

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491366** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.18

(22) Дата подачи заявки
2022.11.23

(51) Int. Cl. **C08B 37/00** (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)
A23L 29/00 (2016.01)
A23L 29/30 (2016.01)
A23K 10/18 (2016.01)
A23L 33/135 (2016.01)
C12P 19/04 (2006.01)

(54) ПОЛИСАХАРИДЫ, ПРИВОДЯЩИЕ К УЛУЧШЕНИЮ ВОДОУДЕРЖИВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

(31) **21210446.7**

(32) **2021.11.25**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/082940**

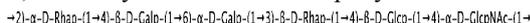
(87) **WO 2023/094430 2023.06.01**

(71) Заявитель:
КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:
**Польсен Вера Кузина, Гаспар Паула,
Йенсен Кристиан, Невес Руте, Зейдан
Ахмад (DK)**

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

(57) В настоящем изобретении предложены структуры EPS (экзополисахарид), идентифицированные по их повторяющемуся звену, соответствующие кластеры генов eps и штаммы, продуцирующие такие EPS, которые обеспечивают нужное сочетание водоудерживающей способности, текстуры и скорости подкисления. В изобретении также предложены способы применения EPS и штаммов, продуцирующих такие EPS, для получения пищевых продуктов.



A1

202491366

202491366

A1

PCT/EP2022/082940

C08B 37/00 (2006.01) *A23L 29/30* (2016.01)
C08L 5/00 (2006.01) *A23K 10/18* (2016.01)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)
C12 R 1/46 (2006.01) *C12P 19/04* (2006.01)
A23L 29/00 (2016.01)

ПОЛИСАХАРИДЫ, ПРИВОДЯЩИЕ К УЛУЧШЕНИЮ ВОДОУДЕРЖИВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым внеклеточным полисахаридам, приводящим к улучшению водоудерживающей способности молочных продуктов, и к бактериальным штаммам, продуцирующим такие полисахариды. Эти полисахариды и штаммы также позволяют сохранять необходимые свойства напряжения сдвига и времени подкисления, которые в противном случае трудно совместить с высокой водоудерживающей способностью.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Молочные компании постоянно ищут пути оптимизации своего производства, например инвестируя в оптимизацию энергопотребления, меняя ассортимент своей продукции или улучшая использование потоков отходов. Одним из решений для повышения выхода продукта, то есть получения большего количества продукта из заданного количества молока, является использование заквасок, способных удерживать больше влаги в сыре.

Повышенная водоудерживающая способность позволяет сыроделам производить больше сыра из того же количества молока, тем самым, среди других преимуществ, снижая выбросы углекислого газа от своей продукции. В результате производство сыра становится более устойчивым: клиенты сокращают свои затраты, а также уменьшаются выбросы CO₂. Таким образом, повышение водоудерживающей способности обеспечивает снижение синерезиса в кисломолочных продуктах и повышает выход сыра. В промышленных масштабах даже относительно небольшое процентное улучшение водоудерживающей способности может привести к значительной экономии с точки зрения как финансовых, так и экологических затрат.

Использование заквасок, продуцирующих полисахариды, может способствовать увеличению водоудерживающей способности ферментированного молока, что приводит к

снижению уровня отделения сыворотки (синерезиса) в йогурте и увеличению содержания влаги и выхода сыра (Amatayakul et al., 2006).

Следовательно, в промышленности существует острая потребность в полисахаридах и штаммах, продуцирующих такие полисахариды, обеспечивающие высокую водоудерживающую способность, и в то же время отвечающих всем другим релевантным критериям для коммерчески полезных штаммов, таким как текстура и скорость подкисления.

Существует чрезвычайно большое разнообразие возможных полисахаридных структур (идентифицируемых по их повторяющимся звеньям), определяемых по их сахарным структурным блокам, аномерной конфигурации, гликозидной связи, несхарным элементам моносахаридов и конформации.

Выбор подходящих полисахаридов и культур, продуцирующих полисахариды, для использования в ферментированных молочных продуктах зависит от многочисленных факторов, таких как функциональность получаемого полисахарида, тип продукта и процесс производства. Например, в контексте настоящего изобретения, подходящие полисахариды должны обладать нужной водоудерживающей способностью, а также должны соответствовать другим критериям, чтобы быть коммерчески полезными. Важно, что полисахариды, которые приводят к превосходной текстуре, не подходят для производства такого сыра, как моцарелла. Следовательно, подходящие полисахариды должны сочетать высокую водоудерживающую способность с относительно низким напряжением сдвига, чтобы избежать образования вязкой сыворотки в процессе производства сыра, что приводит к проблемам. Кроме того, штаммы, продуцирующие такие полисахариды, должны быть способны относительно быстро подкислять молоко, т.е. быстро достигать рН 4,5 во время ферментации. Медленная ферментация связана с более длительным временем ожидания, более высокими затратами и повышенной вероятностью загрязнения нежелательными микроорганизмами.

Внеклеточные полисахариды могут продуцироваться как в виде неприкрепленного вещества, выделяющегося в окружающую среду, которое часто называют экзополисахаридом (EPS), так и в виде капсулы, прикрепленной к поверхности бактерий, называемой капсульными полисахаридами или CPS (Zeidan et al., 2017). CPS менее склонны к увеличению вязкости сыворотки по сравнению с вязким EPS, поэтому они более благоприятны для применения в изготовлении сыра (Awad et al., 2005; Broadbent et al., 2001), где вязкий EPS является менее желательным из-за увеличения вязкости сыворотки. Кластер генов, кодирующих ферменты, ответственные за продуцирование

внеклеточных полисахаридов, обычно называют кластером генов *eps*.

В данной области указывалось, что выделенные EPS не подходят для достижения необходимого сочетания высокой водоудерживающей способности и низкой вязкости. Вместо них следует использовать CPS (Low et al., 1998, Broadbent et al., 2001). Хотя до сих пор не до конца понятно, какие конкретные структуры CPS или EPS могут обеспечивать необходимое сочетание водоудерживающей способности и низкой вязкости, существовала сильная мотивация исследовать другие штаммы, продуцирующие CPS, и избегать EPS.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что штаммы, продуцирующие преимущественно экскретируемые EPS-структуры по настоящему изобретению, демонстрируют как нужную высокую водоудерживающую способность, так и низкое напряжение сдвига. Авторы изобретения также идентифицировали соответствующие кластеры генов *eps* и определили структуру повторяющегося звена таких полисахаридов, и предложили штаммы, продуцирующие такие внеклеточные полисахариды, которые сочетают нужный уровень водоудерживающей способности и текстуры, сохраняя при этом высокую скорость подкисления.

О структуре внеклеточных полисахаридов по настоящему изобретению еще не сообщалось. Кроме того, существование EPS и бактериальных штаммов, продуцирующих такие EPS, способных объединять все нужные свойства, а именно водоудерживающую способность, относительно низкое напряжение сдвига и скорость подкисления, не очевидно из уровня техники, что стимулировало поиск дополнительных штаммов, преимущественно продуцирующих CPS, для достижения нужного результата.

Настоящее изобретение также относится к композициям и закваскам, содержащим такие внеклеточные полисахариды и/или штаммы, а также к способам использования внеклеточных полисахаридов и/или штаммов для получения пищевых продуктов, и к пищевым продуктам, содержащим указанные внеклеточные полисахариды и/или штаммы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 представляет полную последовательность кластера генов *eps* штамма *S. thermophilus* DSM33981 (или его мутантного варианта).

SEQ ID NO: 2 представляет полную последовательность кластера генов *eps* штамма *S. thermophilus* DSM33982 (или его мутантного варианта).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: Структура повторяющегося звена полисахарида, продуцируемого

DSM33981

Фиг. 2: Структура повторяющегося звена полисахарида, продуцируемого DSM33982

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Все определения релевантных здесь терминов соответствуют тому, что понятно специалисту в отношении релевантного здесь технического контекста.

В контексте настоящего изобретения в любом из его вариантов выражение **“молочнокислые бактерии” (“LAB”)** означает пищевые бактерии, продуцирующие молочную кислоту в качестве основного метаболического конечного продукта ферментации углеводов. Эти бактерии имеют общие метаболические и физиологические характеристики и являются грамположительными, имеющими низкое содержание GC (гуанина и цитозина), кислототолерантными, неспорообразующими, палочковидными бациллами или кокками. На стадии ферментации потребление углеводов этими бактериями вызывает образование молочной кислоты, что снижает pH и приводит к образованию белкового сгустка. Таким образом, эти бактерии ответственны за подкисление молока и текстуру молочного продукта. Штаммы *S. thermophilus* по настоящему изобретению относятся к молочнокислым бактериям.

Под **“водоудерживающим штаммом”** в настоящем описании и формуле изобретения подразумевается штамм, который предпочтительно образует ферментированные виды молока, имеющие в условиях, описанных ниже, и как показано в примере 1, водоудерживающую способность 85% или выше, более предпочтительно 88% или выше, или 91% или выше, выраженную как процент молочного сгустка, оставшегося в образце после центрифугирования и удаления сыворотки. Например, водоудерживающая способность может составлять 85-100%, 85-95% или 85-90%. Штаммы, представленные в Примере 1 в описании изобретения, имеют водоудерживающую способность 88-91%.

Водоудерживающие штаммы по настоящему изобретению могут представлять собой любой бактериальный штамм. Штаммы по изобретению могут представлять собой выделенный штамм, например выделенный из природного источника, или могут представлять собой штамм неприродного происхождения, например полученный рекомбинантным путем. Рекомбинантные штаммы будут отличаться от встречающихся в природе штаммов по меньшей мере присутствием нуклеинокислотной(ых) конструкции(й), используемой(ых) для трансформации или трансфекции материнского

штамма. В предпочтительном воплощении настоящего изобретения водоудерживающие штаммы по настоящему изобретению представляют собой молочнокислые бактерии. В наиболее предпочтительном воплощении настоящего изобретения водоудерживающие штаммы представляют собой штаммы *S. thermophilus*.

"Водоудерживающая способность" является важным фактором эффективности получения кисломолочных продуктов. Текстура ферментированного молока зависит как от бактерий, используемых для ферментации, так и от параметров процесса. Внеклеточные полисахариды, продуцируемые бактериями, могут положительно влиять на водоудерживающую способность.

Для измерения водоудерживающей способности кисломолочных продуктов было реализовано несколько методик, таких как центрифугирование, сифонирование, дренирование и ядерный магнитный резонанс (NMR) (Amatayakul et al., 2006; Gilbert et al., 2020).

Центрифугирование, используемое для оценки количества воды, захваченной матрицей, по всей видимости, является наиболее часто используемым методом количественного определения водоудерживающей способности. Методом центрифугирования измеряют уровень сыворотки, отделившейся от деформированного геля в результате приложенной большой внешней силы (центробежной силы), т.е. устойчивость геля к сжатию.

В контексте настоящего изобретения **"водоудерживающую способность"** измеряют путем центрифугирования и выражают как процент молочного сгустка, оставшийся в образце после центрифугирования и удаления сыворотки.

"Текстура" также является важным фактором качества ферментированных молочных продуктов, и признание потребителей часто тесно связано со свойствами текстуры. Текстура ферментированного молока зависит от структур внеклеточных полисахаридов, бактерий, используемых для ферментации, и параметров процесса, а также от состава молока. В контексте настоящего изобретения реологические свойства (текстура) кисломолочного продукта, такие как **вязкость**, могут быть измерены как функция напряжения сдвига кисломолочного продукта, как описано ниже.

В контексте настоящего изобретения, **"напряжение сдвига"** можно измерить следующим методом: когда pH ферментированного молока (например молока млекопитающих или молока растительного происхождения) достигало pH ~ 4,55 при температуре инкубации, например, 40°C, кисломолочный продукт охлаждали путем переноса контейнера в ледяную воду. Образец ферментированного молока осторожно

перемешивали вручную с помощью палочки, снабженной перфорированным диском, до достижения однородности образца. Реологические свойства образца оценивали на реометре (Anton Paar Physica Rheometer with ASC, Automatic Sample Changer, Anton Paar® GmbH, Austria), используя чашу и шарик. У реометра устанавливали постоянную температуру 13°C во время измерения. Настройки были следующие:

- Время выдержки (чтобы восстановить до некоторой степени исходную структуру)
- 5 минут без какого-либо физического воздействия (колебаний или вращения) на образец.

- Шаг колебаний (для измерения модулей упругости и вязкости, G' и G'' соответственно, и, следовательно, для расчета комплексного модуля G^*)

Постоянное напряжение = 0,3 %, частота (f) = [0.5...8] Гц

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

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

- Были разработаны две стадии:

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

Каждая стадия содержала 21 точку измерения в течение 210 с (каждые 10 с). Для дальнейшего анализа было выбрано напряжение сдвига 300 1/с (300 с^{-1}), поскольку оно коррелирует с толщиной рта при проглатывании кисломолочного продукта.

Штаммы, которые способны подкислять молоко примерно за 8 часов или менее, могут называться “**быстро подкисляющими**” штаммами, т.е. штаммами, которые способны достигать pH примерно 4,55 за 8 часов или менее, при измерении следующим образом: 200 мл полужирного молока (1,5% жира) нагревали до 90°C в течение 20 мин, затем охлаждали до температуры инокуляции, инокулировали 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий и оставляли при температуре инокуляции до достижения pH 4,55. Температура инокуляции составляет 40°C.

Термин “**идентичность последовательности**” относится к сходству двух нуклеотидных последовательностей или двух аминокислотных последовательностей. Для целей настоящего изобретения степень идентичности двух нуклеотидных последовательностей или двух аминокислотных последовательностей определяли, например, с использованием инструмента множественного выравнивания последовательностей Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; Sievers et al., 2011) со стандартными параметрами.

В настоящем контексте термины “**штаммы, полученные из**”, “**производный штамм**” или “**мутант**” следует понимать как штамм, полученный из штамма по

изобретению посредством, например, генной инженерии, радиационной и/или химической обработки, и/или отбора, адаптации, скрининга и т.д. Предпочтительно, чтобы производный штамм представлял собой функционально эквивалентный мутант, например штамм, который имеет по существу такие же, или улучшенные, свойства в отношении водоудерживающей способности, что и материнский штамм. Такой производный штамм является частью настоящего изобретения. В частности, термин “**производный штамм**” или “**мутант**” относится к штамму, полученному путем обработки штамма по изобретению любым традиционно используемым мутагеном, включая обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрогуанидин (NTG), УФ-свет, или к спонтанно возникшему мутанту.

Мутант может быть подвергнут нескольким обработкам мутагеном (под одной обработкой следует понимать одну стадию мутагенеза, за которой следует стадия скрининга/отбора), но в настоящее время предпочтительно проводить не более 20, не более 10 или не более 5 обработок. В предпочтительном в настоящем изобретении производном штамме изменено менее 1%, или менее 0,1%, менее 0,01%, менее 0,001%, или даже менее 0,0001% нуклеотидов в бактериальном геноме (например путем замены, вставки, делеции или их комбинации) по сравнению с родительским штаммом.

Термины “**ферментированное молоко**” и “**молочные продукты**” используются здесь взаимозаменяемо. В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений, выражение “**ферментированный молочный продукт**” означает пищевой или кормовой продукт, приготовление которого включает ферментацию молочной основы молочнокислыми бактериями. Используемый здесь “**кисломолочный продукт**” включает, без ограничения ими, такие продукты, как термофильные кисломолочные продукты или мезофильные кисломолочные продукты. Термин “**термофильная ферментация**” здесь относится к ферментации при температуре выше примерно 35°C, например от примерно 35°C до примерно 45°C. Термин “**мезофильная ферментации**” здесь относится к ферментации при температуре от примерно 22°C до примерно 35°C.

В контексте настоящей заявки, термин “**молоко**” широко используется в своем обычном значении для обозначения жидкостей, вырабатываемых молочными железами животных (например коровы, овцы, козы, буйвола, верблюда и т. д.) или произведенных с использованием растительных основ. Термин “**молочная основа**” или “**молочный субстрат**” может означать любое молочное вещество, которое можно подвергнуть ферментации согласно настоящему изобретению. Таким образом, полезные молочные основы включают, без ограничения ими, растворы/суспензии любого молока или

молокоподобных продуктов, содержащих белок, таких 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 сывороточного белка, сливки или молоко растительного происхождения. Молочная основа может быть получена от любого млекопитающего, например, представлять собой по существу чистое молоко млекопитающих или восстановленное сухое молоко. Растительные источники молока включают, без ограничения ими, молоко, полученное из соевых бобов. Предпочтительно, молоко растительного происхождения представляет собой соевое молоко, в которое предпочтительно может быть добавлена глюкоза, например 0,5-5% глюкозы, предпочтительно 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно примерно 2% глюкозы.

Перед ферментацией молочная основа может быть гомогенизирована и пастеризована способами, известными в данной области техники.

“**Гомогенизация**” в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений, означает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию проводят до ферментации, ее можно проводить для измельчения молочного жира до более мелких частиц, чтобы он больше не отделялся от молока. Этого можно добиться, пропуская молоко под высоким давлением через маленькие отверстия.

“**Пастеризация**” в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений, означает обработку молочной основы для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно, пастеризацию выполняют путем поддержания заданной температуры в течение определенного периода времени. Указанной температуры обычно достигают посредством нагревания. Температура и продолжительность могут быть выбраны таким образом, чтобы убить или инактивировать некоторые бактерии, например вредные бактерии. Затем может следовать стадия быстрого охлаждения.

“**Ферментация**” в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений означает превращение углеводов в кислоты или спирты, или их смесь посредством действия микроорганизмов (LAB). Процессы ферментации, используемые при производстве пищевых продуктов, таких как молочные продукты, хорошо известны, и специалист в данной области техники знает, как выбрать подходящие условия процесса, такие как температура, кислород, количество микроорганизма(ов) и время процесса. Условия ферментации выбраны таким образом, чтобы способствовать достижению целей

настоящего изобретения, например получению пищевого продукта, предпочтительно пищевого продукта, который имеет улучшенную водоудерживающую способность по сравнению с пищевым продуктом, полученным способом, не включающим использование хотя бы одной из EPS-структур и/или штаммов, продуцирующих такие структуры, как описано в первом аспекте настоящего изобретения, или применению композиции, как описано во втором аспекте настоящего изобретения, в любом из его воплощений.

Используемый здесь термин **“молочный продукт”** относится к пищевому продукту, полученному из молока. Как описано выше, в контексте настоящей заявки, термин **“молоко”** широко используется в своем обычном значении для обозначения жидкостей, вырабатываемых молочными железами животных (например коров, овец, коз, буйволов, верблюдов и т. д.) или растениями. В предпочтительном воплощении, молоко представляет собой коровье молоко. В соответствии с настоящим изобретением, молоко может быть подвергнуто переработке, и термин **“молоко”** включает цельное молоко, снятое молоко, обезжиренное молоко, молоко с низким содержанием жира, цельное молоко, молоко с пониженным содержанием лактозы или концентрированное молоко. Обезжиренное молоко представляет собой обезжиренный или снятый молочный продукт. Молоко с низким содержанием жира обычно определяют как молоко, которое содержит от примерно 1% до примерно 2% жира. Цельное молоко часто содержит 2% жира или более. Термин **“молоко”** охватывает молоко разных млекопитающих и молоко, полученное из растительных источников. Источники молока млекопитающих включают, без ограничения ими, коровье, овечье, козье, буйволиное, верблюжье молоко и молоко ламы, кобылы и оленя. Растительные источники молока включают, без ограничения ими, молоко, полученное из соевых бобов, гороха, арахиса, ячменя, риса, овса, киноа, миндаля, кешью, кокоса, фундука, конопли, семян кунжута и семян подсолнечника. В конкретном воплощении молоко представляет собой коровье молоко. В другом конкретном воплощении молоко представляет собой молоко растительного происхождения, предпочтительно, соевое молоко, в которое предпочтительно может быть добавлена глюкоза, например 0,5-5% глюкозы, предпочтительно 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно примерно 2% глюкозы.

Используемый здесь термин **“примерно”** (или **“примерно”**) означает указанное значение $\pm 1\%$ от его значения, или термин **“примерно”** означает указанное значение $\pm 2\%$ от его значения, или термин **“примерно”** означает указанное значение $\pm 5\%$ от его значения, термин **“примерно”** означает указанное значение $\pm 10\%$ от его значения, или термин **“примерно”** означает указанное значение $\pm 20\%$ от его значения, или термин

“примерно” означает указанное значение $\pm 30\%$ от его значения; предпочтительно термин “примерно” означает именно указанное значение ($\pm 0\%$).

Во всем описании и формуле изобретения слово “**содержит**” и варианты этого слова (например “содержащий”, “имеющий”, “включающий”, “составляющий”) обычно не являются ограничивающими и, таким образом, не исключают другие признаки, которые могут быть, например, техническими признаками, добавками, компонентами или стадиями. Однако всякий раз, когда здесь используется слово “содержит”, это также включает конкретное воплощение, в котором это слово понимают как ограничивающее; в этом конкретном воплощении слово “содержит” имеет значение термина “состоит из”.

Использование терминов “**a**” и “**an**” и “**the**” и подобных им референтов в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее и единственное, и множественное число, за исключением случаев, когда здесь указано иное или это явно противоречит контексту. Перечисление диапазонов значений здесь предназначено только для использования в качестве сокращенного метода индивидуального указания на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если здесь не указано иное, и каждое отдельное значение включено в данное описание изобретения, как если бы оно было указано здесь индивидуально. Все способы, описанные в настоящем описании, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если в настоящем документе не указано иное или это иным образом не противоречит контексту.

Использование любых и всех примеров или примерных формулировок (например “такой как”), представленных в настоящем документе, предназначено только для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в описании не должна быть истолкована как указание на какой-либо не заявленный элемент, как существенный для практического осуществления изобретения.

Структуры внеклеточных полисахаридов и кластеры генов *eps* штаммов *S. thermophiles*

Целью настоящего изобретения является предложение структуры внеклеточного полисахарида, продуцируемого штаммами *S. thermophilus*, которая способствует улучшению водоудерживающей способности, которая пригодна для использования в получении пищевых продуктов. Авторы изобретения также проанализировали соответствующий кластер генов *eps* и идентифицировали последовательности генов, которые вовлечены в продуцирование внеклеточного полисахарида по настоящему

изобретению. Эти внеклеточные полисахариды вовлечены в превосходную водоудерживающую способность и относительно низкое напряжение сдвига, необходимое при производстве сыра, такого как моцарелла. Как показано в Примере 1, штаммы, продуцирующие такие внеклеточные полисахариды (DSM33981 и DSM33982), обеспечивают кисломолочную продукцию с отличной водоудерживающей способностью.

Штамм DSM33981, имеющий кластер генов *eps* с SEQ ID NO: 1, продуцирует полисахариды с повторяющимся звеном, показанным на Фиг. 1. Штамм DSM33982, имеющий кластер генов *eps* с SEQ ID NO.: 2, продуцирует полисахариды с повторяющимся звеном, как показано на Фиг. 2.

Штаммы, продуцирующие эти полисахариды, предпочтительно имеют идентичность последовательности 95% или более с указанными кластерами генов *eps*, например 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Наиболее предпочтительно, последовательности имеют 100%-ную идентичность.

Было показано, что LAB продуцируют внеклеточные полисахариды двумя путями, кодируемыми отличающимися геномными компонентами: сахарозависимым путем и Wzy-зависимым путем (Zeidan et al., 2017). *S. thermophilus* не имеют сахарозависимого пути и синтезируют внеклеточные полисахариды только посредством Wzy-зависимого пути, который кодируется в кластере генов, называемом здесь кластером *eps* (Zeidan et al., 2017). Обычно кластеры *eps* состоят из областей высоко консервативных генов, фланкирующих варибельную область биосинтетических генов, кодирующих гликозилтрансферазы. Эта изменчивость лежит в основе разнообразия полисахаридных структур, поскольку гликозилтрансферазы отвечают за построение повторяющихся звеньев, которые впоследствии собираются в длинные полимеры. Повторяющееся звено синтезируется внутриклеточно, при этом образующийся гликозид закреплен на липидной мембране. Первая стадия процесса катализируется праймирующей гликозилтрансферазой, которая активирует липидный якорь, обычно ундекапренилфосфат, путем присоединения к нему сахарного мономера (Islam et al., 2014). После присоединения первого сахарного мономера, гликозилтрансферазы, кодируемые в кластере *eps*, последовательно добавляют оставшиеся сахарные мономеры до тех пор, пока не будет завершено создание всего повторяющегося звена.

После завершения создания повторяющегося звена, оно переносится на наружную сторону клеточной мембраны и добавляется к удлиняющейся цепи повторяющихся звеньев с помощью полимеразы (Islam et al., 2014).

Считается, что эта структура влияет на различия водоудерживающей способности

разных штаммов LAB.

Композиции, содержащие внеклеточный полисахарид, и/или штаммы *S. Thermophiles*, продуцирующие такой внеклеточный полисахарид

В настоящем изобретении также предложены композиции и закваски, содержащие внеклеточный полисахарид, и/или штаммы *S. thermophilus* по изобретению, как описано здесь.

LAB, включая бактерии вида *S. thermophilus*, обычно поставляются для молочной промышленности в виде либо замороженных (F-DVS®), либо лиофилизированных (FD-DVS®) культур для массового размножения закваски, либо в виде так называемых культур "Direct Vat Set" (DVS®), предназначенных для непосредственной инокуляции в ферментационный сосуд или чан для производства молочного продукта, например кисломолочного продукта. Такие культуры молочнокислых бактерий обычно называют "стартовые культуры" или "закваски". Соответственно, композиция по настоящему изобретению может быть заморожена или лиофилизирована. Кроме того, композиция по настоящему изобретению может быть представлена в жидкой форме. Таким образом, в одном воплощении композиция находится в замороженной, высушенной, лиофилизированной или жидкой форме.

Композиции или стартовые культуры по настоящему изобретению могут также дополнительно включать криопротекторы, лиопротекторы, антиоксиданты, питательные вещества, наполнители, ароматизаторы или их смеси. Композиция предпочтительно содержит один или более криопротекторов, лиопротекторов, антиоксидантов и/или питательных веществ, более предпочтительно криопротекторов, лиопротекторов и/или антиоксидантов, и наиболее предпочтительно криопротекторов или лиопротекторов, или их обоих. Использование защитных средств, таких как криопротекторы и лиопротекторы, известно специалисту в данной области. Подходящие криопротекторы или лиопротекторы включают моно-, ди-, три- и полисахариды (такие как глюкоза, манноза, ксилоза, лактоза, сахароза, трегалоза, раффиноза, мальтодекстрин, крахмал и гуммиарабик (акация) и т.п.), полиолы (такие как эритрит, глицерин, инозитол, маннит, сорбит, треитол, ксилит и тому подобное), аминокислоты (например пролин, глутаминовую кислоту), сложные вещества (такие как обезжиренное молоко, пептоны, желатин, дрожжевой экстракт) и неорганические соединения (например триполифосфат натрия).

В одном воплощении композиции или стартовые культуры по настоящему изобретению могут содержать один или более криопротекторов, выбранных из группы, состоящей из инозин-5'-монофосфата (IMP), аденозин-5'-монофосфата (AMP), гуанозин-

5'-монофосфата (GMP), уранозин-5'-монофосфата (UMP), цитидин-5'-монофосфата (CMP), аденина, гуанина, урацила, цитозина, аденозина, гуанозина, уридина, цитидина, гипоксантина, ксантина, оротидина, тимидина, инозина и производного любых таких соединений. Подходящие антиоксиданты включают аскорбиновую кислоту, лимонную кислоту и ее соли, галлаты, цистеин, сорбит, маннит, мальтозу. Подходящие питательные вещества включают сахара, аминокислоты, жирные кислоты, минералы, микроэлементы, витамины (такие как витамины группы В, витамин С). Композиция возможно может содержать дополнительные вещества, включая наполнители (такие как лактоза, мальтодекстрин) и/или ароматизаторы.

В одном воплощении изобретения криопротектор представляет собой агент или смесь агентов, которые помимо своей криопротекторности обладают бустерным эффектом.

Выражение “бустерный эффект” используется для описания ситуации, когда криозащитный агент придает повышенную метаболическую активность (бустерный эффект) размороженной или восстановленной культуре, когда ее инокулируют в среду, для ферментации или превращения. Жизнеспособность и метаболическая активность не являются синонимами. Коммерческие замороженные или лиофилизированные культуры могут сохранять свою жизнеспособность, хотя они могут потерять значительную часть своей метаболической активности, например, культуры могут потерять свою кислотообразующую (подкисляющую) активность при хранении даже в течение коротких периодов времени. Таким образом, жизнеспособность и бустерный эффект необходимо оценивать с помощью разных анализов. В то время как жизнеспособность оценивают с помощью анализов жизнеспособности, таких как определение колониеобразующих единиц, бустерный эффект оценивают путем количественного сравнения релевантной метаболической активности размороженной или восстановленной культуры относительно жизнеспособности культуры. Термин "**метаболическая активность**" относится к активности удаления кислорода культурами, их кислотопродуцирующей активности, т.е. к продуцированию, например, молочной кислоты, уксусной кислоты, муравьиной кислоты и/или пропионовой кислоты, или к их активности по продуцированию метаболитов, такой как продуцирование ароматических соединений, таких как ацетальдегид (α -ацетолактат, ацетоин, диацетил и 2,3-бутиленгликоль (2,3-бутандиол)).

В одном воплощении композиции или стартовые культуры по изобретению содержат или включают в себя 0,2-20% криопротектора или смеси агентов, измеряемых в % масс./масс. от вещества. Однако предпочтительно добавлять криозащитный агент или

смесь агентов в количестве, которое находится в диапазоне 0,2-15%, 0,2-10%, 0,5-7% и 1-6% по массе, в том числе в диапазоне 2-5% криозащитного агента или смеси агентов, измеряемых в % по массе от замороженного вещества. В предпочтительном воплощении культура содержит примерно 3% криозащитного агента или смеси агентов, измеренной в % масс./масс. от вещества. Количество, составляющее примерно 3% криозащитного агента, соответствует концентрациям в диапазоне 100 мМ. Следует признать, что для каждого аспекта воплощения изобретения диапазоны могут представлять собой приращения описанных диапазонов.

В еще одном аспекте композиции или стартовые культуры по настоящему изобретению содержат или включают в себя аммонийную соль (например аммонийную соль органической кислоты (такую как формиат аммония и цитрат аммония) или аммонийную соль неорганической кислоты) в качестве бустера (например стимулятора роста или стимулятора подкисления) для бактериальных клеток, таких как клетки, принадлежащие к виду *S. thermophilus*, например (по существу) уреазы-отрицательные бактериальные клетки. Термин “аммонийная соль”, “формиат аммония” и т. д. следует понимать как источник соли или комбинацию ионов. Термин "источник", например, "формиата аммония" или “аммонийной соли” относится к соединению или смеси соединений, которые при добавлении в культуру клеток предоставляют формиат аммония или аммонийную соль. В некоторых воплощениях источник аммония высвобождает аммоний в питательную среду, в то время как в других воплощениях источник аммония подвергается метаболизму с образованием аммония. В некоторых предпочтительных воплощениях источник аммония является экзогенным. В некоторых особенно предпочтительных воплощениях молочный субстрат не предоставляет аммоний. Конечно, следует понимать, что вместо аммонийной соли можно добавлять аммиак. Таким образом, термин аммонийная соль включает аммиак (NH_3), NH_4OH , NH_4^+ , и тому подобное.

В одном воплощении композиция по изобретению может содержать загуститель и/или стабилизатор, такой как пектин (например пектин НМ (высокометоксилированный), пектин ЛМ (низкометоксилированный)), желатин, СМС (карбоксиметилцеллюлоза), волокно соевых бобов/полимер соевых бобов, крахмал, модифицированный крахмал, каррагинан, альгинат и гуаровая камедь.

Способ получения пищевых или кормовых продуктов

Настоящее изобретение также относится к способам получения пищевого продукта, включающим по меньшей мере одну стадию, на которой используют по

меньшей мере один внеклеточный полисахарид и/или штамм *S. Thermophiles*, как определено в первом аспекте настоящего изобретения, и/или композицию или закваску, как определено во втором аспекте настоящего изобретения. Получение пищевого продукта осуществляют способами, известными специалисту в данной области.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения пищевого продукта, включающему по меньшей мере одну стадию, на которой используют по меньшей мере один из внеклеточных полисахаридов по настоящему изобретению.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к способу получения пищевого продукта, включающему по меньшей мере одну стадию, на которой используют штамм молочнокислых бактерий *S. thermophilus* DSM33981 или его мутант или вариант.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к способу получения пищевого продукта, включающему по меньшей мере одну стадию, на которой используют штамм молочнокислых бактерий *S. thermophilus* DSM33982 или его мутант или вариант.

Например, способ по настоящему изобретению включает ферментацию молочного субстрата композицией, содержащей по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/мл, предпочтительно по меньшей мере 1×10^8 КОЕ/мл штамма *S. thermophilus* DSM33981 или его мутанта или варианта.

Например, способ по настоящему изобретению включает ферментацию молочного субстрата композицией, содержащей по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/мл, предпочтительно по меньшей мере 1×10^8 КОЕ/мл штамма *S. thermophilus* DSM33982 или его мутанта или варианта.

В другом предпочтительном воплощении, способ включает ферментацию молочного субстрата композицией, как описано во втором аспекте настоящего изобретения, в любом из его воплощений.

Предпочтительно, пищевой продукт является молочным продуктом и способ в любом из его воплощений включает ферментацию молочного субстрата (также называемого “молочной основой” в контексте настоящего изобретения) с по меньшей мере одним *S. thermophilus* и/или с композицией или стартовой культурой по изобретению.

Предпочтительно, пищевой продукт является молочным продуктом и способ в любом из его воплощений включает ферментацию молочного субстрата растительного происхождения (также называемого “молочной основой растительного происхождения” в контексте настоящего изобретения), такого как соевое молоко, предпочтительно соевого молока с добавлением глюкозы, например 0,5-5% глюкозы, предпочтительно 0,5-2%

глюкозы, более предпочтительно примерно 2%, с по меньшей мере одним штаммом *S. thermophilus* и/или с композицией или с закваской по изобретению (первый и второй аспекты соответственно).

Пищевой продукт согласно настоящему изобретению может преимущественно дополнительно содержать “загуститель” и/или “стабилизатор”, такой как пектин (например, пектин НМ, пектин LM), желатин, СМС, волокно соевых бобов/полимер соевых бобов, крахмал, модифицированный крахмал, каррагинан, альгинат и гуаровая камедь.

В конкретном воплощении пищевой продукт является молочным продуктом, мясным продуктом, овощным продуктом, фруктовым продуктом или зерновым продуктом. В предпочтительном воплощении, пищевой продукт является молочным продуктом, как определено выше. В другом предпочтительном воплощении, пищевой продукт представляет собой пищевой продукт растительного происхождения, такой как ферментированное соевое молоко.

В конкретном воплощении изобретения, кисломолочный продукт выбран из группы, состоящей из сыра моцарелла, йогурта, кефира, сметаны, сыра, творога. Моцарелла является особенно предпочтительной. В предпочтительном воплощении изобретения, кисломолочный продукт включает дополнительный пищевой продукт, выбранный из группы, состоящей из фруктового напитка, зерновых продуктов, ферментированных зерновых продуктов, химически подкисленных зерновых продуктов, продуктов из соевого молока, ферментированных продуктов из соевого молока и любой их смеси. В другом предпочтительном воплощении, ферментированный молочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт растительного происхождения, такой как ферментированное соевое молоко.

Ферментированный молочный продукт обычно содержит белок в количестве 1,0-12,0% по массе, предпочтительно 2,0-10,0% по массе. В конкретном воплощении, сметана содержит белок в количестве 1,0-5,0% по массе, предпочтительно 2,0-4,0% по массе. В конкретном воплощении, творог содержит белок в количестве 4,0-12,0% по массе, предпочтительно 5,0-10,0% по массе.

Предпочтительно, пищевой продукт имеет улучшенную водоудерживающую способность (как описано в настоящем изобретении, например, в Примере 1) по сравнению с пищевым продуктом, полученным с помощью сопоставимого способа, который не включает использование хотя бы одного из EPS, штамма *S. thermophilus* с активным кластером генов *eps*, как описано в настоящем изобретении, и/или

использование описанных композиции или закваски.

Любая комбинация вышеописанных элементов, аспектов и воплощений во всех возможных их вариантах охватывается изобретением, если иное не указано в настоящем документе, или это иным образом явно не противоречит контексту. Воплощения настоящего изобретения описаны ниже только посредством примеров.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Оценка водоудерживающей способности ферментированного молока с использованием штаммов *S. thermophilus*, продуцирующих нужный внеклеточный полисахарид.

Культуры, инкубированные в течение ночи в бульоне M17, содержащем 2% лактозы, использовали для подкисления молока (1% инокулята) в обезжиренном молоке, подвергнутом сильной тепловой обработке (SHT-SM), для измерения напряжения сдвига и в пастеризованном обезжиренном молоке (пастеризованное LFM) для измерений водоудерживающей способности (например для применения в сыре моцарелла). SHT-SM было приготовлено путем восстановления сухого обезжиренного молока, содержащего 38% белка, 53% лактозы, *S. thermophilus* (Derzelle, Bolotin, Mistou, & Rul, 2005).

Водоудерживающую способность измеряли посредством центрифугирования и выражали в процентах молочного сгустка, оставшегося в образце после центрифугирования и удаления сыворотки.

Пастеризованное обезжиренное молоко фирмы “Арла”, содержащее 1,5% жира и 3,8% белка, пастеризовали при 90°C в течение 20 мин, охлаждали до 40°C и обогащали 0,003% формиата Na⁺ (HCOONa) для стимуляции роста *S. thermophilus*.

Пустые стерильные пластиковые бутылки взвешивали и добавляли в них 200 мл пастеризованного обезжиренного молока, содержащего 1% ночной культуры и 0,003% формиата Na⁺. Образцы инкубировали при 40°C до pH 4,55, затем охлаждали в ледяной воде в течение 30 мин и оставляли на ночь при 4°C. Образцы центрифугировали при 2325*g в течение 3 мин, и сыворотку аккуратно выливали из пластиковых бутылок. Образцы взвешивали до и после удаления сыворотки. Водоудерживающую способность (WHC) выражали в процентах молочного сгустка, оставшегося в образце после удаления сыворотки. Были приготовлены четыре повтора каждого образца; один использовался для мониторинга закисления молока с использованием pH-электродов, а остальные три повтора - для измерения водоудерживающей способности.

Таблица 1: Водоудерживающая способность (WHC), напряжение сдвига при скорости сдвига 300 1/с, время до pH 4,55 ферментированного молока с использованием

штаммов, продуцирующих EPS по изобретению

Штамм	WHC (% молочного сгустка)	Напряжение сдвига при 300 1/с (Pa)	Время до pH 4,55 (часы)
DSM33981	91	23,1	8
DSM33982	89	17,6	5

На двух примерах штаммов с нужным кластером генов *eps*, продуцирующих заявленные внеклеточные полисахаридные структуры, ясно показана комбинация высокой водоудерживающей способности и низкого напряжения сдвига.

Пример 2: Оценка продуцирования EPS и CPS у штаммов *S. thermophilus*.

Полисахаридные фракции очищали из образцов, собранных в стационарной фазе роста, путем осаждения этанолом и количественно характеризовали методом фенол:серная кислота для определения общего содержания сахара. Рост осуществляли в химически определенной среде с добавлением 2% лактозы (CDMLac) при постоянном pH 6,5 и 40°C в анаэробных условиях. pH поддерживали постоянным путем добавления NaOH. Значения представляют собой среднее значение от не менее 5 технических повторов ± стандартное отклонение.

Таблица 2: Уровни EPS и CPS и нормализованные уровни EPS и CPS штаммов по изобретению

	EPS и CPS уровни нормированные по биомассе (OD ₆₀₀)				EPS и CPS уровни			
	EPS (мкг/мл/OD ₆₀₀)		CPS (мкг/мл/OD ₆₀₀)		EPS (мкг/мл)		CPS (мкг/мл)	
	среднее	ст.откл.	среднее	ст.откл.	среднее	ст.откл.	среднее	ст.откл.
DSM33981	8,4	0,5	3,7	0,2	36,7	2,4	16,1	0,8
DSM33982	7,8	0,2	1,3	0,1	35,3	0,8	5,7	0,3

Штаммы, приведенные в качестве примера, преимущественно продуцируют выделяемый EPS по настоящему изобретению. Ранее считалось, что более высокие количества EPS обязательно приведут к сопутствующему увеличению вязкости, то есть к более высокому напряжению сдвига. EPS с заявленной структурой способны сочетать как

высокую водоудерживающую способность, так и относительно низкие напряжения сдвига (Пример 1).

Пример 3: Определение структуры внеклеточного полисахарида

Штаммы выращивали в химически определенной среде в анаэробных условиях в течение 24 ч при 40°C. Затем культуру центрифугировали (10000 x g, 1 час, 4°C) и надосадочную жидкость обрабатывали 80% трихлоруксусной кислотой (масс./об.) до конечной концентрации 20%. Осаждение продолжалось при 4°C при перемешивании в течение 2 часов. Смесь центрифугировали (10000 g, 1 час, 4°C) и неочищенный EPS осаждали путем добавления к надосадочной жидкости равного объема ацетона (4°C). После выпадения осадка в течение ночи при 4°C при слабом перемешивании, образец центрифугировали (10000 g, 1 час, 4°C). Осадок трижды промывали 50%-ным ацетоном (4°C) и полученный осадок суспендировали в 50 мл дистиллированной воды при интенсивном перемешивании. Суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 5 минут, что приводило к получению прозрачного раствора. Наконец, этот раствор диализовали в течение 12 часов против дистиллированной воды (5 л) при 4°C. Диализ повторяли в общей сложности три раза, каждый раз против свежей дистиллированной воды. Содержимое диализного мешка лиофилизировали и остаток EPS солюбилизировали в 1 мл D₂O посредством энергичного перемешивания и обработки ультразвуком.

Для выяснения структуры методом ЯМР спектры снимали на спектрометре AVANCE III 800 (Bruker, Rheinstetten, Germany), работающем на рабочей частоте протонов 800,33 МГц, и оснащенном трехканальным инверсным датчиком обнаружения (ТХИ) с градиентами импульсного поля. Двумерные спектры для определения структуры были получены при 60°C с использованием стандартных импульсных программ Bruker. Корреляционная спектроскопия протон-гомоядерного сдвига (COSY), полная корреляционная спектроскопия (TOCSY), ¹H-¹³C гетероядерные одноквантовые спектры когерентности с редактированием множественности (ed-HSQC), и двухмерный HSQC-TOCSY использовали для полного соотнесения всех резонансов на картах HSQC. ³J_{H1,H2}, измеренный непосредственно из спектра 1D ¹H, и ¹J_{C,H1}, измеренный из неразъединённого спектра HSQC, использовали для определения конфигурации сахарных колец. Гетероядерные многосвязные спектры связности (HMBC) были получены для определения положения гликозидных связей. Подлинность сахарных мономеров была установлена при помощи картин химических сдвигов ¹H и ¹³C и, при возможности, путем определения отдельных ³J_{C,H} связей.

Таблица 3: Структуры внеклеточных полисахаридов по настоящему изобретению

<i>S. thermophilus</i> (DSM33981)	$\rightarrow 2$)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow
<i>S. thermophilus</i> (DSM33982)	β -D-Galp-(1 ↓ 2 $\rightarrow 6$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -L-RhapOAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow

Пример 4: Определение кластера генов *eps*

Поскольку кластеры *eps* имеют консервативные гены на обоих концах, они были идентифицированы с помощью BLAST, путем поиска в транслированных последовательностях генов аннотированного генома известных белковых последовательностей первого и последнего гена кластера. Организация генов в кластерах *eps* в LAB, согласно Zeidan *et al.* (2017), была использована для определения первого и последнего *eps* генов у каждого отдельного вида, например *epsA* и *orf14.9* у *S. thermophilus*. Если для первого и последнего гена обнаруживалось одно совпадение с идентичностью последовательности более 90% и покрытием более 90%, все гены между этими двумя совпадениями и включая их извлекали и использовали в качестве кластера *eps*.

ДЕПОНИРОВАНИЕ

Штамм *Streptococcus thermophilus* DSM33981 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) под номером доступа DSM33981 18 Августа, 2021.

Штамм *Streptococcus thermophilus* DSM33982 был депонирован в DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany) под номером доступа DSM33982 18 Августа, 2021

Депонирование было осуществлено в соответствии с условиями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры. Заявитель требует, чтобы образец депонированных микроорганизмов был предоставлен только эксперту, одобренному заявителем.

ЛИТЕРАТУРА

Amatayakul, T., Sherkat, F. and Shah, N.P. (2006). Syneresis in set yoghurt as affected by EPS стартовые культуры and level of solids. International Journal of Dairy Science, 59, 3, 216-221. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00264.x>

Awad, S., Hassan, A.N. and Muthukumarappan, K. (2005). Application of Exopolysaccharide-Producing Cultures in Reduced-Fat Cheddar Cheese: Texture and Melting Properties. *Journal of Dairy Science*, 88, 12, 4204-4213. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73106-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73106-4)

Broadbent, J.R., McMahon, D.J., Oberg, C.J. and Welker, D.L. (2001). Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. *International Dairy Journal*, 11, 4-7, 433-439. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00084-X)

Gilbert, A., Rioux, L. E., St-Gelais, D., and Turgeon, S. L. (2020). Characterization of syneresis phenomena in stirred acid milk gel using low frequency nuclear magnetic resonance on hydrogen and image analyses. *Food Hydrocolloids*. 106. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105907>

Islam, S.T., and Lam, J.S. (2014). Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(11), 697–716. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0595>

Low, D., Ahlgren, J.A., Horne, D., McMahon, D.J., Oberg, C.J., and Broadbent, J.R. (1998). Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 6, 2147-2151. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2147-2151.1998>

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T., Karplus, K., Weizhong, L., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J., and Higgins, D.G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.*, 7:539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>

Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M. F., Øregaard, G., and Neves, A. R. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(1), S168–S200. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux017>

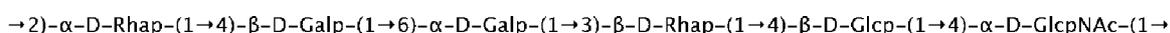
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полисахарид с повторяющейся структурой звеньев, в котором основная цепь состоит из рамнозы, галактозы, глюкозы и N-ацетилглюкозамина в соотношении 2:2:1:1, где рамноза возможно является O-ацетилированной.

2. Полисахарид по п. 1, в котором основная цепь повторяющейся структуры звеньев представляет собой линейный гексамер, возможно содержащий по меньшей мере одну боковую ветвь с по меньшей мере одним сахаром.

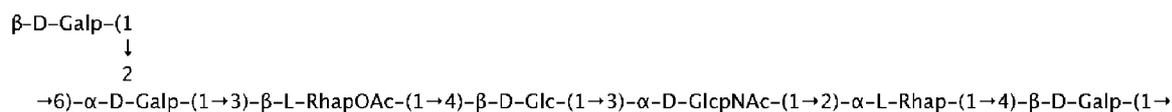
3. Полисахарид по п. 1 или 2, имеющий повторяющуюся структуру звеньев:

(1)



или

(2)



4. Штамм молочнокислых бактерий, содержащий активный кластер генов *eps*, способный продуцировать полисахариды по пп. 1-3, где кластер генов *eps* имеет идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере 95%, с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

5. Молочнокислая бактерия по п. 4, которая представляет собой бактерию *S. thermophilus*.

6. Молочнокислая бактерия по п. 5, которая выбрана из:

(1) DSM33981,

(2) DSM33982,

или их мутантных вариантов с сохраненной или дополнительно улучшенной водоудерживающей способностью.

7. Композиция, содержащая по меньшей мере одно из полисахаридов по пп. 1-3 и/или штамма молочнокислой бактерии по пп. 4-6.

8. Закваска, содержащая по меньшей мере одно из полисахаридов по любому из пп. 1-3, штамма молочнокислой бактерии по пп. 4-6 и/или композиции по п. 7.

9. Применение полисахаридов по любому из пп. 1-3, штаммов молочнокислых

бактерий по пп. 4-6, композиции по п. 7 и/или закваски по п. 8 для модулирования водоудерживающей способности ферментированного продукта.

10. Способ получения пищевого или кормового продукта, включающий по меньшей мере одну стадию, на которой используют по меньшей мере один полисахарид по любому из пп. 1-3, штаммы молочнокислых бактерий по пп. 4-6, композицию по п. 7 и/или закваску по п. 8.

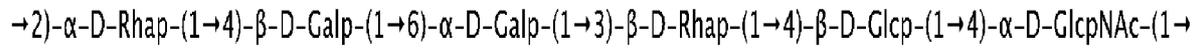
11. Способ по п. 10, где пищевой продукт представляет собой сыр, такой как, например, сыр моцарелла, йогурт, кефир, сметану или творог, и где способ возможно дополнительно включает использование дополнительных молочнокислых бактерий.

12. Пищевой или кормовой продукт, содержащий по меньшей мере одно из полисахаридов по любому из пп. 1-3, штаммов молочнокислых бактерий по пп. 4-6, композиции по п. 7 и/или закваски по п. 8.

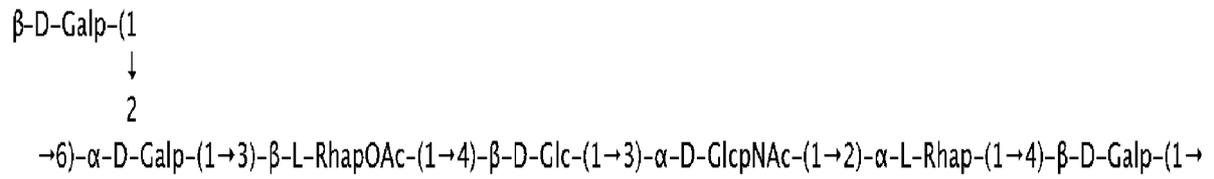
13. Пищевой или кормовой продукт по п. 12, который представляет собой молочный продукт, содержащий ферментированное растительное молоко и/или молоко млекопитающих.

14. Пищевой или кормовой продукт по п. 13, где пищевой продукт представляет собой сыр моцарелла.

15. Способ получения дополнительных штаммов молочнокислых бактерий, как определено в п. 4; где мутантный штамм получают путем использования депонированного штамма в качестве исходного материала, скрининга кластера генов *eps* и выбора бактерии, которая сохранила кластер генов *eps*.



Фиг.1



Фиг.2