

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047191**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2024.06.20

(21) Номер заявки

202192498

(22) Дата подачи заявки

2020.03.13(51) Int. Cl. **C12R 1/46** (2006.01)**C12P 7/56** (2006.01)**A23C 9/12** (2006.01)**C12N 9/38** (2006.01)**(54) НОВЫЕ МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ**(31) **19162856.9; 201910406044.7; 19214119.0**(32) **2019.03.14; 2019.05.16; 2019.12.06**(33) **EP; CN; EP**(43) **2021.12.01**(86) **PCT/EP2020/056766**(87) **WO 2020/182976 2020.09.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ИНТЕРНЭШНЛ Эн энд Эйч**ДЕНМАРК АпС (DK)**

(72) Изобретатель:

Еджеёвский Анаис, Фремо Кристоф,**Ван Диллен Сабин, Дефужер Тома,****Жодо Макс Шарль, Люган Дамьен****(FR)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) DATABASE UniProt [Online], 24 July 2013 (2013-07-24), "RecName: Full = Beta-galactosidase {ECO: 0000256, RuleBase: RU361154, ECO: 0000256, SAAS: SAAS01166384}; EC=3.2.1.23, {ECO: 0000256, RuleBase: RU361154, ECO: 0000256, SAAS: SAAS01166384}; AltName: Full = Lactase {ECO: 0000256, RuleBase: RU361154}", XP002793052, retrieved from EBI accession no. UNIPROT: R6PHJ8, Database accession no. R6PHJ8, sequence

DATABASE UniProt [Online], 20 December 2017 (2017-12-20), "RecName: Full = Beta-galactosidase {ECO: 0000256, RuleBase: RU361154, ECO: 0000256, SAAS: SAAS01166384}; EC=3.2.1.23 {ECO: 0000256, RuleBase: RU361154, ECO: 0000256, SAAS: SAAS01166384}; AltName: Full = Lactase {ECO: 0000256, RuleBase: RU361154}", XP002793053, retrieved from EBI accession no. UNIPROT: A0A2A7PZQ6, Database accession no. A0A2A7PZQ6, sequence

DATABASE UniProt [Online], 22 November 2017 (2017-11-22), "RecName: Full = Beta-galactosidase {ECO: 0000256, SAAS: SAAS01166384}; EC=3.2.1.23 {ECO: 0000256, SAAS: SAAS01166384}", XP002793054, retrieved from EBI accession no. UNIPROT: A0A1G8Y9F2, Database accession no. A0A1G8Y9F2, sequence

DAMIEN DANDOY ET AL.: "The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS", MICROBIAL CELL FACTORIES, vol. 10, no. Suppl 1, 30 August 2011 (2011-08-30), page S21, XP021105388, ISSN: 1475-2859, DOI: 10.1186/1475-2859-10-S1-S21, table 1

US-A1-2016165910

US-A1-2017135360

WO-A1-2018130630

(57) Изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему ген *lacZ* (*lacZ^{FS}*), кодирующий β -галактозидазу, отличающуюся особым профилем, касающимся ее эффективности гидролиза лактозы. Изобретение также относится к штамму *Streptococcus thermophilus*, содержащему аллель *lacZ^{FS}*, и к его бактериальной композиции и к их применению для получения ферментированного молока, не подвергающегося пост-подкислению.

B1**047191****047191 B1**

Область техники

Изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему ген *lacZ* (*lacZ*^{FS}), кодирующий β-галактозидазу, отличающуюся особым профилем, касающимся ее эффективности гидролиза лактозы. Изобретение также относится к штамму *Streptococcus thermophilus*, содержащему аллель *lacZ*^{FS}, и его бактериальной композиции и к их применению для получения ферментированного молока, не подвергающегося пост-подкислению.

Уровень техники изобретения

В пищевой промышленности используются бактерии для улучшения вкуса и текстуры пищевых или кормовых продуктов. В случае молочной промышленности молочнокислые бактерии обычно используются для того, чтобы, например, вызвать подкисление молока (путем ферментации лактозы) и текстурировать продукт, в который они включены. Например, молочнокислые бактерии вида *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) широко используются, отдельно или в комбинации с другими бактериями, при производстве свежих ферментированных молочных продуктов, таких как сыр или йогурт.

Одним из ограничений использования молочнокислых бактерий в молочной технологии является пост-подкисление, т.е. производство молочной кислоты молочнокислыми бактериями после достижения целевого значения pH (требуемого технологией). Таким образом, чтобы избежать этого явления пост-подкисления, производители молочных продуктов должны быстро охлаждать ферментированный продукт сразу после достижения целевого значения pH. Таким образом, производителям молочных продуктов не хватает гибкости в производственном процессе, в то время как возможность выдерживать ферментированный продукт при температуре ферментации в течение некоторого времени была бы преимуществом. Кроме того, стадия охлаждения является энергозатратной, так что обход стадии охлаждения был бы как экономическим, так и экологическим преимуществом.

WO 90/05459 описывает мутантные штаммы *Lactobacillus bulgaricus*, отобранные на основе их цветового фенотипа на среде, содержащей X-gal. В документе сообщается об идентификации мутантов температурно-зависимых *L. bulgaricus* (синие при 37°C, но белые при 4°C) и чувствительных к pH мутантов *L. bulgaricus* (синие при pH 7, но белые при pH 4,5 или 5). Однако в WO 90/05459 ничего не говорится о мутации в гене *lacZ*. Кроме того, в WO 90/05459 описаны мутанты, отличающиеся ферментом, который имеет активность, составляющую по меньшей мере 90% от активности фермента дикого типа в производственных условиях (температура обработки или pH обработки), имея при этом активность, сниженную по меньшей мере на 20% по сравнению с активностью фермента дикого типа в условиях хранения. Однако описание WO 90/05459 является недостаточным в отношении активности какого-либо фермента и, в частности, в отношении активности бета-галактозидазы; действительно, как показано в примерах 4 и 5 настоящего документа, не наблюдается принятая эталонная активность бета-галактозидазы в штаммах при pH 4,5 или 6. Следовательно, характеристика мутантов, описанных в WO 90/015459, невозможна без какого-либо эталонного значения или эталонного штамма.

В WO 2010/139765 описан способ производства ферментированного молочного продукта с использованием культуры со слабым пост-подкислением на основе конкретных штаммов *Lactobacillus bulgaricus*. Поскольку культура характеризуется слабым продуцированием молочной кислоты при температуре ферментации, pH практически не меняется, и стадии охлаждения можно избежать. Однако WO 2010/139765 не характеризует приведенные в качестве примера штаммы *Lactobacillus bulgaricus*.

В WO 2015/193459 предложены другие решения для преодоления проблемы пост-подкисления: контроль концентрации лактозы в молоке перед ферментацией, например, путем добавления лактазы, обеспечивая молочнокислые бактерии, которые не способны гидролизовать лактозу (лактозодефицитные молочнокислые бактерии). Однако эти решения не подходят для производителей молочных продуктов, поскольку они требуют либо добавления экзогенного фермента (такого как лактаза) в молоко перед ферментацией, что делает производственный процесс более сложным и более дорогим, либо добавления углевода в молоко (например, сахарозы), что не согласуется с растущим спросом на более здоровые продукты без добавок.

Следовательно, существует потребность в предоставлении производителям молочных продуктов средств для производства ферментированных продуктов на основе молочнокислых бактерий как с удовлетворительными результатами, так и с высокой гибкостью производственного процесса.

Описание чертежей

На фиг. 1 представлены графики, представляющие (А) профиль подкисления молока (pH с течением времени) штамма DGCC7984 и двух его субклонов DGCC12455 и DGCC12456 и (В) эволюцию скорости подкисления во времени (мЕд.pH/мин с течением времени) штамма DGCC12456.

На фиг. 2 представлены графики, представляющие (А) профиль подкисления молока (pH с течением времени) и (В) изменение скорости подкисления с течением времени (мЕд.pH/мин с течением времени) штамма DGCC715.

На фиг. 3 представлены графики, представляющие (А) профиль подкисления молока (pH с течением времени) и (В) изменение скорости подкисления с течением времени (мЕд.pH/мин с течением времени) штамма 715R354С.

На фиг. 4 представлены графики, представляющие (А) профиль подкисления молока (pH с течением

времени) и (В) изменение скорости подкисления с течением времени (мЕд.рН/мин с течением времени) штамма DGCC11231.

На фиг. 5 представлены графики, представляющие (А) профиль подкисления молока (рН с течением времени) и (В) изменение скорости подкисления с течением времени (мЕд.рН/мин с течением времени) штамма 11231R354С.

На фиг. 6 представлен график, представляющий активность бета-галактозидазы при рН 6 и 4,5 четырех штаммов *S. thermophilus*.

На фиг. 7 представлен график, представляющий активность бета-галактозидазы при рН 6 и 4,5 штамма DGCC715, штамма 715R354С, штамма DGCC11231, штамма 11231R354С и штамма DGCC12456.

На фиг. 8 представлен график, представляющий отношение LacS к LacZ при рН 6 и 4,5 штамма DGCC715, штамма 715R354С, штамма DGCC11231, штамма 11231R354С и штамма DGCC12456.

На фиг. 9 представлен график, представляющий разницу в эффективности гидролиза лактозы в диапазоне рН 6 и 4,5 (ΔЕН) штамма DGCC715, штамма 715R354С, штамма DGCC11231, штамма 11231R354С и штамма DGCC12456.

На фиг. 10 представлен график, представляющий (А) вязкость, измеренную на 14-й день, и (В) изменение рН во времени для перемешанного йогурта, изготовленного из штамма DGCC12456 и упакованного при температуре 20 или 35°C (хранение при 10°C).

На фиг. 11 представлен график, представляющий изменение рН во времени йогурта, изготовленного с использованием штамма DGCC12456 (сплошная линия) и с использованием эталонной культуры (пунктирная линия) (хранение при 10°C).

Сущность изобретения

В одном аспекте изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему β-галактозидазу^{FS}, который при вставке вместо аллеля гена *lacZ* штамма DGCC715 (депонированного в DSMZ 12 февраля 2019 г. под номером доступа DSM33036), приводит к производному DGCC715, характеризующемуся отношением $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, которое составляет более чем 8, где $LacS_{pH4,5}$ представляет активность пермеазы LacS для импорта лактозы, рассчитанную с помощью анализа А при рН 4,5, а $LacZ_{pH4,5}$ представляет собой активность бета-галактозидазы для гидролиза лактозы, рассчитанную с помощью анализа В при рН 4,5. Таким образом, изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему β-галактозидазу^{FS}, который определяется как аллель *lacZ*, который увеличивает отношение активности пермеазы LacS для импорта лактозы, рассчитанной с помощью анализа А при рН 4,5, к активности бета-галактозидазы для гидролиза лактозы, рассчитанной с помощью анализа В при рН 4,5 (отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$) выше 8 в производном DGCC715, где указанное производное DGCC715 является штаммом DGCC715 (депонирован в DSMZ 12 февраля 2019 г. под номером доступа DSM33036) в котором его ген *lacZ* был заменен указанным полинуклеотидом, кодирующим β-галактозидазу^{FS}.

В одном аспекте изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему часть по меньшей мере из 100 нуклеотидов полинуклеотида, кодирующего β-галактозидазу^{FS}, где указанная нуклеотидная часть охватывает кодон, соответствующий остатку 354 указанной β-галактозидазы^{FS}.

В одном аспекте изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид по изобретению.

В одном аспекте изобретение относится к штамму *Streptococcus thermophilus*, содержащему аллель гена *lacZ*, который представляет собой аллель *lacZ*^{FS}, кодирующий β-галактозидазу^{FS} по изобретению.

В одном аспекте изобретение относится к бактериальной композиции, содержащей штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению.

В одном аспекте изобретение относится к пищевому или кормовому продукту, содержащему штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению или бактериальную композицию по изобретению.

В одном аспекте изобретение относится к способу производства ферментированного продукта, включающему а) инокуляцию субстрата штаммом *Streptococcus thermophilus* по изобретению или бактериальной композицией по изобретению и б) ферментацию инокулированного субстрата, полученного на стадии а) для получения ферментированного продукта, предпочтительно ферментированного молочного продукта.

В одном аспекте изобретение относится к применению штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению или бактериальной композиции по изобретению для производства пищевого или кормового продукта, предпочтительно ферментированного пищевого продукта, более предпочтительно ферментированного молочного продукта.

В одном аспекте изобретение относится к применению полинуклеотида или вектора по изобретению для получения штамма *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP при использовании для ферментации молока с помощью анализа С.

В одном аспекте изобретение относится к способу получения штамма *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP, включающему а) получение штамма *Streptococcus thermophilus*, имеющего отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, которое составляет менее чем 5, где $LacS_{pH4,5}$ представляет активность по импорту лактозопермеазы LacS, рассчитанную с помощью анализа А при рН 4,5, и $LacZ_{pH4,5}$ представляет собой активность бета-галактозидазы для гидролиза лактозы, рассчитанную с помощью анализа В при рН 4,5; б) замену аллеля гена *lacZ* указанного штамма *Streptococcus thermophilus* на стадии а) полинук-

леотидом по изобретению или замену части аллеля гена *lacZ* указанного штамма *Streptococcus thermophilus* на стадии а) на соответствующий полинуклеотид согласно по настоящему изобретению или модификации последовательности гена *lacZ* указанного штамма *Streptococcus thermophilus* на стадии а) для получения аллеля *lacZ^{FS}* с такой же последовательностью, что и полинуклеотид по настоящему изобретению; и с) выделение штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP при использовании для ферментации молока с помощью анализа С. Таким образом, изобретение относится к способу получения штамма *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP, включающему а) получение штамма *Streptococcus thermophilus*, имеющего отношение активности пермеазы LacS для импорта лактозы, рассчитанной с помощью анализа А при pH 4,5, к активности бета-галактозидазы для гидролиза лактозы, рассчитанной с помощью анализа В при pH 4,5 (отношение LacS_{pH4,5} к LacZ_{pH4,5}), которое составляет менее чем 5; б) замену аллеля гена *lacZ* указанного штамма *Streptococcus thermophilus* на стадии а) полинуклеотидом по изобретению или замену части аллеля гена *lacZ* указанного штамма *Streptococcus thermophilus* стадии а) с помощью соответствующего полинуклеотида по изобретению или модификации последовательности гена *lacZ* указанного штамма *Streptococcus thermophilus* стадии а) для получения аллеля *lacZ^{FS}* с такой же последовательностью, что и у полинуклеотида по изобретению; и с) выделение штамма(штаммов) *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP при использовании для ферментации молока с помощью анализа С.

В одном аспекте изобретение относится к способу идентификации аллеля *lacZ^{FS}*, кодирующего β-галактозидазу^{FS}, включающему а) вставку аллеля *lacZ*, подлежащего тестированию, вместо аллеля гена *lacZ* штамма DGCC715 (депонированного в DSMZ 12 февраля 2019 г. под номером доступа DSM33036), с получением производного DGCC715; и б) определение активности пермеазы LacS для импорта лактозы с помощью анализа А при pH 4,5 (LacS_{pH4,5}) и активности бета-галактозидазы для гидролиза лактозы с помощью анализа В при pH 4,5 (LacZ_{pH4,5}); где отношение LacS_{pH4,5} к LacZ_{pH4,5}, которое составляет более чем 8, является показателем аллеля *lacZ*, который является аллелем *lacZ^{FS}*, кодирующим β-галактозидазу^{FS}.

Подробное описание изобретения

Общие определения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится настоящее описание.

Настоящее описание не ограничивается примерами способов и материалов, раскрытых в настоящем описании, и любые методы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут использоваться на практике или при тестировании вариантов осуществления настоящего описания.

Заголовки, представленные в настоящем описании, не являются ограничениями различных аспектов или вариантов осуществления настоящего описания, которые могут использоваться со ссылкой на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены со ссылкой на описание в целом.

Используемый в настоящем описании термин "полинуклеотид" является синонимом термина "нуклеотидная последовательность" и/или термина "последовательность нуклеиновой кислоты". Если не указано иное, любые последовательности нуклеиновых кислот записываются слева направо в ориентации от 5' к 3'.

Используемый в настоящем описании термин "белок" включает белки, полипептиды и пептиды. Используемый в настоящем описании термин "аминокислотная последовательность" является синонимом термина "белок". В настоящем описании и формуле изобретения используется название аминокислоты, традиционный трехбуквенный код или обычный однобуквенный код для аминокислотных остатков. Также понятно, что белок может кодироваться более чем одной нуклеотидной последовательностью из-за вырожденности генетического кода. Если не указано иное, любые аминокислотные последовательности записывают слева направо в ориентации от аминоконца к карбоксиконцу.

В настоящем изобретении может использоваться конкретная нумерация положений аминокислотных остатков в бета-галактозидазе. Путем выравнивания аминокислотной последовательности образца бета-галактозидазы с бета-галактозидазой SEQ ID NO: 2 можно присвоить номер положению аминокислотного остатка в указанном образце бета-галактозидазы, которое соответствует положению аминокислотного остатка или нумерации аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 настоящего изобретения.

В описании могут встречаться и другие определения терминов. Прежде чем примеры вариантов осуществления будут описаны более подробно, следует понимать, что настоящее описание не ограничивается конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем описании терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Следует отметить, что примененные в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения

формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если контекст ясно не указывает иное.

Термины "содержащий", "включает" и "состоящий из", используемые в настоящем описании, являются синонимами "включающий", "включает" или "содержащий", "содержит" и являются инклюзивными или открытыми и не исключают дополнительных, непременных членов, элементов или стадий способа. Термины "содержащий", "содержит" также включают термин "состоящий из".

Публикации обсуждаемые в настоящем описании, представлены исключительно для их раскрытия до даты подачи заявки на данное изобретение. Ничто в настоящем описании не должно толковаться как признание того, что такие публикации составляют предшествующий уровень техники по отношению к прилагаемой формуле изобретения.

В настоящем изобретении неожиданно было обнаружено, что мутации, модифицирующие поток лактозы, можно использовать для создания штаммов *Streptococcus thermophilus*, которые можно использовать для производства ферментированного молока, не подвергающегося пост-подкислению при хранении при температуре ферментации.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу идентификации аллеля $lacZ^{FS}$, кодирующего β -галактозидазу^{FS}, включающему:

a) вставку аллеля $lacZ$, подлежащего тестированию, вместо аллеля гена $lacZ$ штамма DGCC715, для получения производного DGCC715;

b) определение активности пермеазы LacS для импорта лактозы с помощью анализа А при pH 4,5 ($LacS_{pH4,5}$) и активности бета-галактозидазы для гидролиза лактозы с помощью анализа В при pH 4,5 ($LacZ_{pH4,5}$) в DGCC715-производном стадии a);

где отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, которое составляет более чем 8, является показателем аллеля $lacZ$, который представляет собой аллель $lacZ^{FS}$, кодирующий β -галактозидазу^{FS}.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает определение активности бета-галактозидазы для гидролиза лактозы с помощью анализа В при pH 6 ($LacZ_{pH6}$) в производном DGCC715, и где отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, которое составляет более чем 8, и $LacZ_{pH6}$, составляющая по меньшей мере 7×10^{-8} моль/(мг экстракта общего белка \times мин), являются показателем аллеля $lacZ$, который представляет собой аллель $lacZ^{FS}$, кодирующий β -галактозидазу^{FS}.

В данном контексте выражение "аллель гена $lacZ$ " означает вариант гена $lacZ$, обнаруженный в конкретном штамме *Streptococcus thermophilus*. Что касается большинства бактериальных генов, нуклеотидная последовательность гена может варьироваться, а аллели представляют разные последовательности одного и того же гена.

Под геном $lacZ$ штамма *Streptococcus thermophilus* здесь понимают нуклеотидную последовательность, кодирующую бета-галактозидазу, расположенную ниже гена $lacS$, кодирующего лактозопермеазу LacS, в lac -опероне [Schroeder C.J. et al., J. Gen. Microbiol. 1991 Feb; 137(2):369-80]. Термин "бета-галактозидаза" используется здесь взаимозаменяемо с термином "бета-галактозидаза".

Примером аллеля гена $lacZ$ *Streptococcus thermophilus* является аллель гена $lacZ$ штамма DGCC715 (DSM33036), SEQ ID NO: 1. Этот аллель, как определено в SEQ ID NO: 1, кодирует β -галактозидазу, SEQ ID NO: 2.

Примером аллеля гена $lacS$ *Streptococcus thermophilus* является аллель гена $lacS$ штамма DGCC715, SEQ ID NO: 30. Этот аллель, как определено в SEQ ID NO: 30, кодирует лактозопермеазу LacS, SEQ ID NO: 31.

Аллели $lacZ^{FS}$, кодирующие β -галактозидазу^{FS}.

Авторы изобретения показали, что некоторые из этих аллелей $lacZ$ кодируют β -галактозидазу, активность которой в значительной степени снижена, но не равна нулю при pH 4,5 (как определено в анализе В), при вставке вместо аллеля гена $lacZ$ (SEQ ID NO: 1) штамма DGCC715. Под "активностью β -галактозидазы, не равной нулю при pH 4,5, подразумевается, что активность β -галактозидазы при pH 4,5 ($LacZ_{pH4,5}$) обнаруживается при определении с помощью анализа В, как описано здесь.

Как показано в примерах 4 и 5 ниже, активность β -галактозидазы в штаммах *Streptococcus thermophilus* сильно варьируется от штамма к штамму, так что технически нецелесообразно ссылаться на активность β -галактозидазы без какого-либо эталонного значения или без какого-либо эталонного штамма. Кроме того, как показано в примере 6, снижение активности β -галактозидазы при pH 4,5 в штамме, производном от DGCC715, несущем аллель $lacZ^{FS}$, по сравнению со штаммом DGCC715, сопровождается увеличением активности LacS (как определено с помощью анализа А). В целом, эти результаты привели к тому, что авторы изобретения охарактеризовали снижение β -галактозидазы при pH 4,5 с помощью надежного и воспроизводимого параметра, который представляет собой отношение активности пермеазы LacS для импорта лактозы, рассчитанной с помощью анализа А при pH 4,5, к активности бета-галактозидазы для гидролиза лактозы, рассчитанной с помощью анализа В при pH 4,5 (отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$). Таким образом, авторы изобретения показали, что один из этих аллелей $lacZ$ приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, составляющему более чем 8, при вставке вместо аллеля гена $lacZ$ (SEQ ID NO: 1) штамма DGCC715. Эти аллели $lacZ$ определены здесь как "аллели $lacZ^{FS}$ ". Белок, кодируемый этими аллелями $lacZ^{FS}$, упоминается в настоящем описании как " β -галактозидаза^{FS}". Другими

словами, аллель $lacZ^{FS}$ увеличивает отношение активности пермеазы LacS для импорта лактозы, рассчитанной с помощью анализа А при рН 4,5, к активности бета-галактозидазы для гидролиза лактозы, рассчитанной с помощью анализа В при рН 4,5 (отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$), выше 8 в производном DGCC715, где указанное производное DGCC715 представляет собой штамм DGCC715 (DSM33036), в котором его ген $lacZ$ был заменен указанным полинуклеотидом, кодирующим β -галактозидазу^{FS}; как определено в настоящей заявке, "увеличение" отношения $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ в производном DGCC715 определяется по сравнению с отношением $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ штамма DGCC715 (DSM33036).

Таким образом, любой аллель $lacZ^{FS}$ (кодирующий β -галактозидазу^{FS}), приводящий к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, составляющему более чем 8 (как определено в настоящем документе) в DGCC715-производном, является частью изобретения. Таким образом, любой аллель $lacZ^{FS}$ (кодирующий β -галактозидазу^{FS}), увеличивающий отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ выше 8 в производном DGCC715, как определено в настоящем документе, является частью изобретения). В одном варианте осуществления аллель $lacZ^{FS}$ по изобретению (кодирующий β -галактозидазу^{FS}) приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, которое составляет более чем 9 (как определено в настоящем документе), в производном DGCC715. В одном варианте осуществления аллель $lacZ^{FS}$ по настоящему изобретению (кодирующий β -галактозидазу^{FS}) приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, которое составляет более чем 10 (как определено в настоящем документе), в производном DGCC715. В одном варианте осуществления аллель $lacZ^{FS}$ по настоящему изобретению (кодирующий β -галактозидазу^{FS}) приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, которое составляет более чем 11 (как определено в настоящем документе), в производном DGCC715. В одном варианте осуществления аллель $lacZ^{FS}$ по настоящему изобретению (кодирующий β -галактозидазу^{FS}) приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, которое составляет более чем 12 (как определено в настоящем документе), в производном DGCC715. В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ по изобретению (кодирующий β -галактозидазу^{FS}) приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ (как определено в настоящем документе) в производном DGCC715, которое выбрано из группы, состоящей из более чем 9, более чем 10, более чем 11 и более чем 12. Таким образом, аллель $lacZ^{FS}$ по изобретению (кодирующий β -галактозидазу^{FS}) увеличивает отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ в производном DGCC715, как определено в настоящем документе, выше значения, выбранного из группы, состоящей из выше 9, выше 10, выше 11 и выше 12.

Как упоминалось в другом месте, активность β -галактозидазы при рН 4,5 ($LacZ_{pH4,5}$) не является нулевой, т. е. детектируется при определении с помощью анализа В; в одном варианте осуществления и в комбинации с любым минимальным значением отношения $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, как определено в настоящем описании, аллель $lacZ^{FS}$ по изобретению (кодирующий β -галактозидазу^{FS}) приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ (как определено в настоящем описании) в производном DGCC715, которое составляет менее чем 100 (или увеличивает отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ в производном DGCC715 до менее чем 100).

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$, как определено в настоящем документе, дополнительно характеризуется (в дополнение к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$) тем, что он кодирует β -галактозидазу^{FS}, активность которой составляет по меньшей мере 7×10^{-8} моль/(мг общего белкового экстракта \times мин) при рН 6 (как определено в анализе В) ($LacZ_{pH6}$), когда указанный аллель $lacZ^{FS}$ вставлен вместо аллеля гена $lacZ$ штамма DGCC715. Таким образом, аллель $lacZ^{FS}$, как определено в настоящем документе, дополнительно характеризуется (в дополнение к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$) тем, что он кодирует β -галактозидазу^{FS}, активность которой составляет по меньшей мере 7×10^{-8} моль/(мг экстракта общего белка \times мин) при рН 6 (как определено анализом В) ($LacZ_{pH6}$) в производном DGCC715, где указанное производное DGCC715 представляет собой штамм DGCC715, в котором его ген $lacZ$ был заменен указанным аллелем $lacZ^{FS}$. В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, активность которой составляет по меньшей мере 8×10^{-8} моль/(мг экстракта общего белка \times мин) при рН 6 ($LacZ_{pH6}$). В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, активность которой составляет по меньшей мере 9×10^{-8} моль/(мг экстракта общего белка \times мин) при рН 6 ($LacZ_{pH6}$). В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, активность которой составляет по меньшей мере 1×10^{-7} моль/(мг экстракта общего белка \times мин) при рН 6 ($LacZ_{pH6}$). В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$, как определено в настоящем документе, дополнительно характеризуется (в дополнение к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$) тем, что он кодирует β -галактозидазу^{FS}, активность которой выбрана из группы, состоящей по меньшей мере из 7×10^{-8} , по меньшей мере 8×10^{-8} , по меньшей мере 9×10^{-8} и по меньшей мере 1×10^{-7} моль/(мг экстракта общего белка \times мин) при рН 6 (как определено в анализе В) ($LacZ_{pH6}$), когда указанный аллель $lacZ^{FS}$ вставлен вместо аллеля гена $lacZ$ штамма DGCC715 (т.е. в производном DGCC715, указанное производное DGCC715 представляет собой штамм DGCC715, в котором его ген $lacZ$ был заменен указанным аллелем $lacZ^{FS}$).

Таким образом, в одном варианте осуществления любой аллель $lacZ^{FS}$ (кодирующий β -галактозидазу^{FS}), который приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, составляющему более чем 8 (как определено в настоящем документе), и приводит к $LacZ_{pH6}$, составляющему по меньшей мере

7×10^{-8} моль/(мг экстракта общего белка \times мин) (как определено в настоящем документе) в производном DGCC715, является частью изобретения. В одном варианте осуществления аллель $lacZ^{FS}$ по настоящему изобретению (кодирующий β -галактозидазу^{FS}) приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, которое выбирается из группы, состоящей из более чем 9, более чем 10, более чем 11 и более чем 12 (как определено в настоящем документе) в производном DGCC715, и приводит к $LacZ_{pH6}$, выбранному из группы, состоящей по меньшей мере из 7×10^{-8} , по меньшей мере 8×10^{-8} , по меньшей мере 9×10^{-8} и по меньшей мере 1×10^{-7} моль/(мг экстракта общего белка \times мин) (как определено в анализе В), в указанном производном DGCC715. В одном варианте осуществления аллель $lacZ^{FS}$ по изобретению (кодирующий β -галактозидазу^{FS}) приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ (как определено в настоящем документе) в производном DGCC715, которое составляет менее чем 100. Таким образом, любой аллель $lacZ^{FS}$ (кодирующий β -галактозидазу^{FS}), увеличивающий отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ выше 8 (по сравнению с отношением $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ штамма DGCC715) и приводящий к $LacZ_{pH6}$ по меньшей мере 7×10^{-8} моль/(мг экстракта общего белка \times мин) (как определено в настоящем описании) в производном DGCC715, является частью изобретения. В одном варианте осуществления аллель $lacZ^{FS}$ по изобретению (кодирующий β -галактозидазу^{FS}) увеличивает отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ выше значения, которое выбирается из группы, состоящей из выше 9, выше 10, выше 11 и выше 12 (как определено в настоящем описании), в производном DGCC715, и приводит к $LacZ_{pH6}$, выбранному из группы, состоящей по меньшей мере из 7×10^{-8} , по меньшей мере 8×10^{-8} , по меньшей мере 9×10^{-8} и по меньшей мере 1×10^{-7} моль/(мг экстракта общего белка \times мин) (как определено в анализе В, в указанном производном DGCC715. В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ по изобретению (кодирующий β -галактозидазу^{FS}) увеличивает отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ (как определено в настоящем документе) в производном DGCC715 до менее чем 100.

Неограничивающие примеры β -галактозидазы^{FS} раскрыты ниже.

Примечательно, что в настоящем изобретении активность $LacS$ и $LacZ$ (при pH 4,5 и 6) рассчитывают с помощью анализа А и анализа В соответственно, как описано в настоящем документе.

Аллель $lacZ$, который при вставке вместо аллеля гена $lacZ$ штамма DGCC715 не приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ (как определено в настоящем документе) более 8, не считается аллелем $lacZ^{FS}$ по изобретению. Другими словами, аллель $lacZ$, который не увеличивает отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ (как определено в настоящем описании) выше 8 в производном DGCC715, не считается аллелем $lacZ^{FS}$ по изобретению, где указанное производное DGCC715 является штаммом DGCC715, в котором его ген $lacZ$ был заменен указанным аллелем $lacZ$.

Активность $LacS$, активность $LacZ$ и их соотношение.

Изобретение основано на определении активности пермеазы $LacS$ для импорта лактозы и/или определения активности бета-галактозидазы для гидролиза лактозы при определенных значениях pH (pH 4,5 и/или pH 6). Эти активности определяют в конкретном штамме, таком как, например, штамм DGCC715 или в производном DGCC715, как определено в настоящем описании.

Активность по импорту лактозопермеазы $LacS$ при определенном pH (pH X) обозначается здесь как " $LacSpHx$ ". В одном из вариантов осуществления эту активность определяют при pH 4,5 ($LacSpH4,5$). В одном из вариантов осуществления эту активность определяют при pH 6 ($LacSpH6$). В конкретном варианте осуществления активность пермеазы $LacS$ для импорта лактозы определяют при конкретном pH (таком как pH 4,5 или 6) с помощью анализа А.

Активность бета-галактозидазы для гидролиза лактозы при определенном pH (pH X) обозначается здесь как " $LacZpHx$ ". В одном из вариантов осуществления эту активность определяют при pH 4,5 ($LacZpH4,5$). В одном варианте осуществления эту активность определяют при pH 6 ($LacZpH6$). В конкретном варианте осуществления активность бета-галактозидазы для гидролиза лактозы определяют при конкретном pH (таком как pH 4,5 или 6) с помощью анализа В.

Один из способов определения отношения $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ для идентификации аллеля $lacZ^{FS}$ по настоящему изобретению состоит в определении активности пермеазы $LacS$ для импорта лактозы при pH 4,5 в штамме DGCC715, в котором аллель его гена $lacZ$ был заменен на аллель $lacZ$, подлежащий тестированию (называемый здесь "производным DGCC715"), и для определения активности бета-галактозидазы для гидролиза лактозы при pH 4,5 в том же производном DGCC715 и для расчета соотношения обеих активностей.

Анализ А (активность $LacS$).

Штаммы *Streptococcus thermophilus* выращивали на среде M17, содержащей 30 г/л сахарозы в качестве единственного источника углерода, в течение ночи при 37°C. Когда клетки достигали стационарной фазы, их переносили (при 0,05 uDO/мл) в 1 объем среды M17, содержащей 30 г/л лактозы в качестве единственного источника углерода, и их инкубировали в течение 2 ч при 42°C. Культуры штаммов центрифугировали при комнатной температуре (3500 \times g), супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в 0,5 объема 4% (мас./об.) глицерофосфата. Эту стадию промывки применяли дважды. 1,8 мл клеточной суспензии в 4% глицерофосфате инкубировали в течение 2 мин при 42°C. Затем добавляли 0,2 мл раствора лактозы (70 г/л лактозы + 0,1 М калий-фосфатный буфер) [pH раствора лактозы предварительно

доводили до pH 4,5 или 6, в зависимости от необходимого измерения]. Смесь инкубировали еще 3 мин при 42°C. Реакцию блокировали фильтрованием на фильтре 0,22 мкм для удаления клеток. Затем лактозу в отфильтрованном растворе анализировали с помощью ВЭЖХ, используя следующий протокол. Раствор разбавляли в 10 раз водой и вводили 10 мкл на ВЭЖХ Agilent 1200 (высокоэффективная жидкостная хроматография). Элюирование проводили в изократическом режиме чистой водой со скоростью 0,6 мл/мин. Молекулы разделяли за 40 мин на ионообменной колонке Pb2 + (SP-0810 Shodex® 300 мм×8 мм×7 мкм). Сахара определяли рефрактометром. Количественный анализ проводили с помощью внешней калибровки.

Активность пермеазы LacS для импорта лактозы рассчитывали следующим образом:

Активность LacS = ([лактоза]_{начальная} - [лактоза]_{3 мин})/(DO × время), выраженная в мкмоль/(uDO × мин),

где [лактоза]_{начальная} - начальная концентрация в мкмоль/мл;

[лактоза]_{3 мин} - концентрация в мкмоль/мл через 3 мин при 42°C;

DO - плотность бактерий в uDO/мл;

время - продолжительность эксперимента в минутах (в данном случае 3 мин).

Анализ В (активность LacZ).

Получали свежую ночную культуру штамма *Streptococcus thermophilus* для анализа в M17, содержащую 30 г/л лактозы, и использовали для инокуляции 1% (об./об.) 10 мл свежей M17, содержащей 30 г/л лактозы. Клетки собирали центрифугированием (6000×g, 10 мин, 4°C) после 3 ч роста на M17, содержащей 30 г/л лактозы, при 42°C, промывали в 1,5 мл холодного буфера для лизиса (KPO₄ 0,1 M) и ресуспендировали в 300 мкл холодного буфера для лизиса. Ингибиторы протеазы, не содержащие ЭДТА, "сOmplete™" (Roche, ссылка поставщика 04693132001) добавляли в буфер для анализа, как описано поставщиком. Клетки разрушали добавлением 100 мг стеклянных гранул (150-212 мкм, Sigma G1145) к 250 мкл ресуспендированных клеток и осцилляцией с частотой 30 циклов/с в течение 6 мин в вибромельнице MM200 (Retsch, Haan, Germany). Клеточный дебрис и стеклянные гранулы удаляли центрифугированием (14000×g, 15 мин, 4°C), а супернатант переносили в чистую центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, хранящуюся на льду. Содержание общего белка определяли с использованием набора для определения белка FLUKA-Rapid (ссылка 51254). Активность бета-галактозидазы в клеточных экстрактах определяли спектрофотометрически путем мониторинга гидролиза О-нитро-фенол-бета-галактозида (ONPG) до галактозы и О-нитрофенола (ONP). 20 мкл клеточного экстракта смешивали с 135 мкл реакционного буфера (NaPO₄ 100 mM; KCl 10 mM; MgSO₄ 1 mM; ONPG 3 mM + бета-меркаптоэтанол 60 mM, pH 6). Выработка ONP приводит к желтому цвету в пробирке. Когда появлялся желтый цвет, реакцию блокировали добавлением 250 мкл стоп-буфера (Na₂CO₃ 1 M). Оптическую плотность при 420 нм регистрировали с использованием ридера для микропланшетов Synergy HT (BIO-ТЕК). Одна единица бета-галактозидазы соответствует количеству фермента, который катализирует выработку 1 мкмоль ONP в минуту в условиях анализа. Активность бета-галактозидазы рассчитывали следующим образом:

Активность LacZ = dOD × V/[dt × l × ε × Qprot], выраженная в моль/(мг экстракта общего белка × мин),

где dOD - изменение оптической плотности (OD) при 420 нм между пустой средой и тестируемым образцом;

V - объем реакции, в которой измеряется оптическая плотность (в настоящем документе 250 мкл);

dt - представляет продолжительность в минутах между добавлением 20 мкл бактериального экстракта и добавлением 250 мкл стоп-буфера;

l - длина оптического пути (в данном случае 0,73 см);

ε - молярный коэффициент ослабления ONP (в настоящем документе 4500 см²/мкмоль);

Qprot - количество белка в кювете (в мг).

Расчет соотношения.

После расчета активности LacS и LacZ, как определено в настоящем документе, соотношение активностей LacSpHX по сравнению с LacZpHX рассчитывается следующим образом: [LacSpHX, как определено в настоящем описании/LacZpHX, как определено в настоящем описании]×10⁻⁶.

Примечательно, что, когда упоминается соотношение LacSpHX к LacZpHX, активности LacS и LacZ рассчитываются для одного и того же штамма, в частности для одного и того же производного DGCC715.

Аллель варианта lacZ, кодирующего вариант β-галактозидазы.

Аллель lacZ, который 1) кодирует β-галактозидазу, последовательность которой имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2, и 2) приводит к отношению LacS_{pH4,5} к LacZ_{pH4,5} (как определено в настоящем описании) менее чем 5, при вставке вместо аллеля гена lacZ штамма DGCC715, упоминается здесь как аллель варианта lacZ (кодирующего вариант β-галактозидазы). Другими словами, аллель lacZ, который 1) кодирует β-галактозидазу, последовательность которой имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2, и 2) не увеличивает отношение LacS_{pH4,5} к LacZ_{pH4,5} (как определено в настоящем документе) до 5 или более чем 5 в производном DGCC715, упоминается здесь как аллель вари-

анта *lacZ* (кодирующего вариант β -галактозидазы), указанное производное DGCC715 представляет собой штамм DGCC715, в котором его ген *lacZ* был заменен указанным аллелем варианта *lacZ*; как упоминалось ранее, "увеличение" отношения $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ в производном DGCC715 определяется по сравнению с отношением $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ штамма DGCC715 (DSM33036). Выражение "вариант β -галактозидазы" используется взаимозаменяемо с выражением "вариант β -галактозидазы, имеющий по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2".

В одном из вариантов осуществления аллель варианта *lacZ* при вставке вместо аллеля гена *lacZ* штамма DGCC715 приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ (как определено в настоящем документе) менее чем 4 (или не увеличивает отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ до 4 или более 4, в производном DGCC715, как определено в настоящем документе). В одном из вариантов осуществления аллель варианта *lacZ* при вставке вместо аллеля гена *lacZ* штамма DGCC715 приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ (как определено в настоящем документе) до менее чем 3 (или не увеличивает отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ до 3 или более чем 3 в производном DGCC715, как определено в настоящем документе).

В комбинации с любым из вариантов осуществления, относящихся к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ выше, аллель варианта *lacZ* также определяется как кодирующий вариант β -галактозидазы, последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2. Под "по меньшей мере на 95% идентично SEQ ID NO: 2" подразумевается по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. В одном из вариантов осуществления вариант β -галактозидазы (кодируемый аллелем варианта *lacZ*) имеет последовательность, которая по меньшей мере на 96% идентична SEQ ID NO: 2. В одном из вариантов осуществления вариант β -галактозидазы (кодируемый аллелем варианта *lacZ*) имеет последовательность, которая по меньшей мере на 96% идентична SEQ ID NO: 2. В одном из вариантов осуществления вариант β -галактозидазы (кодируемый аллелем варианта *lacZ*) имеет последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 2. В одном из вариантов осуществления вариант β -галактозидазы (кодируемый аллелем варианта *lacZ*) имеет последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов осуществления в комбинации с процентом идентичности размер варианта β -галактозидазы такой же, как и размер белка β -галактозидазы, как определено в SEQ ID NO: 2 (1026 аминокислотных остатков); таким образом, в одном из вариантов осуществления аллель варианта *lacZ* дополнительно определяется как кодирующий вариант β -галактозидазы из 1026 аминокислот.

В одном из вариантов осуществления аллель варианта *lacZ* определяется в настоящем документе как:

1) кодирующий вариант β -галактозидазы, последовательность которого по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 2; и

2) при вставке вместо аллеля гена *lacZ* штамма DGCC715 приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ (как определено в настоящем документе), которое составляет менее чем 5, менее чем 4 или менее чем 3.

Таким образом, аллель варианта *lacZ* определяется здесь как:

1) кодирующий вариант β -галактозидазы, последовательность которого по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 2; и

2) не увеличивающий отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ до 5 или более 5, до 4 или более 4 или до 3 или более 3 в производном DGCC715, как определено в настоящем документе.

Неограничивающие примеры вариантов β -галактозидазы раскрыты в табл. 2, и их последовательность определена в SEQ ID NO: 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 и 27.

Замена аллеля гена *lacZ* штамма *Streptococcus thermophilus* (в частности, штамма DGCC715).

Замена аллеля гена *lacZ* конкретного штамма *Streptococcus thermophilus* на аллель *lacZ*, подлежащий тестированию, осуществляется с использованием обычных методов молекулярной биологии и находится в пределах возможностей специалиста в данной области. Вообще говоря, подходящие стандартные методы включают замену посредством гомологичной рекомбинации.

Выражение "аллель *lacZ*, вставленный вместо аллеля гена *lacZ*" является синонимом выражения "аллель гена *lacZ* заменен на аллель *lacZ*, подлежащий тестированию". Выражение "аллель *lacZ*^{FS}, вставленный вместо аллеля гена *lacZ*" является синонимом выражения "аллель гена *lacZ* заменен на аллель *lacZ*^{FS}".

Замененный (или вставленный вместо) означает, что последовательность β -галактозидазы, кодируемая аллелем *lacZ*, которая должна быть вставлена (аллель *lacZ*, подлежащий тестированию), отличается от последовательности β -галактозидазы, кодируемой аллелем гена *lacZ* штамма *Streptococcus thermophilus*. Таким образом, замена (или вставка вместо) означает, что кодирующая последовательность гена *lacZ* штамма *Streptococcus thermophilus* (от 1-го нуклеотида стартового кодона до последнего нуклеотида стоп-кодона) заменяется соответствующей кодирующей последовательностью аллеля *lacZ*, под-

лежащего тестированию.

В случае штамма DGCC715 замена (или вставка вместо) означает, что последовательность белка β -галактозидазы, кодируемого аллелем *lacZ*, который должен быть вставлен (аллель *lacZ*, подлежащий тестированию), отличается от последовательности β -галактозидазы, кодируемой геном *lacZ* штамма DGCC715. Таким образом, замена (или вставка вместо) означает, что кодирующая последовательность гена *lacZ* штамма DGCC715 (от 1-го нуклеотида стартового кодона до последнего нуклеотида стоп-кодона, т.е. нуклеотидов с 1 по 3081 из SEQ ID NO: 1) заменяется соответствующей кодирующей последовательностью аллеля *lacZ*, подлежащего тестированию. Штамм DGCC715, ген *lacZ* которого был заменен тестируемым аллелем *lacZ* (таким как аллель *lacZ*^{FS} или вариантный аллель *lacZ*), определяется здесь как "производное DGCC715".

Штамм DGCC715.

Штамм *Streptococcus thermophilus* DGCC715 был депонирован DuPont Nutrition Biosciences ApS в соответствии с Будапештским соглашением в Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 12 февраля 2019 г. и получили депозитарный номер DSM33036. Условия культивирования этого штамма приведены в разделе примеров. Заявитель просит, чтобы образец депонированного микроорганизма, указанного в настоящем документе, мог быть предоставлен только эксперту до даты выдачи патента.

Выражения "штамм DGCC715" и "производное DGCC715" используются взаимозаменяемо с выражениями "штамм DSM33036" и "производное DSM33036", соответственно.

Для создания аллеля *lacZ*, подлежащего тестированию (включая аллель *lacZ*^{FS}).

Аллели *lacZ*, подлежащие тестированию (в частности, аллели *lacZ*^{FS}), могут быть сгенерированы случайным или направленным мутагенезом, начиная с аллеля *lacZ*, который не является аллелем *lacZ*^{FS}, в частности, начиная с аллеля *lacZ*, кодирующего β -галактозидазу, SEQ ID NO: 2 (например, SEQ ID NO: 1) или начиная с аллеля варианта *lacZ*, как определено в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления аллели *lacZ*, подлежащие тестированию (в частности, аллели *lacZ*^{FS}), генерируются случайным мутагенезом. В другом варианте осуществления аллели *lacZ*, подлежащие тестированию, (в частности, аллели *lacZ*^{FS}) могут быть получены путем направленного мутагенеза. Подходящие протоколы мутагенеза для случайного или направленного мутагенеза хорошо известны и описаны в литературе.

Сгенерированные таким образом аллели *lacZ*, подлежащие тестированию, могут быть подвергнуты скринингу с использованием метода идентификации аллеля *lacZ*^{FS}, как определено в настоящем документе.

Последовательности белков β -галактозидазы^{FS}.

Аллель *lacZ*^{FS} по изобретению - как часть полинуклеотида по изобретению или содержащийся в молочнокислой бактерии по изобретению - может быть определен в дополнение к тому, что он приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ более 8 (как определено в настоящем описании) (или для увеличения отношения $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ до более чем 8) и, необязательно, приводит к $LacZ_{pH6}$ по меньшей мере 7×10^{-8} моль/(мг экстракта общего белка \times мин) (как определено в настоящем документе) за счет его нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности β -галактозидазы, которую он кодирует.

В одном из вариантов осуществления аллель *lacZ*^{FS}, как определено в настоящем документе, кодирует β -галактозидазу^{FS}, последовательность которой отличается от SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления аллель *lacZ*^{FS}, как определено в настоящем документе, как часть полинуклеотида по настоящему изобретению или содержащийся в молочнокислой бактерии по настоящему изобретению, определяется тем фактом, что он приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ более чем 8 (как определено в настоящем документе) (или увеличивает отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ до более чем 8) и, необязательно, приводит к $LacZ_{pH6}$ по меньшей мере 7×10^{-8} моль/(мг экстракта общего белка \times мин) (как определено в настоящем документе), в производном DGCC715 и кодирует β -галактозидазу^{FS}, последовательность которой отличается от SEQ ID NO: 2. Конкретные варианты осуществления, касающиеся отношения $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ и $LacZ_{pH6}$, описанные в другом месте в настоящем документе, применяются аналогично в текущем контексте.

В одном из вариантов осуществления аллель *lacZ*^{FS} кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую супрессию аминокислот (т.е. подавление одной или более аминокислот), добавление аминокислоты (т.е. супрессию одной или более аминокислот), аминокислотную замену (т.е. замену одной или более аминокислот) или супрессию и добавление аминокислот (т.е. подавление и добавление одной или более аминокислот) относительно β -галактозидазы, выбранной из группы, состоящей из:

- β -галактозидазы, имеющей аминокислотную последовательность, определенную в SEQ ID NO: 2; и
- белка варианта β -галактозидазы, как определено в настоящем документе, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2. Белок варианта β -галактозидазы, как определено в настоящем документе, кодируется аллелем варианта *lacZ*, который при вставке вместо аллеля гена *lacZ* штамма DGCC715 приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, которое меньше 5 (как определено в настоящем

документе) (или не увеличивает отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ до 5 или более 5 в производном DGCC715, как определено в настоящем документе). Конкретные варианты осуществления, касающиеся отношения $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, процент идентичности и размер, описанные в другом месте в настоящей заявке в контексте аллеля варианта $lacZ$, применяются аналогично в текущем контексте.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую аминокислотное подавление, по сравнению с β -галактозидазой, выбранной из группы, состоящей из:

a) β -галактозидазы, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и

b) варианта β -галактозидазы, как определено в настоящем документе, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2; в конкретном варианте осуществления β -галактозидаза^{FS} характеризуется супрессией по меньшей мере одной аминокислоты, в частности супрессией 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот. В конкретном варианте осуществления β -галактозидаза^{FS} характеризуется супрессией одной аминокислоты. В конкретном варианте осуществления β -галактозидаза^{FS} характеризуется супрессией 2, 3, 4 или 5 аминокислот. В конкретном варианте осуществления β -галактозидаза^{FS} характеризуется супрессией 2, 3, 4 или 5 последовательных аминокислот.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую добавление аминокислот, по сравнению с β -галактозидазой, выбранной из группы, состоящей из:

a) β -галактозидазы, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и

b) варианта β -галактозидазы, как определено в настоящем документе, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2; в конкретном варианте осуществления β -галактозидаза^{FS} характеризуется добавлением по меньшей мере одной аминокислоты, в частности добавлением 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот. В конкретном варианте осуществления β -галактозидаза^{FS} характеризуется добавлением одной аминокислоты. В конкретном варианте осуществления β -галактозидаза^{FS} характеризуется добавлением 2, 3, 4 или 5 аминокислот. В конкретном варианте осуществления β -галактозидаза^{FS} характеризуется добавлением 2, 3, 4 или 5 последовательных аминокислот.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую аминокислотную замену относительно β -галактозидазы, выбранной из группы, состоящей из:

a) β -галактозидазы, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и

b) варианта β -галактозидазы, как определено в настоящем документе, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2; в конкретном варианте осуществления β -галактозидаза^{FS} характеризуется заменой по меньшей мере одной аминокислоты, в частности заменой 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот. В конкретном варианте осуществления β -галактозидаза^{FS} характеризуется заменой одной аминокислоты. В конкретном варианте осуществления β -галактозидаза^{FS} характеризуется заменой 2, 3, 4 или 5 аминокислот. В конкретном варианте осуществления β -галактозидаза^{FS} имеет длину 1026 аминокислот.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, где последовательность указанной β -галактозидазы^{FS} не содержит аргинин в положении 354, при этом для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, где последовательность указанной β -галактозидазы^{FS} не содержит аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аргинина, гистидина, глутамина и лизина в положении 354, где для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2. В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, где последовательность указанной β -галактозидазы^{FS} не содержит аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из аргинина, гистидина, глутамина, лизина, глутаминовой кислоты и аспарагина в положении 354, где для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую цистеин или его эквивалентную аминокислоту в положении 354, где для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2. Под "его эквивалентной аминокислотой" подразумевается любая аминокислота, имеющая сходство по полярности, заряду, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природе остатков, при условии, что аллель $lacZ^{FS}$, кодирующий эту β -галактозидазу^{FS}, приводит к отношению $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ более 8 (как определено в настоящем документе) и, необязательно, приводит к $LacZ_{pH6}$ по меньшей мере 7×10^{-8} моль/(мг экстракта общего белка x мин) (как определено в настоящем документе), при вставке вместо аллеля $lacZ$ гена штамма DGCC715. В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из цистеина, аланина и серина в положении 354, где для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую цистеин в положении 354, где для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2.

В конкретном варианте осуществления любого из этих вариантов осуществления β -галактозидаза^{FS} имеет длину 1026 аминокислот.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ по настоящему изобретению кодирует β -галактозидазу^{FS}, последовательность которой по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, но

отличается от нее.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, последовательность которой по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, но отличается от нее, и не содержит аргинин в положении 354, где для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, последовательность которой по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, но отличается от нее, и не содержит аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящей из аргинина, гистидина, глутамина и лизина в положении 354, где для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, последовательность которой по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, но отличается от нее, и не содержит аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аргинина, гистидина, глутамина, лизина, глутаминовой кислоты и аспарагина в положении 354, где для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, последовательность которой по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, но отличается от нее и содержит цистеин или его эквивалентную аминокислоту в положении 354, где для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, последовательность которой по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, но отличается от нее, и содержит аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из цистеина, аланина и серина в положении 354, где для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, последовательность которой по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2, но отличается от нее, и содержит цистеин в положении 354, где для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2.

В конкретном варианте осуществления любого из этих вариантов осуществления β -галактозидаза^{FS} имеет длину 1026 аминокислот.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую:

a) аминокислотную последовательность, которая в остальном такая же, как SEQ ID NO: 2, но которая не содержит аргинин в положении 354 (SEQ ID NO: 5, где положение 354 не является аргинином); или

b) аминокислотную последовательность, которая в остальном является последовательностью варианта β -галактозидазы, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 (вариант β -галактозидазы, как определено в настоящем документе), но которая не содержит аргинин в положении 354. Неограничивающие примеры β -галактозидазы^{FS} определены в SEQ ID NO: 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 и 28, где положение 354 не является аргинином.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую:

a) аминокислотную последовательность, которая в остальном такая же, как SEQ ID NO: 2, но которая не содержит аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аргинина, гистидина, глутамина и лизина в положении 354 (SEQ ID NO: 5, где положение 354 не является аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из аргинина, гистидина, глутамина и лизина); или

b) аминокислотную последовательность, которая в остальном является последовательностью варианта β -галактозидазы, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 (вариант β -галактозидазы, как определено в настоящем документе), но которая не содержит аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящая из аргинина, гистидина, глутамина и лизина в положении 354. Неограничивающие примеры β -галактозидазы^{FS}. Неограничивающие примеры β -галактозидазы^{FS} соответствуют SEQ ID NO: 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 и 28, где положение 354 не является аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящий из аргинина, гистидина, глутамина и лизина.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую:

a) аминокислотную последовательность, которая в остальном определена в SEQ ID NO: 2, но которая не содержит аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аргинина, гистидина, глутамина, лизина, глутаминовой кислоты и аспарагина в положении 354 (SEQ ID NO: 5, где положение 354 не является аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из аргинина, гистидина, глутамина, лизина, глутаминовой кислоты и аспарагина); или

b) аминокислотную последовательность, которая в остальном является последовательностью варианта β -галактозидазы, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 (вариант β -галактозидазы, как определено в настоящем документе), но которая не содержит аминокислотного остатка, выбранного из группы, состоящая из аргинина, гистидина, глутамина, лизина, глутаминовой кислоты и аспарагина в положении 354. Неограничивающие примеры β -галактозидазы^{FS} имеют значения, определенные в SEQ ID NO: 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 и 28, где положение 354 не является аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из аргинина, гистидина, глутамина, лизина, глутаминовой кислоты и аспарагина.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую:

а) аминокислотную последовательность, которая в остальном такая же как SEQ ID NO: 2, но которая содержит цистеин или его эквивалентную аминокислоту в положении 354 (SEQ ID NO: 5, где положение 354 представляет собой цистеин или его эквивалентную аминокислоту); или

б) аминокислотную последовательность, которая в остальном является последовательностью варианта β -галактозидазы, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 (вариант β -галактозидазы, как определено в настоящем документе), но которая содержит цистеин или его эквивалентную аминокислоту в положении 354. Неограничивающие примеры β -галактозидазы^{FS} соответствуют SEQ ID NO: 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 и 28, где положение 354 представляет собой цистеин или его эквивалентную аминокислоту.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую:

а) аминокислотную последовательность, которая в остальном такая же, как SEQ ID NO: 2, но которая содержит аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из цистеина, аланина и серина в положении 354 (SEQ ID NO: 5, где положение 354 выбирают из группы, состоящей из цистеина, аланина и серина); или

б) аминокислотную последовательность, которая в остальном является последовательностью варианта β -галактозидазы, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 (вариант β -галактозидазы, как определено в настоящем документе), но которая содержит аминокислотный остаток, выбранный из группы состоящий из цистеина, аланина и серина в положении 354. Неограничивающие примеры β -галактозидазы^{FS} соответствуют SEQ ID NO: 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 и 28, где положение 354 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из цистеина, аланина и серина.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, содержащую:

а) аминокислотную последовательность, которая в остальном такая же, как SEQ ID NO: 2, но которая содержит цистеин в положении 354 (SEQ ID NO: 4); в одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ соответствует SEQ ID NO: 3; или

б) аминокислотную последовательность, которая в остальном является последовательностью варианта β -галактозидазы, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 (вариант β -галактозидазы, как определено в настоящем документе), но которая содержит цистеин в положении 354. Неограничивающие примеры β -галактозидазы^{FS} соответствуют SEQ ID NO: 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26 и 29.

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, которая получена из β -галактозидазы, имеющей последовательность SEQ ID NO: 2, путем замены аргинина на цистеин в положении 354 (R354C).

В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, которая получена из варианта β -галактозидазы, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 (вариант β -галактозидазы, как определено в настоящем документе), путем замены аргинина на цистеин в положении 354 (R354C). В одном из вариантов осуществления аллель $lacZ^{FS}$ кодирует β -галактозидазу^{FS}, которая получена из варианта β -галактозидазы, SEQ ID NO: 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 или 27, путем замены аргинина на цистеин в положении 354 (R354C).

В конкретном варианте осуществления любого из этих вариантов осуществления β -галактозидазы^{FS} имеет длину 1026 аминокислот.

Нумерация аминокислот.

В настоящем документе для характеристики β -галактозидазы используется конкретная нумерация положений аминокислотных остатков. Путем выравнивания аминокислотной последовательности белка β -галактозидазы^{FS} или варианта β -галактозидазы с белком β -галактозидазы SEQ ID NO: 2, можно присвоить номер положению аминокислотного остатка в указанной β -галактозидазе^{FS} или указанном варианте β -галактозидазы соответственно, что соответствует положению аминокислотного остатка или нумерации аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

Альтернативный способ описания нумерации аминокислот, используемый в этом документе, состоит в том, что положения аминокислот идентифицируются такими, которые "соответствуют" конкретному положению в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. Это не следует интерпретировать как означающее, что последовательности по настоящему изобретению должны включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Квалифицированный специалист легко поймет, что последовательности β -галактозидазы различаются среди различных бактериальных штаммов. Ссылка на аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 используется просто для того, чтобы сделать возможным идентификацию конкретного аминокислотного положения в любой конкретной β -галактозидазе. Такие положения аминокислот можно обычно идентифицировать с помощью программ выравнивания последовательностей, использование которых хорошо известно в данной области.

Полинуклеотид по изобретению.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему или состоящему из аллеля $lacZ^{FS}$, кодирующего β -галактозидазу^{FS} по изобретению. В одном из вариантов осуществления полинуклеотид представляет собой аллель $lacZ^{FS}$ [кодирующий β -галактозидазу^{FS}] по настоящему

изобретению. В одном из вариантов осуществления полинуклеотид по изобретению кодирует β -галактозидазу^{FS}, как определено в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления размер полинуклеотида по изобретению составляет по меньшей мере 3063 нуклеотида, по меньшей мере 3066 нуклеотидов, по меньшей мере 3069 нуклеотидов, по меньшей мере 3072 нуклеотида, по меньшей мере 3075 нуклеотидов, по меньшей мере 3078 нуклеотидов или по меньшей мере 3081 нуклеотид. В одном из вариантов осуществления размер полинуклеотида по изобретению составляет менее 5 т.п.н. или менее 4 т.п.н. В одном из вариантов осуществления размер полинуклеотида находится в диапазоне от минимального размера, выбранного из группы, состоящей по меньшей мере из 3063 нуклеотидов, по меньшей мере 3066 нуклеотидов, по меньшей мере 3069 нуклеотидов, по меньшей мере 3072 нуклеотидов, по меньшей мере 3075 нуклеотидов, по меньшей мере 3078 нуклеотидов или по меньшей мере 3081 нуклеотид до максимального размера, выбранного из группы, состоящей из 4 и 5 т.п.н. В одном из вариантов осуществления размер полинуклеотида составляет 3078 или 3081 нуклеотид.

В одном из вариантов осуществления полинуклеотид по изобретению состоит из аллеля lacZ^{FS}, как определено в настоящем документе, независимо фланкированного с одной стороны (в 5' и 3') или с обеих сторон нуклеотидной области в диапазоне от 500 п.н. до 1 т.п.н.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему или состоящему из части по меньшей мере 100 нуклеотидов полинуклеотида, кодирующего β -галактозидазу^{FS}, как определено в настоящем документе, где указанная нуклеотидная часть охватывает кодон, соответствующий остатку 354 указанной β -галактозидазы^{FS}. Выражение "кодон, соответствующий остатку 354 указанной β -галактозидазы^{FS}" означает кодон 354 аллеля lacZ^{FS}, как определено в настоящем документе, где указанный кодон соответствует остатку 354 β -галактозидазы^{FS}, где для нумерации используется аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 2. Положение кодона 354 аллеля lacZ^{FS} и положение остатка 354 β -галактозидазы^{FS} может быть легко определено специалистом в данной области путем выравнивания части по меньшей мере из 100 нуклеотидов или пептида β -галактозидазы, кодируемого этой частью по меньшей мере из 100 нуклеотидов с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, соответственно. В одном из вариантов осуществления полинуклеотид включает часть полинуклеотида, состоящую из аллеля lacZ^{FS}, где указанная нуклеотидная часть включает кодон, соответствующий остатку 354 кодируемой β -галактозидазы^{FS}.

В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть содержит или состоит по меньшей мере из 100 последовательных нуклеотидов полинуклеотида, содержащего или состоящего из аллеля lacZ^{FS}, как определено в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть содержит или состоит по меньшей мере из 200 последовательных нуклеотидов полинуклеотида, содержащего или состоящего из аллеля lacZ^{FS}. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть содержит или состоит по меньшей мере из 300 последовательных нуклеотидов полинуклеотида, содержащего или состоящего из аллеля lacZ^{FS}. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть содержит или состоит по меньшей мере из 400 последовательных нуклеотидов полинуклеотида, содержащего или состоящего из аллеля lacZ^{FS}. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть содержит или состоит по меньшей мере, 500 последовательных нуклеотидов полинуклеотида, содержащего или состоящего из аллеля lacZ^{FS}. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть содержит или состоит по меньшей мере из 1000 последовательных нуклеотидов полинуклеотида, содержащего или состоящего из аллеля lacZ^{FS}. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть содержит или состоит по меньшей мере из 1500 последовательных нуклеотидов полинуклеотида, содержащего или состоящего из аллеля lacZ^{FS}. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть содержит или состоит по меньшей мере из 2000 последовательных нуклеотидов полинуклеотида, содержащего или состоящего из аллеля lacZ^{FS}.

В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть, охватывающая кодон, соответствующий остатку 354 указанной β -галактозидазы^{FS}, содержит или состоит по меньшей мере из 100 нуклеотидов полинуклеотида, кодирующего β -галактозидазу^{FS}, где остаток, соответствующий остатку 354, не является аргинином. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть, охватывающая кодон, соответствующий остатку 354 указанной β -галактозидазы^{FS}, содержит или состоит по меньшей мере из 100 нуклеотидов полинуклеотида, кодирующего β -галактозидазу^{FS}, где остаток, соответствующий остатку 354, не является аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из аргинина, гистидина, глутамина и лизина. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть, охватывающая кодон, соответствующий остатку 354 указанной β -галактозидазы^{FS}, содержит или состоит по меньшей мере из 100 нуклеотидов полинуклеотида, кодирующего β -галактозидазу^{FS}, где остаток, соответствующий остатку 354, не является аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из аргинина, гистидина, глутамина, лизина, глутаминовой кислоты и аспарагина. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть, охватывающая кодон, соответствующий остатку 354 указанной β -галактозидазы^{FS}, содержит или состоит по меньшей мере из 100 нуклеотидов полинуклеотида, кодирующего β -галактозидазу^{FS}, где остаток, соответствующий остатку 354 представляет собой цистеин или его эквивалентную аминокислоту. В одном из вариантов осуществления нуклеотидная часть, охватывающая кодон, соответствующий остатку 354 указанной β -галактозидазы^{FS}, содержит или состоит по меньшей мере

леотида, кодирующего β -галактозидазу^{FS}, который получен из варианта β -галактозидазы, имеющего по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 (вариант β -галактозидазы, как определено в настоящем документе), посредством замены аргинина цистеином в положении 354 (R354C). В одном варианте осуществления нуклеотидная часть, охватывающая кодон, соответствующий остатку 354 указанной β -галактозидазы^{FS}, содержит или состоит по меньшей мере из 100 нуклеотидов полинуклеотида, кодирующего β -галактозидазу^{FS}, который получен из варианта β -галактозидазы, как определено в SEQ ID NO: 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 или 27, путем замены аргинина на цистеин в положении 354 (R354C).

Обычно полинуклеотид, охваченный объемом настоящего изобретения, получают с использованием методов рекомбинантной ДНК (т. е. рекомбинантной ДНК), как описано в настоящем документе. Однако в альтернативном варианте осуществления изобретения полинуклеотид может быть синтезирован, полностью или частично, с использованием химических методов, хорошо известных в данной области (см. Caruthers M.H. et al., (1980), Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 215-23 и Horn T. et al., (1980), Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 225-232).

Полинуклеотид, кодирующий белок lacZ^{FS}, как определено в настоящем описании, может быть идентифицирован и/или выделен, и/или очищен из любой молочнокислой бактерии. В данной области хорошо известны различные методы идентификации и/или выделения и/или очистки полинуклеотидов.

В качестве примера, методы амплификации ПЦР для получения большего количества копий полинуклеотида могут быть использованы после того, как подходящий полинуклеотид был идентифицирован и/или выделен и/или очищен.

В качестве дополнительного примера библиотека геномной ДНК может быть сконструирована с использованием хромосомной ДНК из молочнокислых бактерий, продуцирующих β -галактозидазу^{FS}. На основе последовательности β -галактозидазы^{FS} можно синтезировать олигонуклеотидные зонды и использовать их для идентификации клонов, кодирующих белок, из геномной библиотеки, полученной из молочнокислых бактерий.

Альтернативно, полинуклеотид по изобретению может быть получен синтетически известными стандартными методами, например фосфорамидитным методом, описанным Weisage S.L. et al., 1981, Tetrahedron Letters, 22:1859-1869, или способом, описанным Matthes et al., 1984, EMBO J., 3:801-805. В фосфоамидитном методе синтезируются олигонуклеотиды, например, в автоматическом синтезаторе, ДНК очищают, отжигают, лигируют и клонируют в соответствующих векторах.

Полинуклеотид может быть получен полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с использованием конкретных праймеров, например, как описано в патенте США 4683202 или в Saiki R.K. et al., 1988, Science, 239:487-491.

Полинуклеотид и нуклеиновые кислоты, охваченные настоящим изобретением, могут быть выделены или по существу очищены. Под "выделенным" или "по существу очищенным" подразумевается, что полинуклеотиды по существу не содержат компонентов, обычно встречающихся в ассоциации с полинуклеотидом в его естественном состоянии. Такие компоненты включают другой клеточный материал, культуральную среду, полученную в результате рекомбинантного производства, и различные химические вещества, используемые при химическом синтезе нуклеиновых кислот.

"Выделенный" полинуклеотид или нуклеиновая кислота обычно не содержит последовательностей нуклеиновых кислот, фланкирующих интересующую нуклеиновую кислоту в геномной ДНК организма, из которого была получена нуклеиновая кислота (например, кодирующие последовательности, присутствующие на 5'- или 3'-концах). Однако молекула может включать некоторые дополнительные основания или фрагменты, которые не влияют отрицательно на основные характеристики композиции.

Вектор.

Изобретение также относится к вектору, содержащему полинуклеотид по изобретению. В одном варианте осуществления этот вектор представляет собой плазмиду.

В одном из вариантов осуществления вектор содержит один или более генов маркеров селекции, таких как ген, придающий устойчивость к антибиотикам, например устойчивость к ампициллину, канамицину, хлорамфениколу или тетрациклину. В одном варианте осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность, позволяющую вектору реплицироваться в рассматриваемой клетке-хозяине. Примерами таких последовательностей являются точки начала репликации плазмид pUC19, pACYC177, pUB10, pE194, pAMB1 и pIJ702.

Вектор по изобретению можно использовать для конструирования молочнокислых бактерий по изобретению.

Штамм *Streptococcus thermophilus*, содержащий полинуклеотид по изобретению.

Изобретение относится к штамму *Streptococcus thermophilus*, содержащему полинуклеотид, содержащий или состоящий из аллеля lacZ^{FS} [кодирующего β -галактозидазу^{FS}] по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* содержит аллель lacZ^{FS} [кодирующий β -галактозидазу^{FS}] по настоящему изобретению.

Во избежание сомнений, вид *Streptococcus thermophilus* следует понимать как штамм *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

В одном варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению

представляет собой галактоза-отрицательный штамм *Streptococcus thermophilus*. Под выражением "галактоза-отрицательный" подразумевается штамм *Streptococcus thermophilus*, который не способен расти на галактозе как единственном источнике углеводов, в частности на среде М17 с добавлением 2% галактозы. В конкретном варианте осуществления изобретения "галактоза-отрицательный" фенотип анализируют путем инокуляции в бульон М17, содержащий 2% галактозы - ночной культуры штамма *S. thermophilus*, который подлежит тестированию, при 1% и инкубируют в течение 20 ч при 37°C, и где рН 6 или выше в конце инкубации указывает на галактоза-отрицательный фенотип.

Как описано в настоящем документе, "содержащий полинуклеотид, содержащий или состоящий из аллеля $lacZ^{FS}$ ", или "содержащий аллель $lacZ^{FS}$ " означает, что единственный аллель гена $lacZ$, содержащийся в геноме штамма *Streptococcus thermophilus*, представляет собой аллель $lacZ^{FS}$. В одном из вариантов осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению содержит в качестве единственного аллеля его гена $lacZ$ полинуклеотид, содержащий или состоящий из аллеля $lacZ^{FS}$ по настоящему изобретению. Не предполагается, что штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению содержит несколько аллелей гена $lacZ$.

Такой штамм *Streptococcus thermophilus* может быть создан с помощью:

а) замены аллеля его гена $lacZ$ полинуклеотидом, содержащим или состоящим из аллеля $lacZ^{FS}$ по изобретению; или

б) замены части аллеля его гена $lacZ$ на соответствующий полинуклеотид, содержащий или состоящий из части по меньшей мере 100 нуклеотидов полинуклеотида, кодирующего β -галактозидазу^{FS}, как определено в настоящем документе, где указанная нуклеотидная часть включает кодон, соответствующий остатку 354 указанной β -галактозидазы^{FS}. Под "соответствующим полинуклеотидом" подразумевается такая же часть аллеля $lacZ$, охватывающая кодон, соответствующий остатку 354 указанной β -галактозидазы^{FS}.

Замена может быть выполнена с использованием обычных методов, как определено в настоящем документе.

В одном варианте осуществления *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению (содержащий аллель $lacZ^{FS}$) дополнительно характеризуется своей способностью при тестировании с помощью анализа С приводить к скорости подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 по меньшей мере -0,005 Ед.рН/мин. В одном варианте осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,006 Ед.рН/мин. В одном варианте осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,007 Ед.рН/мин. В одном варианте осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,008 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,009 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,01 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,02 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,03 Ед.рН/мин. В одном варианте осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,04 Ед.рН/мин. рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,05 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 выбирается из группы, состоящей по меньшей мере из -0,005, -0,006, -0,007, -0,008, -0,009, -0,01, -0,02, -0,03, -0,04 и -0,05 Ед.рН/мин.

Анализ С (кинетика подкисления в молоке).

Полуобезжиренное молоко УНТ "Le Petit Vendéen" ("йогуртовое молоко"), содержащее 3% (мас./об.) сухого молока (ВВА, Lactalis), предварительно пастеризованное в течение 10 мин при 90°C, инокулируется до 1% (об./об., примерно 10^7 КОЕ/мл) культурой штамма *S. thermophilus* для анализа (ресуспендированные клетки, не содержащие М17, из ночной культуры, выращенные в М17 с добавлением 3% сахарозы). Колбы с инокулированным молоком статически инкубируют на водяной бане при 43°C (начало эксперимента по ферментации) в течение 24 ч для получения ферментированного молока. Подкисляющие свойства штаммов *S. thermophilus* оценивали путем регистрации значения рН с течением времени во время ферментации молока. За рН следили в течение 24 ч с помощью системы CINAC (Alliance Instruments, Франция; рН-электрод Mettler 405 DPAS SC, Толедо, Испания), как описано ранее. РН измеряли и регистрировали каждые 5 мин. С помощью программного обеспечения CINAC v2.07 были вычислены следующие дескрипторы:

скорость изменения рН в диапазоне рН 6 и 5,3 (Ед.рН/мин) [скорость рН6-5,3];

время, соответствующее V_{max} (где V_{max} - максимальная скорость, полученная во время эксперимента по ферментации; T_{Vmax}), время (в минутах), рассчитанное с момента начала эксперимента по ферментации;

pH_{STOP} соответствует значению рН при V_0 , причем V_0 соответствует скорости, которая окончательно становится не детектируемой, т.е. ниже 0,1 мЕд.рН/мин (0,0001 Ед.рН/мин); "окончательно становится" означает, что скорость остается менее 0,1 мЕд.рН/мин в течение оставшегося времени анализа С (т.е. до 24 ч при температуре ферментации); и

время, соответствующее pH_{STOP} ($Tr_{pH_{STOP}}$) [т.е. время, соответствующее V_0 , рассчитанное с момента

начала эксперимента по ферментации].

В одном варианте осуществления вместе со скоростью подкисления, определенной с помощью анализа C, или независимо от него, *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению (содержащий аллель *lacZ^{FS}*) дополнительно характеризуется своими текстурирующими свойствами. Таким образом, *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению может быть охарактеризован значением напряжения сдвига, которое он создает при использовании для получения ферментированного молока, как определено в анализе D (т.е. при скорости сдвига 350 с^{-1}).

В одном варианте осуществления значение напряжения сдвига, возникающего в ферментированном молоке, полученном с использованием *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению, как определено в анализе D, составляет по меньшей мере 60, по меньшей мере 120, по меньшей мере 180 или по меньшей мере 240 Па. В одном варианте осуществления величина напряжения сдвига, создаваемого в ферментированном молоке, полученном с помощью *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению, как определено в анализе D, составляет менее 60, менее 120, менее 180 или менее 240 Па. В одном варианте осуществления величина напряжения сдвига, возникающая в ферментированном молоке, полученном с использованием *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению, как определено в анализе D, составляет как по меньшей мере 60, или по меньшей мере 120, так и менее 180 или менее 240 Па.

В одном варианте осуществления значение напряжения сдвига, создаваемое в ферментированном молоке, полученном с помощью *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению, как определено в анализе D, находится в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из 0-59 Па, 60-119 Па, 120-179 Па, 180-239 Па и 240-300 Па.

Для сравнения, значение напряжения сдвига, созданное в ферментированном молоке, полученном с использованием штамма DGCC715 (DSM33036), было определено с помощью анализа D, и было показано, что оно находится в диапазоне 0-59 Па. В качестве другой ссылки, значение напряжения сдвига, созданное в ферментированном молоке, полученном с использованием штамма DGCC7710 (депонированного как DSM28255), было определено с помощью анализа D, и было показано, что оно находится в диапазоне 120-179 Па, более конкретно, примерно 150 ± 15 Па. Штамм *Streptococcus thermophilus* DGCC7710 был депонирован Danisco Deutschland GmbH в соответствии с Будапештским соглашением в Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 14 января 2014 г. и получил номер доступа DSM28255. Настоящим мы подтверждаем, что депонент, Danisco Deutschland GmbH (Busch-Johannsen-Strasse 1, D-25899 Niebüll, Германия) разрешил заявителю (DuPont Nutrition Biosciences ApS) ссылаться на депонированный биологический материал в настоящем документе. Заявитель просит, чтобы образец депонированного микроорганизма, указанного в настоящем документе, мог быть предоставлен только эксперту до даты выдачи патента.

Анализ D.

Приготовление инокулята штамма: 1,8 мл исходной культуры, консервированной при -80°C , инокулируют в 100 мл среды производственной закваски в 250-миллилитровой колбе и инкубируют в течение 18 ч при 37°C . Среду производственной закваски получают путем добавления в воду 10% сухого обезжиренного молока (BBA Lactalis) и перемешивания в течение 30 мин при комнатной температуре; затем среду подвергают термообработке в течение 20 мин при 120°C .

Приготовление молока: смешивают 93% (мас./мас.) коммерческого свежего молока [Candia, lait frais de montagne Grand Lait entier: 3,6% жира, 3,2% белка] и 7% (мас./мас.) сахарозы; смесь подвергают термообработке при 90°C в течение 10 мин на водяной бане. Непосредственно перед инокуляцией штамма добавляют 1 г/100 л (мас./об.) формиата натрия.

Ферментация: инокулят штамма добавляют в молоко в количестве 1% (об./об.), а инокулированное молоко выливают в 125 мл йогуртовый горшок и инкубируют при 43°C до достижения pH 4,6 (pH отслеживается с помощью системы CINAC.; Alliance Instruments, Франция; pH-электрод Mettler 405 DPAS SC, Толедо, Испания). Затем ферментированное молоко медленно охлаждают в хорошо вентилируемом инкубаторе до 6°C . Образцы хранят 7 дней при 6°C .

Перед определением напряжения сдвига образцы доводят до 8°C и перемешивают 5 раз/5 с (1 поворот = 1 с) с помощью ложки. Непосредственно перед измерением дают время покоя 5 мин (время уравновешивания). Напряжение сдвига образца оценивают с помощью реометра (MCR Modular Compact Rheometer тип 302, Anton Paar GmbH, Германия), оснащенного коаксиальной измерительной системой CC27 (Standard DIN 53019 и ISO 3219) и системой Пельтье C-PTD200-SN81154777. Вискозиметрический тест проводят с изменением скорости сдвига от $0,1$ до 350 с^{-1} в 31 точке и от 350 с^{-1} до $0,1 \text{ с}^{-1}$ в 31 точке. Напряжение сдвига постоянно регистрируют. Используют настройки длительности точки измерения логарифмической переменной, при этом начальное значение восходящей кривой установлено на 10 с, а конечное значение - на 3 с, а начальное значение нисходящей кривой установлено на 3 с, а конечное значение - на 10 с. Значение напряжения сдвига при 350 с^{-1} на восходящей кривой выбрано для характеристики текстурирующих свойств штамма *S. Thermophilus* по настоящему изобретению.

Авторы изобретения показали, что штаммы *Streptococcus thermophilus*, содержащие аллель *lacZ^{FS}* по настоящему изобретению, можно использовать не только для ферментации молока с приемлемым промышленным временем, но также для получения ферментированного молока, которое не подвергается

последующему подкислению при температуре ферментации. Авторы изобретения точно показали, что эти штаммы *Streptococcus thermophilus* (содержащие аллель $lacZ^{FS}$ по изобретению) могут быть определены как отношением $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$, как определено в настоящем описании, так и отношением $LacSpH6$ к $LacZ_{pH6}$, как определено в настоящем описании для этого штамма. Действительно, отношение $LacSpH6$ к $LacZ_{pH6}$ представляет способность штамма по изобретению утилизировать лактозу и, таким образом, подкислять молоко (производство молочной кислоты) в начале производственного процесса до целевого значения pH, тогда как отношение $LacS_{pH4,5}$ к $LacZ_{pH4,5}$ представляет способность этого же штамма менее эффективно утилизировать лактозу и, таким образом, не производить молочную кислоту при достижении целевого значения pH. Таким образом, авторы изобретения показали, что описанная в настоящем документе формула (I) может быть использована для характеристики штаммов, проявляющих кинетику подкисления в молоке без последующего подкисления. В одном варианте осуществления *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению (содержащий аллель $lacZ^{FS}$) дополнительно характеризуется разницей в эффективности гидролиза импортируемой лактозы (ErH6-ErH4,5), которая составляет менее -0,5, рассчитанной по следующей формуле (I):

$$(I) \Delta EH = \ln \left[\frac{LacS_{pH6}}{LacZ_{pH6}} \right] - \ln \left[\frac{LacS_{pH4,5}}{LacZ_{pH4,5}} \right],$$

в которой $LacSpH6$ и $LacS_{pH4,5}$ представляют активность пермеазы $LacS$ для импорта лактозы, рассчитанную с помощью анализа А при pH 6 и 4,5 соответственно, а $LacZ_{pH6}$ и $LacZ_{pH4,5}$ представляют активность бета-галактозидазы для гидролиза лактозы, рассчитанную с помощью анализа В при pH 6 и 4,5 соответственно.

Таким образом, значение ΔEH , как определено в настоящем описании, менее -0,5 означает, что эффективность гидролиза импортируемой лактозы при pH 4,5 (ErH4,5) [(т.е. импорт лактозы в бактерии пермеазой $LacS$ с последующим гидролизом лактозы бета-галактозидазой)] значительно снижается по сравнению с таковой при pH 6 (ErH6). В одном варианте осуществления *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению (включающий аллель $lacZ^{FS}$) характеризуется ΔEH [вычисленным по формуле (I)], который выбран из группы, состоящей из менее -0,6, менее -0,7, менее -0,8, менее -0,9, менее -1, менее -1,1, менее -1,2, менее -1,3, менее -1,4 и менее -1,5.

Напротив, значение ΔEH , которое составляет чуть больше 0, около 0 или чуть меньше 0, означает, что эффективность гидролиза импортируемой лактозы столь же эффективна при pH 4,5, как и при pH 6. Такое ΔEH характерно для штаммов *Streptococcus thermophilus*, которые при использовании для ферментации молока приводят к последующему подкислению ферментированного молока.

Также частью изобретения является то, что штамм *Streptococcus thermophilus*, определенный в настоящем описании (содержащий аллель $lacZ^{FS}$ по изобретению), дополнительно характеризуется своей способностью ферментировать молоко с приемлемым промышленным временем, после чего получают ферментированное молоко, которое не подвергается последующему подкислению при температуре ферментации. Эта способность определяется в настоящем описании как фенотип "full-STOP" и может быть определена с помощью анализа С, как определено в настоящем описании.

Таким образом, фенотип full-STOP характеризуется тем, что, когда штамм по настоящему изобретению инокулируют в молочный субстрат и ферментируют в соответствии с анализом С, молоко ферментируется таким образом, что pH ферментированного молока останавливается между 4 и 4,8 (pH_{STOP}), и время между T_{Vmax} и TrH_{STOP} составляет менее 600 мин. В одном из вариантов осуществления время между T_{Vmax} и TrH_{STOP} составляет менее 550 мин. В одном из вариантов осуществления время между T_{Vmax} и TrH_{STOP} составляет менее 500 мин.

В одном из вариантов осуществления, индивидуально или в комбинации со временем между V_{max} и V_0 , pH_{STOP} , полученное с использованием штамма по изобретению с помощью анализа С, составляет от 4 до 4,6. В одном варианте осуществления pH_{STOP} , полученное с использованием штамма по изобретению с помощью анализа С, составляет от 4 до 4,5. В одном варианте осуществления pH_{STOP} , полученное с использованием штамма по изобретению с помощью анализа С, составляет от 4 до 4,4.

В одном варианте осуществления фенотип full-STOP характеризуется тем фактом, что, когда штамм по изобретению инокулируют в молочный субстрат и ферментируют в соответствии с анализом С, молоко ферментируется таким образом, что pH ферментированного молока останавливается в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из 4-4,8, 4-4,6, 4-4,5 и 4-4,4, а время между T_{Vmax} и TrH_{STOP} выбирают из группы, состоящей из менее 600 мин, менее 550 мин и менее 500 мин.

Таким образом, после очень быстрой остановки pH ферментированный молочный продукт может храниться при температуре ферментации, составляющей по меньшей мере 24 ч без снижения pH ферментированного продукта (что дает высокую гибкость в производственном процессе).

В конкретном варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению, как определено в настоящем документе, несет в качестве своего гена $lacZ$ аллель $lacZ^{FS}$, кодирующий β -галактозидазу^{FS}, SEQ ID NO: 4, в частности аллель $lacZ^{FS}$, SEQ ID NO: 3.

В конкретном варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению, как определено в настоящем документе, несет в качестве своего гена $lacZ$ аллель $lacZ^{FS}$, кодирую-

щий β -галактозидазу^{FS}, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2, но которая содержит цистеин в положении 354.

В конкретном варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению, как определено в настоящем документе, несет в качестве своего гена *lacZ* аллель *lacZ*^{FS}, кодирующий β -галактозидазу^{FS}, аминокислотная последовательность которой в остальных случаях является последовательностью варианта β -галактозидазы, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2 (вариант β -галактозидазы, как определено в настоящем документе), но которая содержит цистеин в положении 354. В конкретном варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению несет в качестве гена *lacZ* аллель *lacZ*^{FS}, кодирующий β -галактозидазу^{FS}, как определено в SEQ ID NO: 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26 или 29.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к штамму *Streptococcus thermophilus*, соответствующему штамму *Streptococcus thermophilus* DGCC7984, ген *lacZ* которого заменен аллелем *lacZ*^{FS}, кодирующим β -галактозидазу^{FS}, SEQ ID NO: 4, в частности аллелем *lacZ*^{FS}, SEQ ID NO: 3. Штамм *Streptococcus thermophilus* DGCC7984 был депонирован Danisco Deutschland GmbH в соответствии с Бундеспатентным соглашением в Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig) 14 января 2014 г. и получил номер доступа DSM28257. Настоящим подтверждаем, что депонент, Danisco Deutschland GmbH (Busch-Johannsen-Strasse 1, D-25899 Niebüll, Германия) разрешил заявителю (DuPont Nutrition Biosciences ApS) ссылаться на депонированный биологический материал в настоящем документе. Заявитель просит, чтобы образец депонированного микроорганизма, указанного в настоящем документе, мог быть предоставлен только эксперту до даты выдачи патента. Выражение "штамм DGCC7984" используется как синоним выражения "штамм DSM28257".

Применение и способы на основе полинуклеотида или вектора по изобретению.

В одном варианте осуществления изобретение относится к применению полинуклеотида или вектора по изобретению для получения штамма *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP при использовании для ферментации молока с помощью анализа С.

Таким образом, полинуклеотид или вектор используют так, чтобы полученный штамм *Streptococcus thermophilus* содержал аллель *lacZ*^{FS} в качестве единственного гена *lacZ* в своем геноме. В одном варианте осуществления полинуклеотид или вектор используют так, что аллель гена *lacZ* или его часть штамма *Streptococcus thermophilus* заменяют полинуклеотидом по изобретению; замена может быть выполнена с использованием стандартных методов, как определено в настоящем документе.

В одном аспекте изобретение относится к способу получения штамма *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP, включающему:

а) получение штамма *Streptococcus thermophilus*, имеющего отношение активности пермеазы LacS для импорта лактозы, рассчитанной с помощью анализа А при pH 4,5, к активности бета-галактозидазы для гидролиза лактозы, рассчитанной с помощью анализа В при pH 4,5 ($LacS_{pH4,5}$ по сравнению с $LacZ_{pH4,5}$), менее 5;

б) замену гена *lacZ* указанного штамма *Streptococcus thermophilus* на полинуклеотид (содержащий или состоящий из аллеля *lacZ*^{FS}) по настоящему изобретению; и

с) выделение штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP при использовании для ферментации молока с помощью анализа С.

В одном варианте осуществления стадия б) состоит в замене гена *lacZ* указанного штамма *Streptococcus thermophilus* на полинуклеотид, состоящий из аллеля *lacZ*^{FS} по настоящему изобретению.

В одном аспекте изобретение относится к способу получения штамма *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP, включающему:

а) получение штамма *Streptococcus thermophilus*, имеющего отношение активности пермеазы LacS для импорта лактозы, рассчитанной с помощью анализа А при pH 4,5, к активности бета-галактозидазы для гидролиза лактозы, рассчитанной с помощью анализа В при pH 4,5 ($LacS_{pH4,5}$ по сравнению с $LacZ_{pH4,5}$), менее 5;

б) замену части гена *lacZ* указанного штамма *Streptococcus thermophilus* на соответствующий полинуклеотид, содержащий или состоящий из части по меньшей мере 100 нуклеотидов полинуклеотида, кодирующего β -галактозидазу^{FS}, как определено в настоящем документе, причем указанная нуклеотидная часть включает кодон, соответствующий остатку 354 указанной β -галактозидазы^{FS}. Под "соответствующим полинуклеотидом" подразумевается такая же часть аллеля *lacZ*, охватывающая кодон, соответствующий остатку 354 указанной β -галактозидазы^{FS}; и

с) выделение штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP при использовании для ферментации молока с помощью анализа С.

В одном аспекте изобретение относится к способу получения штамма *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP, включающему:

а) получение штамма *Streptococcus thermophilus*, имеющего отношение активности пермеазы LacS для импорта лактозы, рассчитанной с помощью анализа А при pH 4,5, к активности бета-галактозидазы для гидролиза лактозы, рассчитанной с помощью анализа В при pH 4,5 ($LacS_{pH4,5}$ по сравнению с

LacZ_{pH4,5}), менее 5;

b) модификацию гена lacZ указанного штамма *Streptococcus thermophilus*, чтобы он имел ту же последовательность, что и аллель lacZ^{FS} по изобретению; и

c) выделение молочного штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP при использовании для ферментации молока с помощью анализа С.

В одном из вариантов осуществления любой из описанных в настоящем документе способов получения штамма *Streptococcus thermophilus* с фенотипом full-STOP реализуется на среде, содержащей лактозу в качестве единственного источника углеводов.

В рамках применения или способов по изобретению отношение LacS_{pH4,5} к LacZ_{pH4,5} определяется, как описано в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* стадии а) имеет отношение LacS_{pH4,5} к LacZ_{pH4,5}, которое составляет менее 5. В одном из вариантов осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* стадии а) имеет отношение LacS_{pH4,5} к LacZ_{pH4,5}, которое составляет менее 4. В одном из вариантов осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* стадии а) имеет отношение LacS_{pH4,5} к LacZ_{pH4,5}, которое составляет менее 3.

В одном варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* на стадии а) дополнительно характеризуется своей способностью при тестировании с помощью анализа С приводить к скорости подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 по меньшей мере -0,005 Ед.рН/мин. В одном варианте осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,006 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,009 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,008 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,009 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,01 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,02 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,03 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,04 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления скорость подкисления в диапазоне рН 6 и 5,3 составляет по меньшей мере -0,05 Ед.рН/мин. В одном из вариантов осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* стадии а) дополнительно характеризуется своей способностью при тестировании с помощью анализа С приводить к скорости подкисления от рН 6 до 4,5, которая выбрана из группы, состоящей по меньшей мере из -0,005, -0,006, -0,007, -0,008, -0,009, -0,01, -0,02, -0,03, -0,04 и -0,05 Ед.рН/мин.

В дополнительном аспекте изобретение относится к штамму *Streptococcus thermophilus*, полученному с помощью применения или способа по настоящему изобретению.

Еще в одном дополнительном аспекте изобретение относится к штамму *Streptococcus thermophilus* по изобретению, полученному способом по изобретению.

Бактериальная композиция.

Изобретение также относится к бактериальной композиции, содержащей или состоящей по меньшей мере из одного, предпочтительно одного, штамма *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления бактериальная композиция представляет собой чистую культуру, т. е. содержит или состоит из одного штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению. В другом варианте осуществления бактериальная композиция представляет собой смешанную культуру, т.е. содержит или состоит из штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению и по меньшей мере одного другого микроорганизма, в частности по меньшей мере одного другого бактериального штамма. В одном варианте осуществления бактериальная композиция представляет собой чистую культуру, т.е. содержит или состоит из одного штамма *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления бактериальная композиция представляет собой смешанную культуру, т. е. содержит или состоит из штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению и по меньшей мере одного другого бактериального штамма. Под "по меньшей мере" одним другим штаммом бактерий подразумевается 1 или более, в частности 1, 2, 3, 4 или 5, штаммов.

В варианте осуществления любой бактериальной композиции, определенной в данном документе, либо в виде чистой, либо в виде смешанной культуры, бактериальная композиция дополнительно содержит приемлемый для пищевых продуктов компонент, такой как сахар (сахароза, трегалоза), мальтодекстрин или минералы. В конкретном варианте осуществления бактериальная композиция, определенная в настоящем документе, не содержит лактозу.

В одном варианте осуществления бактериальная композиция по изобретению содержит или состоит из штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению и одной или более дополнительных молочнокислых бактерий видов, выбранных из группы, состоящей из *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, включая *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* и *Oenococcus* или любой их комбинации. Виды *Lactococcus* включают *Lactococcus lactis*, в том числе *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Виды *Bifidobacterium* включают *Bifidobacterium animalis*, в частности *Bifidobacterium*

animalis subsp. lactis. Другие виды молочнокислых бактерий включают *Leuconostoc* sp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Lactobacillus helveticus*.

В одном варианте осуществления бактериальная композиция содержит или состоит из штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению и по меньшей мере одного штамма *Streptococcus thermophilus*, отличного от штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению и/или по меньшей мере одного штамма вида *Lactobacillus* и/или любой их комбинации. В конкретном варианте осуществления бактериальная композиция содержит или состоит из штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению, одного или более штамма (штаммов) вида *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и/или одного или более штаммов вида *Lactobacillus helveticus* и/или любой их комбинации и, необязательно, по меньшей мере одного штамма *Streptococcus thermophilus*, отличного от штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению. В конкретном варианте осуществления бактериальная композиция содержит или состоит из штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению, по меньшей мере одного штамма вида *Streptococcus thermophilus*, отличного от штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению, и штамма вида *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. В другом конкретном варианте осуществления бактериальная композиция содержит или состоит из штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению и штамма вида *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

В одном варианте осуществления бактериальная композиция содержит или состоит из штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* и/или *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

В конкретном варианте осуществления любой бактериальной композиции, определенной в настоящем документе, в виде чистой или смешанной культуры, бактериальная композиция дополнительно содержит по меньшей мере один пробиотический штамм, такой как *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* или *Lactobacillus casei*.

В конкретном варианте осуществления бактериальная композиция, как чистая, так и смешанная культура, как определено выше, находится в замороженном, высушенном, лиофилизированном, жидком или твердом формате, в форме гранул или замороженных гранул, или в виде порошка или высушенного порошка. В конкретном варианте осуществления бактериальная композиция по изобретению находится в замороженном виде или в форме гранул или замороженных гранул, в частности, содержащихся в одной или более коробках или саше. В другом варианте осуществления бактериальная композиция, как определено в настоящем описании, находится в форме порошка, такого как высушенный или лиофилизированный порошок, в частности, содержащегося в одной или нескольких коробках или саше.

В конкретном варианте осуществления бактериальная композиция по изобретению либо в виде чистой культуры, либо в виде смешанной культуры, как определено выше, и в любом формате (замороженный, высушенный, лиофилизированный, жидкий или твердый формат, в форме гранул или замороженных гранул или в форме порошка, или сухого порошка) содержит штамм (штаммы) *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению в концентрации, находящейся в диапазоне 10^5 - 10^{12} КОЕ (колониеобразующих единиц) на 1 г (КОЕ/г) бактериальной композиции. В конкретном варианте осуществления концентрация штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* в бактериальной композиции по изобретению находится в диапазоне 10^7 - 10^{12} КОЕ на 1 г бактериальной композиции, в частности, по меньшей мере 10^7 , по меньшей мере 10^8 , по меньшей мере 10^9 , по меньшей мере 10^{10} или по меньшей мере 10^{11} КОЕ/г бактериальной композиции. В конкретном варианте осуществления в форме замороженного или высушенного концентрата концентрация штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus* по изобретению - в виде чистой культуры или в виде смешанной культуры - в бактериальной композиции находится в диапазоне 10^8 - 10^{12} КОЕ/г замороженного концентрата или высушенного концентрата, а более предпочтительно по меньшей мере 10^8 , по меньшей мере 10^9 , по меньшей мере 10^{10} , по меньшей мере 10^{11} или по меньшей мере 10^{12} КОЕ/г замороженного концентрата или высушенного концентрата.

Производство продукта с использованием штамма *Streptococcus thermophilus* по изобретению.

В дополнительном аспекте предложен способ производства ферментированного продукта, включающий а) инокуляцию субстрата штаммом *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композицией по изобретению и б) ферментацию инокулированного субстрата для получения ферментированного продукта. В конкретном варианте осуществления штамм (штаммы) *Streptococcus thermophilus* по изобретению инокулируют в виде бактериальной композиции, как определено в настоящем документе, такой как чистая культура или смешанная культура. Предпочтительно субстрат представляет собой молочный субстрат, более предпочтительно молоко. Под "молочным субстратом" подразумевается молоко животного и/или растительного происхождения. В конкретном варианте осуществления молочный субстрат имеет происхождение от животных, в частности от любых млекопитающих, таких как корова, коза, овца, буйвол, зебра, лошадь, осел или верблюд и т. п. Молоко может быть в нативном состоянии, может представлять собой восстановленное молоко, обезжиренное молоко или молоко, дополненное соединениями, необходимыми для роста бактерий или для последующей обработки ферментированного молока. Предпочтительно, молочный субстрат содержит твердые вещества. Предпочтительно твердые вещества включают или состоят из фруктов, шоколадных продуктов или злаков. Предпочтительно ферментированный

продукт представляет собой ферментированный молочный продукт.

В настоящем изобретении также предложено в дополнительном аспекте использование штамма *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композиции по настоящему изобретению для производства пищевого или кормового продукта, предпочтительно ферментированного молочного продукта.

Изобретение также относится к ферментированному молочному продукту, который получают с использованием штамма (штаммов) молочнокислых бактерий или бактериальной композиции по изобретению, в частности, полученных или получаемых способом по изобретению. Таким образом, изобретение относится к ферментированному молочному продукту, содержащему штамм (штаммы) *Streptococcus thermophilus* по изобретению. В конкретном варианте осуществления ферментированный молочный пищевой продукт по изобретению представляет собой свежее ферментированное молоко.

Штамм *Streptococcus thermophilus* или бактериальная композиция по изобретению находит выгодное применение в различных молочных продуктах (в качестве конкретных вариантов осуществления способа производства ферментированного продукта, описанного в настоящем документе).

В одном аспекте штамм или бактериальная композиция *Streptococcus thermophilus* по изобретению находят применение в производстве перемешанного йогурта. Производство перемешанного йогурта включает ферментацию молочного субстрата, предварительно инокулированного штаммом *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композицией по изобретению, необязательно хранение перемешанного йогурта в резервуаре для хранения и, наконец, упаковку перемешанного йогурта. Этот процесс включает охлаждение перемешанного йогурта между окончанием ферментации (т.е. после достижения целевого pH) и стадией упаковки, чтобы остановить дальнейшее подкисление перемешанного йогурта, так что перемешанный йогурт упаковывают при температуре от 15 до 22°C. Поскольку эта стадия охлаждения требует времени и ресурсов (энергии), производители йогуртов стараются упаковывать перемешанный йогурт при более высокой температуре; упаковка при более высокой температуре также имеет преимущество улучшения текстуры перемешанного йогурта в упаковках (см. пример 8); однако упаковка при более высокой температуре неприемлема для производителей йогуртов с бактериальными композициями, присутствующими в настоящее время на рынке, поскольку было показано, что перемешанный йогурт слишком кислый. Штамм *Streptococcus thermophilus* или бактериальная композиция по изобретению решает эту проблему, позволяя производителям йогуртов упаковывать перемешанный йогурт при более высокой температуре, получая продукт с приемлемым pH. Это может быть достигнуто либо охлаждением перемешанного йогурта до температуры выше 22°C, либо пропуском стадии охлаждения. Таким образом, изобретение также относится к использованию штамма *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композиции по изобретению при производстве перемешанного йогурта. В конкретном варианте осуществления изобретение также относится к использованию штамма *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композиции по изобретению в производстве перемешанного йогурта, при этом стадия упаковки перемешанного йогурта выполняется при температуре, которая составляет по меньшей мере 23°C. Изобретение также относится к способу производства перемешанного йогурта, включающему (a) ферментацию молочного субстрата, в частности молока, инокулированного штаммом *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композицией по изобретению, для получения перемешанного йогурта (с pH от 4,2 до 4,7, более предпочтительно от 4,45 до 4,6), (b) охлаждение перемешанного йогурта и (c) упаковку перемешанного йогурта, при этом температура охлаждения и упаковки составляет по меньшей мере 23°C (температура охлаждения и упаковки составляет одну температуру). Под "по меньшей мере 23°C" в контексте температуры охлаждения и упаковки подразумевается по меньшей мере 24°C, по меньшей мере 25°C, по меньшей мере 26°C, по меньшей мере 27°C, по меньшей мере 28°C, по меньшей мере 29°C, по меньшей мере 30°C, по меньшей мере 31°C, по меньшей мере 32°C, по меньшей мере 33°C, по меньшей мере 34°C, по меньшей мере 35°C, по меньшей мере 36°C, по меньшей мере 37°C, по меньшей мере 38°C, по меньшей мере 39°C и по меньшей мере 40°C. В конкретном варианте осуществления температура охлаждения и упаковки равна или меньше температуры ферментации (т.е. обычно меньше 43°C). В конкретном варианте осуществления температура охлаждения и упаковки составляет по меньшей мере 2°C и равна или меньше 43°C. Как показано в примере 8, упаковка при температуре 35°C со временем дает pH, аналогичный pH перемешанного йогурта, упакованного при 20°C, в то же время улучшая текстуру перемешанного йогурта. Изобретение также относится к способу производства перемешанного йогурта, включающему (a) ферментацию молочного субстрата, в частности молока, штаммом *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композицией по изобретению для получения перемешанного йогурта (с pH от 4,2 до 4,7, более предпочтительно от 4,45 до 4,6), и (b) упаковку этого перемешанного йогурта, при этом процесс не включает стадию охлаждения между окончанием ферментации и упаковкой. В этом варианте осуществления температура охлаждения и упаковки равна температуре ферментации (т.е. обычно 42-43°C). В одном варианте осуществления способ производства перемешанного йогурта, как описано в настоящем документе, дополнительно включает перенос упаковок в холодную камеру хранения (т.е. при температуре ниже 8°C).

В другом аспекте штамм или бактериальная композиция *Streptococcus thermophilus* по изобретению находят применение в производстве термостатного йогурта. Производство термостатного йогурта включает охлаждение упаковок, содержащих термостатный йогурт, после достижения желаемого pH (с pH от

4,2 до 4,7, более предпочтительно от 4,45 до 4,6; считается окончанием ферментации), чтобы остановить дальнейшее подкисление продукта. Эта стадия охлаждения выполняется в охлаждающей камере (также называемой охлаждающей камерой или охлаждающим туннелем) перед перемещением упаковок в холодную камеру хранения (т.е. при температуре ниже 8°C). Для обычных заквасочных культур важно быстро остановить дальнейший рост после ферментации, что означает, что температура примерно 35°C должна быть достигнута в течение 30 мин после окончания ферментации и 18-20°C еще через 30-40 мин. Обычно общее время охлаждения составляет примерно 65-70 мин для небольших упаковок и примерно 80-90 мин для больших упаковок. Поскольку эта стадия охлаждения требует времени и ресурсов (энергии), производители йогуртов стремятся сократить время в охлаждающей камере; однако сокращение этого времени неприемлемо для производителей йогуртов с бактериальными композициями, присутствующими в настоящее время на рынке, поскольку было показано, что йогуртовые продукты являются слишком кислыми. Штамм *Streptococcus thermophilus* или бактериальная композиция по настоящему изобретению решает эту проблему, позволяя производителям йогуртов варьировать периодом времени для достижения температуры 18-20°C, получая продукт с приемлемым pH. В конкретном варианте осуществления изобретение относится к применению штамма *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композиции по изобретению при производстве термостатного йогурта, при этом время, необходимое для термостатного йогурта, содержащегося в упаковке, для достижения температуры 18-20°C (начиная с конца ферментации) увеличивается по сравнению со временем 65-70 мин для небольших упаковок (здесь определяется размером от 0,1 до 0,2 кг) и временем 80-90 мин для больших упаковок (здесь определяется размером от 0,4 до 0,6 кг). В конкретном варианте осуществления время, необходимое для того, чтобы термостатный йогурт, содержащийся в упаковке, достиг температуры 18-20°C, составляет по меньшей мере 100 мин, по меньшей мере 120 мин, по меньшей мере 180 мин или по меньшей мере 240 мин. Это может быть достигнуто несколькими способами, предоставляющими производителям молочных продуктов большую гибкость, например, путем обхода стадии охлаждения (т.е. обхода стадии в камере охлаждения) или путем отсрочки времени между окончанием ферментации и временем входа в режим охлаждения. Изобретение относится к способу производства термостатного йогурта, включающему а) упаковку молочного субстрата, в частности молока, инокулированного штаммом *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композицией по изобретению, в упаковки, б) ферментацию инокулированного молочного субстрата (содержится в упаковках) для получения термостатного йогурта (с pH от 4,2 до 4,7, более предпочтительно от 4,45 до 4,6), и с) обработку упаковок таким образом, чтобы время, необходимое термостатному йогурту в упаковках, чтобы достичь температуры 18-20°C, составляло по меньшей мере 100 мин, по меньшей мере 120 мин, по меньшей мере 180 мин или по меньшей мере 240 мин. В конкретном варианте осуществления способ производства термостатного йогурта, как описано в настоящем документе, дополнительно включает d) перенос упаковок в холодильную камеру хранения (т.е. при температуре ниже 8°C). В одном варианте осуществления изобретение относится к способу производства термостатного йогурта, включающему а) упаковку молочного субстрата, в частности молока, инокулированного штаммом *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композицией по изобретению, в упаковки и б) ферментацию инокулированного молочного субстрата для получения термостатного йогурта (с pH от 4,2 до 4,7, более предпочтительно от 4,45 до 4,6), где указанный процесс не включает стадию охлаждения в холодильной камере. В конкретном варианте осуществления способ производства термостатного йогурта, как описано в настоящем документе, дополнительно включает с) перенос упаковок в холодную камеру хранения (т.е. при температуре ниже 8°C). В одном варианте осуществления изобретение относится к способу производства термостатного йогурта, включающему а) упаковку молочного субстрата, в частности молока, инокулированного штаммом *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композицией по изобретению, в упаковки, б) ферментацию инокулированного молочного субстрата для получения термостатного йогурта (с pH от 4,2 до 4,7, более предпочтительно от 4,45 до 4,6), с) выдерживание термостатного йогурта в упаковках при комнатной температуре (т.е. выше 20°C) в течение по меньшей мере 30 мин, по меньшей мере 45 мин или по меньшей мере 60 мин после окончания ферментации и d) инкубацию упаковок в холодильной камере для того, чтобы термостатный йогурт, содержащийся в упаковке, достиг температуры 18-20°C.

В другом аспекте штамм или бактериальная композиция *Streptococcus thermophilus* по изобретению находит применение при хранении ферментированного молока, такого как перемешанный йогурт и термостатный йогурт. В конце процесса производства (включая упаковку и охлаждение) ферментированное молоко хранится в холодильной камере при температуре, которая обычно ниже 8°C, до момента распределения. Как показано в примере 9, йогурт, изготовленный из штамма изобретения, хранящегося при 10°C, сохраняет стабильное pH до 45 дней (под стабильным понимается изменение pH менее 0,1 единицы). Таким образом, изобретение также относится к способу производства и хранения ферментированного молока, включающему а) ферментацию молочного субстрата, в частности молока, штаммом *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композицией по изобретению для получения ферментированного молока (с pH от 4,2 до 4,7, более предпочтительно от 4,45 до 4,6); б) возможно охлаждение ферментированного молока до температуры 18-20°C и с) хранение упаковок, содержащих ферментированное молоко, причем стадия упаковки происходит либо до, либо после стадии ферментации, но перед не-

обязательной стадией охлаждения, где хранение проводят при температуре выше 8°C; в одном из вариантов осуществления хранение проводят при температуре, равной или превышающей 10°C и необязательно менее 20°C, предпочтительно менее 15°C. В конкретном варианте осуществления время хранения при температуре выше 8°C (предпочтительно при температуре равной или выше 10°C, и необязательно ниже 20°C, предпочтительно менее 15°C) составляет менее 24 ч.

Продукт.

Любой продукт, который содержит, включает или приготовлен из штамма *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композиции по изобретению, рассматривается в соответствии с настоящим изобретением.

Подходящие продукты включают, но не ограничиваются ими, пищевой или кормовой продукт.

К ним относятся, помимо прочего, фрукты, бобовые, кормовые культуры и овощи, включая производные продукты, зерно и продукты из зерна, молочные продукты и продукты, полученные из молочных продуктов, мясо, птицу и морепродукты. Предпочтительно пищевой или кормовой продукт представляет собой молочный, мясной или зерновой продукт.

Термин "пища" используется в широком смысле и включает корма, пищевые продукты, пищевые ингредиенты, пищевые добавки и функциональные пищевые продукты. В настоящем описании термин "пища" используется в широком смысле и охватывает как пищу для людей, так и пищу для животных (т.е. корм). В предпочтительном аспекте пища предназначена для потребления человеком.

Используемый в настоящем описании термин "пищевой ингредиент" включает состав, который вводится или может быть добавлен в пищевые продукты, и включает составы, которые можно использовать в низких концентрациях в широком спектре продуктов, требующих, например, подкисления или эмульгирования.

Используемый в настоящем описании термин "функциональный пищевой продукт" означает пищевой продукт, который способен обеспечивать не только питательный эффект и/или удовлетворение вкуса, но также способен оказывать дополнительный положительный эффект потребителям. Хотя нет юридического определения функционального питания, большинство сторон, заинтересованных в этой области, согласны с тем, что существуют продукты, которые продаются как имеющие определенное воздействие на здоровье.

Штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению может представлять собой пищевой ингредиент или может быть добавлен к пищевому ингредиенту, пищевой добавке или функциональному корму.

Пища может быть в форме раствора или в виде твердого вещества в зависимости от использования и/или способа применения, и/или способа введения.

Штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению можно использовать при приготовлении пищевых продуктов, таких как кондитерские изделия, молочные продукты, мясные продукты, продукты из птицы, рыбные продукты или хлебобулочные изделия.

В качестве примера штамм *Streptococcus thermophilus* можно использовать в качестве ингредиента для приготовления безалкогольных напитков, фруктового сока или напитка, содержащего сывороточный белок, чая, напитка какао, молочных напитков и напитков с молочнокислыми бактериями, йогурта, питьевого йогурта и вина.

Предпочтительно пища, описанная в настоящем документе, представляет собой молочный продукт. Более предпочтительно, описанный в настоящем документе молочный продукт представляет собой одно или более из следующих: йогурт, сыр (например, кислый творог, твердый сыр, полутвердый сыр, творог), пахта, творог, сметана, кефир, напиток на основе ферментированной сыворотки, кумыс, молочный напиток, йогуртовый напиток, ферментированное молоко, зрелые сливки, сыр, мягкий сыр низкой жирности, молоко, ретенат молочного продукта, плавленый сыр, сливочный десерт или молоко для детского питания.

Предпочтительно пища, описанная в настоящем документе, представляет собой ферментированный пищевой продукт. Более предпочтительно пища, как описано в настоящем документе, представляет собой ферментированный молочный продукт, такой как ферментированное молоко, йогурт, сливки, зрелые сливки, сыр, мягкий сыр низкой жирности, молочный напиток, плавленый сыр, сливочный десерт, творог, йогуртовый напиток, ретенат молочных продуктов или молоко для детского питания.

Предпочтительно молочный продукт по изобретению содержит молоко животного и/или растительного происхождения.

Под молоком подразумевается молоко животного происхождения, в частности любых млекопитающих, таких как корова, коза, овца, буйвол, зебра, лошадь, осел или верблюд и т.п. Термин "молоко" также применяется к тому, что обычно называется растительным молоком, т.е. к экстрактам растительного материала, который был обработан, или в ином случае, например, к бобовым растениям (соевым бобы, нут, чечевица и т.п.) или масличным семенам (рапс, соя фасоль, кунжут, хлопок и т.п.), экстракт которых содержит белки в растворе или в коллоидной суспензии, которые коагулируются химическим действием, кислотной ферментацией и/или нагреванием. Наконец, слово "молоко" также означает смеси молока животных и растительного молока.

В одном варианте осуществления термин "молоко" означает коммерческое молоко с ультрапастеризацией с добавлением 3% (мас./мас.) полуобезжиренного сухого молока, пастеризованного путем нагревания в течение 10 ± 1 мин при $90 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

В области применения молочных продуктов использование ферментированного молока, такого как йогурт, произведенный из штамма *Streptococcus thermophilus* или бактериальной композиции по изобретению, является выгодным при смешивании с теплыми ароматизаторами (такими как ароматизаторы кофе или шоколада); действительно, не только высокий pH йогурта, полученного со штаммом по настоящему изобретению, но также стабильность этого pH (отсутствие пост-подкисления) подавляют кислотное восприятие в конечном продукте и улучшают его мягкость; эти преимущества делают использование теплых ароматизаторов, таких как ароматизаторы кофе или шоколада, совместимым с производством ароматизированного йогурта. В другом варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* или бактериальная композиция по настоящему изобретению имеет преимущество при использовании для производства продуктов типа Ряженка (Восточная Европа), также называемых "коричневые йогурты" (страны Азии) (ферментация топленого молока с получением карамельных ароматических ноток); действительно, обычные заквасочные культуры, дающие кислую нотку йогурта, несовместимы с этим типом кисломолочных продуктов.

Процент идентичности β -галактозидазы.

Процент идентичности по меньшей мере 95% с SEQ ID NO: 2 означает процент идентичности, выбранный из группы, состоящей по меньшей мере из 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% и по меньшей мере 99%.

В одном варианте осуществления, хотя последовательность β -галактозидазы отличается от SEQ ID NO: 2, размер варианта β -галактозидазы такой же, как и у β -галактозидазы, SEQ ID NO: 2 (1026 аминокислотных остатков).

Сравнение последовательностей можно проводить на глаз или, чаще, с помощью легко доступных программ сравнения последовательностей. Эти коммерчески или свободно доступные компьютерные программы могут вычислять значения сходства или идентичности между двумя или более последовательностями.

Процент идентичности может быть рассчитан для выровненных непрерывных последовательностей, т. е. одна последовательность выровнена относительно другой последовательности, и каждая аминокислота в одной последовательности напрямую сравнивается с соответствующей аминокислотой в другой последовательности, по одному остатку за раз. Это называется выравниванием "без пропусков". Обычно такое выравнивание без пропусков выполняется только для относительно небольшого числа остатков.

Хотя это очень простой и последовательный метод, он не принимает во внимание, что, например, в идентичной в остальном паре последовательностей одна вставка или делеция приведет к нарушению выравнивания нижежащих аминокислотных остатков, что потенциально может привести к большому сокращению идентичности при выполнении глобального выравнивания. Следовательно, большинство методов сравнения последовательностей разработаны для получения оптимальных выравниваний, которые учитывают возможные вставки и делеции без чрезмерного снижения общей оценки идентичности. Это достигается путем вставки "пропусков" в выравнивание последовательностей, чтобы попытаться максимизировать локальную идентичность. Эти более сложные методы назначают "штрафы за пропуски" для каждого пропуска, возникающего при выравнивании, так что для одинакового количества идентичных аминокислот выравнивание последовательностей с минимально возможным количеством пропусков, отражающее более высокую степень родства между двумя сравниваемыми последовательностями, будет достигать более высокого балла, чем в случае, когда много пропусков. Обычно используются "аффинные затраты на пропуск", при которых взимается относительно высокая стоимость за существование пропуска и меньший штраф за каждый последующий остаток в пропуске (штраф за продление пропуска). Это наиболее часто используемая система оценки пропусков. Высокие штрафы за пропуски, конечно, приведут к оптимизированному выравниванию с меньшим количеством пропусков. Большинство программ выравнивания позволяют изменять штрафы за пропуски. Однако можно использовать значения по умолчанию при использовании такого программного обеспечения для сравнения последовательностей, поскольку эти значения по умолчанию были скорректированы для обеспечения соответствующих результатов в большинстве случаев. Поэтому для расчета максимального процента идентичности в первую очередь необходимо произвести оптимальное выравнивание с учетом штрафов за пропуски. Подходящей компьютерной программой для выполнения такого выравнивания является Vector NTI (Invitrogen Corp.). Пример программного обеспечения, которое может выполнять сравнение последовательностей, включает, помимо прочего, пакет BLAST (см. Ausubel et al., 1999, Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed - Chapter 18).

Хотя качество выравнивания можно измерить с точки зрения идентичности, сам процесс выравнивания обычно не основан на сравнении пар по принципу "все или ничего". Вместо этого обычно используется масштабированная матрица оценок сходства, которая присваивает оценки каждому попарному сравнению на основе химического сходства или эволюционного расстояния. Примером такой широко

используемой матрицы является матрица BLOSUM62 - матрица по умолчанию для пакета программ BLAST. Программы Vector NTI обычно используют либо общедоступные значения по умолчанию, либо настраиваемую таблицу сравнения, если она предоставляется (дополнительные сведения см. руководство пользователя). В качестве альтернативы процент сходства может быть рассчитан с использованием функции множественного выравнивания в Vector NTI (Invitrogen Corp.) на основе алгоритма, аналогичного CLUSTAL (Higgins D.G. & Sharp P.M. (1988), *Gene*, 73(1), 237-244).

После того, как с помощью программного обеспечения произвели оптимальное выравнивание, можно вычислить процент сходства последовательностей, предпочтительно процент идентичности последовательностей. Программное обеспечение обычно делает это как часть сравнения последовательностей и генерирует числовой результат.

В одном варианте осуществления степень идентичности в отношении последовательности белка (аминокислоты) определяется по меньшей мере 50 непрерывно расположенных аминокислот, по меньшей мере 100 непрерывно расположенных аминокислот, по меньшей мере 150 непрерывно расположенных аминокислот, по меньшей мере 200 непрерывно расположенных аминокислот или по меньшей мере 250 непрерывно расположенных аминокислот.

В одном из вариантов осуществления степень идентичности в отношении аминокислотной или белковой последовательности может быть определена по всей последовательности SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов осуществления последовательности [последовательность β-галактозидазы, которую нужно сравнивать, и SEQ ID NO: 2] выравниваются с помощью программы глобального выравнивания, и идентичность последовательности вычисляется путем определения количества точных совпадений, идентифицированных программой, деленных на длину сравниваемой последовательности β-галактозидазы.

В одном из вариантов осуществления степень идентичности последовательности между последовательностью сравниваемой β-галактозидазы и SEQ ID NO: 2 определяется посредством 1) выравнивания двух последовательностей с помощью любой подходящей программы выравнивания с использованием оценочной матрицы по умолчанию и штрафов за пропуски по умолчанию, 2) определения количества точных совпадений, где точное совпадение - это когда программа выравнивания идентифицировала идентичную аминокислоту в двух выровненных последовательностях в заданном положении в выравнивании, и 3) деления количества точных совпадений на длину последовательности β-галактозидазы для сравнения.

В одном из вариантов осуществления программа глобального выравнивания выбирается из группы, состоящей из CLUSTAL и BLAST, в частности CLUSTAL, с использованием параметров по умолчанию, и идентичность последовательности вычисляется путем определения количества точных совпадений, идентифицированных программой, деленных на длину целевой последовательности.

В варианте осуществления программой глобального выравнивания является CLUSTAL с использованием параметров по умолчанию, а идентичность последовательности определяется с помощью программного обеспечения BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) [выбор "Последовательность" в раскрывающемся меню, затем выберите подменю "Парное выравнивание", затем выберите пункт меню "Рассчитать идентичность/сходство для двух последовательностей"].

Общие методы технологии рекомбинантной ДНК.

В настоящем изобретении используются, если не указано иное, обычные методы биохимии, молекулярной биологии, микробиологии и рекомбинантной ДНК, которые находятся в пределах возможностей специалиста с обычной квалификацией в данной области. Такие методы описаны в литературе. См., например, J. Sambrook, E.F. Fritsch и T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al. (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N. Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M.J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; и D.M.J. Lilley and J.E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press. Каждый из этих общих текстов включен сюда в качестве ссылки.

Далее изобретение будет описано с помощью примеров, которые предназначены для помощи специалисту в данной области техники в осуществлении изобретения и никоим образом не предназначены для ограничения объема изобретения.

Материалы и методы.

Штаммы и условия роста.

Штаммы *S. thermophilus* (ST), раскрытые в настоящем документе, выращивали при 37°C в бульоне M17 (Oxoid, ссылка поставщика CM0817) с добавлением 30 г/л лактозы и, если необходимо, с добавлением 15 г/л агара бактериологического Типа А (Biokar, номер поставщика A1010HA) или при 43°C в молоке (УНТ-полуобезжиренное молоко "Le Petit Vendéen" + 3% сухого молока BBA Lactalis). В автоклавированный бульон M17 добавляли 0,2 мкм-фильтрованную лактозу, сахарозу, галактозу или глюкозу. Замороженные исходные материалы штаммов ST получали путем полуразбавления в M17 50% глицирина ночной культуры, выращенной в бульоне M17 с добавлением 30 г/л сахарозы, и хранили при -20°C.

Перенос аллеля *lacZ* штамма DGCC12456 в геном 2 других штаммов *S. Thermophilus*.

Продукт ПЦР длиной 1198 п.н., несущий ген *lacZ* штамма DGCC12456, был получен с использованием праймеров *lacZ_F5* (5'-GTAАСТТСТСГТАГГАТАСАГТГ-3') и *lacZ_R6* (5'-CAGAGTTACCCATTGTGTGC-3'). Затем продукт ПЦР очищали с использованием набора для очистки QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) и элюировали водой, свободной от ДНКазы. Концентрацию продукта ПЦР определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, MA). Размер и чистоту продукта ПЦР проверяли с помощью капиллярного гелеэлектрофореза в системе QIAxcel® (Qiagen, Hilden, Germany). Штаммы DGCC715 и DGCC11231 трансформировали продуктом ПЦР длиной 1198 п.н. с использованием естественной компетентности клеток в соответствии с Dandoy et al. (2011). Были отобраны мутанты, у которых ген *lacZ* заменен аллелем *lacZ* штамма DGCC12456 (наличие аллеля *lacZ* штамма DGCC12456 проверяли секвенированием).

Проверка путем секвенирования наличия аллеля *lacZ* DGCC12456.

ПЦР-амплификацию гена β -галактозидазы выполняли с использованием праймеров *lacS_F1* (5'-GTAАСТТСТСГТАГГАТАСАГТГ-3') и *lacZ_R7* (5'-CAGAGTTACCCATTGTGTGC-3'), [стадия инкубации при 98°C, 5 мин, затем 33 цикла по 98°C, 45 с; 58°C, 30 с; 68°C, 3 мин, с последней стадией удлинения при 72°C, 7 мин]. Затем продукт ПЦР длиной 1198 п.н. обрабатывали Illustra™ ExoProStar™ в соответствии с инструкциями производителя (GE Healthcare). Реакции секвенирования проводили с использованием набора для циклического секвенирования BigDye® Terminator v3.1 (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя с использованием AB3500 (Applied Biosystems™) и праймеров, перечисленных в табл. 1.

Таблица 1

Список праймеров, используемых для амплификации и секвенирования фрагмента *lacZ*, использованного для трансформации

| Праймеры | Последовательность 5'-3' | SEQ ID |
|-----------------|--------------------------|---------------|
| <i>lacS_F1</i> | CTTGACTGCAGCTGAACTC | SEQ ID NO: 32 |
| <i>lacZ_R7</i> | CTCGACTACAAAGTTAACTGG | SEQ ID NO: 33 |
| <i>lacZ_R6</i> | CAGAGTTACCCATTGTGTGC | SEQ ID NO: 34 |
| <i>qLacZ_R4</i> | AGGTTGGCTTCATCGATAAC | SEQ ID NO: 35 |
| <i>qLacZ_F1</i> | CATCACCTTCTGTAACGATGC | SEQ ID NO: 36 |
| <i>LacZ_F5</i> | GTAАСТТСТСГТАГГАТАСАГТГ | SEQ ID NO: 37 |
| <i>qLacZ_F3</i> | AGGACGTTGTATCACTGAAG | SEQ ID NO: 38 |

Активность *LacS* [анализ А].

Штаммы *Streptococcus thermophilus* выращивали на среде M17, содержащей 30 г/л сахарозы в качестве единственного источника углерода, в течение ночи при 37°C. Когда клетки достигли стационарной фазы, их переносили (при 0,05 Ед.ДО/мл) в 1 объем среды M17, содержащей 30 г/л лактозы в качестве единственного источника углерода, и их инкубировали в течение 2 ч при 42°C. Культуры штаммов центрифугировали при комнатной температуре (3500 g), супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в 0,5 объема 4% (мас./об.) глицерофосфата. Эта стадия промывки применялась дважды. 1,8 мл клеточной суспензии в 4% глицерофосфате инкубировали в течение 2 мин при 42°C. Затем добавляли 0,2 мл раствора лактозы (70 г/л лактозы + 0,1 М калий-фосфатный буфер) [рН раствора лактозы предварительно доводили до рН 4,5 или 6, в зависимости от необходимого измерения]. Смесь инкубировали еще 3 мин при 42°C. Реакцию блокировали фильтрованием на фильтре 0,22 мкм для удаления клеток. Затем лактозу в отфильтрованном растворе анализировали с помощью ВЭЖХ, используя следующий протокол. Раствор разбавляли в 10 раз водой и вводили 10 мкл на ВЭЖХ Agilent 1200 (высокоэффективная жидкостная хроматография). Элюирование проводили в изократическом режиме чистой водой со скоростью 0,6 мл/мин. Молекулы разделяли за 40 мин на ионообменной колонке Pb2 + (SP-0810 Shodex® 300 мм×8 мм×7 мкм). Сахара определяли рефрактометром. Количественный анализ проводили с помощью внешней калибровки.

Активность пермеазы *LacS* для импорта лактозы рассчитывали следующим образом:

Активность *LacS* = ([лактоза]начальная - [лактоза]3 мин)/(ДО × время), выраженная в мкмоль/(Ед.ДО.мин);

где [лактоза]начальная - начальная концентрация в мкмоль/мл;

[лактоза]3 мин - концентрация в мкмоль/мл через 3 мин при 42°C;

ДО - плотность бактерий в Ед.ДО/мл;

время - продолжительность эксперимента в минутах (в данном случае 3 мин).

Активность *LacZ* [анализ В].

Получали свежую ночную культуру штамма *Streptococcus thermophilus* для анализа в M17, содержащую 30 г/л лактозы, и использовали для инокуляции 1% (об./об.) 10 мл свежей M17, содержащей 30 г/л лактозы. Клетки собирали центрифугированием (6000×g, 10 мин, 4°C) после 3 ч роста на M17, со-

держателем 30 г/л лактозы, при 42°C, промывали в 1,5 мл холодного буфера для лизиса (KPO_4 0,1 М) и ресуспендировали в 300 мкл холодного буфера для лизиса. Ингибиторы протеазы, не содержащие ЭДТА, "сOmplete™" (Roche, ссылка поставщика 04693132001) добавляли в буфер для лизиса, как описано поставщиком. Клетки разрушали добавлением 100 мг стеклянных гранул (150-212 мкм, Sigma G1145) к 250 мкл ресуспендированных клеток и осцилляцией с частотой 30 циклов/с в течение 6 мин в вибротельнице MM200 (Retsch, Naan, Germany). Клеточный дебрис и стеклянные гранулы удаляли центрифугированием (14000×g, 15 мин, 4°C), а супернатант переносили в чистую центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, хранящуюся на льду. Содержание общего белка определяли с использованием набора для определения белка FLUKA-Rapid (ссылка 51254). Активность бета-галактозидазы в клеточных экстрактах определяли спектрофотометрически путем мониторинга гидролиза О-нитро-фенол-бета-галактозида (ONPG) до галактозы и О-нитрофенола (ONP). Двадцать мкл клеточного экстракта смешивали с 135 мкл реактивного буфера (NaPO_4 100 мМ; KCl 10 мМ; MgSO_4 1 мМ; ONPG 3 мМ + бета-меркаптоэтанол 60 мМ, pH 6). Выработка ONP приводит к желтому цвету в пробирке. Когда появлялся желтый цвет, реакцию блокировали добавлением 250 мкл стоп-буфера (Na_2CO_3 1 М). Оптическую плотность при 420 нм регистрировали с использованием ридера для микропланшетов Synergy HT (BIO-ТЕК). Одна единица бета-галактозидазы соответствует количеству фермента, который катализирует выработку 1 мкмоль ONP в минуту в условиях анализа. Активность бета-галактозидазы рассчитывали следующим образом:

Активность $\text{LacZ} = d\text{OD} \times V / [dt \times l \times \epsilon \times Q_{\text{prot}}]$, выраженная в моль/(мг экстракта общего белка × мин), где $d\text{OD}$ - изменение оптической плотности (OD) при 420 нм между пустой средой и тестируемым образцом;

V - объем реакции, в которой измеряется оптическая плотность (в настоящем документе 250 мкл);

dt - представляет продолжительность в минутах между добавлением 20 мкл бактериального экстракта и добавлением 250 мкл стоп-буфера;

l - длина оптического пути (в данном случае 0,73 см);

ϵ - молярный коэффициент ослабления ONP (в настоящем документе 4500 $\text{см}^2/\text{мкмоль}$);

Q_{prot} - количество белка в кювете (в мг).

Способность подкисления молока [анализ С].

Подкисляющие свойства штаммов *S. thermophilus* оценивали путем регистрации pH с течением времени во время ферментации молока следующим образом: УНТ-полуобезжиренное молоко "Le Petit Vendéen" ("йогуртовое молоко"), содержащее 3% (мас./об.) сухого молока (BBA), Lactalis, предварительно пастеризованное в течение 10 мин при 90°C, инокулировали в концентрации 1% (об./об., примерно 10^7 КОЕ/мл) культурой штамма *S. thermophilus* для анализа (ресуспендированные клетки в безуглеводной M17 из ночной культуры, выращенной в M17 с добавлением 3% сахарозы). Колбы с инокулированным молоком статически инкубировали на водяной бане при 43°C в течение 24 ч. Во время инкубации контролировали pH с помощью системы CINAC (Alliance Instruments, Франция; pH-электрод Mettler 405 DPAS SC, Толедо, Испания), как описано ранее. pH измеряли и регистрировали каждые 5 мин.

Результаты.

Пример 1. Выделение *Streptococcus thermophilus*, проявляющего фенотип full-stop.

Разведения культуры штамма DGCC7984 высевали на чашки на поверхность с M17 с добавлением в агар 5 г/л сахарозы. После инкубации в течение 48 ч при 37°C отбирали 2 выделенные колонии штамма DGCC7984 и наращивали в течение 24 ч в бульоне M17 с добавлением 20 г/л сахарозы при 37°C. Эти два субклона штамма DGCC7984 были названы DGCC12455 и DGCC12456. Подкисляющие свойства штаммов DGCC12455 и DGCC12456 исследовали следующим образом: 2 штамма инокулировали в бульон M17 с добавлением 30 г/л лактозы и затем инкубировали при 37°C в течение ночи. Культуры промывали (об./об.) раствором соли триптона (триптон 1 г/л, NaCl 8,5 г/л) следующим образом: культуры центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин; осадки ресуспендировали в 10 мл раствора соли триптона. Промытые культуры инокулировали в концентрации 1% (об./об.) в 100 мл УНТ-полуобезжиренного молока, содержащего 3% (мас./об.) сухого молока, и пастеризовали при 90°C в течение 10 мин. Колбы инкубировали на водяной бане при 43°C, а pH измеряли и регистрировали в режиме онлайн с помощью системы CINAC (фиг. 1А). Рассчитывали скорость изменения pH в диапазоне 6 и 5,3 (Ед.pH/мин), представляющую скорость в диапазоне pH 6 и 5,3 (как скорость изменения линейной модели, выведенный из изменения pH как функции времени ($\Delta\text{pH}/\Delta\text{время}$) для значения pH от 6 до 5,3). Кроме того, был определен pH_{STOP} , соответствующий значению pH при V_0 (соответствующая скорости изменения pH, которая окончательно становится не детектируемой, т.е. ниже 0,1 мЕд.pH/мин (0,0001 Ед.pH/мин)).

Было обнаружено, что подкисление молока с помощью DGCC12455 и DGCC7984 было одинаковым на всем протяжении кинетики. Напротив, DGCC12456 показал отчетливый профиль подкисления (фиг. 1А). Действительно, примерно через 600 мин ферментации с DGCC12456, pH имел тенденцию стабилизироваться на уровне около 4,37 и не изменялся до конца времени ферментации ($\text{pH}_{\text{STOP}}=4,37$), тогда как для штаммов DGCC12455 и DGCC7984 pH продолжал снижаться после 600 мин ферментации и достигал значений около 4,1 и 4,2 в конце периода ферментации. Этот своеобразный профиль подкисления со стабилизацией pH был назван фенотипом full-STOP. Однако, несмотря на эту своеобразную кинетику

в конце ферментации, скорость подкисления pH от 6 до 5,3 составляла 10^6 мЕд.рН/мин, что является скоростью подкисления, ожидаемой при промышленной ферментации молочных продуктов.

Пример 2. Идентификация генетического различия в гене *lacZ* DGCC12456.

Геномы штаммов DGCC7984 и DGCC12456 секвенировали и сравнивали. Среди прочего, разница между двумя штаммами была выявлена в гене *lacZ*. Ген *lacZ* описан (van den Bogaard et al., 2000; Vaughan et al., 2001) как кодирующий β -галактозидазу, фермент, ответственный за гидролиз лактозы до глюкозы и галактозы. В геноме DGCC12456 основание С было заменено основанием Т в положении 1060 гена *lacZ*, что привело к неконсервативной замене аминокислоты, замене аргинина на цистеин в положении 354 (замена R354C) фермента β -галактозидазы. Таким образом, DGCC7984 имеет аллель *lacZ*, кодирующий β -галактозидазу, последовательность которой определена в SEQ ID NO: 2, тогда как штамм DGCC12456 имеет аллель *lacZ*, кодирующий β -галактозидазу, последовательность которого определена в SEQ ID NO: 4. Напротив, секвенирование гена *lacZ* штамма DGCC12455 показало, что его последовательность *lacZ* идентична последовательности DGCC7984 (т.е. кодирует β -галактозидазу, последовательность которой определена в SEQ ID NO: 2). В совокупности эти результаты предполагают, что мутация в гене *lacZ* может быть ответственной за специфический профиль подкисления DGCC12456.

Для дальнейшего исследования этой гипотезы сравнивали β -галактозидазу, кодируемую геном *lacZ* других штаммов *S. thermophilus*. Замена R354C, обнаруженная в DGCC12456, не была обнаружена ни в одной из последовательностей β -галактозидазы других штаммов *S. thermophilus*, что подтверждает, что эта замена уникальна для DGCC12456.

Большинство протестированных штаммов *S. thermophilus* несут аллель *lacZ*, кодирующий β -галактозидазу, последовательность которой определена в SEQ ID NO: 2. У некоторых штаммов *S. thermophilus* были идентифицированы аминокислотные различия по сравнению с SEQ ID NO: 2. Эти идентифицированные аминокислотные различия представляли собой консервативные замены и привели к идентификации 8 различных типов вариантов β -галактозидазы (как определено в настоящем документе), последовательность которых соответствует SEQ ID NO: 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 и 27 [варианты с 1 по 8 - табл. 2].

Таблица 2

Сравнительный анализ аминокислотной последовательности β -галактозидаз, кодируемых штаммами *S. thermophilus*. Нумерация аминокислотных положений производится в соответствии с SEQ ID NO: 2.

| Тип | Аминокислотное положение (для нумерации использовали SEQ ID NO: 2) | | | | | | | | | | | % сходства | SEQ ID |
|-----------|--|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------------|--------|
| | 35 | 237 | 339 | 354* | 542 | 714 | 777 | 951 | 955 | 999 | 1002 | | |
| DGCC7984 | E | A | V | R | Y | E | V | A | A | T | A | 100% | 2 |
| Вариант 1 | A | T | V | R | Y | E | V | A | A | T | A | 99,7% | 6 |
| Вариант 2 | E | A | V | R | Y | E | I | A | A | S | S | 99,7% | 9 |
| Вариант 3 | E | A | V | R | Y | E | V | A | A | S | A | 99,9% | 12 |
| Вариант 4 | E | A | V | R | Y | K | V | A | A | T | A | 99,9% | 15 |
| Вариант 5 | E | A | V | R | F | E | V | A | A | T | A | 99,9% | 18 |
| Вариант 6 | E | A | V | R | Y | E | V | S | A | T | A | 99,9% | 21 |
| Вариант 7 | E | T | I | R | Y | E | V | A | A | T | A | 99,8% | 24 |
| Вариант 8 | E | A | V | R | Y | E | V | A | V | T | A | 99,9% | 27 |
| DGCC12456 | E | A | V | C | Y | E | V | A | A | T | A | 99,9% | 4 |

* Указывает положение 354, которое отличается в SEQ ID NO: 4.

Пример 3. Сравнение профиля подкисления штаммов *S. thermophilus* DGCC715 и DGCC11231 и их производных, кодирующих β -галактозидазу, с последовательностью SEQ ID NO: 4 вместо SEQ ID NO: 2 (замена R354C).

Были сконструированы производные штаммов DGCC715 и DGCC11231, названные 715R354C и 11231R354C, соответственно. Ген *lacZ* DGCC12456 (кодирующий β -галактозидазу с цистеином (C) в положении 354) был вставлен вместо гена *lacZ* штаммов DGCC715 и DGCC11231. Практически ген *lacZ* амплифицировали с помощью ПЦР с ДНК DGCC12456. Компетентные клетки DGCC715 или DGCC11231 получали и трансформировали амплифицированной ДНК. Трансформанты проверяли секвенированием.

Способность штаммов *S. thermophilus* DGCC715, DGCC11231, 715R354C и 11231R354C для ферментации молока оценивали, как описано в разделе "Материалы и методы" [анализ C]. pH регистрировали с течением времени с помощью прибора CINAС, и результаты отображены на фиг. 2А, 3А, 4А и 5А. Были рассчитаны следующие дескрипторы (табл. 3):

градиент в диапазоне pH 6 и 5,3 (Ед.рН/мин) [градиент pH 6-5,3];

pH_{STOP} , соответствующий значению pH при V_0 [соответствующая скорости, которая окончательно становится не детектируемой, т.е. ниже 0,1 мЕд.рН/мин (0,0001 Ед.рН/мин)].

Таблица 3
Дескрипторы кинетики подкисления молока DGCC715, DGCC11231 и их сконструированных производных, рассчитанные по кривым подкисления

| Штамм | Скорость изменения pH 6-5,3 (10^{-4} Ед.рН/мин) | pH_{STOP} |
|------------------------|--|-------------|
| DGCC715 | 109 | 4,19 |
| 715 ^{R354C} | 117 | 4,38 |
| DGCC11231 | 130 | 4,1 |
| 11231 ^{R354C} | 149 | 4,27 |

Результаты показали, что профиль подкисления производных 715R354C и 11231R354C (см. фиг. 3А и 5А) отличался от профиля их соответствующего родительского штамма (фиг. 2А и 4А соответственно) стабилизацией pH после 10-12 ч инкубации. Стабилизация pH (pH_{STOP}) произошла около pH 4,27 для 11231R354C и pH 4,38 для 715R354C, в то время как родительские штаммы продолжали подкислять молоко после 12 ч инкубации до достижения pH 4,19 и 4,1 соответственно в конце времени инкубации. Результаты также показали, что, несмотря на замену аргинина на цистеин в положении 354 β -галактозидазы, на скорость подкисления в диапазоне pH 6 и 5,3 не было отрицательного влияния. Как следствие, сконструированные производные по-прежнему подходили для ферментации молочных продуктов на промышленных предприятиях.

Второй набор дескрипторов также рассматривался для характеристики фенотипа полной остановки. Этот второй набор дескрипторов был также определен для штамма DGCC12456. Для этой цели была рассчитана эволюция скорости (скорости подкисления) как функция времени, и результаты представлены на фиг. 1В, 2В, 3В, 4В и 5В. По этим кривым были определены следующие дескрипторы (табл. 4):

- время достижения максимальной скорости, полученной во время эксперимента по ферментации (T_{Vmax}), время, рассчитанное (в минутах) от начала эксперимента по ферментации;
- время до pH_{STOP} (TrH_{STOP}) [время достижения V_0 , как определено выше], время, рассчитанное (в минутах) с момента начала эксперимента по ферментации;
- разница во времени между TrH_{STOP} и T_{Vmax} (в минутах).

Таблица 4
Дескрипторы кинетики скорости ферментации DGCC715, DGCC11231 и их сконструированных производных и DGCC12456, рассчитанные по кривым скорости

| Штамм | T_{Vmax} | TrH_{STOP} | Δ время между T_{Vmax} и TrH_{STOP} |
|------------------------|------------|--------------|--|
| DGCC715 | 95 | 790 | 695 |
| 715 ^{R354C} | 115 | 525 | 410 |
| DGCC11231 | 105 | 945 | 840 |
| 11231 ^{R354C} | 115 | 595 | 480 |
| DGCC12456 | 160 | 610 | 450 |

Результаты показали, что разница во времени между TrH_{STOP} и T_{Vmax} составляла 410 и 480 мин для производных 715R354C и 11231R354C по сравнению с 695 и 840 мин для их соответствующих родительских штаммов (табл. 4). Результаты также показали, что штамм DGCC12456 имеет тот же профиль, что и производные 715R354C и 11231R354C. Эти результаты показали, что разница во времени между TrH_{STOP} и T_{Vmax} производных 715R354C и 11231R354C значительно уменьшилась по сравнению с таковой для их соответствующего родительского штамма (разница 285 и 360 мин соответственно). Эти данные отражают способность производных 715R354C и 11231R354C при использовании для ферментации молока достигать стабилизированного pH (pH_{STOP}), которое выше, за более короткое время (по сравнению с T_{Vmax}). Эти результаты подтвердили, что замена R354C в β -галактозидазе DGCC12456 отвечает за фенотип full-STOP.

Таким образом, штаммы, несущие аллель *lacZ*, кодирующий β -галактозидазу с цистеином в положении 354, открывают возможность производства ферментированного молока не только с достижением их целевого pH (pH_{STOP}) в приемлемое промышленное время (около 600 мин), но также стабилизируя их pH при температуре ферментации до 24 ч. Напротив, родительские штаммы продолжают подкислять молоко до 700-800 мин и при более низком pH, что требует остановки процесса ферментации на стадии охлаждения до того, как pH станет слишком низким.

Пример 4. Активности бета-галактозидазы при pH 6 и 4,5 для различных штаммов *S. thermophilus*.

Активность β -галактозидазы при pH 4,5 и 6 различных штаммов *S. thermophilus*, несущих аллель

lacZ, кодирующий β -галактозидазу, как определено в SEQ ID NO: 2, определяли с помощью анализа В (как определено в материале и методах). Результаты представлены на фиг. 6.

Во-первых, эти данные показали, что для конкретного штамма его β -галактозидазная активность при pH 4,5 всегда меньше, чем его β -галактозидазная активность при pH 6, из чего следует, что активность β -галактозидазы снижается с понижением pH.

Более того, эти данные показали, что существует значительная вариабельность активности β -галактозидазы между штаммами, несущими один и тот же аллель lacZ, не только при pH 6 [от $9,93 \times 10^{-8}$ до $1,74 \times 10^{-7}$ моль/(мг экстракта общего белка \times мин)], но также и при pH 4,5 [от $6,7 \times 10^{-8}$ до $1,15 \times 10^{-7}$ моль/(мг экстракта общего белка \times мин)]. Эту изменчивость можно объяснить генетическим фоном, характерным для каждого штамма. Эти данные вызвали сомнения относительно того факта, что только активность β -галактозидазы (при pH 4,5 и/или 6) может использоваться в качестве надежного дескриптора для характеристики штаммов по изобретению (имеющих фенотип full-STOP).

Пример 5: сравнение активности бета-галактозы при pH 6 и pH 4,5 штаммов *S. thermophilus* 715 и ST11231, их производных 715R354C и 11231R354C и штамма DGCC12456

После идентификации замены R354C в β -галактозидазе и ее роли в специфической кинетике подкисления молока DGCC12456 (фенотип full-STOP), активность β -галактозидазы при pH 6 и pH 4,5 штаммов DGCC715, DGCC11231, их соответствующих сконструированных производных и DGCC12456 определяли с помощью анализа В (как определено в материалах и методах). Результаты представлены на фиг. 7.

Эти данные подтверждают, что активность β -галактозидазы при pH 4,5 у штаммов, несущих аллель lacZ, кодирующего β -галактозидазу, как определено в SEQ ID NO: 4 (цистеин в положении 354), меньше активности β -галактозидазы при pH 6.

Примечательно, что разница в активности β -галактозидазы в диапазоне pH 6 и 4,5 более важна для штаммов, несущих аллель lacZ, кодирующий β -галактозидазу, SEQ ID NO: 4, чем для штаммов, несущих аллель lacZ, кодирующий β -галактозидазу, SEQ ID NO: 2. Таким образом, активность β -галактозидазы при pH 4,5 у штаммов, несущих аллель lacZ, кодирующий β -галактозидазу SEQ ID NO: 4, была ниже, чем у штаммов, несущих аллель lacZ, кодирующий β -галактозидазу SEQ ID NO: 2).

Однако вариабельность активности β -галактозидазы при pH 4,5, существующая между штаммами, несущими один и тот же аллель lacZ [от $1,65 \times 10^{-8}$ до $3,94 \times 10^{-8}$ моль/(мг экстракта общего белка \times мин)], для штаммов, несущих аллель lacZ, кодирующий β -галактозидазу, SEQ ID NO: 4], подтвердила, что активность β -галактозидазы, даже при pH 4,5, не может использоваться в качестве единственного параметра для наилучшей характеристики штаммов по изобретению, имеющих фенотип full-STOP.

Пример 6. Исследование активности лактозопермеазы (LacS).

У *S. thermophilus* ген lacZ является частью оперона lac (вместе с геном lacS, кодирующим лактозопермеазу), и как лактозопермеаза, так и β -галактозидаза участвуют в катаболизме лактозы (путем импорта лактозы (LacS), а затем гидролизует его до глюкозы и галактозы (lacZ).

Активность LacS при pH 6 и pH 4,5 штаммов DGCC715, DGCC11231, их соответствующих производных и штаммов DGCC7984 и DGCC12456 определяли с помощью анализа А (как определено в материалах и методах). Результаты представлены в табл. 5 (вместе с активностью β -галактозидазы, определенной в примере 4).

Таблица 5

Активность LacS, активность LacZ и отношение при pH 4,5 и 6 DGCC715, DGCC11231, их сконструированных производных и штаммов DGCC7984 и DGCC12456

| Штамм | LacS активность (мкмоль/мДО \times мин) | | LacZ активность (моль/мг экстракта общего белка \times мин) | | Отношение LacS/LacZ $\times 10^{-6}$ | |
|------------------------|--|--------|---|-----------------------|--------------------------------------|--------|
| | pH 6 | pH 4,5 | pH 6 | pH 4,5 | pH 6 | pH 4,5 |
| DGCC715 | 0,3696 | 0,1532 | $1,17 \times 10^{-7}$ | $8,48 \times 10^{-8}$ | 3,16 | 1,81 |
| 715 ^{R354C} | 0,2846 | 0,5036 | $8,36 \times 10^{-8}$ | $3,68 \times 10^{-8}$ | 3,4 | 13,7 |
| DGCC11231 | 0,7686 | 0,3347 | $9,93 \times 10^{-8}$ | $6,7 \times 10^{-8}$ | 7,74 | 5 |
| 11231 ^{R354C} | 0,5567 | 0,9075 | $8,23 \times 10^{-8}$ | $3,94 \times 10^{-8}$ | 6,77 | 23,05 |
| DGCC7984 | 0,4574 | 0,2943 | $2,1 \times 10^{-7}$ | $1,11 \times 10^{-7}$ | 2,18 | 2,66 |
| DGCC12456 | 0,4568 | 0,4529 | $1,2 \times 10^{-7}$ | $1,65 \times 10^{-8}$ | 3,82 | 27,49 |

Хотя активность лактозопермеазы (LacS) при pH 4,5 была снижена по сравнению с pH 6 для штаммов, кодирующих β -галактозидазу, как определено в SEQ ID NO: 2, эти активности были увеличены (715R354C и 11231R354C) или не изменились (DGCC12456) для штаммов, кодирующих β -галактозидазу SEQ ID NO: 4. Предполагается, что для компенсации снижения гидролиза лактозы β -галактозидазой^{FS}, больше лактозы импортируется лактозопермеазой.

Поэтому отношение LacS к LacZ (LacS/LacZ, которое представляет эффективность для штамма по гидролизу импортированной лактозы = EH) при pH 4,5 и 6 было рассчитано (как определено в настоящем документе) и представлено в табл. 5 и на фиг. 8. Штаммы, несущие аллель lacZ, кодирующий

β -галактозидазу SEQ ID NO: 2, демонстрировали отношения LacS/LacZ, аналогичные или слегка пониженные значения при pH 4,5 по сравнению с pH 6. Напротив, эти отношения были значительно увеличены при pH 4,5 по сравнению с pH 6 для штаммов, несущих аллель lacZ, кодирующий β -галактозидазу SEQ ID NO: 4. Эти результаты отражают снижение эффективности штаммов по изобретению при использовании лактозы в среде (т. е. при гидролизе импортированной лактозы) при pH 4,5 по сравнению со штаммами, несущими аллель lacZ, кодирующий β -галактозидазу SEQ ID NO: 2.

Разница между отношением LacS/LacZ при pH 4,5 штаммов, несущих аллель lacZ, кодирующего β -галактозидазу SEQ ID NO: 2, и отношением штаммов, несущих аллель lacZ, кодирующего β -галактозидазу SEQ ID NO: 4, очень важна, так что этот параметр можно надежно использовать для характеристики штаммов по изобретению.

Было показано, что отношения LacS/LacZ при pH 4,5 штамма DGCC715 и его производного достаточно отличительны, чтобы использовать штамм DGCC715 для идентификации дополнительных аллелей lacZ, кодирующих β -галактозидазу по изобретению (аллели lacZ^{FS}).

Пример 7. Эффективность гидролиза импортированной лактозы (EH) штаммов *S. thermophilus* 715 и ST11231, их производных 715R354C и 11231R354C и штамма DGCC12456.

Наконец, авторы изобретения определили дополнительный дескриптор, представляющий общее поведение штамма *S. thermophilus* по изобретению в отношении метаболизма лактозы во время всего процесса ферментации молока. Таким образом, была разработана следующая формула (I), представляющая разницу в эффективности гидролиза импортированной лактозы в диапазоне pH 6,0 и pH 4,5 (EH_{pH6} - EH_{pH4,5}):

$$(I) \Delta EH = \ln \left[\frac{\text{LacS}_{\text{pH6}}}{\text{LacZ}_{\text{pH6}}} \right] - \ln \left[\frac{\text{LacS}_{\text{pH4,5}}}{\text{LacZ}_{\text{pH4,5}}} \right]$$

В этой формуле значение ΔEH около 0, или чуть больше 0, или чуть меньше 0 означает, что эффективность гидролиза импортированной лактозы аналогична при pH 6 и 4,5 (т.е. эффективность гидролиза не зависит от pH). Напротив, существенно меньшее 0 ΔEH означает, что эффективность гидролиза импортированной лактозы ниже при pH 4,5, чем при pH 6 (т.е. что эффективность гидролиза значительно снижается с уменьшением pH).

Эту формулу применяли для расчета ΔEH для штаммов DGCC715, DGCC11231, их соответствующих производных и DGCC12456 на основании активности β -галактозидазы и активности лактозопермеазы, представленных в табл. 5. Результаты представлены на фиг. 9.

Как показано на фиг. 9 и как ожидалось, два штамма *S. thermophilus*, несущие аллель lacZ, кодирующий β -галактозидазу SEQ ID NO: 2, имеют чуть больше 0 значение ΔEH (0,44 и 0,56). Напротив, три штамма *S. thermophilus*, несущие аллель lacZ, кодирующий β -галактозидазу SEQ ID NO: 4, имеют значение ΔEH , которое является существенно меньше 0 (от -1,23 до -1,97).

Помимо отношения LacS к LacZ при pH 4,5, определенного выше, значение ΔEH , определенное формулой (I), является надежным параметром, позволяющим охарактеризовать штаммы по изобретению, имеющие фенотип full-STOP.

Пример 8. Влияние температуры упаковки во время производства перемешанного йогурта.

Перемешанный йогурт готовили путем инокуляции молочного субстрата (белок 3,9%, жир 1,5% и сахара 6%) штаммом DGCC12456, описанным ранее (не менее 10⁷ КОЕ/мл), и *Lactobacillus bulgaricus* (примерно 10³ КОЕ/мл), и путем инкубации инокулированного молока при 43°C до достижения pH 4,6. Сразу после этого йогурт перемешивали. Затем перемешанный йогурт охлаждали и упаковывали либо при 20°C, либо при 35°C, а затем хранили при 10°C в течение срока хранения (45 дней).

pH во время хранения измеряли с помощью портативного pH-метра с одним зондом.

Вязкость на 14 день (после окончания ферментации) определяли с помощью вискозиметра Brookfield DV-ITM Prime (AMETEK Brookfield) с использованием шпинделя S-05 и скорости 10 об/мин; через 30 с определяли значение вязкости (в сантипуазах; сП).

Как показано на фиг. 10А и как и ожидалось, упаковка при 35°C давала перемешанному йогурту более высокую текстуру на 14 день по сравнению с упаковкой при 20°C (фиг. 10А). Интересно, что pH перемешанного йогурта поддерживался на высоком уровне в течение по меньшей мере 45 дней независимо от температуры упаковки (фиг. 10В).

Эти результаты подтверждают, что штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению, имеющий фенотип full-STOP, представляет большой интерес для производителей перемешанного йогурта, поскольку он позволяет улучшить текстуру перемешанного йогурта за счет повышения температуры упаковки без снижения pH во время хранения.

Пример 9. Пост-подкисление йогурта при 10°C.

Йогурт готовили путем инокуляции молочного субстрата (белок 3,9% и жир 1,5%; без добавления сахара) либо (А) штаммом DGCC12456, описанным ранее (по меньшей мере 10⁷ КОЕ/мл), либо *Lactobacillus bulgaricus* (примерно 10³ КОЕ/мл), либо (В) эталонной заквасочной культурой с высокими контрольными показателями после подкисления, состоящей из штаммов *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus* (тот же штамм *L. bulgaricus*, что и композиция А), и путем инкубирования иноку-

лированного молока при 43°C до достижения рН 4,60. Сразу после этого йогурт охлаждали до 22°C, а затем хранили при 10°C в течение всего срока годности (45 дней). рН во время хранения измеряли с помощью портативного рН-метра с одним зондом.

Как показано на фиг. 11, обе культуры показали относительно высокий рН в течение срока хранения. Эталонная заквасочная культура показала быстрое снижение рН до 4,34 до 14 дней, а затем стабильность рН с 14 по 45 день (пунктирная линия); напротив, культура, содержащая штамм DGCC12456, показала стабильное рН в течение всего срока хранения с 1 до 45 дней (рН от 4,48 до 4,5) (сплошная линия).

Эти результаты подтверждают, что штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению, имеющий фенотип full-STOP, представляет большой интерес для производителей ферментированного молока, поскольку позволяет хранить кисломолочные продукты при температуре выше, чем температура обычной холодильной камеры (обычно менее 8°C), не влияя на рН.

В целом, штамм *Streptococcus thermophilus* по настоящему изобретению предлагает производителям ферментированного молока и йогурта новые возможности для улучшения процессов и снижения затрат, например, за счет использования стабильности рН при температуре ферментации в течение до 24 ч при производстве термостатного йогурта за счет использования улучшения текстуры и стабильности рН при упаковке при высокой температуре при производстве перемешанного йогурта или за счет использования стабильности рН при 10°C в течение по меньшей мере 45 дней при хранении ферментированного молока.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм *Streptococcus thermophilus*, содержащий аллель гена *lacZ*, который кодирует β-галактозидазу, где β-галактозидаза выбрана из группы, состоящей из:

а) β-галактозидазы, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2; и

б) варианта β-галактозидазы, содержащей аминокислотную последовательность, имеющую 95-100% идентичность с SEQ ID NO: 2, где последовательность указанной β-галактозидазы не содержит аргинин в положении 354.

2. Штамм *Streptococcus thermophilus* по п.1, где последовательность указанной β-галактозидазы состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет 95-100% идентичность с SEQ ID NO: 2.

3. Штамм *Streptococcus thermophilus* по п.1, где последовательность указанной β-галактозидазы содержит цистеин, аланин или серин в положении 354.

4. Пищевой или кормовой продукт, содержащий штамм *Streptococcus thermophilus* по п.1.

5. Способ производства ферментированного продукта, включающий:

а) инокуляцию субстрата штаммом *Streptococcus thermophilus* по п.1;

б) ферментацию инокулированного субстрата, полученного на стадии а), с получением ферментированного продукта.

6. Способ производства перемешанного йогурта, включающий:

а) ферментацию молочного субстрата, инокулированного штаммом *Streptococcus thermophilus* по п.1, для получения перемешанного йогурта;

б) охлаждение перемешанного йогурта;

с) упаковку перемешанного йогурта,

где температура охлаждения и упаковки составляет от 24 до 43°C.

7. Способ производства перемешанного йогурта, включающий:

а) ферментацию молочного субстрата, инокулированного штаммом *Streptococcus thermophilus* по п.1, для получения перемешанного йогурта;

б) упаковку перемешанного йогурта,

где способ не включает стадии охлаждения между концом ферментации и упаковкой.

8. Способ производства термостатного йогурта, включающий:

а) упаковку молочного субстрата, инокулированного штаммом *Streptococcus thermophilus* по п.1, в упаковки;

б) ферментацию инокулированного молочного субстрата для получения термостатного йогурта,

где указанный способ не включает стадию охлаждения в холодильной камере хранения после стадии ферментации б).

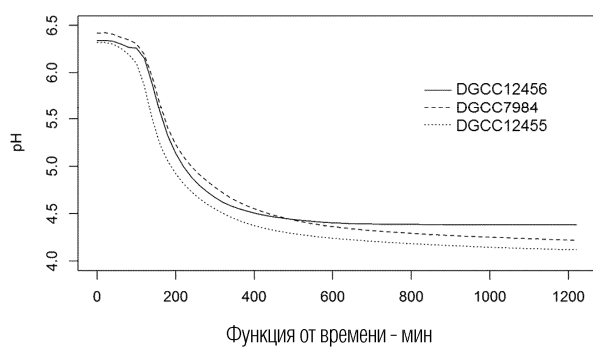
9. Способ получения штамма *Streptococcus thermophilus*, способного ферментировать молоко, где молоко не подвергается пост-подкислению при температуре ферментации, включающий:

а) получение штамма *Streptococcus thermophilus*;

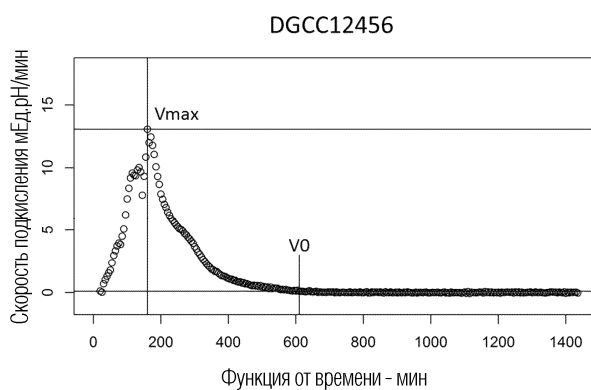
б) замену аллеля гена *lacZ* указанного штамма *Streptococcus thermophilus* на стадии а) аллелем *lacZ*, как определено в любом из пп.1-3; и

с) выделение штамма (штаммов) *Streptococcus thermophilus*.

A.

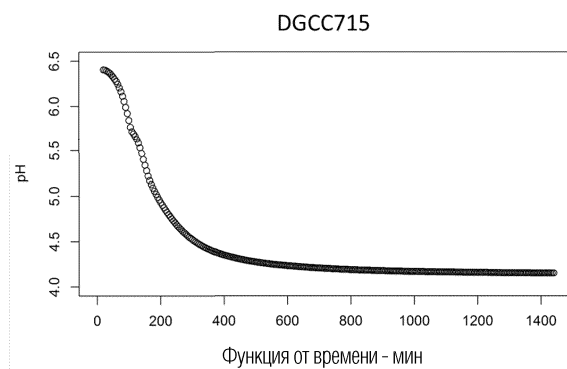


B.

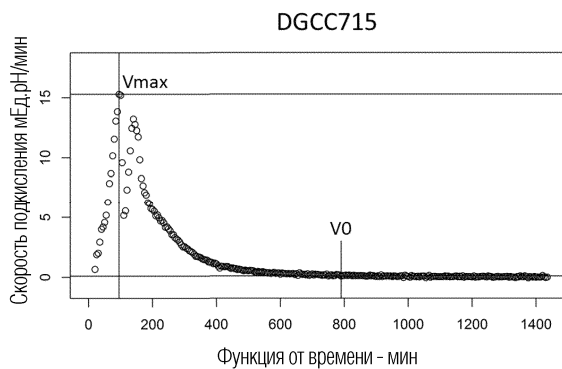


Фиг. 1

A.

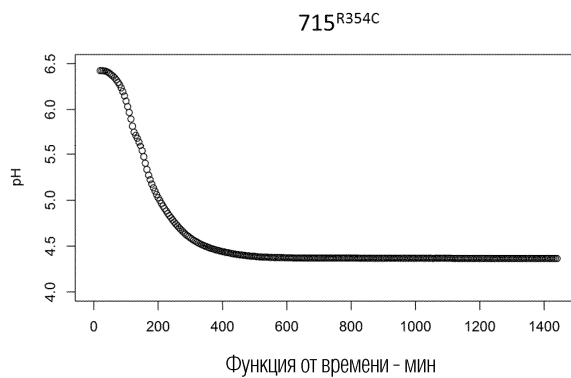


B.

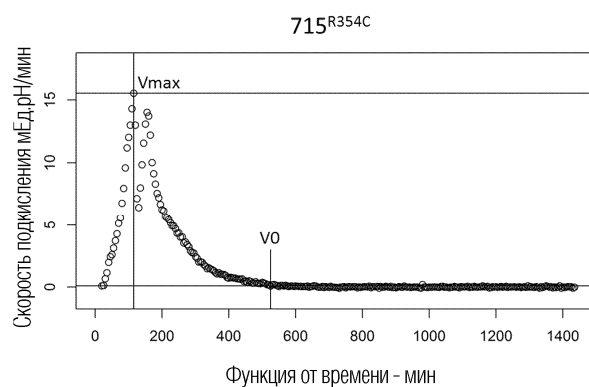


Фиг. 2

A.

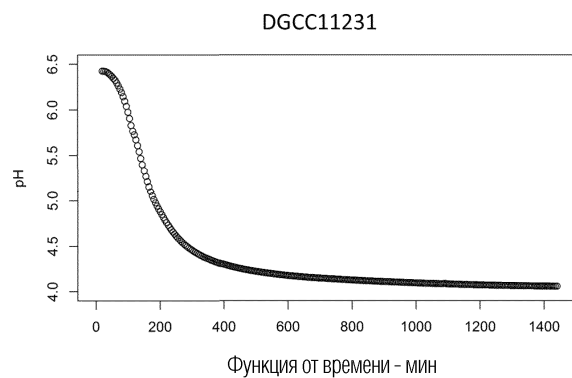


B.

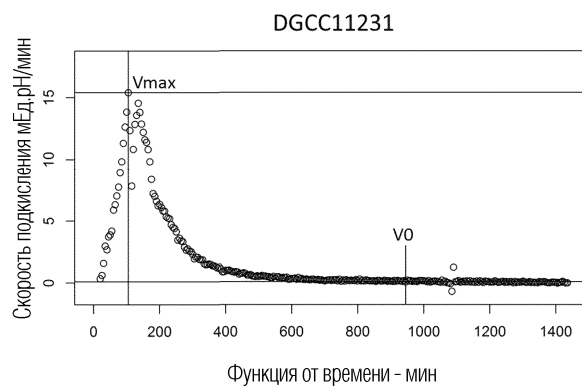


Фиг. 3

A.

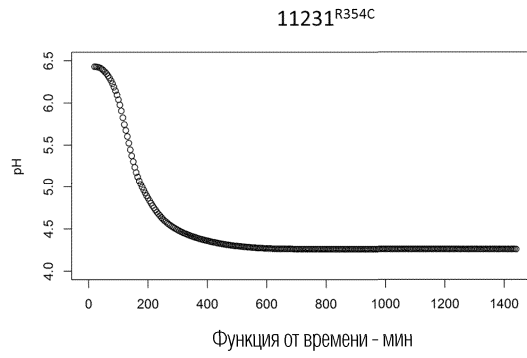


B.

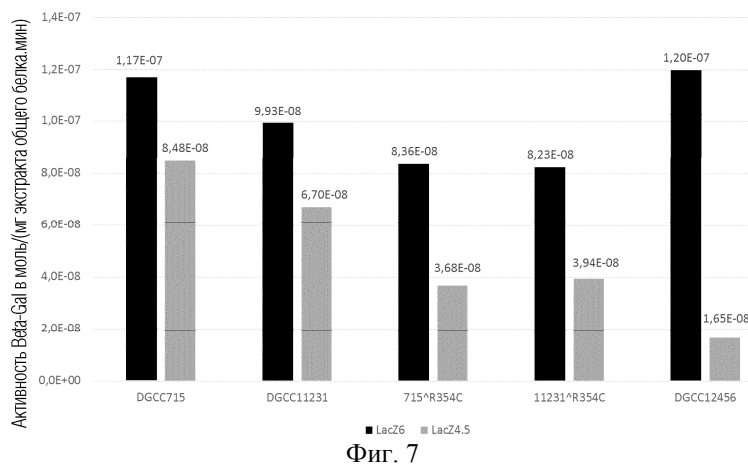
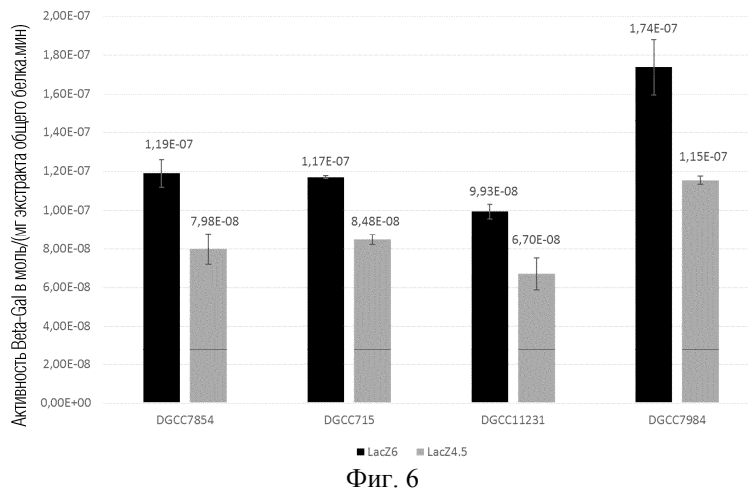
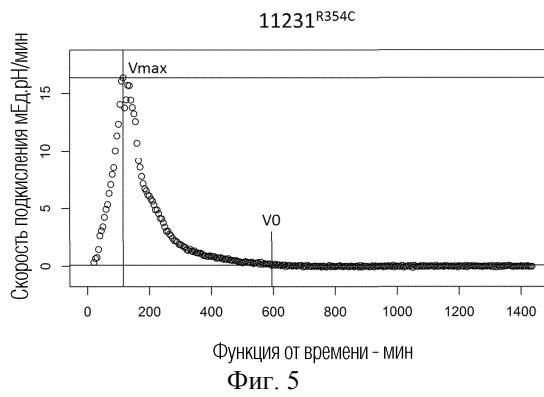


Фиг. 4

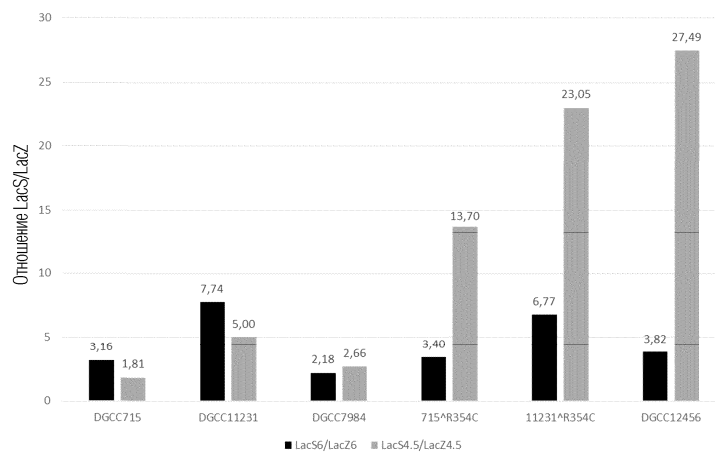
A.



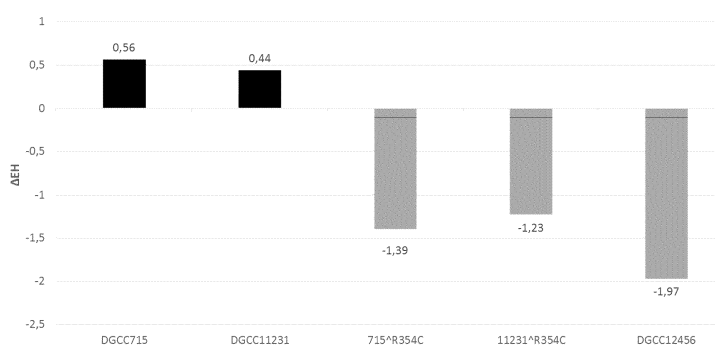
B.



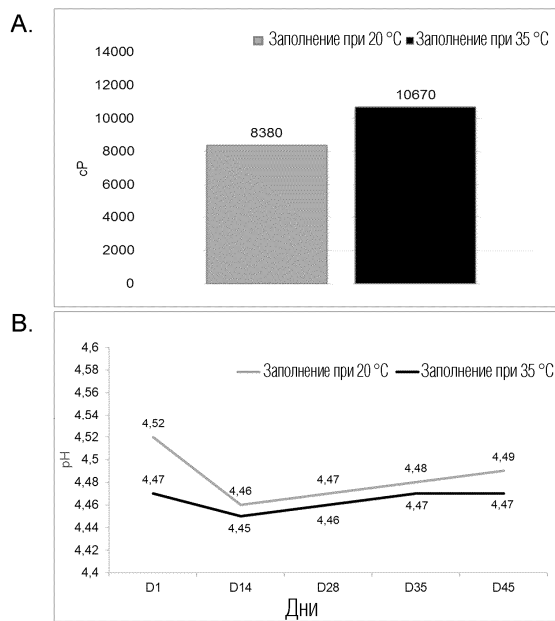
047191



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

