

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201692283** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.06.30

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

(22) Дата подачи заявки
2015.06.18

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННОГО МОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С
УЛУЧШЕННЫМ КОНТРОЛЕМ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ПОДКИСЛЕНИЯ**

(31) 14173196.8; 14176627.9; 14196125.0;
15156025.7

(32) 2014.06.19; 2014.07.10; 2014.12.03;
2015.02.20

(33) EP

(86) PCT/EP2015/063767

(87) WO 2015/193459 2015.12.23

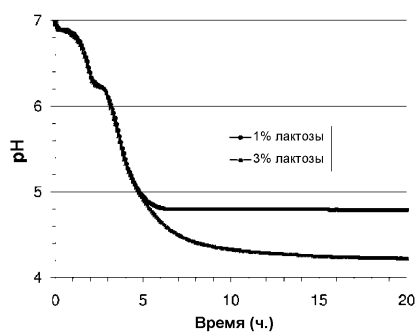
(71) Заявитель:
КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Гарригуэс Кристель, Гиллеладен
Кристиан (DK), Курик-Бавден
Мирьяна (US), Янсен Томас,
Биркелунд Мими, Бухгорн Гелле
Леттир, Соэрсен Ким Иб,
Кристенсен Нанна, Сване Клаус,
Риис Соэрсен (DK), Педерсен Мартин
Бастьян (IT), Одино Жан-Мари,
Жимене Люсьяна, Лансио Паскаль
(FR), Хамм Дункан (SG), Снев Хун
Мин (MY)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены способы изготовления ферментированного молочного продукта, включающие стадию, на которой молоко сбраживают, где а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, содержащей молочнокислые бактерии, способные метаболизировать один или несколько углеводов, присутствующих в молоке, б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации одного или нескольких углеводов в ходе сбраживания и в) уменьшение, по меньшей мере, также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий. В изобретении также предложены соответствующие способы, включающие стадию, на которой по меньшей мере часть сыворотки отделяют от ферментированного молочного продукта.

CHCC6008 – ограничение лактозы



A1

201692283

201692283

A1

Способ получения ферментированного молочного продукта с улучшенным контролем последующего подкисления

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам получения ферментированного молочного продукта, включающим стадии, где молоко сбраживают заквасочной культурой, содержащей молочнокислые бактерии, и где сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации углеводов, которые могут быть метаболизированы молочнокислыми бактериями. Способы по настоящему изобретению обеспечивают улучшенный контроль последующего подкисления, то есть подкисления, вызванного бактериями после завершения сбраживания, например во время последующей обработки и хранения.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Большинство существующих способов получения ферментированных молочных продуктов может быть охарактеризовано следующей серией стадий:

- а) молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, содержащей молочнокислые бактерии (или LAB), способные метаболизировать глюкозу, полученную из лактозы, присутствующей в молоке;
- б) сбраживание вызывает выработку молочной кислоты, которая вызывает снижение pH от исходных 6,4-6,8 (для коровьего молока) до диапазона от pH 3,8 до 4,7;
- в) сбраживание завершают посредством быстрого охлаждения ферментированного молочного продукта, как только было достигнуто pH, желательное для этого ферментированного продукта.

Этот способ используют, например, для изготовления йогурта и йогуртовых напитков.

Быстрое охлаждение ферментированного молочного продукта при предварительно определенном значении pH осуществляют для завершения

сбраживания. Без охлаждения ферментированного продукта сбраживание бы продолжилось. Однако быстрое охлаждение имеет недостатки, так как оно приводит к потере текстуры. Избежание стадии быстрого охлаждения также сэкономило бы типовую операцию и, таким образом, снизило бы стоимость производства.

Даже в способах, включающих стадию быстрого охлаждения, наблюдают последующее подкисление, то есть продуцирование LAB молочной кислоты после завершения сбраживания, то есть после того, как желательный pH был достигнут. В настоящее время считают, что последующее подкисление представляет собой одну из наиболее важных проблем в ходе сбраживания молочных продуктов. Дальнейшее снижение значения pH в ходе обработки и хранения ферментированного молочного продукта приводит к проблемам с повышенной кислотностью и сниженным сроком хранения.

Таким образом, последующее подкисление также оказывает отрицательное влияние на срок хранения йогурта. Срок хранения йогурта варьирует от 30 до 50 суток в зависимости от страны. В ходе этого времени последующее подкисление меняет качество йогурта, приводя к кислому продукту и высокому отделению сыворотки. Обычно качество йогурта поддерживается настолько, насколько это возможно, путем поддержания продукта при температуре от 4 до 8°C во время хранения. При этой температуре бактерии будут обладать лишь небольшой активностью. Однако, во многих странах сложно поддерживать цепочки охлаждения в ходе хранения.

Как следствие, высокий интерес представляет изготовление йогурта с увеличенным сроком хранения (ESL йогурт), в частности, в странах, где сложно поддерживать цепочку охлаждения. Известные из предшествующего уровня техники способы изготовления ESL йогурта включают стадию тепловой обработки (обычно 65°C/ 30 сек) после сбраживания. Обработка вызывает значительное снижение числа бактерий, используемых для сбраживания, а также количества дрожжей и плесневых грибов. Стадия нагревания также ингибирует активность ферментов, присутствующих в йогурте. Как следствие, продукт имеет увеличенный срок хранения вплоть до 9 месяцев, при этом не наблюдают последующего подкисления и изменений вкуса или наблюдают незначительное последующее подкисление и изменения вкуса.

Однако, тепловая обработка оказывает отрицательное влияние на качество йогурта, и получают изменения во вкусе и текстуре. Другим негативным эффектом тепловой обработки является то, что польза для здоровья, получаемая при съедании живых бактерий, уменьшается или исчезает.

Один из подходов к контролю последующего подкисления заключается в изготовлении молочных продуктов с относительно кислотным pH. В этих способах дальнейший рост LAB и продуцирование молочной кислоты ингибируется кислотным pH. Однако, дальнейшее продуцирование молочной кислоты лишь ингибируется, и не прекращается полностью, и способ, очевидно, не подходит для изготовления ферментированных молочных продуктов с мягким вкусом.

Предположили, что последующее подкисление контролируется метаболической активностью *L. bulgaricus* и вызвано захватом пептидов, и для контроля последующего подкисления получали штаммы с недостаточностью аминокислотного метаболизма (US2010/0021586 и WO2006/042862A1). Другие подходы для контроля последующего подкисления были описаны в предшествующем уровне техники и включают способы на основе применения особых штаммов LAB, отличающихся слабой активностью последующего подкисления (WO2010/139765).

Альтернативный подход для минимизации последующего подкисления основан на контроле соотношения белка к лактозе, контроле буферной емкости и поддержания буферной емкости и pH в пределах предварительно определенного диапазона в ходе сбраживания (WO2013/169205). Однако, этот подход требует определения нескольких параметров процесса в ходе сбраживания и может требовать добавления в сбраживающую среду белков, или лактозы, или буфера для обеспечения того, что предварительно определенные диапазоны поддерживаются в ходе сбраживания.

Очевидно, все еще существует потребность в улучшении способов изготовления ферментированных молочных продуктов, где эти способы дают лучший контроль активности последующего подкисления в ферментированном молочном продукте.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящее время эта проблема решена посредством способов по настоящему изобретению, в которых предложен молочный продукт с крайне низкой активностью последующего подкисления.

В частности, в настоящем изобретении предложены способы получения ферментированного молочного продукта, включающие стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, содержащей молочнокислые бактерии, способные метаболизировать один или несколько углеводов, присутствующих в молоке,
- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации одного или нескольких углеводов в ходе сбраживания, и
- в) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что завершение сбраживания можно контролировать концентрацией углеводов в молоке, которое подлежит сбраживанию, без значительного воздействия на эффективность или время, требуемое для сбраживания. Это является неожиданным, поскольку полагали, что уменьшение углеводов, присутствующих в молоке, которые доступны LAB для сбраживания, будет ингибировать или отсрочивать процесс сбраживания, и таким образом приведет к неэффективному процессу, который не может быть использован в крупномасштабном производстве ферментированных молочных продуктов, таких как йогурт. Авторы изобретения также неожиданно отметили, что процесс сбраживания быстро протекает до точки, где по существу все углеводы были потреблены LAB, и затем завершается практически полностью (Фиг. 1; 1% лактозы). Ожидали, что процесс сбраживания в присутствии очень низкой концентрации углеводов, доступных для LAB, приведет к низкой подкисляющей активности LAB в течение длительного периода времени.

Альтернативно, в настоящем изобретении предложены способы изготовления ферментированного молочного продукта, включающие стадию, где молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, где:

- 1) заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,
- 2) сбраживание осуществляют при температуре от 22 до 45°C,
- 3) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации углевода в ходе сбраживания,
- 4) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий, и

где ферментированный молочный продукт отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH при хранении после завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания на стадии (2), в течение периода 20 часов. Это не означает, что способ обязательно включает стадию, где ферментированный молочный продукт выдерживают в течение периода 20 часов после завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания на стадии (2). Это лишь функциональный тест, который может быть использован для подтверждения низкого последующего подкисления. Поддержание значения pH ферментированного молочного продукта в пределах диапазона 0,3 единицы pH в течение периода 20 часов при хранении при температуре сбраживания является показателем очень низкого последующего подкисления.

В другом воплощении настоящее изобретение направлено на способы изготовления ферментированного молочного продукта, которые отличаются по существу отсутствием последующего подкисления. Соответствующие способы изготовления ферментированного молочного продукта включают стадию, где молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, где:

- 1) заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,
- 2) сбраживание осуществляют при температуре от 22 до 45°C,
- 3) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации углевода в ходе сбраживания,
- 4) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий, и

где ферментированный молочный продукт отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,1 единицы pH при хранении

после завершения сбраживания при температуре, использованной для сбраживания на стадии (2), в течение периода 20 часов. Поддержание значения рН ферментированного молочного продукта в пределах диапазона 0,1 единицы рН в течение периода 20 часов при хранении при температуре сбраживания является показателем отсутствия последующего подкисления.

В другой альтернативе в настоящем изобретении предложены способы изготовления ферментированного молочного продукта, включающие:

- а) стадию, где молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, где:
 - 1) сбраживание инициируют с использованием молока и заквасочной культуры, где концентрация лактозы в молоке находится в диапазоне от 5 до 100 мг/г в начале сбраживания,
 - 2) заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,
 - 3) сбраживание осуществляют при температуре от 22 до 45°C,
 - 4) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации лактозы в ходе сбраживания,
 - 5) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий, и
- б) стадию, где ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C.

Вследствие низкого последующего подкисления этот способ не требует стадии охлаждения после сбраживания.

В настоящем изобретении также предложены ферментированные молочные продукты, получаемые этими способами. Эти ферментированные молочные продукты отличаются поддержанием значения рН продукта в пределах диапазона 0,3 единицы рН в течение периода 20 часов при хранении при температуре, использованной для сбраживания. Продукты также отличаются очень низкой концентрацией углеводов, которые могут быть метаболизированы LAB, используемыми для сбраживания. Другие углеводы могут присутствовать в значительно большей концентрации.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В целом, в настоящем изобретении предложены способы изготовления ферментированного молочного продукта, включающие стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, содержащей молочнокислые бактерии, способные метаболизировать один или несколько углеводов, присутствующих в молоке,
- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации одного или нескольких углеводов в ходе сбраживания, и
- в) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий.

В контексте настоящей заявки термин “молоко” широко используют в его обычном значении для обозначения жидкостей, вырабатываемых молочными железами животных или растениями. В соответствии с настоящим изобретением молоко может являться обработанным, и термин “молоко” включает цельное молоко, снятое молоко, обезжиренное молоко, молоко с низким содержанием жира, полножирное молоко, молоко с пониженным содержанием лактозы или концентрированное молоко. Обезжиренное молоко представляет собой не содержащий жира или снятый молочный продукт. Молоко с низким содержанием жира обычно определяют как молоко, которое содержит от примерно 1% до примерно 2% жира. Полножирное молоко часто содержит 2% жира или более. Термин “молоко” предназначен охватывать молоко от различных млекопитающих и из различных растительных источников. Млекопитающие - источники молока включают, без ограничения, корову, овцу, козу, буйвола, верблюда, ламу, кобылу и оленя. Растительные источники молока включают, без ограничения, молоко, экстрагированное из соевых бобов, гороха, арахиса, ячменя, риса, овса, квиноа, миндаля, кешью, кокоса, фундука, конопли, семян кунжута и семян подсолнечника.

В способах и продуктах по настоящему изобретению в качестве исходного вещества для сбраживания наиболее предпочтительно используют молоко, полученное от коров.

Молоко с пониженным содержанием лактозы было использовано в некоторых из примеров в настоящей заявке и является доступным в продаже

(например, от Select Milk Producers Inc., Texas, USA). Молоко с пониженным содержанием лактозы может быть получено согласно любому способу, известному в области техники, включая гидролиз лактозы ферментом лактазой до глюкозы и галактозы или путем нанофильтрации, электродиализа, ионообменной хроматографии и центрифугирования.

Термин “молочная основа” широко используют в настоящей заявке для обозначения композиции, основанной на молоке или компонентах молока, которая может быть использована в качестве среды для роста и сбраживания LAB. Молочная основа содержит компоненты, полученные из молока, и любой другой компонент, который может быть использован для выращивания или сбраживания LAB.

В контексте настоящей заявки термин “молочнокислые бактерии” или “LAB” используют для обозначения бактерий пищевого класса, продуцирующих молочную кислоту в качестве основного метаболического конечного продукта сбраживания углеводов. Эти бактерии связаны их общими метаболическими и физиологическими характеристиками и обычно являются Грам-положительными, с низким содержанием GC (гуанин и цитозин), кислотоустойчивыми, неспорообразующими, не потребляющими кислород, палочковидными бациллами или кокками. В ходе стадии сбраживания потребление лактозы этими бактериями вызывает образование молочной кислоты, снижение pH и приводит к образованию белкового коагулята. Таким образом, эти бактерии ответственны за подкисление молока и за текстуру молочного продукта. Как использовано в данной заявке, термин “молочнокислые бактерии” охватывает, без ограничения, бактерии, принадлежащие к роду *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., такие как *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* и *Leuconostoc* spp.

Стадия сбраживания способа изготовления ферментированных молочных продуктов включает добавление заквасочной культуры к молоку. Термин “закваска” или “заквасочная культура”, как использовано в данном контексте, относится к одному или более пищевых микроорганизмов, в

частности, молочнокислых бактерий, которые ответственны за подкисление молочной основы. Заквасочные культуры могут быть свежими, замороженными или высушенными посредством лиофилизационной сушки. Для изготовления ферментированного молочного продукта закваска может быть добавлена в количестве от 0,01 до 3%, предпочтительно от 0,01 до 0,025% по объему от общего количества молока.

Термин “способен метаболизировать один или несколько углеводов, присутствующих в молоке” используют в контексте настоящего изобретения для описания метаболической активности LAB, которая вызывает продуцирование молочной кислоты как основного метаболического конечного продукта сбраживания углеводов. Как будет объяснено более подробно ниже, LAB могут быть способны метаболизировать один, несколько или все углеводы, присутствующие в молоке. Углеводы могут присутствовать в натуральном молоке или могут быть добавлены в молоко.

В определенных воплощениях в настоящем изобретении предложены способы с использованием LAB, способных метаболизировать лактозу и глюкозу. В других воплощениях в изобретении предложены способы с использованием LAB с недостаточностью метаболизма глюкозы, где эти LAB способны метаболизировать другие углеводы, такие как лактоза и галактоза. В других альтернативах в настоящем изобретении предложены способы с использованием LAB с недостаточностью метаболизма лактозы, где эти LAB способны метаболизировать другие углеводы, такие как глюкоза.

Способы по настоящему изобретению отличаются стадией, где молоко сбраживают, и сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации одного или нескольких углеводов в ходе сбраживания. Это означает, что LAB, присутствующие в среде сбраживания, больше не могут продуцировать значительные количества молочной кислоты вследствие очень низкой концентрации углеводов, которые могут быть метаболизированы. В одном из воплощений завершение сбраживания может быть охарактеризовано значением pH, которое поддерживается в пределах диапазона менее чем 0,3 единицы pH при выдерживании культуры при температуре, использованной для сбраживания, в течение 20 часов. Например, если осуществляют способ изготовления ферментированного молочного продукта, включающий стадию,

где молоко сбраживают как описано выше, можно легко протестировать, является ли завершение сбраживания следствием снижения концентрации одного или нескольких углеводов в ходе сбраживания путем выдерживания продукта при температуре сбраживания в течение 20 часов. Если pH не меняется более чем на 0,3 единицы pH в течение этого времени, тогда завершение сбраживания было вызвано снижением концентрации одного или нескольких углеводов в ходе сбраживания.

Способы из предшествующего уровня техники, в которых сбраживание завершают посредством охлаждения, как только достигнут желаемый pH, не могут пройти этот тест, потому что остаточные углеводы, доступные для метаболической активности, будут вызывать значительное последующее подкисление при температуре, используемой для сбраживания (Фиг. 1, кривая 3%; Фиг. 2 и 3, самая нижняя кривая).

Способы по настоящему изобретению также могут отличаться тем, что снижение концентрации углеводов по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий. Это означает, что молочнокислые бактерии вносят вклад в снижение углеводов, хотя другие компоненты, например ферменты, такие как лактаза, также могут вносить вклад в снижение углеводов, которые могут быть метаболизированы в ходе сбраживания.

В некоторых воплощениях способы по настоящему изобретению включают стадию, где ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C. Как указано выше, одна из основных проблем предшествующего уровня техники заключается в необходимости быстрого охлаждения продукта сбраживания для завершения сбраживания. Способы по настоящему изобретению могут включать стадию, где ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C. Это показывает, что в отличие от способов из предшествующего уровня техники быстрое охлаждение не является абсолютно необходимым.

Согласно одной из альтернатив, завершение сбраживания может быть охарактеризовано концентрацией одного или нескольких углеводов, которые могут быть метаболизированы молочнокислыми бактериями. При завершении сбраживания концентрация углеводов, метаболизируемых молочнокислыми

бактериями, может находиться в диапазоне менее чем 100 мг/г, таком как менее чем 30 мг/г, включая диапазон от 25 мг/г до 0,01 мг/г, или диапазон от 5 мг/г до 0,01 мг/г.

Как указано выше, способы изготовления ферментированного молочного продукта согласно настоящему изобретению также могут отличаться особенно стабильным значением pH в ходе хранения. Ферментированный продукт может быть сохранен в пределах диапазона 0,3 единиц pH в течение периода 20 часов при хранении при температуре, используемой для сбраживания.

В другой альтернативе способы изготовления ферментированного молочного продукта согласно настоящему изобретению могут быть охарактеризованы температурой в ходе сбраживания от 22 до 45°C. Этот температурный диапазон включает диапазон, используемый для мезофильных и термофильных культур. В контексте настоящей заявки “мезофильный” относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при умеренных температурах, то есть, при температурах от 15°C до 40°C. Наиболее промышленно полезные мезофильные бактерии включают *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp. Мезофильные молочные продукты включают такие молочные продукты как пахта, простокваша, сквашенное молоко, сметана, сквашенные сливки и молодой сыр, такой как творог, творог и творожный сыр. В контексте настоящей заявки термин “термофильный” относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при температурах выше 40°C. Наиболее промышленно полезные термофильные бактерии включают *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. Термофильные молочные продукты включают такие молочные продукты как йогурт.

Согласно одному из воплощений в настоящем изобретении предложен способ, как описано выше, где обе из мезофильной и термофильной культур сбраживают при температуре от 22 до 45°C.

В настоящем изобретении также предложены ферментированные молочные продукты, получаемые способами, как описано выше. Ферментированные молочные продукты по настоящему изобретению предпочтительно представляют собой ферментированные пищевые продукты, включая йогурт, фруктовый йогурт, йогуртовый напиток или сыр.

В их наиболее предпочтительном воплощении все способы по настоящему изобретению представляют собой способы получения йогурта, и продукт по настоящему изобретению представляет собой йогурт.

В контексте настоящей заявки термин “йогурт” относится к продуктам, содержащим *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и возможно другие микроорганизмы, такие как *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus paracasei*, или любой микроорганизм, полученный из них. Молочнокислые штаммы, отличные от *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* включают для получения различных свойств готового продукта, таких как свойство способствования равновесию флоры. Как использовано в данной заявке, термин “йогурт” охватывает йогурт термостатного способа производства, перемешанный йогурт, питьевой йогурт, Petit Suisse, термообработанный йогурт, процеженный или в греческом стиле йогурт, отличающийся высоким содержанием белка, и йогуртоподобные продукты.

В частности, термин “йогурт” охватывает, без ограничения, йогурт, как определено согласно французским и европейским нормам, например коагулированные молочные продукты, полученные путем молочнокислого сбраживания только с помощью особых термофильных молочнокислых бактерий (то есть *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*), которые культивируют одновременно, и которые обнаруживаются в живом состоянии в конечном продукте в количестве по меньшей мере 10 миллионов КОЕ (колониеобразующих единиц) / г. Йогурты возможно могут содержать добавленные молочные исходные вещества (например, сливки) или другие ингредиенты, такие как сахар или подсластители, один или более корригентов, фрукты, злаки или питательные вещества, особенно витамины, минералы и волокна, а также стабилизаторы и загустители. В одной из альтернатив йогурт соответствует спецификациям для ферментированного молока и йогуртов стандарта AFNOR NF 04-600 и/или кодексу стандарта StanA-Ila-1975. Для соответствия стандарту AFNOR NF 04-600 продукт не должен быть нагрет после сбраживания, и молочные исходные вещества должны составлять минимум 70% (масс./масс.) готового продукта.

Сыр, такой как моцарелла и сыр для пиццы, а также фета, также может быть получен путем сбраживания с использованием заквасочной культуры, содержащей *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Hoier et al. (2010) в The Technology of Cheesemaking, 2nd Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192).

Способы по настоящему изобретению охватывают многочисленные различные альтернативы. Следующие альтернативы будут описаны более подробно ниже:

- а) Способы изготовления ферментированного молочного продукта с использованием молока с низким содержанием лактозы.
- б) Недостаточные по лактозе LAB и способы изготовления ферментированного молочного продукта с использованием недостаточных по лактозе LAB.
- в) Способы изготовления ферментированного молочного продукта с увеличенным сроком хранения
- г) Способы изготовления ферментированного молочного продукта с использованием недостаточных по глюкозе LAB.
- д) Способы изготовления ферментированного молочного продукта с добавлением лактазы к сбраживанию.
- е) Способы изготовления процеженного ферментированного молочного продукта на основе продукта, полученного с использованием одного из способов (а)-(д).
- ж) Способы изготовления сырного продукта паста филата с использованием одного из способов (а)-(д).

А: Способы изготовления ферментированного молочного продукта с использованием молока с низким содержанием лактозы

Согласно этой альтернативе в настоящем изобретении предложены способы изготовления ферментированного молочного продукта, включающие стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, содержащей молочнокислые бактерии, где заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* (ST) и *Lactobacillus delbrueckii* ssp.

bulgaricus, оба из которых способны метаболизировать лактозу, присутствующую в молоке,

- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации лактозы в ходе сбраживания, и
- в) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий,

где перед добавлением заквасочной культуры концентрация лактозы в молоке составляет менее 30 мг/г, и концентрация глюкозы в молоке составляет менее 15 мг/г. В одной из альтернатив концентрация лактозы составляет менее 25 мг/г или менее 15 мг/г, и концентрация глюкозы составляет менее 2 мг/г.

В одном из аспектов этого подхода в настоящем изобретении предложены способы изготовления ферментированного молочного продукта, включающие стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, содержащей молочнокислые бактерии, где заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* (ST) и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, оба из которых способны метаболизировать лактозу, присутствующую в молоке,
- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации лактозы в ходе сбраживания, и
- в) уменьшение вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий,

где способ дополнительно включает стадию, где ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C.

В одной из альтернатив способ может быть охарактеризован тем, что значение pH ферментированного продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH или в пределах диапазона 0,1 единицы pH при хранении после завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания, в течение периода 20 часов.

Лактоза может присутствовать в молоке природно или может быть добавлена к молоку.

В этой альтернативе сбраживание вызвано LAB, способными метаболизировать лактозу, и завершение сбраживания вызвано концентрацией

лактозы, которая так мала, что сбраживание и продуцирование LAB молочной кислоты завершается. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что даже эти очень низкие концентрации лактозы в молоке дают достаточный источник углеводов для быстрого сбраживания. Также было обнаружено, что как только концентрация лактозы снижалась ниже определенного предела, сбраживание быстро завершалось (Пример 1, Фиг. 1).

Исходная концентрация лактозы в молоке может быть ниже 30 мг/г, например от 30 мг/г до 5 мг/г, или от 15 мг/г до 5 мг/г, или от 10 мг/г до 5 мг/г.

Молоко с пониженной концентрацией лактозы может быть доступно в продаже или изготовлено согласно способам, хорошо известным в области техники.

В одном из воплощений этой альтернативы молоко содержит пониженное количество лактозы, и не содержит дополнительных углеводов, которые не присутствуют природно в коровьем молоке. Соответственно, исходная концентрация глюкозы в молоке может быть значительно ниже 15 мг/г, например менее 2 мг/г. Сбраживание может быть осуществлено на молоке с пониженным содержанием лактозы и без добавления каких-либо углеводов к натуральному коровьему молоку.

В другом воплощении этой альтернативы молоко содержит пониженное количество лактозы и дополнительные углеводы, не присутствующие природно в коровьем молоке, такие как глюкоза или сахароза.

Б: Недостаточные по лактозе LAB и способы изготовления ферментированного молочного продукта с использованием недостаточных по лактозе LAB

В другом воплощении в настоящем изобретении предложены недостаточные по лактозе LAB.

Термины “недостаточность метаболизма лактозы” и “недостаточные по лактозе” используют в контексте настоящего изобретения, чтобы охарактеризовать LAB, которые или частично, или полностью потеряли способность использовать лактозу в качестве источника для роста клеток или поддержания жизнеспособности клеток. Соответствующие LAB способны метаболизировать один или несколько углеводов, выбранных из сахарозы, галактозы и/или глюкозы или другого углевода, поддающегося сбраживанию.

Поскольку эти углеводы не присутствуют в молоке природно в достаточных количествах для поддержания сбраживания недостаточными по лактозе мутантами, будет необходимо добавлять эти углеводы к молоку. Недостаточные по лактозе и частично недостаточные LAB могут быть охарактеризованы как белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид).

Как подробно описано в Примере 2 ниже, авторы настоящего изобретения выделили несколько недостаточных по лактозе LAB, в частности, штаммы *Streptococcus thermophilus* (ST) и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (LB). Эти недостаточные по лактозе LAB метаболизируют сахарозу.

Штаммы получали из штамма CHCC15914, который не является недостаточным по лактозе. Соответственно, в настоящем изобретении предложен выделенный штамм *Streptococcus thermophilus*, где этот штамм представляет собой штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28909.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к следующим недостаточным по лактозе штаммам LAB:

- а) штамм *Streptococcus thermophilus*, который представляет собой:
 - 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28952;
 - 2) или штамм, полученный из DSM 28952, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;
- б) штамм *Streptococcus thermophilus*, который представляет собой:
 - 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28953;

- 2) или штамм, полученный из DSM 28953, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;
- в) штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, который представляет собой:
- 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28910;
 - 2) или штамм, полученный из DSM 28910, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии в среде, содержащей лактозу и X-Gal.

Настоящее изобретение также относится к применению этих штаммов в способах изготовления ферментированного молочного продукта, как описано в данной заявке. Также изобретение относится к ферментированным пищевым продуктам, содержащим один или несколько из следующих штаммов:

- а) штамм *Streptococcus thermophilus*, который представляет собой:
- 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28952;
 - 2) или штамм, полученный из DSM 28952, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;
- б) штамм *Streptococcus thermophilus*, который представляет собой:
- 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28953;

- 2) или штамм, полученный из DSM 28953, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;
- в) штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, который представляет собой:
 - 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28910;
 - 2) или штамм, полученный из DSM 28910, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

Ферментированные пищевые продукты могут представлять собой йогурт, фруктовый йогурт, йогуртовый напиток или сыр.

Согласно этому подходу в настоящем изобретении также предложены способы изготовления ферментированного молочного продукта, включающие стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, где заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма лактозы и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* с недостаточностью метаболизма лактозы,
- б) к молоку добавляют углевод, который может быть метаболизирован *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, как определено в (а),
- в) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации углеводов, добавленных к молоку, и
- г) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* ssp., как определено в (а).

В некоторых воплощениях способ дополнительно отличается тем, что включает стадию, где ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C.

В других альтернативах способ может быть охарактеризован тем, что значение pH ферментированного продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 pH или в пределах диапазона 0,1 единицы pH при хранении после завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания, в течение периода 20 часов.

Общая концентрация углеводов, которые могут быть метаболизированы *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, как определено в (а), может находиться в диапазоне от 30 мг/г до 2 мг/г, или в диапазоне от 20 мг/г до 3 мг/г, или в диапазоне от 10 мг/г до 4 мг/г.

Этот путь движения обладает тем преимуществом, что в производственном процессе может быть использовано нормальное молоко с концентрацией лактозы примерно 5% (50 мг/г), и тем что сбраживание можно точно контролировать количеством добавленного углевода. Концентрация углевода, которую необходимо добавить, может быть определена в ходе исследований, тестирующих желательные условия сбраживания, включая конечный pH, температуру, заквасочную культуру и т.д..

В предпочтительном воплощении этой альтернативы сбраживание осуществляют с использованием LAB, которые способны метаболизировать сахарозу (suc+), и сахарозу добавляют к молоку перед сбраживанием. В одной из альтернатив концентрация сахарозы находится в диапазоне от 30 мг/г до 2 мг/г, или в диапазоне от 20 мг/г до 3 мг/г, или в диапазоне от 10 мг/г до 4 мг/г.

В одном из аспектов стадию (а) вышеуказанного способа осуществляют с использованием одного или нескольких из следующих штаммов

- а) штамм *Streptococcus thermophilus*, который представляет собой:
 - 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28952;
 - 2) или штамм, полученный из DSM 28952, где полученный штамм дополнительно отличается способностью

образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

- б) штамм *Streptococcus thermophilus*, который представляет собой:
 - 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28953;
 - 2) или штамм, полученный из DSM 28953, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;
- в) штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, который представляет собой:
 - 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28910;
 - 2) или штамм, полученный из DSM 28910, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

В: Способы изготовления ферментированного молочного продукта с увеличенным сроком хранения

Согласно одному из воплощений настоящего изобретения способы контроля последующего подкисления, описанные выше, в частности, способы, описанные выше в разделе Б, используют для получения ферментированного молочного продукта с увеличенным сроком хранения.

Соответствующий способ изготовления ферментированного молочного продукта может, например, включать стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, где заквасочная культура содержит молочнокислые бактерии, способные метаболизировать один или несколько углеводов, присутствующих в молоке,

- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации одного или нескольких углеводов в ходе сбраживания, и
- в) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий,

где ферментированный продукт отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH при хранении после завершения сбраживания в течение периода 6 месяцев. В особенно предпочтительном воплощении ферментированный продукт отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH при хранении после завершения сбраживания в течение периода 12 месяцев. Продукт можно хранить при температуре от 2°C до комнатной температуры. Предпочтительным является хранение при температуре охлаждения, то есть от 4 до 8°C.

Как указано выше, не требуется хранить продукт в течение нескольких месяцев. Способ изготовления ферментированного молочного продукта согласно настоящему изобретению отличается продуктом, получаемым этим способом, который поддерживает стабильность в течение указанного периода времени. В одном из аспектов в настоящем изобретении предложен способ изготовления ферментированного молочного продукта, который включает стадию, где молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, где продукт, получаемый этим способом, хранят в течение 6 или 12 месяцев.

В альтернативном воплощении способ изготовления ферментированного молочного продукта включает стадию, где молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, где:

- 1) заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,
- 2) сбраживание осуществляют при температуре от 22 до 45°C,
- 3) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации углевода в ходе сбраживания,
- 4) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий, и

где ферментированный продукт отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH при хранении после завершения сбраживания в течение периода 6 или 12 месяцев.

В другой альтернативе предложены способы изготовления ферментированного молочного продукта, которые включают следующие стадии:

- а) стадию, где молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, где:
 - 1) сбраживание инициируют с использованием молока и заквасочной культуры, где концентрация лактозы в молоке находится в диапазоне от 5 до 100 мг/г в начале сбраживания
 - 2) заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,
 - 3) сбраживание осуществляют при температуре от 22 до 45°C,
 - 4) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации лактозы в ходе сбраживания,
 - 5) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий, и
- б) стадию, где ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C,

где ферментированный продукт отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH при хранении после завершения сбраживания в течение периода 6 или 12 месяцев.

Согласно одному из воплощений в этих способах используют молочнокислые бактерии для сбраживания, которые не способны метаболизировать лактозу. Молочнокислые бактерии могут быть способны метаболизировать сахарозу. В особенно предпочтительном воплощении в этих способах используют заквасочную культуру, содержащую один или несколько из следующих штаммов:

- а) штамм *Streptococcus thermophilus*, который представляет собой:
 - 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-

- 38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28952;
- 2) или штамм, полученный из DSM 28952, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;
- б) штамм *Streptococcus thermophilus*, который представляет собой:
- 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28953;
 - 2) или штамм, полученный из DSM 28953, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;
- в) штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, который представляет собой:
- 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28910;
 - 2) или штамм, полученный из DSM 28910, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

Для сбраживания йогурта предпочтительно, чтобы была использована заквасочная культура, которая содержит штамм *Streptococcus thermophilus* и штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, как описано выше.

Способ также может включать тепловую обработку после сбраживания. Например, тепловая обработка может быть осуществлена при температуре в диапазоне от 30 до 65°C в течение 10-30 секунд, и ее предпочтительно осуществляют при температуре в диапазоне от 40 до 55°C в течение 10-25 секунд.

В настоящем изобретении также предложены ферментированные молочные продукты, получаемые способом, описанными выше. Ферментированный молочный продукт может представлять собой йогурт, фруктовый йогурт, йогуртовый напиток или сыр. Таким образом, в изобретении предложен йогурт термостатного способа производства, перемешанный йогурт, питьевой йогурт, Petit Suisse, термообработанный йогурт, процеженный или в греческом стиле йогурт, отличающийся высоким содержанием белка, и йогуртоподобные продукты, получаемые этими способами.

Г: Способы изготовления ферментированного молочного продукта с использованием недостаточных по глюкозе LAB

В этой альтернативе в настоящем изобретении предложены способы изготовления ферментированного молочного продукта, включающие стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, где заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы и *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* с недостаточностью метаболизма глюкозы,
- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации лактозы в ходе сбраживания, и
- в) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий.

В предпочтительном аспекте этот способ также может быть охарактеризован как включающий стадию, где ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C.

В других альтернативах способ может быть охарактеризован тем, что значение pH ферментированного продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 pH или в пределах диапазона 0,1 единицы pH при хранении после завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания, в течение периода 20 часов.

Оба термина “недостаточность метаболизма глюкозы” и термин “недостаточный по глюкозе” используют в контексте настоящего изобретения для того, чтобы охарактеризовать LAB, которые или частично, или полностью потеряли способность использовать глюкозу в качестве источника для роста

клеток или поддержания жизнеспособности клеток. Соответствующая недостаточность метаболизма глюкозы может, например, быть вызвана мутацией в гене, ингибирующей или инактивирующей экспрессию или активность белка глюкокиназы или транспортного белка глюкозы. LAB с недостаточностью метаболизма глюкозы могут быть охарактеризованы как увеличивающие концентрацию глюкозы в культуральной среде при выращивании на лактозе в качестве источника углеводов. Увеличение глюкозы вызвано секрецией глюкозы недостаточными по глюкозе LAB. Увеличение концентрации глюкозы в культуральной среде может быть определено посредством анализа HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография), например с использованием колонки Dionex CarboPac PA 20 3*150 мм (Thermo Fisher Scientific, номер продукта 060142).

Несколько форм глюкозных LAB с недостаточностью метаболизма глюкозы были описаны в предшествующем уровне техники, включая LAB, способные метаболизировать лактозу и галактозу (WO 2013/160413, Pool et al., 2006). Соответствующие LAB могут усваивать основной углевод, присутствующий в молоке, лактозу, таким образом вырабатывая глюкозу и галактозу. Недостаточные по глюкозе штаммы, такие как недостаточный по глюкозе штамм *Streptococcus thermophilus*, описанный в WO 2013/160413, могут метаболизировать галактозу и также, как оказывается, выделяют глюкозу. Альтернативные штаммы описаны в WO 2013/160413, такие как 2-дезоксиглюкоза-резистентный мутантный штамм LAB *Lactobacillus delbrueckii*, который не может усваивать глюкозу или галактозу, присутствующую в среде. Однако, штамм может усваивать лактозу, перерабатывать лактозу и использовать глюкозу, полученную в результате переработки лактозы, для роста и продуцирования кислоты. В публикации Pool et al., 2006 раскрыт еще один способ получения LAB с недостаточностью метаболизма глюкозы. С использованием общих принципов, описанных в этих публикациях, обычным специалистом в данной области могут быть получены многочисленные другие LAB с такой же или сходной недостаточностью метаболизма глюкозы.

Так как вкус глюкозы является намного более сладким, чем вкус галактозы, сбраживание молока с использованием этих недостаточных по глюкозе мутантов увеличит сладость ферментированного продукта при

значительном снижении концентрации лактозы и без увеличения общей концентрации углеводов (как описано более подробно в WO2013/160413).

Согласно одной из альтернатив молочнокислые бактерии с недостаточностью метаболизма глюкозы могут включать недостаточный по глюкозе, но сбраживающий галактозу штамм *Streptococcus thermophilus* и/или штамм *Lactobacillus delbrueckii* с недостаточностью усвоения глюкозы. Штамм *Lactobacillus delbrueckii* с недостаточностью усвоения глюкозы может метаболизировать лактозу и использовать глюкозу, полученную из внутриклеточного гидролиза лактозы.

Заквасочная культура может содержать дополнительные LAB или может состоять из смеси этих штаммов.

Соответственно, в настоящем изобретении предложены способы изготовления ферментированного молочного продукта, включающие стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, содержащей один или более штаммов *Streptococcus thermophilus*, выбранных из CHCC16731, CHCC15757 и CHCC16404, и штамма *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC16159,
- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации лактозы в ходе сбраживания, и
- в) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий.

С использованием этих недостаточных по глюкозе LAB в способах по изобретению предложено дополнительное преимущество, что ферментированный молочный продукт, полученный таким образом, имеет сладкий вкус.

В данном воплощении настоящего изобретения может быть использован молочный продукт с пониженной концентрацией лактозы для сбраживания с целью завершения сбраживания вследствие уменьшения концентрации лактозы в ходе сбраживания. Соответственно, в настоящем изобретении также предложены способы изготовления ферментированного молочного продукта, включающие стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют молоком и заквасочной культурой, где перед добавлением заквасочной культуры концентрация лактозы в молоке составляет менее 30 мг/г, и где заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* с недостаточностью метаболизма глюкозы,
- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации лактозы в ходе сбраживания, и
- в) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий.

Исходная концентрация лактозы, то есть концентрация перед добавлением заквасочной культуры, в молоке может составлять от 50 мг/г до 5 мг/г, или от 25 мг/г до 5 мг/г.

Молоко с пониженной концентрацией лактозы может быть доступно в продаже или изготовлено согласно способам, хорошо известным в области техники.

Д: Способы изготовления ферментированного молочного продукта с добавлением лактазы к сбраживанию

В этой альтернативе в настоящем изобретении предложены способы изготовления ферментированного молочного продукта, включающие стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, содержащей молочнокислые бактерии, способные метаболизировать один или несколько углеводов, присутствующих в молоке,
- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации одного или нескольких углеводов в ходе сбраживания, и
- в) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий,

и где сбраживание осуществляют в присутствии лактазы в начальной концентрации от 500 до 5000 NLU/л (единиц нейтральной лактазы/л).

В предпочтительном аспекте этот способ также может быть охарактеризован как включающий стадию, где ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C.

В других альтернативах способ может быть охарактеризован тем, что значение pH ферментированного продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 pH или диапазона 0,1 единицы pH при хранении после завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания, в течение периода 20 часов.

Лактаза представляет собой фермент, который гидролизует лактозу и продуцирует глюкозу и галактозу. Лактаза доступна в продаже из многих источников и может быть получена согласно способам, хорошо известным в области техники. Активность лактазы может быть определена как единицы активности нейтральной лактазы (NLU). В соответствии с настоящим изобретением активность лактазы определяют с использованием способа, как описано в IV способе Food Chemicals Codex (FCC).

Е: Способы изготовления процеженного ферментированного молочного продукта на основе продукта, полученного одним из способов (а)-(д)

Способы от А до Д, описанные выше, являются особенно предпочтительными для изготовления процеженных ферментированных молочных продуктов, таких как процеженный йогурт (греческий йогурт, Labneh), творог, свежий сыр (fromage frais) и сливочный сыр. Процеженные ферментированные молочные продукты отличаются стадией производства, где сыворотку удаляют из ферментированного молока путем разделения и/или фильтрации после сбраживания, что приводит к относительно плотным продуктам с высокой концентрацией белка.

Концентрирование ферментированного молока с использованием ультрафильтрации или с использованием сепаратора после традиционных способов сбраживания приведет к последующему подкислению в ходе стадии концентрирования. Последующее подкисление будет оказывать влияние на несколько факторов перед и в ходе процесса разделения. Во-первых, последующее подкисление будет вызывать дальнейшее уменьшение pH. Как следствие уменьшения pH, будет увеличиваться плотность геля. Как другое следствие уменьшения pH, увеличится размер частиц в йогурте. Наконец, увеличится напряжение сдвига вследствие продолжающегося продуцирования

и выделения LAB экзополисахаридов (или внеклеточных полимерных веществ или EPS).

В результате, ферментированному молоку, произведенному этим способом, будет не хватать гомогенности. Это будет влиять на основные параметры процесса разделения, напрямую связанные с законом Стокса, такие как, например, размер частиц, способность частиц связывать воду, вязкость сывороточной фазы и иммобилизованная вода в белковой матрице. Вследствие дальнейшего уменьшения pH, например с 4,65 до pH 4,30, будет получен меньший выход продукта и будут наблюдаться вариации качества продукта с точки зрения вкуса, кислотности и текстуры. Таким образом, в предшествующем уровне техники протертые ферментированные молочные продукты получают с использованием способов, включающих стадии способа, которые подавляют последующее подкисление, чаще всего с использованием стадии охлаждения. Однако, стадия охлаждения требует значительного количества энергии и оказывает негативные эффекты на дальнейшую обработку продукта.

Обзор различных способов изготовления ферментированных молочных продуктов с использованием стадии концентрирования белка приведен на Фиг. 7. На левой части Фиг. 7 показаны способы с использованием стадии концентрирования перед сбраживанием, а на правой части Фиг. 6 показаны способы с использованием стадии концентрирования после сбраживания путем разделения с использованием центрифугирования и ультрафильтрации.

На Фиг. 8-11 показаны результаты доказательства принципиальных экспериментов, иллюстрирующих преимущества, которые могут быть достигнуты путем объединения способов снижения последующего подкисления, как описано выше, со способами изготовления ферментированного молочного продукта, которые включают стадию, где сыворотку удаляют из ферментированного молока путем разделения и/или фильтрации, что приводит к относительно густому йогурту с высокой концентрацией белка. Эти результаты получали со следующей экспериментальной установкой:

Следующие две партии коммерческих культур сбраживали в одинаковом типе молочной основы:

- Mild 2.0 (от Chr. Hansen, Дания);

- Тип культуры Premium 1.0 (70%) плюс Тип культуры SSC17 (30%) (оба от Chr. Hansen, Дания).

Использованная молочная основа представляла собой снятое молоко; сбраживание осуществляли при температуре 40°C.

Обе партии сбраживали до pH 4,60. Отбирали образцы для анализа текстуры и сбраживание продолжали до достижения pH 4,45. Вновь анализировали текстуру продукта. Четыре йогуртовых сгустка (две культуры при двух различных значениях pH, 4,60 и 4,45) обрабатывали в модуле дополнительной обработки (FH Scandinox) после достижения определенного значения pH. К культурам применяли различные обратные давления, между 4 и 9, или от 4 до 12 бар. Напряжение сдвига и суммарный модуль определяли с использованием реометра.

На Фиг. 8-11 показано, что и напряжение сдвига, и суммарные модули являются бóльшими при pH 4,45, чем при pH 4,60. Также текстура ферментированного молочного продукта увеличивается как следствие снижения значения pH с 4,60 до 4,45.

Культура Premium 1.0 плюс SSC17 давала большее напряжение сдвига и суммарный модуль по сравнению с Mild 2.0 при обоих уровнях pH.

Текстура значительно снижалась при применении обратного давления, между 4 и вплоть до 9, или от 4 вплоть до 12 бар.

Таким образом, эксперименты по подтверждению принципа действия показывают, что будет возможно и предпочтительно отделять сыворотку от ферментированного молочного продукта с использованием меньшего напряжения сдвига и суммарного модуля со способами контроля последующего подкисления, как описано выше. Текстура зависит от типа культуры, pH и примененного обратного давления в ходе процесса перед входом в сепаратор или UF (ультрафильтр). Было невозможно уменьшить текстуру при pH 4,45 до текстуры при 4,60 даже если к йогуртовому сгустку применяли высокое обратное давление.

Таким образом, в способах контроля последующего подкисления предложена возможность сбраживать молоко с использованием культур LAB до конкретного pH в зависимости от углевода, добавляемого для сбраживания. В этих способах предложен улучшенный контроль pH в йогурте в ходе обработки

после сбраживания и, таким образом, в частности улучшит стадию разделения. Кроме того скорость может быть оптимизирована, так как охлаждение не является необходимым, и выход производства увеличивается.

Согласно данному аспекту изобретения среди прочих предложены следующие воплощения:

1. Способ изготовления процеженного ферментированного молочного продукта, включающий стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, где заквасочная культура содержит молочнокислые бактерии, способные метаболизировать один или несколько углеводов, присутствующих в молоке,
- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации одного или нескольких углеводов в ходе сбраживания,
- в) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий,
- г) по меньшей мере часть сыворотки отделяют от ферментированного молочного продукта.

2. Способ изготовления процеженного ферментированного молочного продукта, включающий стадию, где молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, где:

- 1) заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,
- 2) сбраживание осуществляют при температуре от 22 до 45°C,
- 3) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации углевода в ходе сбраживания,
- 4) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий,
- 5) по меньшей мере часть сыворотки отделяют от ферментированного молочного продукта, и

где ферментированный молочный продукт перед отделением сыворотки отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH или поддерживается в пределах диапазона 0,1 единицы pH при хранении, обработке или выдерживании после завершения

сбраживания при температуре, используемой для сбраживания на стадии (2), в течение периода 20 часов.

3. Способ изготовления ферментированного молочного продукта, включающий:

- а) стадию, где молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, где:
 - 1) сбраживание инициируют с использованием молока и заквасочной культуры, где концентрация лактозы в молоке находится в диапазоне от 5 до 100 мг/г в начале сбраживания,
 - 2) заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,
 - 3) сбраживание осуществляют при температуре от 22 до 45°C,
 - 4) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации лактозы в ходе сбраживания,
 - 5) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий, и
- б) стадию, где по меньшей мере часть сыворотки отделяют от ферментированного молочного продукта при температуре от 15 до 45°C,
- в) стадию, где ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C,

где ферментированный молочный продукт отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH или поддерживается в пределах диапазона 0,1 единицы pH при хранении после завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания на стадии (2), в течение периода 20 часов.

4. Способ по любому из воплощений 1-3, где отделение осуществляют путем фильтрации, включая фильтрацию с использованием соплового сепаратора, центрифуги или ультрафильтрацию со спиральными фильтрами или керамическими фильтрами.

5. Способ по любому из воплощений 1-4, где процеженный ферментированный молочный продукт отличается содержанием белка от 6 до 13% и содержанием жира от 0 до 10%.

6. Способ по любому из воплощений 1-5, где процеженный ферментированный молочный продукт отличается содержанием белка от 6 до 10%.

7. Способ по любому из воплощений 1-6, где процеженный ферментированный молочный продукт представляет собой йогурт, греческий йогурт, Labneh, творог, свежий сыр (fromage frais) или сливочный сыр.

8. Способ по любому из воплощений 1-7, где отделение по меньшей мере части сыворотки от ферментированного молочного продукта осуществляют без активного охлаждения ферментированного молочного продукта.

9. Способ по любому из воплощений 1-8, где заквасочная культура содержит отрицательный по лактозе штамм.

10. Способ по любому из воплощений 1-9, где заквасочная культура содержит одну или более LAB, выбранных из штаммов CHCC18944, CHCC17861 и CHCC17862.

11. Ферментированный молочный продукт, получаемый способом по любому из воплощений 1-10.

12. Ферментированный молочный продукт согласно воплощению 11, где ферментированный молочный продукт представляет собой йогурт, фруктовый йогурт, йогуртовый напиток или сыр.

Отделение сыворотки может быть осуществлено с использованием соплового сепаратора (центрифуги), часто используемого в области техники для отделения сыворотки от ферментированных молочных продуктов. Альтернативно или дополнительно могут быть использованы ультрафильтрационные системы, обычно спиральные фильтры или керамические фильтры. В другой альтернативе используют пластинчатые и рамные фильтры для применений с большим содержанием твердого белка и жира, например полножирного сливочного сыра.

Процеженный йогурт отличается содержанием белка от 6 до 13%. Продукт может дополнительно иметь содержание жира от 0 до 10%.

Альтернативно, ферментированный продукт может представлять собой творог или свежий сыр (fromage frais). Творог и свежий сыр (fromage frais) обычно отличаются содержанием белка от 6 до 10%. Творог и свежий сыр (fromage frais) также могут быть охарактеризованы содержанием жира от 6 до 10%.

В другой альтернативе, ферментированный продукт представляет собой сливочный сыр. Сливочный сыр может отличаться содержанием белка от 6 до 13%. Сливочный сыр также может быть охарактеризован содержанием жира от 0 до 35%.

В предпочтительных воплощениях этого аспекта по настоящему изобретению отделение по меньшей мере части сыворотки от ферментированного молочного продукта осуществляют без активного охлаждения ферментированного молочного продукта. Это не означает, что продукт выдерживают при температуре, используемой для сбраживания, но лишь то, что продукт не подвергают охлаждению.

В другом воплощении вышеуказанный способ изготовления процеженного ферментированного молочного продукта осуществляют с использованием заквасочной культуры, содержащей отрицательный по лактозе штамм. Как объяснено в части Б выше, применение отрицательных по лактозе штаммов для контроля последующего подкисления является особенно предпочтительным. Соответственно, предложены способы изготовления процеженного ферментированного молочного продукта, где используют заквасочную культуру, содержащую один или более LAB, выбранных из штаммов CHCC18944, CHCC17861 и CHCC17862.

Данное воплощение является особенно подходящим для изготовления греческого йогурта, творога или сливочного сыра.

Ж: Способы изготовления сырного продукта паста филата с использованием одного из способов от (А) до (Д).

Способы по настоящему изобретению, как описано в разделах (А)-(Д) выше, являются особенно предпочтительными для изготовления сыра паста филата. Сыр паста филата представляет собой сыр, полученный способом, включающим стадию тепловой обработки сгустка. Тепловая обработка может быть осуществлена несколькими различными путями, включая замачивания

сгустков в горячей воде или сыворотке. В другой альтернативе в сгустки впрыскивают пар. Стадия тепловой обработки придает готовому сыру волокнистую структуру и, в частности, тянущие свойства. Обычные сыры паста филата представляют собой Mozzarella и Provolone, Caciocavallo, Pallone di Gravina и Scamorza.

Согласно этому аспекту изобретения среди прочих предложены следующие воплощения:

1. Способ изготовления сыра паста филата, включающий стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, где заквасочная культура содержит молочнокислые бактерии, способные метаболизировать один или несколько углеводов, присутствующих в молоке,
- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации одного или нескольких углеводов в ходе сбраживания, и
- в) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий;
- г) ферментированный продукт подвергают тепловой обработке, например путем помещения ферментированного продукта в горячую воду или впрыскивания пара в ферментированный продукт.

2. Способ изготовления сыра паста филата, включающий стадию, где молоко сбраживают, где:

- 1) заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,
- 2) сбраживание осуществляют при температуре от 22 до 45°C,
- 3) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации углевода в ходе сбраживания,
- 4) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий, и

где ферментированный молочный продукт отличается тем, что значение рН продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы рН или поддерживается в пределах диапазона 0,1 единицы рН при хранении после

завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания на стадии (2), в течение периода 20 часов; и

где ферментированный продукт подвергают тепловой обработке, например путем помещения ферментированного продукта в горячую воду или впрыскивания пара в ферментированный продукт.

3. Способ изготовления сыра паста филата, включающий стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) стадия, где молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, где:
 - 1) сбраживание инициируют с использованием молока и заквасочной культуры, где концентрация лактозы в молоке находится в диапазоне от 5 до 100 мг/г в начале сбраживания,
 - 2) заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,
 - 3) сбраживание осуществляют при температуре от 22 до 45°C,
 - 4) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации лактозы в ходе сбраживания,
 - 5) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий, и
- б) стадия, где ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C,

где ферментированный молочный продукт отличается тем, что значение рН продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы рН или поддерживается в пределах диапазона 0,1 единицы рН при хранении после завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания на стадии (2), в течение периода 20 часов; и

где ферментированный продукт подвергают тепловой обработке, например путем помещения ферментированного продукта в горячую воду или впрыскивания пара в ферментированный продукт.

4. Способ изготовления сыра паста филата согласно одному из воплощений 1-3, где молочнокислые бактерии способны метаболизировать лактозу и глюкозу, и где перед добавлением заквасочной культуры

концентрация лактозы в молоке составляет менее 200 мг/г, например от 100 мг/г до 5 мг/г, или от 50 мг/г до 5 мг/г, или от 25 мг/г до 5 мг/г.

5. Способ изготовления сыра паста филата согласно одному из воплощений 1-3, где молочнокислые бактерии не способны метаболизировать лактозу, и где перед добавлением заквасочной культуры общая концентрация углеводов, которые могут быть метаболизированы молочнокислыми бактериями в молоке, составляет менее 45 мг/г.

6. Способ изготовления сыра паста филата согласно одному из воплощений 1-3, где молочнокислые бактерии способны метаболизировать лактозу и галактозу, но являются недостаточными по глюкозе.

7. Способ изготовления сыра паста филата согласно одному из воплощений 1-6, где сбраживание осуществляют в присутствии лактазы в исходной концентрации от 500 до 5000 NLU/л.

8. Способ изготовления сыра паста филата согласно одному из воплощений 1-7, где завершение сбраживания вызвано уменьшением общей концентрации одного или нескольких углеводов, которые могут быть метаболизированы молочнокислыми бактериями до значения менее чем 30 мг/г, включая диапазон от 25 мг/г до 0,01 мг/г или диапазон от 5 мг/г до 0,01 мг/г.

9. Способ изготовления сыра паста филата согласно одному из воплощений 1-8, где значение pH ферментированного продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH в течение периода 20 часов при хранении при температуре для сбраживания.

10. Способ изготовления сыра паста филата согласно одному из воплощений 1-9, где сбраживание осуществляют при температуре от 30 до 45°C.

11. Способ изготовления сыра паста филата согласно одному из воплощений 1-10, где после завершения сбраживания ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C.

12. Способ изготовления сыра паста филата согласно одному из воплощений 1-11, где ферментированный продукт

отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH при хранении после завершения сбраживания в течение периода 6 месяцев или

отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH при хранении после завершения сбраживания в течение периода 12 месяцев.

13. Ферментированный молочный продукт, получаемый способом по любому из воплощений 1-12, где молочный продукт представляет собой сыр паста филата.

14. Ферментированный молочный продукт согласно воплощению 13, где сыр паста филата выбран из Mozzarella, Provolone, Caciocavallo, Pallone di Gravina и Scamorza.

Более конкретно, способ изготовления сыра паста филата по настоящему изобретению может включать следующие стадии способа:

- получение молочного продукта со стандартизованными белком, жиром и сухими веществами;
- доведение температуры до температуры коагуляции (32-38°C);
- добавление культуры Acidifix (*Streptococcus thermophilus* CHCC17861 и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944);
- добавление коагулянта;
- коагулирование молока в течение 15-60 минут, резка и перемешивание сгустка;
- возможно нагревание (бланширование) сгустка;
- подкисление сгустка (или покрытого сывороткой, или отфильтрованного от сыворотки);
- вытягивание сгустка в горячей воде или путем впрыскивания пара (в "сухом устройстве для вытягивания") или другими способами нагревания и механической обработки сгустка;
- формовка и охлаждение сыра;
- охлаждение и подсаливание сыра;
- упаковывание сыра.

В альтернативном воплощении способ изготовления сыра паста филата по настоящему изобретению может включать следующие стадии способа:

- получение молочного продукта со стандартизованными белком, жиром и сухими веществами;
- добавление сахарозы, достаточной для культуры подкисления;

- доведение температуры до температуры коагуляции (32-38°C);
- добавление культуры Acidifix (*Streptococcus thermophilus* CHCC17861 и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944);
- добавление коагулянта;
- коагуляция молока в течение 15-60 минут, резка и перемешивание сгустка;
- возможно нагревание (бланширование) сгустка;
- подкисление сгустка (или покрытого сывороткой, или отфильтрованного от сыворотки);
- охлаждение подкисленного сгустка;
- вытягивание сгустка в горячей воде или путем впрыскивания пара (в “сухом устройстве для вытягивания”) или другими способами нагревания и механической обработки сгустка;
- формовка и охлаждение сыра;
- охлаждение и подсаливание сыра;
- упаковывание сыра.

В альтернативном воплощении способ изготовления сыра паста филата по настоящему изобретению может включать следующие стадии способа:

- получение молочного продукта со стандартизованными белком, жиром и сухими веществами;
- добавление сахарозы, достаточной для культуры подкисления;
- доведение температуры до температуры коагуляции (32-38°C);
- добавление культуры Acidifix (*Streptococcus thermophilus* CHCC17861 и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944);
- добавление коагулянта;
- коагулирование молока в течение 15-60 минут, резка и перемешивание сгустка;
- возможно нагревание (бланширование) сгустка;
- подкисление сгустка (или покрытого сывороткой, или отфильтрованного от сыворотки);
- хранение подкисленного сгустка при температуре от 6 до 25°C;

- вытягивание сгустка в горячей воде или путем впрыскивания пара (в “сухом устройстве для вытягивания”) или другими способами нагревания и механической обработки сгустка;
- формовка и охлаждение сыра;
- охлаждение и подсаливание сыра;
- упаковывание сыра.

Во всех воплощениях сыр может быть порезан на ломтики, нашинкован, разделен на куски, нарезан на кубики или разделен на порции другими способами перед упаковкой.

Описание графических материалов

На Фиг. 1 сравнивается подкисляющая активность штамма *S. thermophilus* CHCC6008 при использовании для инокулирования молока, содержащего 1 и 3% лактозы.

На Фиг. 2 сравнивается подкисляющая активность *S. thermophilus* CHCC15914 и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC10019 с подкисляющей активностью *S. thermophilus* CHCC17862 и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC18944 при использовании для сбраживания молока с добавлением сахарозы.

На Фиг. 3 показана подкисляющая активность различных соотношений *S. thermophilus* CHCC17861 и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CHCC18944 при использовании для сбраживания молока с добавлением сахарозы и сравнения с подкисляющей активностью *S. thermophilus* CHCC15914.

На Фиг. 4 показано последующее подкисление, то есть развитие pH двух различных ферментированных молочных продуктов после сбраживания с использованием способа по изобретению (Acidifix) и способа из предшествующего уровня техники (YFL-904).

На Фиг. 5 показано развитие pH в культуре, ферментированной с помощью Sweetu после завершения сбраживания при 6°C в течение 42 суток (то есть последующее подкисление). На этой Фиг. показано, что pH отличается менее чем на 0,1 единицы pH в этих условиях.

На Фиг. 6 показано развитие pH в различных культурах, ферментированных с лактазой и без лактазы в ходе хранения при температуре охлаждения в течение периода 48 суток.

На Фиг. 7 показан обзор способов, в которых использовано концентрирование белка перед сбраживанием (левая сторона) и концентрирование белка после сбраживания с помощью разделения с использованием центрифугирования или ультрафильтрации (правая сторона).

На Фиг. 8 показано влияние pH на напряжение сдвига в ходе отделения сыворотки от молочного продукта после сбраживания с помощью SSC17.

На Фиг. 9 показано влияние pH на напряжение сдвига в ходе отделения сыворотки от молочного продукта после сбраживания с помощью Mild2.0.

На Фиг. 10 показано влияние pH на суммарный модуль или твердость геля в ходе отделения сыворотки от молочного продукта после сбраживания с помощью SSC17.

На Фиг. 11 показано влияние pH на суммарный модуль или твердость геля в ходе отделения сыворотки от молочного продукта после сбраживания с помощью Mild2.0.

Штаммы LAB:

В последующих примерах использованы штаммы CH, некоторые из которых были депонированы для предыдущих патентных заявок Chr. Hansen. Дальнейшая информация по штаммам предоставлена соответствующей патентной заявкой и депонированием следующим образом:

Streptococcus thermophilus CHCC6008 депонировали для WO2011/000879 в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig 2006-03-23 с номером доступа DSM 18111.

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* CHCC10019 депонировали для WO2011/000879 в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig 2007-04-03 с номером доступа DSM 19252.

Streptococcus thermophilus CHCC15757 депонировали для WO2013160413 в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,

Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig 2012-04-03 с номером доступа DSM 25850.

Streptococcus thermophilus CHCC16404 депонировали для WO2013160413 в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig 2012-12-12 с номером доступа DSM 26722.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CHCC16159 депонировали для WO2013160413 в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig 2012-09-06 с номером доступа DSM 26420.

Оставшиеся штаммы, использованные в последующих примерах, были или депонированы для настоящей заявки, или являются доступными в продаже от Chr. Hansen.

Пример 1: Способы изготовления ферментированного молочного продукта с использованием низколактозного молока

Получали изготовленное по индивидуальным параметрам молоко, содержащее 1% лактозы (10 г/л) (от Select Milk Producers, Inc., Texas, USA). Молоко, содержавшее 3% лактозы (30 г/л), получали путем добавления 2% лактозы (20 г/л) к молоку с 1% лактозы.

Молоко засеивали штаммом *S. thermophilus* CHCC6008 (0,01% F-DVS) и поддерживали при температуре 37°C в течение 20 часов. Подкисление (значение pH) определяли автоматически с течением времени.

Результат показан на Фиг. 1. Сбраживание с использованием 1% лактозы демонстрирует профиль подкисления близкий к идеальному. Исходно продукт подкисляется с высокой скоростью, но подкисление резко прекращается при pH 4,8 по прошествии примерно 6 часов, и pH культуры оставался постоянным в течение последующих 14 часов, хотя культуру поддерживали при температуре 37°C. Это показывает, что подкисление полностью завершилось.

Сбраживание с использованием 3% лактозы использовали в качестве контроля. Исходно продукт подкисляется с той же скоростью, что и при сбраживании на основе 1% лактозы. Это показывает, что концентрация лактозы

1% (10 мг/г) не является слишком низкой для ингибирования сбраживания в начальной фазе.

Но сбраживание с использованием 3% лактозы не завершается при pH 4,8, но подкисление продолжается вплоть до достижения pH примерно 4,5, и в этом состоянии присутствие кислоты, продуцированной бактериями, ингибирует дальнейшее сбраживание. Как следствие, сбраживание продолжается с низкой скоростью до достижения pH примерно 4,2.

Эти результаты доказывают, что концентрация углевода (в данном случае, лактозы) может быть неожиданно использована для контроля завершения сбраживания. Этот тип осуществления предлагает способы, где желаемое значение pH достигается путем сбраживания, и впоследствии не наблюдают последующего подкисления.

Пример 2: Способы изготовления молочного продукта с использованием недостаточных по лактозе LAB

Недостаточные по лактозе мутанты выделяли из EPS-положительных штаммов *S. thermophilus* (ST) CHCC15914 и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (LB) CHCC10019. Штаммы выбирали после UV(ультрафиолет)-мутагенеза как белые колонии (что указывает на недостаточный по лактозе фенотип) на M17 с 1% лактозы и 200 мг/мл X-Gal для CHCC15914, соотв. MRS агаровые планшеты с 1% лактозы и 200 мг/мл X-Gal для CHCC10019.

Оба штамма дикого типа обладают β -галактозидазной активностью, и колонии дикого типа оказывались синими вследствие активности β -галактозидазы.

Из CHCC10019 выделяли один недостаточный по лактозе мутант и обозначали CHCC18944 (этот мутант был идентифицирован как CHCC18994 в заявке на европейский патент 14173196; но внутренний номер доступа заявителя был изменен и сейчас представляет собой CHCC18944; номер доступа DSMZ не был изменен, и поэтому все еще представляет собой DSM28910).

Из CHCC15914 выделяли два недостаточных по лактозе мутанта и обозначали CHCC17861 и CHCC17862, соответственно.

Характеристики роста выделенных недостаточных по лактозе мутантов определяли следующим образом:

Фенотип LB CHCC18944: *lac*⁻, *suc*⁻, *gal*⁻, *glc*⁺

Фенотип ST CHCC17861: *lac*⁻, *suc*⁺, *gal*⁺, *glc*⁺

Фенотип ST CHCC17862: *lac*⁻, *suc*⁺, *gal*⁺, *glc*⁺

Полный лактозный оперон секвенировали для всех трех мутантов и сравнивали с соответствующим штаммом дикого типа для выявления типа мутации.

Сравнение с родительским штаммом CHCC15914 показывало, что CHCC17861 имел дополнительный нуклеотид “Т” в начале гена *lacZ* (кодирующего β-галактозидазу), приводящего к стоп-кодону в кодирующей последовательности через несколько нуклеотидов от мутации. CHCC17862 демонстрировал делецию одного нуклеотида, также прерывающего кодирующую последовательность гена *lacZ*.

Для CHCC18944 была идентифицирована мутация внутри гена *lacZ*. Это приводило к обмену 8 нуклеотидов (5'-CTT CCA AGC-3' на 5'-CGC TAC TAT-3') и, как следствие, к замене 3 аминокислот (Leu-Pro-Ser на Arg-Tyr-Tyr) в *lacZ*, что объясняло недостаточный по лактозе фенотип.

Все мутанты при применении в качестве отдельных штаммов или в комбинации (ST плюс LB) подкисляют молоко в зависимости от добавления поддающегося сбраживанию углевода, отличного от лактозы. Подкисляющую активность недостаточных по лактозе культур, например, определяли с использованием культур, выращенных в течение ночи в MRS (LB wt (дикий тип) и LB *lac*⁻ мутант); M17 с 1% лактозы (ST wt); или M17 с различными концентрациями сахарозы (1% и 0,5%; сбраживание с ST *lac*⁻ мутантом). Молоко инокулировали и сбраживание контролировали по развитию pH при 37°C.

Развитие pH при температуре сбраживания в течение 20 и 40 часов показано на Фиг. 2 и 3, соответственно, и показано, что сахароза метаболизируется недостаточными по лактозе штаммами, дающими процесс сбраживания, который является практически таким же быстрым, как и процесс, вызванный родительскими LAB, обладающими способностью метаболизировать лактозу. Обусловленный сахарозой процесс сбраживания немедленно завершается и становится плоской линией, когда сахароза истощается. После завершения сбраживания, вызванного истощением

углеводов, pH оставался стабильным при примерно pH 4,5. Очень стабильный конечный pH обнаруживали, когда CHCC17861, CHCC17862 или CHCC18944 использовали в качестве отдельных штаммов, или в виде смеси одного из ST мутантов вместе с LB мутантом (смесь показана на Фиг. 3). Это напоминает заквасочную культуру для использования в способе сбраживания для изготовления обычного йогурта.

Не смогли наблюдать значительное различие между штаммами CHCC17861 и CHCC17862. Таким образом, добавление сахарозы обеспечивает очень точный контроль подкисляющей активности.

В некоторых сбраживаниях наблюдали образование “плеча” на кривых pH смешанных культур, что указывает на то, что метаболизм смещался, прежде чем продуцирование кислоты полностью останавливалось (Фиг. 3). Для дальнейшего исследования этого соотношения ST:LB меняли, и это приводило к изменению в образовании плеча. Снижение концентрации штамма *lac*- ST и увеличение штамма *lac*- LB приводило к уменьшению плеча pH и даже более горизонтальной pH-“кривой”.

Интересным образом, применение 100% ST CHCC17861, с другой стороны, приводит к полностью прерванному продуцированию кислоты при истощении сахарозы и исключает плечо pH, но падение pH останавливается на значении pH выше на 0,3 единицы (Фиг. 3).

Во всех случаях pH оставался стабильным при 4,75 вплоть до конца периода сбраживания (48 часов).

В ST/LB совместное сбраживание части *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ответственно за конечное падение pH и также за основную часть последующего подкисления. По этой причине концентрация LB ниже, чем концентрация ST в большинстве способов сбраживания йогурта.

Это показывает, что значение pH можно полностью контролировать концентрацией добавленной сахарозы или другого углевода, поддающегося сбраживанию, так как *Lb. Bulgaricus* может быть легко увеличен.

Культура *lac*- не только приведет к большему конечному pH по прошествии, например, 6 часов, но также будет обладать значительно меньшим последующим подкислением, и таким образом, увеличенным сроком хранения.

В некоторых экспериментах наблюдали, что pH был очень стабильным в течение примерно 5 часов после завершения сбраживания, и затем несколько снижался в течение последующих 10 часов (данные не показаны). Очевидно, это происходит вследствие спонтанных ревертантов, то есть LAB, приобретающих способность использовать лактозу в результате спонтанной мутации.

Пример 3: Способы изготовления ферментированного молочного продукта с увеличенным сроком хранения

Йогурт с увеличенным сроком хранения (ESL йогурт) изготавливали путем сбраживания молока с доступной в продаже FD-DVS YFL-904 и, в отдельном сбраживании, с новой культурой F-DVS Acidifix 2.0 (содержащей *Streptococcus thermophilus* CHCC17861 и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944, описанной в Примере 2).

Таблица 1 - Рецепт ESL йогурта:

Молочная основа

Ингредиенты	Описание	Дозировка
Свежее молоко	Meiji, 2 л бутылка	97,95%
Thermex	Модифицированный крахмал, Ingredion	1,00%
LM 106-AS-YA	Пектин, CP Kelco	0,15%
Kelcogel YSS	Геллановая камедь, CP Kelco	0,03%
Сахар	Сахар-рафинад, Phoon Huat	0,87%
Культуры	FD-DVS-YF-L904	100u/mt
	F-DVS-Acidifix	100u/mt

Анализ Milkoscan: Жир: 3,70 % Белок: 3,05%

12% сахарного сиропа добавляли к белой массе после сбраживания

Следующие параметры использовали для сбраживания и обработки:

Температура смешивания: 45°C – 50°C

Время гидратации: 20 минут

Способ:

Давление гомогенизации: 150 бар плюс 30 бар (всего 180 бар)

Условия пастеризации: 95°C/4 мин

Температура охлаждения: менее чем 10°C

Сбраживание:

Температура сбраживания: 43°C для YF-L904 и 39°C для Acidifix

Конечный pH: $4,35 \pm 0,05$

Сгусток разбивают вручную, когда достигается целевой pH.

Добавляют 12% сахарного сиропа к 88% ферментированной молочной основы. Вручную перемешивают для хорошего смешивания.

Термизуют йогурт с помощью пилотной установки GEA:

Гомо давление: 0 бар

Условия термизации: 65°C/30 сек

Наполнение бутылочек (температура наполнения: 28°C – 33°C).

Активность последующего подкисления анализировали для обоих продуктов непосредственно после сбраживания, после термизации и по прошествии 6 суток хранения при различных температурах. Результаты показаны на Фиг. 4, и они демонстрируют высокую стабильность pH продукта, полученного с помощью Acidifix, в ходе обработки и хранения.

Пример 4: Способы изготовления ферментированного молочного продукта с использованием недостаточных по глюкозе LAB

Материалы и способы

Молочная основа (1,0% жира и 4,5% белка):

Ингредиенты: Смесь имеющегося в продаже молока (1,5% жира плюс 0,5% жира плюс порошок снятого молока для достижения требуемого уровня жира и белка) 9,5% масс./масс. порошок снятого молока плюс 90,5% водопроводная вода

Имеющееся в продаже молоко: Arla Harmonie minimælk (0,5% жира) и Arla Harmonie letmælk (1,5% жира)

Порошок снятого молока: Arla Foods, Gin 990214

Процедура: Смесь молока и порошка перемешивают, обрабатывают теплом 90°C, 20 мин

Лактоза:

Продукт: Лактозы моногидрат (Gin 500449, Партия 0005078607)

Изготовитель: German Lac-Sachsenmilch

Добавляли в виде 19% масс./масс. раствора к йогуртовой основе с получением правильного количества, как предписано

Рецепт: 0,6 кг лактозы моногидрата плюс 2,4 кг водопроводной воды

Способ: Нагревают при перемешивании, перед пастеризацией (95°C, 5 мин)

Заквасочные культуры:

F-DVS Sweety 1.0 состоит из смеси следующих штаммов

резистентные к 2-дезоксиглюкозе штаммы

Streptococcus thermophilus CHCC16731 (гипер-лактоза сбраживающий и выделяющий глюкозу мутант штамма CHCC11976).

Streptococcus thermophilus CHCC15757 (резистентный к 2-дезоксиглюкозе мутант штамма CHCC14944).

Streptococcus thermophilus CHCC16404 (гипер-лактоза сбраживающий и выделяющий глюкозу мутант штамма CHCC15757).

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CHCC16159 (резистентный к 2-дезоксиглюкозе мутант штамма CHCC10019).

Свойства низкого последующего подкисления гипер-лактоза-сбраживающих и выделяющих глюкозу мутантов *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Селекцию гипер-лактоза-сбраживающих и выделяющих глюкозу мутантов *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* осуществляли, как описано в WO2013/160413, озаглавленной “Применение молочнокислых бактерий для изготовления ферментированных пищевых продуктов с повышенной природной сладостью”.

Для демонстрации свойств низкого последующего подкисления культуры в стандартной схеме изготовления йогурта использовали 0,024% замороженной культуры для прямого внесения (F-DVS) смеси культур Sweety 1.0 для инокулирования 3 л молочной основы, и молоко сбраживали при 43°C.

За подкислением следили с помощью регистрирующего pH устройства CINAC (Alliance instruments) со стандартными pH электродами и программным обеспечением CINAC 4.0. Когда pH достигал 4,55 при 43°C происходило свертывание молока. Затем йогурт охлаждали и инкубировали при $7 \pm 1,5^\circ\text{C}$ в течение 42 суток. Затем изменение pH регистрировали в течение периода 42

суток (Фиг. 5). Как можно видеть из Фиг. 5, изменение pH по прошествии 42 суток хранения при $7 \pm 1,5^\circ\text{C}$ составляет менее чем 0,1 единицы pH, что подтверждает крайне низкий уровень последующего подкисления.

Эти данные показывают, что йогуртовые смеси выделяющих глюкозу штаммов и применение способов по настоящему изобретению будут свертывать молоко, поддерживать конечный pH очень стабильным в течение 43 суток при $7 \pm 1,5^\circ\text{C}$ и увеличивать сладость ферментированного продукта.

Смешанные культуры выделяющих глюкозу *Streptococcus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* метаболизируют всю или почти всю лактозу, присутствующую в молоке, в ходе сбраживания. Как следствие, LAB больше не вызывают последующего подкисления.

ПРИМЕР 5: Низкое последующее подкисление при использовании лактазы в сбраживании йогурта

Было неожиданно обнаружено, что добавление лактазы к способу получения йогурта значительно уменьшает последующее подкисление по сравнению с йогуртом, изготовленным без лактазы.

Материалы и способы

Молочная основа (0,1% жира и 4,5% белка):

Ингредиенты: Смесь имеющегося в продаже молока (0,1% жира) и порошка снятого молока для достижения уровня белка.

Имеющееся в продаже молоко: Arla skummetmælk (0,1% жира)

Порошок снятого молока: Milex 240, Arla Foods, партия 990214

Процедура: Смешивание порошка и молока, гидратация при 5°C в течение ночи, тепловая обработка $90^\circ\text{C}/20$ мин.

Лактаза:

Продукт: Ha-Lactase 5200 (Gin 450805)

Изготовитель: Chr. Hansen A/S

Заквасочные культуры:

F-DVS YF-L706, Gin 685141

F-DVS YF-L901, Gin 685142

F-DVS YoFlex®Mild 1.0, Gin 702897

F-DVS YoFlex®Creamy 1.0, Gin 706168

F-DVS YoFlex®Premium 1.0, Gin 706161

Все от Chr. Hansen A/S

Сбраживания осуществляли в масштабе 3 л. Культуры инокулировали в количестве 0,02% и образцы сбраживали при 43°C. Вместе с культурой к молочной основе добавляли лактазу в дозировке 3500 NLU/л. Подкисление контролировали посредством pH-метра 1120 (Mettler-Toledo AG, 52120653), и сбраживание останавливалось при pH 4,55. Ферментированные молочные продукты перемешивали стандартизованным способом и далее помещали под давление и охлаждали (2 бар, 25°C), после чего хранили при 6°C. Затем pH образцов отслеживали в 1, 7, 14, 21 и 48 сутки с использованием pH-метра 1120 (Mettler-Toledo AG, 52120653). Определяли концентрации лактозы, глюкозы и галактозы (мг/г) в йогурте в сутки 1 после сбраживания с использованием HPLC с колонкой Dionex CarboPac PA 20 3*150 мм (Thermo Fisher Scientific, номер продукта 060142).

Результаты показаны на Фиг. 6, где показано изменение значения pH в ходе хранения и, таким образом, последующее подкисление. Дополнительно результаты показаны в Таблице 1 ниже, в которой представлен обзор разницы значений pH, полученных в йогуртах, изготовленных с лактазой и без лактазы с различными культурами. Различие вызвано последующим подкислением и было определено с использованием F-DVS YoFlex®Mild 1.0 йогурта в качестве примера: F-DVS YoFlex®Mild 1.0 йогурт с 3500 NLU/л лактазы имел по прошествии 21 суток pH 4,44, в то время как F-DVS YoFlex®Mild 1.0 йогурт без лактазы имел pH 4,36. Сбраживание останавливалось при 4,55 для обоих йогуртов. Последующее подкисление йогурта, обработанного лактазой, составляло $4,55 - 4,44 = 0,11$, для йогурта без лактазы оно составляло $4,55 - 4,36 = 0,19$. Таким образом, разница в последующем подкислении между йогуртом, ферментированным с помощью F-DVS YoFlex®Mild 1.0 с 3500 NLU/л лактазы и без 3500 NLU/л лактазы, составляет $0,19 - 0,11 = 0,08$.

Таблица 2: Разница в последующем подкислении между йогуртами, изготовленными с культурами в таблице при 0,02%, с и без 3500 NLU/L лактазы.

Культура	Сутки 21	Сутки 48
F-DVS YF-L706	0,00	0,00
F-DVS YF-L901	0,04	0,04

F-DVS YoFlex®Creamy	0,10	0,07
F-DVS YoFlex®Premium 1.0	0,08	0,08
F-DVS YoFlex®Mild 1.0	0,08	0,11

Представленные данные показывают, что выбранные коммерческие культуры Chr. Hansen в комбинации с лактазой могут быть использованы для получения йогурта с уменьшенным последующим подкислением. Все из F-DVS YoFlex®Mild 1.0, F-DVS YoFlex®Creamy 1.0 и F-DVS YoFlex®Premium 1.0 демонстрируют низкое последующее подкисление. Уменьшение последующего подкисления менее выражено в культуре YF-L901, и не наблюдали уменьшения последующего подкисления для F-DVS YF-L706.

Таблица 3. Концентрации лактозы, глюкозы и галактозы (мг/г) в йогурте, изготовленном с 3500 NLU/л лактазы и без 3500 NLU/л лактазы, в сутки 1 после сбраживания, определенные с использованием HPLC.

Культура	Галактоза (мг/г)	Глюкоза (мг/г)	Лактоза (мг/г)
F-DVS YF-L706	9,2	0,4	42,3
F-DVS YF-L706 плюс 3500 NLU/лактазы	26,2	21,8	2,0
F-DVS YF-L901	10,6	1,6	39,4
F-DVS YF-L901 плюс 3500 NLU/лактазы	26,1	21,4	2,1
F-DVS YoFlex®Creamy 1.0	7,7	0,0	43,4
F-DVS YoFlex®Creamy 1.0 плюс 3500 NLU/лактазы	23,1	21,2	5,3
F-DVS YoFlex®Premium 1.0	7,7	0,6	41,7
F-DVS YoFlex®Premium 1.0 плюс 3500 NLU/лактазы	25,1	23,8	2,0
F-DVS YoFlex®Mild 1.0	7,7	0,6	42,2
F-DVS YoFlex®Mild 1.0 плюс 3500 NLU/лактазы	25,4	24,1	2,9

В Таблице 3 показано, что культуры, ферментируемые в присутствии лактазы, имеют очень низкую остаточную лактозу, но более высокие

концентрации остаточной глюкозы и галактозы. Таким образом, тот факт, что последующее подкисление наблюдают для штаммов, может быть объяснен высоким общим остаточным количеством углеводов, доступных для метаболизма LAB.

Степень последующего подкисления все еще является очень низкой и поэтому удивительной ввиду остаточных концентраций углеводов. Низкое последующее подкисление, по-видимому, вызвано необходимостью метаболического сдвига источника углеводов у микроорганизмов. Другими словами, культуры, демонстрирующие низкое последующее подкисление, содержат штаммы, которые борются со сдвигом с лактозы на глюкозу в качестве источника углеводов.

Депонирование и экспертное решение

Заявитель просит, чтобы образец микроорганизмов, депонированный для настоящей заявки, как описано ниже, был сделан доступным только для эксперта до даты, в которую патент будет выдан.

Streptococcus thermophilus CHCC16731 депонировали в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-04 с номером доступа DSM 28889.

Streptococcus thermophilus CHCC15914 депонировали в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28909.

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* CHCC18944 депонировали в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28910.

Streptococcus thermophilus CHCC17861 депонировали в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28952.

Streptococcus thermophilus CHCC17862 депонировали в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с номером доступа DSM 28953.

Депонирование осуществляли согласно Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Ссылки

US2010/0021586

WO2006/042862A1

WO2010/139765

WO2013/169205

WO2011/000879

Pool et al., Metabolic Engineering, vol. 8, 2006, 456-464

Формула изобретения

1. Способ изготовления ферментированного молочного продукта, включающий стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, содержащей молочнокислые бактерии, способные метаболизировать один или несколько углеводов, присутствующих в молоке,
- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации одного или нескольких углеводов в ходе сбраживания, и
- в) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий.

2. Способ изготовления ферментированного молочного продукта, включающий стадию, где молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, где:

- 1) заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,
- 2) сбраживание осуществляют при температуре от 22 до 45°C,
- 3) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации углевода в ходе сбраживания,
- 4) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий, и

где ферментированный молочный продукт отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH или поддерживается в пределах диапазона 0,1 единицы pH при хранении после завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания на стадии (2), в течение периода 20 часов.

3. Способ изготовления ферментированного молочного продукта, включающий:

- а) стадию, где молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, где:
 - 1) сбраживание инициируют с использованием молока и заквасочной культуры, где концентрация лактозы в молоке находится в диапазоне от 5 до 100 мг/г в начале сбраживания,

- 2) заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,
- 3) сбраживание осуществляют при температуре от 22 до 45°C,
- 4) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации лактозы в ходе сбраживания,
- 5) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий, и
- б) стадию, где ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C,

где ферментированный молочный продукт отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH или поддерживается в пределах диапазона 0,1 единицы pH при хранении после завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания на стадии (2), в течение периода 20 часов.

4. Способ изготовления ферментированного молочного продукта по любому из пп. 1-3, где молочнокислые бактерии способны метаболизировать лактозу и глюкозу, и где перед добавлением заквасочной культуры концентрация лактозы в молоке составляет менее 200 мг/г, например между 100 мг/г и 5 мг/г, или между 50 мг/г и 5 мг/г, или между 25 мг/г и 5 мг/г.

5. Способ изготовления ферментированного молочного продукта по любому из пп 1-3, где молочнокислые бактерии не способны метаболизировать лактозу, и где перед добавлением заквасочной культуры общая концентрация углеводов, которые могут быть метаболизированы молочнокислыми бактериями в молоке, составляет менее 45 мг/г.

6. Способ изготовления ферментированного молочного продукта по любому из пп. 1-3, где молочнокислые бактерии способны метаболизировать лактозу и галактозу, но являются недостаточными по глюкозе.

7. Способ изготовления ферментированного молочного продукта по любому из пп. 1-6, где сбраживание осуществляют в присутствии лактазы в начальной концентрации от 500 до 5000 NLU/л (единиц нейтральной лактазы/л).

8. Способ изготовления ферментированного молочного продукта по любому из пп. 1-7, где завершение сбраживания вызвано уменьшением общей

концентрации одного или нескольких углеводов, которые могут быть метаболизированы молочнокислыми бактериями, до значения менее чем 30 мг/г, включая диапазон от 25 мг/г до 0,01 мг/г, или диапазон от 5 мг/г до 0,01 мг/г.

9. Способ изготовления ферментированного молочного продукта по любому из пп. 1-8, где значение pH ферментированного продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH в течение периода 20 часов при хранении при температуре сбраживания.

10. Способ изготовления ферментированного молочного продукта по любому из пп. 1-9, где сбраживание осуществляют при температуре от 30 до 45°C.

11. Способ изготовления ферментированного молочного продукта по любому из пп. 1-10, где после завершения сбраживания ферментированный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C.

12. Способ изготовления ферментированного молочного продукта по любому из пп. 1-11, где ферментированный продукт

отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH при хранении после завершения сбраживания в течение периода 6 месяцев или

отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH при хранении после завершения сбраживания в течение периода 12 месяцев.

13. Ферментированный молочный продукт, получаемый способом по любому из пп. 1-12.

14. Ферментированный молочный продукт по п. 13, где ферментированный молочный продукт представляет собой йогурт, фруктовый йогурт, йогуртовый напиток или сыр.

15. Выделенный штамм LAB (молочнокислые бактерии), характеризующийся как:

а) штамм *Streptococcus thermophilus*, который представляет собой:

1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-

38124 Braunschweig, 2014-06-12 с учетным номером DSM 28952;

- 2) или штамм, полученный из DSM 28952, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид);

б) штамм *Streptococcus thermophilus*, который представляет собой:

- 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с учетным номером DSM 28953;
- 2) или штамм, полученный из DSM 28953, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

в) штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, который представляет собой:

- 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с учетным номером DSM 28910;
- 2) или штамм, полученный из DSM 28910, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

16. Ферментированный пищевой продукт, содержащий один или несколько из следующих штаммов:

а) штамм *Streptococcus thermophilus*, который представляет собой:

- 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с учетным номером DSM 28952;

- 2) или штамм, полученный из DSM 28952, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;
- б) штамм *Streptococcus thermophilus*, который представляет собой:
- 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с учетным номером DSM 28953;
 - 2) или штамм, полученный из DSM 28953, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;
- в) штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, который представляет собой:
- 1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с учетным номером DSM 28910;
 - 2) или штамм, полученный из DSM 28910, где полученный штамм дополнительно отличается способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

17. Способ изготовления ферментированного молочного продукта, включающий стадию, где молоко сбраживают, где:

- а) сбраживание инициируют заквасочной культурой, содержащей молочнокислые бактерии, способные метаболизировать один или несколько углеводов, присутствующих в молоке,
- б) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации одного или нескольких углеводов в ходе сбраживания,
- в) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий,

- г) по меньшей мере часть сыворотки отделяют от ферментированного молочного продукта, и

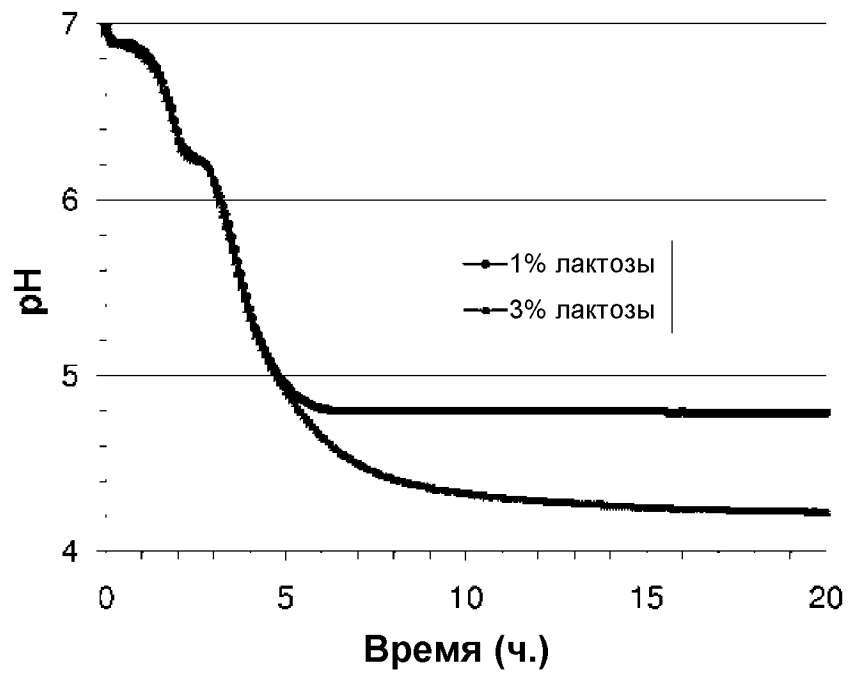
где ферментированный молочный продукт отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH или поддерживается в пределах диапазона 0,1 единицы pH при хранении, обработке или выдерживании после завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания на стадии (2), в течение периода 20 часов.

18. Способ изготовления процеженного ферментированного молочного продукта, включающий стадию, где молоко сбраживают с использованием заквасочной культуры, где:

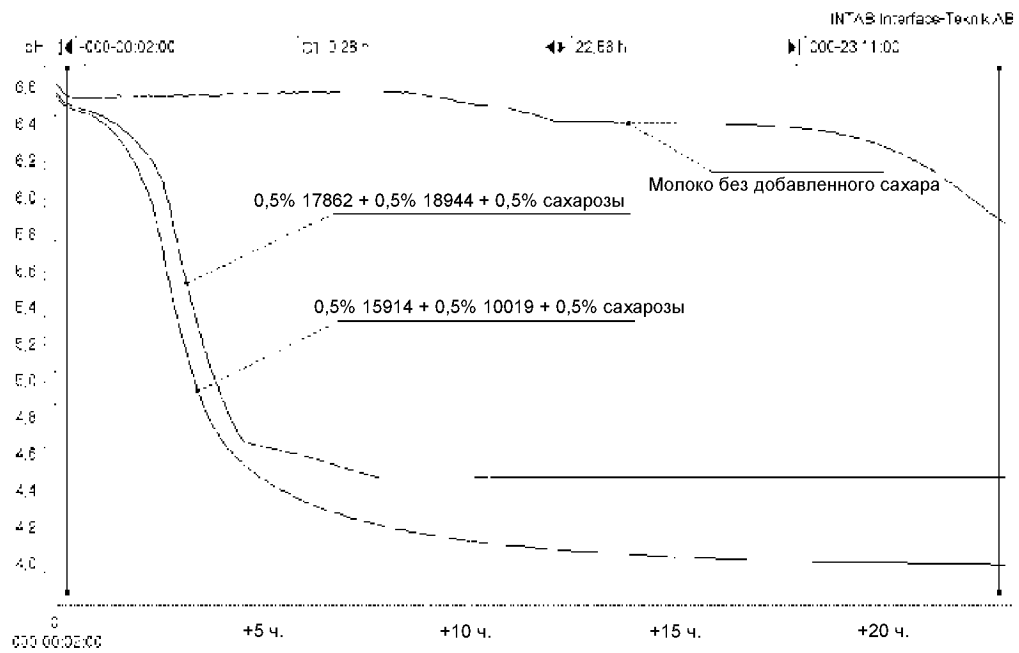
- 1) заквасочная культура содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,
- 2) сбраживание осуществляют при температуре от 22 до 45°C,
- 3) сбраживание завершается посредством уменьшения концентрации углевода в ходе сбраживания,
- 4) уменьшение по меньшей мере также вызвано метаболической активностью молочнокислых бактерий,
- 5) по меньшей мере часть сыворотки отделяют от ферментированного молочного продукта, и

где ферментированный молочный продукт перед отделением сыворотки отличается тем, что значение pH продукта поддерживается в пределах диапазона 0,3 единицы pH или поддерживается в пределах диапазона 0,1 единицы pH при хранении, обработке или выдерживании после завершения сбраживания при температуре, используемой для сбраживания на стадии (2), в течение периода 20 часов.

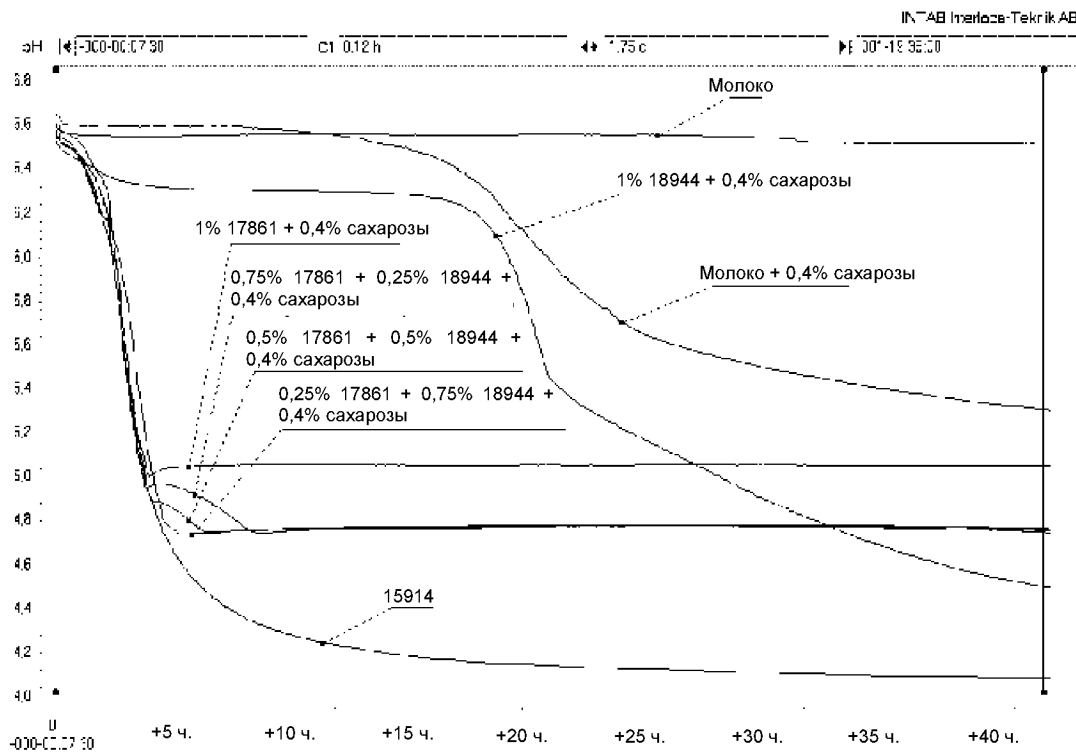
СНСС6008 – ограничение лактозы



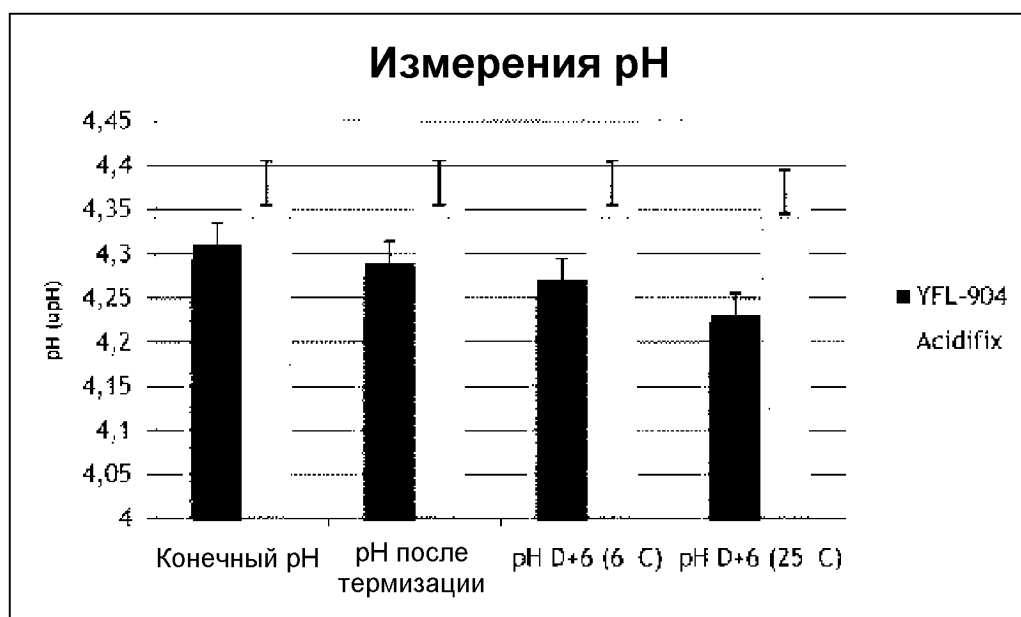
Фиг. 1



Фиг. 2

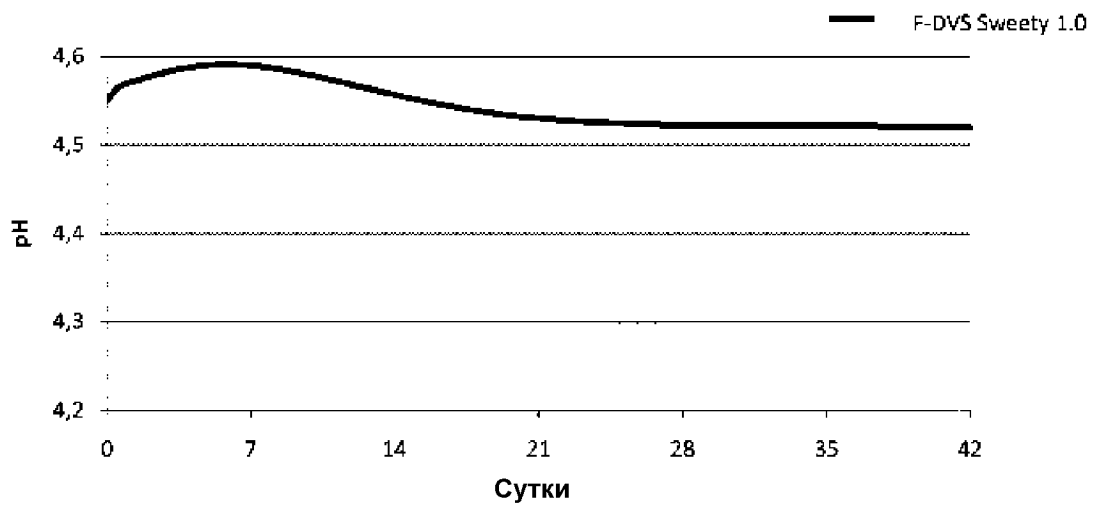


Фиг. 3

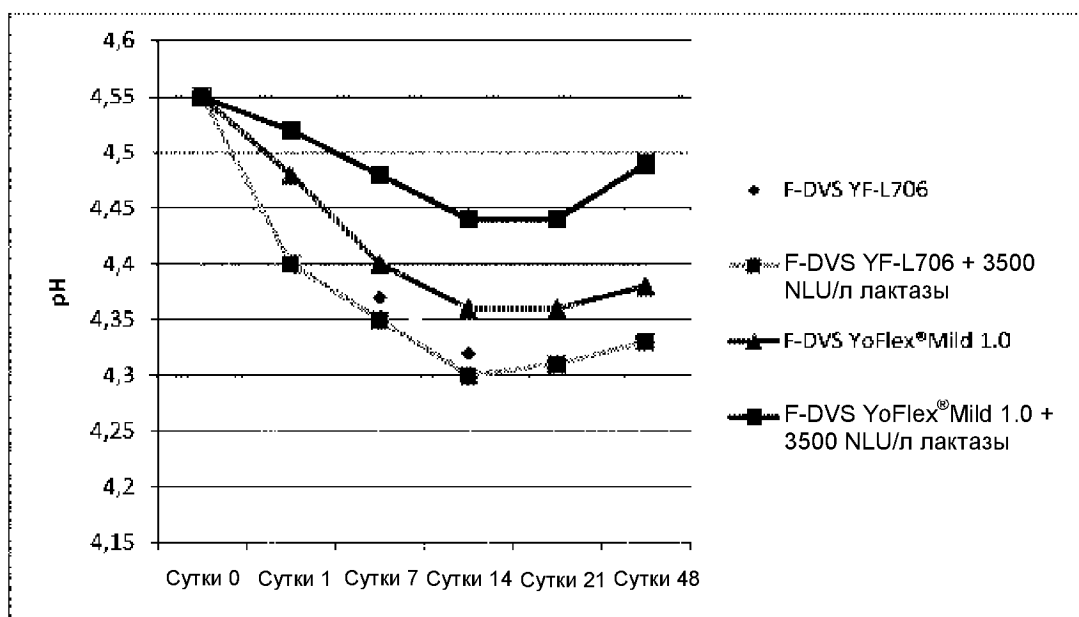


Фиг. 4

Последующее подкисление при долговременном хранении при 6°C



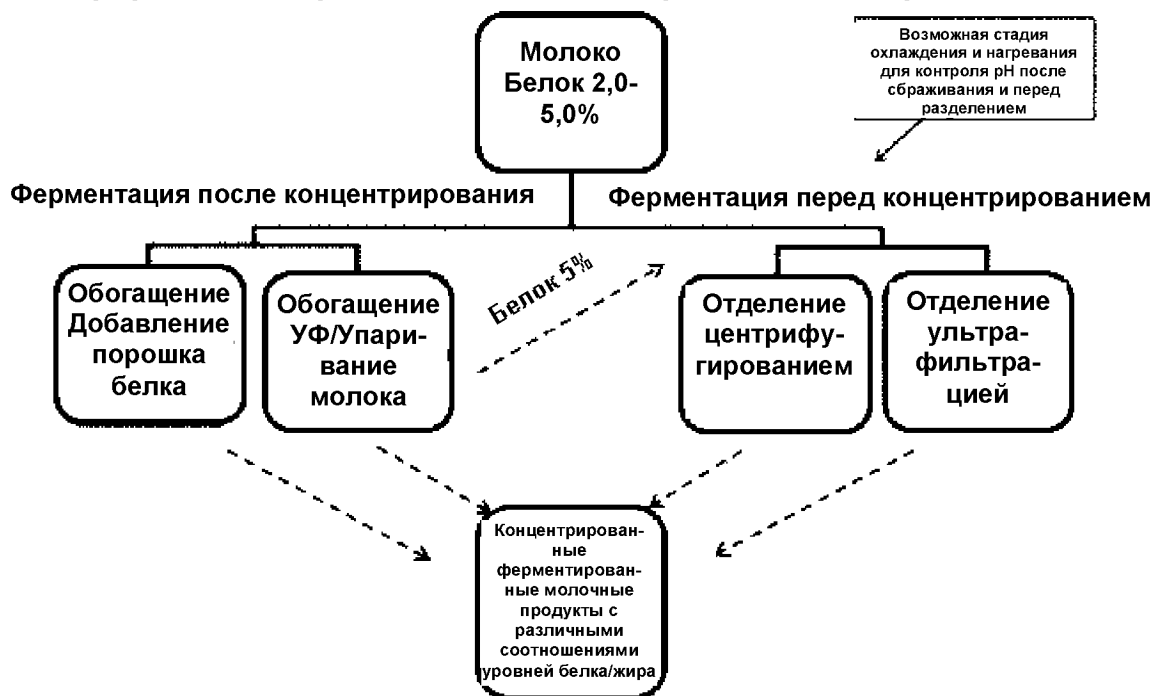
Фиг. 5



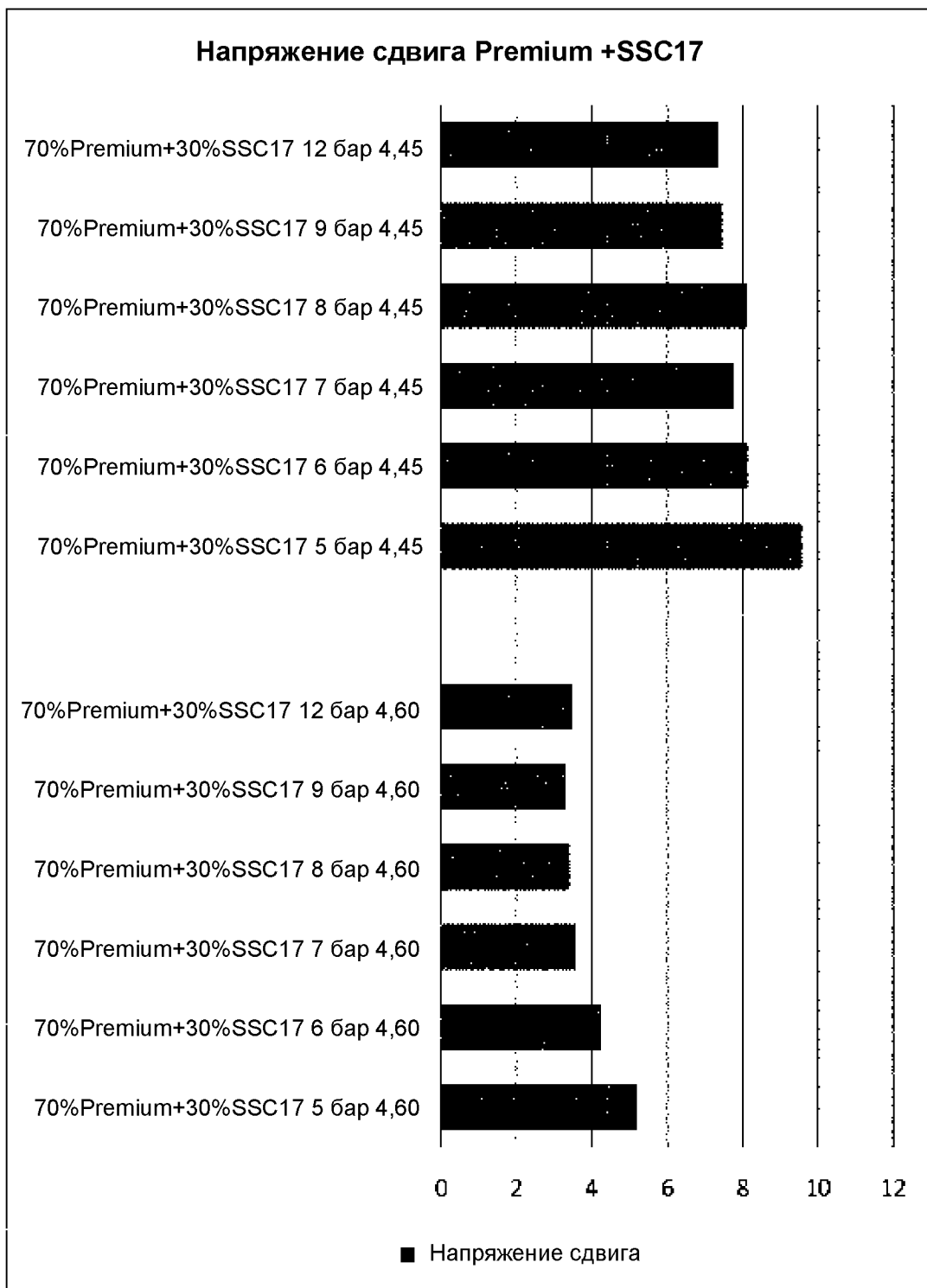
Фиг. 6

Получение ферментированного молока термофильного и мезофильного применений с высоким содержанием белка, жира и сухих веществ.

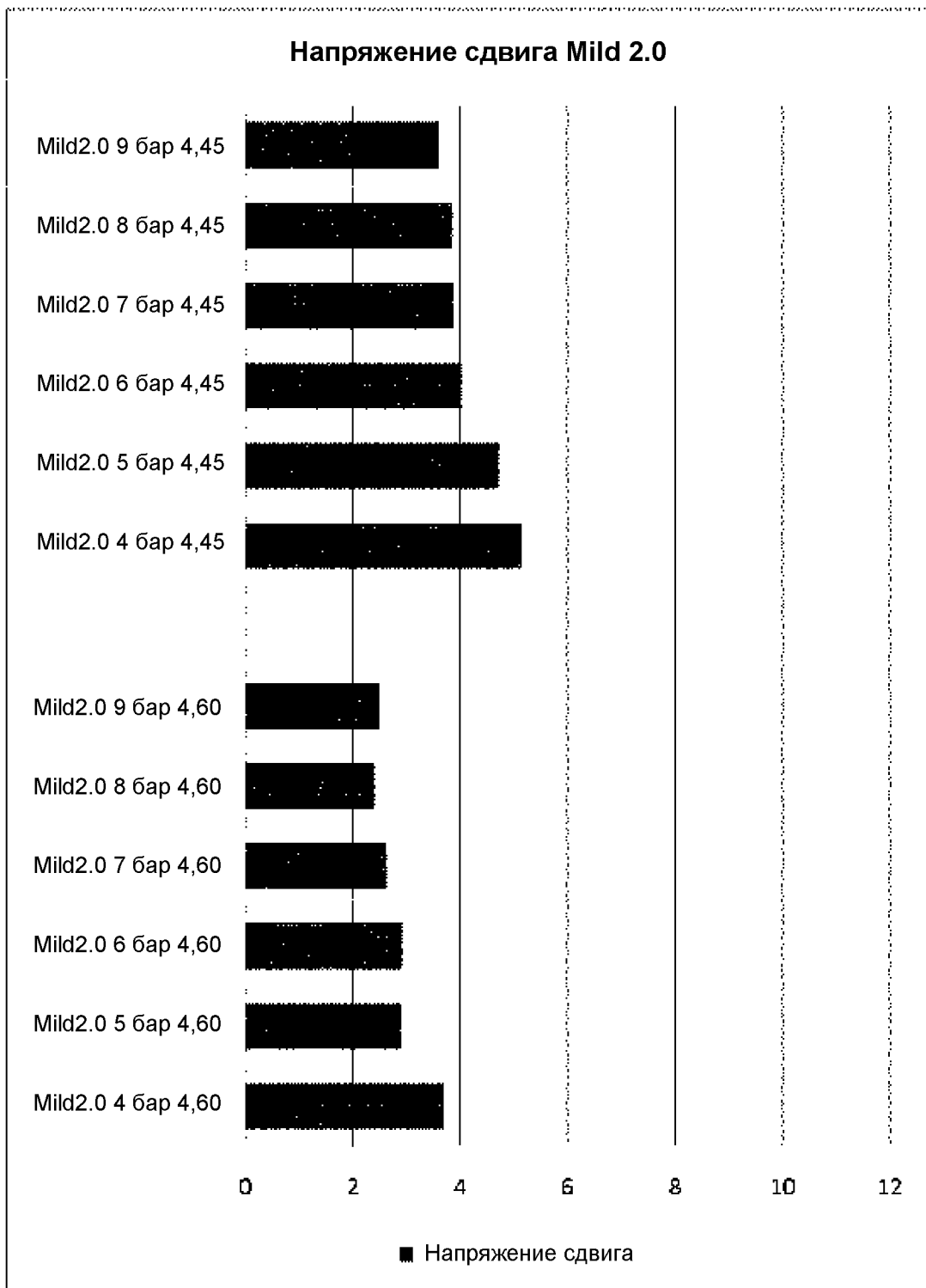
Примеры способа с концентрированием перед сбраживанием и концентрированием путем отделения сыворотки после сбраживания.



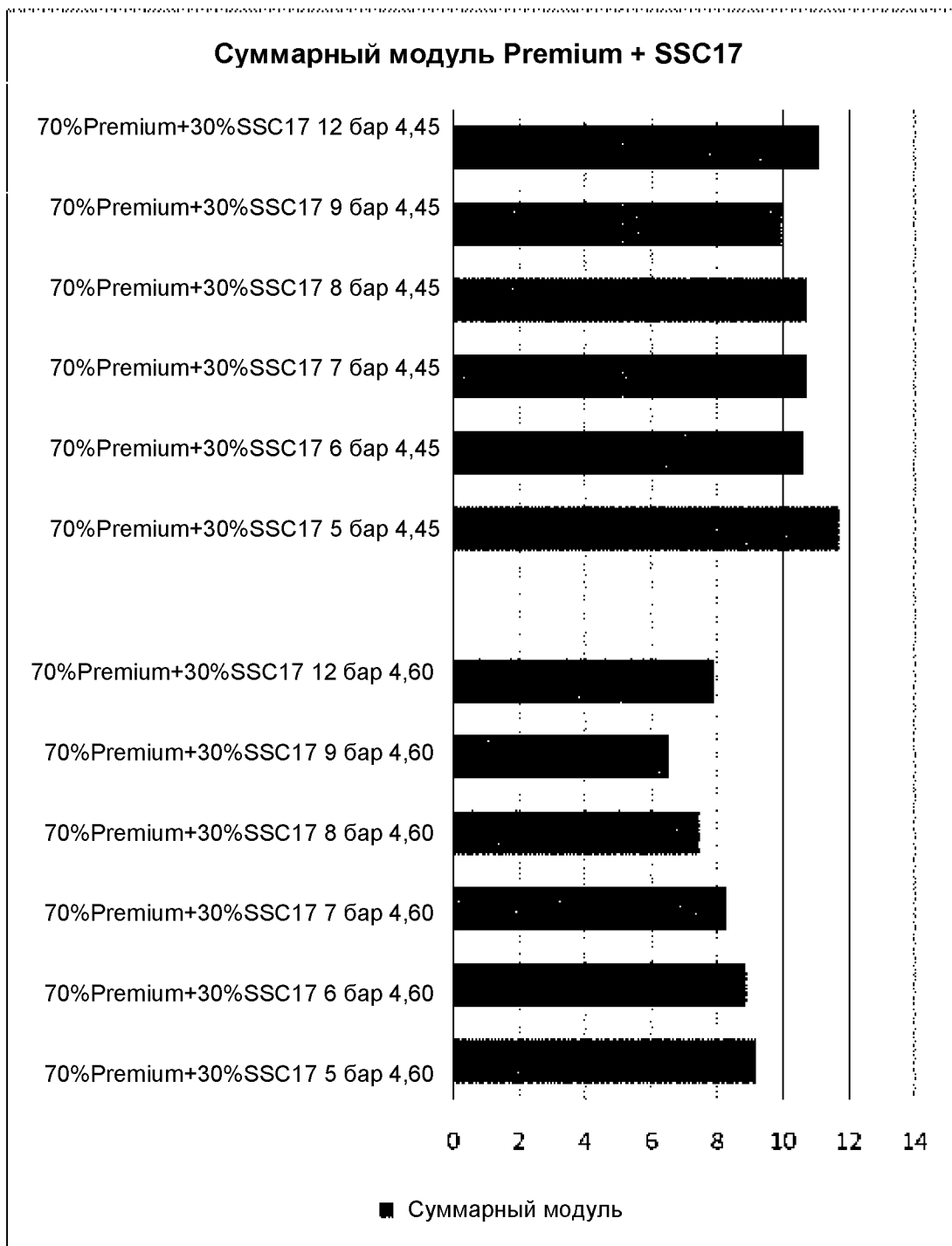
Фиг. 7



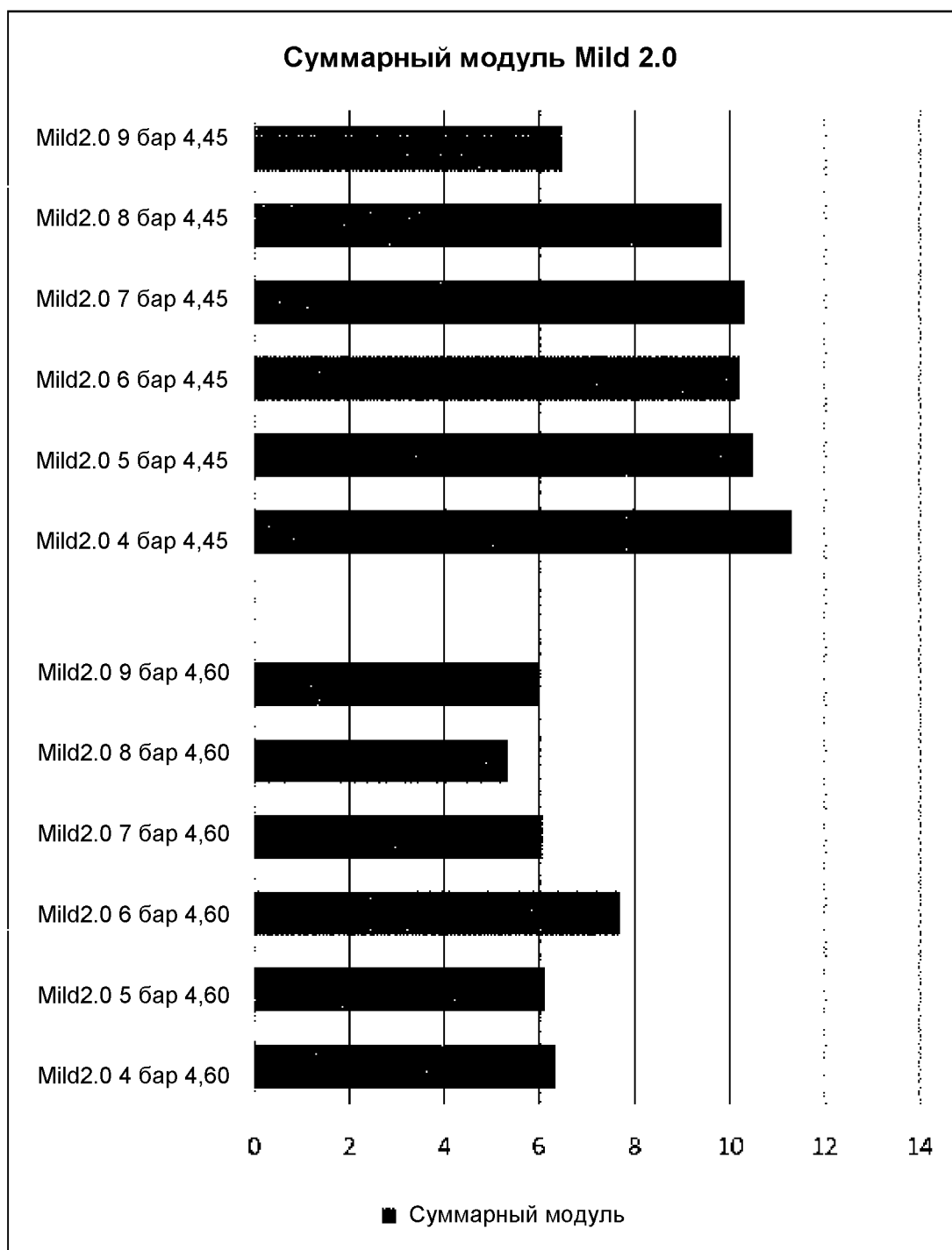
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11