



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2019.11.26**

**(21)** Номер заявки  
**201491951**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.04.25**

**(51)** Int. Cl. **C12N 1/20** (2006.01)  
**C12N 9/12** (2006.01)

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ  
ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ С ПОВЫШЕННОЙ  
ЕСТЕСТВЕННОЙ СЛАДОСТЬЮ**

**(31)** **12165517.9; 12198766.3**

**(32)** **2012.04.25; 2012.12.20**

**(33)** **EP**

**(43)** **2015.01.30**

**(86)** **PCT/EP2013/058655**

**(87)** **WO 2013/160413 2013.10.31**

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

**(72)** Изобретатель:  
**Йохансен Эрик, Серенсен Ким Иб  
(DK), Курик-Боуден Мирьяна (US),  
Юнге Метте Пиа (DK)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** POOL W.A. ET AL.: "Natural sweetening of food products by engineering *Lactococcus lactis* for glucose production", *METABOLIC ENGINEERING*, ACADEMIC PRESS, US, vol. 8, no. 5, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 456-464, XP024946964, ISSN: 1096-7176, DOI: 10.1016/J.YMBEN.2006.05.003, [retrieved on 2006-09-01], the whole document

THOMPSON J. ET AL.: "LACTOSE METABOLISM IN *STREPTOCOCCUS-LACTIS* STUDIES WITH A MUTANT LACKING GLUCOKINASE EC-2.7.1.2 AND MANNOSE-PHOSPHOTRANSFERASE ACTIVITIES", *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, vol. 162, no. 1, 1985, pages 217-223, XP002682846, ISSN: 0021-9193, the whole document  
WO-A1-2011026863

DE VIN FILIP ET AL.: "Molecular and biochemical analysis of the galactose phenotype of dairy *Streptococcus thermophilus* strains reveals four different fermentation profiles", *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 71, no. 7, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 3659-3667, XP002604686, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.71.7.3659-3667.2005, the whole document

DELORME CHRISTINE ET AL.: "Emergence of a Cell Wall Protease in the *Streptococcus thermophilus* Population", *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, vol. 76, no. 2, January 2010 (2010-01), pages 451-460, XP002682847, the whole document

DE VOS W.M. ET AL.: "Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria", *TRENDS IN BIOTECHNOLOGY*, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 22, no. 2, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 72-79, XP004486415, ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2003.11.011, the whole document

VADEBONCOEUR C. ET AL.: "Control of sugar utilization in the oral bacteria *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus sanguis* by the phosphoenolpyruvate: Glucose phosphotransferase system", *ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY*, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 28, no. 2, 1 January 1983 (1983-01-01), pages 123-131, XP026164827, ISSN: 0003-9969, DOI: 10.1016/0003-9969(83)90119-X, [retrieved on 1983-01-01], the whole document

COCHU ARMELLE ET AL.: "Genetic and biochemical characterization of the phosphoenolpyruvate:glucose/mannose phosphotransferase system of *Streptococcus thermophilus*", *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* SEP 2003, vol. 69, no. 9, September 2003 (2003-09), pages 5423-5432, XP002698280, ISSN: 0099-2240, the whole document

BOELS I.C. ET AL.: "Engineering of carbon distribution between glycolysis and sugar nucleotide biosynthesis in *Lactococcus lactis*", *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 20030201 US, vol. 69, no. 2, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 1129-1135, XP002698281, ISSN: 0099-2240, the whole document

C. CHERVAUX ET AL.: "Physiological Study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Strains in a Novel Chemically Defined Medium", *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, vol. 66, no. 12, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 5306-5311, XP55065341, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.66.12.5306-5311.2000, the whole document

GAUTHIER L. ET AL.: "Positive selection for resistance to 2-deoxyglucose gives rise, in *Streptococcus salivarius*, to seven classes of pleiotropic mutants, including ptsH and ptsI missense mutants", *MOLECULAR MICROBIOLOGY* 1994 GB, vol. 13, no. 6, 1994, pages 1101-1109, XP002698282, ISSN: 0950-382X, the whole document

HOPKINS M.J. ET AL.: "Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources", *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY* 1998 GB, vol. 85, no. 2, 1998, pages 381-386, XP002698283, ISSN: 1364-5072, the whole document

---

(57) В молочной промышленности сегодня существует потребность в разработке способа, составляющего альтернативу добавлению подсластителей в кисломолочные продукты, который позволяет достичь желательного сладкого вкуса в отсутствие добавленных калорий. Кроме того, весьма желательно разработать способ уменьшения содержания лактозы в кисломолочных продуктах до уровня, приемлемого для потребителей с непереносимостью лактозы. Вышеуказанные проблемы решают путем получения мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus* и мутантных штаммов *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, которые выделяют глюкозу в молоко, если молоко инокулируют и ферментируют такими штаммами *Streptococcus thermophilus* и штаммами *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Таким образом, изобретение относится к штаммам *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, которые выделяют глюкозу в молочный субстрат в процессе ферментации, а также к смешанным культурам, содержащим штаммы *Streptococcus thermophilus* и штаммы *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, заквасочным культурам, содержащим указанные штаммы, и к молочным продуктам, полученным с использованием указанных культур. Изобретение также относится к применению указанных штаммов для уменьшения содержания лактозы в ферментированном пищевом продукте и для усиления роста пробиотика ВВ-12®.

033795 B1

033795 B1

### Область техники изобретения

Изобретение относится к штаммам и культурам бактерий *Streptococcus thermophilus*, обладающих подслащивающей способностью, обусловленной выделением высоких уровней глюкозы, образовавшихся в результате деградации лактозы, штаммам бактерий *Lactobacillus delbrueckii*, подвида *bulgaricus*, обладающих подслащивающей способностью, обусловленной выделением высоких уровней глюкозы, образовавшихся в результате деградации лактозы, заквасочным культурам, содержащим такие штаммы, а также к кисломолочным продуктам, полученным с использованием указанных культур. Изобретение также относится к способу получения указанных штаммов и к применению таких штаммов для получения кисломолочных продуктов, а также для повышения сладости кисломолочных продуктов при снижении в них содержания лактозы.

### Уровень техники изобретения

Чистые кисломолочные продукты имеют терпкий или кислый вкус в результате превращения лактозы в молочную кислоту под действием молочнокислых бактерий в процессе ферментации. Поэтому их часто подслащивают путем добавления фруктов, меда, сахара или искусственных подсластителей, чтобы удовлетворить потребность клиентов в продукте с более сладким вкусом.

Пищевая промышленность характеризуется повышенным спросом на низкокалорийные продукты питания со сладким вкусом, способствующие преодолению проблем, связанным с избыточным весом и ожирением, которые стали весьма распространенными в последние 20 лет. Сладость, обычно рассматриваемая как приятное ощущение, генерируется сахарами и некоторыми другими веществами.

Восприятие разных сахаров сильно различается.

Если сладость сахарозы принять за 100 единиц, сладость лактозы составит 16, галактозы 32 и глюкозы 74 (Godshall (1988). *Food Technology* 42 (11): 71-78). Таким образом, глюкоза, воспринимается более чем в 4 раза слаще лактозы, но при этом дает примерно такой же уровень калорий.

Сахар в ферментированных пищевых продуктах чаще заменяют подсластителями, такими как аспартам, ацесульфам К, сукралоза и сахарин, которые могут обеспечивать сладость при более низком потреблении калорий. Однако тот факт, что применение искусственных подсластителей может привести к появлению привкуса, а также результаты некоторых исследований, свидетельствующие о том, что потребление искусственных подсластителей связано с такими недостатками, как увеличение чувства голода, развитие аллергии, рака и т.д., приводят к тому, что потребители предпочитают кисломолочные продукты, которые содержат только натуральные подсластители, или, предпочтительно, не содержат добавленных подсластителей.

Таким образом, особой задачей является разработка кисломолочных продуктов с высокой естественной (внутренней) сладостью.

Кислотность кисломолочных продуктов зависит в значительной степени от присутствующих молочнокислых бактерий и параметров процесса, используемых для получения кисломолочного продукта.

Ферментация дисахарида лактозы в молочнокислых бактериях очень хорошо изучена, поскольку он является основным источником углерода в молоке. У многих видов лактоза после поглощения расщепляется под действием  $\beta$ -галактозидазы на глюкозу и галактозу. Глюкоза фосфорилируется глюкокиназой с получением глюкозо-6-фосфата и ферментируется посредством пути Эмбдена-Мейергофа-Парнеса (гликолиза) большинством молочнокислых бактерий (фиг. 1).

*Streptococcus thermophilus* является одной из молочнокислых бактерий, наиболее широко используемых для коммерческой термофильной ферментации молока, где указанный организм обычно используют как часть смешанной закваски, где в качестве другого компонента используют *Lactobacillus sp.*, например *Lactobacillus delbrueckii*, подвида *bulgaricus*, для получения йогурта, или *Lactobacillus helveticus* для получения сыра типа швейцарского.

Юридическое определение йогурта во многих странах требует применения *Streptococcus thermophilus* наряду с *Lactobacillus delbrueckii*, подвида *bulgaricus*. Оба вида генерируют желательные количества ацетальдегида, важного компонента аромата йогурта.

Лактоза и сахароза легче ферментируются *Streptococcus thermophilus*, чем составляющие их моносахариды. При использовании *Streptococcus thermophilus* в присутствии избытка галактозы ферментируется только глюкозный фрагмент молекулы лактозы, а галактоза накапливается в кисломолочных продуктах. В йогурте, где высокая концентрация кислоты ограничивает брожение, остается свободная галактоза, хотя свободная галактоза, продуцируемая на ранних стадиях производства швейцарского сыра, впоследствии ферментируется *Lactobacillus helveticus*.

Однако некоторыми исследователями описаны штаммы *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, которые ферментируют галактозу (Hutkins et al. (1986) *J. Dairy Sci.*, 69(1): 1-8; Vaillancourt et al. (2002), *J. Bacteriol.* 184 (3): 785-793), а в WO 2011/026863 (Chr. Hansen) описан способ получения штаммов *Streptococcus thermophilus*, способных сбраживать галактозу.

Чтобы удовлетворить требования пищевой промышленности, нужны новые штаммы, в частности штаммы *Streptococcus thermophilus* и штаммы *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, которые обеспечивают повышенную естественную сладость при отсутствии лишних калорий непосредственно в ферментированных продуктах (внутренняя сладость) путем экскреции глюкозы.

Pool et al. (2006. *Metabolic Engineering* 8(5); 456-464) раскрывают штамм *Lactococcus lactis*, в котором метаболизм глюкозы полностью разрушен в результате делеции генов, кодирующих глюкокиназу, ЕП(man/glc) и недавно обнаруженного глюкоза-PTS ЕП(cel). Способ конструирования представляет собой генетическую рекомбинацию с целью генерирования всех мутаций и, следовательно, полученный штамм представляет собой генетически модифицированный организм (ГМО), который в настоящее время не может использоваться в пищевых продуктах.

Thompson et al. (1985. *J. Bacteriol.* 162 (1); 217-223) исследуют метаболизм лактозы в *Streptococcus lactis* (в настоящее время переименован в *Lactococcus lactis*). В этой работе 2-дезоксиглюкозу используют для получения мутанта в системе манноза-PTS. Затем данный мутант подвергают мутации с использованием УФ-мутагена с последующим скринингом на отрицательные по глюкозе колонии методом реплик. С помощью указанного способа выделяют двойной мутант (по манноза-PTS и глюкокиназе). Полученный двойной мутант используют для изучения механизмов, участвующих в регуляции ферментации лактозы под действием "заквасочных" организмов. Эти мутанты имеют несколько недостатков по сравнению с родительским штаммом, которые делают их непригодными для включения в коммерческую заквасочную культуру. Выход клеток мутантов составляет половину от выхода клеток родительского штамма на моль ферментированной лактозы, а время удвоения у мутантов значительно увеличивается при выращивании на лактозе. Подобным образом, выход молочной кислоты составляет половину от выхода молочной кислоты у родительского штамма на моль ферментированной лактозы. Поведение указанных штаммов в молоке не анализируют, но ожидается, что скорость подкисления может значительно уменьшаться.

Кроме того, *Lactococcus lactis* обычно не выбирают для получения ацетальдегида и он не участвует в удовлетворении требований к юридическому определению йогурта.

Chervaux et al. (2000. *Appl. And Environ. Microbiol.*, 66, 5306-5311), исследуют физиологию штаммов *Lactobacillus Delbrueckii subsp. bulgaricus* в новой химически определенной среде и выделенных 2-дезоксиглюкоза-устойчивых мутантов, дефицитных по ферментации глюкозы. Наблюдают несколько разных фенотипов и описывают штамм-специфические эффекты.

Ни один из вышеупомянутых подходов не решает проблему получения штаммов *Streptococcus thermophilus* и штаммов *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* с улучшенной способностью обеспечить природную сладость пищевых продуктов, которые получают путем ферментации такими штаммами в отдельности, или вместе с другими штаммами молочнокислых бактерий.

Кроме того, ни один из вышеуказанных подходов не решает проблему снижения содержания лактозы в пищевых продуктах, которые получают путем ферментации такими штаммами, до уровня, приемлемого для лиц с непереносимостью лактозы.

### Сущность изобретения

В отличие от описанного выше предшествующего уровня техники авторы настоящего изобретения обнаружили, что штаммы *Streptococcus thermophilus*, содержащие мутацию в гене глюкокиназы (glcK), можно выбирать путем подвергания галактоза-ферментирующих штаммов *Streptococcus thermophilus* воздействию 2-дезоксиглюкозы и что указанные клетки расщепляют лактозу и галактозу и выделяют глюкозу в окружающую среду при выращивании на молочном субстрате.

Неожиданно было обнаружено, что указанные штаммы *Streptococcus thermophilus* сами по себе еще вполне способны подкислять молоко, хотя время подкисления до pH 5 увеличивается на 2-5 ч. Следовательно, их можно использовать как таковые для сбраживания молока.

Однако глюкоза используется как источник углерода многими молочнокислыми бактериями и выделяемая глюкоза может потребляться другими микроорганизмами, присутствующими в кисломолочном продукте.

Для преодоления данной проблемы настоящее изобретение предлагает 2-дезоксиглюкоза-устойчивые мутанты *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, которые либо утрачивают способность расти на глюкозе в качестве источника углерода, либо обладают пониженной способностью к росту в таких условиях. Мутантные штаммы *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* не только не потребляют глюкозу, секретлируемую в молоко другими микроорганизмами, которые могут присутствовать, но и выделяют большое количество глюкозы в окружающую среду и, что удивительно, все еще обладают способностью подкислять молоко, хотя время подкисления до pH 5 задерживается на 2-5 ч. Следовательно, их можно использовать как таковые для сбраживания молока.

Такие бактерии пищевых категорий можно использовать для обогащения кисломолочных продуктов глюкозой. Глюкоза создает более сильное ощущение сладости, чем лактоза и галактоза, и как таковая экскреция глюкозы в молочный субстрат приводит к повышению ощущения сладости (внутренней) в кисломолочном продукте.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что, если молочный субстрат сбраживают штаммом *Streptococcus thermophilus* и штаммом *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* в соответствии с данным изобретением, уровень лактозы в молоке значительно уменьшается.

Непереносимость лактозы представляет собой состояние, характеризующееся отсутствием способности расщеплять лактозу. Большинство субъектов с непереносимостью лактозы может переносить не-

которое количество лактозы в рационе, причем тяжесть симптомов (включающих в себя тошноту, спазмы, вздутие живота, диарею и метеоризм) увеличивается с ростом количества потребляемой лактозы.

Таким образом, возможность получения продуктов питания, которые либо не содержат лактозу, либо содержат пониженное количество лактозы, имеет большое значение в данной отрасли промышленности.

Общие предельные значения до сих пор не были установлены ЕУ для содержания лактозы в продуктах питания с низким содержанием лактозы и в продуктах питания, не содержащих лактозы, однако Управление по контролю качества продуктов питания Финляндии Evira устанавливает Северные предельные значения содержания лактозы, составляющие менее 10 мг/100 г или 100 мл для пищевых продуктов, не содержащих лактозу, и менее 1 г/100 г или 100 мл для пищевых продуктов с низким содержанием лактозы.

Молочная промышленность сегодня сталкивается с проблемой обеспечения альтернативы добавлению подсластителей в кисломолочные продукты, чтобы достичь желательного сладкого вкуса без дополнительных калорий. Кроме того, желательно разработать способ уменьшения содержания лактозы в кисломолочных продуктах до уровня, приемлемого для потребителей с непереносимостью лактозы.

Вышеуказанные проблемы решаются путем получения мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus* и мутантных штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, которые выделяют глюкозу в молоко, если 9,5% В-молоко инокулируют  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* настоящего изобретения или  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* настоящего изобретения, и ферментируют штаммами *Streptococcus thermophilus* или штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* настоящего изобретения при 40°C в течение по меньшей мере 20 ч. Предпочтительно такие мутантные штаммы сами по себе выделяют по меньшей мере 5 мг/мл глюкозы в В-молоко, если 9,5% В-молоко инокулируют  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* настоящего изобретения или  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* настоящего изобретения, и ферментируют штаммами *Streptococcus thermophilus* или штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* настоящего изобретения при 40°C в течение по меньшей мере 20 ч. Штаммы сохраняют способность подкислять молоко, хотя время подкисления до pH 5 увеличивается на 2-5 ч. Конечный кисломолочный продукт содержит менее 15 мг/мл лактозы в ферментированном молоке. Следовательно, в конечном кисломолочном продукте показатель внутренней сладости повышается примерно в 2 раза или больше.

Чтобы получить штаммы *Streptococcus thermophilus*, авторы настоящего изобретения разработали способ выделения 2-дезоксиглюкоза-устойчивых мутантных штаммов из исходного галактоза-ферментирующего штамма *Streptococcus thermophilus*, предпочтительно с мутацией в опероне галактозы, которая повышает экспрессию ранее экспрессирующегося на низком уровне или не экспрессирующегося оперона, где фенотип устойчивости к 2-дезоксиглюкозе обусловлен мутацией в гене глюкокиназы (*glcK*), которая частично или полностью инактивирует кодируемый белок. Способ включает в себя подвергание исходного штамма воздействию 2-дезоксиглюкозы и выбор мутантных штаммов, способных расти в присутствии 2-дезоксиглюкозы на чашках с агаром, содержащих среду M17+2% галактозы, например, как описано в примере 1 настоящего документа. Указанные мутанты подвергают скринингу и выбирают штаммы, у которых скорость роста в среде M17+2% галактозы выше, чем в среде M17+2% глюкозы.

Неожиданно было обнаружено, что мутантные штаммы *Streptococcus thermophilus* с мутацией в гене глюкокиназы (*glcK*), но с очевидно нормальной функционирующей системой транспортеров глюкозы, секретируют глюкозу. Указанные мутанты называют CHCC15757 и CHCC15887.

Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что штаммы *Streptococcus thermophilus* с еще более высокой способностью к ферментации лактозы и экскреции глюкозы можно выбрать, подвергая штаммы *Streptococcus thermophilus* с мутацией в гене глюкокиназы воздействию 2-дезоксиглюкозы, с последующим отбором штаммов, которые не способны расти в 9,5% В-молоке за исключением случаев, когда к В-молоку добавляют сахарозу в концентрации, составляющей лишь 0,01%.

Один из таких мутантов с повышенной ферментацией лактозы и секрецией глюкозы обозначают CHCC16404.

Обнаружено, что CHCC16404 содержит мутацию в гене транспортера глюкозы (MARIM), приводящую к инактивации белка транспортера глюкозы, ответственного за транспорт глюкозы в клетку.

Чтобы получить штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, авторы настоящего изобретения разработали способ выделения 2-дезоксиглюкоза-устойчивых штаммов, полученных в результате мутации исходного штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, у которых способность расти на глюкозе как на источнике углерода либо отсутствует, либо снижена. Способ включает в себя подвергание исходного штамма воздействию 2-дезоксиглюкозы и выбор мутантных штаммов, способных расти в присутствии 2-дезоксиглюкозы на чашках с агаром, содержащих среду MRS-IM с добавлением 2% лактозы, например, как описано в данном документе в примере 5. Указанные мутанты подвергают скринингу и выбирают штаммы, у которых способность к росту на MRS-IM, содержащей 2% глюкозы, либо полностью утрачена, либо снижена по сравнению с исходным штаммом, который может расти в присутствии глюкозы.

В соответствии с указанным неожиданным открытием настоящее изобретение относится к новым штаммам молочнокислых бактерий, в частности к штаммам *Streptococcus thermophilus*, несущих мута-

цию в гене *glcK*, или мутантам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, которые выделяют глюкозу в ферментированный продукт, обеспечивая естественную сладость без дополнительных калорий, к способу получения таких штаммов, к кисломолочным продуктам, полученным с использованием таких штаммов, и к применению таких штаммов для получения кисломолочных продуктов с повышенной сладостью и пониженным уровнем лактозы.

Кроме того, неожиданно было обнаружено, что штаммы *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* настоящего изобретения усиливают рост штамма BB-12® *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, пробиотической бактерии, которая сама по себе плохо растет в молоке.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приведено схематическое изображение катаболизма лактозы в *Streptococcus thermophilus*. *GlcK*, глюкокиназа; *LacS*, транспортер лактозы; *LacZ*,  $\beta$ -галактозидаза; *GalM*, мутаротаза; *GalK*, галактокиназа; *GalT*, галактозо-1-фосфат уридилтрансфераза; *GalE*, UDP-глюкозо-4 эпимераза; *GalIP*, галактозо-1-фосфат;

на фиг. 2 изображена ДНК-последовательность (SEQ ID NO. 1) гена глюкокиназы (*glcK*) *Streptococcus thermophilus*, а также кодируемая ею аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 2). Соответственно, указаны замены отдельных нуклеотидов в CHCC15757 и CHCC15887;

на фиг. 3 - оперон *man*, кодирующий фосфотрансферазную систему (PTS) глюкозы/маннозы в *Streptococcus thermophilus*. Обнаружено, что мутантный штамм CHCC16404, характеризующийся повышенной ферментацией лактозы и секрецией глюкозы по сравнению с исходным штаммом CHCC15757, содержит мутацию в гене *manM*, кодирующем белок ПС<sup>Man</sup> PTS глюкозы/маннозы. В результате замены G на T кодон GAA, кодирующий глутаминовую кислоту в положении 209, заменяется на стоп-кодон TAA (\*), останавливающий трансляцию в CHCC16404 и инактивирующий функцию белка;

на фиг. 4 - ДНК-последовательность (SEQ ID NO. 5) гена *manM* из штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, а также кодируемая ею аминокислотная последовательность (SEQ ID NO. 6). Указана единственная нуклеотидная замена в CHCC16404.

#### Подробное описание изобретения

В данном описании термин "молочнокислая бактерия" обозначает грамположительную микроаэрофильную или анаэробную бактерию, которая ферментирует сахара с образованием кислот, включающих в себя молочную кислоту как преимущественно продуцируемую кислоту, уксусную кислоту и пропионовую кислоту. В промышленности наиболее широко используются молочнокислые бактерии, относящиеся к отряду "Lactobacillales", который включает в себя *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. и *Propionibacterium* spp. Молочнокислые бактерии, в том числе бактерии видов *Lactobacillus* sp. и *Streptococcus thermophilus*, обычно поставляются в молочную промышленность в виде замороженных или лиофилизированных культур для размножения производственной закваски, или как так называемых культур "прямого внесения" (DVS), предназначенных для прямого внесения в ферментационный сосуд или чан для получения молочного продукта, такого как кисломолочный продукт. Такие культуры в целом называют "заквасочные культуры" или "закваски".

Если не указано иначе, или если это явно не противоречит контексту, термины, используемые в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения) в единственном числе, следует истолковывать как охватывающие и единственное, и множественное число. Если не указано иначе, термины "содержащий", "имеющий", "включающий в себя" и "состоящий из" следует истолковывать как неограничивающие термины (т.е. как имеющие значение "включающий в себя, без ограничения"). Если не указано иначе, диапазоны значений в данном описании приводятся только для краткости упоминания всех отдельных значений, находящихся в пределах диапазона, причем каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно указано в настоящем документе. Если не указано иначе, или если это явно не противоречит контексту, все описанные здесь способы можно осуществлять в любом подходящем порядке. Использование каждого и всех примеров или иллюстративных выражений (например, "такой как") в настоящем изобретении предназначено только для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничений на объем изобретения, если не заявлено иное. Ни одно выражение в описании не должно быть истолковано как указание на какой-либо незаявленный элемент как необходимый для практического осуществления изобретения.

В некоторых странах юридическое определение йогурта требует присутствия как *Streptococcus thermophilus*, так и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Оба вида генерируют желательные количества ацетальдегида, важного ароматизирующего компонента йогурта.

Путем ферментации с использованием как *Streptococcus thermophilus*, так и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (Hoier et al. (2010) in *The Technology of Cheesemaking*, 2<sup>nd</sup> Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192), также можно получить сыр, такой как моцарелла и сыр для пиццы, а также фета.

Для удовлетворения требований пищевой промышленности желательно разработать новые штаммы, в частности штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и штаммы *Streptococcus thermophilus*, которые продуцируют больше естественной сладости непосредственно в ферментированных продуктах

(внутренняя сладость) в отсутствии добавленных калорий.

*Streptococcus thermophilus* представляет собой одну из наиболее широко используемых молочнокислых бактерий для коммерческой ферментации молока, причем данный организм обычно используют как часть смешанной закваски, где другим компонентом является *Lactobacillus* sp., например, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в случае получения йогурта и *Lactobacillus helveticus* в случае получения сыра швейцарского типа.

Лактоза и сахароза легче ферментируются *Streptococcus thermophilus*, чем составляющие их моносахариды. При использовании *Streptococcus thermophilus* только часть глюкозы из молекулы лактозы сбраживается под действием этих бактерий, а галактоза накапливается в кисломолочных продуктах. В йогурте, где высокая концентрация кислоты ограничивает ферментацию, свободная галактоза остается, тогда как свободная галактоза, продуцируемая на ранних стадиях производства швейцарского сыра, впоследствии ферментируется *Lactobacillus helveticus*.

*Lactococcus lactis*, присутствующая во многих заквасочных культурах, используемых для производства сыра, также способна потреблять галактозу, продуцируемую *Streptococcus thermophilus*.

Чтобы достичь наиболее оптимальных показателей роста штаммов *Streptococcus thermophilus*, авторы настоящего изобретения подвергают галактозо-ферментирующие штаммы *Streptococcus thermophilus* воздействию средства селекции 2-дезоксиглюкозы. Как правило, 2-дезоксиглюкоза-устойчивые мутанты содержат мутации в гене, кодирующем глюкокиназу, и в генах, кодирующих транспорт глюкозы. Выделенные мутанты, СНСС15757, СНСС15887 и СНСС16404, устойчивы к 2-дезоксиглюкозе, содержат мутации в гене глюкокиназы (*glcK*). Авторы настоящего изобретения обнаружили, что помимо мутации в гене глюкокиназы, СНСС16404 содержит мутацию стоп-кодона в гене транспортера глюкозы/маннозы, которая могла бы объяснить, почему экспортированная глюкоза не транспортируется обратно в клетки.

Неожиданно было обнаружено, что такие мутанты сами по себе полностью сохраняют способность подкислять молоко, хотя время подкисления до pH 5 увеличивается на 2-5 ч. Следовательно, их можно использовать для сбраживания молока и они сохраняют способность исходных штаммов к свертыванию молока, характерному для йогурта. Кроме того, обнаружено, что мутанты выделяют более 5 мг/мл глюкозы после инокуляции в 9,5% В-молоко  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл штаммов *Streptococcus thermophilus* СНСС15757 или СНСС15887 и ферментации при 40°C в течение по меньшей мере 20 ч без необходимости выделения мутантов по транспорту глюкозы, или после инокуляции в 9,5% В-молоко, содержащее 0,05% сахарозы,  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* штамма СНСС16404 и ферментации при 40°C в течение по меньшей мере 20 ч. При этом в ферментированном молоке остается лишь около 10 мг/мл лактозы и менее 1,5 мг/мл лактозы (предел обнаружения), соответственно. Таким образом, применение таких штаммов для производства кисломолочных продуктов может иметь большое значение для людей с непереносимостью лактозы.

Следовательно, конечный кисломолочный имеет более высокий показатель внутренней сладости, составляющий по меньшей мере 2,0, в соответствии со способом расчета Godshall (1988. Food Technology 42(11): 71-78).

Таким образом, первый аспект настоящего изобретения относится к галактозо-ферментирующему мутантному штамму *Streptococcus thermophilus*, который несет мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующей белок глюкокиназы, где мутация инактивирует кодируемый белок глюкокиназы или оказывает негативное влияние на экспрессию гена. Способы измерения уровня активности глюкокиназы или уровня экспрессии гена глюкокиназы хорошо известны (Porter et al. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 709: 178-186) и включают в себя ферментные анализы, которые можно проводить с использованием коммерчески доступных наборов, а также транскриптомику или количественную ПЦР с использованием легко доступных материалов.

Используемый здесь термин "бактериальный штамм" относится к бактерии, которая остается генетически неизменной при выращивании или размножении. Совокупность идентичных бактерий входит в объем данного термина.

Используемый здесь термин "галактозо-ферментирующие штаммы *Streptococcus thermophilus*" относится к штаммам *Streptococcus thermophilus*, которые способны расти на/в среде M17+2% галактозы. Галактозо-ферментирующие штаммы *Streptococcus thermophilus* определяют здесь как штаммы *Streptococcus thermophilus*, которые понижают pH бульона M17, содержащего 2% галактозы в качестве единственного углевода, до 5,5 или ниже, после инокуляции ночной культуры в количестве 1% и инкубации в течение 24 ч при 37°C.

Галактозо-ферментирующие штаммы можно получить по способу, описанному в WO 2011/026863.

Термин "мутация, инактивирующая белок глюкокиназы" в изобретении относится к мутации, которая приводит к "инактивации белка глюкокиназы", т.е. к образованию белка глюкокиназы, который в случае его присутствия в клетке не способен нормально функционировать, а также к мутациям, которые препятствуют образованию белка глюкокиназы, или приводят к деградации белка глюкокиназы.

В частности, инактивированный белок глюкокиназы представляет собой белок, который в отличие от функционального белка глюкокиназы не способен обеспечивать фосфорилирование глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата, или обеспечивает фосфорилирование глюкозы с образованием глюкозо-6-

фосфата с гораздо более низкой скоростью. Ген, кодирующий такой инактивированный белок глюкокиназы, в отличие от гена, кодирующего функциональный белок глюкокиназы, содержит мутацию в открытой рамке считывания (ORF), причем указанная мутация может включать в себя, без ограничения, делецию, мутацию, обуславливающую сдвиг рамки считывания, введение стоп-кодона или мутацию, обуславливающую аминокислотную замену, которая приводит к изменению функциональных свойств белка, или мутацию промотора, которая уменьшает или прекращает транскрипцию или трансляцию гена.

В предпочтительных вариантах осуществления мутация снижает активность (скорость фосфорилирования глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата) белка глюкокиназы по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 90%.

Активность глюкокиназы можно определить с помощью ферментативных анализов глюкокиназы, как описано в Pool et al. (2006, *Metabolic Engineering* 8: 456-464).

Используемый здесь термин "функциональный белок глюкокиназы" относится к белку глюкокиназы, который в случае его присутствия в клетке способствует фосфорилированию глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата. В частности, функциональный белок может представлять собой глюкокиназу, кодируемую геном, содержащим ORF, которая имеет последовательность, соответствующую положениям 1-966 SEQ ID NO. 1, или последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична, например по меньшей мере на 90% идентична, например по меньшей мере на 95% идентична, например по меньшей мере на 98% идентична, например по меньшей мере на 99% идентична последовательности, соответствующей положениям 1-966 SEQ ID NO. 1.

Процент идентичности двух последовательностей можно определить с помощью математических алгоритмов, таких как алгоритм Karlin and Altschul (1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264), модифицированный алгоритм описан в Karlin and Altschul (1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877); алгоритм Myers and Miller (1988. *CABIOS* 4; 11-17); алгоритм Needleman and Wunsch (1970. *J. Mol. Biol.* 48: 443-453); и алгоритм Pearson and Lipman (1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85; 2444-2448). Также существуют компьютерные программы для определения идентичности нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, основанные на указанных математических алгоритмах. Например, сравнение нуклеотидных последовательностей можно осуществить с помощью программы BLASTN, оценка=100, длина слова=12. Сравнение аминокислотных последовательностей можно выполнить с помощью программы BLASTX, оценка=50, длина слова=3. В качестве остальных параметров программы BLAST можно использовать параметры по умолчанию.

Во многих странах не разрешается использовать генетически модифицированные организмы (ГМО) для получения кисломолочных продуктов. Вместо этого настоящее изобретение предлагает способ получения встречающихся в природе или индуцированных мутантных штаммов, которые могут обеспечить желательное накопление глюкозы в кисломолочном продукте.

Таким образом, в гораздо более предпочтительном варианте осуществления изобретения мутантный штамм представляет собой встречающийся в природе мутант или индуцированный мутант.

Используемый здесь термин "мутантная бактерия" или "мутантный штамм" относится к естественной (спонтанной, встречающейся в природе) мутантной бактерии или к индуцированной мутантной бактерии, геном (ДНК) которой содержит одну или несколько мутаций, отсутствующих в ДНК дикого типа. "Индукцированный мутант" представляет собой бактерию, которая содержит мутацию, индуцированную человеком, например, путем обработки химическими мутагенами, УФ- или гамма-облучением и т.д. Напротив, "спонтанный мутант" или "естественный мутант" не является следствием мутагенеза, проводимого человеком. Мутантные бактерии, описанные в данном документе, не являются ГМО (генетически модифицированным организмом), т.е. для их получения не используют технологии рекомбинантных ДНК.

"Штамм дикого типа" представляет собой немутантную форму бактерии, встречающуюся в природе.

Такие термины, как "штаммы с подслащающей способностью", "штаммы, способные обеспечить желательное накопление глюкозы в кисломолочном продукте" и "штаммы с повышенной способностью к естественному подслащиванию пищевых продуктов" используются здесь как взаимозаменяемые для описания преимущества применения штаммов изобретения для ферментации молочных продуктов.

В предпочтительном варианте осуществления мутантный штамм *Streptococcus thermophilus* настоящего изобретения повышает количество глюкозы в 9,5% В-молоке по меньшей мере до 5 мг/мл при инокуляции в 9,5% В-молоко в концентрации  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл и выращивании при 40°C в течение по меньшей мере 20 ч.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения мутантный штамм *Streptococcus thermophilus* настоящего изобретения увеличивает количество глюкозы в 9,5% В-молоке, содержащем 0,05% сахарозы по меньшей мере до 5 мг/мл после инокуляции в 9,5% В-молоко, содержащее 0,05% сахарозы, в концентрации  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл и выращивания при 40°C в течение по меньшей мере 20 ч.

В контексте настоящего изобретения, 9,5% В-молоко представляет собой кипяченое молоко, полученное путем перерастворения снятого сухого молока низкой жирности с получением концентрации сухого вещества 9,5%, пастеризации при 99°C в течение 30 мин и последующего охлаждения до 40°C.

В более предпочтительных вариантах осуществления изобретения мутантный штамм приводит к увеличению количества глюкозы по меньшей мере до 6 мг/мл, например по меньшей мере до 7 мг/мл, например по меньшей мере до 8 мг/мл, например по меньшей мере до 9 мг/мл, например по меньшей мере до 10 мг/мл, например по меньшей мере до 11 мг/мл, например по меньшей мере до 12 мг/мл, например по меньшей мере до 13 мг/мл, например по меньшей мере до 14 мг/мл, например по меньшей мере до 15 мг/мл, например по меньшей мере до 20 мг/мл, например по меньшей мере до 25 мг/мл.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения мутантный штамм *Streptococcus thermophilus* обладает устойчивостью к 2-дезоксиглюкозе.

Термин "устойчивый к 2-дезоксиглюкозе" в данном документе относится к конкретному мутантному бактериальному штамму, обладающему способностью расти с образованием колонии при высевании штрихом на чашки со средой M17, содержащей 20 мМ 2-дезоксиглюкозу после инкубации при 40°C в течение 20 ч. Наличие 2-дезоксиглюкозы в культуральной среде препятствует росту немутантных штаммов, но не влияет или практически не влияет на рост мутантных штаммов. Немутантные штаммы, которые можно использовать в качестве чувствительных контрольных штаммов для определения устойчивости предпочтительно включают в себя штаммы CHCC14994 и CHCC11976.

Примеры 1 и 2 настоящего описания иллюстрируют выделение мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus*, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе.

В следующем варианте осуществления мутантный штамм настоящего изобретения можно охарактеризовать по характеру роста. Характер роста отличается тем, что скорость роста мутантного штамма в среде M17+2% галактозы выше, чем в среде M17+2% глюкозы. Скорость роста определяют как развитие оптической плотности культуры в экспоненциальной фазе роста при 600 нм (OD<sub>600</sub>) с течением времени, как описано в примере 2 данного документа.

В предпочтительном варианте осуществления скорость роста по меньшей мере на 5% выше, например по меньшей мере на 10% выше, например по меньшей мере на 15% выше, например по меньшей мере на 20% выше в среде M17+2% галактозы, чем в среде M17 + 2% глюкозы.

В предпочтительном варианте осуществления мутация включает в себя замену кодона, кодирующего серии, на кодон, кодирующий пролин, в положении 72 SEQ ID NO. 2. Предпочтительно мутация в гене *glcK* включает в себя замену Т на С в положении 214 SEQ ID NO. 1.

В другом предпочтительном варианте осуществления мутация включает в себя замену кодона, кодирующего треонин, на кодон, кодирующий изолейцин, в положении 141 SEQ ID NO. 2.

Предпочтительно мутация в гене *glcK* включает в себя замену С на Т в положении 422 SEQ ID NO. 1.

Следует отметить, что ген *glcK* *Streptococcus thermophilus* можно инактивировать посредством мутаций других типов в других участках гена *glcK*.

В предпочтительном варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию, которая уменьшает транспорт глюкозы в клетку.

Используемый здесь термин "мутация, которая уменьшает транспорт глюкозы в клетку", относится к мутации в гене, кодирующем белок, участвующий в транспорте глюкозы, которая приводит к накоплению глюкозы в среде, окружающей клетку. Уровень глюкозы в культуральной среде штамма *Streptococcus thermophilus* можно легко измерить с помощью способов, известных специалистам в данной области, а также по способу, описанному в примере 4 данного документа, если культуральная среда представляет собой молочный субстрат.

В предпочтительных вариантах осуществления мутация снижает транспорт глюкозы в клетку по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 90%.

Транспорт глюкозы в клетку можно определить с помощью анализа поглощения глюкозы, описанного Cochu et al. (2003. *Appl Environ Microbiol* 69(9); 5423-5432).

Предпочтительно штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию в гене, кодирующем компонент транспортера глюкозы, где мутация инактивирует белок транспортера глюкозы или оказывает отрицательный эффект на экспрессию гена.

Компонент может представлять собой любой компонент белка транспортера глюкозы, который играет важную роль в транспорте глюкозы. Например, предполагается, что инактивация любого компонента PTS глюкозы/маннозы в *Streptococcus thermophilus*, изображенного на фиг. 3, может привести к инактивации функции транспортера глюкозы.

Используемый здесь термин "мутация, инактивирующая транспортер глюкозы", относится к мутации, приводящей к "инактивации транспортера глюкозы", белка транспортера глюкозы, который в случае присутствия в клетке не способен выполнять нормальную функцию, а также к мутациям, которые препятствуют образованию белка транспортера глюкозы или приводят к деградации белка транспортера глюкозы.

В частности, инактивированный белок транспортера глюкозы представляет собой белок, который по сравнению с функциональным белком транспортера глюкозы не может обеспечить транспорт глюкозы через плазматическую мембрану или обеспечивает транспорт глюкозы через плазматическую мембрану с гораздо более низкой скоростью. Ген, кодирующий такой инактивированный белок транспортера

глюкозы, по сравнению с геном, кодирующим функциональный белок транспортера глюкозы, содержит мутацию в открытой рамке считывания (ORF), где указанная мутация может включать в себя, без ограничения, делецию, сдвиг рамки считывания, введение стоп-кодона или мутацию, приводящую к аминокислотной замене, которая изменяет функциональные свойства белка, или мутацию промотора, которая уменьшает или прекращает транскрипцию или трансляцию гена.

В предпочтительных вариантах осуществления мутация снижает активность (скорость транспорта глюкозы) белка транспортера глюкозы по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 90%.

Активность транспортера глюкозы можно определить с помощью анализа поглощения глюкозы, описанного Cochu et al. (2003. Appl. Environ. Microbiol. 69 (9); 5423-5432).

Используемый здесь термин "функциональный белок транспортера глюкозы" относится к белку транспортера глюкозы, который, в случае присутствия в клетке, обеспечивает транспорт глюкозы через плазматическую мембрану.

Более предпочтительный штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию в последовательности ДНК гена *manM*, кодирующего белок ПС<sup>Man</sup> системы фосфотрансферазы глюкозы/маннозы, где мутация инактивирует белок ПС<sup>Man</sup> или оказывает отрицательное влияние на экспрессию гена.

В еще более предпочтительном варианте осуществления мутация включает в себя замену кодона, кодирующего глутаминовую кислоту, на стоп-кодон в положении 209 SEQ ID NO. 6 белка ПС<sup>Man</sup> фосфотрансферазной системы глюкозы/маннозы. Предпочтительно мутация включает в себя замену G на T в положении 625 SEQ ID NO. 5.

Второй аспект настоящего изобретения относится к штамму *Streptococcus thermophilus*, выбранному из группы, включающей в себя штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 25850, штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15887, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 25851, штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 26722, а также полученные из них штаммы.

В контексте настоящего изобретения термин "полученные из них штаммы" следует понимать как штаммы, полученные, или штаммы, которые могут быть получены из штамма настоящего изобретения (или исходного штамма), например, с помощью методов генной инженерии, в результате облучения и/или химической обработки. "Полученные из них штаммы" также могут представлять собой спонтанно образующиеся мутанты.

Предпочтительно "полученные из них штаммы" представляют собой функционально эквивалентные мутанты, например мутанты, которые обладают такими же или улучшенными свойствами (например, связанными с выведением глюкозы) по сравнению с исходным штаммом. Такие "полученные из них штаммы" являются частью настоящего изобретения. В частности, термин "полученные из них штаммы" относится к штаммам, полученным путем подвергания штамма настоящего изобретения любой традиционно используемой мутагенной обработке, включающей в себя обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (НТГ), ультрафиолетовым светом, или к спонтанно образующимся мутантам. Мутант может быть получен в результате нескольких мутагенных обработок (одну обработку следует понимать как одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/отбора), однако в настоящее время предпочитают, чтобы число обработок (или стадий скрининг/отбор) не превышало 20, не превышало 10 или не превышало 5. В настоящее время предпочтительно, чтобы мутант содержал менее 1%, менее 0,1%, менее 0,01%, менее 0,001% или даже менее 0,0001% замен или делеций нуклеотидов в бактериальном геноме, по сравнению с исходным штаммом.

Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* выбирают из группы, включающей в себя штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 25850, штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15887, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 25851, штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 26722, а также полученные из них мутантные штаммы, где мутантные штаммы получают с использованием одного из депонированных штаммов в качестве исходного материала и где мутант обладает такой же или дополнительно улучшенной способностью ферментировать лактозу и/или секретировать глюкозу по сравнению с указанным депонированным штаммом.

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* представляет собой молочнокислую бактерию, которую часто используют для коммерческой ферментации молока, где указанный организм обычно используют как часть смешанной заквасочной культуры.

Лактоза ферментируется *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* легче, чем моносахариды глюкоза, фруктоза и манноза, причем штаммы этого вида обычно не растут на галактозе (Buchanan R.E., Gibbons N.E., eds (1974): *Bergey's manual of determinative bacteriology* (The Williams & Wilkins Co. Baltimore,

Md), 8th ed.). В процессе ферментации лактозы под действием *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* только глюкозный фрагмент молекулы лактозы ферментируется и, следовательно, галактоза накапливается в кисломолочных продуктах.

Чтобы получить *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, не способный расти на глюкозе в качестве источника углерода, авторы настоящего изобретения подвергают штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* воздействию 2-дезоксиглюкозы. Выделенные мутанты устойчивы к 2-дезоксиглюкозе и способны расти в молочном субстрате без применения глюкозы в качестве источника углерода. Обнаружено, что мутанты повышают содержание глюкозы в молоке. Соответственно, кисломолочные продукты, полученные с использованием указанных штаммов, характеризуются более высоким содержанием глюкозы, и, следовательно, обладают более сладким вкусом.

Неожиданно было обнаружено, что штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* данного изобретения, используемые отдельно, полностью сохраняют способность подкислять молоко, хотя время подкисления до pH 5 увеличивается на 2-5 ч. Кроме того, как показано в примерах, обнаружено, что указанные штаммы выделяют примерно 5 мг/мл или больше глюкозы, и при этом в ферментированном молоке остается менее чем примерно 10 мг/мл лактозы, если 9,5% В-молоко инокулируют  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* настоящего изобретения и ферментируют штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* настоящего изобретения при 40°C в течение по меньшей мере 20 ч. Следовательно, применение таких штаммов для получения кисломолочных продуктов может иметь значение для людей с непереносимостью лактозы.

Таким образом, конечный кисломолочный продукт имеет более высокий показатель внутренней сладости, который в соответствии со способом вычисления Godshall (1988. Food Technology 42(11):71-78), составляет примерно 2 или выше, например 2,5 или выше или, например, 3 или выше.

Третий аспект настоящего изобретения относится к штамму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, отличающемуся тем, что штамм устойчив к 2-дезоксиглюкозе.

Термин "устойчивый к 2-дезоксиглюкозе", используемый в применении к штамму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, означает, что конкретный бактериальный штамм обладает способностью расти с образованием колонии после инкубации при 40°C в течение 20 ч при высевании штрихом на чашку со средой MRS-IM, содержащей 2% лактозы и 20 мм 2-дезоксиглюкозы. Наличие 2-дезоксиглюкозы в культуральной среде препятствует росту не обладающих устойчивостью штаммов и не влияет или практически не влияет на рост устойчивых штаммов. Не обладающие устойчивостью штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, которые можно использовать в качестве чувствительных контрольных штаммов для анализа устойчивости, включают в себя штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM 26419 и CHCC10019, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM 19252.

В случае, если в чашках с агаровой средой MRS-IM, содержащей 2% лактозы и, кроме того, 20 мМ 2-дезоксиглюкозы, наблюдается чрезмерный рост колоний, целесообразно увеличить концентрацию 2-дезоксиглюкозы в чашках, например до 30 мМ или даже до 40 мМ или выше. Если колонии не образуются, целесообразно уменьшить концентрацию 2-дезоксиглюкозы в чашках, например, до 15 мМ, или до 10 мМ, или даже ниже. При необходимости скорость мутаций можно увеличить путем применения подходящих схем физического или химического мутагенеза.

Предпочтительно штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* настоящего изобретения увеличивает количество глюкозы в 9,5% В-молоке по меньшей мере до 5 мг/мл после инокуляции в 9,5% В-молоке в концентрации  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл и выращивания при 40°C в течение по меньшей мере 20 ч, например в течение периода от 20 до 30 ч, например в течение 20 ч.

В более предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения мутантный штамм приводит к увеличению количества глюкозы по меньшей мере до 6 мг/мл, например по меньшей мере до 7 мг/мл, например по меньшей мере до 8 мг/мл, например по меньшей мере до 9 мг/мл, например по меньшей мере до 10 мг/мл, например по меньшей мере до 11 мг/мл, например по меньшей мере до 12 мг/мл, например по меньшей мере до 13 мг/мл, например по меньшей мере до 14 мг/мл, например по меньшей мере до 15 мг/мл.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к штамму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, выбранному из группы, включающей в себя штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM26420, штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM26421, и полученные из них штаммы.

Термин "полученные из них штаммы" имеет указанное выше определение.

Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* выбран из группы, включающей в себя штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM26420, штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160, депони-

рованный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM26421, и полученные из них мутантные штаммы, где мутантные штаммы получают с использованием одного из депонированных штаммов в качестве исходного материала, причем мутанты обладают такой же, как и у депонированного штамма, или дополнительно улучшенной по сравнению с депонированным штаммом способностью ферментировать лактозу и/или секретировать глюкозу.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей от  $10^4$  до  $10^{12}$  КОЕ (колониеобразующих единиц)/г штамма *Streptococcus thermophilus* в соответствии с первым или вторым аспектом настоящего изобретения, например от  $10^5$  до  $10^{11}$  КОЕ/г, например от  $10^6$  до  $10^{10}$  КОЕ/г или, например, от  $10^7$  до  $10^9$  КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus*.

В предпочтительном варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* не способен подкислять 9,5% В-молоко, т.е. уменьшать pH менее чем на 1,0, после инокуляции 9,5% В-молока  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* и инкубации в течение 14 ч при 40°C, а композиция дополнительно содержит количество соединения, которое может инициировать подкисление 9,5% В-молока под действием штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, депонированного в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 26722, т.е. уменьшение pH на 1,0 или более после инокуляции 9,5% В-молока  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* и инкубации в течение 14 ч при 40°C.

Предпочтительно соединение представляет собой сахарозу.

Предпочтительно, количество сахарозы составляет от 0,000001 до 2%, например от 0,00001 до 0,2%, например от 0,0001 до 0,1%, например от 0,001 до 0,05%.

В особенно предпочтительном варианте осуществления композиция дополнительно содержит от  $10^4$  до  $10^{12}$  КОЕ/г штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* настоящего изобретения, например, от  $10^5$  до  $10^{11}$  КОЕ/г, например, от  $10^6$  до  $10^{10}$  КОЕ/г, или, например, от  $10^7$  до  $10^9$  КОЕ/г штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Предпочтительная композиция настоящего изобретения содержит, например, штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 и/или штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 в сочетании со штаммом *Streptococcus thermophilus* CHCC15757. Более предпочтительная композиция содержит штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 и/или штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 в сочетании со штаммом *Streptococcus thermophilus* CHCC15887. Еще более предпочтительная композиция содержит штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 и/или штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 в сочетании со штаммом *Streptococcus thermophilus* CHCC16404.

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* и другие молочнокислые бактерии обычно используют в качестве заквасочных культур в технологических процессах для получения разных пищевых продуктов, например, в молочной промышленности для получения кисломолочных продуктов. Следовательно, в другом предпочтительном варианте осуществления композицию можно использовать в качестве заквасочной культуры.

Заквасочные культуры можно получить в виде замороженных или сухих заквасок помимо жидких заквасочных культур. Таким образом, в следующем предпочтительном варианте осуществления композиция находится в виде замороженной, лиофилизированной или жидкой формы.

Как описано в WO 2005/003327, к заквасочной культуре полезно добавить определенные криопротекторы. Таким образом, композиция закваски в соответствии с настоящим изобретением может содержать одно или несколько криопротекторных средств, выбранных из группы, включающей в себя инозин-5'-монофосфат (ИМФ), аденозин-5'-монофосфат (АМФ), гуанозин-5'-монофосфат (ГМФ), уранозин-5'-монофосфат (УМФ), цитидин-5'-монофосфат (ЦМФ), аденин, гуанин, урацил, цитозин, аденозин, гуанозин, уридин, цитидин, гипоксантин, ксантин, гипоксантин, оротидин, тимидин, инозин, а также производные указанных соединений.

Шестой аспект настоящего изобретения относится к способу получения кисломолочного продукта, включающему в себя инокуляцию и ферментацию молочного субстрата по меньшей мере одним штаммом *Streptococcus thermophilus* в соответствии с первым или вторым аспектом настоящего изобретения.

Под термином "молоко" подразумевается продукт секреции молока, полученный путем доения любого млекопитающего, такого как корова, овца, коза, буйвол или верблюд. В предпочтительном варианте осуществления молоко представляет собой коровье молоко.

Термин "молочный субстрат" может относиться к любому необработанному и/или обработанному молочному материалу, который можно подвергнуть ферментации по способу настоящего изобретения. Так, подходящие для применения молочные субстраты включают в себя, без ограничения, растворы/суспензии любых молочных или молоко-подобных продуктов, содержащие белок, такие как цельное или обезжиренное молоко, снятое молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, сыворотка, сывороточный пермеат, лактоза, маточная жидкость, полученная при кристаллизации лактозы, концентрат белка молочной сыворотки или сливок. Очевидно, что молочный субстрат может быть получен от любого млекопитающего, например, он может представлять собой практически чистое молоко млекопитающего или переработанный молочный порошок.

Предпочтительно по меньшей мере часть белков молочного субстрата представляют собой встречающиеся в природе белки молока, такие как казеин или белок молочной сыворотки. Однако часть белков могут составлять белки молока, не встречающиеся в природе.

Перед ферментацией молочный субстрат можно гомогенизировать и пастеризовать с помощью известных в данной области способов.

В данном описании термин "гомогенизация" обозначает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию проводят перед ферментацией, ее можно проводить так, чтобы разбить молочный жир с получением частиц более мелких размеров, которые больше не будут отделяться от молока. Этого можно достичь, продавливая молоко при высоком давлении через маленькие отверстия.

В данном описании термин "пастеризация" обозначает обработку молочного субстрата с целью уменьшения или устранения присутствия в нем живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно пастеризацию проводят путем поддержания заданной температуры в течение заданного периода времени. Заданной температуры, как правило, достигают путем нагревания. Температуру и продолжительность нагревания выбирают так, чтобы убить или инактивировать некоторые бактерии, такие как вредные бактерии. Затем можно использовать стадию быстрого охлаждения.

Термин "ферментация" в применении к способам настоящего изобретения обозначает превращение углеводов в спирты или кислоты под действием микроорганизма. Предпочтительно в способах настоящего изобретения ферментация включает в себя превращение лактозы в молочную кислоту.

Способы ферментации, используемые в производстве кисломолочных продуктов, хорошо известны и специалисты в данной области могут выбрать подходящие технологические условия, такие как температура, кислород, количество и характеристики микроорганизма (микроорганизмов) и время процесса. Очевидно, что условия ферментации выбирают таким образом, чтобы достичь осуществления настоящего изобретения, т.е. чтобы получить молочный продукт в твердой или жидкой форме (кисломолочный продукт).

Используемый здесь термин "кисломолочный продукт" относится к пищевому или кормовому продукту, причем получение пищевого или кормового продукта включает в себя ферментацию молочного субстрата молочнокислыми бактериями. Используемый здесь термин "кисломолочный продукт" включает в себя, без ограничения, такие продукты, как йогурт, сыр, сметана и пахта, а также ферментированная сыворотка.

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

В другом предпочтительном варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* не способен подкислять 9,5% В-молоко, т.е. он уменьшает pH менее чем на 1,0 после инокуляции 9,5% В-молока  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* и инкубации в течение 14 ч при 40°C, поэтому в молочный субстрат добавляют количество соединения, эффективное для инициации подкисления 9,5% В-молока под действием штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, депонированным в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 26722, что определяют как уменьшение pH на 1,0 или более после инокуляции 9,5% В-молока  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* и инкубации в течение 14 ч при 40°C.

Предпочтительно соединение представляет собой сахарозу.

Предпочтительно количество сахарозы составляет от 0,000001 до 2%, например от 0,00001 до 0,2%, например от 0,0001 до 0,1%, например от 0,001 до 0,05%.

Седьмой аспект настоящего изобретения относится к способу получения кисломолочного продукта, который включает в себя инокуляцию и ферментацию молочного субстрата по меньшей мере одним штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в соответствии с третьим или четвертым аспектом настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления концентрация инокулированных клеток *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* составляет от  $10^4$  до  $10^9$  КОЕ на мл молочного субстрата, например, от  $10^4$  до  $10^8$  КОЕ на мл молочного субстрата.

В предпочтительном варианте осуществления способ получения кисломолочного продукта включает в себя инокуляцию и ферментацию молочного субстрата по меньшей мере одним штаммом *Streptococcus thermophilus* настоящего изобретения и по меньшей мере одним штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* настоящего изобретения.

В другом предпочтительном варианте кисломолочный продукт представляет собой йогурт или сыр.

Примеры сыров, которые получают путем ферментации под действием *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* включают в себя моцареллу и сыр для пиццы (Hoier et al. (2010) in *The Technology of Cheese making*, 2<sup>nd</sup> Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192).

Предпочтительно кисломолочный продукт представляет собой йогурт.

В контексте настоящего изобретения закваска для йогурта представляет собой бактериальную культуру, которая содержит по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и по

меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*. В соответствии с настоящим изобретением термин "йогурт" относится к кисломолочному продукту, полученному путем инокуляции и ферментации молока композицией, содержащей штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и штамм *Streptococcus thermophilus*.

В восьмом аспекте настоящее изобретение относится к кисломолочному продукту, полученному по способу, описанному в шестом или седьмом аспекте настоящего изобретения.

В девятом аспекте настоящее изобретение относится к кисломолочному продукту, содержащему по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*, описанный в первом или втором аспекте настоящего изобретения.

В десятом аспекте настоящее изобретение относится к кисломолочному продукту, содержащему по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, описанный в третьем или четвертом аспекте настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления кисломолочный продукт содержит по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus* настоящего изобретения и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* настоящего изобретения.

В другом предпочтительном варианте кисломолочный продукт представляет собой йогурт или сыр. Предпочтительно кисломолочный продукт представляет собой йогурт.

В одиннадцатом аспекте настоящее изобретение относится к применению штамма *Streptococcus thermophilus*, описанного в первом или во втором аспекте настоящего изобретения, для получения кисломолочного продукта.

В двенадцатом аспекте настоящее изобретение относится к применению *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, в соответствии с третьим или четвертым аспектом настоящего изобретения для получения кисломолочного продукта.

Тринадцатый аспект настоящего изобретения относится к применению штамма *Streptococcus thermophilus* настоящего изобретения и штамма *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* настоящего изобретения для получения кисломолочного продукта.

Четырнадцатый аспект относится к применению штамма *Streptococcus thermophilus*, описанного в первом или во втором аспекте изобретения, для повышения сладости кисломолочного продукта.

В пятнадцатом аспекте настоящее изобретение относится к применению штамма *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, описанного в третьем и четвертом аспекте настоящего изобретения, для повышения сладости кисломолочного продукта.

В шестнадцатом аспекте настоящее изобретение направлено на применение штамма *Streptococcus thermophilus*, описанного в первом или во втором аспекте настоящего изобретения, и штамма *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, описанного в третьем и четвертом аспекте настоящего изобретения, для повышения сладости кисломолочного продукта.

В частности, поскольку дети, как потребительская группа, отдают предпочтение продуктам питания со сладким вкусом, предполагается, что штамм *Streptococcus thermophilus* настоящего изобретения и штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* настоящего изобретения можно использовать для увеличения сладости кисломолочных продуктов, предназначенных для детей.

Семнадцатый аспект настоящего изобретения относится к кисломолочному продукту настоящего изобретения, содержащему пониженное количество калорий.

Кисломолочный продукт настоящего изобретения предпочтительно можно использовать в рационе людей, страдающих от избыточного веса или ожирения.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления кисломолочный продукт настоящего изобретения предназначен для уменьшения потребления калорий людьми, страдающими от избыточного веса или ожирения.

Избыточный вес и ожирение представляют собой медицинские состояния, определенные Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) как ненормальное или чрезмерное накопление жира, которое представляет опасность для здоровья. Индекс массы тела (ВМТ), который можно использовать в качестве приблизительного показателя для диагностики избыточного веса и ожирения у взрослых, рассчитывают путем деления массы субъекта в килограммах на квадрат его/ее роста в метрах ( $\text{кг}/\text{м}^2$ ). В соответствии с определением ВОЗ, если ВМТ больше или равен 25, субъект имеет избыточный вес, а если ВМТ больше или равен 30, то субъект страдает от ожирения.

Восемнадцатый аспект настоящего изобретения относится к применению штамма *Streptococcus thermophilus*, описанного в первом или во втором аспекте настоящего изобретения, для снижения содержания лактозы в кисломолочном продукте.

В девятнадцатом аспекте настоящее изобретение относится к применению штамма *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, описанного в третьем или четвертом аспекте настоящего изобретения, для снижения содержания лактозы в кисломолочном продукте.

Двадцатый аспект настоящего изобретения относится к применению штамма *Streptococcus thermophilus*, описанного в первом или во втором аспекте настоящего изобретения, и штамма *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, описанного в третьем или четвертом аспекте настоящего изобретения, для сни-

жения содержания лактозы в кисломолочном продукте.

Двадцать первый аспект настоящего изобретения направлен на кисломолочный продукт настоящего изобретения, позволяющий избежать симптомов непереносимости лактозы.

Двадцать второй аспект относится к композиции настоящего изобретения, предназначенной для применения в качестве лекарственного средства.

В двадцать третьем аспекте изобретение относится к применению штамма *Streptococcus thermophilus* настоящего изобретения для улучшения роста штамма *Bifidobacterium*.

В предпочтительном варианте штамм *Bifidobacterium* принадлежит к видам, выбранным из группы, включающей в себя *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis* и *Bifidobacterium infantis*, и может представлять собой, например, штамм, выбранный из группы, включающей в себя штамм *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM 15954, штамм *Bifidobacterium animalis*, депонированный в DSMZ под номером доступа DSM 15954, штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, депонированный в DSMZ под номером доступа DSM 15953, и штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, депонированный в DSMZ под номером доступа DSM 15955. Наиболее предпочтительный штамм *Bifidobacterium* представляет собой штамм *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®, депонированный в DSMZ под номером доступа DSM 15954.

В двадцать четвертом аспекте данное изобретение относится к применению штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* настоящего изобретения для улучшения роста штамма *Bifidobacterium*.

В предпочтительном варианте осуществления штамм *Bifidobacterium* принадлежит к видам, выбранным из группы, включающей в себя *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis* и *Bifidobacterium infantis*, и может представлять собой, например, штамм, выбранный из группы, включающей в себя штамм *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером доступа DSM 15954, штамм *Bifidobacterium animalis*, депонированный в DSMZ под номером доступа DSM 15954, штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, депонированный в DSMZ под номером доступа DSM 15953, и штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, депонированный в DSMZ под номером доступа DSM 15955. Наиболее предпочтительный штамм *Bifidobacterium* представляет собой штамм *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®, депонированный в DSMZ под номером доступа DSM 15954.

Двадцать пятый аспект относится к применению штамма *Streptococcus thermophilus* настоящего изобретения и штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* настоящего изобретения для улучшения роста штамма *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 15954.

2-Дезоксиглюкозу и определение характера роста бактерий в среде M17+2% галактозы по сравнению со средой M17+2% глюкозы используют для отбора бактерий, содержащих мутацию в гене глюкокиназы (*glcK*).

В двадцать шестом аспекте настоящее изобретение предлагает способ скрининга и выделения штамма *Streptococcus thermophilus*, содержащего мутантный ген *glcK*. Способ включает в себя следующие стадии:

- а) получение галактоза-ферментирующего исходного штамма *Streptococcus thermophilus*;
- б) отбор и выделение из пула мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus*, полученных из исходного штамма, совокупности мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus*, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе; и
- в) отбор и выделение из пула мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus*, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе, мутантного штамма *Streptococcus thermophilus*, скорость роста которого в среде M17+2% галактозы выше, чем в среде M17+2% глюкозы.

Термин "устойчивый к 2-дезоксиглюкозе" в данном документе относится к конкретному мутантному бактериальному штамму, обладающему способностью расти с образованием колонии при высевании штрихом на чашки со средой M17, содержащей 20 мМ 2-дезоксиглюкозу после инкубации при 40°C в течение 20 ч. Наличие 2-дезоксиглюкозы в культуральной среде препятствует росту немутантных штаммов, но не влияет или практически не влияет на рост мутантных штаммов. Немутантные штаммы, которые можно использовать в качестве чувствительных контрольных штаммов для определения устойчивости, предпочтительно включают в себя штаммы CHCC14994 и CHCC11976.

Примеры 1 и 2 настоящего описания иллюстрируют выделение мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus*, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе.

В предпочтительном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя стадию а1) мутагенеза исходного штамма, например, путем подвергания исходного штамма воздействию химического и/или физического мутагена.

В другом предпочтительном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя ста-

дию d) отбора и выделения из пула 2-дезоксиглюкоза-устойчивых штаммов *Streptococcus thermophilus*, отобранных на стадии c), штамма *Streptococcus thermophilus*, скорость роста которого в среде M17+2% сахарозы является высокой, но равна нулю, или по меньшей мере на 0-50% ниже, чем скорость роста исходного штамма в среде M17+2% глюкозы.

Галактоза-ферментирующие исходные штаммы *Streptococcus thermophilus*, способные к росту на/в среде M17+2% галактозы, определяют здесь как штаммы *Streptococcus thermophilus*, которые понижают pH бульона M17, содержащего 2% галактозы в качестве единственного углевода, до 5,5 или ниже, после инокуляции ночной культуры в количестве 1% и инкубации в течение 24 ч при 37°C. Такие галактоза-положительные штаммы описаны на предшествующем уровне техники, а в WO 2011/026863 (Chr. Hansen A/S) описан способ получения таких штаммов.

В гораздо более предпочтительном варианте исходный штамм выбирают из группы, включающей в себя штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC14994, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 25838, штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC11976, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 22934, и полученные из них штаммы.

В контексте настоящего изобретения термин "полученные из них штаммы" следует понимать как штаммы, полученные, или штаммы, которые могут быть получены из галактоза-ферментирующих исходных штаммов *Streptococcus thermophilus*, например, с помощью методов генной инженерии, в результате облучения и/или химической обработки. "Полученные из них штаммы" также могут представлять собой спонтанно образующиеся мутанты.

Предпочтительно "полученные из них штаммы" представляют собой функционально эквивалентные мутанты, например мутанты, которые обладают такими же или улучшенными свойствами (например, связанными с ферментацией галактозы) по сравнению с исходным штаммом. Такие "полученные из них штаммы" являются частью настоящего изобретения. В частности, термин "полученные из них штаммы" относится к штаммам, полученным путем подвергания штамма настоящего изобретения любой традиционно используемой мутагенной обработке, включающей в себя обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), ультрафиолетовым светом, или к спонтанно образующимся мутантам. Мутант может быть получен в результате нескольких мутагенных обработок (одну обработку следует понимать как одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/отбора), однако в настоящее время предпочитают, чтобы число обработок (или стадий скрининг/отбор) не превышало 20, не превышало 10 или не превышало 5. В настоящее время предпочтительно, чтобы мутант содержал менее 1%, менее 0,1%, менее 0,01%, менее 0,001% или даже менее 0,0001% замен или делеций нуклеотидов в бактериальном геноме, по сравнению с исходным штаммом.

В двадцать седьмом аспекте мутантный штамм *Streptococcus thermophilus*, который можно получить по способу двадцать седьмого аспекта, входит в объем настоящего описания.

В двадцать восьмом аспекте настоящее изобретение предлагает способ скрининга и выделения штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* с нарушением метаболизма глюкозы. Способ включает в себя следующие стадии:

- a) получение исходного штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*;
- b) отбор и выделение из пула мутантных штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, полученных из исходного штамма, совокупности штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе; и
- c) отбор и выделение из пула мутантных штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе, штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, скорость роста которого в среде MRS-IM+2% лактозы выше, чем в среде MRS-IM+2% глюкозы.

Выделение мутантных штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе, подробно описано в примерах. С помощью селекционного анализа устойчивости к 2-дезоксиглюкозе, описанного в примере 5, специалист в данной области может легко проверить конкретный представляющий интерес штамм (например, штамм из соответствующего коммерческого продукта) на наличие соответствующей устойчивости к 2-дезоксиглюкозе. С помощью анализа роста мутанта, устойчивого к 2-дезоксиглюкозе, описанного в примере 6, специалист в данной области может легко определить, обладает ли конкретный представляющий интерес штамм (например, штамм из соответствующего коммерческого продукта) соответствующим характером роста, который является свойством выбранных мутантов.

В предпочтительном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя стадию a1) мутагенеза исходного штамма, например, путем подвергания исходного штамма воздействию химического и/или физического мутагена.

Исходные штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, способные расти на/в среде MRS-IM+2% лактозы, определяют здесь как обладающие способностью понижать pH в бульоне MRS-IM, содержащем 2% лактозы в качестве единственного углевода, до 5,5 или ниже, после инокуляции из ночной культуры в количестве 1% и инкубации в течение 24 ч при 37°C.

В гораздо более предпочтительном варианте исходный штамм выбран из группы, включающей в себя штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 26419, штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC10019 штамм, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM 19252, и полученные из них штаммы.

В двадцать девятом аспекте штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, который можно получить с помощью способа, описанного в двадцать восьмом аспекте, входит в объем настоящего описания.

Варианты осуществления изобретения описаны ниже посредством неограничивающих примеров.

### Примеры

Материалы и методы.

Среда.

Для *Streptococcus thermophilus* используют среду М17, известную специалистам в данной области.

Агаровая среда М17 имеет следующий состав на литр H<sub>2</sub>O:

агар, 12,75 г  
 аскорбиновая кислота, 0,5 г  
 казеиновый пептон (трипсиновый), 2,5 г  
 динатрия β-глицерофосфата пентагидрат, 19 г  
 гидрат сульфата магния, 0,25 г  
 мясной экстракт, 5 г  
 мясной пептон (пепсиновый), 2,5 г  
 соевый пептон (папаиновый), 5 г  
 дрожжевой экстракт, 2,5 г  
 конечное значение pH 7,1±0,2 (25°C)

Бульон М17 имеет следующий состав на литр H<sub>2</sub>O:

аскорбиновая кислота, 0,5 г  
 сульфат магния, 0,25 г  
 мясной экстракт, 5 г  
 мясной пептон (пепсиновый), 2,5 г  
 глицерофосфат натрия, 19 г  
 соевый пептон (папаиновый), 5 г  
 триптон, 2,5 г  
 дрожжевой экстракт, 2,5 г  
 конечное значение pH 7,0±0,2 (25°C)

В качестве источников углерода добавляют стерильную лактозу, 20 г/л, глюкозу, 20 г/л, или галактозу, 20 г/л.

Как известно специалистам в данной области среду М17 можно использовать для выращивания *Streptococcus thermophilus*.

Кроме того, специалистам в данной области следует понимать, что в контексте настоящего изобретения можно использовать концентрат М17, полученный от разных поставщиков, и независимо от конкретного поставщика (с учетом измерения стандартной погрешности) можно получить такой же результат относительно устойчивости к 2-дезоксиглюкозе представляющих интерес релевантных клеток, как и в настоящем изобретении.

Для культивирования *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* используют среду MRS-IM. MRS-IM используют в виде чашки с агаром или бульона. Агаровая среда MRS-IM имеет следующий состав на литр H<sub>2</sub>O:

Триптон	Oxoid L 42	10,0 г
Дрожжевой экстракт	Oxoid L 21	5,0 г
Твин 80	Merck nr 8,22187	1,0 г
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck nr 105104	2,6 г
Na-ацетат	Merck nr 106267	5,0 г
Диаммония гидроцитрат	Merck nr 101154	2,0 г
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	Merck nr 105882	0,2 г
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	Merck nr 105941	0,05 г
Агар	SO-BI-GEL	13,0 г

рН доводят после автоклавирования до  $6,9 \pm 0,1$  при  $25^\circ\text{C}$ .

Бульон MRS-IM, используемый в приведенных ниже примерах для жидких культур, имеет следующий состав на литр  $\text{H}_2\text{O}$ :

Триптон	Oxoid L 42	10,0 г
Дрожжевой экстракт	Oxoid L 21	5,0 г
Твин 80	Merck nr 8,22187	1,0 г
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Merck nr 105104	2,6 г
Na-ацетат	Merck nr 106267	5,0 г
Диаммония гидроцитрат	Merck nr 101154	2,0 г
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	Merck nr 105882	0,2 г
$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	Merck nr 105941	0,05 г

рН доводят после автоклавирования до  $6,9 \pm 0,1$  при  $25^\circ\text{C}$ .

Используемую в качестве источника углерода лактозу, 20 г/л, или глюкозу, 20 г/л, сначала стерилизуют фильтрацией и затем добавляют к автоклавированному бульону.

Указанную выше среду MRS-IM можно подвергнуть некоторой модификации при условии, что такая модификация не влияет на способность среды поддерживать рост *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Кроме того, специалисту в данной области должно быть понятно, что среду MRS-IM можно получить с использованием концентрата MRS-IM или разных описанных выше компонентов, полученных из разных источников. Указанные среды подобным образом используют в приведенных ниже примерах, в частности в селекционном анализе устойчивости к 2-дезоксиглюкозе.

Исходные штаммы.

*Streptococcus thermophilus* CHCC11976 (штамм с мутацией в гене GalK, способный ферментировать галактозу и продуцировать экзополисахариды, как описано в WO 2011/026863).

*Streptococcus thermophilus* CHCC14994 (галактоза-ферментирующий штамм).

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759.

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC10019.

Штаммы, устойчивые к 2-дезоксиглюкозе.

*Streptococcus thermophilus* CHCC15757 (2-дезоксиглюкоза-устойчивый мутант CHCC14994).

*Streptococcus thermophilus* CHCC15887 (2-дезоксиглюкоза-устойчивый мутант CHCC11976).

*Streptococcus thermophilus* CHCC16404 (мутант CHCC15757, обладающий повышенной способностью ферментировать лактозу и способный секретировать глюкозу).

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 (2-дезоксиглюкоза-устойчивый мутант CHCC759).

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 (2-дезоксиглюкоза-устойчивый мутант CHCC10019).

Пример 1. Применение 2-дезоксиглюкозы для выделения мутантов *Streptococcus thermophilus* по глюкокиназе, характеризующихся повышенной экскрецией глюкозы.

Чтобы выделить мутанты штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 и штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC14994, клетки, полученные в результате выращивания одной колонии, инокулируют в 10 мл бульона M17, содержащего 2% лактозы, и выращивают в течение ночи при  $40^\circ\text{C}$ .

На следующий день штаммы высевают в серийных разведениях на чашки с агаром M17, содержащим 2% галактозы и 2-дезоксиглюкозу в концентрации либо 20 мМ (CHCC14994), либо 30 мМ (CHCC11976), и инкубируют в течение 20 ч при  $40^\circ\text{C}$ . Вначале устойчивые колонии повторно высевают штрихом на чашки с агаром такого же типа, как и при селекции. Выжившие клетки используют для инокуляции свежего бульона M17, содержащего либо 2% лактозы, 2% галактозы, либо 2% глюкозы, и изменяют рост.

Определяют количество мутантов, способных расти на галактозе быстрее, чем на глюкозе, как описано в примере 2. Идентифицируют два таких мутанта, CHCC15757 и CHCC15887, которые были получены из CHCC14994 и CHCC11976 соответственно.

Пример 2. Характер роста мутанта, устойчивого к 2-дезоксиглюкозе.

Чтобы выбрать мутанты, устойчивые к 2-дезоксиглюкозе и способные расти на галактозе, используют два штамма, выбранных из коллекции галактоза-ферментирующих штаммов. Тогда как скорость роста галактоза-ферментирующих штаммов в экспоненциальной фазе в бульоне M17+2% глюкозы по меньшей мере на 10% выше, чем в бульоне M17+2% галактозы, 2-дезоксиглюкоза-устойчивые мутанты, полученные из CHCC11976 и CHCC14994, такие как CHCC15757 и CHCC15887, в экспоненциальной фазе в бульоне M17+2% галактозы растут быстрее, чем в бульоне M17 + 2% глюкозы.

В настоящем описании рост в экспоненциальной фазе измеряют как изменение оптической плотности культуры, находящейся в экспоненциальной фазе роста, при 600 нанометров ( $\text{OD}_{600}$ ) с течением времени при  $40^\circ\text{C}$ .

Как известно специалистам в данной области, изменение оптической плотности может варьировать

в зависимости от вида, если культура находится в экспоненциальной фазе роста. Опытному специалисту известно, как определить рост в экспоненциальной фазе, например при  $OD_{600}$  в диапазоне 0,1-1,0.

Оптическую плотность (OD) культуры измеряют с помощью спектрофотометра.

Вывод.

На основании определенного по способу примера 2 характера роста 2-дезоксиглюкоза-устойчивого мутанта - для конкретного представляющего интерес штамма (например, одного из соответствующих коммерческих продуктов) - специалист в данной области может регулярно проверять, обладает ли конкретный представляющий интерес штамм характером роста, соответствующим настоящему изобретению, который является особенностью выбранных мутантов.

Пример 3. Мутационный анализ гена, кодирующего глюкокиназу.

Из мутантов, полученных по способу примера 1, выделяют общую ДНК и проводят мутационный анализ гена, кодирующего глюкокиназу. Секвенирование гена глюкокиназы демонстрирует, что ген штамма СНСС15757 содержит неконсервативную мутацию в кодоне 141, приводящую к замене треонина на изолейцин. Секвенирование гена мутанта СНСС15887 выявляет мутацию в кодоне 72, приводящую к неконсервативной аминокислотной замене серина на пролин (фиг. 2).

2-Дезоксиглюкоза-устойчивые штаммы, соответствующие условиям, определенным в примерах 1 и 2, и выделенные по способу примера 1, характеризуются наличием мутации в гене, кодирующем глюкокиназу (glcK). Мутация может привести к аминокислотной замене в кодируемом ферменте или к образованию стоп-кодона, укорачивающего кодируемый фермент.

Для выявления мутации в гене glcK конкретный представляющий интерес штамм выращивают в жидком бульоне (M17), содержащем 2% лактозы, при 40°C в течение ночи. Выделяют хромосомальную ДНК, которую затем подвергают анализу методом ПЦР с использованием двух праймеров, комплементарных консервативным участкам, расположенным непосредственно перед геном, кодирующим глюкокиназу, и сразу после данного гена. Праймеры имеют следующие последовательности:

GK1F: 5' CTT GGG TAA AAG GCT CTA TG 3' (SEQ ID NO 3.)

GK1R: 5' CGT TTT TCA ACA AAA AAG TGC TACC 3\* (SEQ ID NO 4)

Для проведения реакций ПЦР используют условия, описанные производителем набора для ПЦР-амплификации (Roche), например

2 мкл хромосомальной ДНК  
1 мкл праймера GK1F  
1 мкл праймера GK1R  
25 мкл общей реакционной смеси  
21 мкл H<sub>2</sub>O

Программа для ПЦР: (94°C-1,5 мин, 50°C-1 мин, 72°C-1,5 мин)×30.

После амплификации методом ПЦР получают фрагмент размером 1168 п.о. После очистки с использованием набора для очистки методом ПЦР, Biograd, фрагмент ПЦР подвергают ДНК-секвенированию на Masogen с использованием таких же двух праймеров, как и для амплификации. После секвенирования последовательность ДНК сравнивают с последовательностью ДНК исходного штамма.

Пример 4. Углеводный анализ ферментированного молока.

В другом эксперименте определяют концентрацию соответствующего сахара в молоке, ферментированном с использованием СНСС14994, СНСС11976, СНСС15757 и СНСС15887 соответственно. 9,5% В-молоко инокулируют 1% ( $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл) культуры, выращенной в течение ночи в бульоне M17, содержащем 2% галактозы. Подкисление отслеживают с помощью регистрирующего устройства INTAV PC и программного обеспечения Easyview. После 30 ч подкисления при 40°C отбирают образцы молока для анализа ВЭЖХ, чтобы определить содержание соответствующих сахаров и кислот. Кривые подкисления демонстрируют, что у мутантов подкисление начинается немного позднее, но заканчивается при таких же конечных значениях pH. Данные ВЭЖХ представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что два glcK-мутантных штамма, СНСС15757 и СНСС15887, потребляют по меньшей мере 71% лактозы, тогда как исходные штаммы потребляют примерно 28% лактозы. В случае применения мутанта с максимальной способностью к ферментации лактозы, СНСС15887, в кисломолочном продукте остается всего 11,9 мг/мл лактозы, что свидетельствует о том, что данный продукт подходит даже для людей с непереносимостью лактозы. Очень важно то, что два glcK-мутанта выделяют от 8,3 до 11,3 мг/мл глюкозы, тогда как у исходных штаммов уровень секреции глюкозы находится ниже уровня детекции. В то же время оба мутантных штамма также секретируют больше галактозы, чем исходные штаммы: от 34 до 52%. С учетом того, что сладость сахарозы принимают за 100, а сладость лактозы за 16, сладость галактозы составляет 32, а сладость глюкозы составляет 74,3, и расчет относительной сладости конечного ферментированного продукта позволяет предположить, что при использовании наилучшего мутанта СНСС15757 сладость будет в 2,0 раза выше, чем при ферментации с использованием соответствующего исходного штамма СНСС14994.

Таблица 1. Результаты анализа образцов молока методом ВЭЖХ

Образец	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	
<b>№.</b>	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	
	Лимонная кислота	Молочная кислота	Уксусная кислота	Галактоза	Глюкоза	Лактоза	Фруктоза	Сладость
Предел детекции	<1.25	<1.25	<1.25	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	
Молоко	<b>1.8</b>	<b>1.7</b>	<b>&lt;1.25</b>	<b>&lt;1.5</b>	<b>&lt;1.5</b>	<b>47.6</b>	<b>&lt;1.5</b>	<b>761.6</b>
<b>СНСС11976</b>	<b>2.0</b>	<b>8.2</b>	<b>&lt;1.25</b>	<b>7.2</b>	<b>&lt;1.5</b>	<b>34.4</b>	<b>&lt;1.5</b>	<b>781</b>
<b>СНСС15887</b>	<b>1.8</b>	<b>7.8</b>	<b>&lt;1.25</b>	<b>10.9</b>	<b>8.3</b>	<b>11.9</b>	<b>&lt;1.5</b>	<b>1156</b>
<b>СНСС14994</b>	<b>1.8</b>	<b>7.2</b>	<b>&lt;1.25</b>	<b>4.9</b>	<b>&lt;1.5</b>	<b>34.3</b>	<b>&lt;1.5</b>	<b>705.6</b>
<b>СНСС15757</b>	<b>1.7</b>	<b>7.1</b>	<b>&lt;1.25</b>	<b>10.3</b>	<b>11.3</b>	<b>13.8</b>	<b>&lt;1.5</b>	<b>1390</b>

Расчет сладости: мг/мл глюкозы·74 + мг/мл лактозы·16 + мг/мл галактозы·32.

Поскольку два *glcK*-мутантных штамма, СНСС15757 и СНСС15887, выделяют высокие уровни глюкозы, полагают, что мутации в гене *glcK* инактивируют кодируемый белок глюкокиназы.

Пример 5. Отбор 2-дезоксиглюкоза-устойчивых штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Отбор 2-дезоксиглюкоза-устойчивых мутантов.

Два представляющих интерес штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, СНСС759 и СНСС10019, независимо друг от друга инокулируют в 10 мл описанного выше бульона MRS-IM, содержащего 2% лактозы, и инкубируют в анаэробных условиях при 40°C в течение ночи. На следующей стадии образцы указанных культур, содержащие примерно  $3 \times 10^8$  клеток, высевают на чашки с агарной средой MRS-IM, содержащей 2% лактозы и, кроме того, 20 мМ 2-дезоксиглюкозы. Колонии, образовавшиеся на чашках, очищают путем высеваания штрихом отдельных колоний на чашки с агарной средой MRS-IM, содержащей 2% лактозы и, кроме того, 20 мМ 2-дезоксиглюкозы, и затем характеризуют, как описано ниже.

Анализ устойчивости к 2-дезоксиглюкозе.

Нижеследующий способ можно использовать для определения устойчивости представляющего интерес штамма к 2-дезоксиглюкозе. Представляющие интерес штаммы инокулируют в 10 мл описанного выше бульона MRS-IM, содержащего 2% лактозы, и инкубируют в анаэробных условиях при 40°C в течение ночи. На следующей стадии разбавленные образцы указанных культур, содержащие примерно  $10^4$ - $10^5$  клеток, помещают на чашки с агарной средой MRS-IM, содержащей, помимо 2% лактозы, такую же концентрацию 2-дезоксиглюкозы, которая использовалась для отбора устойчивого мутанта (обычно 20 мМ, но можно использовать и другие концентрации). Чашки с агаром инкубируют в анаэробных условиях в течение 20 ч при 40°C и осматривают. Штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, которые не являются устойчивыми к 2-дезоксиглюкозе, образуют мало колоний или вообще не образуют, тогда как штаммы, устойчивые к 2-дезоксиглюкозе, образуют множество колоний. Соответствующие контроли включают в себя штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, СНСС759 и СНСС10019, которые являются чувствительными к 2-дезоксиглюкозе в концентрации 20 мМ, и СНСС16159 и СНСС16160, устойчивые к 20 мМ 2-дезоксиглюкозе.

Результат. С помощью данного способа выделяют несколько клонов, способных расти в условиях селекции в присутствии 2-дезоксиглюкозы. Мутантные штаммы, способные быстро расти на чашках с 2-дезоксиглюкозой, обозначают СНСС16159 (полученный из исходного штамма СНСС759) и СНСС16160 (полученный из исходного штамма СНСС10019). Указанные мутантные штаммы помещают на хранение в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH.

Пример 6. Характер роста 2-дезоксиглюкоза-устойчивых мутантов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Чтобы убедиться, что 2-дезоксиглюкоза-устойчивые мутанты *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* не способны расти или хуже растут на глюкозе как на источнике углерода, характер роста мутантов сравнивают с характером роста исходных штаммов путем выращивания исходных штаммов, СНСС759 и СНСС10019, и мутантов, СНСС16159 и СНСС16160, в бульоне MRS-IM, содержащем 2% глюкозы.

В то время как 2 исходных штамма, СНСС759 и СНСС10019, экспоненциально растут в бульоне MRS-IM, содержащем 2% глюкозы, со временем удвоения менее 10 ч, два 2-дезоксиглюкоза-устойчивых мутанта, СНСС16159 и СНСС16160, в данной среде не растут или растут очень медленно. Рост в экспоненциальной фазе регистрируют путем измерения оптической плотности экспоненциально растущей культуры при 600 нм ( $OD_{600}$ ) при 40°C с помощью спектрофотометра. Экспоненциальная фаза роста достигается в диапазоне  $OD_{600}$  0,1-1,0.

Пример 7. Углеводный анализ молока, ферментированного с использованием штаммов *Lactobacillus*

*delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

В другом эксперименте определяют концентрации разных сахаров в молоке, ферментированном с использованием штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759, CHCC10019, CHCC16159 и CHCC16160 соответственно. 9,5% В-молоко инокулируют 1% ( $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл) жидкой культуры, выращенной в течение ночи в анаэробных условиях в бульоне MRS-IM, содержащем 2% лактозы. Подкисление отслеживают с помощью регистрирующего устройства INTAB PC и программного обеспечения Easyview. После 30 ч подкисления при 40°C отбирают образцы молока для анализа ВЭЖХ, чтобы определить содержание разных сахаров и органических кислот. Кривые подкисления демонстрируют, что у мутантов подкисление начинается немного позднее, но заканчивается при таких же конечных значениях pH. Данные ВЭЖХ представлены в табл. 2.

Как можно видеть из табл. 2, два 2-дезоксиглюкоза-устойчивых мутантных штамма, CHCC16159 и CHCC16160, потребляют по меньшей мере примерно 94% лактозы, тогда как исходные штаммы потребляют по меньшей мере примерно 37% лактозы. В случае применения мутанта, характеризующегося наибольшей продукцией молочной кислоты, CHCC16160, в ферментированном молоке остается всего 2,9 мг/мл лактозы. Кисломолочные продукты с таким низким уровнем лактозы подходят для потребления людьми с непереносимостью лактозы.

Важно отметить, что два мутантных штамма, CHCC16159 и CHCC16160, выделяют от 15,2 до 15,8 мг/мл глюкозы, в то время как секреция глюкозы у исходных штаммов находится ниже уровня детекции в случае применения CHCC10019 и составляет 4,2 мг/мл в случае применения CHCC759 соответственно. В то же время оба мутантных штамма также выделяют больше галактозы, чем исходные штаммы. Если сладость сахарозы принимают за 100, а сладость лактозы составляет 16, сладость галактозы составляет 32, а сладость глюкозы составляет 74,3, расчет относительной сладости конечного ферментированного продукта позволяет предположить, что мутант CHCC16160 продуцирует кисломолочный продукт, который в 2,5 раза слаще, чем продукт, полученный с использованием соответствующего исходного штамма CHCC10019.

Таблица 2. Результаты анализа образцов молока методом ВЭЖХ

Образец	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	
№.	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	
	Лимонная кислота	Молочная кислота	Уксусная кислота	Галактоза	Глюкоза	Лактоза	Фруктоза	Сладость
Предел детекции	<1.25	<1.25	<1.25	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	
Молоко	1.9	<1.25	<1.25	<1.5	<1.5	55.5	<1.5	888
CHCC759	1.8	9.6	<1.25	13.1	4.2	18.1	<1.5	1021
CHCC16159	2.0	7.9	<1.25	21.4	15.2	1.7	<1.5	1841
CHCC10019	1.8	11.1	<1.25	12.4	>1.5	20.8	<1.5	730
CHCC16160	1.9	5.4	<1.25	19.4	15.8	2.9	<1.5	1841

Расчет сладости: мг/мл глюкозы·74 + мг/мл лактозы·16 + мг/мл галактозы·32.

Пример 8. Выбор мутанта *Streptococcus thermophilus*, обладающего повышенной способностью к ферментации лактозы и способного секретировать глюкозу.

Чтобы выделить мутантный штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, обладающий повышенной способностью к ферментации лактозы и способный секретировать глюкозу, клетки, полученные в результате выращивания одной колонии, высевают в 10 мл бульона M17, содержащего 2% галактозы, и выращивают в течение ночи при 40°C.

На следующий день штамм высевают в серийных разведениях на чашки с агарной средой M17, содержащей 2% галактозы и 2-дезоксиглюкозу в концентрации 30 мМ, и инкубируют в течение 20 ч при 40°C. Вначале обладающие устойчивостью колонии повторно высевают штрихом на чашки с агаром такого же типа, какие использовались для селекции. Выжившие клетки используют для инокуляции свежего бульона M17, содержащего 2% лактозы, или 2% галактозы, или 2% сахарозы, или 2% глюкозы.

В результате выделяют мутант CHCC16404, полученный из CHCC15757, который не способен расти в В-молоке, но может расти в среде M17, содержащей 2% сахарозы, при 40°C. Кроме того, CHCC16404 не способен расти в M17, содержащей 2% глюкозы.

Рост в экспоненциальной фазе в настоящем описании измеряют как развитие оптической плотности экспоненциально растущей культуры при 600 нанометрах ( $OD_{600}$ ) с течением времени при 40°C.

Пример 9. Характер роста мутанта *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, обладающего повышенной способностью к ферментации лактозы и способного секретировать глюкозу.

Чтобы обеспечить поддержание и надлежащий рост мутанта CHCC16404, штамм выращивают при 40°C в M17, содержащей 2% сахарозы. Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что

мутантный штамм СНСС16404 может подкислять 9,5% В-молоко только в том случае, если к штамму добавляют 1% ( $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл) культуры, выращенной в течение ночи в бульоне М17, содержащем 2% сахарозы, или если в молоко добавить сахарозу. Авторы обнаружили, что добавление к молоку всего лишь 0,01% сахарозы придает штамму СНСС16404 способность подкислять 9,5% В-молоко. Кроме того, СНСС16404 не может расти в М17, содержащей 2% глюкозы, при 40°C, в отличие от исходного штамма СНСС15757, способного расти в тех же условиях в среде М17, содержащей глюкозу. В совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что обработка штамма СНСС15757 2-дезоксиглюкозой, приводящая к получению штамма СНСС16404, позволяет выбрать мутацию, которая инактивирует систему поглощения глюкозы, делая невозможным поглощение секретируемой глюкозы из среды.

Пример 10. Углеводный анализ молока, ферментированного с использованием мутанта *Streptococcus thermophilus* СНСС16404, обладающего повышенной способностью к ферментации лактозы и способного секретировать глюкозу.

В другом эксперименте концентрации соответствующих сахаров определяют в молоке, ферментированном с использованием СНСС16404. В бутылки, содержащие 9,5% В-молоко с добавлением 0,01, 0,02, 0,03 и 0,05% сахарозы, соответственно, вносят 1% ( $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл) культуры, выращенной в течение ночи в бульоне М17, содержащем 2% сахарозы. Подкисление отслеживают с помощью регистрирующего устройства INTAB PC и программного обеспечения Easyview. После 30 ч подкисления при 40°C отбирают образцы молока для анализа ВЭЖХ, чтобы определить содержание соответствующих сахаров и кислот.

Из табл. 3 видно, что мутант СНСС16404, обладающий повышенной способностью к ферментации лактозы и способный секретировать глюкозу, как ни удивительно, потребляет всю лактозу при всех концентрациях добавленной сахарозы, тестируемых в данном эксперименте. Авторы также отметили, что при добавлении повышенных концентраций сахарозы (например, >0,1 мг/мл) ферментация лактозы не завершается, прежде чем будет достигнуто конечное значение pH. Кроме того, табл. 3 также показывает, что вся лактоза превращается в глюкозу и галактозу и что только часть галактозы используется для ферментации при всех концентрациях добавленной сахарозы. Интересно, что секретируемая глюкоза не поглощается повторно, и в результате в молоке остается более 23,9 мг/мл глюкозы. Поскольку ферментируется примерно 25% галактозы, после ферментации в молоке остается более 16 мг/мл галактозы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что СНСС16404, помимо мутации *glcK*, унаследованной от исходного штамма СНСС15757, также несет мутацию, которая инактивирует систему поглощения глюкозы, делая невозможным поглощение секретируемой глюкозы из среды. Сравнение результатов, приведенных в табл. 3, и результатов, приведенных в табл. 1, с учетом того, что сладость сахарозы принимают за 100, сладость лактозы составляет 16, сладость галактозы составляет 32, а сладость глюкозы составляет 74,3, после вычисления относительной сладости конечного ферментированного продукта, позволяет сделать вывод, что штамм СНСС16404 генерирует сладость примерно в 3,5 раз выше, чем штамм СНСС14994.

Таблица 3. Результаты анализа образцов молока методом ВЭЖХ

Образец	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	
№.	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	
	Лимонная кислота	Молочная кислота	Уксусная кислота	Галактоза	Глюкоза	Лактоза	Сладость
Предел детекции	<1.25	<1.25	<1.25	<1.5	<1.5	<1.5	
Молоко	1.8	1.7	<1.25	<1.5	<1.5	47.6	762
<b>СНСС16404+</b> 0.01% сахарозы	1.9	5.4	<1.25	16.1	23.9	<1.5	2291
<b>СНСС16404+</b> 0.02% сахарозы	2.0	5.6	<1.25	17.0	25.3	<1.5	2424
<b>СНСС16404+</b> 0.03% сахарозы	2.0	5.6	<1.25	16.4	24.1	<1.5	2315
<b>СНСС16404+</b> 0.05% сахарозы	2.1	6.0	<1.25	17.3	25.4	<1.5	2441

Расчет сладости: мг/мл глюкозы·74 + мг/мл лактозы·16 + мг/мл галактозы·32.

Пример 11. Углеводный анализ молока, ферментированного с использованием сочетания штаммов *Streptococcus thermophilus* и штаммов *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

В данном эксперименте определяют концентрации сахаров и органических кислот в молоке, ферментированном с использованием сочетаний штамма *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (выбранного из СНСС759, СНСС10019, СНСС16159 и СНСС16160) и штамма *Streptococcus thermophilus*, в качестве которого используют один из СНСС14994, СНСС15757 и СНСС16404.

Производство йогурта обычно включает в себя использование смешанной заквасочной культуры, содержащей как штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, так и штаммы *Streptococcus thermophilus*. Как правило, молочный субстрат, используемый в производстве йогурта, инокулируют 1 частью *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и 9 частями *Streptococcus thermophilus*. Чтобы проанализировать способность к секреции глюкозы в стандартной установке для производства йогурта, 9,5% В-молоко инокулируют 0,1% культуры *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, выращенной в течение ночи в анаэробных условиях в бульоне HRS-IM, содержащем 2% лактозы, и 0,9% культуры *Streptococcus thermophilus*, выращенной в течение ночи в бульоне M17, содержащем 2% галактозы (CHCC15757) или 2% сахарозы (CHCC16404). Подкисление отслеживают с помощью регистрирующего устройства INTAB PC и программного обеспечения Easyview. После 30 ч подкисления берут образцы молока и проводят анализ методом ВЭЖХ, чтобы определить содержание разных сахаров и кислот. Результаты ВЭЖХ представлены в табл. 4.

Из табл. 4 следует, что 2-дезоксиглюкоза-устойчивые мутантные штаммы CHCC15757 и CHCC16404 *Streptococcus thermophilus* способны секретировать глюкозу в молоко, независимо от того, используют ли их в сочетании с исходным штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, или с мутантным штаммом, устойчивым к 2-дезоксиглюкозе. Однако концентрация глюкозы выше при использовании сочетания 2-дезоксиглюкоза-устойчивых мутантных штаммов обоих видов, например сочетания CHCC15757 и CHCC16159 или сочетания CHCC15757 и CHCC16160. Обнаружено, что при использовании указанных смешанных культур потребляется по меньшей мере 82% лактозы и выделяется от 11,8 до 14,1 мг/мл глюкозы. Подобные результаты получают при использовании штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC15887, который также представляет собой 2-дезоксиглюкоза-устойчивый мутант с мутацией в гене *glcK*.

В то же время присутствие 2-дезоксиглюкоза-устойчивого мутантного штамма в заквасочной культуре также приводит к повышению экскреции галактозы. При использовании сочетания мутантных штаммов, например CHCC15757 и CHCC16159, экскреция галактозы примерно в 3 раза выше (17,1 мг/мл), чем при использовании заквасочной культуры, содержащей соответствующие исходные штаммы CHCC14994 и CHCC10019.

Секреция глюкозы является еще более эффективной, если используют сочетание глюкозо-секретирующего мутантного штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, обладающего повышенной способностью к ферментации лактозы, и 2-дезоксиглюкоза-устойчивых мутантных штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, например сочетание CHCC16404 и CHCC16159 или сочетание CHCC164C4 и CHCC16160.

С учетом того, что сладость сахарозы принимают за 100 (контрольное значение), сладость лактозы составляет 16, сладость галактозы составляет 32, а сладость глюкозы составляет 74, расчет относительной сладости конечного ферментированного продукта, представленного в последней строке табл. 4, позволяет предположить, что разные сочетания штаммов дают определение конечной концентрации остаточной лактозы, глюкозы и галактозы в конечном ферментированном продукте. Для получения йогурта с максимальной внутренней сладостью, обусловленной высокими концентрациями секретируемых глюкозы и галактозы и отсутствием остаточной лактозы, наиболее эффективным является сочетание штаммов CHCC16404 и CHCC16160. С использованием данного сочетания можно получить йогурт в 3,6 раза слаще, чем с использованием соответствующего сочетания из 2-DG-чувствительных штаммов *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, CHCC14994 и CHCC10019, причем в ферментированном молоке не остается детектируемых уровней лактозы.

Таблица 4. Результаты ВЭЖХ-анализа образцов молока, ферментированного смешанными культурами

Образец	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	Кол-во	
	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	
	Лимонная кислота	Молочная кислота	Уксусная кислота	Галактоза	Глюкоза	Лактоза	Сладость
Предел детекции	<1.25	<1.25	<1.25	<1.5	<1.5	<1.5	
Молоко	1.7	<1.25	<1.25	<1.5	<1.5	51.6	
CHCC14994+CHCC10019	1.8	7.6	<1.25	5.7	<1.5	33.6	722
CHCC14994+CHCC16159	1.9	7.7	<1.25	5.6	<1.5	36.4	762
CHCC15757+CHCC10019	1.7	9.7	<1.25	12.9	6.5	13.2	1108
CHCC15757+CHCC16159	2.0	10.4	<1.25	17.1	14.1	9.5	1743
CHCC14994 + CHCC759	1.7	7.4	<1.25	5.6	<1.5	31.6	686
CHCC14994 + CHCC16160	1.8	7.3	<1.25	5.5	<1.5	32.4	693
CHCC15757+CHCC759	2.1	13.8	<1.25	16.6	6.5	12.2	1209
CHCC15757+CHCC16160	2.0	8.7	<1.25	13.2	11.8	8.5	1432
CHCC16404+CHCC10019	2.2	8.1	<1.25	11.5	1.8	24.9	900.1
CHCC16404+CHCC16159	2.2	7.8	1.3	20.9	14.9	3.9	1838.3
CHCC16404+CHCC16160	2.3	7.7	<1.25	23.1	22.3	<1.5	2396.1
CHCC16404*+CHCC10019	2.1	10.7	<1.25	17.7	11.9	3.2	1501.8
CHCC16404*+CHCC16159	2.0	11.0	<1.25	22.2	20.2	<1.5	2211.3
CHCC16404*+CHCC16160	2.1	6.6	<1.25	18.3	25.8	<1.5	2502.5

\* добавление 0,05% сахарозы.

Расчет сладости: мг/мл глюкозы·74 + мг/мл лактозы·16 + мг/мл галактозы·32.

Пример 12. Улучшение роста бифидобактерий путем применения глюкозо-секретирующих мутантов *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Некоторые из наиболее известных пробиотических бактерий, таких как *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® (коммерчески доступные от Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Denmark), плохо растут сами по себе в такой среде, как молоко, содержащее лактозу. В данном эксперименте авторы исследуют влияние сочетания *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® с глюкозо-секретирующим штаммом *Streptococcus thermophilus* или *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Эксперимент 1.

CHCC 5445 (BB-12®) выращивают в анаэробных условиях в течение ночи при 40°C в MRS+0,05% хлорида цистеина.

CHCC14994 выращивают в течение ночи при 40°C в M17, содержащей 2% галактозы.

CHCC 15757 выращивают в течение ночи при 40°C в M17, содержащей 2% галактозы.

Эксперимент 2.

CHCC 5445 (BB-12®) выращивают в анаэробных условиях в течение ночи при 40°C в MRS + 0,05% хлорида цистеина.

CHCC10019 выращивают в течение ночи в анаэробных условиях при 40°C в MRS, содержащей 2% лактозы.

CHCC16159 выращивают в течение ночи в анаэробных условиях при 40°C в MRS, содержащей 2% лактозы.

В шесть бутылок, содержащих 200 мл В-молока, добавляют при 40°C в общей сложности 1% выращенных культур, имеющих сходные оптические плотности, и инкубируют в течение ночи.

1) 1% CHCC 5445 (BB-12®).

2) 0,5% CHCC 5445 (BB-12®)+0,5% CHCC14994.

3) 0,5% CHCC 5445 (BB-12®)+0,5% CHCC15757.

- 4) 1% CHCC5445 (BB-12®).  
 5) 0,5% CHCC 5445 (BB-12®)+0,5% CHCC10019.  
 6) 0,5% CHCC 5445 (BB-12®)+0,5% CHCC16159.

Подкисление происходит только в бутылках 2-3 и 5-6 вследствие плохой эффективности BB-12 в молоке. После ферментации 100 мкл каждой культуры высевают в различных разведениях ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) на чашки с агаром, предназначенные специально для выращивания BB-12®, т.е. содержащие MRS+0,05% хлорида цистеина+10 мкг/мл тетрациклина, и затем инкубируют в течение ночи в анаэробных условиях при 40°C.

Затем путем подсчета определяют число колоний и средний результат приводят в табл. 5 как КОЕ/мл (число колониеобразующих единиц на миллилитр).

Таблица 5. КОЕ/мл BB-12 в кисломолочных культурах

Эксперимент	Культуры	КОЕ/мл
1	1% CHCC 5445 (BB-12)	4,50E+07
1	0,5% CHCC 5445 (BB-12) + 0,5 % CHCC14994	4,00E+07
1	0,5% CHCC 5445 (BB-12) + 0,5 % CHCC15757	4,00E+08
2	1% CHCC 5445 (BB-12)	6,00E+07
2	0,5% CHCC 5445 (BB-12) + 0,5 % CHCC10019	2,00E+07
2	0,5% CHCC 5445 (BB-12) + 0,5 % CHCC16159	1,40E+08

Только тогда, когда глюкозо-секретирующие мутанты *Streptococcus thermophilus*, CHCC15757, и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, CHCC16159, присутствуют вместе с BB-12®, рост BB-12® усиливается, причем в данных культурах общее число клеток, представленное в виде КОЕ/мл, примерно на  $10 \times (1 \log)$  выше. Данный результат позволяет предположить, что глюкозо-секретирующие штаммы можно использовать для того, чтобы повысить содержание пробиотических штаммов, таких как BB-12®, при использовании в смешанных культурах.

Пример 13. Сравнение геномов CHCC15757 и CHCC16404 и определение мутации в гене, кодирующем белок ПС<sup>Man</sup> системы фосфотрансферазы глюкозы/маннозы (PTS).

Препараты геномной ДНК CHCC15757 и CHCC16404 секвенируют в Пекинском институте геномики (BGI, Пекин, Китай), сборку и завершение проводят с использованием программного обеспечения для геномных инструментальных средств CLC (CLCBio, Arhus, Denmark). Геномные последовательности CHCC15757 и CHCC16404 выравнивают с использованием аннотированной геномной последовательности CHRZ1066 в качестве эталона, используя программное обеспечение Mauve 2.3.1. После выравнивания проводят анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP) при помощи бесплатного программного обеспечения Mauve 2.3.1 для CHCC15757 и CHCC16404. В результате идентифицируют замену G на T в кодоне GAA (кодирующем глутаминовую кислоту), соответствующем аминокислотному положению 209, в гене *manM*, кодирующем белок ПС<sup>Man</sup> из PTS глюкозы/маннозы. Данная замена приводит к введению стоп-кодона TAA в положении, соответствующем положению 209 белка (фиг. 3), и, как следствие, к продукции усеченного и нефункционального белка ПС<sup>Man</sup>. Таким образом, предполагают, что данная мутация приводит к предотвращению транспорта глюкозы в клетку через PTS глюкозы/маннозы.

Депонирование и экспертные решения.

По просьбе заявителя образцы депонированных микроорганизмов, указанных ниже, могут быть доступны только для эксперта до даты выдачи патента.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 помещен на хранение в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 3 апреля 2012 года под номером доступа DSM 25850

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15887 помещен на хранение в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 3 апреля 2012 года под номером доступа DSM 25851

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 помещен на хранение в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 12 декабря 2012 года под номером доступа DSM 26722.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC14994 помещен на хранение в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 3 апреля 2012 года под номером доступа DSM 25838.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 помещен на хранение в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 8 сентября 2009 года под номером доступа DSM 22934.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CHCC759 помещен на хранение в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig,

Germany, 6 сентября 2012 года под номером доступа DSM 26419.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC10019 помещен на хранение в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 3 апреля 2007 года под номером доступа DSM 19252.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 помещен на хранение в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 6 сентября 2012 года под номером доступа DSM 26420.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 помещен на хранение в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 6 сентября 2012 года под номером доступа DSM 26421.

Штамм *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CHCC5445 (BB-12®) помещен на хранение в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 30 сентября 2003 года под номером доступа DSM 15954.

Депонирование осуществляют в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

#### Ссылки

WO 2011/026863

Pool *et al.* (2006) *Metabolic Engineering* 8(5); 456-464

Thompson *et al.* (1985) *J. Bacteriol.* 162(1); 217-223

Chervaux *et al.* (2000). *Appl and Environ Microbiol*, 66, 5306-5311

Cochu *et al.* (2003). *Appl and Environ Microbiol*, 69(9), 5423-5432

Nøier *et al.* (2010) *in The Technology of Cheesemaking*, 2<sup>nd</sup> Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Галактоза-ферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus*, где штамм несет мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназы, где указанная мутация частично или полностью инактивирует белок глюкокиназы, что придает штамму устойчивость к 2-дезоксиглюкозе и способность расти с образованием колонии при высевании штрихом на чашки со средой M17, содержащей 2% (мас./об.) лактозы или 2% (мас./об.) галактозы и 20 мМ 2-дезоксиглюкозу после инкубации при 40°C в течение 20 ч, где штамм увеличивает количество глюкозы в 9,5%-ном молоке класса В (В-молоке) по меньшей мере до 5 мг/мл при инокуляции в 9,5% В-молоко в концентрации  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл, и выращивании при 40°C в течение 20 ч, где 9,5% В-молоко представляет собой кипяченое молоко, полученное путем перерастворения снятого сухого молока низкой жирности с получением концентрации сухого вещества 9,5%, пастеризации при 99°C в течение 30 мин и последующего охлаждения до 40°C.

2. Штамм *Streptococcus thermophilus* по п.1, где штамм увеличивает количество глюкозы в 9,5% В-молоке, содержащем 0,05% сахарозы, по меньшей мере до 5 мг/мл при инокуляции в указанное В-молоко в концентрации  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл и выращивании при 40°C в течение 20 ч.

3. Штамм *Streptococcus thermophilus* по п.1, где штамм выбран из группы, включающей штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 DSM 25850, штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15887 DSM 25851, штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 DSM 26722.

4. Композиция для получения кисломолочного продукта, содержащая от  $10^4$  до  $10^{12}$  КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.1-3.

5. Композиция по п.4, где штамм *Streptococcus thermophilus* не способен подкислять 9,5% В-молоко, что определяют как снижение pH менее чем на 1,0 при инокуляции 9,5% В-молока  $10^6$ - $10^7$  КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* и инкубации в течение 14 ч при 40°C, дополнительно содержащая количество сахарозы, эффективное для подкисления 9,5% В-молока.

6. Композиция по п.4 или 5, дополнительно содержащая от  $10^4$  до  $10^{12}$  КОЕ/г штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, устойчивого к 2-дезоксиглюкозе.

7. Композиция по п.6, где штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* выбран из группы, включающей штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 DSM 26420, штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 DSM 26421.

8. Способ получения кисломолочного продукта, включающий инокуляцию и ферментацию молочного субстрата штаммом *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.1-3.

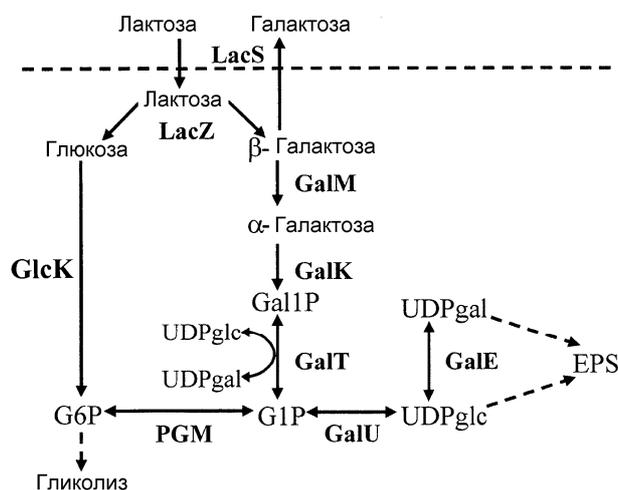
9. Способ по п.8, где в молочный субстрат добавляют сахарозу в количестве, эффективном для подкисления 9,5% В-молока.

10. Способ по любому из пп.8, 9, включающий в себя инокуляцию и ферментацию молочного субстрата композицией по п.6 или 7.

11. Кисломолочный продукт, содержащий штамм *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.1-3.

12. Кисломолочный продукт по п.11, содержащий композицию по п.6 или 7.

13. Применение композиции по п.6 или 7 для получения кисломолочного продукта.
14. Применение композиции по п.6 или 7 для увеличения сладости кисломолочного продукта.
15. Применение композиции по п.6 или 7 для уменьшения содержания лактозы в кисломолочном продукте.
16. Кисломолочный продукт по любому из пп.11, 12, позволяющий избежать симптомов непереносимости лактозы.
17. Применение штамма *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.1-3 для улучшения роста штамма *Bifidobacterium*.
18. Способ скрининга и выделения штамма *Streptococcus thermophilus* по любому из пп.1-3, который не является генетически модифицированным, где способ включает в себя следующие стадии:
- получение пула галактоза-ферментирующих исходных штаммов *Streptococcus thermophilus*;
  - отбор и выделение из указанного пула штаммов *Streptococcus thermophilus*, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе и способных расти с образованием колонии при высевании штрихом на чашки со средой M17, содержащей 2% (мас./об.) лактозы или 2% (мас./об.) галактозы и 20 мМ 2-дезоксиглюкозу после инкубации при 40°C в течение 20 ч; и
  - отбор и выделение из пула штаммов *Streptococcus thermophilus*, полученных на стадии б), штаммов *Streptococcus thermophilus*, скорость роста которых в среде M17, содержащей 2% (мас./об.) галактозы выше по меньшей мере на 5%, чем в среде M17, содержащей 2% глюкозы (мас./об.).
19. Способ по п.18, где галактоза-ферментирующий исходный штамм выбирают из группы, включающей штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC14994 DSM 25838 и штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 DSM 22934.



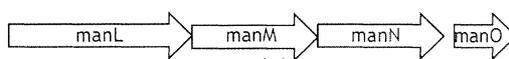
Фиг. 1

```

MetSerLysLys LeuLeuGly IleAspLeu GlyGlyThrThr ValLysPhe GlyIleLeu ThrAlaAspGly GluValGln GluLysTrp AlaIleGluThr
.....
1  ATGAGTAAGA AACCTCTAGG TATTGACCTT GGTGGAACAA CTGTTAAGTT TGGTATTTTG ACTGCAGATG GTGAAGTTCA AGAAAAATGG GCTATTGAAA
.....
TAsnThrPhe GluAsnGly SerHisIleVal ProAspIle ValGluSer LeuLysHisArg LeuGluLeu TyrGlyLeu ThrAlaGluAsp PheIleGly
.....
101  CAAATACGTT TGAANAATGGT ACCACATTG TTCCAGACAT TGTAGAATCT TTGAACACCC GPTTGGAAAT GTATGGACTT ACTGCTGAAG ATTTTATTGG
.....
Pro
IleGlyMet GlySerProGly AlaValAsp ArgGluAsn LysThrValThr GlyAlaPhe AsnLeuAsn TrpAlaGluThr GlnGluVal GlySerVal
.....
201  AATGGTATG GGATCTCCAG GTGCAGTTGA CCGAGAAAAA AAAACAGTAA CGGTGCCTT TAACTTGAAC TGGGCAGAAA CTCAAGAAGT TGGCTCTGTT
.....
CHCC15887
C
IleGluLysGlu LeuGlyIle ProPheAla IleAspAsnAsp AlaAsnVal AlaAlaLeu GlyGluArgTrp ValGlyAla GlyAlaAsn AsnArgAsnVal
.....
301  ATTGAAAAAG AACCTGGTAT TCCATTGCGT ATTGATAATG ATGCTAATGT GGTGCACCTG GGTGAACGTT GGGTTGGTGC TGGTGTACAC AATCGGAATG
.....
Ile
VValPheIle ThrLeuGly ThrGlyValGly GlyGlyVal IleAlaAsp GlyAsnLeuIle HisGlyVal AlaGlyAla GlyGlyGluIle GlyHisIle
.....
401  TTGCTTTTAT AACATGGGT ACAGGTGTTG GTGGCGGTGT TATCGCTGAT GGTAACCTAA TTCATGGTGT TCCCGGTGCT GGTGGGAAA TTGTCACAT
.....
CHCC15757
T
IleValGlu ProAspThrGly PheGluCys ThrCysGly AsnLysGlyCys LeuGluThr ValAlaSer AlaThrGlyIle ValArgVal AlaHisHis
.....
501  TATTGTTGAA CCTGACACAG GATTTGAGTG TACTTGCGGA AACAAAGGGT GTCTGGAAAC TGTAGCTTCA GCAACAGGTA TTGTACGTGT AGCACATCAT
.....
LeuAlaGluLys TyrGluGly AsnSerSer IleLysAlaAla ValAspAsn GlyGluPhe ValThrSerLys AspIleIle ValAlaAla ThrGluGlyAsp
.....
601  TTGGCAGAAA AATACGAAGG AAACCTCTCT ATTAAAGCTG CTGTAGACAA TGGTGAGTTT GTGACAAGTA AAGATATTAT CGTAGCTGCT ACTGAAGGTTG
.....
ALysPheAla AspSerIle ValAspLysVal SerLysTyr LeuGlyLeu AlaThrAlaAsn IleSerAsn IleLeuAsn ProAspSerVal ValIleGly
.....
701  ATAAGTTTGC TGACAGCAAT GTTGATAAAG TCTCTAAATA CCTCGGACTT GCAACAGCAA ACATCTCAA CAITCTTAAC CCAGATTCTG TCGTTATCGG
.....
GlyGlyVal SerAlaAlaGly GluPheLeu ArgSerArg ValGluGlyTyr PheThrArg TyrAlaPhe ProGlnValArg ArgThrThr LysValLys
.....
801  TGGTGGTGT TCTGCCGAG GAGAATTCTT GCGTAGTCGT GTTGAAGGAT ACTTTACAG TTATGCATTC CCACAAGTTC GCGTACAAC AAAAGTGAAA
.....
LeuAlaGluLeu GlyAsnAsp AlaGlyIle IleGlyAlaAla SerLeuAla TyrSerIle AspLys* (SEQ ID NO. 2)
.....
901  TTAGCGGAGC TTGGAATGA TGCAGGAATC ATTGAGCTG STAGTCTTGC TTATAGTATT GACAAATAA (SEQ ID NO. 1)

```

Фиг. 2



```

209
CHCC15757...ATGGCTACTCGTGAAGTTTGG...
CHCC16404...ATGGCTACTCGTTAA

```

Met Ala Thr Arg \*

Фиг. 3

```

      M S D M S I I S A I L V V A V A F L A G
1  ATGTCAGATA TGCAATTAT TTCTGCGATT TTGGTCGTAG CTGTTGCCTT CCTGCTGGT
   L E S I L D Q F Q F H Q P L V A C T L I
61  CTTGAAAGTA TCCTTGACCA ATTCCAATTC CACCAACCAC TTGTTGCATG TACCCTCATC
   G A A T G N L T A G I M L G G S L Q M I
121 GGTGCTGCCA CAGGTAACCT CACTGCAGGT ATCATGCTTG GTGGTTCTCT TCAAATGATT
   T L A W A N I G A A V A P D V A L A S V
181 ACCCTTGCTT GGGCAAACAT CGGTGCTGCC GTAGCTCCTG ACGTTGCCCT TGCATCTGTT
   A A A I I L V K G G K F T A E G I G V A
241 GCCGCTGCCA TCATTTGGT TAAAGGTGGT AAATTTACAG CTGAAGGTAT CGGTGTTGCC
   I A I A I L L A V A G L F L T M P V R T
301 ATTGCAATAG STATCCTGCT TGCAGTTGCA GGTCTCTTCC TAACTATGCC TGTTCTGACA
   A S I A F V H A A D K A A E H G N I A G
361 GCATCTAATG CCTTGTGTC A TGCTGCAGAT AAAGCTGCAG AACACGGAAA CATCGCTGGT
   V E R A Y Y L A L L L Q G L R I A V P A
421 GTTGAACGTG CATACTACCT CGCTCTCCTT CTTCAAGGTT TGGTATTGC TGTGCCAGCA
   A L L L A I P A Q S V Q H A L G L M P D
481 GCCCTTCTTC TTGCCATCCC GGCCCAATCT GTTCAACATG CCCTTGGCTT GATGCCCTGAC
   W L T H G L V V G G G M V V A V G Y A M
541 TGGCTCACCC ATGGTTTGGT TGTCGGTGGT GGTATGGTCG TAGCCGTTGG TTACGCCATG
   I I N M M A T R E V W P F F A I G F A L
601 ATTATCAATA TGATGGCTAC TCGTGAAGTT TGGCCATTCT TCGCCATTGG TTTTGCTTTG
CHCC16404 T
      A A I S Q L T L I A L S T I G V A I A F
661 GCAGCAATTA GCCAATTGAC ACTTATCGCT CTTAGTACCA TTGGTGTTC CATCGCCTTC
   I Y L N L S K Q G G G N G G G N G G G T
721 ATCTACCTCA ACCTTCTAA ACAAGGTGGC GGAAATGGTG GCGGAAATGG TGGCGGAACT
   S S G S G D P I G D I L E D Y (SEQ ID NO.6)
781 TCATCTGGTT CAGGCGACCC AATCGCGCAT ATCTTGAAG ACTAC (SEQ ID NO.5)

```

Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2