

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491818 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.11.14

(22) Дата подачи заявки
2023.01.25

(51) Int. Cl. *A23C 9/123* (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)
C12N 9/80 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)

(54) ШТАММЫ STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS, ОБЛАДАЮЩИЕ УЛУЧШЕННЫМИ
ТЕКСТУРИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ

(31) 22153930.7

(32) 2022.01.28

(33) EP

(86) PCT/EP2023/051744

(87) WO 2023/144174 2023.08.03

(71) Заявитель:

КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:

Янсен Томас, Кристиансен Дитте
Эллегорд, Брөнд Еспер, Трихос
Йёргос, Серро Стефани (DK)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В изобретении предложены мутанты *Streptococcus thermophilus*, такие как DSM22933, которые обладают улучшенными текстурирующими свойствами. Эти штаммы имеют (1) мутацию в гене АТР-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью; и (2) мутацию в гене белка пермеазы ABC-транспортера; и/или (3) мутацию в гене белка пептидеформилазы. Кроме того, изобретение относится к композициям, таким как заквасочная культура, содержащим один или более чем один из этих мутантов, к ферментированным продуктам, полученным с использованием этих мутантов, и к применению мутантов и композиций в соответствии с изобретением.

A1

202491818

202491818

A1

ШТАММЫ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*, ОБЛАДАЮЩИЕ УЛУЧШЕННЫМИ ТЕКСТУРИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к мутантам *Streptococcus thermophilus*, которые обладают улучшенными текстурирующими свойствами. Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям, таким как заквасочная культура, содержащим один или более чем один из этих мутантов, к ферментированным продуктам, приготовленным с использованием этих мутантов, и к использованию мутантов и композиций в соответствии с изобретением.

Предшествующий уровень техники

В пищевой промышленности используют множество бактерий, в частности молочнокислые бактерии, для улучшения вкуса и текстуры пищевых продуктов. В молочной промышленности молочнокислые бактерии интенсивно используют для обеспечения подкисления молока (путем ферментации), а также для придания текстуры продукту, в который они включены.

Среди молочнокислых бактерий, используемых в пищевой промышленности, преимущественно используют *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* и *Bifidobacterium*. Молочнокислые бактерии вида *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) широко используют сами по себе или в сочетании с другими бактериями, такими как *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* (*L. bulgaricus*), для производства пищевых продуктов, в частности ферментированных пищевых продуктов. Их используют, в частности, в композиции заквасок, используемых для производства кисломолочных продуктов, например, йогурта. Некоторые из них играют доминирующую роль в формировании текстуры ферментированного продукта. Указанная характеристика тесно связана с производством внеклеточных полимерных веществ (экзополисахариды, EPS), которые секретируются молочнокислыми бактериями в окружающую среду.

Существует потребность получить кисломолочные продукты с текстурой высокой густоты. Например, современная тенденция в производстве йогурта заключается в стремлении к мягкому вкусу и текстуре высокой густоты. В настоящее время это достигается за счет использования культур, которые придают мягкий вкус, и добавления загустителей или белков для придания желаемой густоты. Производители

ферментированных продуктов (такие как производители йогуртов) хотели бы иметь возможность производить ферментированные продукты, такие как йогурт, с такими свойствами без добавления загустителей. Это поможет им уменьшить затраты и обеспечить более чистый состав. Одним из очень привлекательных способов достижения этой цели является заквасочная культура, которая приводит к получению текстуры высокой густоты.

Многие штаммы *S. thermophilus* синтезируют внеклеточные полисахариды (EPS). Эти молекулы могут продуцироваться в виде капсул, плотно ассоциированных с клеткой, или они могут выделяться в среду в виде рыхлой слизи (т.е. “липкого” полисахарида). Хотя присутствие экзополисахарида не обеспечивает очевидного преимущества для роста или выживания *S. thermophilus* в молоке, его продуцирование *in situ* этим видом или другими молочнокислыми бактериями обычно придает кисломолочным продуктам желательную “липкую” или вязкую текстуру. В работах также продемонстрировали, что продуцирующий экзополисахариды *S. thermophilus* может улучшать функциональные свойства кисломолочных продуктов. Более подробную информацию смотри в обзорной статье Broadbent *et al.* (J. Dairy Sci., 2003, 86:407-423).

Для удовлетворения требований промышленности, возникла необходимость предложить новые текстурирующие штаммы молочнокислых бактерий, в частности *S. thermophilus*, для придания текстуры пищевым продуктам. Особенно необходимы новые текстурирующие штаммы *S. thermophilus*, которые можно использовать вместе с текстурирующими штаммами *Lactobacillus*, такими как, например, *L. bulgaricus*.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложены новые штаммы *S. thermophilus*, обладающие улучшенными свойствами, в частности, в отношении их способности улучшать текстуру ферментированных пищевых продуктов, таких как молочные продукты, такие как, например, йогурт, а также продукты-аналоги молочных продуктов, и которые полезны для современного высокоиндустриального производства ферментированных пищевых продуктов.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к штамму *S. thermophilus*, имеющему (1) мутацию в гене АТР (аденозинтрифосфат)-связывающего белка LivG (ТС 3.A.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, причем мутация предпочтительно представляет собой замену глутаминовой кислоты на валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12. В другом аспекте настоящее изобретение относится к штамму *S. thermophilus*, имеющему мутацию в гене АТР-связывающего белка LivG (ТС 3.A.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, причем мутация предпочтительно представляет собой замену

нуклеотида А на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11.

В одном из аспектов изобретения штамм *S. thermophilus* имеет (2) мутацию в гене белка пермеазы ABC-транспортера, причем мутация предпочтительно представляет собой замену лейцина на фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4. В еще одном аспекте штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет дополнительную мутацию в гене белка пермеазы ABC-транспортера, причем мутация предпочтительно представляет собой замену нуклеотида С на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3.

В одном из аспектов в соответствии с изобретением штамм *S. thermophilus* имеет (3) мутацию в гене белка пептидеформилазы, причем мутация предпочтительно представляет собой замену аргинина на цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8. В еще одном аспекте штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет мутацию в гене белка пептидеформилазы, причем мутация предпочтительно представляет собой замену нуклеотида С на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7.

В одном из аспектов штамм *S. thermophilus* имеет (1) мутацию в гене АТФ-связывающего белка LivG, транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью. В одном из аспектов штамм *S. thermophilus* имеет (2) мутацию в гене белка пермеазы ABC-транспортера. В одном из аспектов штамм *S. thermophilus* имеет (3) мутацию в гене белка пептидеформилазы. В еще одном аспекте штамм *S. thermophilus* имеет две из описанных выше мутаций, такие как мутации (1) и (2), т.е. мутация в гене АТФ-связывающего белка LivG, транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, и в гене белка пермеазы ABC-транспортера; такие как вышеописанные мутации (1) и (3) или такие как вышеописанные мутации (2) и (3). В предпочтительном аспекте штамм *S. thermophilus* имеет все три вышеописанные мутации (1), (2) и (3).

Таким образом, настоящее изобретение относится к штамму *S. thermophilus*, имеющему (1) валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12, и/или Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11 (ген АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью). Настоящее изобретение относится к штамму *S. thermophilus*, имеющему (2) фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4, и/или Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3 (ген белка пермеазы ABC-транспортера). Настоящее изобретение относится к штамму *S. thermophilus*,

имеющему (3) цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8 и/или Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7 (ген белка пептиддеформилазы). В предпочтительном аспекте ген АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующей аминокислоты с разветвленной цепью, штамма *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11, и/или АТФ-связывающий белок LivG (ТС 3.А.1.4.1) транспортирующий аминокислоты с разветвленной цепью, имеет валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12. В еще одном предпочтительном аспекте ген белка пермеазы АВС-транспортера штамма *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3, и/или белок пермеаза АВС-транспортера имеет фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4. В еще одном аспекте штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет оба из вышеописанных (1) и (2). В еще одном аспекте штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет вышеописанные (1) и (3). В еще одном аспекте штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет вышеописанные (2) и (3). В предпочтительном аспекте штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет вышеописанные (1), (2) и (3).

Предпочтительно, штамм *S. thermophilus* представляет собой DSM22933 или его мутант или вариант, предпочтительно, когда мутант или вариант демонстрирует такие же или похожие текстурирующие свойства, как и DSM22933.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к композиции, содержащей указанный штамм *S. thermophilus*.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способам продуцирования ферментированного продукта, включающих ферментацию субстрата штаммом *S. thermophilus* или композицией в соответствии с изобретением.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к ферментированному пищевому продукту, полученному способом в соответствии с изобретением, или содержащему штамм *S. thermophilus*, или содержащему композицию в соответствии с изобретением.

Настоящее изобретение также относится к способам приготовления штаммов *S. thermophilus*, как определено в изобретении; причем штаммы предпочтительно получают с использованием штамма DSM22587 в качестве исходного материала, т.е. в качестве материнского штамма.

Настоящее изобретение также относится к использованию штамма *S. thermophilus* в соответствии с изобретением или композиции в соответствии с изобретением для

производства ферментированного продукта, предпочтительно для производства кисломолочного продукта.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:1 представляет нуклеотидную последовательность пермеазы ABC-транспортера в DSM22587.

SEQ ID NO: 2 представляет аминокислотную последовательность пермеазы ABC-транспортера в DSM22587.

SEQ ID NO: 3 представляет нуклеотидную последовательность пермеазы ABC-транспортера в DSM22933.

SEQ ID NO: 4 представляет аминокислотную последовательность пермеазы ABC-транспортера в DSM22933.

SEQ ID NO: 5 представляет нуклеотидную последовательность пептидеформилазы в DSM22587.

SEQ ID NO: 6 представляет аминокислотную последовательность пептидеформилазы в DSM22587.

SEQ ID NO: 7 представляет нуклеотидную последовательность пептидеформилазы в DSM22933.

SEQ ID NO: 8 представляет аминокислотную последовательность пептидеформилазы в DSM22933.

SEQ ID NO: 9 представляет нуклеотидную последовательность АТФ-связывающего белка LivG, транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, в DSM22587.

SEQ ID NO: 10 представляет аминокислотную последовательность АТФ-связывающего белка LivG, транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, в DSM22587.

SEQ ID NO: 11 представляет нуклеотидную последовательность АТФ-связывающего белка LivG, транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, в DSM22933.

SEQ ID NO: 12 представляет аминокислотную последовательность АТФ-связывающего белка LivG, транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, в DSM22933.

Пермеаза ABC-транспортера, DSM22587

SEQ ID NO: 1 – Последовательность ДНК, 2001 п.о.

ATGTTTCGTCTAACCAATAGACTGGCTTTGTCCAATCTCATAAAAAATCGTAA
GCTTTACTATCCGTATACATTGGCAACTATTCTGGTTATTGCCATTACCTATATTTTT
ACATCTTTAACGCTTAATTCGCATCTGGATGACTTACCTAGGGCAGATGCTATCAAG

ACGGTTTTGGGGTTGGGACTTGGGATTGTCGCCCTATCCTCTGGGATTATTGTTCTTT
ATGCCAACAGCTTTGTCATGAAAAATCGTTCAAAGGAGCTTGGTCTCTATAGTGTGC
TAGGCTTAGAGAAACGTCACCTCTTTAGCATGATTTTAAAAGAAACGATGATTATGG
GTTTTGTGACTTTGCTTCTAGGTATAGGTGTAGGGGCGCTATTCGATAAACTCATTTA
TGCTTTTCTTCAAAGGCTTATCGGTGAAAGTACTGGTTTAGTTTCAACCTTTCAGGTA
ATGACAATTCCTATTGTTCTTGTCATCTTTGCTTGTATTTTTAGTTTTTTGGTTTTGGT
AAATGGTTTCCGATTGCTACGGCTTAATCCTTTACAATTAATAAGATGGCCTTAA
GGGTGAAAAAAGGGACGTTTCCTAGTTATTCAGACCTTTTTGGGGCTTGGGGCTAT
GGGGTATGGTACTATCTTGCTCTTTCTGTTTCAAGTCCAGTAATAGCTATTATGAGT
TTTTTCTTGGCTGTTTTACTAGTTATTCTTGGAAGTTATCTTCTCTTTAATGCCGGGAC
AACAGTAGTTCTGCAACTCTTGAAAAAGAAGAAAAGCTACTATTACAAGCCTAATA
ATATGATTTCCATTTCCAACCTTGTCTTTCCGGATGAAGAAAAATGCAGTTGGGCTGG
CGACTATTGCTATCCTCTCAAGTATGGTTTTGGTGACGCTTGTAGGAGCTGCAAGTA
TCTATGCTGGGAAAAAAGACTATTTGGTGAGTGCTGCTCCACATGATTATTCAGTTT
CGGGCAATAAAGTTGACCTTACAAGCACTAAAAAGCTTATGGATGATTTCTTAATCA
AAACAGGTGAGCAAGTAAATGAAGAAGTAGCTGTCTCTTATCTTTTCTTTGGTATAA
AAAATCAAGAACTAATAAGTTAACCGTTTTTACTAAAAATGAAAGAAAAGTTGTT
CCAAAATCAATTGTTCTGGTCTTCTCTCAAGAAACCTTTAAGCAATTGACAGGGAAA
GAACTCAATCTCAGTTCTAATCAAATTGCCTTATACTAAGAATAAAACATTTAAG
ACGCAAAAGAGTCTGTCCATAGATGGTAAGAACTACCAGATTCATAGGCAACTTGG
TGACTTTATCAATAAAAAAGTACCAAATATCTATAAGATTATTGTGTCAGATTATAG
CTACTTAGTTGTACCAGATATCAAGATTTTTGAGTCATCAATGAAAGGGACATCAAT
AGCGCAAGCTACTTATGTTGGTGTAAACGTCAAGGACTCCACACATGATGCCAAGA
AAAATTTAGATTTGCTAGACCAAATAGCAGGTGAAGCAACAAAACAGTTAGCTGGA
CAAACACTACAGGTGTCCCTGAGTCTTACTTCTCTGCAAACAGCCGATATGATGCAGAA
GGGATGGTAAATGGCTTTGTTGGCGGAACCTTCTTTATTAGTATCTTCCTATCCATCA
TCTTCATGCTTGGCACAGTTCTTGTGATTTACTATAAACAGATTTCCGAAGGTTATGA
GGATCGTGAGCGCTTTGTTATTCTTCAAAGATTGGTTTGGACGACCTTCAAGTCAA
GCAAACCATTCGTAAGCAAGTTCTTACCATCTTCTTCCCTTTGATTTTTGCCTTT
ATTCACTTGGCCTTTGCTTATCATATGATCAGTTTGATTGTGCGTATCATTGGAGTTC
TCAATCCAGATCTTATGTTAGTGGTCACTATCATTGTTTGTGGTGTTTTTCTTCCTAGC
TTATATCTTGGTTTTTCGTCCTAACATCGCGTTCTTATCGTAGAATAGTATCAATGTAA

SEQ ID NO: 2 – АК (аминокислотная) последовательность, 666 аминокислот

MFRLTNRLALSNIKRNKLYYPYTLATILVIAITYIFTSLTLNSHLDDLPRADAIKT
 VLGLGLGIVALSSGIIVLYANSFVMKNRSKELGLYSVLGLEKRHLFSMILKETMIMGFVT
 LLLGIGVGALFDKLIYAFLQRLIGESTGLVSTFQVMTIPIVLVIFACIFSFLVLVNGFRLRL
 NPLQLTKDGLKGEKKGRFLVIQTFLGLGAMGYGYLALSQNPVIAIMSFFLAVLLVIL
 GTYLLFNAGTTVVLQLLKKKKSYYYKPNMISISNLVFRMKKNAVGLATIAILSSMVLV
 TLVGAASIYAGKKDYLVSAAPHDYSVSGNKVDLTSTKKLMDDFLIKTGEQVNEEVAVS
 YLFFGIKNQETNKLTVFTKNERKVVPKSIVLVFSQETFKQLTGKELNLSSNQIALYTKNK
 TFKTQKSLSIDGKNYQIHRQLGDFINKKVPNIYKIIIVSDYSYLVVPDIKIFESSMKGTSIAQ
 ATYVGVNVKDSHDAKKNLDDLQIAGEATKQLAGQTTGVPESYFSANSRYDAEGMV
 NGFVGGTFFISIFLSIIFMLGTVLVIYYKQISEGYEDRERFVILQKIGLDDLQVKQTIRKQV
 LTIFFLPLIFAFIHLAFAYHMISSLIVRIIGVLPDLMLVVTHIVCGVFFLAYILVFLTSRSYR
 RIVSM

Пермеаза ABC-транспортера, DSM22933

SEQ ID NO: 3 – Последовательность ДНК, 2001 п.о.

ATGTTTCGTCTAACCAATAGACTGGCTTTGTCCAATCTCATAAAAAATCGTAA
 GCTTTACTATCCGTATACATTGGCAACTATTCTGGTTATTGCCATTACCTATATTTTT
 ACATCTTTAACGCTTAATTCGCATCTGGATGACTTACCTAGGGCAGATGCTATCAAG
 ACGGTTTTGGGGTTGGGACTTGGGATTGTCGCCCTATCCTCTGGGATTATTGTTCTTT
 ATGCCAACAGCTTTGTCATGAAAAATCGTTCAAAGGAGCTTGGTCTCTATAGTGTGC
 TAGGCTTAGAGAAACGTCACCTCTTTAGCATGATTTTAAAAGAAACGATGATTATGG
 GTTTTGTGACTTTGCTTCTAGGTATAGGTGTAGGGGCGCTATTCGATAAACTCATTTA
 TGCTTTTCTTCAAAGGCTTATCGGTGAAAGTACTGGTTTAGTTTTCAACCTTTCAGGTA
 ATGACAATTCCTATTGTTCTTGTCATCTTTGCTTGTATTTTTAGTTTTTTGGTTTTGGT
 AAATGGTTTCCGATTGCTACGGCTTAATCCTTTACAATTAATAAAGATGGCTTTAA
 GGGTGAAAAAAGGGACGTTTCTAGTTATTCAGACCTTTTTGGGGCTTGGGGCTAT
 GGGGTATGGTACTATCTTGCTCTTTCTGTTTCAAGAAATCCAGTAATAGCTATTATGAGT
 TTTTTCTTGGCTGTTTTACTAGTTATTCTTGGAAGCTTATCTTCTTTAATGCCGGGAC
 AACAGTAGTTCTGCAACTCTTGAAAAAGAAGAAAAGCTACTATTACAAGCCTAATA
 ATATGATTTCCATTTCCAACCTTGTCTTTTCGGATGAAGAAAAATGCAGTTGGGCTGG
 CGACTATTGCTATCCTCTCAAGTATGGTTTTGGTGACGCTTGTAGGAGCTGCAAGTA
 TCTATGCTGGGAAAAAAGACTATTTGGTGAGTGCTGCTCCACATGATTATTCAGTTT
 CGGGCAATAAAGTTGACCTTACAAGCACTAAAAAGCTTATGGATGATTTCTTAATCA
 AACAGGTGAGCAAGTAAATGAAGAAGTAGCTGTCTCTTATCTTTTCTTTGGTATAA
 AAAATCAAGAACTAATAAGTTAACCGTTTTTACTAAAAATGAAAGAAAAGTTGTT

CCAAAATCAATTGTTCTGGTCTTCTCTCAAGAAACCTTTAAGCAATTGACAGGGAAA
 GAACTCAATCTCAGTTCTAATCAAATTGCCTTATACTAAGAATAAAACATTTAAG
 ACGCAAAGAGTCTGTCCATAGATGGTAAGAACTACCAGATTCATAGGCAACTTGG
 TGACTTTATCAATAAAAAAGTACCAAATATCTATAAGATTATTGTGTCAGATTATAG
 CTACTTAGTTGTACCAGATATCAAGATTTTTGAGTCATCAATGAAAGGGACATCAAT
 AGCGCAAGCTACTTATGTTGGTGTAAACGTCAAGGACTCCACACATGATGCCAAGA
 AAAATTTAGATTTGCTAGACCAAATAGCAGGTGAAGCAACAAAACAGTTAGCTGGA
 CAACTACAGGTGTCCCTGAGTCTTACTTCTCTGCAAACAGCCGATATGATGCAGAA
 GGGATGGTAAATGGCTTTGTTGGCGGAACCTTCTTTATTAGTATCTTCCTATCCATCA
 TCTTCATGCTTGGCACAGTTCTTGTGATTTACTATAAACAGATTTCCGAAGGTTATGA
 GGATCGTGAGCGCTTTGTTATTCTTCAAAGATTGGTTTGGACGACCTTCAAGTCAA
 GCAAACCATTCGTAAGCAAGTTCTTACCATCTTCTCCTCCCTTTGATTTTTGCCTTT
 ATCACTTGGCCTTTGCTTATCATATGATCAGTTTGATTGTGCGTATCATTGGAGTTC
 TCAATCCAGATCTTATGTTAGTGGTCACTATCATTGTTTGTGGTGTTCCTCCTAGC
 TTATATCTTGGTTTTCGTCCTAACATCGCGTTCTTATCGTAGAATAGTATCAATGTAA

SEQ ID NO: 4 – АК последовательность, 666 аминокислот

MFRLTNRLALSNIKRNKLYPYTLATILVIAITYIFTSLLNSHLDDLPRADAIKT
 VLGLGLGIVALSSGIIVLYANSFVMKNRSKELGLYSVLGLEKRHLFSMILKETMIMGFVT
 LLLGIGVGALFDKLIYAFLQRLIGESTGLVSTFQVMTIPIVLVIFACIFSFLVLVNGFRLRL
 NPLQLTKDGFKGEKKGRFLVIQTFLGLGAMGYGYLALSQNPVIAIMSFFLAVLLVIL
 GTYLLFNAGTTVVLQLLKKKKSYYYKPNMISISNLVFRMKKNAVGLATIAILSSMVLV
 TLVGAASIYAGKKDYLVSAAPHDYSVSGNKVDLTSTKCLMDDFLIKTGEQVNEEVAVS
 YLFFGIKNQETNKLTVFTKNERKVPKSIVLVFSQETFKQLTGKELNLSSNQIALYTKNK
 TFKTQKSLSIDGKNYQIHRQLGDFINKKVPNIYKIIVSDYSYLVVPDIKIFESSMKGTSLAQ
 ATYVGVNVKDSTHDAKKNLDDQIAGEATKQLAGQTTGVPESYFSANSRYDAEGMV
 NGFVGGTFFISIFLSIIFMLGTVLVIYYKQISEGYEDRERFVILQKIGLDDLQVKQTIRKQV
 LTIFFLPLIFAFIHLAFAYHMISLIVRIIGVLNPDMLMLVVTHIVCGVFFLAYILVFLTSRSYR
 RIVSM

Пептидная деформилаза, DSM22587

SEQ ID NO: 5 – Последовательность ДНК, 615 п.о.

ATGGATGCTCAAACCAAAATTATTCGCGCCAGCCACATGATTGATATGAACG
 ATATCATACGCGAAGGCAACCAACCTTGCCTGCTGTCGCTGAAGACGTAACCCTAC
 CACTTTCAGATGAAGATATTATCCTTGGTGAAAAAATGATGCAGTTTCTTCGTAATT
 CACAGGACCCTGTTATCGCTGAAAAAATGGGACTTCGAGGAGGTGTTGGTCTTGCA

GCACCACAATTAGATATTTCAAAACGCATTATTGCTGTTCTCGTTCCAAATCCTGAA
 GACGCTAAGGGGAATCCACCTAAAGAAGCTTATAGCCTTCAAGAAATCATGTATAA
 TCCTAAAGTAGTTGCTCATTCTGTTTCAGGAGGCTGCTCTAGGTAACGGTGAAGGATG
 CCTTTCAGTCGATCGCGACGTTCTGGATATGTCGTTTCGCCATGCTCGTGTACTATT
 GAATACTTCAACAAAGAGGGTGAAAAGAAACGTATTAAACTCCGTGGTTACGACTC
 AATCGTTGTTCAACATGAAATCGACCATACTAACGGTATCATGTTCTACGACCGTAT
 CAATAAAGACAATCCATTTACTATCAAGGATGGACTCTTGATTATCGAATAA

SEQ ID NO: 6 – АК последовательность, 204 аминокислоты

MDAQTKIIRASHMIDMNDIIREGNPTLRVAEDVTLPLSDEDIILGEKMMQFLRNS
 QDPVIAEKMGLRGGVGLAAPQLDISKRIIAVLVPNPEDAKGNPPKEAYSLQEIMYNPKV
 VAHSVQEAALGNNEGCLSVDRDVPGYVVRHARVTIEYFNKEGEKRIKLRGYDSIVVQ
 HEIDHTNGIMFYDRINKDNPFTIKDGLLIE

Пептидная деформилаза, DSM22933

SEQ ID NO: 7 – Последовательность ДНК, 615 п.о.

ATGGATGCTCAAACCAAAATTATTCGCGCCAGCCACATGATTGATATGAACG
 ATATCATACGCGAAGGCAACCCAACCTTGCGTGCTGTCGCTGAAGACGTAACCCTAC
 CACTTTCAGATGAAGATATTATCCTTGGTGAAAAAATGATGCAGTTTCTTCGTAATT
 CACAGGACCCTGTTATCGCTGAAAAAATGGGACTTCGAGGAGGTGTTGGTCTTGCA
 GCACCACAATTAGATATTTCAAAACGCATTATTGCTGTTCTCGTTCCAAATCCTGAA
 GACGCTAAGGGGAATCCACCTAAAGAAGCTTATAGCCTTCAAGAAATCATGTATAA
 TCCTAAAGTAGTTGCTCATTCTGTTTCAGGAGGCTGCTCTAGGTAACGGTGAAGGATG
 CCTTTCAGTCGATCGCGACGTTCTGGATATGTCGTTTGGCCATGCTCGTGTACTATT
 GAATACTTCAACAAAGAGGGTGAAAAGAAACGTATTAAACTCCGTGGTTACGACTC
 AATCGTTGTTCAACATGAAATCGACCATACTAACGGTATCATGTTCTACGACCGTAT
 CAATAAAGACAATCCATTTACTATCAAGGATGGACTCTTGATTATCGAATAA

SEQ ID NO: 8 – АК последовательность, 204 аминокислоты

MDAQTKIIRASHMIDMNDIIREGNPTLRVAEDVTLPLSDEDIILGEKMMQFLRNS
 QDPVIAEKMGLRGGVGLAAPQLDISKRIIAVLVPNPEDAKGNPPKEAYSLQEIMYNPKV
 VAHSVQEAALGNNEGCLSVDRDVPGYVVRHARVTIEYFNKEGEKRIKLRGYDSIVVQ
 HEIDHTNGIMFYDRINKDNPFTIKDGLLIE

**АТФ-связывающий белок LivG, транспортирующий аминокислоты с
 разветвленной цепью, DSM22587**

SEQ ID NO: 9 – Последовательность ДНК, 765 п.о.

ATGGCACTTCTTGAAGTTAAAAATTTAACTAAAAACTTTGGTGGTTTGACTGC
 TGTTGGTGATGTTTCAATGGAACCTCAATGAAGGTGAGTTGGTTGGGCTAATAGGGCC
 AAACGGTGCTGGTAAAACAACCTTGTTC AACCTTTTGACTGGTGTCTATGAGCCAAG
 TGAAGGGACTGTAACGCTTGATGGTATAGTTCTCAACGGTAAAGCACCTTACAAGAT
 TGCGTCACTCGGTTTGTACGTA CTTTCCAAAATATCCGCCTTTTCAAAGACATGACT
 GTA CTTGAAAATGTTCTTGTGGTTTATCAAATAAGCAACCTTCAAATTTCTTTGCAT
 CTCTTTTTCGCTTGCCTAAGTACTATTCAAGTGAGGAAGAGTTGAAAGACAAAGCTA
 TGAAGCTCTTGGCTATCTTTAACTTGGATGGTGAGGCAGATACGCTTGCGAAAACT
 TGGCTTATGGACAACAACGTC ACTTGGAGATTGTTCGTGCGCTTGCAACGGAACCTA
 AAATTCTTTTCCTCGATGAACCAGCTGCTGGTATGAACCCACAAGAAACAGCTGAGT
 TGACTGCTCGTATTCGTCAAATTCAAAAAGATTTCCGGTATTACAATTATCTTGATTGA
 GCACGATATGAGTTTGGTCATGGATGTCACTGAGCGTATCTATGTTTTAGAAATATGG
 ACGCTTGATTGCAGAAGGAACCCCTGATGAAATTAAGAATAACAAGCGTGTTATCG
 AAGCTTACTTGGGAGGTGAAGCATAA

SEQ ID NO: 10 - АК последовательность, 254 аминокислоты

MALLEVKNLTKNFGGLTAVGDVSMELNEGELVGLIGPNGAGKTTLFNLLTGVY
 EPSEGTVTLDGIVLNGKAPYKIASLGLSRTFQNI RLFKDMTVLE NVLVGLSNKQPSNFFA
 SLLRLPKYYSSEEELKDKAMKLLAIFNLDGEADTLAKNLAYGQQRHLEIVRALATEPKIL
 FLDEPAAGMNPQETAELTARIRQIQKDFGITIILIEHDMSLVMDVTERIYVLEYGRLIAEG
 TPDEIKNNKRVIEAYLGGEA

АТФ-связывающий белок LivG, транспортирующий аминокислоты с разветвленной цепью, DSM22933

SEQ ID NO: 11 – Последовательность ДНК, 765 п.о.

ATGGCACTTCTTGAAGTTAAAAATTTAACTAAAAACTTTGGTGGTTTGACTGC
 TGTTGGTGATGTTTCAATGGAACCTCAATGAAGGTGAGTTGGTTGGGCTAATAGGGCC
 AAACGGTGCTGGTAAAACAACCTTGTTC AACCTTTTGACTGGTGTCTATGAGCCAAG
 TGAAGGGACTGTAACGCTTGATGGTATAGTTCTCAACGGTAAAGCACCTTACAAGAT
 TGCGTCACTCGGTTTGTACGTA CTTTCCAAAATATCCGCCTTTTCAAAGACATGACT
 GTA CTTGAAAATGTTCTTGTGGTTTATCAAATAAGCAACCTTCAAATTTCTTTGCAT
 CTCTTTTTCGCTTGCCTAAGTACTATTCAAGTGAGGAAGAGTTGAAAGACAAAGCTA
 TGAAGCTCTTGGCTATCTTTAACTTGGATGGTGAGGCAGATACGCTTGCGAAAACT
 TGGCTTATGGACAACAACGTC ACTTGGAGATTGTTCGTGCGCTTGCAACGGTACCTA
 AAATTCTTTTCCTCGATGAACCAGCTGCTGGTATGAACCCACAAGAAACAGCTGAGT
 TGACTGCTCGTATTCGTCAAATTCAAAAAGATTTCCGGTATTACAATTATCTTGATTGA

GCACGATATGAGTTTGGTCATGGATGTCACTGAGCGTATCTATGTTTTAGAAATATGG
ACGCTTGATTGCAGAAGGAACCCCTGATGAAATTAAGAATAACAAGCGTGTTATCG
AAGCTTACTTGGGAGGTGAAGCATAA

SEQ ID NO: 12 – АК последовательность, 254 аминокислоты

MALLEVKNLTKNFGGLTAVGDVSMELNEGELVGLIGPNGAGKTTLFNLLTGVY
EPSEGTVTLDGIVLNGKAPYKIASLGLSRTFQNIRLFKDMTVLENVLVGLSNKQPSNFFA
SLLRLPKYYSSEEELKDKAMKLLAIFNLDGEADTLAKNLAYGQQRHLEIVRALATVPKI
LFLDEPAAGMNPQETAELTARIRQIQKDFGITIILIEHDMSLVMDVTERIYVLEYGRLIAE
GTPDEIKNNKRVIEAYLGGEA

Подробное описание изобретения

Определения

Все определения здесь соответствующих терминов соответствуют тому, что будет понятно специалисту в данной области техники в связи с соответствующим здесь техническим контекстом.

В контексте настоящей заявки на изобретение термин “**молоко**” используется в своем общепринятом значении для обозначения жидкостей, продуцируемых молочными железами животных (например, коров, овец, коз, буйволиц, верблюдиц и т.п.).

Термин “**молочный субстрат**“ может представлять собой любой сырой и/или переработанный молочный материал, который можно подвергать ферментации способом в соответствии с изобретением. Таким образом, полезные молочные субстраты включают растворы/суспензии любого молока, такого как цельное молоко или молоко пониженной жирности, обезжиренное молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, сыворотка, сывороточный пермеат, лактоза, маточная жидкость процесса кристаллизации лактозы, концентрат сывороточного белка или сливки, но не ограничиваясь этим. Очевидно то, что молочный субстрат может быть получен у любого млекопитающего, например, он может представлять собой, по существу, чистое молоко млекопитающих или восстановленное сухое молоко, или молочный субстрат можно получать из растительного материала. Предпочтительно, по меньшей мере часть белка в молочном субстрате представляет собой белки, естественным образом встречающиеся в молоке млекопитающих, такие как казеин или сывороточный белок. Тем не менее, часть белка может представлять собой белки, которые не встречаются естественным образом в молоке.

Перед ферментацией молочный субстрат может быть гомогенизирован и пастеризован в соответствии со способами, известными в данной области техники.

“**Гомогенизация**”, используемый в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений, обозначает интенсивное перемешивание для получения растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию осуществляют до ферментации, то ее можно осуществлять для разбивания молочного жира на более мелкие части, чтобы он больше не отделялся от молока. Последнее можно осуществить путем пропускания молока под высоким давлением через небольшие отверстия.

“**Пастеризация**”, используемый в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений, обозначает обработку молочного субстрата для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно, пастеризацию осуществляют путем поддержания определенной температуры в течение определенного периода времени. Указанную температуру обычно достигают путем нагревания. Температуру и продолжительность можно выбирать для уничтожения или инактивации некоторых бактерий, таких как вредные бактерии. Затем можно проводить стадию быстрого охлаждения.

“**Ферментация**” в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений обозначает превращение углеводов в кислоты или спирты или их смесь под действием микроорганизмов (например, молочнокислых бактерий (LAB)). Процессы ферментации, используемые при производстве пищевых продуктов, таких как молочные продукты, хорошо известны, и специалисты в данной области техники знают, каким образом выбрать подходящие условия процесса, такие как температура, кислород, количество микроорганизма(ов) и длительность процесса. Условия ферментации выбирают таким образом, чтобы способствовать достижению настоящего изобретения, например, для получения ферментированного пищевого продукта, такого как кисломолочный продукт, такой как молочный продукт, предпочтительно, ферментированный пищевой продукт, который обладает улучшенной текстурой по сравнению с пищевым продуктом, полученным способом, который не включает использование штаммов в соответствии с настоящим изобретением или использование композиции в соответствии с настоящим изобретением в любом из его воплощений.

Термины “**кисломолочный**” и “**молочный**” используются здесь взаимозаменяемо. В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений выражение “**кисломолочный продукт**” обозначает пищевой или кормовой продукт, причем получение пищевого или кормового продукта включает ферментацию молочного субстрата молочнокислой бактерией. Используемый здесь “**кисломолочный продукт**” включает продукты, такие как термофильные кисломолочные продукты или мезофильные

кисломолочные продукты, но не ограничиваясь этим. Термин “**термофильная ферментация**” здесь относится к ферментации при температуре выше приблизительно 35°C, такой как от приблизительно 35°C до приблизительно 45°C. Термин “**мезофильная ферментация**” здесь относится к ферментации при температуре от приблизительно 22°C до приблизительно 35°C.

В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений выражение “**молочнокислые бактерии**” (“LAB”) обозначает пищевые бактерии, продуцирующие молочную кислоту в качестве основного конечного продукта метаболизма при ферментации углеводов. Эти бактерии связаны общими метаболическими и физиологическими характеристиками и являются грамположительными, с низким содержанием GC, кислотоустойчивыми, неспорулирующими, палочковидными бациллами или кокками. На стадии ферментации потребление углеводов этими бактериями приводит к образованию молочной кислоты, уменьшению pH и образованию белкового сгустка. Таким образом, эти бактерии отвечают за подкисление молока и текстуру молочного продукта. Штаммы *S. thermophilus* в соответствии с настоящим изобретением классифицируются как молочнокислые бактерии.

В настоящем контексте “**заквасочная культура**” представляет собой культуру, которая представляет собой препарат из одного или 30 дополнительных бактериальных штаммов (таких как штаммы молочнокислых бактерий) для содействия процессу ферментации при приготовлении ферментированных продуктов, таких как различные продукты питания, корма и напитки.

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

“**Текстура**” также представляет собой важный фактор качества кисломолочных продуктов, и потребительское признание часто тесно связано со свойствами текстуры. Текстура кисломолочного продукта зависит от структур внеклеточных полисахаридов, бактерий, используемых для ферментации, параметров процесса, а также состава молока. В контексте настоящего изобретения реологические свойства (текстура) кисломолочного продукта, такие как **вязкость**, могут быть измерены в зависимости от напряжения сдвига

кисломолочного продукта, как описано ниже. Вязкость также может быть измерена с помощью пипеточного тестирования вязкости, как описано ниже в примерах 2 и 3. Кроме того, свойства текстурирования можно оценить с помощью аспирационного теста, как описано в примере 4 ниже.

“**Текстурирующий штамм**” в описании и формуле настоящего изобретения представляет собой штамм, который предпочтительно приводит к получению молочнокислых продуктов, имеющих в условиях, описанных ниже и приведенных здесь в примерах, напряжение сдвига предпочтительно больше 40 Па, такое как 44 Па или выше, измеренное при скорости сдвига 300 с^{-1} . Штамм *S. thermophilus* может быть определен как **обеспечивающий высокую степень текстурирования**, поскольку он приводит к образованию молочнокислых продуктов, имеющих в тех же самых условиях напряжение сдвига 53 Па или выше, измеренное при скорости сдвига 300 с^{-1} .

200 мл молока (3,6% белка, 1,5% или 3% жира) нагревают до 95°C в течение 5 мин, затем охлаждают до температуры инокуляции (43°C), и инокулируют 0,02% заквасочной культуры FD-DVS, содержащей штамм молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции (43°C) до pH 4,60 с последующим хранением при 6°C в течение 7 суток, а затем осторожно перемешивают и измеряют напряжение сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} при 13°C .

В связи с настоящим изобретением “**напряжение сдвига**” может быть измерено следующим способом: когда pH кисломолочного продукта (например, молока млекопитающих или растительного молока) достигал pH~4,60 при температуре инкубации, например, 43°C , кисломолочный продукт охлаждали путем переноса контейнера в ледяную воду и, возможно, хранения при 6°C в течение 7 суток. Образец кисломолочного продукта осторожно перемешивали вручную с помощью палочки с перфорированным диском до гомогенности образца. Реологические свойства образца оценивали на реометре (Anton Paar Physica Rheometer с ASC, автоматическое устройство для смены образца, Anton Paar® GmbH, Австрия) с помощью чашки-бочонка. Реометр был настроен на постоянную температуру 13°C в течение всего времени измерения. Настройки были следующими:

-Время удерживания (для перестройки до некоторой исходной структуры)

-5 минут без какого-либо физического стресса (вибрация или вращение), применяемого в отношении образца.

-Стадия вибрации (для измерения модуля эластичности и вязкости, G' и G'' , соответственно, таким образом, рассчитывая комплексный модуль G^*)

Постоянный штамм = 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)

-Конструировали две стадии:

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

Каждая стадия включала 21 точку измерения в течение 210 с (на каждую по 10 с).

Для дополнительного анализа выбирали напряжение сдвига при 300 1/с (300 с^{-1}), поскольку оно коррелирует с вязкостью в ротовой полости при проглатывании кисломолочного продукта.

Используемое здесь “**пипеточное тестирование вязкости**” относится к способу определения вязкости продукта путем определения времени истечения из волюметрической пипетки. Более длительное время вытекания соответствует более высокой вязкости, смотри также пример 2:

Свернувшееся молоко изготавливали из 200 мл обезжиренного молока, инокулированного 1% тестируемого бактериального штамма(ов) (из ночной культуры, выращенной в обезжиренном молоке при 37°C), и инкубировали в течение 20 ч при 42°C или при 37°C . Вязкость свернувшегося молока измеряли с помощью волюметрической пипетки объемом 25 мл, при этом время вытекания указанного свернувшегося молока из пипетки измеряли в трех параллелях. Свернувшееся молоко осторожно перемешивают ложкой до гомогенного состояния. Затем волюметрическую пипетку объемом 25 мл заполняют и измеряют время опорожнения пипетки под действием силы тяжести. Время, необходимое для опорожнения 25 мл свернувшегося молока из пипетки, регистрируют в секундах.

Используемый здесь термин “**бактериофаг**” имеет обычное значение, понимаемое в области техники, т.е. вирус, который избирательно инфицирует одну или более чем одну бактерию. Множество бактериофагов специфичны к конкретному роду или видам, или штамму бактерий. Термин “бактериофаг” является синонимом термина “фаг”. Бактериофаги могут включать бактериофаги, принадлежащие к любому из следующих семейств вирусов: *Corticoviridae*, *Cystoviridae*, *Inoviridae*, *Leviviridae*, *Microviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae* или *Tectiviridae*, но не ограничиваясь этим. Бактериофаг может представлять собой литический бактериофаг или лизогенный бактериофаг. Литический бактериофаг представляет собой бактериофаг, который следует литическим путем при завершении литического цикла, нежели чем путем вхождения в лизогенный путь. Литический бактериофаг подвергается вирулентной репликации, приводящей к лизису клеточной мембраны, разрушению клеток и высвобождению частиц

потомства бактериофага, способных инфицировать другие клетки. Лизогенный бактериофаг представляет собой бактериофаг, способный входить в лизогенный путь, в котором бактериофаг становится спящей пассивной частью клеточного генома до завершения ее литического цикла.

В контексте настоящего изобретения **“фагоустойчивый мутант”** относится к бактериальному штамму, в котором развиты механизмы защиты от фагов. В одном из воплощений молочнокислая бактерия в соответствии с настоящим изобретением устойчива к одному или более чем одному бактериофагу или одному или более чем одному набору бактериофагов; в еще одном воплощении молочнокислая бактерия в соответствии с настоящим изобретением устойчива к тому же самому бактериофагу, к которому устойчив штамм, депонированный в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно, молочнокислая бактерия в соответствии с настоящим изобретением устойчива к фагу DSM24022. В данном контексте термин **“фагостойкий”** используется взаимозаменяемо с термином **“фагоустойчивый”**. **Фагоустойчивые мутанты** в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены, как описано в примере 1 ниже.

В данном контексте термины **“штаммы, имеющие происхождение из”**, **“полученный штамм”** или **“мутант”** следует понимать как штамм, имеющий происхождение из другого штамма (или **“материнского штамма”**) с помощью, например, генной инженерии, радиации и/или химической обработки, и/или селекции, адаптации, скрининга и т.п. Мутант также может представлять собой спонтанно возникший мутант. Предпочтительно то, чтобы полученный штамм представлял собой функционально эквивалентный мутант, например, штамм, который имеет практически такие же или улучшенные свойства в отношении, например, роста и подкисления, что и материнский штамм. Такой производный штамм является частью настоящего изобретения. В частности, термин **“производный штамм”** или **“мутант”** относится к штамму, полученному путем того, что материнский штамм подвергают любой обычно используемой мутагенизирующей обработке, включая обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрогуанидин (NTG), УФ-излучение или спонтанно возникающий мутант. Мутанты также могут быть получены с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Мутант может быть подвергнут нескольким мутагенизирующим обработкам (под одной обработкой следует понимать одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/отбора), но в настоящее время предпочтительно, чтобы было осуществлено не более 20, не более 10 или не более 5 обработок. В предпочтительном полученном штамме

менее чем 1% или менее чем 0,1%, менее чем 0,01%, менее чем 0,001% или даже менее чем 0,0001% нуклеотидов бактериального генома изменены (например, путем замены, вставки, делеции или их комбинации) по сравнению с материнским штаммом.

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

Термин “**идентичность последовательности**” относится к родству между двумя нуклеотидными последовательностями или между двумя аминокислотными последовательностями. Алгоритмы для выравнивания последовательностей и определения степени идентичности последовательностей между ними хорошо известны в данной области техники. Для задач настоящего изобретения степень идентичности последовательностей между двумя нуклеотидными последовательностями или двумя аминокислотными последовательностями определяют, например, с помощью инструмента множественного выравнивания последовательностей Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; Sievers et al., 2011) со стандартными параметрами.

Для задач настоящего изобретения степень идентичности между двумя аминокислотными последовательностями определяют, например, с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453), как реализовано в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al. (2000) Trends in Genetics 16:276-277), предпочтительно, версии 3.0.0 или более поздней. Следующие возможные используемые параметры представляют собой штраф за открытие пробелов - 10, штраф за удлинение пробелов - 0,5, и матрица подстановок EBLOSUM62 (EMBOSS-версия BLOSUM62). Выход Needle с меткой “longest identity (самая длинная идентичность)” (полученный с помощью опции -no brief 30) используется в качестве процента идентичности и рассчитывается следующим образом:

$(\text{идентичные остатки} \times 100) / (\text{длина выравнивания} - \text{Общее количество пробелов в выравнивании})$.

Для задачи в соответствии с настоящим изобретением может быть осуществлен процесс выравнивания нуклеотидных последовательностей с использованием blastn,

предоставленного Национальным центром биотехнологической информации (NCBI) на сайте <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> с применением стандартных параметров.

В настоящем описании изобретения и формуле изобретения используются обычные однобуквенные и трехбуквенные коды аминокислотных остатков. Для удобства ссылки аминокислотные изменения в мутантах и вариантах в соответствии с изобретением описаны с использованием следующей номенклатуры: аминокислотный остаток в родительском белке; позиция; замененный(е) аминокислотный(е) остаток(и). В соответствии с этой номенклатурой замена, например, остатка глутаминовой кислоты на остаток валина в положении 169 обозначена как Glu169Val или E169V.

В контексте настоящего изобретения под мутацией в гене (“**генной мутацией**”) следует понимать изменение нуклеотидной последовательности генома организма, приводящее в результате к изменениям в фенотипе указанного организма, причем изменение может представлять собой делецию нуклеотида, замену нуклеотида на другой нуклеотид, вставку нуклеотида или сдвиг рамки считывания. В контексте настоящего изобретения под “**делецией**” следует понимать генетическую мутацию, приводящую к удалению одного или более чем одного нуклеотида нуклеотидной последовательности генома организма; под “**вставкой**” следует понимать добавление одного или более чем одного нуклеотида в нуклеотидную последовательность; под “**заменой**” (или “**точечной мутацией**”) следует понимать генетическую мутацию, при которой один нуклеотид нуклеотидной последовательности заменяется на другой нуклеотид. В контексте настоящего изобретения мутация в гене относится к изменению нуклеотидной последовательности любого из элементов, содержащихся в гене. Например, ген может содержать несколько элементов или участков, таких как различные регуляторные последовательности (энхансеры, сайленсеры, промоторы, 5' и 3' UTR (нетранслируемые области) и т.д.) и области открытой рамки считывания (которые содержат интроны и экзоны). Следовательно, в контексте настоящего изобретения под мутацией в конкретном гене следует понимать изменение нуклеотидной последовательности указанного гена, причем это изменение происходит в регуляторном элементе гена (например, в промоторе гена) и/или в открытой рамке считывания гена (такой как в экзоне). Если мутация возникает, например, в последовательности экзона, то мутация может привести к отличающейся аминокислоте в транслируемом белке. Если мутация возникает, например, в регуляторной области гена, то мутация может привести к повышенной (или пониженной) экспрессии гена, например, к повышенному (или пониженному) количеству белка.

В контексте настоящего изобретения замена или мутация одной аминокислоты или нуклеотида на другую аминокислоту или нуклеотид в положении, **соответствующем конкретному положению** в конкретной последовательности, означает, что в мутировавшей аминокислотной или нуклеотидной последовательности могут присутствовать дополнительные мутации (например, делеции, вставки, замены и т.д.), помимо конкретной замены или мутации в указанном положении (или в положении, соответствующем этому указанному положению, в случае, например, когда в мутировавшей последовательности присутствуют делеции или вставки). Следовательно, в контексте настоящего изобретения, например, фраза “мутация в АТР-связывающем белке LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующем аминокислоты с разветвленной цепью, представляет собой замену глутаминовой кислоты на валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12, и/или мутацию нуклеотида А на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11” может означать:

(1) что в мутировавшей аминокислотной или нуклеотидной последовательности АТР-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1 .4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, имеется замена глутаминовой кислоты на валин точно в положении 169 в SEQ ID NO: 12 или замена (мутация) нуклеотида А на нуклеотид Т точно в положении 506 в SEQ ID NO: 11. Безусловно то, что не исключены дополнительные замены или мутации в SEQ ID NO: 12 или в SEQ ID NO: 11;

(2) что в случае, если имеются дополнительные мутации в последовательности, такие как вставки или делеции, специфическая замена глутаминовой кислоты на валин или нуклеотида А на нуклеотид Т может больше не находиться точно в положении 169 в SEQ ID NO: 12 или точно в положении 506 в SEQ ID NO: 11 из-за дополнительных мутаций, таких как вставки или делеции. В этих случаях указанная замена глутаминовой кислоты на валин или нуклеотида А на нуклеотид Т должна быть в положении, которое, с учетом дополнительной мутации в последовательности, может соответствовать положению 169 в SEQ ID NO. 12 или положению 506 в SEQ ID NO. 11. Специалист в данной области техники может определить “положение, соответствующее конкретному положению в конкретной последовательности”, например, путем выравнивания последовательностей и нахождения положения, которое будет соответствовать конкретному положению в исходной последовательности.

Соответствующее значение может применяться к фразам “мутация в белке пермеазе ABC-транспортера представляет собой замену лейцина на фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4, и/или мутацию нуклеотида С на

нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3” и “мутация в белке пептиддеформилазы представляет собой замену аргинина на цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8, и/или мутацию нуклеотида С на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7”.

В настоящем описании и формуле изобретения используется обычный однобуквенный код для нуклеотидов в соответствии с аналогичными принципами, описанными выше для номенклатуры аминокислот.

Используемый здесь термин “**приблизительно**” (или “около”) означает указанную величину $\pm 1\%$ от ее величины, или термин “приблизительно” означает указанную величину $\pm 2\%$ от ее величины, или термин “приблизительно” означает указанную величину $\pm 5\%$ от ее величины, термин “приблизительно” означает указанную величину $\pm 10\%$ от ее величины, или термин “приблизительно” означает указанную величину $\pm 20\%$ от ее величины, или термин “приблизительно” означает указанную величину $\pm 30\%$ от ее величины; предпочтительно термин “приблизительно” означает точно указанную величину ($\pm 0\%$).

Во всем описании и формуле изобретения слово “**содержит**” и его варианты (например, “содержащий”, “имеющий”, “включающий”, “вмещающий”) как правило не является ограничивающим и, таким образом, не исключает другие характеристики, которые могут представлять собой, например, технические характеристики, добавки, компоненты или стадии. Тем не менее, когда здесь используется слово “содержат”, то оно также включает конкретное воплощение, в котором это слово понимается как ограничивающее; в этом конкретном воплощении слово “содержат” имеет значение термина “состоять из”.

Использование терминов единственного числа и похожих им в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) должно быть истолковано как охватывающее единственное, так и множественное число, если иное не указано здесь или явно не противоречит контексту. Указание диапазонов величин здесь предназначено только для того, чтобы служить сокращенным способом индивидуальной ссылки на каждую отдельную величину, оказывающуюся в диапазоне, если иное здесь не указано, и каждая отдельная величина включено в описание таким образом, как если бы она было указана здесь индивидуально. Все описанные здесь способы могут быть осуществлены в любом подходящем порядке, если здесь не указано иное или если явно не противоречит контексту.

Использование любых и всех приведенных здесь примеров или примерных формулировок (например, “такой как”) предназначено исключительно для более хорошего

освещения изобретения и не ограничивает объем изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в описании не должна толковаться как указывающая на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического применения изобретения.

В соответствии с настоящим изобретением вязкость может быть (и предпочтительно) измерена, как описано в примерах 2 и 3. В соответствии с настоящим изобретением аспирация может быть (и предпочтительно) измерена, как описано в примере 4. В соответствии с настоящим изобретением реологические свойства молочнокислой бактерии или смеси, такие как напряжение сдвига, могут быть (и предпочтительно) измерены, как описано в примере 5.

Штаммы *Streptococcus thermophilus*

Авторы изобретения неожиданно идентифицировали штаммы *S. thermophilus*, которые отвечают потребностям промышленности. Новые штаммы демонстрируют, например, улучшенные реологические свойства (например, текстуру) при использовании самих по себе или в качестве части смешанной культуры в молочном субстрате по сравнению с материнским штаммом. Новые штаммы *S. thermophilus* обладают способностью, используемой, например, в молочных культурах, таких как йогуртовые культуры, для достижения улучшенных реологических параметров, таких как напряжение сдвига, вязкость и упругость геля в конечном продукте. Реология тесно связана с сенсорным качеством продукта и поэтому взаимосвязь между реологией и вкусом в конечном продукте таким образом имеет первостепенную важность.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что штаммы *S. thermophilus*, имеющие мутацию в гене АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, обладают более хорошими текстурирующими свойствами, чем их материнские штаммы, т.е. чем штамм, у которого отсутствует такая же мутация в гене АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью. В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что мутация в гене АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, причем мутация представляет собой замену глутаминовой кислоты на валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12, связана с более хорошими текстурирующими свойствами. Например, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что штаммы *S. thermophilus*, имеющие мутацию в гене АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, причем мутация представляет собой замену нуклеотида А на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 506

в SEQ ID NO: 11, демонстрируют более хорошие текстурирующие свойства, чем их материнский штамм. Последнее продемонстрировано в примерах. Следовательно, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что штаммы *S. thermophilus*, имеющие валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12, и/или Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11 (ген АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью), демонстрируют более хорошие текстурирующие свойства, чем штаммы *S. thermophilus*, у которых отсутствует валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12 (например, штаммы которые могут иметь глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12), и/или Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11 (например, штаммы, которые могут иметь А в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11).

Следовательно, первый аспект настоящего изобретения относится к штамму *S. thermophilus*, имеющему (1) мутацию в гене АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, причем мутация предпочтительно представляет собой замену глутаминовой кислоты на валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к штамму *S. thermophilus*, имеющему (1) мутацию в гене АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, причем мутация предпочтительно представляет собой замену нуклеотида А на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11. Следовательно, настоящее изобретение дополнительно относится к штамму *S. thermophilus*, имеющему валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12, и/или Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11 (ген АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью).

Дополнительно, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что штаммы *S. thermophilus*, имеющие мутацию в гене белка пермеазы АВС-транспортера, обладают более хорошими текстурирующими свойствами, чем их материнские штаммы, т.е. чем штамм, у которого отсутствует такая же мутация в гене белка пермеазы АВС-транспортера. В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что мутация в гене белка пермеазы АВС-транспортера, причем мутация представляет собой замену лейцина на фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4, связана с более хорошими текстурирующими свойствами. Например, авторы настоящего изобретения неожиданно

обнаружили, что штаммы *S. thermophilus*, имеющие мутацию в гене белка пермеазы ABC-транспортера, причем мутация представляет собой замену нуклеотида С на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3, демонстрируют более хорошие текстурирующие свойства, чем материнский штамм. Последнее продемонстрировано в примерах. Следовательно, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что штаммы *S. thermophilus*, имеющие фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4, и/или Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3 (ген белка пермеазы ABC-транспортера), демонстрируют более хорошие текстурирующие свойства, чем штаммы *S. thermophilus*, у которых отсутствует фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4 (например, штаммы которые имеют лейцин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4), и/или штаммы, у которых отсутствует Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3 (например, штаммы, которые имеют С в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3).

Следовательно, штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет (2) мутацию в гене белка пермеазы ABC-транспортера, причем мутация предпочтительно представляет собой замену лейцина на фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4. Например, штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет (2) мутацию в гене белка пермеазы ABC-транспортера, причем мутация предпочтительно представляет собой замену нуклеотида С на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3. Следовательно, настоящее изобретение дополнительно относится к штамму *S. thermophilus*, имеющему (2) фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4, и/или Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3 (ген белка пермеазы ABC-транспортера).

Дополнительно, авторы изобретения неожиданно обнаружили то, что штаммы *S. thermophilus*, имеющие мутацию в гене белка пептиддеформилазы, обладают более хорошими текстурирующими свойствами, чем их материнские штаммы, т.е. чем штамм, у которого отсутствует такая же мутация в гене белка пептиддеформилазы. В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что мутация в гене белка пептиддеформилазы, причем мутация представляет собой замену аргинина на цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8, связана с более хорошими текстурирующими свойствами. Например, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что штаммы *S. thermophilus*, имеющие мутацию в гене белка

пептиддеформилазы, причем мутация представляет собой замену нуклеотида С на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7, демонстрируют более хорошие текстурирующие свойства, чем материнский штамм. Последнее продемонстрировано в примерах. Следовательно, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что штаммы *S. thermophilus*, имеющие цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8, и/или Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7 (ген белка пептиддеформилазы), демонстрируют более хорошие текстурирующие свойства, чем штаммы *S. thermophilus*, у которых отсутствует цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8 (например, штаммы, которые имеют аргинин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8), и/или штаммы, у которых отсутствует Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7 (например, штаммы, которые имеют С в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7).

Следовательно, штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет (3) мутацию в гене белка пептиддеформилазы, причем мутация предпочтительно представляет собой замену аргинина на цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8. Например, штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет (3) мутацию в гене белка пептиддеформилазы, причем мутация предпочтительно представляет собой замену нуклеотида С на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7. Следовательно, настоящее изобретение относится к штамму *S. thermophilus*, имеющему (3) цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8, и/или Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7 (ген белка пептиддеформилазы).

Предпочтительно, штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет по меньшей мере две из вышеописанных мутаций (1) – (3), предпочтительно мутации (1) и (2), т.е. (1) мутация в гене АТР-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, причем мутация предпочтительно представляет собой замену глутаминовой кислоты на валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12, или причем мутация предпочтительно представляет собой замену нуклеотида А на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11, и (2) мутация в гене белка пермеазы ABC-транспортера, причем мутация предпочтительно представляет собой замену лейцина на фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4, или причем мутация предпочтительно представляет собой замену нуклеотида С на нуклеотид Т в положении, соответствующем

положению 568 в SEQ ID NO: 3. В еще одном аспекте штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет вышеописанные мутации (1) и (3) или имеет вышеописанные мутации (2) и (3).

В одном из воплощений, штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет все три вышеописанные мутации (1)-(3) в белковых последовательностях и/или в нуклеотидных последовательностях.

В одном из воплощений ген АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, штамма *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11, и/или АТФ-связывающий белок LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующий аминокислоты с разветвленной цепью, имеет валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12. В дополнительном предпочтительном аспекте ген белка пермеазы ABC-транспортера штамма *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3, и/или белок пермеаза ABC-транспортера имеет фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4. В еще одном аспекте штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет как вышеописанные (1), так и (2). В еще одном аспекте штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет вышеописанные (1) и (3). В дополнительном аспекте штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет вышеописанные (2) и (3). В предпочтительном аспекте штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением имеет вышеописанные (1), (2) и (3).

Предпочтительно, штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением приводит к более высокому напряжению сдвига и/или большему времени вытекания в пипеточном тесте вязкости (измеренным в соответствии с описанным здесь и в примерах), чем штамм, не содержащий ни одну из вышеописанных мутаций (1), (2) или (3) при использовании для ферментации молока. В одном воплощений изобретения штамм, не содержащий ни одной из вышеописанных мутаций (1), (2) или (3), представляет собой материнский штамм, из которого получен штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением. В одном из воплощений изобретения штамм, не содержащий ни одной из вышеописанных мутаций (1), (2) или (3), представляет собой штамм DSM22587.

В одном из воплощений в соответствии с изобретением мутантный штамм является фагоустойчивым, существенно фагоустойчивым и/или обладает увеличенной фагоустойчивостью по сравнению с материнским штаммом. Последнее означает, что материнский штамм восприимчив к инфицированию (лизису) фагом, а мутантный штамм

устойчив к инфицированию (лизису) тем же самым фагом. Предпочтительно, штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением является устойчивым к фагу DSM24022. В одном из воплощений штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением является фагоустойчивым мутантом из штамма DSM22587. Предпочтительно, штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением представляет собой мутант из штамма DSM22587, причем мутант является устойчивым к фагу DSM24022.

Еще более предпочтительно штамм *S. thermophilus* в соответствии с изобретением представляет собой DSM22933 или его мутант или вариант. Предпочтительно, мутант или вариант демонстрирует те же самые или похожие текстурирующие свойства, что и DSM22933, например, такое же или похожее напряжение сдвига и/или такие же или похожие свойства вязкости. Следовательно, предполагается, что штаммы *S. thermophilus* в соответствии с изобретением, включая мутанты и варианты DSM22933, демонстрируют по меньшей мере такие же или похожие характеристики напряжения сдвига и/или вязкости, и/или текстурирующие свойства, как определено в представленных примерах, как DSM22933. Следовательно, в настоящем изобретении дополнительно предложен штамм *S. thermophilus* DSM22933 или его мутант, или вариант.

В представленном контексте термин **“такое же или похожее напряжение сдвига”** следует понимать как диапазон, охватывающий от 10% ниже характеристик напряжения сдвига DSM22933 до 10% выше характеристик напряжения сдвига DSM22933, причем диапазон может также составлять 9% ниже/выше характеристик напряжения сдвига DSM22933, например, 8% ниже/выше характеристик напряжения сдвига DSM22933, например, 7% ниже/выше характеристик напряжения сдвига DSM22933, например, 6% ниже/выше характеристик напряжения сдвига DSM22933, например, 5% ниже/выше характеристик напряжения сдвига DSM22933, например, 4% ниже/выше характеристик напряжения сдвига DSM22933, например, 3% ниже/выше характеристик напряжения сдвига DSM22933, например, 2% ниже/выше характеристик напряжения сдвига DSM22933 или 1% ниже/выше характеристик напряжения сдвига DSM22933. Характеристики напряжения сдвига DSM22933 измеряют, как изложено в описании изобретения или как описано в примере 5. Например, характеристики напряжения сдвига DSM2293 могут быть измерены в смешанных культурах, как описано в примере 5. Например, характеристики напряжения сдвига DSM2293 могут быть измерены следующим образом:

Данные в отношении напряжения сдвига были получены путем инокуляции одних и тех же микробных культур в молоко (3,6% белка и 1,5% или 3% жира); молоко нагревали при 95°C в течение 5 мин и охлаждали до температуры инокуляции (43°C), перед

инокуляцией 30% тестируемого текстурирующего штамма, 60% другого штамма *S. thermophilus* и 10% штамма *Lb. bulgaricus*, или молоко нагревали при 95°C в течение 5 минут и охлаждали до температуры инокуляции (43°C) перед инокуляцией 50% тестируемого текстурирующего штамма, 25% другого штамма *S. thermophilus* и 25% штамма *Lb. bulgaricus*, предпочтительно штамма DSM26419. Ферментацию осуществляли при 43°C до pH 4,60 с последующим охлаждением до 6°C и хранением в течение 7 суток при 6°C. После хранения кисломолочный продукт осторожно перемешивали палочкой с диском с отверстиями до однородности образца. Напряжение сдвига образцов оценивали при 13°C с помощью реометра (Anton Paar Physica Rheometer с ASC, автоматическое устройство для смены образца, Anton Paar® GmbH, Австрия), используя следующие настройки:

- Время удерживания (для перестройки до некоторой исходной структуры)
- 5 минут без какой-либо вибрации или вращения
- Вращение (для измерения напряжения сдвига при 300 с⁻¹ и т.п.)
- $\dot{\gamma} = [0,2707-300] \text{ с}^{-1}$ и $\dot{\gamma} = [275-0,2707] \text{ с}^{-1}$

21 точка измерения в течение 210 с (по одной каждые 10 с) до 300 с⁻¹ и 21 точка измерения в течение 210 с (по одной каждые 10 с) до 0,2707 с⁻¹. Для анализа данных было выбрано напряжение сдвига при скорости сдвига 300 с⁻¹.

В данном контексте термин “**такие же или похожие свойства вязкости**” следует понимать как диапазон, охватывающий от 10% ниже свойств вязкости DSM22933 до 10% выше свойств вязкости DSM22933, этот диапазон также может составлять 9% ниже/выше свойств вязкости DSM22933, например, 8% ниже/выше свойств вязкости DSM22933, например, 7% ниже/выше свойств вязкости DSM22933, например, 6% ниже/выше свойств вязкости DSM22933, например, 5% ниже/выше свойств вязкости DSM22933, например, 4% ниже/выше свойств вязкости DSM22933, например, 3% ниже/выше свойств вязкости DSM22933, например, 2% ниже/выше свойств вязкости DSM22933 или 1% ниже/выше свойств вязкости DSM22933. Свойства вязкости DSM22933 измеряют, как описано здесь и/или в примерах 2-3. Например, свойства вязкости могут быть измерены с помощью **пипеточного теста вязкости**, т.е. определения времени вытекания из волюметрической пипетки. Более длительное время вытекания соответствует более высокой вязкости. Например, пипеточный тест вязкости может быть осуществлен следующим образом:

Свернувшееся молоко изготавливали из 200 мл обезжиренного молока, инокулированного 1% тестируемого(ых) бактериального(ых) штамма(ов) (из ночной культуры, выращенной в обезжиренном молоке при 37°C), и инкубировали в течение 20 ч

при 42°C или при 37°C. Вязкость свернувшегося молока измеряли с помощью волюметрической пипетки объемом 25 мл, при этом время вытекания указанного свернувшегося молока из пипетки измеряли в трех параллелях. Свернувшееся молоко осторожно перемешивают ложкой до гомогенизации. Затем заполняют волюметрическую пипетку объемом 25 мл и измеряют время опорожнения пипетки под действием силы тяжести. Время, необходимое для опорожнения 25 мл свернувшегося молока из пипетки, регистрируют в секундах.

Пипеточный тест вязкости можно осуществлять с самим штаммом (единичный штамм, например, пример 2) или со смешанной культурой *S. thermophilus* и подкисляя штамм *Lb. bulgaricus*, предпочтительно штамм DSM19251, и возможно с 1% дрожжевым экстрактом (например, пример 3).

Приведенные выше “**характеристики**” следует понимать в контексте части определения, в которой указано то, каким образом правильно измерять напряжение сдвига или вязкость. Способы определения текстуры ферментированных продуктов, таких как молочные продукты, включают измерение напряжения сдвига или вязкости ферментированного продукта и являются легкодоступными и известными в данной области техники, и приведены здесь в качестве примера.

В одном из воплощений штаммы *Streptococcus thermophilus* в соответствии с настоящим изобретением обладают вышеописанными улучшенными текстурирующими свойствами, поддерживая при этом свойства роста и свойства подкисления своего родительского (материнского) штамма.

Композиции, содержащие штаммы *Streptococcus thermophilus* штаммы

В настоящем изобретении также предложены композиции и заквасочные культуры, содержащие вышеописанные штаммы *S. thermophilus* в соответствии с изобретением.

Молочнокислые бактерии (LAB), включая бактерии вида *S. thermophilus*, обычно поставляются в молочную промышленность либо в виде замороженных (F-DVS[®]) или высушенных путем замораживания (FD-DVS[®]) культур для массового размножения заквасок, либо в виде так называемых культур “для прямого внесения” (DVS[®]), предназначенных для непосредственной инокуляции в ферментационный чан или чан для производства молочного продукта, например, кисломолочного продукта. Такие культуры молочнокислых бактерий обычно называют “**заквасочными культурами**” или “**заквасками**”. Следовательно, в настоящем изобретении дополнительно предложена заквасочная культура или закваска, предпочтительно, йогуртовая заквасочная культура, содержащая вышеописанные штаммы в соответствии с настоящим изобретением.

Композиция или заквасочная культура в соответствии с настоящим изобретением может быть заморожена или лиофилизована. Кроме того, композиция или заквасочная культура в соответствии с настоящим изобретением может быть предложена в жидкой форме. Таким образом, в одном из воплощений композиция находится в замороженной, высушенной, лиофилизованной или жидкой форме. Предпочтительно, композиция и/или заквасочная культура в соответствии с настоящим изобретением находится в замороженной, форме, высушенной путем распыления, высушенной путем сублимации, высушенной в вакууме, высушенной на воздухе, высушенной в поддоне, или в жидкой форме.

Композиции или заквасочные культуры в соответствии с настоящим изобретением также могут дополнительно содержать криопротекторы, лиопротекторы, антиоксиданты, питательные вещества, наполнители, ароматизаторы или их смеси. Композиция предпочтительно содержит один или более чем один из криопротекторов, лиопротекторов, антиоксидантов и/или питательных веществ, более предпочтительно криопротекторов, лиопротекторов и/или антиоксидантов и наиболее предпочтительно криопротекторов или лиопротекторов, или и тех и других. Применение защитных агентов, таких как криопротекторы и лиопротекторы, известно специалистам в данной области техники. Подходящие криопротекторы или лиопротекторы включают моно-, ди-, три- и полисахариды (такие как глюкоза, манноза, ксилоза, лактоза, сахароза, трегалоза, рафиноза, мальтодекстрин, крахмал и гуммиарабик (аравийская камедь) и т.п.), многоатомные спирты (такие как эритрит, глицерин, инозит, маннит, сорбит, трейт, ксилит и т.п.), аминокислоты (такие как пролин, глутаминовая кислота), сложные вещества (такие как обезжиренное молоко, пептоны, желатин, дрожжевой экстракт) и неорганические соединения (такие как триполифосфат натрия).

В одном из воплощений композиции или заквасочные культуры в соответствии с настоящим изобретением могут содержать один или более чем один криопротекторный агент, выбранный из группы, состоящей из инозин-5'-монофосфата (IMP), аденозин-5'-монофосфата (AMP), гуанозин-5'-монофосфата (GMP), уранозин-5'-монофосфата (UMP), цитидин-5'-монофосфата (CMP), аденина, гуанина, урацила, цитозина, аденозина, гуанозина, уридина, цитидина, гипоксантина, ксантина, гипоксантина, оротидина, тимидина, инозина и производного любых таких соединений. Подходящие антиоксиданты включают аскорбиновую кислоту, лимонную кислоту и их соли, галлаты, цистеин, сорбит, маннит, мальтозу. Подходящие питательные вещества включают сахара, аминокислоты, жирные кислоты, минералы, микроэлементы, витамины (такие как семейство витаминов В, витамин С). Возможно композиция может содержать дополнительные вещества, включая

наполнители (такие как лактоза, мальтодекстрин) и/или ароматизаторы. В одном из воплощений изобретения криопротекторный агент представляет собой агент или смесь агентов, которые в дополнение к своей криопротекторной способности обладают бустер-эффектом.

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

В одном из воплощений композиции или заквасочные культуры в соответствии с изобретением содержат или включают от 0,2% до 20% криопротекторного агента или смеси агентов, измеренных в виде масс./масс.% вещества. Тем не менее, предпочтительно добавлять криопротекторный агент или смесь агентов в количестве, которое находится в диапазоне от 0,2% до 15%, от 0,2% до 10%, от 0,5% до 7% и от 1% до 6% по массе, включая диапазон от 2% до 5% криопротекторного агента или смеси агентов, измеренных в виде масс./масс.% замороженного вещества. В одном из воплощений культура содержит приблизительно 3% криопротекторного агента или смеси агентов, измеренных в виде масс./масс.% вещества. Количество приблизительно 3% криопротекторного агента соответствует концентрациям в диапазоне 100 мМ. Следует понимать, что для каждого

аспекта воплощения изобретения диапазоны могут представлять собой приросты описанных диапазонов.

В дополнительном аспекте композиции или заквасочные культуры в соответствии с настоящим изобретением содержат или включают аммониевую соль (например, аммониевую соль органической кислоты (такую как формиат аммония и цитрат аммония) или аммониевую соль неорганической кислоты) в качестве стимулятора (например, бустера роста или стимулятора подкисления) для бактериальных клеток, таких как клетки, принадлежащие к видам *S. thermophilus*, например, (по существу) отрицательные в отношении уреазы бактериальные клетки. Термины “аммониевая соль”, “формиат аммония” и т.п. следует понимать в качестве источника соли или комбинации ионов. Термин “источник”, например, “формиата аммония” или “аммониевой соли” относится к соединению или смеси соединений, которые при добавлении к культуре клеток приводят к образованию формиата аммония или аммониевой соли. В некоторых воплощениях источник аммония высвобождает аммоний в среду для выращивания, 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 обеспечивает получение аммония. Безусловно, следует понимать, что вместо аммониевой соли можно добавлять аммиак. Таким образом, термин аммониевая соль включает аммиак (NH_3), NH_4OH , NH_4^+ и т.п.

В одном из воплощений композиция в соответствии с изобретением может содержать загуститель и/или стабилизатор, такой как пектин (например, пектин НМ (с высоким содержанием метоксила), пектин LM (с низким содержанием метоксила)), желатин, СМС (карбоксиметилцеллюлоза), соевое волокно/соевый полимер, крахмал, модифицированный крахмал, каррагенан, альгинат и гуаровая камедь.

Композиция может представлять собой смесь или набор компонентов, содержащий:

- 1) штамм *Streptococcus thermophilus* **DSM 33676**, и
- 2) штамм, принадлежащий к виду *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

Композиция или заквасочная культура в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой смесь или набор компонентов, содержащий:

- 1) штамм *Streptococcus thermophilus* в соответствии с изобретением, предпочтительно, штамм **DSM22933**, и
- 2) штамм, относящийся к видам *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

Для получения наилучшей комбинации кислотности, вкуса, текстуры продукта,

такого как молочный продукт, например, йогурт, часто применяют комбинацию *S. thermophilus* и *L. bulgaricus*.

Для получения наилучшей комбинации кислотности, вкуса, текстуры продукта, такого как молочный продукт, такой как йогурт, часто применяется комбинация *S. thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвида *bulgaricus*.

В одном из воплощений смесь или набор компонентов может содержать штамм *S. thermophilus* в соответствии с настоящим изобретением в комбинации с одним или более чем одним штаммом *Lactobacillus delbrueckii* подвида *bulgaricus* и, возможно, один или более чем один штамм *S. thermophilus*.

Например, смесь или набор компонентов может содержать штамм *S. thermophilus* в соответствии с настоящим изобретением в комбинации с *Lactobacillus delbrueckii* подвида *bulgaricus* штамм DSM19251. В одном из воплощений смесь или набор компонентов может содержать *S. thermophilus* штамм DSM22933 в комбинации с *Lactobacillus delbrueckii* подвида *bulgaricus* штамм DSM19251.

Кроме того, композиция в соответствии с настоящим изобретением дополнительно может содержать дрожжевой экстракт. Следовательно, композиция в соответствии с настоящим изобретением может содержать штамм *Streptococcus thermophilus* в соответствии с изобретением, причем штамм относится к *Lactobacillus delbrueckii* подвида *bulgaricus*, предпочтительно, как определено выше, возможно дополнительно штамм(ы) *Streptococcus thermophilus*, предпочтительно, как определено выше, и, возможно, дрожжевой экстракт.

Выражение “**смесь**” означает то, что штамм(ы) *S. thermophilus* и штамм(ы) *Lactobacillus delbrueckii* подвида *bulgaricus* физически смешаны вместе. В воплощении штамм(ы) *S. thermophilus*(s) и штамм(ы) *Lactobacillus delbrueckii* подвида *bulgaricus* находятся в одной и той же коробке или в одном и том же пакете.

Напротив, выражение “**набор компонентов**”, содержащий штамм(ы) *S. thermophilus* и штамм *L. bulgaricus*, означает, что культура штамма(ов) *S. thermophilus* и культура штамма *L. bulgaricus* физически разделены, но предназначены для совместного использования. Таким образом, культура штамма(ов) *S. thermophilus* и культура штамма(ов) *L. bulgaricus* находятся в разных коробках или пакетах. В одном из воплощений культура штамма(ов) *S. thermophilus* и штамма(ов) *L. bulgaricus* находятся в одном и том же формате, т.е. находятся в замороженном формате, в форме гранул или замороженных гранул, в форме порошка, такого как высушенный порошок или лиофилизированный порошок.

В одном из воплощений в соответствии с настоящим изобретением композиция содержит от 10^4 до 10^{12} КОЕ (колониеобразующих единиц)/г штамма(ов) *S. thermophilus*, такое как от 10^5 до 10^{11} КОЕ/г, такое как от 10^6 до 10^{10} КОЕ/г, или такое как от 10^7 до 10^9 КОЕ/г штамма(ов) *S. thermophilus*. В одном из воплощений композиция дополнительно содержит от 10^4 до 10^{12} КОЕ/г штамма(ов) *L. bulgaricus*, такое как от 10^5 до 10^{11} КОЕ/г, такое как от 10^6 до 10^{10} КОЕ/г или такое как от 10^7 до 10^9 КОЕ/г штамма(ов) *L. bulgaricus*.

Способ получения ферментированного пищевого продукта

Настоящее изобретение также относится к способам получения ферментированного пищевого продукта, содержащим по меньшей мере одну стадию, на которой используют по меньшей мере один из штаммов *S. thermophilus*, определенных в первом аспекте настоящего изобретения, и/или композицию или заквасочную культуру, определенную во втором аспекте настоящего изобретения. Получение пищевого продукта осуществляют способами, известными специалистам в данной области техники.

В зависимости от получаемого продукта субстрат может представлять собой молочный субстрат. Молочный субстрат особенно предпочтителен тогда, когда кисломолочные продукты, такие как йогурт, пахта или кефир представляют собой конечный продукт. Следовательно, в одном из воплощений способ включает ферментацию молочного субстрата штаммом, определенным в первом аспекте, и/или композицией, описанной во втором аспекте настоящего изобретения, в любом из его воплощений.

Следовательно, в настоящем изобретении предложен **пищевой продукт**, содержащий штамм и/или композицию в соответствии с изобретением. Предпочтительно, пищевой продукт представляет собой молочный продукт, и способ в любом из его воплощений включает ферментацию молочного субстрата (также называемого “**молочной основой**” в контексте настоящего изобретения) по меньшей мере одним *S. thermophilus* и/или композицией или заквасочной культурой в соответствии с изобретением.

Пищевой продукт в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно содержать “**загуститель**” и/или “**стабилизатор**”, такой как пектин (например, пектин НМ, пектин LM), желатин, СМС, соевое волокно/соевый полимер, крахмал, модифицированный крахмал, каррагинан, альгинат и гуаровая камедь.

В одном из воплощений пищевой продукт представляет собой определенный выше молочный продукт. В конкретном воплощении изобретения кисломолочный продукт выбран из группы, состоящей из йогурта, сыра Моцарелла, кефира, сметаны, сыра, кварка. Йогурт является особенно предпочтительным. В одном из воплощений изобретения кисломолочный продукт содержит дополнительный пищевой продукт, выбранный из

группы, состоящей из фруктового напитка, зерновых продуктов, ферментированных зерновых продуктов, химически подкисленных зерновых продуктов, продуктов на основе соевого заменителя молока, ферментированных продуктов на основе соевого заменителя молока и любой их смеси.

В одном из воплощений ферментированный продукт дополнительно содержит ингредиент, выбранный из группы, состоящей из фруктового концентрата, сиропа, пробиотического бактериального штамма или культуры, красителя, загустителя, ароматизатора, консервирующего агента и их смесей.

Кроме того, фермент может быть добавлен к субстрату, например, молочному субстрату, до, в течение и/или после ферментации, причем фермент выбран из группы, состоящей из фермента, способного перекрестно связывать белки, транслугтаминазы, аспаргиновой протеазы, химозина, сычужного фермента и их комбинаций. В одном из воплощений ферментированный продукт может быть представлен в форме продукта перемешиваемого типа, продукта типа набора или питьевого продукта.

Кисломолочный продукт как правило содержит белок на уровне от 1,0% до 12,0% по массе, предпочтительно от 2,0% до 10,0% по массе. В конкретном воплощении сметана содержит белок на уровне от 1,0% до 5,0% по массе, предпочтительно от 2,0% до 4,0% по массе. В конкретном воплощении варк содержит белок на уровне от 4,0% до 12,0% по массе, предпочтительно от 5,0 % до 10,0% по массе.

Предпочтительно, пищевой продукт имеет текстуру (как описано в настоящем изобретении, такую как в примерах 2-5) по сравнению с пищевым продуктом, полученным сравнительным способом, который не включает использование по меньшей мере одного из штаммов *S. thermophilus*, описанных в настоящем изобретении, и/или использование композиции или заквасочной культуры в соответствии с настоящим изобретением.

Ферментированный пищевой продукт, непосредственно полученный способом в соответствии с изобретением

В одном из воплощений изобретение также относится к ферментированному пищевому продукту, непосредственно полученному способом в соответствии с настоящим изобретением, или содержащему штамм *Streptococcus thermophilus* в соответствии с изобретением, или содержащему композицию в соответствии с изобретением. Таким образом, один аспект настоящего изобретения также представляет собой ферментированный продукт, содержащий штаммы *Streptococcus thermophilus* в соответствии с настоящим изобретением и/или композиции в соответствии с настоящим

изобретением. Ферментированный продукт предпочтительно может представлять собой молочный продукт, такой как йогурт.

Способ получения штаммов *Streptococcus thermophilus* в соответствии с настоящим изобретением

В настоящем изобретении предложен способ получения штаммов *Streptococcus thermophilus* и/или композиций в соответствии с настоящим изобретением, включающий следующие стадии:

(1) получение штамма молочнокислой бактерии в качестве материнского штамма;

(2) воздействие на материнский штамм любой мутагенизирующей обработкой, включая обработку химическим мутагеном или УФ светом, и/или осуществление определенного здесь сайт-направленного мутагенеза в отношении материнского штамма;

(3) скрининг в отношении мутантного штамма, содержащего по меньшей мере одну, предпочтительно две и, более предпочтительно, все три из следующих мутаций:

а) мутация в гене АТР-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью;

б) мутация в гене белка пермеазы ABC-транспортера; и/или

в) мутация в гене белка пептиддеформилазы,

причем предпочтительно мутантный штамм демонстрирует определенные здесь улучшенные текстурирующие свойства по сравнению с материнским штаммом, и еще более предпочтительно полученный штамм *Streptococcus thermophilus* демонстрирует те же самые или улучшенные определенные здесь текстурирующие свойства по сравнению со штаммом DSM22933. Следовательно, способ в соответствии с настоящим изобретением может содержать дополнительно стадию скрининга (4), т.е. скрининг в отношении мутантного штамма, который демонстрирует определенные здесь улучшенные текстурирующие свойства по сравнению с материнским штаммом (например, который приводит создает более высокое напряжение сдвига и/или вязкость, чем материнский штамм) при использовании для ферментации молока.

Предпочтительно, материнский штамм в (1) представляет собой депонированный штамм DSM22587.

Определенные в настоящем изобретении штаммы *Streptococcus thermophilus* также могут быть получены путем сайт-направленного мутагенеза, смотри стадию (2) выше. Олигонуклеотиды, несущие мутированный нуклеотид в составе АТР-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, и/или

белка пермеазы ABC-транспортера, и/или белка пептидеформилазы, используются для амплификации специфического фрагмента ДНК с помощью ПЦР (полимеразной цепной реакции). Фрагмент ПЦР, несущий желаемую мутацию(и), клонируют в векторную плазмиду и трансформируют в штамм-мишень *S. thermophilus*, и мутация интегрируется в хромосому и заменяет область белка дикого типа путем рекомбинации. Выделение штаммов осуществляют, как описано выше. Следовательно, стадия (3) выше может также представлять собой скрининг мутантного штамма, содержащего по меньшей мере одну, предпочтительно две и, более предпочтительно, все три из следующих аминокислот и/или нуклеотидов в следующих позициях:

а) валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12, и/или Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11 (ген АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью);

б) фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4, и/или Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3 (ген белка пермеазы ABC-транспортера); и/или

в) цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8, и/или Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7 (ген белка пептидеформилазы).

В одном из воплощений мутация в гене АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, (а) представляет собой замену глутаминовой кислоты на валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12, и/или мутацию нуклеотида А на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11. В одном из воплощений мутация в гене белка пермеазы ABC-транспортера (б) представляет собой замену лейцина на фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4, и/или мутацию нуклеотида С на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3. В еще одном предпочтительном воплощении мутация в гене белка пептидеформилазы (в) представляет собой замену аргинина на цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8, и/или мутацию нуклеотида С на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7.

Дополнительно, в настоящем изобретении предложен способ получения штамма *Streptococcus thermophilus*, который демонстрирует определенные здесь улучшенные текстурирующие свойства по сравнению с материнским штаммом (например, который

создает более высокое напряжение сдвига и/или вязкость, чем материнский штамм), когда бактерии используются для ферментации молока, включающий следующие стадии:

а) получение штамма молочнокислой бактерии в качестве материнского штамма;
б) воздействие на материнский штамм бактериофага, который способен лизировать материнский штамм;

в) выделение мутантного штамма материнского штамма, причем мутантный штамм не лизируется бактериофагом и имеет одну, две или три мутации, выбранные из группы, состоящей из:

1. мутации в гене АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.A.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью;

2. мутации в гене белка пермеазы ABC-транспортера; и/или

3. мутации в гене белка пептиддеформилазы; и

г) скрининга мутантного штамма, который демонстрирует определенные здесь улучшенные текстурирующие свойства по сравнению с материнским штаммом (например, который создает более высокое напряжение сдвига и/или вязкость, чем материнский штамм) при использовании для ферментации молока.

Предпочтительно, описанный выше способ в соответствии с настоящим изобретением содержит стадию инкубирования подвергнутых воздействию бактериальных клеток в среде для роста до описанной выше стадии (в).

Предпочтительно, материнский штамм представляет собой штамм DSM22587. Предпочтительно, бактериофаг, способный лизировать материнский штамм со стадии (б) выше, представляет собой DSM 24022.

В одном из воплощений, (1) мутация в гене АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.A.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью, представляет собой замену глутаминовой кислоты на валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12, и/или мутацию нуклеотида А на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11. В одном из воплощений мутация в гене белка пермеазы ABC-транспортера представляет собой замену лейцина на фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4, и/или мутацию нуклеотида С на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3. В одном из воплощений мутация в гене белка пептиддеформилазы представляет собой замену аргинина на цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8, и/или мутацию нуклеотида С на нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7.

Стадия (г) выше также может включать введение по меньшей мере одной, предпочтительно двух и, более предпочтительно всех трех из следующих аминокислот/нуклеотидов в следующих позициях:

а) валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12, и/или Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11 (ген АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью);

б) фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4, и/или Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3 (ген белка пермеазы АВС-транспортера); и/или

в) цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8, и/или Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7 (ген белка пептиддеформилазы).

Стадия (г) выше (например, введение по меньшей мере одной, предпочтительно двух и, более предпочтительно все три описанные мутации) может быть осуществлена путем воздействия на материнский штамм любым традиционно используемым мутагенизирующим способом, включая обработку химическим мутагеном или УФ светом и/или определенный здесь сайт-направленный мутагенез.

Способы определения текстуры ферментированных продуктов, таких как молочные продукты, включают измерение напряжения сдвига или вязкости (например, с помощью описанного здесь пипеточного теста вязкости) ферментированного продукта и легко доступны, и известны в области техники, и описаны и приведены здесь в качестве примера.

В одном из воплощений штамм *Streptococcus thermophilus* в соответствии с изобретением и/или штамм *Streptococcus thermophilus*, непосредственно полученный при помощи вышеописанного способа, приводят к напряжению сдвига, которое по меньшей мере на 1% улучшено по сравнению с их материнским штаммом, таким как на 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20% или больше чем на 20% при сравнении с их материнским штаммом. Характеристики напряжения сдвига штамма *Streptococcus thermophilus* в соответствии с изобретением и/или штамма *Streptococcus thermophilus*, непосредственно полученного при помощи вышеописанного способа, могут быть измерены в смешанных культурах, как описано в примере 5. Кроме того, характеристики напряжения сдвига DSM2293 могут быть измерены для самого вышеописанного штамма.

В одном из воплощений штамм *Streptococcus thermophilus* в соответствии с изобретением и/или штамм *Streptococcus thermophilus*, непосредственно полученный при помощи вышеописанного способа, приводят к напряжению сдвига, которое по меньшей

мере на 1% улучшено по сравнению с их материнским штаммом, таким как на 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20% или больше чем на 20% при сравнении с их материнским штаммом, измеренному при 300 1/с (Па) после приблизительно меньше чем 5 часов (до рН приблизит. 4,60) роста в молоке (3,6% белок и 1,5% или 3% жир) при 43°C, после инокулирования в количестве 0,02% заквасочной культуры FD-DVS.

В одном из воплощений штамм *Streptococcus thermophilus* в соответствии с изобретением и/или штамм *Streptococcus thermophilus*, непосредственно полученный при помощи вышеописанного способа, приводят к времени вытекания молока, свернувшегося при помощи этого штамма, из пипетки, которое по меньшей мере на 1% улучшено по сравнению с их материнским штаммом, таким как на 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20% или больше чем на 20% при сравнении с их материнским штаммом. Пипеточный тест вязкости может быть осуществлен в соответствии с тем, как описано в примере 2. Пипеточный тест вязкости может быть осуществлен в виде смешанной культуры, как описано в примере 3.

Под “текстурой” или “ощущением в ротовой полости” понимают физическое и химическое взаимодействие продукта в ротовой полости.

Применение штаммов *Streptococcus thermophilus* в соответствии с настоящим изобретением и/или композиций в соответствии с настоящим изобретением

Один из аспектов в соответствии с настоящим изобретением относится к применению штаммов *Streptococcus thermophilus* и/или композиций в соответствии с настоящим изобретением для производства ферментированного продукта. Кроме того, ферментированный продукт может представлять собой молочный продукт.

Если здесь не указано иное или иным образом явно не противоречит контексту, то любая комбинация вышеописанных элементов, аспектов и воплощений во всех возможных вариациях охвачена изобретением. Воплощения в соответствии с настоящим изобретением описаны ниже только в качестве примеров.

Примеры

Пример 1: Фагоустойчивый мутант штамма *Streptococcus thermophilus* DSM22587

Фагоустойчивые мутанты были получены из материнского штамма DSM22587 в чашках с M17-2% лактозным агаром с 10 mM MgCl₂/CaCl₂ после высевания 0,1 мл ночной культуры DSM22587 в M17-2% лактозе вместе с 0,1 мл фага DSM24022, содержащего 1x10⁸ фаговых частиц на мл и инкубации в течение ночи при 37°C. Среди нескольких мутантов колонии штамма DSM22933 трижды очищали и повторно тестировали в бляшках на

чашках с лактозным агаром M17 при 37°C с использованием фага DSM24022 для воздействия фагом, и подтверждали фагоустойчивость (в бляшковом тесте не обнаруживали единичные бляшки). DSM22933 также тестировали в тесте на подкисление молока, продемонстрировав активность в отношении подкисления, сравнимую с материнским штаммом.

Геном DSM22933 секвенировали в компании Chr. Hansen A/S, как описано в Agersø *et al.*, 2018. Кратко, тотальную ДНК очищали и использовали для приготовления парно-концевой библиотеки длиной 250 п.о. для секвенирования генома с использованием системы Illumina MiSeq. Результаты чтения последовательностей подвергали качественной обрезке (оценка Phred <25) и собирали в контиги с использованием алгоритма сборки *de novo* в CLC Genomics Workbench, версия 10.1.1 (CLC bio, Qiagen Bioinformatics). Полученную сборку генома была отфильтровывали путем удаления контигов с покрытием <15X и/или <20% от медианного покрытия сборки. Консенсусную последовательность оставшихся контигов экспортировали в формат FASTA, которую назвали черновой последовательностью генома и использовали в последующем анализе последовательностей.

Таблица 1. Мутации, идентифицированные в DSM22933 по сравнению с его материнским штаммом DSM22587.

Название	Генная мутация	SEQ ID No.	Белковая мутация	SEQ ID No.
Ген АТФ-связывающего белка LivG (TC 3.A.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью	A506T	11	Glu169Val	12
Ген белка пермеазы ABC-транспортера	C568T	3	Leu190Phe	4
Ген белка пептиддеформилазы	C430T	7	Arg144Cys	8

Пример 2: Пипеточный тест вязкости для DSM22933 в качестве единичного штамма

Вязкость измеряли с помощью пипеточного теста. В этом тесте определяли время вытекания из волюметрической пипетки. Более длительное время вытекания соответствует более высокой вязкости. Свернувшееся молоко готовили из 200 мл обезжиренного молока, инокулированного 1% тестируемыми бактериальными штаммами (из ночной культуры, выращенной в обезжиренном молоке при 37°C), и инкубировали в течение 20 часов при 42°C. Вязкость свернувшегося молока измеряли с помощью волюметрической пипетки объемом 25 мл, а время вытекания указанного свернувшегося молока из пипетки измеряли

в трех параллелях. Свернувшееся молоко осторожно перемешивают ложкой до гомогенного состояния. Затем заполняют волюметрическую пипетку объемом 25 мл и измеряют время опорожнения пипетки под действием силы тяжести. Время, необходимое для опорожнения 25 мл свернувшегося молока из пипетки, регистрируют в секундах.

DSM22933 обеспечивает более высокую вязкость, чем его материнский штамм DSM22587, поскольку он на 25% увеличивает время вытекания, измеренное с помощью пипеточного теста, как продемонстрировано в таблице ниже.

Таблица 2. Результаты пипеточного теста вязкости для DSM22933 по сравнению с его материнским штаммом DSM22587.

	Время вытекания для образца 1 (с)	Время вытекания для образца 2 (с)	Время вытекания для образца 3 (с)	Среднее время вытекания (с)	Стандартное отклонение
DSM22587	19	20	20	20	0,58
DSM22933	24	26	25	25	1,00

Пример 3: Пипеточный тест вязкости для DSM22933 в смешанной культуре

Пипеточные тесты осуществляли, как описано в примере 2, за исключением того, что ночную культуру и окончательную инкубацию осуществляли при 37°C. Ферментация со смешанными культурами 0,9% DSM22933 или DSM22587 и 0,1% штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* DSM19251 и 1,0% дрожжевым экстрактом позволила достичь конечного pH 3,8.

Штамм в соответствии с изобретением DSM22933 также демонстрирует улучшенную вязкость в смешанной культуре с штаммом *L. bulgaricus* DSM19251 и дрожжами, как видно из таблицы ниже.

Таблица 3. Результаты пипеточного теста вязкости для DSM22933 в смешанной культуре.

	Время вытекания для образца 1 (с)	Время вытекания для образца 2 (с)	Время вытекания для образца 3 (с)	Среднее время вытекания (с)	Стандартное отклонение
DSM22587	176	204	141	157	17,8
DSM22933	227	204	156	196	36

Пример 4: Аспирация мини-йогуртов, приготовленных с DSM22933

Мини-йогурты были приготовлены из молочной основы, содержащей 4,0% белка и 0,1% жира, инокулированной 0,02% заквасочной культурой F-DVS. Текстурирующие свойства DSM22933 и DSM24023 оценивали путем добавления штаммов по отдельности в

22 различные смешанные культуры для сравнения. Все 22 смешанные культуры состояли из различных комбинаций штамма *S. thermophilus* и штамма *L. bulgaricus*. Аспирацию измерялась для проверки увеличения текстуры. Чем более отрицательная аспирация, тем лучше текстура мини-йогуртов. Оба штаммы (DSM22933 и DSM24023) представляют собой сестринские штаммы, полученные из одного и того же материнского штамма DSM22587. DSM24023 не содержит три мутации, как описано для DSM22933 в таблице 1 выше.

Культуры, содержащие DSM22933, приводили в результате к более высокой потребности в давлении для аспирации йогурта (-1808 Па), если рассматривать в среднем для 22 мини-йогуртов по сравнению с культурами, содержащими DSM24023 (-1692 Па).

Пример 5: Реологические свойства йогурта, приготовленного с DSM22933.

Каждая из молочной основы 1 с 3,6% белка и 3% жира (MB1) или молочной основы 2 с 3,6% белка и 1,5% жира (MB2) были инокулированы 0,02% заквасочной культурой FD-DVS. Ферментацию проводили при 43°C до достижения pH 4,60. Готовый йогурт хранили при 6°C в течение 7 суток. Реологические свойства измеряли с помощью реометра при 13°C на реометре (Anton Paar Physica Rheometer с ASC, автоматическое устройство для смены образца, Anton Paar® GmbH, Австрия), используя следующие настройки:

-Время удерживания (для перестройки до некоторой исходной структуры)

-5 минут без вибрации или вращения.

-Вращение (для измерения напряжения сдвига при 300 c^{-1} и т.п.)

- $\dot{\gamma} = [0,2707-300] \text{ c}^{-1}$ и $\dot{\gamma} = [275-0,2707] \text{ c}^{-1}$

21 восходящая точка измерения в течение 210 с (на каждую по 10 с) до 300 c^{-1} и 21 нисходящая точка измерения в течение 210 с (на каждую по 10 с) до $0,2707 \text{ c}^{-1}$. Для анализа данных выбирали напряжение сдвига при скорости сдвига 300 c^{-1} .

Ферментацию с использованием культуры с DSM22933 сравнивали с ферментацией с использованием эталонной культуры с штаммом предшествующего уровня техники DSM22589 без мутации, описанной в таблице 1 выше. Обе культуры содержали дополнительно штамм *S. thermophilus*, который идентичен в двух культурах и не текстурирующий штамм *L. bulgaricus*.

Культура, содержащая DSM22933, демонстрирует улучшенную вязкость по сравнению с эталоном, что очевидно из двух приведенных ниже таблиц. Результаты были получены при использовании 30% DSM22933 по сравнению с 50% DSM22589.

Таблица 4. Реологическое свойство йогурта, приготовленного из молочного основания 1 и DSM22933.

MB1	Напряжение сдвига при 30с ⁻¹ (Па)	Напряжение сдвига при 300с ⁻¹ (Па)
Эталон	53	53
Культура с DSM22933	65	59

Таблица 5. Реологическое свойство йогурта, приготовленного из молочного основания 2 и DSM22933.

MB2	Напряжение сдвига при 30с ⁻¹ (Па)	Напряжение сдвига при 300с ⁻¹ (Па)
Эталон	44	44
Культура с DSM22933	49	48

Депонирования и экспертные решения

Заявитель запросил, чтобы образец депонированных микроорганизмов, указанных в таблице ниже, был доступен только для эксперта, одобренного заявителем.

Таблица 6. Депонирования, осуществленные в депозитарное учреждение, получившее статус международного депозитарного органа в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры: *Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany.

Микроорганизмы	Инвентарный №	Дата депонирования
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 22933	2009.09.08

Таблица 7. Ссылки на другие микроорганизмы

Другие микроорганизмы	Инвентарный №	Ссылка
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM22587	WO2011/026863
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM22589	WO2007/095958
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM24023	WO2011/092300
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> подвид <i>Bulgaricus</i>	DSM19251	WO2011/026863
<i>Bacteriophage</i>	DSM24022	WO2011/092300

Ссылки

Agersø *et al.*, (2018)

Broadbent *et al.* (2003) *J. Dairy Sci.*, 86:407-423

EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.* (2000) *Trends in Genetics* 16:276-277

Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм *Streptococcus thermophilus*, имеющий:

(1) мутацию в гене АТР(аденозинтрифосфат)-связывающего белка LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью;

(2) мутацию в гене белка пермеазы ABC(АТФ-связывающий кассетный)-транспортера; и/или

(3) мутацию в гене белка пептиддеформилазы.

2. Штамм *Streptococcus thermophilus* по п. 1, где:

(1) мутация в АТР-связывающем белке LivG (ТС 3.А.1.4.1), транспортирующем аминокислоты с разветвленной цепью, представляет собой замену глутаминовой кислоты на валин в положении, соответствующем положению 169 в SEQ ID NO: 12, и/или мутацию нуклеотида А в нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 506 в SEQ ID NO: 11;

(2) мутация в белке пермеазе ABC-транспортера представляет собой замену лейцина на фенилаланин в положении, соответствующем положению 190 в SEQ ID NO: 4, и/или мутацию нуклеотида С в нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 568 в SEQ ID NO: 3; и/или

(3) мутация в белке пептиддеформилазе представляет собой замену аргинина на цистеин в положении, соответствующем положению 144 в SEQ ID NO: 8, и/или мутацию нуклеотида С в нуклеотид Т в положении, соответствующем положению 430 в SEQ ID NO: 7.

3. Штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп. 1-2, где указанный штамм приводит к более высокому напряжению сдвига и/или более длительному времени вытекания в пипеточном тесте вязкости, чем штамм, у которого отсутствуют мутации (1), (2) и/или (3), определенные в любом из пп. 1 или 2, при использовании для ферментации молока.

4. Штамм *Streptococcus thermophilus* по п. 3, имеющий происхождение из материнского штамма, у которого отсутствуют мутации (1), (2) и/или (3), определенные в любом из пп. 1 или 2.

5. Штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп. 1-4, представляющий собой фагоустойчивый мутант штамма, у которого отсутствуют мутации (1), (2) и/или (3), определенные в любом из пп. 1 или 2.

6. Штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп. 3-5, где штамм, у которого отсутствуют мутации (1), (2) и/или (3), определенные в любом из пп. 1 или 2, представляет собой штамм DSM22587.

7. Штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп. 1-6, который устойчив к фагу DSM24022.

8. Штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп. 1-7, представляющий собой DSM22933 или его мутант или вариант.

9. Штамм *Streptococcus thermophilus* по п. 8, где указанный мутант или вариант демонстрирует такие же или похожие текстурирующие свойства, как и DSM22933.

10. Композиция, содержащая штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп. 1-9.

11. Композиция по п. 10, дополнительно содержащая штамм, относящийся к *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

12. Композиция по любому из пп. 10-11, представляющая собой заквасочную культуру, предпочтительно в замороженной форме, форме, высушенной путем распыления, высушенной путем сублимации, высушенной в вакууме, высушенной на воздухе, высушенной в поддоне, или в жидкой форме.

13. Способ получения ферментированного продукта, включающий ферментирование молочного субстрата штаммом *Streptococcus thermophilus* по любому из пп. 1-9 или композицией по любому из пп. 10-12.

14. Ферментированный продукт, получаемый способом по п. 13 или содержащий штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп. 1-9, или содержащий композицию по любому из пп. 10-12.

15. Ферментированный продукт по п. 14, представляющий собой молочный продукт, предпочтительно йогурт, кефир, сметану, квark или сыр.

16. Способ получения штамма *Streptococcus thermophilus*, обладающего улучшенными текстурирующими свойствами по сравнению с материнским штаммом, когда бактерии используют для ферментации молока, включающий стадии:

а) обеспечения штамма молочнокислых бактерий в качестве материнского штамма;

б) воздействия на материнский штамм бактериофагом, способным лизировать материнский штамм;

в) выделения мутантного штамма из материнского штамма, где мутантный штамм не лизируется бактериофагом и имеет одну, две или три мутации, выбранные из группы, состоящей из:

1. мутации в гене АТФ-связывающего белка LivG (ТС 3.A.1.4.1), транспортирующего аминокислоты с разветвленной цепью;

2. мутации в гене белка пермеазы ABC-транспортера; и

3. мутации в гене белка пептиддеформилазы; и
г) скрининга мутанта, который демонстрирует улучшенные текстурирующие свойства по сравнению с материнским штаммом при использовании для ферментации молока.

17. Применение штамма *Streptococcus thermophilus* по любому из пп. 1-9 или композиции по любому из пп. 10-12 для изготовления кисломолочного продукта.