

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036321**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.26

(21) Номер заявки
201891030

(22) Дата подачи заявки
2013.04.09

(51) Int. Cl. *C12N 1/20* (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23K 10/16 (2016.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 31/10 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

(54) ШТАММ LACTOBACILLUS PARACASEI CHCC12777 DSM24651, ОБЛАДАЮЩИЙ ПРОТИВОГРИБКОВЫМИ СВОЙСТВАМИ

(31) 12163508.0; PCT/EP2012/056384;
12168977.2; 13154591.5
(32) 2012.04.09; 2012.04.09; 2012.05.22;
2013.02.08

(33) EP

(43) 2018.09.28

(62) 201491847; 2013.04.09

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

(72) Изобретатель:
**Хорнбек Тина, Лисберг Майке,
Дионер Силья Кей (DK)**

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

(56) US-A1-20110045134

SCHWENNINGER S.M. et al. Detection of Antifungal Properties in *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* SM20, SM29, and SM63 and Molecular Typing of the Strains. *Journal of Food Protection*, 2005, Vol. 68, No. 1, pp. 111-119

THARMARAJ N. et al. Antimicrobial effects of probiotic bacteria against selected species of yeasts and moulds in cheese-based dips. *International Journal of Food Science & Technology*, 2009, 44, pp. 1916-1926

SCHNURER J. et al. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 2005, 16, pp. 70-78

(57) Изобретение относится к штамму *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 DSM24651, обладающему противомикробными свойствами. Кроме того, настоящее изобретение относится к противогрибковой композиции, содержащей этот штамм, пищевым, кормовым и фармацевтическим продуктам, содержащим указанный штамм или противогрибковую композицию, способу получения таких пищевых, кормовых и фармацевтических продуктов и к применению указанных штамма и противогрибковой композиции для приготовления пищевого, кормового или фармацевтического продукта и для ингибирования роста дрожжей и плесневых грибов.

B1**036321****036321****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области биозащиты, в частности к штамму *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 DSM24651, обладающему противогрибковыми свойствами. Кроме того, настоящее изобретение относится к противогрибковой композиции, содержащей этот штамм, , пищевым, кормовым и фармацевтическим продуктам, содержащим такую противогрибковую композицию, способу получения таких пищевых, кормовых и фармацевтических продуктов, способу уменьшения содержания дрожжей и плесневых грибов в таких пищевых, кормовых и фармацевтических продуктах и к применению этой противогрибковой композиции.

Уровень техники изобретения

В течение многих лет молочнокислые бактерии использовались для увеличения срока хранения пищевых продуктов. В процессе брожения молочнокислые бактерии вырабатывают молочную кислоту и другие органические кислоты, что понижает значение pH пищевого продукта, делая его непригодным для роста нежелательных микроорганизмов, таких как патогенные бактерии, дрожжи и грибы.

Кроме того, некоторые молочнокислые бактерии вырабатывают метаболиты, обладающие противомикробной активностью.

В европейской патентной заявке № EP 0221499 описаны противогрибковые свойства штамма *Lactobacillus rhamnosus* NRRL-B-15972, который способен ингибировать рост различных плесневых грибов при культивировании на агаризованной среде с добавлением огуречного сока.

Европейская патентная заявка № EP 0576780 относится к штамму *Lactobacillus rhamnosus* LC-705, который способен ингибировать рост *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* и *Candida* на среде, приготовленной на основе молочной сыворотки с добавлением казеинового гидролизата и дрожжевого экстракта.

Европейская патентная заявка № EP 1442113 относится к обладающей противомикробной активностью смеси *Propionibacterium jensenii* и *Lactobacillus* sp., таких как *Lactobacillus rhamnosus*, для применения для биозащиты.

Тем не менее, все еще существует потребность в биозащитных агентах с улучшенным противогрибковым действием в виде отдельных штаммов или в комбинации с другими биозащитными штаммами.

Сущность изобретения

Целью настоящего изобретения является создание новых штаммов молочнокислых бактерий, которые являются высокоэффективными биозащитными агентами.

В результате обширного скрининга и исследований авторами настоящего изобретения было обнаружено, что некоторые штаммы *Lactobacillus paracasei* обладают значительно более сильным действием против дрожжей и плесневых грибов по сравнению с имеющимися на рынке коммерческими биозащитными культурами, а также широко используемым химическим консервантом сорбатом калия.

Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что определенная группа молочнокислых бактерий, находясь в комбинации с другой группой молочнокислых бактерий, обладает значительным синергическим противомикробным действием. Противомикробное действие этих объединенных двух групп бактерий неожиданно оказалось сильнее, чем сумма отдельных действий этих двух групп бактерий.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан рост плесневых грибов в йогурте с жирностью 1,5%, ферментированном только заквасочной культурой YF-L901 (верхний ряд), вместе с HOLDBAC™ YM-B (средний ряд) и вместе с *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366. Исследуемые контаминанты, добавленные в концентрациях, указанных в тексте, были следующими (слева направо): *Penicillium brevicompactum* (M1), *Penicillium commune* (M6), *Aspergillus versicolor* (M7) и *Penicillium crustosum* (M10) соответственно. Йогурты инкубировали при температуре 7±1°C в течение 45 суток.

На фиг. 2 показано количество клеток изолята *Debaryomyces hansenii*, добавленного в йогурт с жирностью 1,5%, ферментированный только заквасочной культурой YF-L901 (контроль) или вместе со следующими штаммами: HOLDBAC™ YM-B (HoldBac YM-B), HOLDBAC™ YM-C (HoldBac YM-C) или *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (CHCC 5366). Йогурты хранили при температуре 7±1°C и анализировали через соответствующие интервалы времени.

На фиг. 3 показан рост плесневых грибов на чашках с молоком, ферментированным только заквасочной культурой (контроль, первая фотография), вместе с *Lb. paracasei* CHCC14676 (вторая фотография), вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC5366 (третья фотография) или вместе с комбинацией *Lb. paracasei* CHCC14676 и *Lb. rhamnosus* CHCC5366 (четвертая фотография). Исследуемые контаминанты, добавленные в концентрациях, указанных в тексте, были следующими (от левого верхнего по часовой стрелке до левого нижнего на чашке): *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* и *Penicillium crustosum* соответственно. Чашки инкубировали при температуре 7±1°C в течение 12 суток.

На фиг. 4 показан рост (1) *Penicillium solitum*, (2) *P. palitans*, (3) *P. discolor*, (4) *P. spathulatum*, (5) *P. commune*, (6) *P. crustosum*, (7) *P. paneum*, (8) *P. roqueforti* в контрольном йогурте (левая колонка), в йогурте, изготовленном с 0,023% сорбата калия (средняя колонка), и в йогурте, изготовленном с 1Е+0,7 КОЕ/г CHCC5366 (правая колонка) после 60 суток инкубации при температуре 7°C, при инокуляции в

концентрации приблизительно 1000 спор на чашку.

На фиг. 5 показан рост *Mucor* spp. на греческом йогурте, приготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой (левая чашка), или из молока, ферментированного в присутствии *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (правая чашка).

На фиг. 6 показан рост плесневого гриба *Rhizopus stolonifer* на греческом йогурте, приготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой (К, т.е. контроль), заквасочной культурой и HOLDBAC™ YM-B (YM-B), заквасочной культурой и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366) или заквасочной культурой и комбинацией *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5366+14676).

На фиг. 7 показан рост *Saccharomyces cerevisiae* на белом рассольном сыре, изготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой (контроль); заквасочной культурой и HOLDBAC™ YM-B (YM-B) или заквасочной культурой, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366+14676).

На фиг. 8 показан рост *Kluyveromyces marxianus* на белом рассольном сыре, изготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой (контроль); заквасочной культурой и HOLDBAC™ YM-B (YM-B) или заквасочной культурой, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366+14676).

На фиг. 9 показан рост *Penicillium commune* на белом рассольном сыре, изготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой (К, т.е. контроль); заквасочной культурой и HOLDBAC™ YM-B (YM-B) или заквасочной культурой, *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366+14676).

На фиг. 10 показан рост *P. crustosum* на белом рассольном сыре, изготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой (К, т.е. контроль); заквасочной культурой и HOLDBAC™ YM-B (YM-B) или заквасочной культурой и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366).

На фиг. 11 показан рост плесневого гриба *Penicillium paneum* в йогурте с жирностью 1,5%, изготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой (К, т.е. контроль), заквасочной культурой и HOLDBAC™ YM-B (YM-B), заквасочной культурой и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366) или заквасочной культурой и комбинацией *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5366+14676).

На фиг. 12 показан рост плесневого гриба *Penicillium crustosum* в йогурте с жирностью 1,5%, изготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой (верхний ряд), заквасочной культурой и HOLDBAC™ YM-B (второй ряд), заквасочной культурой и *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (третий ряд) или заквасочной культурой и комбинацией *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (нижний ряд). Исследуемый контаминант добавляли в концентрациях 100 спор на чашку и инкубировали йогурты при температуре 7±1°C (левая колонка), 12±1°C (центральная колонка) или 22±1°C (правая колонка) в течение 36 суток.

Подробное описание изобретения

Определения.

Используемый термин "молочнокислая бактерия" обозначает грамположительную микроаэрофильную или анаэробную бактерию, которая сбраживает сахара с образованием кислот, в том числе молочной кислоты, в качестве преимущественно продуцируемой кислоты. Наиболее широко используемые в промышленности молочнокислые бактерии обнаружены в роде *Lactobacillales*, который включает в себя *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp. и *Enterococcus* spp. Они часто используются в качестве пищевых культур отдельно или в комбинации с другими молочнокислыми бактериями.

Подразумевается, что термин "пищевой продукт" также включает сыр. Подразумевается, что термин "сыр" включает любой сыр, включая твердые, полутвердые и мягкие сыры, такие как сыры следующих видов: Домашний, Фета, Чеддер, Пармезан, Моцарелла, Эмменталь, Данбо, Гауда, Эдам, сыры типа Фета, голубые сыры, рассольные сыры, Камамбер и бри. Специалисту в данной области техники известно, как из коагулянта получить сыр, способы можно найти в литературе, см., например, Kosikowski, F.V., and V.V. Mistry, "Cheese and Fermented Milk Foods", 1997, 3rd Ed. F.V. Kosikowski, L.L.C. Westport, CT. В настоящем изобретении сыр, имеющий концентрацию NaCl ниже 1,7% (по массе), называется "слабосоленый сыр".

Молочнокислые бактерии, включая бактерии видов *Lactobacillus* sp. и *Lactococcus* sp., как правило, поступают в молочную промышленность в виде замороженных или лиофилизированных культур для получения производственной закваски или в виде так называемых культур для прямого внесения в ванну (DVS), предназначенных для непосредственной инокуляции в ферментационный чан или ванну для производства молочного продукта, такого как кисломолочный продукт или сыр. Такие культуры молочнокислых бактерий обычно называются "заквасочные культуры" или "закваски".

Используемый термин "мезофильный" относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при умеренных температурах (15-40°C). Наиболее широко применяемые в промышленности мезофиль-

ные бактерии включают в себя *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp. Термин "мезофильное брожение" относится здесь к брожению при температуре от примерно 22°C до примерно 35°C. Термин "мезофильный кисломолочный продукт" относится к кисломолочным продуктам, полученным путем мезофильного брожения мезофильной заквасочной культуры и включающим в себя такие кисломолочные продукты, как пахта, простокваша, сквашенное молоко, сметана, сквашенные сливки и пресный сыр, такой как кварк, творог и сливочный сыр.

Используемый термин "термофильный" относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при температурах выше 43°C. Наиболее широкоприменяемые в промышленности термофильные бактерии включают *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. Термин "термофильное брожение" относится к брожению при температуре выше примерно 35°C, например от примерно 35°C до примерно 45°C. Термин "термофильный кисломолочный продукт" относится к кисломолочным продуктам, полученным путем термофильного брожения термофильной заквасочной культуры и включающим в себя такие кисломолочные продукты, как йогурт с ненарушенным сгустком, йогурт с нарушенным сгустком и питьевой йогурт.

Под термином "молоко" понимается секрет молочной железы, получаемый путем доения любого млекопитающего, такого как коровы, овцы, козы, буйволы или верблюды. В предпочтительном варианте осуществления изобретения молоко является коровьим молоком. Термин "молоко" также включает в себя растворы белка/жира, изготовленные из растительных материалов, например соевое молоко.

Термин "молочный субстрат" относится к любому сырому и/или переработанному молочному материалу, который может быть подвергнут брожению в соответствии со способом настоящего изобретения. Так, подходящие молочные субстраты включают в себя без ограничений растворы/суспензии любых молочных или молокообразных продуктов, содержащих белок, таких как цельное молоко или молоко с пониженным содержанием жира, обезжиренное молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, молочная сыворотка, сывороточный пермеат, лактоза, маточная жидкость от кристаллизации лактозы, концентрат сывороточного белка или сливки. Очевидно, что молочный субстрат может быть получен от любого млекопитающего, например, представлять собой практически чистое молоко млекопитающих или восстановленный молочный порошок.

Перед брожением молочный субстрат может быть гомогенизирован и пастеризован в соответствии со способами, известными из уровня техники.

Используемый здесь термин "гомогенизация" означает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизация проводится перед брожением, то она может быть проведена таким образом, чтобы разбить молочный жир на частицы более мелкого размера так, чтобы он больше не отделялся от молока. Это может быть выполнено путем принудительного пропуска молока под высоким давлением через маленькие отверстия.

Используемый здесь термин "пастеризация" означает обработку молочного субстрата, приводящую к уменьшению или устранению присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно пастеризация достигается путем поддержания определенной температуры в течение определенного периода времени. Определенная температура, как правило, достигается путем нагревания. Температура и продолжительность могут быть выбраны для того, чтобы убить или инактивировать определенные бактерии, например вредные бактерии. После этого может следовать этап быстрого охлаждения.

Термин "брожение (сбраживание)" в способах настоящего изобретения означает превращение углеводов в спирты или кислоты благодаря действию микроорганизма. Предпочтительно брожение в способах настоящего изобретения включает в себя превращение лактозы в молочную кислоту.

Процессы брожения, используемые в производстве молочных продуктов, хорошо известны, и специалисту в данной области техники хорошо известно как выбрать подходящие условия процесса, такие как температура, содержание кислорода, количества и свойства микроорганизма(ов), а также время процесса. Очевидно, что условия брожения выбираются таким образом, чтобы обеспечить осуществление настоящего изобретения, т.е. получение молочного продукта в твердой (например, сыр) или жидкой (например, кисломолочный продукт) форме.

Преимуществом композиций настоящего изобретения является то, что нежелательные микроорганизмы, выбранные из грибов, бактерий и их смесей, например, на пищевых, кормовых и фармацевтических продуктах, а также у людей и животных могут быть подавлены. В частности, предполагается предотвращение и/или ингибирование роста грибов, таких как дрожжи и плесневые грибы. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления изобретения термин "противомикробный" следует понимать как "противогрибковый".

Термин "нежелательные микроорганизмы" относится к таким микроорганизмам, как бактерии и грибки, такие как дрожжи, которые являются патогенными и/или способны вызывать порчу пищевых, кормовых или фармацевтических продуктов. Преимуществом композиций настоящего изобретения является то, что нежелательные микроорганизмы, выбранные из грибов, бактерий и их смесей, например, на пищевых, кормовых и фармацевтических продуктах, а также у людей и животных могут быть подавлены. В частности, предполагается предотвращение и/или ингибирование роста грибов, таких как дрожжи и плесневые грибы.

Термины «"ингибировать" и "ингибирование" по отношению к дрожжам и плесневым грибам означают, например, что рост или количество или концентрация дрожжей и плесневых грибов, например, в пищевых продуктах и/или на поверхности пищевых продуктов, содержащих штаммы настоящего изобретения, являются меньшими, чем в пищевых продуктах и/или на поверхности пищевых продуктов, которые не содержат таких штаммов.

В настоящем контексте термин "мутант" следует понимать как штамм, полученный из штамма настоящего изобретения при помощи, например, генной инженерии, радиационного облучения и/или химической обработки. Предпочтительно, чтобы мутант представлял собой функционально эквивалентный мутант, например мутант, который обладает практически аналогичными или улучшенными свойствами (например, это относится к противогрибковым свойствам) по сравнению с исходным штаммом. Такой мутант является частью настоящего изобретения. В частности, термин "мутант" относится к штамму, полученному путем воздействия на штамм настоящего изобретения любой общепринятой процедуры мутагенеза, включая обработку химическим мутагеном, таким как этилметансульфонат (ЭМС) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ-излучение или спонтанное возникновение мутаций. Мутант может быть подвергнут действию нескольких процедур мутагенеза (под одной процедурой следует понимать один этап мутагенеза с последующим этапом скрининга/отбора), но в настоящий момент является предпочтительным проводить не более 20, или не более 10, или не более 5 процедур (или этапов скрининга/отбора). У мутанта, являющегося предпочтительным в настоящее время, менее 5%, или менее 1%, или даже менее 0,1% нуклеотидов в бактериальном геноме заменены другим нуклеотидом или удалены по сравнению с исходным штаммом.

Следует считать, что термины, использованные в единственном числе, в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) включают как единственное, так и множественное число, если прямо не указано иное или если это явно не противоречит контексту. Термины "включающий", "имеющий", "включающий в себя" и "содержащий" следует рассматривать как неограничивающие термины (т.е. означающие "включающие без ограничений"), если не указано иное. Указание диапазонов значений в настоящем описании является только кратким способом индивидуального указания каждого отдельного значения, находящегося в пределах этого диапазона, если не указано иное, и каждое отдельное значение является включенным в описание, как если бы оно было отдельно в нем указано. Все описанные здесь способы могут быть осуществлены в любом подходящем порядке, если прямо не указано иное или если это явно не противоречит контексту. Использование любого или всех примеров или указывающих на примеры выражений (например, "такой как"), приведенных в настоящей заявке, предназначено исключительно для лучшего раскрытия настоящего изобретения и не накладывает ограничений на объем изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в описании не должна рассматриваться как указание на любой незаявленный элемент как необходимый для осуществления изобретения.

Осуществление и аспекты изобретения

Авторы настоящего изобретения провели скрининг 200 кандидатов из *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus rhamnosus* с целью найти штаммы, наиболее эффективные против широкого спектра микроорганизмов, таких как дрожжи и плесневые грибы.

Скрининг проводили в модельной системе, имитирующей, настолько, насколько это возможно, мезофильные кисломолочные продукты в среде на основе молока, к которой добавляли соответствующую заквасочную культуру вместе с биозащитными кандидатами или без них и которую подвергали сбраживанию в условиях, используемых для мезофильных кисломолочных продуктов. Исследуемые организмы выделяли из мезофильных кисломолочных продуктов. Как очищенные молочнокислые бактерии из культур HOLDBAC™ (Danisco A/S, Дания), так и полные культуры HOLDBAC™ YM-B и HOLDBAC™ YM-C, содержащие как молочнокислые бактерии, так и пропионовокислые бактерии, использовали в качестве показателя исходного уровня биологической защиты.

Эта модельная система описана в европейской патентной заявке № EP 11161609.0.

Было обнаружено, что семнадцать кандидатов из *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus rhamnosus* в большинстве случаев ингибируют 12 индикаторных грибов, а также продемонстрировали лучший уровень биологической защиты, чем контрольные молочнокислые бактерии, при испытании при температуре 25°C.

Испытания на йогурте показали, что один штамм *Lactobacillus rhamnosus* - штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, который был депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под регистрационным номером DSM23035, значительно лучше ингибирует дрожжи и плесневые грибы, чем коммерчески доступная биозащитная культура.

Ингибирующее действие штамма на дрожжи и плесневые грибы может быть определено путем хранения кисломолочных продуктов при подходящей температуре в течение подходящего периода времени хранения, как описано в примерах ниже.

Как правило, подходящая температура, при которой следует осуществлять данный способ, зависит от температуры, при которой, как правило, хранится и/или производится конкретный пищевой, кормовой или фармацевтический продукт. Температура, при которой, как правило, хранятся эти продукты, состав-

ляет от 5 до 26°C, предпочтительно эта температура составляет 8°C.

Время хранения при этой температуре зависит от времени, в течение которого пищевой, кормовой или фармацевтический продукт, как правило, хранится (срока хранения). Время хранения обычно составляет 5-65, предпочтительно 7-60 суток, более предпочтительно 7-28 суток и еще более предпочтительно время хранения составляет примерно 21 сутки.

Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к штамму *Lactobacillus rhamnosus*, выбранному из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, который был депонирован в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под регистрационным номером DSM23035, и полученных из него мутантных штаммов.

Таким образом, кроме вышеуказанного депонированного штамма настоящее изобретение также относится к мутантам, которые были получены из этого штамма, т.е. они были получены с использованием депонированного штамма CHCC5366 в качестве исходного материала. Мутантный штамм может быть получен из депонированного штамма, например, при помощи генной инженерии, радиационного облучения, УФ-излучения, химической обработки и/или способов, индуцирующих изменения в геноме. В соответствии с настоящим изобретением мутант будет ингибировать и/или предотвращать рост некоторых бактерий или грибов, предпочтительно плесневых грибов. Предпочтительно, чтобы мутант обладал практически 80% или более, по меньшей мере 90% или более, по меньшей мере 95% или более или даже до 100% противогрибковой активности по сравнению со своим исходным штаммом, определяемой, например, в анализе, описанном в примере 1, с использованием одного из плесневых грибов *P. brevicompactum*, *P. commune*, *A. versicolor*, *D. hansenii* или *P. crustosum* в качестве контрольного организма, рост которого необходимо ингибировать.

Для специалиста в данной области техники очевидно, что используя депонированный штамм в качестве исходного материала, специалист в данной области техники может при помощи стандартного мутагенеза или методов повторного выделения легко получить его дополнительные мутанты или производные, которые сохраняют описанные здесь характерные признаки и преимущества. Соответственно, термин "мутантные штаммы, полученные из него" в первом аспекте относится к мутантным штаммам, полученным с использованием депонированного штамма в качестве исходного материала.

Второй аспект относится к противогрибковой композиции, содержащей по меньшей мере один штамм *Lactobacillus rhamnosus* в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, предпочтительно, штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366.

При испытании штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 в комбинации с различными штаммами *Lactobacillus paracasei* неожиданно было обнаружено, что эти комбинации оказались даже более эффективными, чем каждый из этих штаммов в отдельности, даже когда общие концентрации клеток были одинаковыми. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к штамму *Lactobacillus paracasei* CHCC12777. В другом варианте осуществления изобретение относится к комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676. Эти комбинации, по-видимому, оказались более эффективными, чем контрольные культуры HOLDBAC™ YM-B и HOLDBAC™ YM-C (Danisco, Дания).

Таким образом, настоящее изобретение относится к противогрибковым композициям, содержащим штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 DSM24651. Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к противогрибковой композиции, содержащей штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC12777.

Противогрибковая композиция, как правило, содержит бактерии в концентрированном виде, включая замороженные, высушенные или лиофилизированные концентраты, как правило, имеющие концентрацию жизнеспособных клеток в диапазоне от 10^4 до 10^{12} КОЕ (колониеобразующих единиц) на 1 г композиции, в том числе по меньшей мере 10^4 КОЕ на 1 г композиции, как, например, по меньшей мере 10^5 КОЕ/г, например по меньшей мере 10^6 КОЕ/г, как, например, по меньшей мере 10^7 КОЕ/г, например по меньшей мере 10^8 КОЕ/г, как, например, по меньшей мере 10^9 КОЕ/г, например по меньшей мере 10^{10} КОЕ/г, как, например, по меньшей мере 10^{11} КОЕ/г. Таким образом, композиция настоящего изобретения предпочтительно находится в замороженной, высушенной или лиофилизированной форме, например, как культура для прямого внесения в ванну (DVS). Однако композиция настоящего изобретения также может представлять собой жидкость, которая получается после суспендирования замороженных, высушенных или лиофилизированных клеточных концентратов в жидкой среде, такой как вода или ФСБ-буфер. Когда композиция настоящего изобретения представляет собой суспензию, концентрация жизнеспособных клеток находится в диапазоне от 10^4 до 10^{12} КОЕ (колониеобразующих единиц) на 1 мл композиции, в том числе по меньшей мере 10^4 КОЕ/мл композиции, как, например, по меньшей мере 10^5 КОЕ/мл, например по меньшей мере 10^6 КОЕ/мл, как, например, по меньшей мере 10^7 КОЕ/мл, например по меньшей мере 10^8 КОЕ/мл, как, например, по меньшей мере 10^9 КОЕ/мл, например по меньшей мере 10^{10} КОЕ/мл, как, например, по меньшей мере 10^{11} КОЕ/мл.

В качестве дополнительных компонентов композиция может содержать криопротекторы и/или стандартные добавки, включая питательные вещества, такие как дрожжевой экстракт, сахара и витамины, например витамин А, С, D, К или витамины группы В. Подходящие криопротекторы, которые могут

быть добавлены в композиции настоящего изобретения, представляют собой компоненты, которые улучшают переносимость микроорганизмами низких температур, такие как маннит, сорбит, триполифосфат натрия, ксилит, глицерин, раффиноза, мальтодекстрин, эритрит, трейт, трегалоза, глюкоза и фруктоза. Другие добавки могут включать в себя, например, углеводы, вкусоароматические добавки, минералы, ферменты (например, сычужный фермент, лактаза и/или фосфолипаза).

Противогрибковая композиция настоящего изобретения может применяться с любым пищевым, кормовым и фармацевтическим продуктом, который подвержен микробиальной порче и/или контаминации дрожжами и плесневыми грибами. К таким продуктам относятся, без ограничений, фрукты и овощи, включая продукты их переработки, зерно и продукты переработки зерна, молочные продукты, мясо, мясо птицы и морепродукты. В особенно предпочтительных вариантах осуществления изобретения композиция применяется с молочным продуктом и/или мясом и мясом птицы. В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиции настоящего изобретения применяются в качестве добавки при приготвлении молочных продуктов, таких как йогурт, творог, сметана, сливочный сыр и т.п.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиции настоящего изобретения применяются для ингибирования и/или предотвращения роста грибов, которые вызывают контаминацию в процессах в молочной промышленности, в частности в процессах сбраживания молока. Композиции настоящего изобретения могут применяться, например, для ингибирования и/или предотвращения роста дрожжей, таких как дрожжи родов *Kluyveromyces* (например, *K. marxianus*, *K. lactis*), *Pichia* (например, *P. fermentans*), *Yarrowia* (например, *Y. lipolytica*), *Candida* (например, *C. sake*) и т.п.; или плесневых грибов, таких как плесневые грибы родов *Penicillium* (например, *P. nalgiovense*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. brevicompactum*, *P. glabrum*), *Mucor* spp., *Cladiosporium* ssp., *Aspergillus* (например, *A. versicolor*), *Debaryomyces* (например, *D. hansenii*) и т.п. Особенно предпочтительным является применение композиций настоящего изобретения для ингибирования и/или предотвращения роста видов *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Penicillium nalgiovense*, *Cladiosporium* ssp., *Penicillium commune*, *Mucor* spp., *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium crustosum*, *Kluyveromyces lactis* и/или *Debaryomyces hansenii*.

Противогрибковая композиция в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения может также применяться в качестве фармацевтического продукта, предпочтительно продукта для лечения инфекций, вызванных патогенными грибами, такими как патогенные дрожжи.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к пищевому, кормовому или фармацевтическому продукту, содержащему штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 DSM24651 в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или противогрибковую композицию, содержащую по меньшей мере один штамм *Lactobacillus paracasei* в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения пищевой, кормовой или фармацевтический продукт представляет собой пищевой продукт.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения такой пищевой продукт выбран из группы, состоящей из фруктов и продуктов переработки фруктов, овощей и продуктов переработки овощей, зерна и продуктов переработки зерна, молочных продуктов, мяса, мяса птицы и морепродуктов, а также их смесей.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения пищевой продукт представляет собой молочный продукт, предпочтительно мезофильный или термофильный кисломолочный продукт, такой как пресный сыр, йогурт, сметана или творог.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения пищевой продукт представляет собой мясо или мясо птицы.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения пищевой, кормовой или фармацевтический продукт представляет собой фармацевтический продукт.

Предпочтительно фармацевтический продукт представляет собой продукт, пригодный для введения противогрибковой композиции в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения человеку или животному для подавления патогенных микроорганизмов и облегчения симптомов, связанных с патогенными микроорганизмами. Примеры таких симптомов включают в себя симптомы, связанные с кандидозом. В таком варианте осуществления изобретения фармацевтический продукт может представлять собой единичную лекарственную форму, содержащую противогрибковую композицию. Предпочтительно единичная лекарственная форма является капсулой или таблеткой. Однако единичная лекарственная форма также может быть пригодной для нанесения на слизистую оболочку или кожу и, таким образом, находится в виде пасты, крема, мази и т.п.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения пищевого, кормового или фармацевтического продукта в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, включающему в себя добавление по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* в соответствии с первым аспектом или противогрибковой композиции в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения во время изготовления пищевого, кормового или фармацевтического продукта. Предпочти-

тельно данный способ также включает в себя этап регулирования технологических параметров во время процесса изготовления таким образом, чтобы концентрация по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus* оставалась постоянной или повышалась.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения концентрация по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* составляет по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/г, или каждого по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере 1×10^5 КОЕ/см² поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта. Предпочтительно концентрация по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* составляет по меньшей мере 5×10^6 КОЕ/г, или каждого по меньшей мере 5×10^6 КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере 5×10^5 КОЕ/см² поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта, например по меньшей мере 1×10^7 КОЕ/г или каждого по меньшей мере 1×10^7 КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/см² поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта, например по меньшей мере 5×10^7 КОЕ/г, или каждого по меньшей мере 5×10^7 КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере 5×10^6 КОЕ/см² поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта.

Когда пищевой, кормовой или фармацевтический продукт производится путем добавления композиции, содержащей штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 DSM24651, концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* составляет каждого по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/г, или каждого по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере 1×10^5 КОЕ/см² поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта. Предпочтительно концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* составляет каждого по меньшей мере 5×10^6 КОЕ/г, или каждого по меньшей мере 5×10^6 КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере 5×10^5 КОЕ/см² поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта. В еще одном варианте осуществления изобретения концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* составляет каждого по меньшей мере 1×10^8 КОЕ/г, или каждого по меньшей мере 1×10^8 КОЕ/мл пищевого, кормового или фармацевтического продукта, или каждого по меньшей мере 1×10^7 КОЕ/см² поверхности пищевого, кормового или фармацевтического продукта.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения технологические параметры регулируются во время процесса изготовления таким образом, чтобы концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* повышалась или оставалась постоянной.

Противогрибковую композицию настоящего изобретения проще всего применять путем смешивания с и/или нанесения на смешиваемый пищевой, кормовой или фармацевтический продукт, но она также является эффективной при нанесении на поверхность твердых пищевых продуктов или введении внутрь таких продуктов, например, при помощи инъекции. В других вариантах осуществления изобретения композиция может применяться в составе маринада, панировки, толченых специй, глазури, смеси красителей и т.п., при этом ключевым критерием является то, чтобы противогрибковая композиция была доступна на поверхности, подверженной бактериальной порче и контаминации дрожжами и плесневыми грибами. В других вариантах осуществления изобретения композиция может быть опосредованно приведена в контакт с поверхностью пищевого продукта путем нанесения композиции на упаковку пищевого продукта и затем приведения этой упаковки в контакт с поверхностью пищевого продукта. Необходимое для применения оптимальное количество будет зависеть от состава конкретного пищевого продукта, подлежащего обработке, и применяемого способа нанесения композиции на поверхность пищевого продукта, но оно может быть определено при помощи несложных экспериментов.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения способ включает один или несколько этапов брожения, и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus paracasei* или противогрибковая композиция могут быть добавлены в пищевой, кормовой или фармацевтический продукт до, во время или после этих одного или нескольких этапов брожения.

Предпочтительно способ включает сбраживание субстрата, такого как молочный субстрат, в присутствии по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* настоящего изобретения в течение периода времени, достаточного для проявления противогрибковой активности, по меньшей мере одного штамма *Lactobacillus paracasei* настоящего изобретения. Эта противогрибковая активность обладает эффектом ингибирования развития дрожжей и/или плесневых грибов в продукте, ферментированном по меньшей мере одним штаммом.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения способ включает сбраживание молочного субстрата заквасочной культурой, содержащей по меньшей мере один штамм родов, выбранных из *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc*, например по меньшей мере один штамм *Lactobacillus bulgaricus* и по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*, или, например, по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, по меньшей мере один штамм *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* и по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к пищевому продукту, получаемому способом в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к применению штамма *Lactobacillus paracasei* в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или противогрибковой композиции в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения для приготовления пищевого, кормового или фармацевтического продукта. Предпочтительно пищевой продукт, получаемый с применением штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 DSM24651 в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или противогрибковой композиции в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, представляет собой сыр, такой как Домашний, Фета, Чеддер, Пармезан, Моцарелла, Эмменталь, Данбо, Гауда, Эдам, сыр типа Фета, голубой сыр, рассольный сыр, Камамбер или Бри.

В последнем аспекте настоящее изобретение относится к применению штамма *Lactobacillus paracasei* в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или противогрибковой композиции в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения для ингибирования роста дрожжей и плесневых грибов, в частности, в пищевых и кормовых продуктах.

Варианты осуществления настоящего изобретения описаны ниже путем приведения неограничивающих примеров.

Примеры

Пример 1. Контрольное заражение йогурта, содержащего *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366.

Для визуальной оценки ингибирующего действия штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 на различные плесневые грибы *P. brevicompactum*, *P. commune*, *A. versicolor* и *P. crustosum* получали йогурт с жирностью 1,5%.

Гомогенизированное молоко (с жирностью 1,5%) подвергали термической обработке при температуре $95\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 5 мин в бутылках объемом 1 л на водяной бане и немедленно охлаждали. Коммерческую заквасочную культуру (F-DVS YF-L901, полученную от Chr. Hansen A/S, Дания) инокулировали в количестве 0,02%. Затем молоко инокулировали HOLDBAC™ YM-B (20 DCU/100 л) или *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 КОЕ/мл) и одну бутылку, инокулированную только заквасочной культурой, использовали в качестве контроля.

Молоко сбраживали при температуре $43\pm 1^\circ\text{C}$ до тех пор, пока значение pH не достигало $4,60\pm 0,1$. Полученный йогурт разливали по чашкам (100 г) и хранили при температуре $7\pm 1^\circ\text{C}$.

На следующий день после приготовления йогурт в чашках инокулировали в двух повторностях различными плесневыми грибами в качестве поверхностных контаминантов в одну точку на поверхности йогурта в количестве 100 спор на точку. Рост плесневых грибов оценивали визуально после хранения в течение 45 суток при температуре $7\pm 1^\circ\text{C}$.

Результаты испытания йогурта приведены на фиг. 1, на которой видно, что *P. brevicompactum* (M1), *P. commune* (M6), *A. Versicolor* (M7) и *P. crustosum* (M10) хорошо растут на йогурте, изготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой YF-L901 (верхний ряд) или заквасочной культурой и культурой HOLDBAC™ YM-B (средний ряд). В отличие от этого, когда во время брожения в молоке присутствовал *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (нижний ряд), рост всех исследуемых плесневых грибов был ингибирован.

Пример 2. Количественное определение ингибирующего действия *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 против *Debaryomyces hansenii*.

Для количественного определения ингибирующего действия *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 на *D. hansenii* получали йогурт.

Гомогенизированное молоко (с жирностью 1,5%) подвергали термической обработке при температуре $95\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 5 мин в бутылках объемом 1 л на водяной бане. Молоко немедленно охлаждали.

Каждую бутылку инокулировали коммерческой заквасочной культурой (F-DVS YF-L901, полученной от Chr. Hansen A/S, Дания) в количестве 0,02%. Затем молоко инокулировали HOLDBAC™ YM-B (20 DCU/100 л), или HOLDBAC™ YM-C (10 DCU/100 л), или *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 КОЕ/г) и одну бутылку, инокулированную только заквасочной культурой, использовали в качестве контроля.

Молоко сбраживали при температуре $43\pm 1^\circ\text{C}$ до тех пор, пока значение pH не достигало $4,60\pm 0,05$. Полученный йогурт разливали по чашкам (приблизительно 75 мл) и хранили при температуре $7\pm 1^\circ\text{C}$.

На следующий день после приготовления йогурта чашки в двух повторностях инокулировали дрожжами в количестве 0,75 мл на чашку с получением конечной концентрации 20 КОЕ/г. Дрожжи равномерно распределяли в йогурте. Чашки хранили под крышкой при температуре $7\pm 1^\circ\text{C}$ и анализировали через соответствующие интервалы времени для определения уровня контаминации *D. hansenii* путем посева 1 мл йогурта и последующих 1-кратных разведений в пептонно-солевом растворе на агар с дрожжевым экстрактом, глюкозой и хлорамфениколом (YGC) с последующей инкубацией в аэробных условиях в течение 5 суток при температуре 25°C .

Как показано на фиг. 2, рост *D. hansenii* подавлялся в присутствии штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, когда его вводили вместе с заквасочной культурой YF-L901 перед сбраживанием. Этот

штамм вызывал значительно более сильное ингибирование, чем коммерческие культуры HOLDBAC™ YM-B и HOLDBAC™ YM-C.

Пример 3.. Полуколичественное определение ингибирующего действия *Lb. paracasei* CHCC14676 и *Lb. rhamnosus* CHCC5366 по отдельности и в комбинации на различные плесневые контаминанты.

Для полуколичественного определения ингибирующего действия *Lb. paracasei* CHCC14676 и *Lb. rhamnosus* CHCC5366 по отдельности и в комбинации использовали анализ на агаре, имеющий сходство с процессом производства йогурта.

Гомогенизированное молоко (с жирностью 1,5% (мас./об.)) подвергали термической обработке при температуре 95°C в течение 5 мин и немедленно охлаждали. Коммерческую заквасочную культуру (F-DVS YC-350, полученную от Chr. Hansen A/S, Дания) инокулировали в количестве 0,02% и молоко разливали по бутылкам объемом 220 мл. Затем бутылки инокулировали *Lb. paracasei* CHCC14676, *Lb. rhamnosus* CHCC5366 и комбинацией этих двух штаммов, соответственно, с общей концентрацией 1×10^7 КОЕ/мл. Одну бутылку, инокулированную только заквасочной культурой, использовали в качестве контроля. Кроме того, во все бутылки добавляли 5% индикатора pH бромкрезоловый пурпурный и бромкрезоловый зеленый, чтобы получить представление о скорости закисления среды и получить синий/зеленый цвет среды, что в дальнейшем сделало более легким обнаружение роста исследуемых дрожжей и плесневых грибов. Все бутылки инкубировали на водяной бане при температуре $43 \pm 1^\circ\text{C}$ и проводили брожение в этих условиях до тех пор, пока значение pH не достигало $4,60 \pm 0,1$. После брожения бутылки сразу охлаждали на льду и энергично встряхивали, чтобы разрушить сгусток. Затем ферментированное молоко нагревали до температуры 40°C и добавляли 40 мл стерильного 5% раствора агара, который был расплавлен и охлажден до 60°C. Этот раствор наливали в стерильные чашки Петри и сушили эти чашки на столе с ламинарным потоком воздуха в течение 30 мин.

Соответствующие разведения суспензий полностью проросших спор выбранных плесневых грибов *Penicillium nalgiovense* (10×), *Penicillium commune* (100×), *Aspergillus versicolor* (100×) и *Penicillium crustosum* (100×) наносили в точку на чашках. Чашки инкубировали при температуре 7°C и анализировали на наличие роста плесневых грибов через соответствующие постоянные интервалы времени.

Результаты анализа на агаре приведены на фиг. 3, на которой видно, что все использованные в анализе плесневые грибы очень хорошо росли на чашках с агаром из молока, ферментированного только заквасочной культурой (контроль). Однако на чашках с агаром из молока, в котором во время брожения присутствовал *Lb. paracasei* CHCC14676 или *Lb. rhamnosus* CHCC5366, рост всех плесневых грибов значительно уменьшался. Кроме того, когда в молоке во время брожения *Lb. paracasei* CHCC14676 и *Lb. rhamnosus* CHCC5366 присутствовали в комбинации, еще более сильное ингибирование наблюдалось для посеянных на чашки *Penicillium commune*, *Aspergillus versicolor* и *Penicillium crustosum*.

Пример 4. Контрольное заражение йогурта, содержащего *Lb. rhamnosus* CHCC5366 и сорбат калия.

Пастеризованное молоко, содержащее 0,17% жира, использовали для приготовления трех различных партий йогурта с применением коммерческой заквасочной культуры, указанной в примере 1. Эту заквасочную культуру инокулировали в количестве 0,013%. Перед брожением в первую партию добавляли сорбат калия (0,023%), *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 КОЕ/г) добавляли во вторую партию, в то время как третью партию использовали в качестве контроля, содержащего только заквасочную культуру. Брожение осуществляли при температуре 43°C до тех пор, пока значение pH не достигало 4,55. После того как значение pH достигало 4,55, йогурт хранили при температуре 7°C.

Три различных типа йогурта распределяли по маленьким чашкам по приблизительно 100 г в каждую и поверхность инокулировали каждым из следующих плесневых грибов, ранее выделенных из испорченных кисломолочных продуктов, в количестве, обеспечивающем конечную концентрацию 1000 спор на чашку:

Penicillium solitum,
Penicillium palitans,
Penicillium discolor,
Penicillium spathulatum,
Penicillium commune,
Penicillium crustosum,
Penicillium paneum,
Penicillium roqueforti.

Йогурты инкубировали при температуре 7°C в течение 60 суток, рост различных плесневых грибов оценивали визуально с помощью фотографирования в конце 60-дневного периода.

Результаты, приведенные на фиг. 4, показывают, что присутствие *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 резко уменьшает разрастание и образование типичного зеленого/синего окрашивания различных плесневых грибов в йогурте во время хранения в течение 60 суток при температуре 7°C. Было обнаружено, что ингибирующее действие *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 на величину разрастания и образование окрашивания плесневых грибов было значительно более сильным, чем действие, вызываемое добавлением 0,023% сорбата калия.

Пример 5. Контрольное заражение греческого йогурта, содержащего комбинацию *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Для визуальной оценки ингибирующего действия комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 на *Mucor* spp. греческий йогурт получали следующим образом.

Пастеризованное молоко (с жирностью 1,5%) инокулировали коммерческой заквасочной культурой (F-DVS YF-L901, полученной от Chr. Hansen A/S, Дания) в количестве 0,02%. Одну партию, инокулированную только заквасочной культурой, использовали в качестве контроля. Другую партию дополнительно инокулировали комбинацией штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 КОЕ/г) и штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 КОЕ/г).

Молоко сбраживали при температуре $43 \pm 1^\circ\text{C}$ до конечного значения pH 4,55 (6-7 ч). Затем йогурт охлаждали до температуры $25 \pm 1^\circ\text{C}$ с обратным давлением 2 бар и хранили при температуре $6 \pm 1^\circ\text{C}$.

На следующий день после приготовления йогурта *Mucor* spp. инокулировали в качестве поверхностного контаминанта в чашки йогурта в двух повторностях путем нанесения одной точки на поверхность йогурта с концентрацией при инокуляции 100 спор на точку. Рост плесневых грибов оценивали визуально после хранения в течение 15 суток при температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Результаты испытания греческого йогурта представлены на фиг. 5, и они показывают, что *Mucor* spp. хорошо растет на йогурте, приготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой (левая чашка). В отличие от этого, когда во время брожения в молоке присутствовали *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (правая чашка), рост *Mucor* spp. был ингибирован.

Пример 6. Второе контрольное заражение греческого йогурта, содержащего комбинацию *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Для визуальной оценки ингибирующего действия комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 на плесень черного хлеба *Rhizopus stolonifer* греческий йогурт получали следующим образом.

Пастеризованное молоко (с жирностью 1,5%) инокулировали коммерческой заквасочной культурой (F-DVS YF-L901, полученной от Chr. Hansen A/S, Дания) в количестве 0,02%. Затем молоко дополнительно инокулировали HOLDBAC™ YM-B (10 DCU/100 л), штаммом *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 КОЕ/г) или комбинацией штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 КОЕ/г) и штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 КОЕ/г). Одну партию, инокулированную только заквасочной культурой, использовали в качестве контроля.

Молоко сбраживали при температуре $43 \pm 1^\circ\text{C}$ до конечного значения pH 4,55 (6-7 ч). Затем йогурт охлаждали до температуры $25 \pm 1^\circ\text{C}$ с обратным давлением 2 бар и хранили при температуре $6 \pm 1^\circ\text{C}$.

На следующий день после приготовления йогурта *Rhizopus stolonifer* инокулировали в качестве поверхностного контаминанта в чашки йогурта в двух повторностях путем нанесения одной точки на поверхность йогурта с концентрацией при инокуляции 100 спор на точку. Рост плесневых грибов оценивали визуально после хранения в течение 42 суток при температуре $7 \pm 1^\circ\text{C}$.

Результаты испытания греческого йогурта представлены на фиг. 6, и они показывают, что *Rhizopus stolonifer* хорошо растет на йогурте, приготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой (К, т.е. контроль) или заквасочной культурой и культурой HOLDBAC™ YM-B (YM-B). Однако в присутствии *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5366) рост *Rhizopus stolonifer* значительно ингибировался. Когда в молоке во время брожения присутствовали как *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, так и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5366+14676), то рост *Rhizopus stolonifer* ингибировался почти полностью.

Пример 7. Контрольное заражение белого рассольного сыра, содержащего комбинацию *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Для количественной оценки ингибирующего действия комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 против *Saccharomyces cerevisiae* получали белый рассольный сыр.

Пастеризованное и стандартизированное молоко инокулировали коммерческой заквасочной культурой (F-DVS SafeIT-1, полученной от Chr. Hansen A/S, Дания) в количестве 40 Ед. на 1000 л молока. Затем молоко дополнительно инокулировали HOLDBAC™ YM-B (10 DCU/100 л) или комбинацией штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 КОЕ/г) и штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 КОЕ/г). Одну партию, инокулированную только заквасочной культурой, использовали в качестве контроля. Молоко при температуре $36 \pm 1^\circ\text{C}$ обрабатывали сычужным ферментом (Chy-Max plus, полученным от Chr. Hansen A/S, Дания) в количестве 220 мл на 1000 л в течение 90 мин перед разрезанием. При значении pH 6,0 сгусток перекачивали в формы и оставляли для осушки до конечного значения pH 4,8-4,7 (20-24 ч). Сыр переносили в жестяные формы с холодным рассолом (8%) и хранили при температуре $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

На следующий день после приготовления белого рассольного сыра жестяные формы в двух повторностях инокулировали дрожжами в конечной концентрации 20 КОЕ/мл. Дрожжи равномерно дисперги-

ровали в рассоле. Чашки хранили под крышкой при температуре $7\pm 1^\circ\text{C}$ в течение периода времени до 40 суток и 10 г анализировали через соответствующие интервалы времени на уровень контаминации *Saccharomyces cerevisiae* путем посева соответствующих 1-кратных разведений в пептонно-солевом растворе на агар с дрожжевым экстрактом, глюкозой и хлорамфениколом (YGC) с последующей инкубацией в аэробных условиях в течение 5 суток при температуре 25°C .

Как показано на фиг. 7, рост *Saccharomyces cerevisiae* подавлялся в присутствии комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676, когда ее вводили вместе с заквасочной культурой SafeIT-1. Эти штаммы вызывали значительно более сильное ингибирование, чем коммерчески доступная культура HOLDBAC™ YM-B.

Пример 8. Второе контрольное заражение белого рассольного сыра, содержащего комбинацию *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Для количественной оценки ингибирующего действия комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 против *Kluveromyces marxianus* белый рассольный сыр получали, как описано в примере 1, за исключением того, что жестяные формы инокулировали *Kluveromyces marxianus* в качестве дрожжевого контаминанта.

Как показано на фиг. 8, рост *Kluveromyces marxianus* подавлялся в присутствии комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676, когда ее вводили вместе с заквасочной культурой SafeIT-1. Эти штаммы вызывали значительно более сильное ингибирование, чем коммерчески доступная культура HOLDBAC™ YM-B.

Пример 9. Третье контрольное заражение белого рассольного сыра, содержащего комбинацию *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Для визуальной оценки ингибирующего действия комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 против *P. commune* белый рассольный сыр получали, как описано в примере 1.

Через 7 дней после приготовления белого рассольного сыра сыр извлекали из рассола и инокулировали его в двух повторностях *P. commune* в качестве поверхностного контаминанта в три точки на поверхности сыра с конечной концентрацией 100 спор на точку. Рост двух различных изолятов *P. commune* оценивали визуально после хранения в течение 12 суток при температуре $7\pm 1^\circ\text{C}$ и затем в течение 16 суток при температуре $12\pm 1^\circ\text{C}$.

Результаты испытания белого рассольного сыра представлены на фиг. 9, и они показывают, что два изолята *P. commune* хорошо растут на белом рассольном сыре, изготовленном из молока, инокулированного только заквасочной культурой (левая фотография). В отличие от этого, когда при изготовлении сыра использовались *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (правая фотография), рост *P. commune* в значительной степени ингибировался.

Пример 10. Контрольное заражение белого рассольного сыра, содержащего *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366.

Для визуальной оценки ингибирующего действия *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 против *P. crustosum* получали белый рассольный сыр.

Пастеризованное и стандартизированное молоко инокулировали коммерческой заквасочной культурой (F-DVS SafeIT-1, полученной от Chr. Hansen A/S, Дания) в количестве 40 Ед. на 1000 л молока. Затем молоко дополнительно инокулировали HOLDBAC™ YM-B (10 DCU/100 л) или штаммом *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 КОЕ/г). Одну партию, инокулированную только заквасочной культурой, использовали в качестве контроля. Молоко при температуре $36\pm 1^\circ\text{C}$ обрабатывали сычужным ферментом (Chy-Max plus, полученным от Chr. Hansen A/S, Дания) в количестве 220 мл на 1000 л в течение 90 мин перед разрезанием. При значении pH 6,0 сгусток перекачивали в формы и оставляли для осушки до конечного значения pH 4,8-4,7 (20-24 ч). Сыр переносили в жестяные формы с холодным рассолом (8%) и хранили при температуре $5\pm 1^\circ\text{C}$.

Через 7 дней после приготовления белого рассольного сыра сыр извлекали из рассола и инокулировали его в двух повторностях *P. crustosum* в качестве поверхностного контаминанта в три точки на поверхности сыра с конечной концентрацией 100 спор на точку. Рост изолята *P. crustosum* оценивали визуально после хранения в течение 11 суток при температуре $12\pm 1^\circ\text{C}$ и затем в течение 16 суток при температуре $12\pm 1^\circ\text{C}$.

Результаты испытания белого рассольного сыра представлены на фиг. 10, и они показывают, что изолят *P. crustosum* хорошо растет на белом рассольном сыре, изготовленном из молока, инокулированного только заквасочной культурой (левая фотография). В отличие от этого, когда при изготовлении сыра использовался *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (правая фотография), рост *P. crustosum* был ингибирован.

Пример 11. Контрольное заражение йогурта, содержащего *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и CHCC14676, *Penicillium paneum*.

Для визуальной оценки ингибирующего действия штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, отдельно или в комбинации с *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 против плесневого гриба *P. paneum* полу-

чали йогурт с жирностью 1,5%.

Гомогенизированное молоко (с жирностью 1,5%) подвергали термической обработке при температуре $95\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 5 мин в бутылках объемом 1 л на водяной бане и немедленно охлаждали. Коммерческую заквасочную культуру (F-DVS YF-L901, полученную от Chr. Hansen A/S, Дания) инокулировали в количестве 0,02%. Затем молоко инокулировали HOLDBAC™ YM-B (20 DCU/100 л) или *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 КОЕ/мл) отдельно или комбинацией *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 КОЕ/мл) и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 КОЕ/мл). Одну бутылку, инокулированную только заквасочной культурой, использовали в качестве контроля.

Молоко сбраживали при температуре $43\pm 1^\circ\text{C}$ до тех пор, пока значение pH не достигало $4,60\pm 0,1$. Полученный йогурт разливали по чашкам (100 г) и хранили при температуре $7\pm 1^\circ\text{C}$.

На следующий день после приготовления йогурт в чашках инокулировали в двух повторностях различными плесневыми грибами в качестве поверхностных контаминантов в одну точку на поверхности йогурта в количестве 100 спор на точку. Рост плесневых грибов оценивали визуально после хранения в течение 28 суток при температуре $7\pm 1^\circ\text{C}$.

Результаты испытания йогурта приведены на фиг. 11, на которой видно, что *P. paneum* хорошо растет на йогурте, изготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой YF-L901 или заквасочной культурой и культурой HOLDBAC™ YM-B. В отличие от этого, когда во время брожения в молоке присутствовал *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, рост *P. paneum* был сильно замедлен, а комбинация *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 вызывала еще более сильное ингибирование роста *P. paneum*.

Пример 12. Контрольное заражение йогурта, содержащего *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и CHCC14676, при различных температурах хранения.

Для визуальной оценки ингибирующего действия штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, отдельно или в комбинации с *Lactobacillus paracasei* CHCC14676, на плесневый гриб *P. crustosum* при различных температурах хранения получали йогурт с жирностью 1,5%.

Гомогенизированное молоко (с жирностью 1,5%) подвергали термической обработке при температуре $95\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 5 мин в бутылках объемом 1 л на водяной бане и немедленно охлаждали. Коммерческую заквасочную культуру (F-DVS YF-L901, полученную от Chr. Hansen A/S, Дания) инокулировали в количестве 0,02%. Затем молоко инокулировали HOLDBAC™ YM-B (20 DCU/100 л) или *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (1×10^7 КОЕ/мл) отдельно или комбинацией *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 (5×10^6 КОЕ/мл) и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 (5×10^6 КОЕ/мл). Одну бутылку, инокулированную только заквасочной культурой, использовали в качестве контроля.

Молоко сбраживали при температуре $43\pm 1^\circ\text{C}$ до тех пор, пока значение pH не достигало $4,60\pm 0,1$. Полученный йогурт разливали по чашкам (100 г) и хранили при температуре $7\pm 1^\circ\text{C}$.

На следующий день после приготовления йогурт в чашках инокулировали в двух повторностях *Penicillium crustosum* в качестве поверхностного контаминанта в одну точку на поверхности йогурта в количестве 100 спор на точку. Рост плесневых грибов оценивали визуально после хранения в течение 36 суток при температуре $7\pm 1^\circ\text{C}$, $12\pm 1^\circ\text{C}$ или $22\pm 1^\circ\text{C}$.

Результаты испытания йогурта приведены на фиг. 12, на которой видно, что *P. crustosum* хорошо растет на йогурте, изготовленном из молока, ферментированного только заквасочной культурой YF-L901 или заквасочной культурой и культурой HOLDBAC™ YM-B, при всех температурах хранения. В отличие от этого, когда во время брожения в молоке присутствовал *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 один или в комбинации с *Lactobacillus paracasei* CHCC14676, рост *P. crustosum* полностью предотвращался при хранении как при $7\pm 1^\circ\text{C}$, так и при $12\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 36 суток. При хранении при $22\pm 1^\circ\text{C}$ рост *P. crustosum* был сильно замедлен в присутствии *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и еще сильнее замедлен в присутствии комбинации *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 и *Lactobacillus paracasei* CHCC14676.

Депонирование и экспертное решение

Заявитель просит, чтобы образцы депонированных микроорганизмов, перечисленных ниже, до даты вынесения решения о выдаче патента могли быть доступны только эксперту.

Штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366 был депонирован 14.10.2009 в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig под регистрационным номером DSM23035.

Штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 был депонирован 15.03.2011 в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig под регистрационным номером DSM24651.

Штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC14676 был депонирован 02.02.2012 в Германской коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig под регистрационным номером DSM25612.

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

Ссылки.

- EP0221499
 EP0576780
 EP1442113
 US5378458
 EP11161609.0
 Kosikowski, F.V. and Mistry, V.V., «Cheese and Fermented Milk Foods», 1997, 3rd Ed. F.V. Kosikowski, L.L.C.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

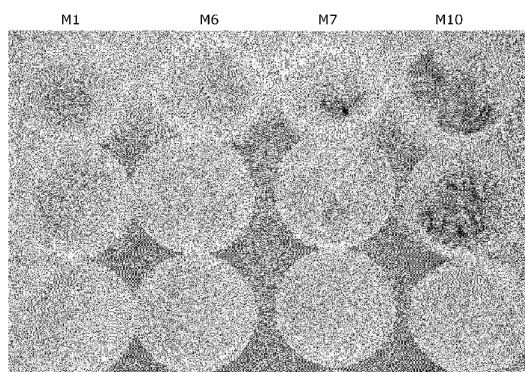
1. Штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC12777 DSM24651, обладающий противогрибковыми свойствами.
2. Противогрибковая композиция, содержащая по меньшей мере один штамм *Lactobacillus paracasei* по п.1.
3. Пищевой продукт, содержащий штамм *Lactobacillus paracasei* по п.1 или противогрибковую композицию по п.2.
4. Пищевой продукт по п.3, выбранный из группы, состоящей из фруктов и продуктов переработки фруктов, овощей и продуктов переработки овощей, зерна и продуктов переработки зерна, молочных продуктов, мяса, мяса птицы и морепродуктов, а также их смесей.
5. Пищевой продукт по п.3, представляющий собой мезофильный или термофильный кисломолочный продукт, такой как йогурт.
6. Кормовой продукт, содержащий штамм *Lactobacillus paracasei* по п.1 или противогрибковую композицию по п.2.
7. Фармацевтический продукт, содержащий штамм *Lactobacillus paracasei* по п.1 или противогрибковую композицию по п.2.
8. Способ получения пищевого продукта, включающий добавление штамма *Lactobacillus paracasei* по п.1 или противогрибковой композиции по п.2 в пищевой продукт во время его изготовления и регулирование параметров во время процесса изготовления таким образом, чтобы концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* оставалась постоянной или повышалась.
9. Способ по п.8, где концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* составляет по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/г, или по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/мл пищевого продукта, или по меньшей мере 1×10^5 КОЕ/см² поверхности пищевого продукта.
10. Способ по п.8, включающий добавление противогрибковой композиции по п.2 во время изготовления пищевого продукта таким образом, что концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* составляет по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/г, или по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/мл пищевого продукта, или по меньшей мере 1×10^5 КОЕ/см² поверхности пищевого продукта.
11. Способ получения кормового продукта, включающий добавление штамма *Lactobacillus paracasei* по п.1 или противогрибковой композиции по п.2 в кормовой продукт во время его изготовления и регулирование параметров во время процесса изготовления таким образом, чтобы концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* оставалась постоянной или повышалась.
12. Способ по п.11, где концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* составляет по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/г, или по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/мл кормового продукта, или по меньшей мере 1×10^5 КОЕ/см² поверхности кормового продукта.
13. Способ по п.11, включающий добавление противогрибковой композиции по п.2 во время изготовления пищевого продукта таким образом, что концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* составляет по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/г, или по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/мл кормового продукта, или по меньшей мере 1×10^5 КОЕ/см² поверхности кормового продукта.
14. Способ получения фармацевтического продукта, включающий добавление штамма *Lactobacillus paracasei* по п.1 или противогрибковой композиции по п.2 в фармацевтический продукт во время его изготовления и регулирование параметров во время процесса изготовления таким образом, чтобы концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* оставалась постоянной или повышалась.
15. Способ по п.14, где концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* составляет по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/г, или каждого по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/мл фармацевтического продукта, или по меньшей мере 1×10^5 КОЕ/см² поверхности фармацевтического продукта.
16. Способ по п.14, включающий добавление противогрибковой композиции по п.2 во время изготовления фармацевтического продукта таким образом, что концентрация штамма *Lactobacillus paracasei* составляет по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/г, или по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/мл фармацевтического продукта, или по меньшей мере 1×10^5 КОЕ/см² поверхности пищевого продукта.
17. Пищевой продукт, получаемый способом по любому из пп.8-10.

18. Применение штамма *Lactobacillus paracasei* по п.1 для приготовления пищевого, кормового или фармацевтического продукта.

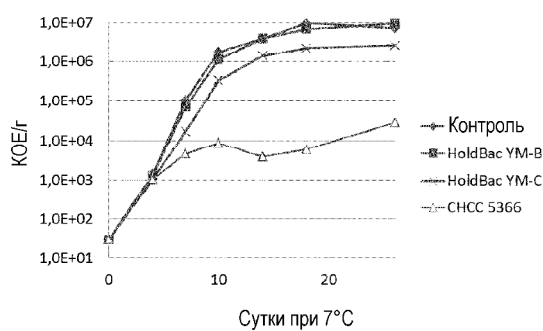
19. Применение противогрибковой композиции по п.2 для приготовления пищевого, кормового или фармацевтического продукта.

20. Применение штамма *Lactobacillus paracasei* по п.1 для ингибирования роста дрожжей и плесневых грибов.

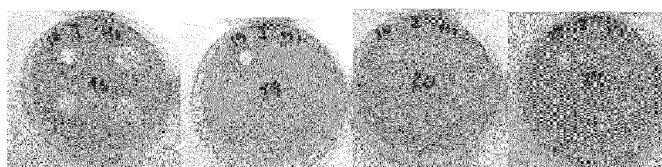
21. Применение противогрибковой композиции по п.2 для ингибирования роста дрожжей и плесневых грибов.



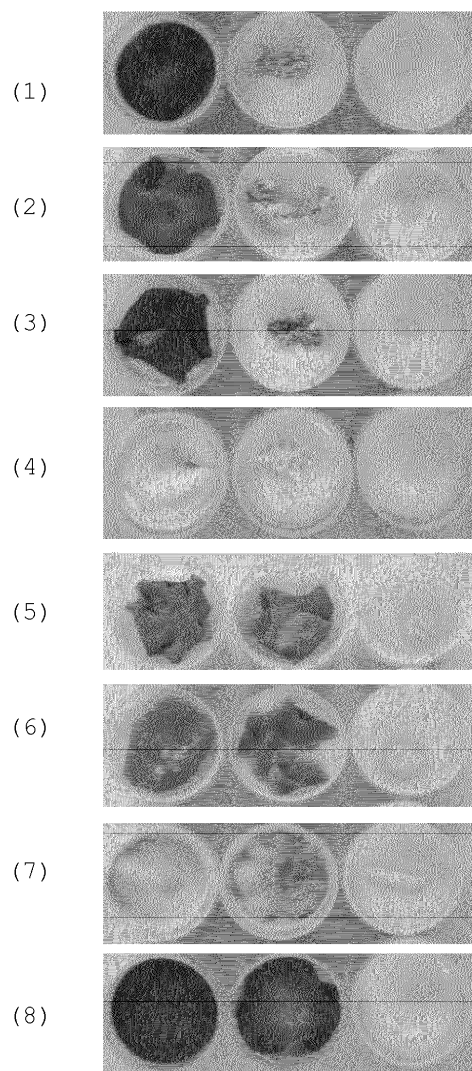
Фиг. 1



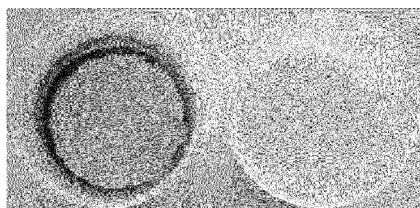
Фиг. 2



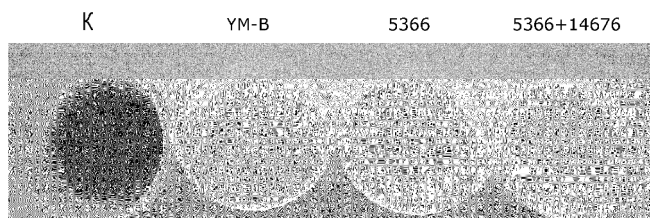
Фиг. 3



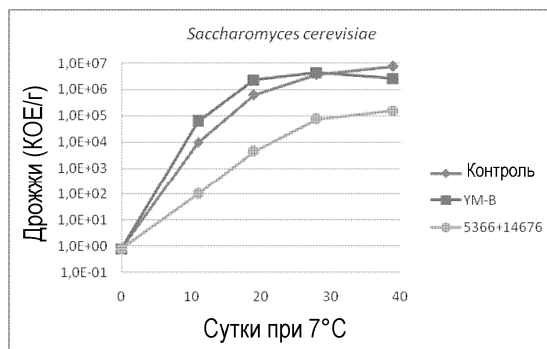
Фиг. 4



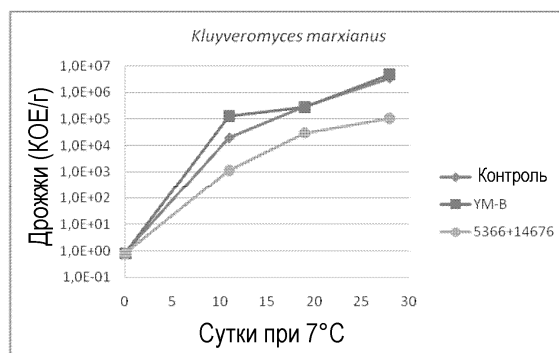
Фиг. 5



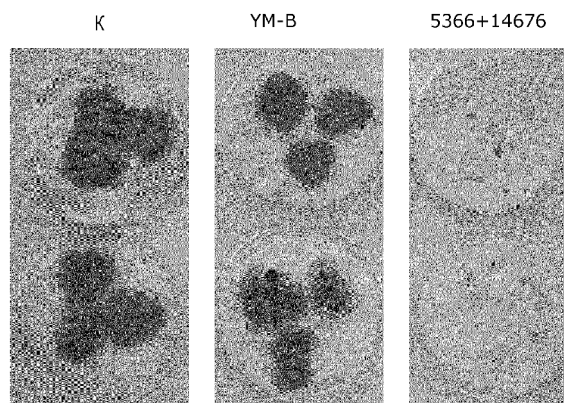
Фиг. 6



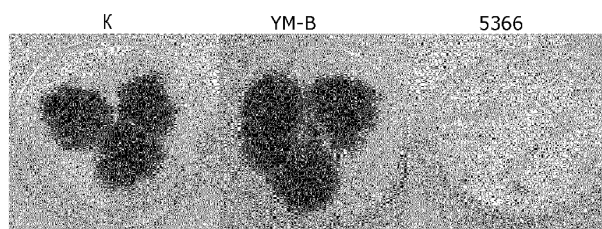
Фиг. 7



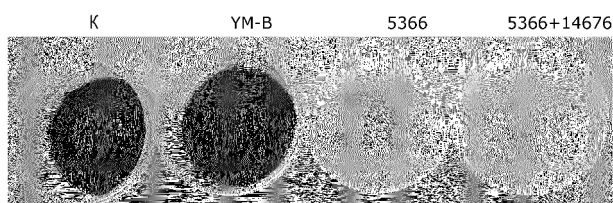
Фиг. 8



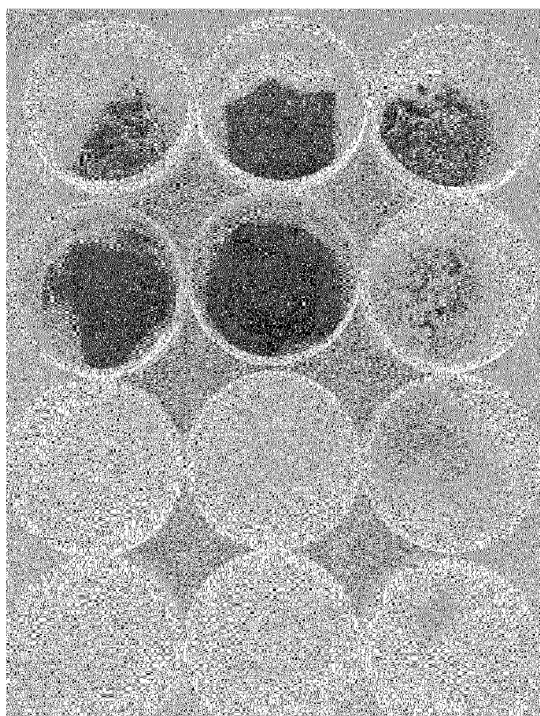
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

