

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047359**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.07.09**

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

(21) Номер заявки  
**202190434**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.08.20**

---

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ УЛУЧШЕННОГО ФЕРМЕНТИРОВАННОГО МОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕГАТИВНОГО В ОТНОШЕНИИ СПОРУЛЯЦИИ ШТАММА *BACILLUS***

---

(31) **18189920.4**(32) **2018.08.21**(33) **EP**(43) **2021.05.26**(86) **PCT/EP2019/072249**(87) **WO 2020/038931 2020.02.27**

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

(72) Изобретатель:

**Кантор Метте Динес, Бьерре Карин,  
Могхадам Элахе Гханей, Гулдагер  
Хелле Сков, Дерке Патрик, Куэвас  
Патриси́я Домингес (DK)**

(74) Представитель:

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

(56) **WO-A1-2017005601****US-A1-2017369537**

**JEROEN SIEBRING ET AL:** "Repeated triggering of sporulation in *Bacillus subtilis* selects against a protein that affects the timing of cell division", **THE I S M E JOURNAL: MULTIDISCIPLINARY JOURNAL OF MICROBIAL ECOLOGY**, vol. 8, no. 1, 8 August 2013 (2013-08-08), pages 77-87, XP055521983, United Kingdom ISSN: 1751-7362, DOI: 10.1038/ismej.2013.128 the whole document  
**US-A1-2009011081**

**D MEHTA ET AL:** "Influence of proteolytic *Bacillus* spp. on sour cream characteristics", **J. ANIM. SCI.**, vol. 94, no. E-Suppl. 5, 9 November 2016 (2016-11-09), pages 264-265, XP055415057, DOI: 10.2527/jam2016-0555 paragraph [0555]

**US-A1-2015313951****US-A-5077063**

**KONURAY G; ERGINKAYA Z:** "Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry.", **FOODS**, vol. 7, no. 6, 92, 13 June 2018 (2018-06-13), pages 1-10, XP002786353, DOI: 10.3390/foods7060092 the whole document

**WO-A1-2019043085**

(57) Данное изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему: (а) предоставление молочного субстрата, (б) ферментирование указанного молочного субстрата заквасочной культурой молочнокислой бактерии, где стадию (б) проводят в присутствии по меньшей мере одного штамма *Bacillus*, выбранного из группы, состоящей из негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus subtilis* подв. natto, негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*, где негативный в отношении споруляции штамм представляет собой штамм, который не образует спор при подвергании следующему методу: 1) инокулирование 1% культуры тестируемого штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с настоем телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором, 2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при ее встряхивании при 200 об/мин и 3) анализ на споры на следующие сутки.

**B1****047359****047359****B1**

Настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему:

- (а) предоставление молочного субстрата,
- (б) ферментирование указанного молочного субстрата заквасочной культурой молочнокислой бактерии.

#### **Предшествующий уровень техники**

Пищевая промышленность использует многочисленные разные типы бактерий для получения пищевых продуктов. Для получения ферментированных молочных продуктов, таких как йогурты, сыр или пахта, чаще всего используются молочнокислые бактерии (LAB). LAB и их метаболические продукты значительно способствуют вкусу и консистенции ферментированных продуктов и ингибируют порчу пищи посредством образования значительных количеств молочной кислоты.

Штаммы LAB, которые в настоящее время используются пищевой промышленностью для получения ферментированных молочных продуктов, происходят из разных таксономических групп, например, родов *Streptococcus*, *Lacto-coccus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* и *Bifidobacterium*. Способность штаммов, используемых для ферментации, придавать молочным продуктам консистенцию в некоторой степени связана с продукцией полисахаридов. Не каждый штамм, который, как было обнаружено, имеет особенно подходящие характеристики ферментации, например, хороший профиль подкисления, также имеет хорошие характеристики придания консистенции. Следовательно, часто требуется улучшение консистенции ферментированных молочных продуктов.

В предшествующем уровне техники использовали разные подходы для улучшения консистенции таких продуктов. Например, в данный продукт после его производства можно добавлять добавки, такие как желатин, пектины, альгинаты, карбоксиметилцеллюлоза, камеди, крахмал и волокна [1]. Однако такие добавки обычно являются нежелательными в виду возрастающей потребности потребителей в продуктах с "чистой этикеткой".

Еще один другой подход для улучшения консистенции сосредоточен на оптимизации штаммов LAB, используемых в ферментации. Например, обнаружили то, что применение генетически модифицированных штаммов с повышенной галактокиназной активностью имеет значительное влияние на консистенцию продуктов, продуцируемых такими штаммами [2]. В то время как данные модифицированные штаммы являются высокоэффективными, большое число потребителей склонны к предпочтению встречающихся в природе штаммов в молочных продуктах.

Совместная ферментация LAB с бактериями, которые не принадлежат к группе LAB, до сих пор не привлекала большого внимания в молочной промышленности. Одна причина этого заключается в том факте, что LAB продуцируют во время ферментации большие количества молочной кислоты, что приводит к значительному снижению pH во время ферментации до 4-5. Большинство бактерий переносит только умеренные снижения pH, что делает их неподходящими для применения в получении ферментированных молочных продуктов.

Бактерии рода *Bacillus* обычно не используются для ферментации молочных продуктов. Тем не менее, есть некоторые доказательства того, что штаммы *Bacillus* использовали в прошлом для получения молочных продуктов, таких как йогурт. В ссылке [3] описано применение штаммов *Bacillus* для осуществления ферментации молочных продуктов, таких как йогурт, в отсутствие классических заквасочных культур LAB.

В ссылке [4] описано применение штамма *Bacillus subtilis* для получения ферментированного молочного продукта, который может иметь терапевтическую ценность. Сообщается о том, что антибактериальные вещества, продуцируемые штаммом *Bacillus*, дают продукт с длительным сроком хранения и предположительными терапевтическими свойствами.

В ссылке [5] описывается способ получения ферментированного молока с использованием *Bacillus subtilis*. Данный способ включает две последовательные стадии. На первой стадии молоко ферментируется с *Bacillus subtilis* в течение нескольких часов. На данном этапе белки в молоке деградируют до аминокислот или олигопептидов посредством протеаз *Bacillus*. Затем в молоко добавляют LAB, и ферментация продолжается, до достижения желаемого значения pH.

В ссылке [6] раскрыт способ получения йогурта с использованием штаммов *Bacillus licheniformis* или *Bacillus subtilis*, продуцирующих левансуказу.

В ссылке [7] описывается получение ферментированных молочных продуктов со вкусом сыра с использованием комбинации *Streptococcus thermophilus* и *Bacillus stercorothermophilus* с получением продукта с сырным вкусом.

Ссылка [8] представляет собой международную патентную заявку, в которой раскрыта совместная ферментация *Streptococcus thermophilus* с разными штаммами *Bacillus*, такими как *Bacillus subtilis* subsp. *natto*, для получения кисломолочного продукта.

Наконец, в ссылке [9] описываются эксперименты, в которых были проанализированы потенциальные эффекты загустения *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* на реологические и структурные свойства кислых густых сливок.

### Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему:

(а) предоставление молочного субстрата,

(б) ферментирование указанного молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислой бактерии, где стадию (б) проводят в присутствии по меньшей мере одного штамма *Bacillus*, выбранного из группы, состоящей из негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto*, негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*, где негативный в отношении споруляции штамм представляет собой штамм, который не образует спор при подвергании следующему методу:

1) инокулирование 1% тестируемой культуры штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с настоем телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором,

2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при встряхивании при 200 об/мин, и

3) анализ на споры на следующие сутки.

Главным препятствием в применении штаммов *Bacillus* в производстве ферментированных молочных продуктов является то, что многие штаммы *Bacillus* образуют споры, что является очень нежелательным в промышленном производстве ферментированных молочных продуктов. По одной этой причине вплоть до настоящего времени избегали применять штаммы *Bacillus* в производстве ферментированных молочных продуктов. Однако в настоящем изобретении теперь показали то, что возможно получать негативные в отношении споруляции штаммы *Bacillus* из позитивных в отношении споруляции материнских штаммов *Bacillus* с сильной способностью к приданию консистенции, у которых сохраняется или даже улучшается способность к приданию консистенции материнского штамма.

Также теперь неожиданно обнаружили то, что консистенция ферментированных молочных продуктов может быть значительно улучшена при ферментировании молочного субстрата заквасочной культурой молочнокислой бактерии в присутствии по меньшей мере одного негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* или по меньшей мере одного негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*. Обнаружили то, что указанные штаммы улучшают консистенцию и термофильных ферментированных молочных продуктов, таких как йогурт, и мезофильных ферментированных молочных продуктов, таких как кислые густые сливки. В частности, указанные штаммы улучшают консистенцию при измерении по сдвиговому напряжению и/или жесткости геля.

По-видимому, негативные в отношении споруляции мутанты штаммов видов *Bacillus* улучшают консистенцию, придаваемую молочному продукту посредством LAB. Механизм, посредством которого штаммы *Bacillus* оказывают данный эффект, не известен. Примечательно то, что сдвиговое напряжение и жесткость геля продуктов, изготовленных способом по изобретению, являются очень высокими и в некоторых случаях достигают в четыре раза большего уровня, чем соответствующее сдвиговое напряжение, достигаемое той же самой заквасочной культурой LAB без штамма *Bacillus*. Кроме того, здесь было показано то, что ферментация молочного субстрата LAB в присутствии *Bacillus* значительно уменьшает время, которое требуется для достижения целевого pH, например, 4,5. В этом смысле способ по изобретению помогает в снижении затрат, сопряженных со способом производства.

Примечательно то, что сдвиговое напряжение и жесткость геля продуктов, изготовленных способом по изобретению, являются очень высокими и в некоторых случаях больше, чем соответствующие сдвиговое напряжение и жесткость геля, достигаемые посредством соответствующего позитивного в отношении споруляции материнского штамма *Bacillus*. Подобным образом, время закисления в способе по изобретению является коротким и, в некоторых случаях, короче, чем соответствующее время закисления, достигаемое посредством соответствующего позитивного в отношении споруляции материнского штамма *Bacillus*.

Согласно вышеописанным неожиданным находкам штаммы негативных в отношении споруляции мутантов видов *Bacillus subtilis* subsp. *natto* или *Bacillus coagulans* можно использовать в качестве добавок в обычные мезофильные и термофильные заквасочные культуры LAB для улучшения консистенции ферментированных молочных продуктов, например, посредством увеличения сдвигового напряжения или жесткости геля (динамический модуль). Согласно настоящему изобретению предложены новые способы ферментации с использованием штаммов LAB и штаммов негативных в отношении споруляции мутантов *Bacillus subtilis* subsp. *natto* или *Bacillus coagulans*, а также заквасочные культуры, содержащие соответствующую комбинацию штаммов. Наконец, согласно настоящему изобретению предложены новые негативные в отношении споруляции штаммы *Bacillus subtilis* subsp. *natto* или *Bacillus coagulans*.

Еще не полностью понятно, как виды *Bacillus* влияют на свойства придания консистенции молочнокислыми бактериями. Однако, по-видимому, штаммы *Bacillus* в значительной степени не размножаются во время ферментации. Однако здесь было показано то, что значительный рост штаммов *Bacillus* не требуется для оказания положительного влияния на ферментацию LAB.

Настоящее изобретение дополнительно относится к штамму *Bacillus*, выбранному из группы, состоящей из *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и штамма *Bacillus coagulans*, который представляет собой негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма, где негативный в отношении споруляции штамм представляет собой штамм, который не образует споры при подвергании следующему методу:

1) инокулирование 1% культуры тестируемого штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с настоем телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором,

2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при встряхивании при 200 об/мин, и

3) анализ на споры на следующие сутки.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции для получения ферментированного молочного продукта, содержащей:

(а) заквасочную культуру молочнокислой бактерии и

(б) штамм *Bacillus*, выбранный из группы, состоящей из негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*, и где негативный в отношении споруляции штамм представляет собой штамм, который не образует спор при подвергании следующему методу:

1) инокулирование 1% культуры тестируемого штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с настоем телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором,

2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при встряхивании при 200 об/мин, и

3) анализ на споры на следующие сутки.

Настоящее изобретение дополнительно относится к ферментированному молочному продукту, получаемому способом по изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно относится к ферментированному молочному продукту, содержащему:

(а) заквасочную культуру молочнокислой бактерии и

(б) штамм *Bacillus*, выбранный из группы, состоящей из негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus subtilis* подв. *natto* и негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*, и где негативный в отношении споруляции штамм представляет собой штамм, который не образует спор при подвергании следующему методу:

1) инокулирование 1% культуры тестируемого штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с настоем телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором,

2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при встряхивании при 200 об/мин, и

3) анализ на споры на следующие сутки.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению штамма *Bacillus*, выбранного из группы, состоящей из негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*, для увеличения сдвигового напряжения, жесткости геля и/или твердости геля мезофильного ферментированного молочного продукта, и где негативный в отношении споруляции штамм представляет собой штамм, которые не образует спор при подвергании следующему методу:

1) инокулирование 1% культуры тестируемого штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с настоем телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором,

2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при встряхивании при 200 об/мин, и

3) анализ на споры на следующие сутки.

#### Определения

Термин "термофильный" здесь относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при температурах выше 35°C. Самые полезные в промышленности термофильные бактерии включают виды *Streptococcus* и виды *Lactobacillus*. Термин "термофильная ферментация" здесь относится к ферментации при температуре выше примерно 35°C, как, например, от примерно 35°C до примерно 45°C. Термин "термофильный ферментированный молочный продукт" относится к кислому молочным продуктам, полученным термофильной ферментацией термофильной заквасочной культуры, и включает такие кисло-молочные продукты, как термостатный йогурт, резервуарный йогурт и питьевой йогурт, например, якульт.

Термин "мезофильный" здесь относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при умеренных температурах (15°C-35°C). Самые полезные в промышленности мезофильные бактерии включа-

ют виды *Lactococcus* и виды *Leuconostoc*. Термин "мезофильная ферментация" здесь относится к ферментации при температуре от примерно 22°C до примерно 35°C. Термин "мезофильный ферментированный молочный продукт" относится к кисломолочным продуктам, полученным мезофильной ферментацией мезофильной заквасочной культуры, и включает такие кисломолочные продукты, как пахта, кислое молоко, сквашенное молоко, сметана, кислые густые сливки, кефир и свежий сыр, такой как кварк, творог и сливочный сыр.

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

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

До ферментации молочный субстрат может быть гомогенизирован и пастеризован согласно способам, известным в данной области.

Термин "гомогенизация" в том виде, в котором он здесь используется, означает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. При проведении гомогенизации до ферментации ее можно проводить таким образом, чтобы разрушать молочный жир до меньших размеров таким образом, что он больше не отделяется от молока. Это может осуществляться посредством пропускания молока под высоким давлением через маленькие отверстия.

Термин "пастеризация" в том виде, в котором он здесь используется, означает обработку молочного субстрата для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно пастеризация достигается поддержанием определенной температуры в течение определенного периода времени. Определенная температура обычно достигается посредством нагревания. Температуру и продолжительность можно выбирать для того, чтобы уничтожить или инактивировать определенные бактерии, такие как вредные бактерии. Затем может следовать стадия быстрого охлаждения.

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

Выражение "время закисления" означает период времени от начала ферментации до достижения целевого pH.

#### **Подробное описание изобретения**

Согласно данному изобретению предложен новый способ изготовления молочного продукта, который основан на ферментации субстрата с LAB в присутствии негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus*.

Штамм *Bacillus*.

Негативный в отношении споруляции штамм по изобретению можно получать с использованием в качестве материнского штамма любого штамма *Bacillus*, выбранного из группы любого штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и любого негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*.

В конкретном воплощении данного изобретения штамм *Bacillus* представляет собой негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма, выбранного из группы, состоящей из *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*.

В конкретном воплощении данного изобретения штамм *Bacillus* представляет собой негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма, выбранного из группы, состоящей из DSM 32588, DSM 32589 и DSM 32606.

В конкретном воплощении данного изобретения негативный в отношении споруляции штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto* выбран из группы, состоящей из DSM 32892, DSM 32893, DSM 32894, DSM 32895 и их мутантов. В предыдущем предложении термин "мутант" относится к штамму, который получают из одного из депонированных штаммов, раскрытых здесь, посредством, например, генной инженерии, радиации и/или химической обработки. Предпочтительно, что данный мутант представляет собой функционально эквивалентного мутанта, т.е. мутанта, который по существу имеет такие же или улучшенные свойства в отношении консистенции, сдвигового напряжения, вязкости, вязкоэластичности и/или жесткости геля, что и депонированный штамм, из которого он получен. В особенности, термин "мутант" относится к штаммам, полученным посредством подвергания штамма по изобретению любой традиционно используемой мутагенизирующей обработке, включающей обработку химическим мутагеном, таким как

этанметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ (ультрафиолетовый) светом, или к появляющемуся спонтанно мутанту. Мутант возможно был подвергнут нескольким мутагенизирующим обработкам (одну обработку следует понимать как одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/отбора), но в настоящее время предпочтительным является то, что проводят не более чем 20 или не более чем 10, или не более чем 5 обработок (или стадий скрининга/отбора). В предпочтительном в настоящее время мутанте менее чем 1%, в частности, менее чем 0,1%, менее чем 0,01%, более конкретно менее чем 0,001% и наиболее конкретно менее чем 0,0001% нуклеотидов в бактериальном геноме было заменено другим нуклеотидом или подвергнуто делеции по сравнению с материнским штаммом. В предпочтительном в настоящее время мутанте менее чем 50, в частности, менее чем 30, более конкретно менее чем 20, более конкретно менее чем 10 и наиболее конкретно менее чем 5 нуклеотидов в бактериальном геноме было заменено другим нуклеотидом или подвергнуто делеции по сравнению с материнским штаммом.

Негативный в отношении споруляции штамм по изобретению можно получать с использованием любого традиционного способа получения негативного в отношении споруляции мутантного бактериального штамма из позитивного в отношении споруляции материнского штамма.

Конкретный способ получения негативного в отношении споруляции мутантного бактериального штамма из позитивного в отношении споруляции материнского штамма включает следующие стадии:

- а) подвергание культуры материнского штамма способу обработки для мутагенеза,
- б) выращивание обработанной культуры на чашках с агаром с индуцирующей споруляцию средой и
- в) отбор колоний негативных в отношении споруляции мутантов на основе визуальной проверки.

Указанный способ обработки для мутагенеза может представлять собой любую традиционно используемую мутагенизирующую обработку, включающую обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), и УФ излучением. Мутант может быть подвергнут нескольким мутагенизирующим обработкам (одну обработку следует понимать как одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/отбора), но в настоящее время предпочтительным является то, что проводят не более чем 20 или не более чем 10, или не более чем 5 обработок (или стадий скрининга/отбора). В предпочтительном в настоящее время мутанте менее чем 1%, менее чем 0,1%, менее чем 0,01%, менее чем 0,001% и даже менее чем 0,0001% нуклеотидов в бактериальном геноме было заменено другим нуклеотидом или подвергнуто делеции по сравнению с материнским штаммом.

В конкретном воплощении данного изобретения указанный способ обработки для мутагенеза представляет собой УФ излучение.

Указанной индуцирующей споруляцию средой чашек с агаром может быть любая традиционная индуцирующая споруляцию среда, например, имеющаяся в продаже индуцирующая споруляцию среда.

Указанный отбор колоний негативных в отношении споруляции мутантов на основе визуальной проверки проводят таким образом, чтобы отобрать колонии, которые являются более бледными и/или более прозрачными по сравнению с колониями позитивных в отношении споруляции штаммов.

В настоящем изобретении термин "негативный в отношении споруляции штамм" означает штамм, который не образует спор при подвергании следующему методу:

1) инокулирование 1% культуры тестируемого штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с настоем телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором,

2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при встряхивании при 200 об/мин, и

3) анализ на споры на следующие сутки.

Указанной стандартной индуцирующей споруляцию средой может быть любая традиционная индуцирующая споруляцию среда, например, имеющаяся в продаже индуцирующая споруляцию среда.

Указанный анализ на споры может проводиться следующим способом:

а) нагревание 1 мл аликвот культуры штамма, подлежащей анализу, при 80°C в течение 10 мин,

б) получение 10-кратных разведений в воде с пептоном-солью и распределение 100 мкл каждого разведения образца, обработанного нагреванием, на чашках с кровяным агаром (ВА) (только позитивные в отношении споруляции штаммы могут расти после тепловой обработки),

в) инкубирование чашек с ВА агаром при 37°C, и

г) проверка роста через 24 и 48 часов.

Согласно данному изобретению ферментация молочного субстрата заквасочной культурой молочнокислой бактерии проводят в присутствии по меньшей мере одного штамма *Bacillus*, выбранного из группы, состоящей из негативного в отношении споруляции *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*. *Bacillus* представляет собой род грамположительных спорообразующих бактерий, которые на протяжении последних лет также привлекали внимание в пищевой промышленности. *Bacillus subtilis* subsp. *natto* известна как непатогенная бактерия, которая используется для изготовления традиционной японской ферментированной соевой пищи "натто". *Bacillus subtilis*

subsp. natto получила от FDA (Федеральное агентство США по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств) регистрацию GRAS ("общепризнанный безопасным") и может быть приобретена у разных изготовителей. *Bacillus coagulans* использовали в качестве пробиотика из-за ее заявляемой поддержки хорошего пищеварительного и иммунного здоровья. Она используется в некоторых пищевых продуктах, включая товары в виде выпечки, молочные продукты и зерновые продукты. *Bacillus coagulans* также получила от FDA регистрацию GRAS. Штаммы *Bacillus coagulans* имеются в продаже у разных изготовителей.

В конкретном воплощении данного изобретения классификацию бактерии как *Bacillus subtilis* subsp. natto согласно настоящему изобретению проводят посредством геномного секвенирования.

В конкретном воплощении данного изобретения классификацию бактерии как штамма *Bacillus coagulans* согласно настоящему изобретению проводят посредством геномного секвенирования.

Способ по изобретению.

Термин "ферментация" в том виде, как он здесь используется, означает превращение углеводов или сахаров в спирты или кислоты посредством действия микроорганизма. Предпочтительно ферментация в значении по настоящему изобретению включает превращение лактозы до молочной кислоты. Ферментация углеводов или сахаров молочнокислыми бактериями является особенно предпочтительной.

На стадии (а) способа по изобретению предложен молочный субстрат, подлежащий ферментации. Термин "молочный субстрат" относится к любому сырому и/или переработанному молочному продукту, который можно подвергать ферментации согласно способу по изобретению. Термин "молоко" в том виде, как он здесь используется, относится к секрету молочных желез, полученному доением млекопитающего, такого как корова, овца, коза, буйвол или верблюд. Термин "молоко" также включает растворы белка и/или жира, полученные из растительных веществ, в частности, соевое молоко. В предпочтительном воплощении настоящего изобретения молоко, используемое в способе по настоящему изобретению, представляет собой коровье молоко.

Полезные молочные субстраты включают растворы/суспензии молока или молокоподобных продуктов, содержащие белок, такие как цельное молоко или молоко с низким содержанием жира, обезжиренное молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, сыворотка, пермеат сыворотки, лактоза, маточная жидкость от кристаллизации лактозы, концентрат белка сыворотки или сливки, но не ограничиваются ими. Очевидно молочный субстрат может происходить от любого млекопитающего, например, представляя собой по существу чистое молоко млекопитающего или восстановленное сухое молоко.

На стадии (б) способа по изобретению молочный субстрат, выбранный для способа ферментации, ферментируется заквасочной культурой молочнокислой бактерии. Согласно настоящему изобретению "заквасочная культура молочнокислой бактерии" или "закваска молочнокислой бактерии" представляет собой композицию, которая включает один или более чем один штамм молочнокислой бактерии, который следует использовать для ферментации. Заквасочную культуру обычно поставляют либо в виде замороженной, либо лиофилизированной культуры для увеличения объема закваски, либо в виде так называемых культур "для прямого внесения" (DVS), т.е. культуры, предназначенной для прямой инокуляции в ферментационный сосуд или чан для получения молочного продукта, такого как кисломолочный продукт.

Перед ферментацией молочный субстрат можно подвергать гомогенизации или пастеризации. Термин "гомогенизация" относится к интенсивному перемешиванию для получения растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию проводят до ферментации, ее можно проводить таким образом, чтобы разрушать глобулы молочного жира в глобулы меньших размеров для предотвращения отделения жирового компонента от молока. Это может быть осуществлено посредством пропускания молока при высоком давлении через маленькие отверстия. Термин "пастеризация" относится к обработке молочного субстрата с уменьшением или устранением присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно пастеризация достигается посредством поддержания молочного субстрата при точно определенной температуре в течение точно определенного периода времени. Точно определенная температура обычно достигается нагреванием. Можно выбирать температуру и продолжительность для того, чтобы уничтожить или инактивировать определенные бактерии, такие как вредные бактерии. Затем может следовать стадия быстрого охлаждения.

В контексте настоящего изобретения термин "молочнокислая бактерия" означает грамположительную микроаэрофильную или анаэробную бактерию, которая ферментирует сахара и посредством этого продуцирует кислоты, включающие молочную кислоту, уксусную кислоту и пропионовую кислоту. Обычно кислотой, которая преимущественно продуцируется, является молочная кислота. Молочнокислые бактерии в пределах порядка "Lactobacillales", которые оказались полезными в промышленных целях, включают виды *Lactococcus*, виды *Streptococcus*, виды *Lactobacillus*, виды *Leuconostoc*, виды *Pseudoleuconostoc*, виды *Pediococcus*, виды *Brevibacterium*, виды *Enterococcus* и виды *Propionibacterium*. Молочнокислые бактерии также включают группу строго анаэробных бифидобактерий, т.е. виды *Bifidobacterium*. Их часто используют в виде одних пищевых культур или в комбинации с другими молочнокислыми бактериями.

В то время как молочный субстрат подлежит ферментации заквасочной культурой мезофильной молочнокислой бактерии в присутствии по меньшей мере одного штамма *Bacillus*, не будет обязательным, чтобы штамм *Bacillus* присутствовал на протяжении всего времени ферментации. Достаточным является то, что по меньшей мере один штамм *Bacillus* присутствует в течение значительной части ферментации, например, в течение по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% общего времени ферментации. Термин "время ферментации" в том виде, как он здесь используется, определяет период времени между инокуляцией молочного субстрата и достижением заданного pH.

Например, молочный субстрат может быть инокулирован заквасочной культурой молочнокислой бактерии с последующей инкубацией молочного субстрата в течение нескольких часов, например, в течение 1-5 ч, как, например, 2, 3 или 4 ч. Затем один или более чем один штамм *Bacillus* может быть добавлен в молочный субстрат, и ферментация может продолжаться в течение нескольких часов, пока не достигается желательный pH. С другой стороны, молочный субстрат сначала может быть инокулирован одним или более чем одним штаммом *Bacillus* и инокулирован в течение нескольких часов, предпочтительно 1-5 ч, как, например, 2, 3 или 4 ч, с последующим добавлением заквасочной культуры мезофильной молочнокислой бактерии. Последовательную инокуляцию молочного субстрата можно использовать как способ корректировки желательной консистенции твердости геля.

В особенно предпочтительном воплощении бактерии из заквасочной культуры молочнокислой бактерии и одного или более чем одного штамма *Bacillus* присутствуют в молочном субстрате в течение всего времени ферментации, что означает то, что заквасочная культура молочнокислой бактерии и один или более чем один штамм *Bacillus* инокулируются в молочный субстрат вместе в начале ферментации.

Данная заквасочная культура может содержать в качестве дополнительных компонентов криопротекторы и/или другие традиционные добавки, такие как красители, дрожжевые экстракты, сахара и витамины.

В конкретном воплощении заквасочная культура молочнокислой бактерии содержит по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*. Далее данное воплощение называется мезофильная заквасочная культура.

В конкретном воплощении заквасочная культура молочнокислой бактерии содержит по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*. Далее данное воплощение называется термофильная заквасочная культура.

Способ применения мезофильной заквасочной культуры.

Целью способа по изобретению является производство мезофильного ферментированного молочного продукта. "Мезофильный ферментированный молочный продукт" представляет собой молочный продукт, который был получен ферментацией мезофильными микроорганизмами и, в частности, мезофильными LAB. "Мезофильные" микроорганизмы имеют оптимум роста при умеренных температурах 15°C-40°C. Типичные LAB, которые считаются мезофильными, включают виды *Lactococcus* и виды *Leuconostoc*, но не ограничиваются ими. "Мезофильная ферментация" здесь относится к ферментации при температуре 15°C-35°C, предпочтительно 20°C-35°C и даже более предпочтительно 25°C-30°C. Типичные молочные продукты, которые считаются "мезофильными ферментированными молочными продуктами" включают пахту, кислое молоко, сквашенное молоко, сметану, кислые густые сливки и свежий сыр, такой как варк, творог и сливочный сыр, но не ограничиваются ими. В отличие от этого, "термофильные" микроорганизмы имеют оптимум роста при температурах выше 43°C. Термофильные LAB, которые используются в молочной промышленности, включают, среди прочих, виды *Streptococcus* и виды *Lactobacillus*. Соответственно, при "термофильной ферментации", которую проводят термофильными микроорганизмами, обычно используется температура выше 35°C. Термин "термофильный молочный продукт" относится к молочным продуктам, полученным ферментацией термофильными микроорганизмами и, в частности, термофильными LAB. Однако термофильные штаммы видов *Streptococcus* также используются для получения некоторых мезофильных ферментированных молочных продуктов, например, в комбинации с мезофильными штаммами видов *Lactococcus*, причем в данном случае предпочтительной является температура, например, 25-35°C, более предпочтительно 30-35°C.

Содержание жира молочного субстрата зависит от специфического субстрата, который используется. В предпочтительном воплощении изобретения данный способ используется для получения кислых густых сливок, что означает то, что молочным субстратом, используемым в данном способе, являются сливки, имеющие содержание жира от 6 до 45%, предпочтительно от 9 до 35%, более предпочтительно от 12 до 30%, более предпочтительно от 14 до 25% и наиболее предпочтительно от 16 до 22%.

Согласно данному изобретению заквасочная культура мезофильных молочнокислых бактерий включает по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*. В одном воплощении штамм *Lactococcus lactis* представляет собой штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. В другом воплощении штамм *Lactococcus lactis* представляет собой штамм *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Помимо по меньшей мере одного штамма *Lactococcus lactis*, данная заквасочная культура мезофильной молочнокислой бактерии может включать дополнительные мезофильные молочнокислые бак-

терии, такие как другие штаммы *L. lactis* subsp. *lactis* или *L. lactis* subsp. *cremoris*. В особенно предпочтительном воплощении заквасочная культура мезофильной молочнокислой бактерии включает один или более чем один штамм *L. lactis* subsp. *lactis* биовар. *diacetylactis*, который продуцирует вкусовые соединения. Альтернативно или дополнительно, данная мезофильная заквасочная культура может включать одну или более чем одну бактерию следующих родов: *Leuconostoc*, *Pseudoleuconostoc*, *Pediococcus* или *Lactobacillus*. Особенно предпочтительные примеры включают *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus paracasei*. Особенно предпочтительные примеры включают *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides* подв. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* и *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

В особенно предпочтительном воплощении данного изобретения заквасочная культура мезофильной молочнокислой бактерии не содержит молочнокислую бактерию, которая продуцирует экзополисахариды (EPS). В частности данная заквасочная культура мезофильной молочнокислой бактерии не содержит штамм *Streptococcus*, такой как штамм *Streptococcus thermophilus*.

Типично молочный субстрат, например, сливки для получения кислых густых сливок, инокулируют заквасочной культурой мезофильной молочнокислой бактерии таким образом, чтобы достигнуть концентрации жизнеспособных молочнокислых бактерий в молочном субстрате в интервале от  $10^4$  до  $10^{12}$  КОЕ (колониеобразующие единицы) на мл молочного субстрата, предпочтительно от  $10^5$  до  $10^{11}$  КОЕ на мл молочного субстрата, более предпочтительно от  $10^6$  до  $10^{10}$  КОЕ на мл молочного субстрата и даже более предпочтительно от  $10^7$  до  $10^9$  КОЕ на мл или от  $10^7$  до  $10^8$  КОЕ на мл молочного субстрата. Соответственно, концентрации жизнеспособных молочнокислых бактерий в молочном субстрате, например, в сливках для получения кислых густых сливок, может составлять по меньшей мере примерно  $10^4$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^5$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^6$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^7$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^8$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^9$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^{10}$  КОЕ на мл молочного субстрата или по меньшей мере примерно  $10^{11}$  КОЕ на мл молочного субстрата.

Когда заквасочная культура мезофильной молочнокислой бактерии содержит смесь двух или более чем двух разных бактерий, предпочтительно, что молочный субстрат, например, сливки для получения кислых густых сливок, инокулируют для достижения концентрации штаммов *Lactococcus lactis* в молочном субстрате по меньшей мере примерно  $10^3$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^4$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^5$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^6$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^7$  КОЕ на мл молочного субстрата или по меньшей мере примерно  $10^8$  КОЕ на мл молочного субстрата.

Штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto* или *Bacillus coagulans* будет инокулирован в молочный субстрат, например, в сливки для получения кислых густых сливок, таким образом, что после инокуляции концентрация штамма *Bacillus* будет сравнимой с концентрацией, перечисленной выше в контексте заквасочной культуры мезофильной молочнокислой бактерии. Это означает то, что молочный субстрат, например, сливки для получения кислых густых сливок, инокулируют одним или более чем одним штаммом *Bacillus* таким образом, чтобы достигать концентрации жизнеспособных бактерий *Bacillus* перечисленных видов в молочном субстрате в интервале от  $10^4$  до  $10^{12}$  КОЕ на мл молочного субстрата, предпочтительно от  $10^5$  до  $10^{11}$  КОЕ на мл молочного субстрата, более предпочтительно от  $10^6$  до  $10^{10}$  КОЕ на мл молочного субстрата и даже более предпочтительно от  $10^7$  до  $10^9$  КОЕ на мл или от  $10^7$  до  $10^8$  КОЕ на мл молочного субстрата. Соответственно, концентрация жизнеспособных бактерий *Bacillus* перечисленных видов в молочном субстрате может составлять по меньшей мере примерно  $10^4$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^5$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^6$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^7$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^8$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^9$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^{10}$  КОЕ на мл молочного субстрата или по меньшей мере примерно  $10^{11}$  КОЕ на мл молочного субстрата.

Особенно предпочтительно, что один или более чем один штамм *Bacillus* добавляют в молочный субстрат в концентрации от  $10^7$  до  $10^8$  КОЕ/мл молочного субстрата. В другом предпочтительном воплощении штамм *Bacillus*, используемый в способе по настоящему изобретению, продуцирует значительные количества витамина К.

После инокуляции заквасочной культуры мезофильной молочнокислой бактерией и одним или более чем одним штаммом *Bacillus* молочный субстрат инкубируют при подходящих условиях для размножения мезофильной молочнокислой бактерии. Это предпочтительно будет включать температуру 15-35°C, более предпочтительно 20-35°C и даже более предпочтительно 25-35°C, как, например, 26-34°C. Конкретная температура, подлежащая применению во время ферментации, будет, главным образом, зависеть от мезофильного ферментированного молочного продукта, который следует получить. Например, когда данный способ применяется для получения кислых густых сливок, температура во время фермен-

тации будет составлять 26-34°C, предпочтительно 28-32°C.

В общем, ферментированный молочный продукт, который получают способом по настоящему изобретению, может представлять собой любой тип молочного продукта, который обычно получают посредством мезофильной ферментации. Однако в предпочтительном воплощении мезофильный ферментированный молочный продукт выбран из группы, состоящей из кислых густых сливок, кислого молока, пахты, сквашенного молока, сметаны, кوارка, творога, свежего сыра и сливочного сыра. В предпочтительном воплощении мезофильный ферментированный молочный продукт представляет собой кислые густые сливки.

Ферментацию проводят, пока молочный субстрат не достигнет желаемого рН, который обычно составляет от рН 4,0 до 5,0 и предпочтительно от рН 4,5 до 4,8. Таким образом, рН будет отслеживаться во время способа ферментации, и ферментация будет остановлена при измерении в ферментационном сосуде заданного рН. В зависимости от концентрации заквасочной культуры и продукта, подлежащего изготовлению, ферментация может занимать 5-24 ч, предпочтительно 5-20 ч, более предпочтительно 5-16 ч, более предпочтительно 5-14 ч, более предпочтительно 6-12 ч, более предпочтительно 7-11 ч и наиболее предпочтительно 8-10 ч.

После ферментации ферментированный молочный продукт можно охлаждать и дополнительно обрабатывать. Например, в зависимости от типа кисломолочного продукта, обработка может включать, например, инкубацию продукта, полученного после ферментации, с ферментами, такими как химозин и пепсин. Когда кисломолочным продуктом является сыр, обработка также может включать разрезание сгустка на частицы сырной массы. Обработка данного продукта также может включать упаковку кисломолочного продукта. Подходящей упаковкой может быть бутылка, картонная упаковка или тому подобное, имеющая объем, например, от 50 мл до 1000 мл.

Способ по изобретению имеет конкретное преимущество в том, что при применении заквасочной культуры мезофильной молочнокислой бактерии совместно со штаммом *Bacillus*, выбранным из группы, состоящей из штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* или штамма *Bacillus coagulans*, в получении мезофильного ферментированного молочного продукта, такого как кислые густые сливки, могут быть значительно улучшены свойства консистенции образующегося молочного продукта, в частности, вязкость, сдвиговое напряжение и жесткость геля.

Предпочтительно посредством применения способа, как здесь определено, можно получать увеличение сдвигового напряжения, жесткости геля и/или твердости геля ферментированного молочного продукта по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450% или по меньшей мере на 500% относительно ферментации такого же молочного субстрата при идентичных условиях в отсутствие какого-либо штамма *Bacillus*.

В одном предпочтительном воплощении увеличение сдвигового напряжения ферментированного молочного продукта составляет по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 30 Па по отношению к соответствующему ферментированному молочному продукту, полученному ферментацией такого же молочного субстрата при идентичных условиях в отсутствие какого-либо штамма *Bacillus*.

В другом предпочтительном воплощении увеличение жесткости геля ферментированного молочного продукта составляет по меньшей мере 25, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250 Па или по меньшей мере 300 Па по отношению к соответствующему ферментированному молочному продукту, полученному ферментацией такого же молочного субстрата при идентичных условиях в отсутствие какого-либо штамма *Bacillus*.

В еще одном другом предпочтительном воплощении увеличение твердости геля ферментированного молочного продукта составляет по меньшей мере 50 (г×с), по меньшей мере 75 (г×с), по меньшей мере 100 (г×с), по меньшей мере 125 (г×с), по меньшей мере 150 (г×с), по меньшей мере 175 (г×с) или по меньшей мере 200 (г×с).

В конкретном воплощении изобретения сдвиговое напряжение измеряют способом, определенным в примере 2.

В конкретном воплощении изобретения жесткость геля определяют как динамический модуль с использованием способа, определенного в примере 2.

В особенно предпочтительном воплощении данного изобретения вышеописанный способ относится к изготовлению густых кислых сливок. Соответственно, в особенно предпочтительном воплощении предложен способ получения густых кислых сливок, включающий:

- (а) предоставление сливок, имеющих содержание жира по меньшей мере 6%,
- (б) инокулирование указанных сливок заквасочной культурой мезофильной молочнокислой бактерии, содержащей по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis* и, возможно, дополнительные мезо-

фильные молочнокислые бактерии,

(в) инокулирование указанных сливок по меньшей мере одним штаммом *Bacillus*, выбранным из группы, состоящей из штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и штамма *Bacillus coagulans*,

(г) ферментирование указанных сливок, пока pH не достигает 4,0-5,0, более предпочтительно 4,5-4,6,

(д) получение кислых густых сливок.

На первой стадии приведенного выше способа предложены сливки в качестве молочного субстрата. Сливки, используемые для способа изготовления кислых густых сливок, предпочтительно получают из коровьего молока. Содержание жира данных сливок будет составлять по меньшей мере 6%, что является обычным содержанием жира для сливок, которые используются в производстве кислых густых сливок. Типично содержание жира стандартизируют перед ферментацией для соответствия нормативам по пищевым продуктам. Во время стандартизации в сливки можно добавлять сухие ингредиенты, такие как сыворотка или казены. Если подлежат добавлению стабилизаторы, их также можно добавлять на этой стадии способа получения. Подходящие стабилизаторы включают, например, полисахариды, крахмал и желатин.

Затем сливки предпочтительно подвергают гомогенизации для того, чтобы разрушать большие глобулы жира на меньшие глобулы, предоставляя, посредством этого, однородную суспензию в предупреждение отделения сыворотки. Гомогенизацию сливок можно проводить в стандартном гомогенизаторе, который традиционно используют в молочной промышленности. Условия гомогенизации могут включать давление от 10 до 20 МПа, предпочтительно от 13 до 15 МПа и температуру от 50 до 80°C, предпочтительно от 65°C до 75°C. В конкретном воплощении гомогенизацию проводят за два этапа при 15-20 МПа и 65°C-75°C на первой стадии и 3-6 МПа и 65°C-75°C на второй стадии.

После гомогенизации сливки могут подвергаться пастеризации для уничтожения потенциально вредных бактерий. Предпочтительно пастеризацию проводят как высокотемпературную кратковременную (HTST) пастеризацию, что обычно означает то, что сливки нагревают до 80-90°C и инкубируют при данной температуре в течение примерно 2-10 мин, в частности, 2-5 мин. После пастеризации сливки охлаждают до выбранной температуры ферментации для инокуляции заквасочной культурой мезофильной молочнокислой бактерии.

Сливки затем инокулируют заквасочной культурой мезофильной молочнокислой бактерии, как определено выше, которая содержит по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis* и, возможно, дополнительные мезофильные молочнокислые бактерии. Обычно данные сливки инокулируют 0,01-0,02% заквасочной культуры. Инокулированные сливки затем обычно инкубируют в течение примерно 12-18 ч, пока не достигается pH от 4,5 до 4,6. Как только достигается заданный pH, ферментированный сметанный продукт охлаждают и упаковывают.

Композиция, содержащая мезофильную заквасочную культуру.

Конкретное воплощение данного изобретения относится к композиции для получения мезофильного ферментированного молочного продукта, содержащей

(а) заквасочную культуру молочнокислой бактерии, содержащую по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis* и

(б) штамм *Bacillus*, выбранный из группы, состоящей из негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*, и где негативный в отношении споруляции штамм представляет собой штамм, который не образует спор при подвергании следующему методу:

1) инокулирование 1% культуры тестируемого штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с настоем телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором,

2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при встряхивании при 200 об/мин, и

3) анализ на споры на следующие сутки.

Данная композиция может быть приготовлена для того, чтобы подходить для непосредственной инокуляции молочного субстрата или другой культуральной среды перед ферментацией.

Ферментированный молочный продукт, содержащий мезофильную заквасочную культуру.

Конкретное воплощение данного изобретения относится к мезофильному ферментированному молочному продукту, получаемому способом по изобретению.

Конкретное воплощение данного изобретения относится к мезофильному ферментированному молочному продукту, содержащему

(а) заквасочную культуру молочнокислой бактерии, содержащую штамм *Lactococcus lactis* и

(б) штамм *Bacillus*, выбранный из группы, состоящей из негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*, и где негативный в отношении споруляции штамм представляет собой штамм, который не образует спор при подвергании следующему методу:

1) инокулирование 1% культуры тестируемого штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с на-

стою телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором,

2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при встряхивании при 200 об/мин, и

3) анализ на споры на следующие сутки.

Штамм *Lactococcus lactis*, который присутствует в мезофильной композиции по изобретению или в мезофильном ферментированном молочном продукте по изобретению, предпочтительно выбран из группы, состоящей из *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* или *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Помимо по меньшей мере одного штамма *Lactococcus lactis* композиция по изобретению или мезофильный ферментированный молочный продукт по изобретению может включать дополнительные мезофильные молочнокислые бактерии, такие как другие штаммы *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* биовар. *diacetylactis* или *L. lactis* subsp. *cremoris*. В качестве альтернативы, композиция по изобретению или мезофильный ферментированный молочный продукт по изобретению может включать мезофильные бактерии рода *Leuconostoc*, *Pseudoleuconostoc*, *Pediococcus* или *Lactobacillus*. Особенно предпочтительные примеры включают *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus paracasei*. Особенно предпочтительные примеры включают *Leuconostoc mesenteroides* подв. *cremoris*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides* подв. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* и *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

Мезофильный ферментированный молочный продукт по изобретению предпочтительно выбран из группы, состоящей из кислых густых сливок, кислого молока, пахты, сквашенного молока, сметаны, кварка, творога, свежего сыра и сливочного сыра, и наиболее предпочтительно представляет собой кислые густые сливки.

Способ с использованием термофильной заквасочной культуры.

"Термофильный" микроорганизм имеет оптимум роста при температурах выше 43°C. Термофильные LAB, которые используются в молочной промышленности, включают, среди прочих, виды *Streptococcus* и виды *Lactobacillus*. Соответственно, в "термофильной ферментации", которую проводят термофильными микроорганизмами, обычно используют температуру выше 35°C. Термин "термофильный молочный продукт" относится к молочным продуктам, полученным ферментацией термофильными микроорганизмами и, в частности, термофильными LAB.

Для применения в способе по изобретению подходят самые традиционные заквасочные культуры, используемые для получения разных типов кисломолочных продуктов. Предпочтительными заквасочными культурами являются заквасочные культуры, которые продуцируют кисломолочные продукты с хорошей консистенцией и/или текстурой. Также предпочтительным является то, что продуцированный кисломолочный продукт является устойчивым к последующей тепловой обработке.

В предпочтительном воплощении данного изобретения заквасочная культура содержит один или более чем один штамм молочнокислой бактерии (LAB), выбранный из группы, состоящей из штаммов молочнокислых бактерий из порядка "Lactobacillales". Предпочтительно данная заквасочная культура содержит один или более чем один штамм молочнокислой бактерии (LAB), выбранный из группы, состоящей из видов *Lactococcus*, видов *Streptococcus*, видов *Lactobacillus*, видов *Leuconostoc*, видов *Pseudoleuconostoc*, видов *Pediococcus*, видов *Brevibacterium*, видов *Enterococcus* и видов *Propionibacterium*.

Типично молочный субстрат инокулируют заквасочной культурой мезофильной молочнокислой бактерии таким образом, чтобы достиг концентрации жизнеспособных молочнокислых бактерий в молочном субстрате в интервале от  $10^4$  до  $10^{12}$  КОЕ (колониеобразующие единицы) на мл молочного субстрата, предпочтительно от  $10^5$  до  $10^{11}$  КОЕ на мл молочного субстрата, более предпочтительно от  $10^6$  до  $10^{10}$  КОЕ на мл молочного субстрата и даже более предпочтительно от  $10^7$  до  $10^9$  КОЕ на мл или от  $10^7$  до  $10^8$  КОЕ на мл молочного субстрата. Соответственно, концентрации жизнеспособных молочнокислых бактерий в молочном субстрате, например, в сливках для получения кислых густых сливок, может составлять по меньшей мере примерно  $10^4$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^5$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^6$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^7$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^8$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^9$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^{10}$  КОЕ на мл молочного субстрата или по меньшей мере примерно  $10^{11}$  КОЕ на мл молочного субстрата.

Когда заквасочная культура термофильной молочнокислой бактерии содержит смесь двух или более чем двух разных бактерий, предпочтительным является то, что молочный субстрат инокулируют для достижения концентрации штамма *Streptococcus thermophilus* в молочном субстрате по меньшей мере примерно  $10^3$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^4$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^5$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^6$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^7$  КОЕ на мл молочного субстрата или по меньшей мере примерно  $10^8$  КОЕ на мл молочного субстрата.

Штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto* или *Bacillus coagulans* будут инокулированы в молочный суб-

страт таким образом, что после инокуляции концентрация штамма *Bacillus* будет сравнимой с концентрацией, перечисленной выше в контексте заквасочной культуры термофильной молочнокислой бактерии. Это означает то, что молочный субстрат инокулируют одним или более чем одним штаммом *Bacillus* таким образом, чтобы достичь концентрации жизнеспособных бактерий *Bacillus* перечисленных видов в молочном субстрате в интервале от  $10^4$  до  $10^{12}$  КОЕ на мл молочного субстрата, предпочтительно от  $10^5$  до  $10^{11}$  КОЕ на мл молочного субстрата, более предпочтительно от  $10^6$  до  $10^{10}$  КОЕ на мл молочного субстрата и даже более предпочтительно от  $10^7$  до  $10^9$  КОЕ на мл или от  $10^7$  до  $10^8$  КОЕ на мл молочного субстрата. Соответственно, концентрация жизнеспособных бактерий *Bacillus* перечисленных видов в молочном субстрате может составлять по меньшей мере примерно  $10^4$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^5$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^6$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^7$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^8$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^9$  КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере примерно  $10^{10}$  КОЕ на мл молочного субстрата или по меньшей мере примерно  $10^{11}$  КОЕ на мл молочного субстрата.

Особенно предпочтительным является то, что один или более чем один штамм *Bacillus* добавляют в молочный субстрат в концентрации от  $10^7$  до  $10^8$  КОЕ/мл молочного субстрата. В другом предпочтительном воплощении штамм *Bacillus*, используемый в способе по настоящему изобретению, продуцирует значительные количества витамина К.

В способе по изобретению предпочтительным является то, что заквасочная культура имеет такую подкисляющую способность, что ферментированный молочный продукт достигает pH 4,3 менее чем за 12 ч, предпочтительно менее чем за 10 ч, более предпочтительно менее чем за 9 ч, более предпочтительно менее чем за 8 ч и наиболее предпочтительно менее чем за 7 ч.

В предпочтительном воплощении способа по изобретению целевой pH составляет от 3,80 до 4,39, предпочтительно от 3,80 до 4,38, предпочтительно от 3,80 до 4,37, более предпочтительно от 3,80 до 4,36, более предпочтительно от 3,80 до 4,35, более предпочтительно от 3,80 до 4,34, более предпочтительно от 3,80 до 4,33, более предпочтительно от 3,80 до 4,32, более предпочтительно от 3,80 до 4,31, более предпочтительно от 3,80 до 4,30, более предпочтительно от 3,90 до 4,30 и наиболее предпочтительно от 4,00 до 4,30.

В предпочтительном воплощении данного изобретения молочный субстрат, используемый для ферментации с заквасочной культурой, имеет содержание белка от 1% по массе (мас./мас.) до 8,0% по массе (мас./мас.), предпочтительно от 1,2% по массе (мас./мас.) до 7,0% по массе (мас./мас.), наиболее предпочтительно от 1,4% по массе (мас./мас.) до 6,0% по массе (мас./мас.), предпочтительно от 1,6% по массе (мас./мас.) до 5,0% по массе (мас./мас.), предпочтительно от 1,8% по массе (мас./мас.) до 4,5% по массе (мас./мас.) и наиболее предпочтительно от 2,0% по массе (мас./мас.) до 4,0% по массе (мас./мас.).

В предпочтительном воплощении изобретения молочный субстрат, используемый для ферментации с заквасочной культурой, имеет содержание жира от 1% по массе (мас./мас.) до 8,0% по массе (мас./мас.), предпочтительно от 1,2% по массе (мас./мас.) до 7,0% по массе (мас./мас.), более предпочтительно от 1,4% по массе (мас./мас.) до 6,0% по массе (мас./мас.), предпочтительно от 1,6% по массе (мас./мас.) до 5,0% по массе (мас./мас.), предпочтительно от 1,8% по массе (мас./мас.) до 4,5% по массе (мас./мас.) и наиболее предпочтительно от 2,0% по массе (мас./мас.) до 4,0% по массе (мас./мас.).

В предпочтительном воплощении концентрация инокулированных клеток *Streptococcus thermophilus* составляет от  $10^4$  до  $10^9$  КОЕ клеток *Streptococcus thermophilus* на мл молочного субстрата, как, например, от  $10^4$  КОЕ до  $10^8$  КОЕ клеток *Streptococcus thermophilus* на мл молочного субстрата.

Предпочтительно посредством применения способа, как здесь определено, можно получать увеличение сдвигового напряжения, жесткости геля и/или твердости геля ферментированного молочного продукта по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450% или по меньшей мере на 500% по отношению к ферментации такого же молочного субстрата при идентичных условиях в отсутствие любого штамма *Bacillus*.

В одном предпочтительном воплощении увеличение сдвигового напряжения ферментированного молочного продукта составляет по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 30 Па по отношению к соответствующему ферментированному молочному продукту, полученному ферментацией такого же молочного субстрата при идентичных условиях в отсутствие любого штамма *Bacillus*.

В другом предпочтительном воплощении увеличение жесткости геля ферментированного молочного продукта составляет по меньшей мере 25, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250 Па или по меньшей мере 300 Па по отношению к соответствующему ферментированному молочному продукту, полученному ферментацией такого же молочного субстрата при идентичных условиях в отсутствие любого штамма *Bacillus*.

В еще одном другом предпочтительном воплощении увеличение твердости геля ферментированного молочного продукта составляет по меньшей мере 50 (г×с), по меньшей мере 75 (г×с), по меньшей мере 100 (г×с), по меньшей мере 125 (г×с), по меньшей мере 150 (г×с), по меньшей мере 175 (г×с) или по меньшей мере 200 (г×с).

В конкретном воплощении данного изобретения сдвиговое напряжение измеряют способом, определенном в примере 2.

В конкретном воплощении данного изобретения жесткость геля определяют как динамический модуль с использованием способа, определенного в примере 2.

Композиция, содержащая термофильную заквасочную культуру.

Композиция для получения термофильного ферментированного молочного продукта, содержащая:

(а) заквасочную культуру молочнокислой бактерии, содержащую по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, и

(б) штамм *Bacillus*, выбранный из группы, состоящей из негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus subtilis subsp. natto* и негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*, и где негативный в отношении споруляции штамм представляет собой штамм, который не образует спор при подвергании следующему методу:

1) инокулирование 1% культуры тестируемого штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с настоем телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором,

2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при встряхивании при 200 об/мин, и

3) анализ на споры на следующие сутки.

Ферментированный молочный продукт, содержащий термофильную заквасочную культуру.

Термофильный кисломолочный продукт по настоящему изобретению относится к кисломолочным продуктам, полученным термофильной ферментацией термофильной заквасочной культуры, и он выбран из группы, включающей термостатный йогурт, резервуарный йогурт и питьевой йогурт, например, якульт.

Конкретное воплощение данного изобретения относится к термофильному ферментированному молочному продукту, содержащему:

(а) заквасочную культуру молочнокислой бактерии, содержащую по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, и

(б) штамм *Bacillus*, выбранный из группы, состоящей из негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus subtilis subsp. natto* и негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus coagulans*, и где негативный в отношении споруляции штамм представляет собой штамм, который не образует спор при подвергании следующему методу:

1) инокулирование 1% культуры тестируемого штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с настоем телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором,

2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при встряхивании при 200 об/мин, и

3) анализ на споры на следующие сутки.

### Примеры

Пример 1. Получение негативных в отношении споруляции мутантов *Bacillus subtilis subsp. natto* DSM 32589.

В качестве материнского штамма использовали *Bacillus subtilis subsp. natto* DSM 32589. Негативных в отношении споруляции мутантов данного материнского штамма получали посредством УФ (ультрафиолетовое излучение) мутагенеза с последующей селекцией негативного в отношении споруляции фенотипа и анализом стабильности.

Материалы:

Среда для споруляции Difco (DSM) (на литр):

Питательный бульон для бактерий (Difco 234000)	8 г
10% (масс./об.) KCl	10 мл
1,2% (масс./об.) MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10 мл
Агар	15 г
1 М NaOH	порядка 1,5 мл (рН до 7,6)

Довести объем до 1 литра дважды дистиллированной H<sub>2</sub>O. Довести рН до 7,6. Автоклавировать и обеспечить охлаждение до 50°C, если следует использовать немедленно. Непосредственно перед применением добавить следующие растворы, подвергнутые стерилизующей фильтрации:

1 M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 мл (23,62 г/100 мл, в зависимости от мол. массы)
0,01 M MnCl <sub>2</sub>	1 мл (0,31 г/100 мл с 4 H <sub>2</sub> O)
1 mM FeSO <sub>4</sub>	1 мл (0,051 г/100 мл с 7 H <sub>2</sub> O)

Селекция:

4×4 мл неразведенной культуры материнского штамма помещали в открытые чашки Петри, помещали в УФ-сшиватель (Amersham Life Science) и подвергали воздействию наибольшего возможного эффекта, 70 мДж/см<sup>2</sup> в течение четырех разных временных схем: 2 мин, 5 мин, 2×5 мин и 4×5 мин. Осуществляли круговое перемещение чашек Петри каждые 5 мин для того, чтобы избежать избыточного нагревания культуры.

Сразу после облучения УФ 2×1 мл клеток инокулировали в 2×5 мл бульоне с настоем телятины (VIB), Difco 234420. Жизнеспособность клеток после облучения УФ определяли посредством высевания 10-кратных разведений в двух повторностях на чашки с кровавым агаром (ВА). И чашки, и пробирки инкубировали в течение ночи при 37°C в темноте (175 об/мин для пробирок).

Таблица 1

Образец	ОП (оптическая плотность) в течение ночи	КОЕ/мл T=0: 3,4×10exp07	% выживших
2 мин	4,886	6,2×10exp06	18,2
5 мин	4,642	4,3×10exp06	12,6
2×5 мин	3,900	2,4×10exp06	7,1
4×5 мин	4,507	6,9×10exp04	0,2

Каждый из четырех образцов депонировали в созданную своими силами коллекцию культур.

Два пула образцов полученных под влиянием УФ мутантов 2×5 мин и 4×5 мин распределяли на агаре, индуцирующем споруляцию (Difco Sporulation Medium, DSM) и инкубировали при 37°C в течение 3 суток. Негативный в отношении споруляции фенотип идентифицировали как лизированные колонии или колонии, выглядящие более бледными/более прозрачными, чем позитивные в отношении споруляции колонии. Из образца 2×5 мин получали четыре негативных в отношении споруляции колонии, а из образца 4×5 мин получали 23 негативных в отношении споруляции колонии. Отобранные колонии распределяли на DSM агаре для чистоты и проверяли на споры посредством микроскопии.

Отбирали пять колоний из образца 4×5 мин и позднее депонировали как DSM 32892, DSM 32893, DSM 32894, DSM 32895 и DSM 33182.

Анализ стабильности:

Все полученные штаммы подвергали анализу стабильности.

Анализ стабильности проводили в 96-глубоколуночных микропланшетах с квадратными лунками.

Осуществляли четыре ежесуточных переноса на свежий бульон, индуцирующий споруляцию, 500 мкл на лунку (Difco Sporulation Medium, DSM), инкубирование при 37°C, встряхивание при 200 об/мин. Анализ на споры осуществляли после последнего переноса.

Кроме того, осуществляли прогон на протяжении выходных (3-суточный рост) с использованием среды DSM, 37°C, 200 об/мин.

Анализ на споры:

Две аликвоты по 75 мкл каждого штамма нагревали при 90°C в течение 15 мин и при 80°C в течение 10 мин в ПЦР-циклере. Для каждого штамма и для каждой тепловой обработки 10 мкл наносили в виде пятен на ВА агар и проверяли на рост через 24 и 48 ч при 37°C - расти будут только позитивные в отношении споруляции штаммы. Все штаммы были согласованно негативными в отношении споруляции, также при проверке микроскопией.

Секвенирование:

У двух из штаммов: DSM 32892 и DSM 32893 осуществляли секвенирование генома.

Результаты для DSM 32892: 2 мутации в генах, для которых неизвестно, что они связаны со споруляцией.

Результаты для DSM 32893: 1 мутация в гене spo0F, для которого известно, что он является важным для споруляции. 1 мутация в области между 2 генами, для которых неизвестно, что они связаны со споруляцией.

Пример 2. Негативный в отношении споруляции *Bacillus subtilis* subsp. *natto* уменьшает время закисления и улучшает реологию во время получения кислых густых сливок.

15 из негативных в отношении споруляции штаммов *Bacillus subtilis* subsp. *natto*, полученных в Примере 1, анализировали на их свойства придания консистенции в маложирной сметане в совместной культуре с мезофильной заквасочной культурой (далее именуемой МО-1). Четыре штамма происходили из образца 2×5 мин примера 1, и 11 штаммов происходили из образца 4×5 мин примера 1. Анализировали

все пять штаммов, депонированных как DSM 32892, DSM 32893, DSM 32894, DSM 32895 и DSM 33182.

Штаммы.

Мезофильная закваска (МО-1): лактококковая заквасочная культура, содержащая целый ряд штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и целый ряд штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Молочный субстрат.

Таблица 2

Ингредиент	Состав конечной основы	Методика
Сливки (9% и 38%), концентрат молочного белка 85%	9% жира 5% белка	Гомогенизация: 20/8 МПа 70°C Тепловая обработка: 85°C, 3 минуты

Ферментация.

Ферментацию проводили в 200 мл молочной основы маложирной сметаны при температуре 30°C, пока не был достигнут целевой pH 4,55. Данный pH измеряли pH-электродами. Культуру МО-1 добавляли в молочный субстрат в концентрации 0,01%. Добавляли штаммы *Bacillus* в молочный субстрат с достижением конечного числа клеток  $10^8$  клеток на мл.

Измерения.

Динамический модуль и сдвиговое напряжение.

Через двое суток после получения кисломолочный продукт доводили до 13°C и вручную осторожно перемешивали посредством ложки (5 раз) до гомогенности образца. Реологические свойства данного образца анализировали на реометре (реометр Anton Paar Physica с ASC - автоматическая смена образца, Anton Paar® GmbH, Австрия) с использованием чашки с грузом. В данном реометре была установлена постоянная температура 13°C на протяжении времени измерения. Установки были следующими:

Время выдерживания (для воссоздания в некоторой степени исходной структуры) - 5 мин без какого-либо физического напряжения (осцилляция или вращение), приложенного к образцу.

Стадия осцилляции (для измерения модуля эластичности и вязкости -  $G'$  и  $G''$ , соответственно, следовательно, рассчитывая динамический модуль  $G^*$ ):

Постоянная относительная деформация - 0,3%, частота (f) - [0,5... 8] Гц,

6 точек измерения за 60 с (один раз каждые 10 с).

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

Разработали две стадии:

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

Каждая стадия содержала 21 точку измерения за 210 с (по одной каждые 10 с).

Для дальнейшего анализа было выбрано сдвиговое напряжение в точке пика кривых потока.

Динамический модуль -  $G^*$  - представляет собой параметр, который выражает жесткость геля.

Результаты - закисление.

Таблица 3

	Время до рН 4,55 (часы, минуты)	Разница во времени до рН 4,55 по сравнению с одной МО-1
МО-1	11 ч	
DSM 32589 (материнский штамм в Примере 1)	9 ч	-2 ч
DSM 32982	9 ч	-2 ч
DSM 32983	8ч 30 мин	-2 ч 30 мин
Spo(-) мутант 1	8ч 30 мин	-2 ч 30 мин
Spo(-) мутант 2	8ч 30 мин	-2 ч 30 мин
Spo(-) мутант 3	10 ч	-1 ч
Spo(-) мутант 5	9 ч	-2 ч
Spo(-) мутант 9	8ч 30 мин	-2 ч 30 мин
Spo(-) мутант 13	8ч 30 мин	-2 ч 30 мин
DSM 32894	9 ч	-2 ч
DSM 33182	8 ч	-3 ч
Spo(-) мутант 20	8 ч	-3 ч
Spo(-) мутант 22	8 ч	-3 ч
Spo(-) мутант 24	8 ч	-3 ч
Spo(-) мутант 26	8 ч	-3 ч
DSM 32895	8 ч	-3 ч

Spo(-): негативный в отношении споруляции.

Как будет очевидно из табл. 3, время закисления значительно снижается для всех 15 культуральных смесей, содержащих негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, по сравнению с заквасочной культурой без штамма *Bacillus*. Кроме того, время закисления значительно ниже для 14 из 15 культуральных смесей, содержащих негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, по сравнению с заквасочной культурой с позитивным в отношении споруляции материнским штаммом DSM 32589.

Результаты - способность к приданию консистенции.

Таблица 4

	Сдвиговое напряжение при 30,2 Гц (Па)	Сдвиговое напряжение при 300 Гц (Па)	Динамический модуль $G^*$ при 2,64 Гц (Па)
МО-1	90,00	104,00	699
DSM 32589 (материнский штамм в Примере 1)	95,6	111,00	883
DSM 32892	95,40	108,00	801
DSM 32893	93,30	106,00	775
Spo(-) мутант 1	95,50	106,00	788
Spo(-) мутант 2	95,90	106,00	805
Spo(-) мутант 3	103,00	113,00	878
Spo(-) мутант 5	106,00	113,00	937
Spo(-) мутант 9	96,50	104,00	798
Spo(-) мутант 13	98,300	107,00	819
DSM 32894	102,00	109,00	908
DSM 33182	98,90	106,00	813
Spo(-) мутант 20	107,00	110,00	897
Spo(-) мутант 22	104,00	109,00	884
Spo(-) мутант 24	101,00	106,00	831
Spo(-) мутант 26	105,00	108,00	903
DSM 32895	107,00	111,00	946

Spo(-): негативный в отношении споруляции.

Как будет очевидно из табл. 4, сдвиговое напряжение и динамический модуль (жесткость геля) значительно возросли для всех 15 культуральных смесей, содержащих негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, по сравнению с заквасочной культурой без штамма *Bacillus*. Кроме того, для сдвигового напряжения при 30,2 Гц данное сдвиговое напряжение значительно выше для 13 из 15 смесей культур, содержащих негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, по сравнению с заквасочной культурой с позитивным в отношении споруляции материнским штаммом DSM 32589. Кроме того, для сдвигового напряжения при 300 Гц данное сдвиговое напряжение для всех 15 культуральных смесей, содержащих негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, находится на том же самом уровне по сравнению с заквасочной культурой с позитивным в отношении споруляции материнским штаммом DSM 32589. Кроме того, динамический модуль значительно выше для 6 из 15 культуральных смесей, содержащих негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, по сравнению с заквасочной культурой с позитивным в отношении споруляции материнским штаммом DSM 32589.

В целом, способность к приданию консистенции 15 негативных в отношении споруляции мутантов позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589 находится на том же самом уровне, что и высокий уровень позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589.

Пример 3. Негативный в отношении споруляции *Bacillus subtilis* subsp. *natto* уменьшает время закисления и улучшает реологию во время получения йогурта 15 негативных в отношении споруляции штаммов *Bacillus subtilis* подв. *natto*, полученных в примере 1 (те же самые 15 штаммов, проанализированных в примере 2), анализировали на их свойства придания консистенции в йогуртовом молочном субстрате в совместной культуре с имеющейся в продаже термофильной заквасочной культурой Yoflex Premium 1.0 (далее именуемой Premium).

Штаммы.

Заквасочная культура термофильного йогурта: имеющаяся в продаже Yoflex Premium 1.0, содержащая целый ряд штаммов *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Молочный субстрат.

Таблица 5

Ингредиент	Количество	Состав	Методика
Обезжиренное сухое молоко и вода	9,5%	0,1% жира 2,5% белка	Тепловая обработка 98°C, 30 минут

Ферментация.

Ферментацию проводили при температуре 43°C, до достижения целевого pH 4,55. pH измеряли посредством pH-электродов. Добавляли в молочный субстрат штаммы *Bacillus* с достижением конечного числа клеток  $10^8$  клеток на мл.

Измерения.

Динамический модуль и сдвиговое напряжение.

Динамический модуль и сдвиговое напряжение измеряли таким же образом, как и в примере 2.

Результаты - закисление.

Таблица 6

	Время до pH 4,55 (часы, минуты)	Разница во времени до pH 4,55 по сравнению с одной Premium
Premium	6ч 10 мин	
DSM 32589 (материнский штамм в Примере 1)	5 ч 05 мин	-1 ч 05 мин
DSM 32892	5 ч 30 мин	-40 мин
DSM 32893	5 ч 30 мин	-40 мин
Spo(-) мутант 1	6 ч 00 мин	-10 мин
Spo(-) мутант 2	6 ч 00 мин	-10 мин
Spo(-) мутант 3	5 ч 30 мин	-40 мин
Spo(-) мутант 5	6 ч 20 мин	+10 мин
Spo(-) мутант 9	6 ч 00 мин	-10 мин
Spo(-) мутант 13	5 ч 45 мин	-25 мин
DSM 32894	5 ч 45 мин	-25 мин
DSM 33182	5 ч 20 мин	-50 мин
Spo(-) мутант 20	6 ч 15 мин	+05 мин
Spo(-) мутант 22	5 ч 30 мин	-40 мин
Spo(-) мутант 24	5 ч 40 мин	-30 мин
Spo(-) мутант 26	5 ч 40 мин	-30 мин
DSM 32895	5 ч 40 мин	-30 мин

Spo(-): негативный в отношении споруляции.

Как будет очевидно из табл. 6, время закисления значительно уменьшается для всех 13 из 15 смесей культур, содержащих негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, по сравнению с заквасочной культурой без штамма *Bacillus*. Кроме того, время закисления слегка выше для 15 смесей культур, содержащих негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, по сравне-

нию с заквасочной культурой с позитивным в отношении споруляции материнским штаммом DSM 32589.

Результаты - способность к приданию консистенции.

Таблица 7

	Сдвиговое напряжение при 30,2 Гц (Па)	Сдвиговое напряжение при 300 Гц (Па)	Динамический модуль G* при 2,64 Гц (Па)
Premium	23,80	39,20	117
DSM 32589 (материнский штамм в Примере 1)	26,30	47,90	118
DSM 32892	29,80	54,20	120
DSM 32893	27,20	50,40	112
Spo(-) мутант 1	30,60	53,10	129
Spo(-) мутант 2	28,90	51,40	128
Spo(-) мутант 3	29,70	51,20	123
Spo(-) мутант 5	30,00	50,60	134
Spo(-) мутант 9	29,40	51,20	124
Spo(-) мутант 13	28,80	51,50	124
DSM 32894	26,30	50,70	112
DSM 33182	26,90	51,70	112
Spo(-) мутант 20	29,10	49,90	128
Spo(-) мутант 22	27,10	50,70	116
Spo(-) мутант 24	26,50	49,30	111
Spo(-) мутант 26	27,50	51,10	120
DSM 32895	29,10	52,40	125

Spo(-): негативный в отношении споруляции.

Как будет очевидно из табл. 7, сдвиговое напряжение как при 30,2 Гц, так и при 300 Гц было значительно повышенным для всех 15 культуральных смесей, содержащих негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, по сравнению с заквасочной культурой без штамма *Bacillus*. Также динамический модуль был повышенным для всех 11 культуральных смесей, содержащих негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, по сравнению с заквасочной культурой без штамма *Bacillus*.

Кроме того, сдвиговое напряжение как при 30,2 Гц, так и при 300 Гц было значительно повышенным для всех 15 культуральных смесей, содержащих негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, по сравнению с заквасочной культурой с позитивным в отношении споруляции материнским штаммом DSM 32589. Кроме того, динамический модуль значительно выше для 10 из 15 культуральных смесей, содержащих негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, по сравнению с заквасочной культурой с позитивным в отношении споруляции материнским штаммом DSM 32589.

В целом, способность к приданию консистенции 15 негативных в отношении споруляции мутантов позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589 находится на даже более высоком уровне, чем высокий уровень позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589.

Пример 4. Негативный в отношении споруляции штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto* DSM 33181 уменьшает время закисления и улучшает реологию во время получения йогурта.

Штамм, депонированный как DSM 33181 представляет собой один из 23 плюс 4 штаммов, полученных в примере 1. Данный штамм анализировали в отношении времени закисления и сдвигового напряжения 1) в сокультуре с мезофильной заквасочной культурой для получения кислых густых сливок и 2) в сокультуре с йогуртовой заквасочной культурой для получения йогурта. Для сравнения использовали соответствующие заквасочные культуры без какого-либо штамма *Vacillus* и с позитивным в отношении споруляции материнским штаммом *Vacillus*.

Для получения кислых густых сливок мезофильная заквасочная культура, молочный субстрат, методика ферментации и измерения являются такими же, как описано в примере 2. Для получения йогурта йогуртовая заквасочная культура, молочный субстрат, методика ферментации и измерения являются такими же, как описано в примере 3.

Результаты - закисление.

Таблица 8

	Различие во времени до pH 4,55 по сравнению с MO-1 или одной Premium (часы)
MO-1	
MO-1 + DSM 32589 (материнский штамм в Примере 1)	-1,26 ч
MO-1 + DSM 33181	-0,50 ч
Premium	
Premium + DSM 32589 (материнский штамм в Примере 1)	-1,84 ч
Premium + DSM 33181	-2,34 ч

Как будет очевидным из табл. 8, время закисления значительно уменьшается и для культуральной смеси, содержащей DSM 33181, и для культуральной смеси, содержащей позитивный в отношении споруляции материнский штамм DSM 32589, по сравнению с заквасочной культурой без штамма *Vacillus*.

Результаты - способность к приданию консистенции.

Таблица 9

	Сдвиговое напряжение при 75,2 Гц (Па)	Сдвиговое напряжение при 300 Гц (Па)
MO-1	118,0	104,0
MO-1 + DSM 32589 (материнский штамм в Примере 1)	131,0	116,0
MO-1 + DSM 33181	121,0	109,0
Premium	38,1	42,3
Premium + DSM 32589 (материнский штамм в Примере 1)	42,7	52,2
Premium + DSM 33181	44,1	54,1

Как будет очевидно из табл. 9, сдвиговое напряжение как при 75,2 Гц, так и при 300 Гц значимо возросло для культуральной смеси, содержащей DSM 33181, и для культуральной смеси, содержащей позитивный в отношении споруляции материнский штамм DSM 32589, по сравнению с заквасочной культурой без штамма *Vacillus*.

#### Депонирования и экспертное заключение

Штамм *Vacillus subtilis* subsp. *natto*, депонированный в Институте Лейбница DSMZ-Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany 16.08.2017 г. под номером доступа DSM 32588.

Штамм *Vacillus subtilis* subsp. *natto*, депонированный в Институте Лейбница DSMZ-Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany 23.08.2017 г. под номером доступа DSM 32606.

Штамм *Vacillus subtilis* subsp. *natto*, депонированный в Институте Лейбница DSMZ-Немецкой кол-

лекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany 16.08.2017 г. под номером доступа DSM 32589.

Штамм *Bacillus subtilis* subsp. natto, депонированный в Институте Лейбница DSMZ-Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany 08.08.2018 г. под номером доступа DSM 32892.

Штамм *Bacillus subtilis* subsp. natto, депонированный в Институте Лейбница DSMZ-Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany 08.08.2018 г. под номером доступа DSM 32893.

Штамм *Bacillus subtilis* subsp. natto, депонированный в Институте Лейбница DSMZ-Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany 08.08.2018 г. под номером доступа DSM 32894.

Штамм *Bacillus subtilis* subsp. natto, депонированный в Институте Лейбница DSMZ-Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany 08.08.2018 г. под номером доступа DSM 32895.

Штамм *Bacillus subtilis* subsp. natto, депонированный в Институте Лейбница DSMZ-Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany 19.06.2019 г. под номером доступа DSM 33181.

Штамм *Bacillus subtilis* subsp. natto, депонированный в Институте Лейбница DSMZ-Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany 19.06.2019 г. под номером доступа DSM 33182.

Данные депонирования были сделаны согласно условиям Будапештского соглашения по международному признанию депонирования микроорганизмов в целях патентной процедуры.

Заявитель ходатайствует о том, что образец депонированных микроорганизмов должен быть сделан доступным только для эксперта, одобренного заявителем.

#### Ссылки

[1] Tasneem et al. (2013) *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 54(7):869-79.

[2] WO 2011/026863

[3] US 2009/0011081 A1

[4] US 5077063

[5] CN 103300147 A

[6] CN 103190478 A

[7] US 3674508

[8] WO 2017/005601 A

[9] Mehta et al. (2016), *Journal of Animal Science*, vol. 94 No. supplement 5,

p. 264-265

Все ссылки, процитированные в данном патентном документе, являются тем самым включенными во всей их полноте посредством ссылки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения ферментированного молочного продукта, включающий:

(а) предоставление молочного субстрата,

(б) ферментирование указанного молочного субстрата заквасочной культурой молочнокислой бактерии,

где стадию (б) проводят в присутствии по меньшей мере одного негативного в отношении споруляции штамма *Bacillus subtilis* subsp. natto, где указанный штамм *Bacillus* представляет собой негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма DSM 32589, и где негативный в отношении споруляции штамм представляет собой штамм, который не образует спор при подвергании следующему методу:

1) инокулирование 1% культуры тестируемого штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с настоем телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором,

2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при встряхивании при 200 об/мин, и

3) анализ на споры на следующие сутки.

2. Способ по п.1, при котором негативный в отношении споруляции штамм *Bacillus subtilis* subsp.

natto выбран из группы, состоящей из DSM 32892, DSM 32893, DSM 32894 и DSM 32895.

3. Способ по п.1 или 2, при котором заквасочная культура молочнокислой бактерии содержит штамм *Streptococcus thermophilus* и штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

4. Способ по п.3, при котором ферментированный молочный продукт выбран из группы, состоящей из термостатного йогурта, резервуарного йогурта и питьевого йогурта.

5. Способ по пп.1-4, при котором заквасочная культура молочнокислой бактерии содержит штамм *Lactococcus lactis*.

6. Способ по п.5, в котором ферментированный молочный продукт представляет собой мезофильный ферментированный молочный продукт, выбранный из группы, состоящей из кислых густых сливок, кислого молока, пахты, сквашенного молока, сметаны, квarka, творога, свежего сыра и сливочного сыра.

7. Негативный в отношении споруляции мутант позитивного в отношении споруляции материнского штамма *Bacillus subtilis subsp. natto* DSM 32589, где негативный в отношении споруляции штамм представляет собой штамм, который не образует спор при подвергании следующему методу:

1) инокулирование 1% культуры тестируемого штамма, выращенной в течение ночи в бульоне с настоем телятины (VIB) при 37°C, 180 об/мин, в 50 мл стандартной среды, индуцирующей споруляцию, содержащейся в 500 мл встряхиваемой колбе с дефлектором,

2) обеспечение роста инокулированной среды в течение ночи при 37°C при встряхивании при 200 об/мин, и

3) анализ на споры на следующие сутки.

8. Композиция для получения ферментированного молочного продукта, содержащая:

(а) заквасочную культуру молочнокислой бактерии и

(б) негативный в отношении споруляции мутантный штамм *Bacillus subtilis subsp. natto* по п.7.

9. Ферментированный молочный продукт, содержащий

(а) заквасочную культуру молочнокислой бактерии и

(б) негативный в отношении споруляции мутантный штамм *Bacillus subtilis subsp. natto* по п.7.

10. Применение негативного в отношении споруляции мутантного штамма *Bacillus subtilis subsp. natto* по п.7 для увеличения сдвигового напряжения, жесткости геля и/или твердости геля мезофильного ферментированного молочного продукта.

