

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035622**

(13) **B1**

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

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.16
- (21) Номер заявки
201501120
- (22) Дата подачи заявки
2015.12.14
- (51) Int. Cl. *A23C 19/032* (2006.01)
A23C 19/06 (2006.01)
A23C 19/14 (2006.01)
A23L 33/18 (2016.01)

(54) **СПОСОБ ПРОИЗВОДСТВА СЫРА ТИПА ШВЕЙЦАРСКОГО**

- (31) **2014027; 15156385.5**
- (32) **2014.12.19; 2015.02.24**
- (33) **NL; EP**
- (43) **2016.06.30**
- (56) **WO-A2-2003005963**
US-B1-6833150
WO-A2-2014038946
US-A1-20010033879
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СиЭсКей ФУД ЭНРИЧМЕНТ Б.В.
(NL)
- (72) Изобретатель:
Мейер Виллем Корнелис, Серрано
Давалос Лурдес Марьела, Смалбринк
Лекс (NL)
- (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

-
- (57) Изобретение относится к усовершенствованному способу производства творога и производства сыра из указанного творога, в частности сыра типа швейцарского, в котором в исходный продукт вносят заквасочную культуру, включающую штамм встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, штамм лактобактерий и источник лактицина. Настоящее изобретение, кроме того, относится к творогу и сырам, получаемым этим способом, а также к заквасочной культуре для производства сыра, включающей штамм встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, штамм лактобактерий и источник лактицина.

B1

035622

035622

B1

Изобретение относится к усовершенствованному способу производства сыра, в частности сыра типа швейцарского, а также сырам, полученным таким образом, и заквасочным культурам, которые могут использоваться в этом способе.

Уровень техники

Руководствуясь предпочтением потребителей, молочная промышленность постоянно стремится получить подвергнутые минимальной технологической обработке пищевые продукты, которые не содержат искусственные консервирующие вещества. В связи с этим большое внимание направлено на предотвращение роста и/или уничтожение *Listeria spp.* и/или *Clostridia spp.* посредством использования бактериоцинов, продуцируемых микроорганизмами, которые в целом признаны безвредными (GRAS), включая многие лактобактерии (LAB). Бактериоцины представляют собой рибосомно синтезируемые противомикробные соединения, которые продуцируются многими различными видами бактерий. Лактицин является известным бактериоцином, например, из WO 96/32482, и, как известно, активен по отношению к грамположительным бактериям.

Способы приготовления сыров типа швейцарского известны, например, из WO 01/70037, US 4242362, US 5006343 и WO 2006/098972. В известных способах приготовления сыров типа швейцарского (или сыра типа гауда) загрязнение болезнетворными микроорганизмами или факторами предотвращают посредством добавления лизоцима или нитрата к молоку для сыроделия, промывания творога нитратом и/или бактофугации. Для дополнительных пояснений (в отношении сыра типа гауда) см., например, Van den Berg et al. in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition - Volume 2: Major Cheese Groups, 2004, 133-134. Эти способы нежелательны по ряду причин, включая экологические или правовые аспекты или обоснования эффективности процесса.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к усовершенствованному способу производства творога и производства сыра, в частности сыра типа швейцарского. Способ в соответствии с настоящим изобретением включает производство творога из исходного продукта в присутствии встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* и источника лактицина, при этом способ включает (а) внесение в исходный продукт заквасочной культуры, включающей штамм встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, штамм лактобактерий и источник лактицина. Предпочтительно, когда штамм лактобактерий функционирует в качестве источника лактицина. Таким образом, для абсолютно ясного понимания и как в деталях объяснено также ниже, способ в соответствии с настоящим изобретением включает производство творога из исходного продукта в присутствии встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* и источника лактицина, при этом способ включает (а) внесение в исходный продукт заквасочной культуры, включающей штамм встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, штамм лактобактерий и источник лактицина, причем штамм лактобактерий может представлять собой или может включать источник лактицина.

Настоящее изобретение также относится к способу производства сыра, в частности сыра типа швейцарского, в котором используется творог, полученный с помощью вышеуказанного способа, и который включает производство сыра из указанного творога. Настоящее изобретение также относится к заквасочной культуре, которая может использоваться в способах в соответствии с настоящим изобретением, и к творогу и сыру, получаемому таким образом. Кроме того, настоящее изобретение относится к применению заквасочной культуры для производства творога и/или сыра и к применению творога для производства сыра. В качестве примера эффективности способа в соответствии с настоящим изобретением, авторы настоящего изобретения показали, что сыр типа сыра Маасдам легко приготовить в присутствии заквасочной культуры, включающей штамм лактококков, способный продуцировать лактицин, и штамм *P. freudenreichii*.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что использование источника лактицина в качестве бактериоцина является эффективным для предотвращения прорастания спор *Clostridium tyrobutyricum*, но не очень препятствовало активности встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*. Использование источника лактицина в сочетании с встречающимися в молочных продуктах *Propionibacteria* предлагалось в известном уровне техники. Способ приготовления сыра в присутствии *Propionibacteria* в соответствии с настоящим изобретением обладает некоторыми основными преимуществами относительно способов известного уровня техники. Поскольку источник лактицина присутствует, рост нежелательных микроорганизмов, таких как штаммы *Listeria* и/или штаммы или споры *Clostridia*, предотвращается в силу бактериоцидной природы лактицина. По этой причине другие меры по предотвращению таких нежелательных микроорганизмов не требуются, не требуется, например, промывание творога нитратом, добавление нитрата к исходному продукту (в особенности молоку) и бактофугация молока для сыроделия. Помимо очевидных недостатков, касающихся длительности процесса и вложения в оборудование, минусом бактофугации является то, что могут оставаться споры, которые выдерживают умеренную термическую обработку. Промывание нитратом или его добавление может обеспечить лучшее уничтожение спор, но становится все в большей степени желательным ввиду заботы о здоровье и требований законодательства.

Кроме того, *Propionibacteria* очень чувствительны к нитрату. Дополнительным преимуществом ис-

пользования источника лактицина, чтобы, по крайней мере частично, заместить нитрат, является то, что на прорастание самих встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* не оказывает или оказывает, по крайней мере, менее негативное влияние нитрата. Способы решения известного уровня техники, чтобы уменьшить ингибирующий эффект нитрата на *Propionibacteria* при приготовлении сыра Маасдам или эментальского сыра, включают использование лактобактерий в качестве дополнительных культур. Хотя использование лактобактерий в качестве дополнительных культур может оставаться выгодным, например, для создания специфических вкусовых особенностей, они не нужны для их свойств уменьшения ингибирующего эффекта нитрата самих по себе. Таким образом, в одном варианте осуществления способ приготовления творога и/или способ приготовления сыра в соответствии с настоящим изобретением не включает стадию промывания творога нитратом или стадию добавления нитрата к исходному продукту.

Перечень предпочтительных вариантов осуществления

1. Способ производство творога из исходного продукта в присутствии встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* и источника лактицина, который включает (а) внесение в исходный продукт заквасочной культуры, включающей штамм встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, штамм лактобактерий и источник лактицина.

2. Способ в соответствии с вариантом осуществления 1, в котором источник лактицина включает источник лактицина 3147.

3. Способ в соответствии с вариантом осуществления 1 или 2, в котором встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria* включают штамм *P. johnsonii*, штамм *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, штамм *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* или их смесь.

4. Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в котором штамм лактобактерий включает источник лактицина, и в котором предпочтительно источник лактицина включает штамм *Lactococcus lactis*.

5. Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в котором источником лактицина является бактериальный штамм, способный продуцировать лактицин, причем предпочтительно бактериальным штаммом является штамм *Lactococcus lactis* subsp., наиболее предпочтительно штамм *L. lactis* subsp. *lactis*, штамм *L. lactis* subsp. *cremoris* или штамм *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

6. Способ в соответствии с вариантом осуществления 5, в котором источником лактицина является штамм лактококков, содержащий плазмиду pMRC01.

7. Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в котором штамм лактобактерий, кроме того, включает штамм *Streptococcus thermophilus*, предпочтительно штамм *Streptococcus thermophilus*, который был адаптирован к лактицину.

8. Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в котором заквасочная культура, кроме того, включает штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp., предпочтительно штамм *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.

9. Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в котором заквасочная культура, кроме того, включает штамм *Lactobacillus helveticus* и/или штамм *Lactobacillus acidophilus*.

10. Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в котором исходный продукт включает молоко.

11. Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, включающий, кроме того, (b) разрезание творога и/или (c) осушение творога.

12. Способ в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в котором заквасочная культура не включает источник низина и/или источник бактериоцина типа Па.

13. Заквасочная культура для приготовления творога и/или сыра, включающая встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria*, штамм лактобактерий и источник лактицина, предпочтительно источник лактицина 3147.

14. Заквасочная культура в соответствии с вариантом осуществления 13, в которой штамм лактобактерий включает источник лактицина, и в которой предпочтительно источник лактицина включает штамм *Lactococcus lactis*.

15. Заквасочная культура в соответствии с вариантом осуществления 13 или 14, в которой источником лактицина является бактериальный штамм способный продуцировать лактицин, причем предпочтительно бактериальным штаммом является штамм *Lactococcus lactis* subsp., наиболее предпочтительно штамм *L. lactis* subsp. *lactis*, штамм *L. lactis* subsp. *cremoris* или штамм *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

16. Заквасочная культура в соответствии с любым из вариантов осуществления 13-15, включающая, кроме того, один или более штаммов, выбираемых из *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*.

17. Заквасочная культура в соответствии с любым из вариантов осуществления 13-16, включающая, кроме того, штамм *Lactobacillus acidophilus* и/или *Lactobacillus helveticus*.

18. Заквасочная культура в соответствии с любым из вариантов осуществления 13-17, включающая,

кроме того, штамм *Streptococcus thermophilus*, предпочтительно штамм *Streptococcus thermophilus*, который был адаптирован к лактицину.

19. Способ производства сыра, который включает (d) производство сыра из творога, причем творог получают способом по любому из вариантов осуществления 1-12.

20. Способ в соответствии с вариантом осуществления 19, в котором сыром является сыр типа эментальского сыра или типа сыра Маасдам, предпочтительно типа сыра Маасдам.

21. Способ в соответствии с вариантом осуществления 19 или 20, причем сыр имеет глазки, глазки составляют предпочтительно по крайней мере 1, более предпочтительно по крайней мере 3, наиболее предпочтительно по крайней мере 5 об.% сыра.

22. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 19-21, который (d) включает прессование и формование творога, добавление соли к творогу для образования молодого сыра, предпочтительно вакуумную упаковку молодого сыра в фольгу или предоставление молодому сыру покрытия для сыров и созревание необязательно упакованного в фольгу или покрытого молодого сыра.

23. Применение заквасочной культуры в соответствии с любым из вариантов осуществления 13-18 для производства творога и/или сыра.

24. Творог, получаемый способом в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-12.

25. Сыр, получаемый способом в соответствии с любым из вариантов осуществления 19-22.

26. Творог в соответствии с вариантом осуществления 24 или сыр в соответствии с вариантом осуществления 25 с содержанием низина, составляющим менее чем 50 МЕ на грамм, и с содержанием бактерицина типа Па, в особенности с содержанием плантарицина, которое не является эффективным для предотвращения прорастания спор *Listeria monocytogenes*.

27. Применение творога в соответствии с вариантом осуществления 24 или 26 для производства сыра, предпочтительно сыра типа швейцарского, наиболее предпочтительно сыра типа Маасдам.

Подробное описание настоящего изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к способу производства творога. Во втором аспекте настоящее изобретение относится к заквасочной культуре, подходящей для применения в способе настоящего изобретения для производства творога, и к применению заквасочной культуры при производстве творога и/или сыра. В третьем аспекте настоящее изобретение относится к творогу и к применению указанного творога при производстве сыра. В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу производства сыра. В пятом аспекте настоящее изобретение относится к сыру.

Процесс приготовления творога.

Настоящее изобретение относится в первом аспекте к усовершенствованному способу производства творога из исходного продукта. Творог, полученный соответственно, подходит, в частности, для производства сыров типа швейцарского. Производство сыров типа швейцарского характеризуется внесением в исходный продукт, обычно исходный продукт для сыроделия, такой как молоко (для сыроделия), встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* при приготовлении творога. Сыром предпочтительно является сыр соленого типа. Предпочтительно, когда творог не является засоленным. В связи с настоящим изобретением сыры типа швейцарского включают любой тип сыра, производство которого осуществляется в присутствии встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, такой как *Emmentaler* и *Maasdammer*. Способ в соответствии с настоящим изобретением включает производство творога из исходного продукта в присутствии встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*. и источника лактицина, при этом способ включает (а) внесение в исходный продукт заквасочной культуры, включающей штамм встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, штамм лактобактерий и источник лактицина.

Способы приготовления творога хорошо известны в данной области техники, и настоящее изобретение охватывает все их известные варианты, если в исходный продукт вносят заквасочную культуру в соответствии с настоящим изобретением, включающую встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria*, штамм лактобактерий и источник лактицина. Внесение в исходный продукт для сыроделия заквасочной культуры является хорошо известной процедурой в молочной промышленности и является частью процесса приготовления сыров. После внесения как в (а) происходит сбраживание, причем образуются, по крайней мере, пропионовая кислота (или пропионат) и CO_2 . Встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria* способны превращать глюкозу или молочную кислоту (или лактат), среди прочего, в пропионовую кислоту (или пропионат) и CO_2 . Как правило, подвергнутый инокуляции исходный продукт для сыроделия оставляют на соответствующий промежуток времени (например, 4-48 ч) при подходящей для встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* температуре для продукции CO_2 , которая обычно находится в диапазоне 15-30°C. Скисание исходного продукта, которое происходит во время (а), как правило, вызывает коагуляцию казеиновых белков, хотя добавочные белки, присутствующие в исходном продукте для сыроделия, например сывороточные белки, могут также подвергаться коагуляции в некоторой степени. Подвергнутые коагуляции белки, как правило, подвергаются агрегации в твердые массы, которые называют в данной области техники творогом. Процесс коагуляции и агрегации также называют створаживанием. Коагуляция, как правило, усиливается при добавлении коагулянта, такого как химозин. Добавление коагулянта является предпочтительно частью (а), причем коагулянт и

заквасочную культуру, как правило, добавляют в одно и то же время к исходному продукту, хотя коагулянт может также добавляться к исходному продукту до (а) или к подвергнутому инокуляции исходному продукту после (а). Является подходящим любой коагулянт, известный в данной области техники, который включает химозин животных, микробный коагулянт, продуцируемый при сбраживании химозина, кислоты и соли (в особенности хлорид кальция). Предпочтительно, когда химозин или микробный коагулянт (например, полученный из *Rhizomucor miehei*) используют в качестве коагулянта.

Во время (а) множество бактериальных штаммов добавляют к исходному продукту. Такое добавление множества бактериальных штаммов может происходить одновременно, т.е. смесь штаммов добавляют к исходному продукту, или последовательно, т.е. бактериальные штаммы добавляют в виде двух или более порций к исходному продукту. Все бактериальные штаммы, которые добавляют к исходному продукту, вкуче называют заквасочной культурой, независимо от того, добавляют ли штаммы сразу или в виде отдельных порций. Следует отметить, что химозин не является частью заквасочной культуры. Стадия (а) может, таким образом, включать многократные добавления бактериальных штаммов к исходному продукту. Заквасочная культура, которую добавляют в (а), к тому же определена ниже.

Способ производства творога в соответствии с настоящим изобретением может включать, кроме того, обработку творога, образованного в (а), предпочтительно для получения творога, который готов к применению в способе производства сыра, предпочтительно в способе в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения. Такая добавочная обработка, как правило, включает разрезание творога, осушение творога, пастеризацию творога и/или прессование творога. Способ в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предпочтительно включает (b) разрезание творога и/или (c) осушение творога, предпочтительно творог, по крайней мере, осушают. Предпочтительно, когда творог сначала разрезают (b), и разрезанный творог затем осушают от исходного продукта для сыростения (c), хотя осушение может также иметь место до разрезания. Осушенный и предпочтительно разрезанный творог предпочтительно подвергают пастеризации, при этом творог "подвергают тепловой обработке" или "подвергают пастеризации", и/или прессованию, при этом творог прессуют. Прессование творога, как правило, имеет место после пастеризации. Температура тепловой обработки во время пастеризации может находиться в диапазоне 30-55°C, например в диапазоне 32-45°C, предпочтительно 35-37°C в случае сыра типа сыра Маасдам, между тем как температура тепловой обработки для сыра типа эмментального сыра находится, как правило, в диапазоне 46-55°C, предпочтительно 50-53°C. Это различие в температуре тепловой обработки дает характеристическое различие между сырами типа сыра Маасдам и типа эмментального сыра, поскольку оно приводит к значительному различию во влагосодержании подвергнутого тепловой обработке творога. Наиболее предпочтительно, когда способ производства творога в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения включает разрезание творога, осушение творога, пастеризацию творога и прессование творога, как описано здесь выше. В предпочтительном варианте осуществления способ производства творога в соответствии с настоящим изобретением не включает стадию промывания творога нитратом и/или добавление нитрата к исходному продукту. В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления способ производства творога в соответствии с настоящим изобретением не включает стадию промывания творога нитратом, добавления нитрата к исходному продукту и бактофугацию исходного продукта. Наиболее предпочтительно, способ производства творога в соответствии с настоящим изобретением не включает стадии промывания творога нитратом, добавления нитрата к исходному продукту и бактофугацию исходного продукта.

Исходный продукт может быть любым субстратом, который, как известно в данной области техники, является подходящим для приготовления творога и сыра из творога. Исходный продукт может также упоминаться как "исходный продукт для творога" или "исходный продукт для сыростения". Как правило, исходным продуктом является молоко, например коровье молоко, козье молоко, буйволиное молоко, овечье молоко. Молочные смеси могут также использоваться в качестве исходного продукта для сыростения. Предпочтительно исходный продукт для сыростения включает коровье молоко, наиболее предпочтительно, когда исходным продуктом для сыростения является коровье молоко. Исходный продукт для сыростения является предпочтительно пастеризованным, хотя также подходит сырое молоко.

Альтернативно, хотя менее предпочтительно, исходный продукт для сыростения может уже включать творог, в который добавлена заквасочная культура в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, исходный продукт предпочтительно включает молоко и/или творог.

Заквасочная культура.

Использование заквасочных культур для приготовления творога или сыра известно в данной области техники. Заквасочная культура в соответствии с настоящим изобретением, которую используют для внесения в исходный продукт в способе в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, находится, как правило, в замороженной, лиофилизированной или высушенной распылением форме, предпочтительно в замороженной форме, и включает встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria*, штамм лактобактерий и источник лактицина. В предпочтительном варианте осуществления штамм лактобактерий способен продуцировать лактицин, как описано к тому же ниже. В этом варианте осуществления штамм лактобактерий включает или представляет собой источник лактицина, и заквасочная культура в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно не включает отдельный источник лактицина помимо штамма лактобактерий, способного к продукции лактицина. Альтернативно, заквасочная

культура в соответствии с настоящим изобретением включает штамм лактобактерий и отдельный источник лактицина, описанный к тому же ниже. Заквасочная культура в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно характеризуется оптимальной температурой для роста в молоке, предпочтительно дополненным дрожжевым экстрактом, в диапазоне 20-45°C, более предпочтительно 25-43°C.

Встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria*, как известно в данной области техники, подходят в качестве заквасочной культуры при приготовлении сыров типа швейцарского и могут быть определены как грамположительные, неспорообразующие, неподвижные плеоморфные палочки, способные к образованию пропионовой кислоты в качестве конечного продукта их метаболизма. Встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria* включают, предпочтительно представляют собой одну или более бактерий, выбираемых из группы, состоящей из *P. acidipropionici*, *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii* subsp. *P. jensenii*, *P. microaerophilum* и *P. thoenii*. Дальнейшее руководство можно найти в Cousin et al., Dairy Sci. Technol., 2011, 91, 1-26. *P. freudenreichii* subsp. Являются предпочтительными видами встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, и предпочтительно их выбирают из группы, состоящей из *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* и *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. Наиболее предпочтительно, когда встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria*, включаемые в заквасочную культуру в соответствии с настоящим изобретением, выбирают из штамма *P. johnsonii*, штамма *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* и штамма *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* и их смесей.

Встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria*, которые включают в заквасочную культуру в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно характеризуются обладанием значения МИС, составляющего 5 мг или больше, более предпочтительно 10 мг или больше, даже более предпочтительно 25 мг или больше, даже более предпочтительно 50 мг или больше, наиболее предпочтительно 100 мг или больше для лактицина 3147 на 1 л среды для выращивания. Здесь термин "МИС" имеет обычное значение "минимальная ингибирующая концентрация" и представляет собой наименьшую концентрацию противомикробного средства (в настоящем случае лактицина 3147), которая будет ингибировать видимый рост микроорганизма после инкубации в течение ночи. Значения МИС для лактицина 3147 или других бактериоцинов, как правило, определяют согласно следующему тесту: штаммы *Propionibacterium* выращивают из отдельной колонии на протяжении 2-3 ночей (SLA, 30°C, в анаэробных условиях) до достижения мутности. 3% инокулята вносят в свежую среду SLA и инкубируют в течение приблизительно 7 ч до достижения ОП600=0,5. Из результирующей культуры 10^5 КСЕ/мл инокулируют в 96-луночные титрационные микропланшеты, содержащие свежую среду SLA, включающую лактицин 3147, или другой бактериоцин, находящийся в диапазоне концентраций от 100 до 0,01 мг/л (высокая концентрация слева, низкая концентрация справа). Рост после инкубации при 30°C в анаэробных условиях в течение 19-24 ч визуально оценивают путем проверки мутности слева направо. Значения МИС определяют по последней лунке, в которой не наблюдается видимый рост (среднее значение определений в трех повторях). Вышеупомянутый протокол в соответствующих условиях роста может использоваться для получения значений МИС других штаммов, например *Lactoabacilli*, *Clostridia*, и т.д., по отношению к лактицину 3147 или другим бактериоцинам, таким как низин. Интересно заметить, как к тому же подробно описано в примере 1, что все четыре исследованных штамма *Propionibacterium freudenreichii* имели значение МИС >5 мг/л лактицина 3147, и 3 из 4 исследованных штамма имели значение МИС >50 мг/л лактицина 3147. В то же время значения МИС по отношению к низину были по крайней мере в 20 раз меньше.

Предпочтительно, когда количество встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, включаемых в заквасочную культуру, таково, что в (а) по крайней мере 10^2 КОЕ встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* добавляют к 1 г исходного продукта, более предпочтительно 1×10^3 - 1×10^8 КОЕ/г исходного продукта, наиболее предпочтительно 1×10^4 - 1×10^7 КОЕ/г исходного продукта. Следует отметить, что в заквасочной культуре в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно и эффективно используются немодифицированные или встречающиеся в природе *Propionibacteria* в качестве встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* по той причине, что они предпочтительно неспособны к продукции лактицина посредством включения плазмиды, также они предпочтительно не десенсибилизируются или не адаптируются к какому-либо бактериоцину, в особенности к низину или лактицину.

Заквасочная культура включает штамм лактобактерий. Лактобактерии известны в данной области техники и могут быть определены как грамположительные, неспорообразующие, анаэробные, негативные по каталазе кокки или палочки, образующие молочную кислоту в качестве конечного продукта их углеводного метаболизма. Хорошо известные роды включают *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactospaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* и *Weissella*. Во время своего роста лактобактерии могут образовывать метаболиты, отличные от молочной кислоты. Эти метаболиты могут вносить вклад в желаемые органолептические свойства продукта. Некоторые из этих метаболитов могут включать, например, диацетил, ацетальдегид и экзополисахариды. Предпочтительные штаммы лактобактерий, включаемых в заквасочную культуру в соответствии с настоящим изобретением, включают *Lactococcus lactis* и *Streptococcus thermophilus*. Предпочтительно штаммом лактобактерий является штамм *L. lactis* и/или штамм *S. thermophilus*. В предпочтительном ва-

рианте осуществления штамм лактобактерий используется в качестве источника лактицина, причем штамм способен к продукции лактицина, наиболее предпочтительно заквасочная культура включает *L. lactis*, способный к продукции лактицина, в качестве штамма лактобактерий и в качестве источника лактицина. Наиболее предпочтительно, когда источник лактицина включает штамм *Lactococcus lactis* subsp., способный к продукции лактицина 3147, более предпочтительно включающий плазмиду pMRC01.

Заквасочная культура также включает источник лактицина, предпочтительно источник лактицина 3147 и/или 481, наиболее предпочтительно источник лактицина 3147. Поскольку лактицин 3147 является предпочтительным лактицином применительно к настоящему изобретению, все сказанное здесь о лактицине в общем в равной степени применимо конкретно к лактицину 3147. О бактериоцидной активности лактицина 3147 известно, например, из WO 96/32482 или WO 99/67287 (при этом обе из них включены сюда посредством ссылки) и Callanan and Ross in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition - Volume 1: General Aspects, 2004, 153-154, а о бактериоцидной активности лактицина 481, например, из Dufour et al. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007, 134-167. Поскольку известно, что лактицин активен по отношению к большинству грамположительных бактерий, было неожиданным, что присутствие лактицина все-таки допускало активность встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* в способе приготовления творога в соответствии с настоящим изобретением. И тем более, поскольку было описано, что лактицин 3147 эффективен против встречающихся на коже *Propionibacteria*, см. WO 99/66949. Авторы настоящего изобретения также неожиданно обнаружили, что присутствие лактицина все-таки допускало то, что встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria*, даже когда они сами были неспособны к продукции лактицина, были эффективны в способе приготовления творога в соответствии с настоящим изобретением. Также на некоторые виды *Lactobacillus*, как ни удивительно, не оказывало влияние присутствие лактицина. Предпочтительно, когда источником лактицина является бактериальный штамм, более предпочтительно штамм лактобактерий, наиболее предпочтительно штамм лактококков, который способен к продукции лактицина, предпочтительно лактицина 3147. Бактериальным штаммом, способным к продукции лактицина, является предпочтительно штамм *Lactococcus lactis* subsp., наиболее предпочтительно штамм *L. lactis* subsp. *lactis*, штамм *L. lactis* subsp. *cremoris* или штамм *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Как правило, штамм способен к продукции лактицина по причине включения плазмиды. Подходящей плазмидой, используемой в этой связи, является pMRC01. Методы создания таких продуцирующих лактицин штаммов лактобактерий известны в данной области техники, см., например, WO 96/32482. Таким образом, источником лактицина является предпочтительно бактериальный штамм, более предпочтительно штамм лактобактерий, даже более предпочтительно штамм лактококков, содержащий плазмиду pMRC01. Предпочтительно, когда штамм *Lactococcus lactis* subsp. используют в качестве источника лактицина, более предпочтительно штамм *L. lactis* subsp. *lactis*, штамм *L. lactis* subsp. *cremoris* или штамм *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, который способен к продукции лактицина, наиболее предпочтительно лактицина 3147, и причем указанный штамм *Lactococcus lactis* subsp. предпочтительно включает плазмиду pMRC01.

В предпочтительном варианте осуществления заквасочная культура включает штамм *Lactococcus lactis* subsp., способный к продукции лактицина, в особенности лактицина 3147, и штамм встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*. Таким образом, заквасочная культура здесь включает *Lactococcus lactis* subsp. в качестве штамма лактобактерий и источник лактицина. Здесь указанный штамм лактококков предпочтительно включает плазмиду pMRC01, а штамм встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* предпочтительно включает штамм *Propionibacterium freudenreichii* subsp. или штамм *Propionibacterium johnsonii* или их смесь. Таковую заквасочную культуру предпочтительно используют при приготовлении сыра типа сыра Маасдам. Заквасочная культура может, кроме того, включать придающую вкус дополнительную культуру, такую как штамм *Lactobacillus*, в особенности штамм *Lactobacillus helveticus* и/или штамм *Lactobacillus acidophilus*. В настоящем варианте осуществления заквасочная культура - необязательно включающая какой-либо штамм *Lactobacillus* subsp. - предпочтительно характеризуется оптимальной температурой для роста в молоке, необязательно дополненном дрожжевым экстрактом, в диапазоне 20-37°C, более предпочтительно 25-35°C, наиболее предпочтительно 25-30°C.

В другом варианте осуществления для приготовления сыра типа сыра Маасдам заквасочная культура включает штамм *Lactococcus lactis* subsp., способный к продукции лактицина, в особенности лактицина 3147, штамм встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* и штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp, предпочтительно штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Включение штамма *Lactobacillus delbrueckii* является особенно подходящим, если все-таки некоторое количество нитрата используется в способе для приготовления сыра, и/или если желательна текстура сыра типа традиционного сыра Маасдам. Здесь штамм лактококков предпочтительно включает плазмиду pMRC01, а штамм встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* предпочтительно включает штамм *Propionibacterium freudenreichii* subsp. или штамм *Propionibacterium johnsonii* или их смесь. В настоящем варианте осуществления заквасочная культура необязательно включающая какой-либо штамм *Lactobacillus* subsp., предпочтительно характеризуется оптимальной температурой для роста в молоке, необязательно дополненном дрожжевым экстрактом, в диапазоне 20-37°C, более предпочтительно 25-35°C, наиболее предпочтительно 25-30°C.

В другом предпочтительном варианте осуществления заквасочная культура включает штамм *Lacto-*

coccus lactis subsp., способный к продукции лактицина, в особенности лактицина 3147, штамм встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* и штамм *Streptococcus thermophilus*. Присутствие одного или более штаммов *Lactobacillus*, способных метаболизировать галактозу, является особенно предпочтительным при использовании заквасочной культуры, включающей *S. thermophilus*. В одном варианте осуществления заквасочная культура, кроме того, включает штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp., предпочтительно штамм *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. В одном варианте осуществления заквасочная культура, кроме того, включает штамм *Lactobacillus helveticus*. В одном варианте осуществления заквасочная культура, кроме того, включает штамм *Lactobacillus acidophilus*. В одном варианте осуществления заквасочная культура, кроме того, включает штамм *Lb. helveticus* и штамм *Lb. acidophilus*. В одном варианте осуществления заквасочная культура, кроме того, включает штамм *Lb. helveticus* и необязательно штамм *Lactobacillus acidophilus*. Таким образом, предпочтительно, когда заквасочная культура включает один или более штаммов, выбираемых из *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. acidophilus* и *Lb. helveticus*. Настоящий вариант осуществления, в котором заквасочная культура включает штамм *Streptococcus thermophilus*, является особенно предпочтительным при приготовлении сыров типа эмментального сыра. Здесь заквасочная культура характеризуется оптимальной температурой для роста в молоке, необязательно дополненном дрожжевым экстрактом, составляющей выше 37°C, например 40-43°C.

В предпочтительном варианте осуществления заквасочная культура не включает большие количества источника низина. Большие количества низина, присутствующие во время процессов в соответствии с настоящим изобретением, нежелательны, поскольку известно, что низин ингибирует активность встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, см., например, в EP 2165608. Таким образом, предпочтительно, когда встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria* подвергаются воздействию концентрации низина, составляющей менее чем 50 МЕ на 1 г исходного продукта для сыроделия, более предпочтительно менее чем 25 МЕ на 1 г даже более предпочтительно менее чем 10 МЕ на 1 г, наиболее предпочтительно их не подвергают воздействию низина. Таким образом, предпочтительно, когда заквасочная культура не включает источник низина, или альтернативно предпочтительно, когда заквасочная культура не включает дополнительный источник низина. В связи с этим также предпочтительно, когда заквасочная культура не включает источник плантарицина или в общем источник бактериоцина класса IIa или, по крайней мере, не включает дополнительный источник плантарицина или в общем источник бактериоцина класса IIa. Предпочтительно, когда источник низина и плантарицина или, по крайней мере, дополнительный источник низина и плантарицина не присутствуют в заквасочной культуре. Наиболее предпочтительно, когда источник низина и бактериоцинов класса IIa или, по крайней мере, дополнительный источник низина и бактериоцинов класса IIa, в особенности плантарицина, не присутствуют в заквасочной культуре.

Хотя способы десенсibilизации встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* к низину известны, например, как описано в EP 1273273, авторы настоящего изобретения обнаружили, что такая десенсibilизация к низину или другим бактериоцинам не требуется, когда источник лактицина используется в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria* предпочтительно определяют как способные к утрате по крайней мере 50%, более предпочтительно по крайней мере 75% своего количества жизнеспособных клеток или метаболической активности после инкубации при подходящей для роста температуре в подходящей жидкой среде для выращивания, включающей 50 МЕ низина на 1 г среды для выращивания, по сравнению с контрольным экспериментом, в котором указанная среда для выращивания не включает низин, и сохраняются все остальные экспериментальные условия.

Заквасочная культура в соответствии с настоящим изобретением может включать дополнительные бактерии, в особенности дополнительные лактобактерии, более предпочтительно заквасочная культура, кроме того, включает один или более штаммов *Lactobacillus*. В одном варианте осуществления заквасочная культура, кроме того, включает штамм *S. thermophilus*, в особенности, когда заквасочная культура используется или, как предполагается, будет использоваться в способе для приготовления сыров типа эмментального сыра. Штамм *S. thermophilus* предпочтительно адаптирован к лактицину, более предпочтительно адаптирован, по крайней мере, к уровню лактицина, который присутствует в настоящем способе производства сыра. В одном варианте осуществления заквасочная культура, кроме того, включает штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp., предпочтительно штамм *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. Штамм *Lb. delbrueckii* может быть адаптирован к лактицину, предпочтительно, по крайней мере, к уровню лактицина, который присутствует в настоящем способе производства творога. Однако было обнаружено, что некоторые штаммы *Lb. delbrueckii* устойчивы к лактицину 3147 в достаточной мере, чтобы использоваться соответственно в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления заквасочная культура, кроме того, включает штамм *Lactobacillus helveticus* и/или штамм *Lactobacillus acidophilus*. В одном варианте осуществления заквасочная культура, кроме того, включает штамм *Lb. helveticus*. В одном варианте осуществления заквасочная культура, кроме того, включает штамм *Lb. acidophilus*. В одном варианте осуществления заквасочная культура, кроме того, включает штамм *Lb. helveticus* и штамм *Lb. acidophilus*. Таким образом, предпочтительно, когда заквасочная культура включает один или более штаммов, выбираемых из *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. acidophilus* и *Lb. helveticus*.

Заквасочная культура в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой одну композицию, т.е. смесь существенных и необязательно предпочтительных компонентов, описанных выше. Таковую одну композицию затем используют для внесения в исходный продукт в (а) способа в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения. Альтернативно, различные компоненты могут быть добавлены в виде двух или более отдельных порций к исходному продукту в (а). Даже если две или более отдельных порций используются для добавления компонентов заквасочной культуры настоящего изобретения к исходному продукту, компоненты вкупе, тем не менее, называют заквасочной культурой в контексте настоящего изобретения. Предпочтительно, когда заквасочную культуру добавляют в виде по крайней мере двух или трех отдельных порций, первой порции, включающей штамм лактобактерий, способный к продукции лактицина (т.е. источник лактицина), необязательно второй порции, включающей один или более штаммов *Lactobacillus*, и последней порции, включающей встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria*. В том случае, если заквасочная культура характеризуется оптимальной температурой для роста в молоке, необязательно дополненным дрожжевым экстрактом, составляющей выше 37°C, например 40-43°C, заквасочную культуру предпочтительно добавляют в виде по крайней мере трех отдельных порций, первой порции, включающей штамм лактобактерий, способный к продукции лактицина (т.е. источник лактицина), источник лактицина), необязательно порции, включающей один или более штаммов *Lactobacillus*, порции, включающей встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria*, и последней порции, включающей штамм *Streptococcus thermophilus*.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к заквасочной культуре, описанной здесь выше. Такая заквасочная культура в особенности подходит для использования в способе в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения. Таким образом, настоящее изобретение также относится к применению заквасочной культуры в соответствии с настоящим изобретением для производства творога и/или сыра, предпочтительно сыра типа швейцарского.

Творог.

Способом в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения получают творог, который отличен от творогов известного уровня техники. Поэтому в третьем аспекте настоящее изобретение относится к творогу, предпочтительно творогу, получаемому способом в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, наиболее предпочтительно творогу, получаемому таким образом. Творог в соответствии с настоящим изобретением в особенности подходит для использования при производстве сыра, особенно сыра типа швейцарского. Творог, как правило, характеризуется содержанием жизнеспособных встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* и/или фрагментов встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*. Такие фрагменты предпочтительно включают ДНК-фрагменты встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, поскольку они являются легко распознаваемыми как относящиеся к первоначальным встречающимся в молочных продуктах *Propionibacteria*, которые присутствовали в заквасочной культуре в соответствии с настоящим изобретением. Творог предпочтительно включает по крайней мере 10^2 КОЕ жизнеспособных встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* на 1 г, более предпочтительно 10^3 - 10^{15} КОЕ на 1 г, наиболее предпочтительно 10^4 - 10^{12} КОЕ на 1 г. Также обычно включаемыми в творог являются жизнеспособные лактобактерии и/или их фрагменты, как правило, по крайней мере 10^3 КОЕ жизнеспособных лактобактерий на 1 г, более предпочтительно 10^6 - 10^{15} КОЕ на 1 г, наиболее предпочтительно 10^8 - 10^{12} КОЕ на 1 г. Также включенными в творог в соответствии с настоящим изобретением могут быть жизнеспособные бактерии или их фрагменты дополнительных бактериальных штаммов, которые могут быть включены в заквасочную культуру в соответствии с настоящим изобретением, такие как *Lactobacillus delbrueckii* subsp., *Lactobacillus helveticus* или *Lactobacillus acidophilus*. Помимо жизнеспособных встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* и/или фрагментов встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* творог, кроме того, включает следы лактицина. Экспериментально было установлено, что в сыре, приготовленном из творога в соответствии с настоящим изобретением, может быть продуцировано такое количество лактицина, которое является достаточным для предотвращения пролиферации спор *Clostridium tyrobutyricum* (при этом тесты включают нанесение 10^2 спор на сырные головки). Творог в соответствии с настоящим изобретением, как правило, включает по крайней мере 0,1 мг лактицина (как правило, лактицина 3147) на 1 кг творога, предпочтительно по крайней мере 0,5 мг/кг, наиболее предпочтительно по крайней мере 1,0 мг/кг или даже по крайней мере 2,5 мг/кг. Творог в соответствии с настоящим изобретением, как правило, включает вплоть до 1000 мг лактицина (как правило, лактицина 3147) на 1 кг творога, предпочтительно вплоть до 200 мг/кг, более предпочтительно вплоть до 50 мг/кг или даже вплоть до 5 мг/кг. Таким образом, предпочтительные диапазоны содержания лактицина (как правило, лактицина 3147) в твороге составляют 0,1-1000 мг/кг, более предпочтительно 0,5-200 мг/кг, даже более предпочтительно 1,0-50 мг/кг, наиболее предпочтительно 2,5-5 мг/кг. В случае использования бактериального штамма, способного к продукции лактицина, в качестве источника лактицина творог в соответствии с настоящим изобретением включает жизнеспособные бактерии указанного штамма и/или их фрагменты. Такие фрагменты предпочтительно включают ДНК-фрагменты этого бактериального штамма, поскольку они являются легко распознаваемыми как относящиеся к первоначальному продуцирующему лактицин бактериальному штамму, который присутствовал в заквасочной культуре в соответствии с настоящим изобретением. Творог

предпочтительно включает по крайней мере 10^3 КОЕ жизнеспособных бактерий, способных к продукции лактина (как правило, лактина 3147) на 1 г, более предпочтительно 10^6 - 10^{15} КОЕ на 1 г, наиболее предпочтительно 10^8 - 10^{12} КОЕ на 1 г творога.

В соответствии с предпочтительным аспектом заквасочной культуры настоящего изобретения большое количество источника низина не включают в нее. Таким образом, предпочтительно, когда творог в соответствии с настоящим изобретением включает незначительные количества низина, например менее чем 50 МЕ низина на 1 г творога, более предпочтительно менее чем 25 МЕ/г, более предпочтительно менее чем 10 МЕ/г. Также предпочтительно, когда творог в соответствии с настоящим изобретением включает незначительные количества плантарицина, более предпочтительно какого-либо типа бактериоцина типа Па, которые не являются эффективными в предотвращении прорастания спор *Listeria monocytogenes*, например менее чем 50 МЕ плантарицина на 1 г творога, более предпочтительно менее чем 25 МЕ/г, наиболее предпочтительно менее чем 10 МЕ/г и, как правило, менее чем 50 МЕ бактериоцина типа Па на 1 г творога, более предпочтительно менее чем 25 МЕ/г, наиболее предпочтительно менее чем 10 МЕ/г. В одном варианте осуществления творог в соответствии с настоящим изобретением характеризуется содержанием бактериоцина типа Па или содержанием плантарицина, которое является, по существу, неэффективным против *Listeria monocytogenes* subsp. Наиболее предпочтительно, когда творог в соответствии с настоящим изобретением характеризуется содержанием низина, составляющим менее чем 50 МЕ/г, более предпочтительно менее чем 10 МЕ/г, наиболее предпочтительно менее чем 5 или даже менее чем 1 МЕ/г. Альтернативно или дополнительно, бактериоцин типа Па не присутствует в обнаруживаемых количествах или, по крайней мере, не в количествах, которые оказывают листерицидный эффект (например, отсутствие ореола, наблюдаемого в экспериментах по нанесению *Listeria monocytogenes* Scott A на головки сыра).

Настоящее изобретение также относится к применению творога в соответствии с настоящим изобретением при производстве сыра, предпочтительно сыра типа швейцарского.

Способ приготовления сыра.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу производства сыра из творога в соответствии с настоящим изобретением. Способ в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения включает (d) производство сыра из творога в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно из творога, полученного способом первого аспекта настоящего изобретения. Способ приготовления сыра предназначен предпочтительно для приготовления сыра типа швейцарского. Сыры типа швейцарского характеризуются внесением в исходный продукт, как правило, молоко, встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* для приготовления творога. В контексте настоящего изобретения сыр типа швейцарского включает любой тип сыра, приготовленный в присутствии встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, предпочтительно сыром является сыр типа эментального сыра или типа сыра Маасдам, как описано выше, наиболее предпочтительно сыр типа сыра Маасдам. Сыр является предпочтительно сыром соленого типа. Предпочтительно, когда сыр имеет глазки, более предпочтительно, когда глазки составляют по крайней мере 1 об.%, еще более предпочтительно, когда глазки составляют по крайней мере 3 об.%, даже более предпочтительно, когда глазки составляют по крайней мере 5 об.% сыра, и глазки могут составлять даже более 10 об.% сыра. Сыры, полученные способом в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения, к тому же описаны ниже.

Способы приготовления сыра из творога хорошо известны в данной области техники, и настоящее изобретение охватывает все известные их варианты, если творог получают посредством внесения заквасочной культуры, включающей встречающиеся в молочных продуктах *Propionibacteria*, штамм лактобактерий и источник лактина. Квалифицированный специалист может найти дальнейшее руководство в Fröhlich-Wyder and Bachmann in Cheese, volume 2, 2004, 141-156. Стадия (d), как правило, включает прессование и формование творога, добавление соли к творогу для образования молодого сыра, предпочтительно вакуумную упаковку молодого сыра в фольгу или предоставление молодому сыру покрытия для сыров и созревание необязательно упакованного в фольгу или покрытого молодого сыра. Конкретнее, (d) включает (i) нагрев творога (пастеризацию), (ii) прессование и формование творога, например, в штампах, (iii) добавление соли к творогу, соответственно посредством добавления соли к частицам творога до прессования и формования, например, как при производстве чеддера, или, применительно к настоящему изобретению наиболее предпочтительно, посредством вымачивания подвергнутого прессованию и формованию творога в соляной бане, для образования молодого сыра. Таким образом, пастеризация и прессование творога, как описано выше для способа в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, являются частью (d). Таким образом, творог в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно подвергают пастеризации (i), при этом творог "подвергают тепловой обработке" или "подвергают пастеризации" и/или прессованию (ii), при этом творог прессуют. Прессование творога, как правило, имеет место после пастеризации. Температура тепловой обработки во время пастеризации (i) может находиться в диапазоне 30-55°C, например в диапазоне 32-45°C, предпочтительно 35-37°C в случае сыра типа сыра Маасдам, между тем как температура тепловой обработки в случае сыра типа эментального сыра находится, как правило, в диапазоне 46-55°C, предпочтительно 50-53°C. Молодой сыр (iv) подвергают предпочтительно вакуумной упаковке в фольгу, или ему предоставляют покрытие для сыров. Не-

обязательно упакованный в фольгу или покрытый молодой сыр (v) подвергают предпочтительно созреванию, как правило, в течение 4 недель - 1 года и предпочтительно при температуре, составляющей 4-30°C. Наиболее предпочтительно, когда стадия созревания включает стадию, на которой температуру устанавливают на значении между 18-30°C, более предпочтительно 20-28°C, наиболее предпочтительно 20-24°C для активации сбраживания пропионовой кислоты. Квалифицированный специалист знает, какие стадии выполнять и каким образом их выполнять при производстве сыра из творога. В предпочтительном варианте осуществления способ производства сыра в соответствии с настоящим изобретением не включает стадию промывки творога нитратом.

Сыр.

Способом в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения осуществляется производство сыра, который отличается от сыров известного уровня техники. Поэтому в пятом аспекте настоящее изобретение относится к сыру, предпочтительно сыру, получаемому способом в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения, наиболее предпочтительно к сыру, полученному таким образом. Сыром в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является сыр типа швейцарского, более предпочтительно сыр типа эментальского сыра, т.е. твердый сыр с глазками, или типа сыра Маасдам, т.е. полутвердый сыр с глазками. Наиболее предпочтительно, когда сыром в соответствии с настоящим изобретением является сыр типа Маасдам. Как правило, сыр в соответствии с настоящим изобретением имеет глазки, которые образуются благодаря внесению и последующему сбраживанию с помощью встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, которые продуцируют такие газы, как CO₂, которые образуют глазки. Сыр является предпочтительно сыром соленого типа. Предпочтительно, когда сыр имеет глазки, более предпочтительно, когда глазки составляют по крайней мере 1 об.%, еще более предпочтительно, когда глазки составляют по крайней мере 3 об.%, даже более предпочтительно, когда глазки составляют по крайней мере 5 об.% сыра, и глазки могут составлять даже более 13 об.% сыра.

Сыр в соответствии с настоящим изобретением, как правило, характеризуется содержанием жизнеспособных встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* и/или фрагментов встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*. Такие фрагменты предпочтительно включают ДНК-фрагменты встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria*, поскольку они являются легко распознаваемыми как относящиеся к первоначальным встречающимся в молочных продуктах *Propionibacteria*, которые присутствовали в заквасочной культуре в соответствии с настоящим изобретением. Сыр предпочтительно включает по крайней мере 10³ КОЕ встречающихся в молочных продуктах *Propionibacteria* на 1 г, более предпочтительно 10⁶-10¹⁵ КОЕ на 1 г, наиболее предпочтительно 10⁸-10¹² КОЕ на 1 г сыра. Также обычно включаемыми в сыр в соответствии с настоящим изобретением являются жизнеспособные лактобактерии и/или их фрагменты, как правило, по крайней мере 10³ КОЕ жизнеспособных лактобактерий на 1 г, более предпочтительно 10⁶-10¹⁵ КОЕ на 1 г, наиболее предпочтительно 10⁸-10¹² КОЕ на 1 г сыра. Также включенными в сыр в соответствии с настоящим изобретением могут быть жизнеспособные бактерии или фрагменты бактерий дополнительных штаммов, которые могут быть включены в заквасочную культуру в соответствии с настоящим изобретением, такие как *Lactobacillus delbrueckii subsp.*, *Lactobacillus helveticus* или *Lactobacillus acidophilus*. Сыр, кроме того, включает, как правило, следовые количества лактицина, достаточные для предотвращения пролиферации спор *Clostridium tyrobutyricum* (при этом тесты включают нанесение 10² спор на сырные головки, размер ореолов >1 мм). Сыр в соответствии с настоящим изобретением, как правило, включает по крайней мере 0,1 мг лактицина (как правило, лактицина 3147) на 1 кг сыра, предпочтительно по крайней мере 0,5 мг/кг, наиболее предпочтительно по крайней мере 1,0 мг/кг или даже по крайней мере 2,5 мг/кг. Сыр в соответствии с настоящим изобретением, как правило, включает вплоть до 1000 мг лактицина (как правило, лактицина 3147) на 1 кг сыра, предпочтительно вплоть до 200 мг/кг, более предпочтительно вплоть до 50 мг/кг или даже вплоть до 5 мг/кг. Таким образом, предпочтительные диапазоны содержания лактицина (как правило, лактицина 3147) в сыре составляют 0,1-1000 мг/кг, более предпочтительно 0,5-200 мг/кг, даже более предпочтительно 1,0-50 мг/кг, наиболее предпочтительно 2,5-5 мг/кг. В случае использования бактериального штамма, способного к продукции лактицина, в качестве источника лактицина сыр в соответствии с настоящим изобретением включает жизнеспособные бактерии указанного штамма и/или их фрагменты. Такие фрагменты предпочтительно включают ДНК-фрагменты этого бактериального штамма, поскольку они являются легко распознаваемыми как относящиеся к первоначальному продуцирующему лактицин бактериальному штамму, который присутствовал в заквасочной культуре в соответствии с настоящим изобретением. Сыр предпочтительно включает по крайней мере 10³ КОЕ жизнеспособных бактерий, способных к продукции лактицина (как правило, лактицина 3147) на 1 г, более предпочтительно 10⁶-10¹⁵ КОЕ на 1 г, наиболее предпочтительно 10⁸-10¹² КОЕ, на 1 г сыра.

Сыр в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно характеризуется тем, что он имеет, как правило, после обработки сильной кислотой, концентрацию пропионовой кислоты, которая выше концентрации бутановой кислоты (масляной кислоты). Альтернативно или дополнительно, сыр в соответствии с настоящим изобретением, как правило, после обработки сильной кислотой, содержит по крайней мере 1000 м.д. пропионовой кислоты, более предпочтительно по крайней мере 3000 м.д. пропионовой кислоты, наиболее предпочтительно по крайней мере 5000 м.д. пропионовой кислоты. Концен-

трации пропионовой кислоты и бутановой кислоты здесь легко определяют, используя HPLC, как проиллюстрировано в примере 4. Обработка сильной кислотой, как правило, включает дистилляцию в 5 мл 10% серной кислоты, 1 мл валериановой кислоты в концентрации, составляющей 10 мг на мл¹, и 10 мл дистиллированной воды (см. пример 4).

В соответствии с предпочтительным аспектом заквасочной культуры настоящего изобретения и творога в соответствии с настоящим изобретением в ней(нем) содержится небольшое количество источника низина. Таким образом, сыр в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно характеризуется содержанием низина, составляющим менее чем 50 МЕ/г, более предпочтительно менее чем 10 МЕ/г, наиболее предпочтительно менее чем 5 МЕ/г или даже менее чем 1 МЕ/г. Альтернативно или дополнительно, бактериоцин типа Па не присутствует в сыре в обнаруживаемых количествах или, по крайней мере, не в количествах, которые оказывают листерицидный эффект (например, отсутствие ореола в экспериментах по нанесению *Listeria monocytogenes* Scott A на головки сыра).

Примеры

Конструирование штаммов и аналитические исследования.

Конструирование штаммов. Метод конъюгации Coakley et al. (Applied and environmental microbiology, 1997, 63, 1434-1440) был использован для создания Ltn⁺ или Nis⁺ трансконъюгатов с незначительными модификациями. Инокулянты (2%) и донора, и реципиента выращивали в течение 4 ч в питательной среде GM17 при 30°C. По окончании периода выращивания 1 мл реципиента и 1 мл донора собирали и дважды промывали питательной средой GM17. После последней промывки каждый штамм ресуспендировали в 50 мкл питательной среды GM17. Сконцентрированные реципиент и донор (20×) затем смешивали друг с другом в следующих соотношениях: 1:1, 2:1 и 20:1. Каждую смесь располагали в виде спота в центре чашки с агаром GM17 и инкубировали в течение ночи при 30°C. На следующий день споты собирали в 1 мл разбавителя для максимального извлечения (MRD; Oxoid) и последовательно разводили до высева на агар с лактозой и индикаторами (LIA), содержащий лактицин (400 условных единиц (УЕ)/мл), как описано Coakley et al. После инкубации в течение 48 ч при 30°C планшеты с лактицинсодержащим LIA проверяли на предмет позитивных по лактозе колоний (желтых) на фоне негативных по лактозе колоний (белых), позитивные по лактозе колонии были отобраны для дальнейшего анализа. Nis⁺ трансконъюгаты были созданы, по существу, как описано выше; отбор выполняли в 10% восстановленном снятом молоке, содержащем 400 УЕ/мл низина, до высева на низин-LIA планшеты.

Соответственно, CSK 1417, штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* с фенотипом lactose⁺ cit⁺ nis^{np} nis^{sens} lacticin^{np} lacticin^{sens} трансформировали, используя производное CSK 3652, содержащее плазмиду pMRC01 и имеющее фенотип lactose⁺ cit⁺ nis^{np} nis^{sens} lacticin^p lacticin^{imm}. Также дополнительные штаммы были получены, используя этот протокол. Штаммы, полученные и/или использованные в настоящем исследовании, суммированы в табл. 1.

Таблица 1

Перечень штаммов

Таксономия	Subsp.	ID	Фенотип
<i>Lactococcus lactis</i>	lactis	CSK 2775	Bac ⁻ (не продуцирующий бактериоцин)
		CSK 3594	Лактицин-продуцирующее, устойчивое к лактицину производное CSK 2775; Ltn ⁺
		CSK 3281	Низин-продуцирующее, устойчивое к низину производное CSK 2775; Nis ⁺
<i>Lactococcus lactis</i>	cremoris	CSK 3834	Bac ⁻
		CSK 4555	Лактицин-продуцирующее, устойчивое к лактицину производное CSK 3834; Ltn ⁺
		CSK 65	Низин-продуцирующее, устойчивое к низину производное CSK 3834; Nis ⁺
<i>Lactococcus lactis</i>	Lactis biovar diacetylactis	CSK 1417	Bac ⁻
		CSK 3652	Лактицин-продуцирующее, устойчивое к лактицину производное CSK 1417; Ltn ⁺
		CSK 3039	Низин-продуцирующее, устойчивое к низину производное CSK 1417; Nis ⁺

Масс-спектрометрический анализ колоний. Масс-спектрометрический анализ колоний выполняли посредством смешивания колоний на петле для посева с 50 мкл 70% изопропанола, 0,1% трифторуксусной кислоты (TFA). Суспензию смешивали посредством перемешивания на вортексе; затем клетки собирали в настольной центрифуге при 14000 об/мин в течение 2 мин. Масс-спектрометрический анализ супернатанта выполняли с помощью масс-спектрометра Axima TOF² MALDI TOF (Shimadzu Biotech, Manchester, Великобритания). 0,5-мкл аликвоту матричного раствора (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (CHCA), 10 мг/мл в 50% ацетонитриле-0,1% (в объемном отношении) TFA) размещали на мишени и оставляли на 1-2 мин до удаления. Допускали высыхание на воздухе остающегося раствора и раствор для образца размещали на предварительно покрытом споте образца. Матричный раствор (0,5 мкл) добавляли к размещенному образцу и допускали высыхание на воздухе. Впоследствии образец анализировали в режиме отражения положительно заряженных ионов.

ПЦР-анализ. Геномную ДНК экстрагировали из 1,5 мл ночной культуры в соответствии со способом Hoffman and Winston (Gene, 1987, 57, 267-272), незначительно модифицированным, как описано Mills и др. (Journal of applied microbiology, 2010, 108, 945-955). Наборы праймеров, использованные для сканирования штаммов на предмет присутствия rMRC01, а также генов, связанных с продукцией низина, перечислены в табл. 2. ПЦР выполняли в Hybaid PCR express unit (Hybaid Ltd., Middlesex, Великобритания), используя полимеразу MyTaqTM Red Mix (Bioline Ltd., London, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителей в сочетании с температурой отжига, составляющей 55°C.

Таблица 2

Перечень праймеров

Праймер	Последовательность	Ген (ы) - мишень	Размер (п.о.)
27-F	5' -GGGGAACAATCTTACCTA	orf 27	326
27-R	5' -ATTATTTTTTATTGCATCTACTA		
49-F	5' -ССААТАСССГССААААТАААГТ	orf 49	347
49-R	5' -СТААГССГСАГГАААТАСААСС		
51-F	5' -ТТСТСААААТСАТСААААТСААГТ	orf 51	293
51-R	5' -GTACGAACAGGAGCGAAAAA		
52-F	5' -ССТААГТТГТСТАТТССГТГТССА	orf 52	210
52-R	5' -АТТАГГТГАГТГСТТГАТТТТТТ		
nisA-F	5' -СААААГАТТТТААСТТГГАТТТТГ	nisA	163
nisA-R	5' -АСГТГААТАСТАСААТГАСААГ		
nisFG-F	5' -GGТТТААТТТСТГСАГАТАСТГ	nisFEG	1573

Плазмидный профиль. Плазмидную ДНК выделяли в соответствии со способом O'Sullivan and Klaenhammer (Applied and environmental microbiology, 1993 59, 2730-2733), используя 5 мл ночной культуры. Результирующую ДНК ресуспендировали в 40 мкл дистиллированной стерильной H₂O и анализировали в 0,7% агарозном геле при 20 В в течение 20 ч при комнатной температуре.

Гель-электрофорез в пульсирующем поле. Гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) выполняли в соответствии с Mills et al. (Journal of microbiological methods, 2007, 70, 159-164). ДНК-фрагменты анализировали в системе с пульсирующим полем CHEF-DR III (Bio-Rad laboratories, California, США) при 6 В/см в течение 22 ч с использованием длительности импульса линейного изменения 1-30 с. Маркеры молекулярной массы (N0340S, N0350S) были куплены у New England BioLabs (New England BioLabs, Hertfordshire, Великобритания).

Анализ бактериофагов. Фаги размножали в соответствии со способом, изложенном ранее (Mills et al. Journal of microbiological methods, 2007, 70, 159-164). Анализ чувствительности к инфицированию бактериофагами выполняли с помощью анализа бляшек с использованием двух слоев агара, описанного ранее (Coakley et al. Applied and environmental microbiology, 1997, 63, 1434-1440).

Характеристика продукции кислоты. За продукцией кислоты следили в 10% восстановленном снятом молоке (RSM) в присутствии и отсутствие 0,1% дрожжевого экстракта в соответствии со способом Harrington and Hill (Applied and environmental microbiology, 1991, 57, 3405-3409).

Пример 1. Определение значений MIC.

Значения MIC определяли в соответствии с протоколом от UCC & Piper et al., J. Antimicrob. Chemother. 2009, 61(3), 546.

Протокол был переделан для скрининга с использованием 96-луночных титрационных микропланшетов. Были использованы индикаторные штаммы *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, C99 (коммерчески доступный от CSK Food Enrichment CV) и *Propionibacterium freudenreichii*, C21 (коммерчески доступный от CSK Food Enrichment CV). Средами для выращивания были MRS для C99, агар с натрием и лактатом (SLA) для C21.

Определение значений MIC *Propionibacterium* по отношению к лактицину осуществляли в соответствии со следующей процедурой. Штаммы *Propionibacterium* выращивали, из отдельной колонии, в течение 2-3 ночей (SLA, 30°C, в анаэробных условиях) до достижения мутности. 3% инокулята вносили в свежую среду SLA и инкубировали в течение приблизительно 7 ч до достижения ОП600=0,5. Из результирующей культуры 10^5 КОЕ/мл инокулировали в 96-луночные титрационные микропланшеты, содержащие свежую среду SLA, включающую лактицин 3147, находящийся в диапазоне концентраций от 100 до 0,01 мг/л (высокая концентрация слева, низкая концентрация справа). Рост после инкубации при 30°C в анаэробных условиях в течение 19-24 ч визуально оценивали путем проверки мутности слева направо (т.е. начиная с наибольших концентраций лактицина). Значения MIC определяли по последней лунке, в которой не наблюдается видимый рост (среднее значение определений в трех повторях). Значения MIC по отношению к низину были получены схожим образом. Полученные значения MIC представлены в табл. 3.

Определение значений MIC *Lactobacilli* по отношению к лактицину осуществляли в соответствии со следующей процедурой. Штаммы *Lactobacillus* выращивали, из отдельной колонии, в течение ночи (MRS, 37°C, в анаэробных условиях) до достижения мутности. 3% инокулята вносили в свежую среду SLA и инкубировали в течение приблизительно 7 ч до достижения ОП600=0,5. Из результирующей культуры 10^5 КОЕ/мл инокулировали в 96-луночные титрационные микропланшеты, содержащие свежую среду MRS, включающую лактицин 3147, находящийся в диапазоне концентраций от 100 до 0,01 мг/л (высокая концентрация слева, низкая концентрация справа). Рост после инкубации при 37°C в анаэробных условиях в течение 19-24 ч визуально оценивали путем проверки мутности слева направо (т.е. начиная с наибольших концентраций лактицина). Значения MIC определяли по последней лунке, в которой не наблюдается видимый рост (среднее значение определений в трех повторях).

Таблица 3

Значения MIC

<i>Propionibacteria</i> <i>freundenreichii</i>	MIC (лакцицин 3147)	MIC (низин)
DPC 2241	>50 мг/л	2,5 мг/л
DPC 4555	8,3 мг/л	0,039 мг/л
CSK код 21	>50 мг/л	1,25 мг/л
CSK 1205	>50 мг/л	1,25 мг/л

Для ингибирования *Lb. delbrueckii* требуется в приблизительно 10 раз больше лактицина 3147, чем низина (не представленные результаты). Все исследованные *Propionibacteria* являются устойчивыми к лактицину 3147 в концентрациях, составляющих 5 мг/л или больше, по большей части даже при 50 мг/л или больше. Исследованные *Propionibacteria* являются значительно более чувствительными к низину, чем к лактицину 3147 (разница в 20 или более раз). *S. tyrobutyricum* является чувствительным и к низину, и к лактицину 3147. Было установлено, что значения MIC для различных штаммов *S. tyrobutyricum* составляют порядка 0,4-2,5 мг/л лактицина 3147 и 0,03-0,1 мг/л низина. Эти данные показывают большую селективность лактицина 3147 по сравнению с низином для ингибирования штаммов *Clostridium tyrobutyricum* относительно *Propionibacteria*.

Пример 2. Сокультуры.

Культуры A-F выращивали в течение ночи в 10% восстановленном снятом молоке (RSM)+0,1% дрожжевого экстракта при 30°C. На следующий день в 10% RSM+дрожжевой экстракт вносили 1% или C99, или C21 (см. выше) и +1% низин- или лактицин-продуцирующего штамма *Lactococcus lactis* subsp.

A. Контроль: Vac- & *Lb. delbrueckii* C99.

B. Тест на лактицин: Lact+ & *Lb. delbrueckii* C99.

C. Тест на низин: Nis+ & *Lb. delbrueckii* C99.

D. Контроль: Vac- & *P. freundenreichii* C21.

E. Тест на лактицин: Lact+ & *P. freundenreichii* C21.

F. Тест на низин: Nis+ & *P. freundenreichii* C21.

Здесь штамм, не продуцирующий бактериоцин, меняли в виде *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамм CSK 2775, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* штамм CSK 3834 и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* штамм CSK 1417. Продуцирующие лактицин 3147 или низин штаммы, упомянутые в B/D и C/F, соответственно, представляют собой изогенные трансконъюгаты не продуцирующих бактериоцин штаммов, упомянутых в A/D.

Культуры инкубировали в соответствии с профилем температур Emmental, представленным Chamba и Prost в Lait 1989, 69, p.417-431, cf. Fig 1. Этот профиль можно суммировать, как указано далее.

Стадия	Профиль температур
1	31°C постоянная в течение 40 мин
2	31→53°C (линейное увеличение на протяжении 40 мин)
3	53°C постоянная в течение 45 мин
4	53→30°C (линейное уменьшение на протяжении 18 ч)
5	30°C (постоянная в течение 4 ч)

Образцы отбирали до и после каждой стадии и высевали на следующие селективные агары для выращивания:

Propionibacteria → SLA+2 мкг/мл клоксациллина;

Lactobacilli → селективный агар для *Lactobacillus* (LBS);

Lactococcus → агар с лактозой и индикаторами (LIA).

Результаты. Каждый из продуцирующих лактицин 3147 штаммов можно было с успехом сокультивировать с *Propionibacterium* CSK код 21, при температуре, составляющей 37°C или ниже. Уменьшений жизнеспособности *P. freudenreichii* C21 не отмечалось в присутствии какого-либо из продуцирующих лактицин штаммов (при сравнении данных, касающихся выживаемости, для эксперимента E в сравнении с экспериментом D на протяжении каждой из 5 стадий, не представленные результаты). В отличие от этого, количество *P. freudenreichii* C21 уменьшалось на 3-7 порядка величины в присутствии каждого из низин-продуцирующих штаммов (максимальное уменьшение выживаемости на протяжении каждой из 5 стадий, эксперимент F в сравнении с экспериментом D). Было установлено, что рост *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* C99 обычно ингибировали низин-продуцирующие штаммы, а не лактицин-продуцирующие штаммы. Рост *Clostridium tyrobutyricum* ингибировала всякая из низин- или лактицин-продуцирующих культур, по крайней мере, до стадии 2 (в соответствии с оценкой по присутствию зоны ингибирования). Как и ожидалось, ни один из штаммов лактококков не выдержал инкубацию при 53°C. По этой причине низин- или лактицин-продуцирующие лактококки будут более подходящими для использования применительно к сыру типу Maasdammer, используя более низкие температуры пастеризации. Однако ожидается, что с помощью добавления термофильных штаммов, таких как *S. thermophilus*, и/или посредством модифицирования низин- или лактицин-продуцирующих лактококков в направлении большей термоустойчивости (сверхэкспрессии белков теплового шока, до культивирования на соответствующих средах и т.д.) также можно приготовить хороший эментальный сыр.

Пример 3. Приготовление сыра.

1. Сыр Маасдам был приготовлен в соответствии со следующей процедурой.

2. Мезофильную заквасочную культуру (CSK 3594 в сочетании с CSK 3652, соотношение 1:1) выращивали в течение ночи в 10% RSM, используя небольшой инокулят (0,20%), при 30°C для гарантии того, что клетки будут жизнеспособными для сыроделия на следующий день.

2. На следующий день заквасочную культуру охлаждали на льду. pH заквасочной культуры составлял ~4,6.

3. 1 л пастеризованного цельного молока нагревали до 32°C в стерильном 2-л стакане и туда вносили 0,6% заквасочной культуры и 0,1% C99 (культуры *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, коммерчески доступной от CSK Food Enrichment CV, в 10% RSM, 25 мкл), и 0,1% *Propionibacterium* (дополнительной культуры *Propionibacterium* CSK код 21 в среде LB, 12,4 мкл) при выбранном pH инокулята.

4. Через 30 мин после инокуляции добавляли химозин (1,8 мл разведения 1:10) и смесь интенсивно перемешивали пипеткой, пипетку оставляли в стакане, пока химозин створаживал (осаждал) молоко.

5. Творог проверяли на твердость и разрезали стерильным ножом (очищенным с использованием этилового спирта) через 30-45 мин после добавления химозина.

6. Через еще 10 мин начинали тепловую обработку посредством медленного повышения температуры с 32 до 37°C на протяжении 30-минутного периода времени (увеличение на 2°C каждые 6 мин) при медленном постоянном перемешивании.

7. pH постоянно контролировали и при pH 6,1-6,5 сливали 40% молочной сыворотки (приблизительно 700 мл). Медленно добавляли 250 мл воды (температура между 40-50°C) при смешивании для получения конечной температуры, равной 37°C, в сырной ванне. После еще 20 мин смешивания сливали всю молочную сыворотку/воду.

8. Температуру творога уменьшали до 32°C на протяжении 40-минутного периода времени.

9. Творог осушали в течение ночи и прессовали в штампах ~190 г.

10. pH сыра проверяли через 24 ч. pH не опускался ниже 5,4.

11. Творог взвешивали, разрезали на маленькие кусочки и добавляли соль в количестве 1,3% от общего веса творога.

12. Маленькие кусочки спрессовывали вместе и впоследствии подвергали вакуумной упаковке.

13. Созревание сыра осуществляли в течение 2 недель при 10-13°C и впоследствии в течение 2 недель при 20°C.

Сыр был успешно приготовлен, поскольку он содержал лактицин в количествах, достаточных для предотвращения пролиферации спор *Clostridium tyrobutyricum* (при этом тесты включают нанесение спор на сырные головки, размер ореолов >1 мм), в то время как ореол не отмечался при нанесении спор *Clostridium tyrobutyricum* (10^2 спор/мл) на головки контрольного сыра, приготовленного с использованием негативных по лактицину штаммов *Lc. lactis* и *Lc. lactis biovar diacetylactis* в равных пропорциях и количествах. Кроме того, прорастание спор *Propionibacteria* не было в значительной степени ингибировано по сравнению с контрольным сыром, приготовленным с использованием негативных по лактицину штаммов *Lc. lactis* и *Lc. lactis biovar diacetylactis* в равных пропорциях и количествах. Наконец, в сыре образовывались глазки спустя 21 день созревания, в то время как глазки не образовывались в контрольном сыре, приготовленном в присутствии негативных по лактицину, позитивных по низину штаммов *Lc. lactis* и *Lc. lactis biovar diacetylactis* в равных пропорциях и количествах.

Пример 4.

Девять сыров Маасдам были приготовлены в соответствии со следующей процедурой.

1. Мезофильную заквасочную культуру выращивали в течение ночи в 10% RSM, используя небольшую инокулят (0,20%), при 30°C для гарантии того, что клетки будут жизнеспособными для сыроделия на следующий день.

2. На следующий день заквасочную культуру охлаждали на льду. pH заквасочной культуры составлял ~4,6.

3. 1 л пастеризованного цельного молока нагревали до 32°C в стерильном 2-л стакане и туда вносили $2,5 \times 10^3$ спор/мл *Clostridium tyrobutyricum*, используя стоковый раствор приблизительно 3×10^8 спор/мл, и 0,6% заквасочной культуры и 0,1% C99 (культуры *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, коммерчески доступной от CSK Food Enrichment CV, в 10% RSM, 25 мкл), и 0,1% *Propionibacterium* (дополнительной культуры *Propionibacterium* CSK код 21 в среде LB, 12,4 мкл) при выбранном pH инокулята.

4. Через 30 мин после инокуляции добавляли химозин (1,8 мл разведения 1:10) и смесь интенсивно перемешивали пипеткой, пипетку оставляли в стакане, пока химозин створаживал (осаждал) молоко.

5. Творог проверяли на твердость и разрезали стерильным ножом (очищенным с использованием этилового спирта) через 30-45 мин после добавления химозина.

6. Через еще 10 мин начинали тепловую обработку посредством медленного повышения температуры с 32 до 37°C на протяжении 30-минутного периода времени (увеличение на 2°C каждые 6 мин) при медленном постоянном перемешивании.

7. pH постоянно контролировали и при pH 6,1-6,5 сливали 40% молочной сыворотки (приблизительно 700 мл). Медленно добавляли 250 мл воды (температура между 40-50°C) при смешивании для получения конечной температуры, равной 37°C, в сырной ванне. После еще 20 мин смешивания сливали всю молочную сыворотку/воду.

8. Творог осушали в течение ночи и прессовали в штампах ~190 г.

9. pH сыра проверяли через 24 ч.

10. Творог взвешивали, разрезали на маленькие кусочки, сыр солили посредством погружения сыра в соляную баню (содержащую 230 г NaCl, 0,05 вес.% CaCl₂×2H₂O и молочную кислоту для доведения pH до 5,4 на литр кипяченой воды) при 10-12°C в течение приблизительно 2 ч.

11. Маленькие кусочки спрессовывали вместе и впоследствии подвергали вакуумной упаковке.

12. Созревание сыра осуществляли в течение 2 недель при 10-13°C и впоследствии в течение 4 недель при 20°C.

Заквасочные культуры А-С использовали на стадии 1, и три сыра были приготовлены, исходя из каждой заквасочной культуры (А1-А3, В1-В3 и С1-С3).

А. CSK 2775 & CSK 1417 (1:1) [Вас⁻; отсутствие продукции бактериоцина].

В. CSK 3594 & CSK 3652 (1:1) [Лас⁺; лактицин-продуцирующий, устойчивый к лактицину].

С. CSK 32 81 & CSK 3 03 9 (1:1) [Нис⁺; низин-продуцирующий, устойчивый к низину].

На стадии 9 pH сыров А находился в диапазоне 5,03-5,35, в случае сыров В - в диапазоне 5,41-5,52, и в случае сыров С - в диапазоне 5,05-5,11. Повышенный pH Лас⁺ сыров В считался выгодным для роста и активности *Propionibacterium freudenreichii*, которые, как было установлено, не растут успешно в кислотной среде.

Спустя 35 дней созревания в не продуцирующих бактериоцин сырах А образовывались небольшие щели (трещины) на их поверхности, которые можно было также наблюдать на части сыра, отделенной для высева. Эти трещины, вероятно, являются результатом образования газа вследствие пролиферации *Cl. tyrobutyricum* в сыре и не наблюдались ни в лактицин-, ни в низин-продуцирующих сырах на этой стадии созревания.

Спустя 1, 7, 14, 21, 28, 35 и 42 дня созревания образцы сыра отбирали в соответствии со следующей процедурой: 1 г сыра гомогенизировали в 9 мл 2% раствора цитрата натрия. Впоследствии делали ряд десятикратных разведений с использованием суспензии до разведения 10^{-7} . Два различных способа использовали для подсчета спор *Cl. tyrobutyricum* в сырах. Они включали (а) высев на агар RCM и (б) инкубацию разведений сыров в среде Bryant & Burkey. Среда Bryant & Burkey содержит лактат натрия, ко-

торый сбраживается в анаэробных условиях с помощью *Cl. tyrobutyricum* и используется в качестве источника углерода и энергии для продукции водорода и CO_2 . Кроме того, разведения высевали на агар LBS для определения количества *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, на агар SLA (+2 мкг/мл клоксацилина) для определения количества *Propionibacterium freudenreichii* и на агар LM-17 для определения количества заквасочных культур *Lactococcus lactis*.

Содержание органических кислот (уксусной кислоты, пропионовой кислоты и масляной кислоты) определяли для всех девяти сыров в день 42 в соответствии со следующим протоколом: 5 г сыра натирали и помещали в дистилляционную насадку, туда добавляли 5 мл 10% серной кислоты, 1 мл валериановой кислоты в концентрации 10 мг на мл⁻¹ и 10 мл дистиллированной воды. Результирующую смесь подвергали дистилляции и собирали 100 мл дистиллята. Дистиллят интенсивно смешивали, фильтровали через 0,2 мкм фильтр и вводили в пробирки с завинчивающимися крышками. Все образцы исследовали в трех повторях с использованием контроля между каждым образцом для проверки загрязнения. Были приготовлены стоковые растворы для всех четырех кислот (уксусной, пропионовой, масляной и валериановой кислот) (40 мл, 25 мг кислоты на мл). Были приготовлены стандарты в соответствии со следующей схемой разведения:

Стоковый раствор (мл)	0,01 н H_2SO_4 (мл)	Концентрация (мг/мл)	Калибровочный уровень
0,25	4,75	3,125	1
0,5	4,5	6,25	2
1,0	4,0	12,5	3
2,0	3,0	25	4
3,0	2,0	37,5	5
4,0	1,0	50	6
5,0	0,0	62,5	7

Эти стандарты затем обрабатывали образом, схожим с таковым в случае 5-г образцов сыра. Каждый стандарт помещали в дистилляционную насадку и туда добавляли 5 мл 10% серной кислоты и 10 мл дистиллированной воды. Результирующую смесь подвергали дистилляции и собирали 100 мл дистиллята. Дистиллят интенсивно смешивали, фильтровали через 0,2 мкм фильтр и вводили в пробирки с завинчивающимися крышками. Стандарты вводили от наименьшей к наибольшей концентрации в колонку HPLC для обеспечения приблизительной стандартной кривой. Условия для HPLC были изократическими с использованием 0,01н. серной кислоты в качестве подвижной фазы. Скорость потока составляла 0,7 мл/мин, время анализа составляло 50 мин, температура колонки составляла 50°C. Вводимый объем и для образцов, и для стандартов составлял 50 мкл. Детектирование осуществляли, используя УФ, при 220 нм. Колонку можно было хранить в 0,01н. серной кислоте.

Подсчет спор *Cl. Tyrobutyricum*. Подсчет спор *Cl. tyrobutyricum* в способе (а) осуществляли посредством последовательного разведения сырной суспензии до 10^{-5} и термообработки (не)разведенных образцов при 75°C в течение 10 мин. Подвергнутые обработке образцы высевали на агар RCM и инкубировали при 37°C в течение 7 дней в анаэробных условиях. Результаты представлены в табл. 4.

Подсчет спор *Cl. tyrobutyricum* в способе (b) осуществляли посредством кипячения пробирок с 9 мл среды для восстановления анаэробных условий. 1 мл 10-кратных разведений сырной суспензии вносили в 9 мл среды в пробирках. 2 мл расплавленного парафина (60-65°C), предварительно подвергнутого автоклавированию при 121°C в течение 15 мин, наливали в каждую пробирку, которую впоследствии нагревали при 75°C в течение 10 мин для уничтожения вегетативных клеток и активации спор. Допускали охлаждение образцов до комнатной температуры до инкубации при 37±2°C в течение вплоть до 7 дней. После инкубации эти пробирки с ростом и образованием газа регистрировали как положительные. Для подсчета спор использовали метод наиболее вероятного количества (MPN). Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 4

Подсчет спор *Cl. tyrobutyricum* (способ (а))

День	Сыры *		
	А	В	С
1	$1,96 \times 10^2$	61,0	68,7
7	63,3	33,3	3,33
14	$1,37 \times 10^2$	21,0	17,5
21	$1,09 \times 10^4$	$5,13 \times 10^3$	8,01
28	$1,86 \times 10^5$	$9,23 \times 10^2$	2,27
35	$9,19 \times 10^5$	$6,93 \times 10^3$	0
42	$1,17 \times 10^6$	$1,08 \times 10^3$	$6,80 \times 10^4$

* Количество спор *Cl. tyrobutyricum* в 1 г сыра (средние значения относительно трех сыров каждого типа).

Таблица 5

Подсчет спор *Cl. tyrobutyricum* (способ (b))

День	Сыры *		
	А	В	С
1	$1,38 \times 10^3$	18,0	0
7	$4,89 \times 10^2$	17,6	0
14	$4,84 \times 10^3$	18,6	1,00
21	$3,20 \times 10^3$	40,1	2,03
28	$2,20 \times 10^3$	52,0	2,60
35	$5,14 \times 10^5$	32,4	0
42	$9,30 \times 10^6$	$8,70 \times 10^2$	47,8

* Количество спор *Cl. tyrobutyricum* в 1 г сыра (средние значения относительно трех сыров каждого типа).

Представленные в табл. 4 результаты показывают, что количество спор *Cl. tyrobutyricum* в отсутствие какого-либо источника бактериоцина (Bac^- , сыры А) увеличивался на приблизительно 4 порядка величины на протяжении 6 недель созревания. В Lac^+ сыре В, количестве спор *Cl. tyrobutyricum* лишь слегка превышало первоначальную концентрацию, составляющую $2,5 \times 10^3$ спор/мл, в исходном инокуляте. Во время первых трех недель созревания содержание спор *Cl. Tyrobutyricum* увеличивалось на приблизительно 1 порядок величины и оставалось неизменным впоследствии. Сыры С, включающие низин, содержали наименьшее количество спор *Cl. tyrobutyricum*, даже меньше первоначальной концентрации, составляющей $2,5 \times 10^3$ спор/мл. В одном из трех С-сыров отмечалась внезапная пролиферация спор *Cl. tyrobutyricum* в день 42. Представленные в табл. 5 результаты в основном согласуются с представленными в табл. 4 результатами. Количество спор *Cl. tyrobutyricum* увеличивалось в отсутствие бактериоцин-продуцирующего штамма, оставалось более или менее неизменным в случае Lac^+ сыров и уменьшалось в случае Nis^+ сыров.

Подсчет *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* (С99). Результаты представлены в табл. 6. В случае сыров А, не продуцирующих бактериоцин, количества незначительно увеличивались вплоть до недели 4 созревания, после чего они снова снижались. В лактицин-продуцирующих сырах В, рост *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* был ингибирован в первую неделю созревания, после чего их количества быстро увеличивались вплоть до приблизительно 5×10^7 КОЕ/г в день 35. Рост *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* был ингибирован в течение большего периода времени в низин-продуцирующих сырах С, и максимальное количество, составляющее 1×10^7 КОЕ/г *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, отмечалось в день 42.

Подсчет спор *Lb. delbrueckii ssp. lactis*

День	Сыры *		
	А	В	С
1	$1,52 \times 10^5$	4,09	0
7	$1,30 \times 10^5$	0	0
14	$6,74 \times 10^4$	$9,63 \times 10^2$	0
21	$3,66 \times 10^5$	$5,88 \times 10^4$	9,00
28	$1,07 \times 10^6$	$2,92 \times 10^6$	$4,24 \times 10^5$
35	$1,41 \times 10^5$	$4,56 \times 10^7$	$2,37 \times 10^6$
42	$8,90 \times 10^4$	$1,41 \times 10^7$	$7,58 \times 10^6$

* Количество спор *Lb. delbrueckii ssp. lactis* в 1 г (средние значения относительно трех сыров каждого типа).

Подсчет *Propionibacterium freudenreichii* (код 21). Результаты представлены в табл. 7. На протяжении всех 6 недель созревания количества *Propionibacteria* были на по крайней мере 0,5-1 порядка величины выше в лактицин-продуцирующих сырах В, чем в низин-продуцирующих сырах С и схожими с таковыми в не продуцирующих бактериоцин сырах А. После дня 14, когда температуру созревания повышали с 7 до 20°C, количества *Propionibacteria* в лактицин-продуцирующих сырах увеличивались на приблизительно 2 порядка величины до 1×10^9 КОЕ/г к дню 21, в то время как концентрация в не продуцирующих бактериоцин сырах оставалась на уровне приблизительно 3×10^7 г/мл, а в низин-продуцирующем сыре - на уровне 1×10^6 КОЕ/г. На этой стадии периода созревания глазки отмечались в частях, отделенных для посева, в одном из Вас сырах и во всех трех Лас⁺ сырах. Глазки не были видимыми в Нис⁺ сырах. Эти результаты свидетельствуют об находящейся под отрицательным влиянием в силу присутствия низина активности *Propionibacteria* в сырах С, но не в сырах В, в которых присутствует лактицин.

Таблица 7

Подсчет спор *P. freudenreichii*

День	Сыры *		
	А	В	С
1	$2,01 \times 10^6$	$4,28 \times 10^6$	$2,19 \times 10^5$
7	$1,28 \times 10^7$	$9,28 \times 10^6$	$3,11 \times 10^6$
14	$2,67 \times 10^6$	$7,46 \times 10^6$	$1,40 \times 10^6$
21	$1,88 \times 10^7$	$9,83 \times 10^8$	$1,12 \times 10^6$
28	$1,92 \times 10^8$	$5,77 \times 10^7$	$3,52 \times 10^6$
35	$9,07 \times 10^7$	$1,56 \times 10^8$	$2,91 \times 10^6$
42	$2,05 \times 10^8$	$1,03 \times 10^8$	$1,29 \times 10^7$

* Количество спор *P. freudenreichii* в 1 г (средние значения относительно трех сыров каждого типа).

Подсчет *Lactococcus lactis*. Результаты представлены в табл. 8. Количества заквасочных культур *Lactococcus lactis* постепенно уменьшались во всех сырах на протяжении всех 6 недель созревания. После дня 14 лактицин-продуцирующие заквасочные культуры в сырах В продемонстрировали лучшую выживаемость, чем не продуцирующие бактериоцин заквасочные культуры или низин-продуцирующие заквасочные культуры в сырах А и С соответственно. Коэффициенты выживания для дня 35 и дня 42 можно было правильно определить, поскольку концентрации уменьшились ниже 1×10^6 КОЕ/мл.

День	Подсчет спор <i>L. lactis</i>		
	Сыры *		
	А	В	С
1	$1,68 \times 10^9$	$5,39 \times 10^8$	$7,72 \times 10^8$
7	$3,81 \times 10^8$	$3,32 \times 10^8$	$1,75 \times 10^9$
14	$4,08 \times 10^8$	$3,76 \times 10^7$	$5,03 \times 10^8$
21	$1,70 \times 10^7$	$7,46 \times 10^7$	$3,56 \times 10^6$
28	$9,21 \times 10^6$	$6,65 \times 10^7$	$3,77 \times 10^6$

* Количество спор *L. lactis* в 1 г (средние значения относительно трех сыров каждого типа).

Содержания органических кислот. Результаты представлены в табл. 9. Низин, присутствующий в сыре С, несомненно, эффективен в ингибировании образования масляной кислоты с помощью *Cl. tyrobutyricum*, но в то же самое время ингибирует образование уксусной кислоты и пропионовой кислоты (все значения ниже в случае сыров С по сравнению с сыром А). Лактицин в сырах В также эффективен в ингибировании образования масляной кислоты, но с другой стороны, не уменьшает образование уксусной кислоты и пропионовой кислоты, но даже, как представляется, стимулирует их образование. Это означает, что лактобактерии и *Propionibacteria* в заквасочных культурах не ингибируются (в значительной степени) под действием лактицина, между тем как они ингибируются под действием низина.

Таблица 9

Сыр	Содержание органических кислот в сырах		
	Уксусная кислота (мг/кг)	Пропионовая кислота (мг/кг)	Масляная кислота (мг/кг)
А1	1330	3341	3095
А2	1298	3269	3290
А3	1670	3478	2498
среднее значение (А)	1433	3363	2961
В1	2267	5787	145
В2	2780	4876	334
В3	2808	5285	351
среднее значение (В)	2619	5316	277
С1	2011	30	330
С2	923	22	149
С3	1007	146	1323
среднее значение (С)	1314	66	601

В заключение, хотя низин-продуцирующие заквасочные культуры эффективны в предотвращении пролиферации *Cl. tyrobutyricum*, они также ингибируют рост *Propionibacterium freudenreichii*, таким образом приводя к ненадлежащим сырам типа швейцарского. Сыры, полученные, исходя из лактицин-продуцирующих заквасочных культур, были также достаточно эффективными в предотвращении пролиферации *Cl. tyrobutyricum*, но в то же время не ингибировали рост *Propionibacterium freudenreichii*. Сыры типа швейцарского, полученные с использованием лактицин-продуцирующих заквасочных культур, были улучшены по показателю содержания *Propionibacterium*, образования глазков и структуры.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Заквасочная культура для приготовления творога, включающая штамм *Propionibacteria* и источник лактицина, причем указанный штамм *Propionibacteria* выбран из штамма *P. johnsonii*, штамма *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, штамма *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* или их смеси; а источник лактицина представляет собой штамм *Lactococcus lactis* subsp., способный продуцировать лактицин.

2. Заквасочная культура по п.1, дополнительно содержащая штамм лактобактерий, выбранный из штамма *L. Lactis*, штамма *S. Thermophiles* или их смеси.
3. Заквасочная культура по п.1 или 2, в которой лактицин представляет собой лактицин 3147.
4. Заквасочная культура по любому из пп.1-3, в которой источником лактицина является штамм *L. lactis subsp. lactis*, штамм *L. lactis subsp. cremoris* или штамм *L. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*.
5. Заквасочная культура по любому из пп.1-4, дополнительно содержащая один или более штаммов, выбранных из штамма *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis*, и/или штамма *Lactobacillus acidophilus*, и/или штамма *Lactobacillus helveticus*, и/или штамма *Streptococcus thermophilus*, предпочтительно адаптированного к лактицину.
6. Способ производства творога из исходного продукта, содержащего молоко, который включает внесение в исходный продукт заквасочной культуры по пп.1-5.
7. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором источником лактицина является штамм лактококков, содержащий плазмиду pMRC01.
8. Способ производства сыра, который включает (d) производство сыра из творога, полученного способом по п.6 или 7.
9. Способ по п.8, в котором сыром является сыр типа Эмменталь или типа Маасдам, наиболее предпочтительно типа Маасдам.
10. Применение заквасочной культуры по любому из пп.1-5 для производства творога из исходного продукта, содержащего молоко.
11. Творог, получаемый способом по п.6 или 7.
12. Сыр, получаемый способом по п.8 или 9.
13. Творог или сыр по п.11 или 12, характеризующийся содержанием низина, составляющим менее чем 50 МЕ на 1 г, и содержанием бактериоцина типа Па, в особенности содержанием плантарицина, которое не является эффективным для предотвращения прорастания спор *Listeria monocytogenes*.

