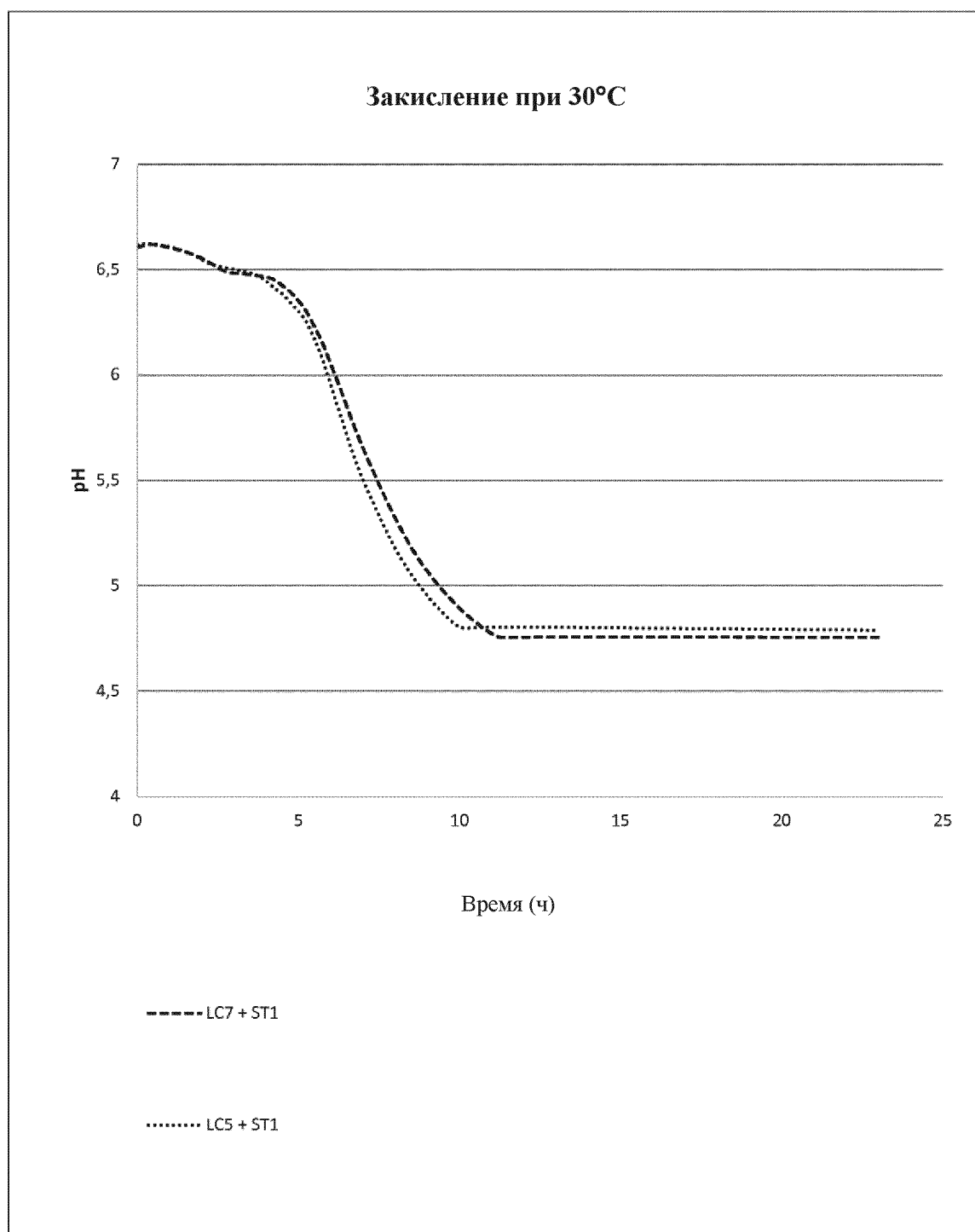
Фиг. 2



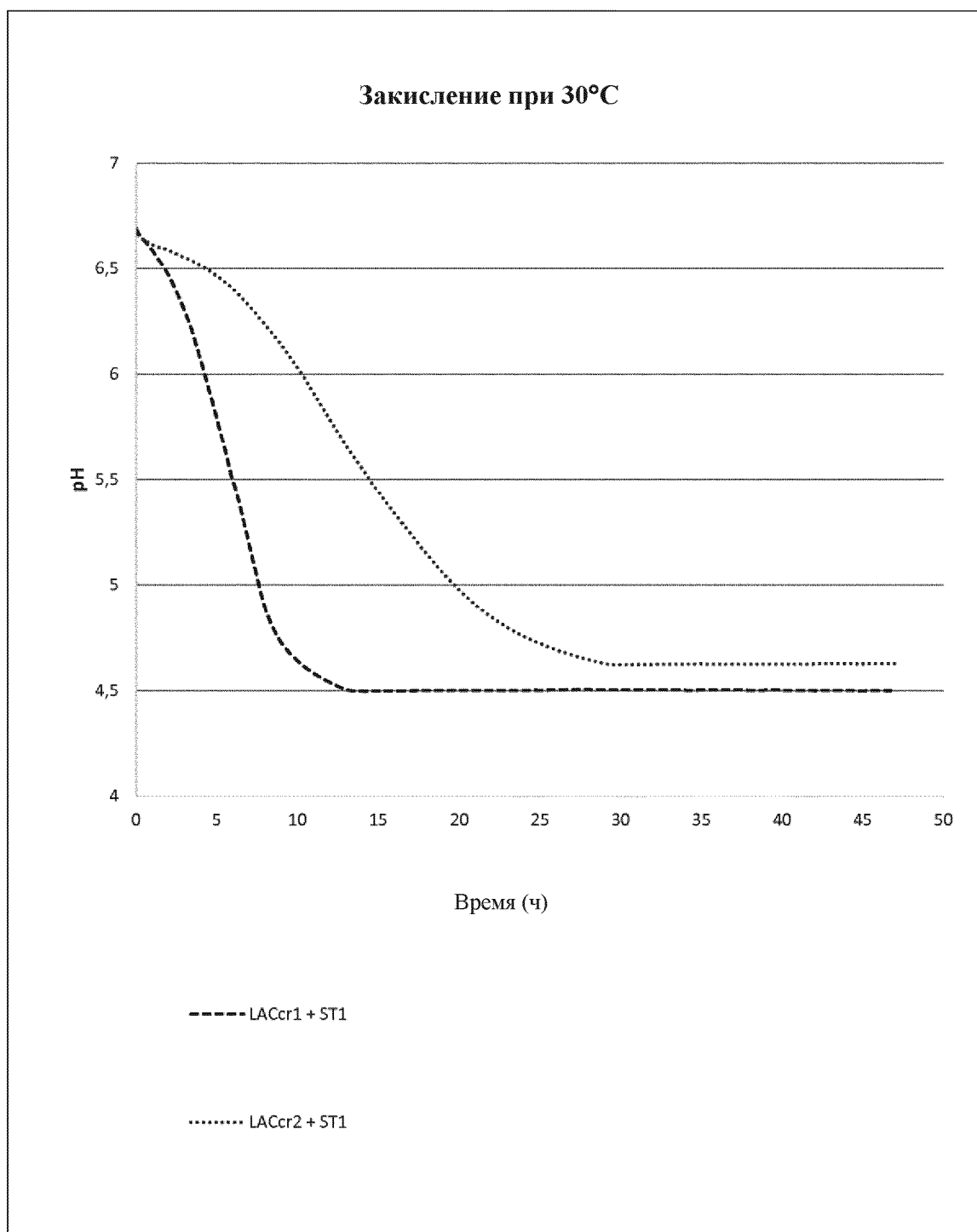
Фиг. 3



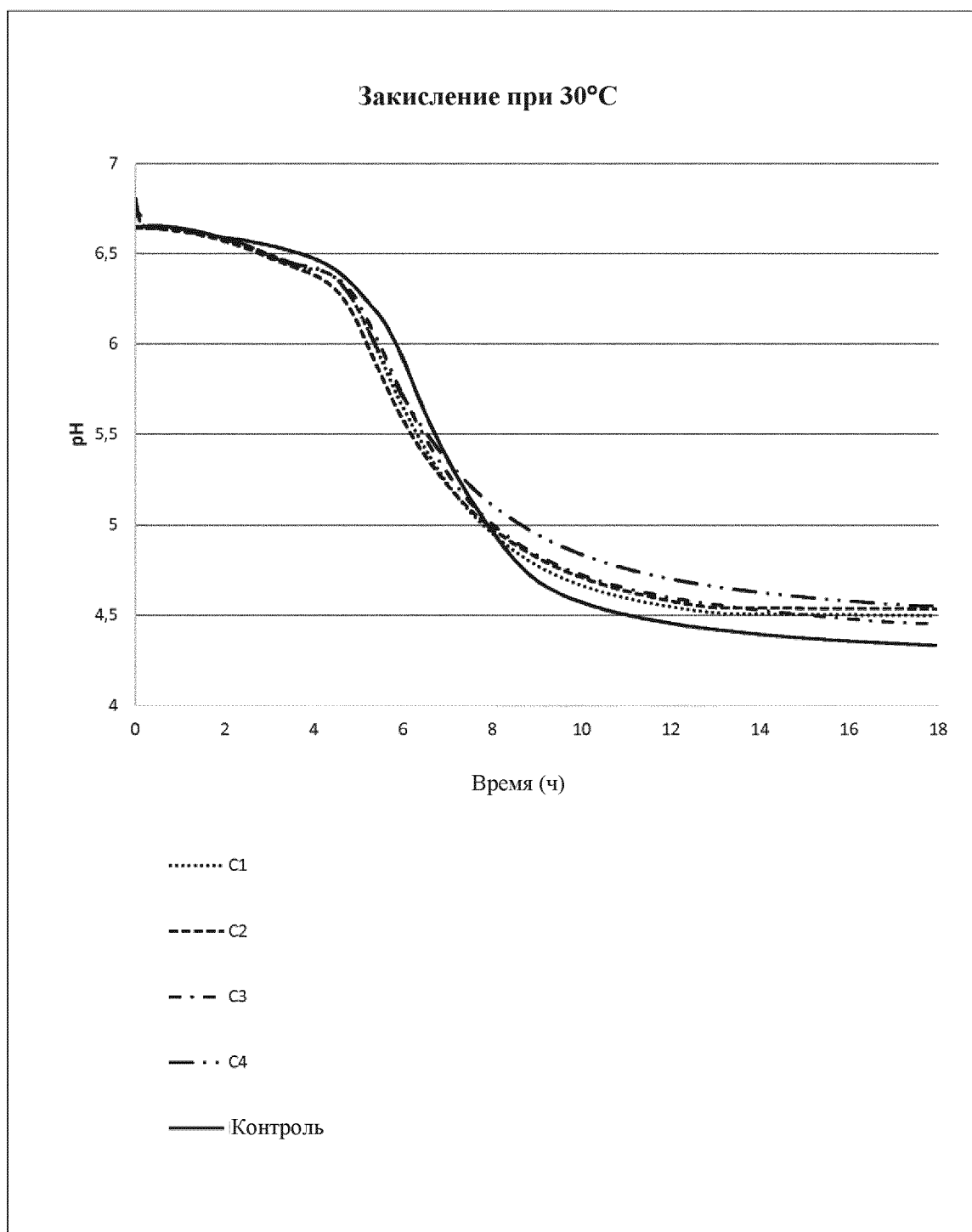
Фиг. 4



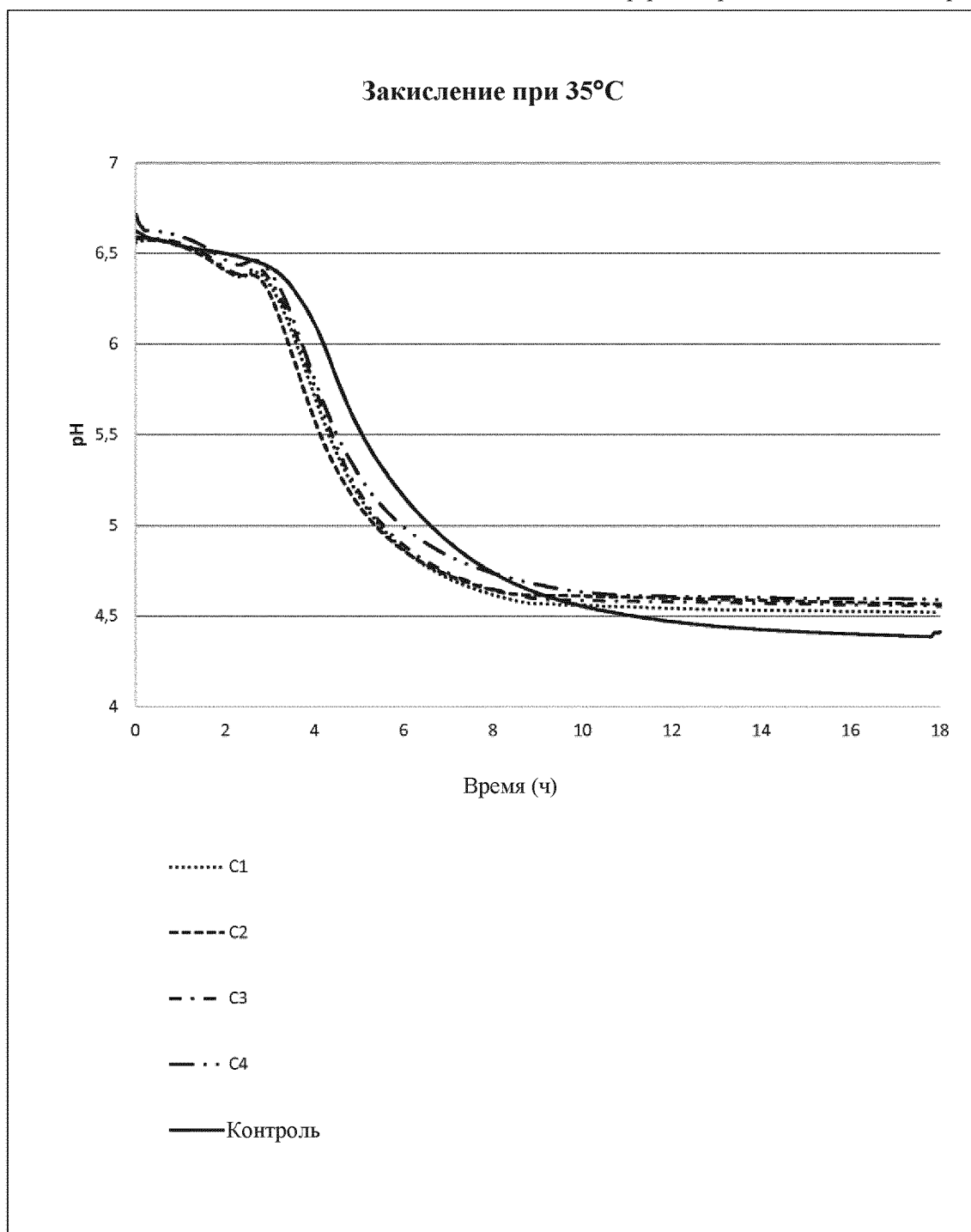
Фиг. 5



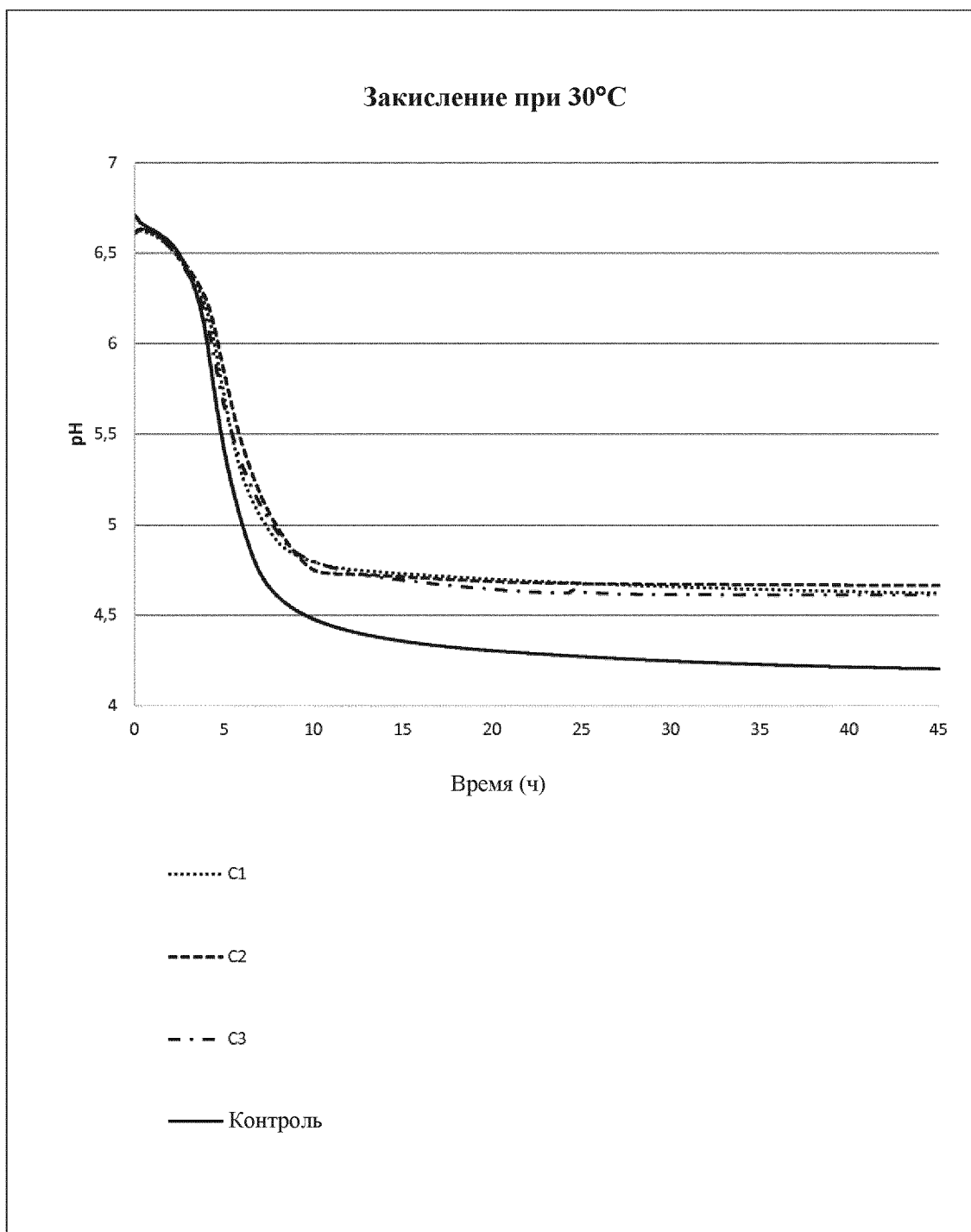
Фиг. 6



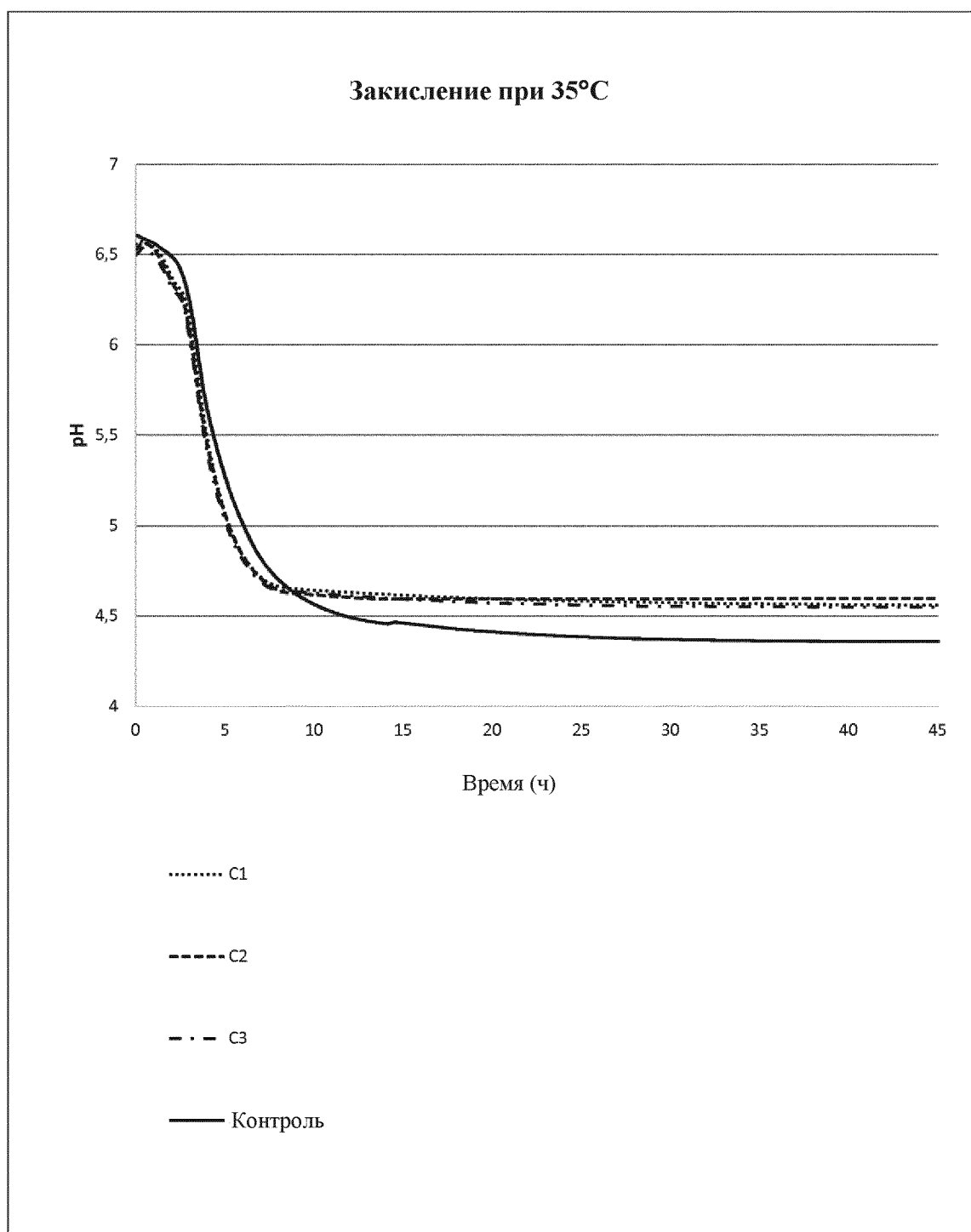
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10