

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090441 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.07

(22) Дата подачи заявки
2018.08.30

(51) Int. Cl. A23C 9/127 (2006.01)
A23C 13/16 (2006.01)
A23C 17/02 (2006.01)
A23C 19/032 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ УЛУЧШЕННОГО МЕЗОФИЛЬНОГО
ФЕРМЕНТИРОВАННОГО МОЛОЧНОГО ПРОДУКТА

(31) 17188492.7
(32) 2017.08.30
(33) EP
(86) PCT/EP2018/073305
(87) WO 2019/043085 2019.03.07
(71) Заявитель:
КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Кантор Метте Динес, Бьерре Карин,
Гулдагер Хелле Сков, Деркс Патрик
(DK)
(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения мезофильного ферментированного молочного продукта путем ферментации молочного субстрата при помощи заквасочной культуры мезофильной молочнокислой бактерии, содержащей по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*, в присутствии по меньшей мере одного штамма *Bacillus subtilis* подвида *natto* или *Bacillus coagulans*.

A1

202090441

202090441

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ УЛУЧШЕННОГО МЕЗОФИЛЬНО ФЕРМЕНТИРОВАННОГО МОЛОЧНОГО ПРОДУКТА

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способу получения мезофильно ферментированного молочного продукта путем ферментации молочного субстрата при помощи заквасочной культуры мезофильных молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В пищевой промышленности используются многочисленные различные типы бактерий для приготовления пищевых продуктов. Для приготовления ферментированных молочных продуктов, таких как йогурты, сыр или простокваша, чаще всего используются молочнокислые бактерии (LAB). LAB и продукты их метаболизма вносят значительный вклад во вкус и текстуру ферментированных продуктов и подавляют порчу продуктов за счет того, что продуцируют значительные количества молочной кислоты.

Штаммы LAB, которые в настоящее время используются в пищевой промышленности для приготовления ферментированных молочных продуктов, происходят из различных таксономических групп, например родов *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* и *Bifidobacterium*. Способность штаммов, используемых для ферментации, придавать текстуру молочным продуктам в некоторой степени связана с продукцией полисахаридов. Не каждый штамм, который, как было обнаружено, обладает особенно подходящими ферментирующими свойствами, например хорошим профилем закисления, также обладает хорошими текстурирующими характеристиками. Таким образом, часто требуется улучшить структуру ферментированных молочных продуктов.

В предшествующем уровне техники используют различные подходы для улучшения текстуры таких продуктов. Например, добавки, такие как желатин, пектины, альгинаты, карбоксиметилцеллюлоза, смолы, крахмал и волокно, могут быть добавлены в продукт после его приготовления [1]. Тем не менее, такие добавки, как правило, являются

нежелательными с точки зрения увеличения потребности пользователей в продуктах с "чистой этикеткой".

Еще один подход для улучшения текстуры заключается в оптимизации штаммов LAB, используемых в процессе ферментации. Например, обнаружено, что применение генетически модифицированных штаммов, обладающих повышенной галактокиназной активностью, оказывает существенное влияние на текстуру продуктов, продуцируемых при помощи таких штаммов [2]. Хотя эти модифицированные штаммы являются высокоэффективными, большое количество пользователей демонстрируют тенденцию, заключающуюся в том, что они предпочитают природные штаммы в молочных продуктах.

Совместная ферментация LAB с бактериями, которые не относятся к группе LAB, до сих пор не привлекала существенного внимания в молочной промышленности. Одна из причин этого состоит в том, что LAB продуцируют большие количества молочной кислоты во время ферментации, что приводит к существенному снижению pH до 4-5 во время ферментации. Большинство бактерий устойчивы исключительно к умеренным снижениям pH, что приводит к тому, что они не подходят для использования при получении ферментированных молочных продуктов.

Бактерии рода *Bacillus* обычно не используют для ферментации. Тем не менее, существует доказательство того, что штаммы *Bacillus* ранее использовали для приготовления молочных продуктов, таких как йогурт. В источнике [3] описано применение штаммов *Bacillus* для ферментации молочных продуктов, таких как йогурт, в отсутствие классических заквасочных культур LAB.

В источнике [4] описано применение штамма *Bacillus subtilis* для получения ферментированного молочного продукта, который может обладать терапевтической ценностью. Сообщается о том, что антибактериальные вещества, продуцируемые штаммом *Bacillus*, придают продукту длительный срок годности и предполагаемые терапевтические свойства.

В источнике [5] описан способ получения ферментированного молока с использованием *Bacillus subtilis*. Этот способ включает две последовательные стадии. На первой стадии молоко ферментируют *Bacillus subtilis* в течение нескольких часов. На этой стадии белки в молоке разрушаются до аминокислот или олигопептидов при помощи протеаз *Bacillus*. Затем LAB добавляют в молоко, и ферментацию продолжают до достижения желаемого pH.

В источнике [6] раскрыт способ приготовления йогурта с использованием продуцирующих левансахарозу штаммов *Bacillus licheniformis* или *Bacillus subtilis*.

В источнике [7] раскрыто получение ферментированных молочных продуктов, обладающих ароматом сыра, с использованием комбинации *Streptococcus thermophilus* и *Bacillus stereothermophilus* с получением продукта, обладающего сырным ароматом.

В источнике [8], представляющем собой Международную заявку на патент, раскрыта совместная ферментация *Streptococcus thermophilus* с различными штаммами *Bacillus*, такими как *Bacillus subtilis* subsp. *natto*, для приготовления термофильного ферментированного молочного продукта.

Наконец, в источнике [9] сообщается об экспериментах, в которых анализируются возможные действия контаминации *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* на реологические и текстурные свойства сквашенных сливок.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В процессе создания изобретения неожиданно обнаружено, что текстура мезофильных ферментированных молочных продуктов может быть существенным образом улучшена при ферментации молочного субстрата при помощи заквасочной культуры мезофильных молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis* в присутствии по меньшей мере одного штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* или *Bacillus coagulans*.

По-видимому, штаммы этих видов *Bacillus* улучшают текстуру, придаваемую молочному продукту LAB. Механизм, посредством которого штаммы *Bacillus* оказывают такой эффект, не известен. В значительной степени, напряжение сдвига и жесткости геля продуктов, изготавливаемых посредством способа в соответствии с изобретением, являются чрезвычайно высокими и в некоторых случаях достигают уровня, который в четыре раза выше соответствующего напряжения сдвига, достигаемого теми же самыми заквасочными культурами LAB без штамма *Bacillus*. Кроме того, здесь продемонстрировано, что ферментация молочного субстрата при помощи LAB в присутствии *Bacillus* существенно уменьшает период времени, который требуется для достижения pH 4,5. В этом отношении, способ в соответствии с изобретением способствует уменьшению стоимости, связанной со способом изготовления.

В соответствии с вышеприведенными неожиданными фактами, штаммы видов *Bacillus subtilis* subsp. *natto* или *Bacillus coagulans* могут быть использованы в качестве добавок в обычные мезофильные заквасочные культуры LAB для улучшения текстуры мезофильно ферментированных молочных продуктов, например путем увеличения напряжения сдвига или жесткости геля (суммарный модуль). В настоящем изобретении предложены новые способы ферментации с использованием штаммов LAB и штаммов

Bacillus subtilis subsp. *natto* или *Bacillus coagulans*, а также заквасочных культур, содержащих соответствующую комбинацию штаммов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения мезофильно ферментированного молочного продукта, включающему:

- (а) обеспечение молочного субстрата,
- (б) ферментацию указанного молочного субстрата заквасочной культурой мезофильных молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*,

где стадию (б) осуществляют в присутствии по меньшей мере одного штамма *Bacillus*, выбранного из группы, состоящей из штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и штамма *Bacillus coagulans*.

В изобретении предложен новый способ изготовления молочного продукта, который основан на мезофильной ферментации субстрата при помощи LAB в присутствии штамма *Bacillus*. Используемый здесь термин "ферментация" обозначает превращение углеводов или сахаров в спирты или кислоты путем действия микроорганизма. Предпочтительно, ферментация с точки зрения настоящего изобретения включает превращение лактозы в молочную кислоту. Ферментация углеводов или сахаров молочнокислыми бактериями является особенно предпочтительной.

В контексте настоящего изобретения термин "молочнокислая бактерия" обозначает грамположительную микроаэрофильную или анаэробную бактерию, которая сбраживает сахара, и, таким образом, продуцирует кислоты, включающие молочную кислоту, уксусную кислоту и пропионовую кислоту. Обычно кислота, которая преимущественно продуцируется, представляет собой молочную кислоту. Молочнокислые бактерии отряда "Lactobacillales", которые продемонстрировали пользу для промышленных задач, включают *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. и *Propionibacterium* spp. Молочнокислые бактерии также включают группу строго анаэробных бифидобактерий, т.е. *Bifidobacterium* spp. Они часто используются в качестве пищевых культур сами по себе или в комбинации с другими молочнокислыми бактериями.

Способ в соответствии с изобретением имеет своей целью получение мезофильно ферментированного молочного продукта. "Мезофильно ферментированный молочный продукт" представляет собой молочный продукт, который получают путем ферментации

при помощи мезофильных микроорганизмов, и в частности мезофильной LAB. "Мезофильные" микроорганизмы обладают оптимальным ростом при умеренных температурах от 15°C до 40°C. Типичные LAB, которые рассматривают как мезофильные, включают *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp., но не ограничиваются ими. "Мезофильная ферментация" здесь относится к ферментации при температуре от 15°C до 35°C, предпочтительно от 20°C до 35°C, и еще более предпочтительно от 25°C до 30°C. Типичные молочные продукты, которые рассматривают как "мезофильно ферментированные молочные продукты", включают пахту, кислое молоко, сквашенного молока, сметану, кислые сливки и молодой сыр, такой как кварк, творог и творожный сыр. В противоположность, "термофильные" микроорганизмы обладают оптимальным ростом при температурах выше 43°C. Термофильные LAB, которые используются в молочной промышленности, включают кроме того *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. Соответственно, в "термофильной ферментации", которую осуществляют при помощи термофильных микроорганизмов, обычно используют температуру выше 35°C. Термин "термофильный молочный продукт" относится к молочным продуктам, получаемым путем ферментации термофильными микроорганизмами, и в частности, термофильными LAB. Тем не менее, термофильные штаммы *Streptococcus* spp. также используют для получения некоторых мезофильных ферментированных молочных продуктов, например в комбинации с мезофильными штаммами *Lactococcus* spp., в случае которых предпочтительна температура например 25°C-35°C, более предпочтительно 30°C-35°C.

На стадии (а) способа в соответствии с изобретением получают молочный субстрат, подвергаемый ферментации. Термин "молочный субстрат" относится к любому необработанному и/или обработанному молочному материалу, который может быть подвергнут ферментации в соответствии со способом по изобретению. Используемый здесь термин "молоко" относится к секретию молока, получаемой путем доения млекопитающего, такого как корова, овца, коза, буйвол или верблюд. Также в термин "молоко" включены белковые и/или жировые растворы, получаемые из растительных материалов, в частности соевое молоко. В предпочтительном воплощении настоящего изобретения молоко, используемое в способе в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой коровье молоко.

Полезные молочные субстраты включают растворы/суспензии молока или подобных молоку 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,

лактозу, маточную жидкость в результате кристаллизации лактозы, белковый концентрат молочной сыворотки или молочные сливки, но не ограничиваются ими. Очевидно, что молочный субстрат может быть получен у любого млекопитающего, например представлять собой по существу чистое молоко млекопитающего или восстановленное сухое молоко.

Содержание жира в молочном субстрате зависит от конкретного используемого субстрата. В предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением способ используется для приготовления кислых сливок, что означает, что молочный субстрат, используемый в способе, представляет собой молочные сливки, имеющие содержание жира от 6% до 45%, предпочтительно от 9% до 35%, более предпочтительно от 12% до 30%, более предпочтительно от 14% до 25% и наиболее предпочтительно от 16% до 22%.

Перед ферментацией молочный субстрат может быть подвергнут гомогенизации или пастеризации. "Гомогенизация" относится к интенсивному перемешиванию с получением растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию осуществляют перед ферментацией, тогда она может быть осуществлена таким образом, чтобы разрушить частицы молочного жира до частиц меньшего размера для предотвращения того, чтобы жировой компонент отделялся от молока. Последнее может быть осуществлено путем пропускания молока при высоком давлении через небольшие отверстия. "Пастеризация" относится к обработке молочного субстрата для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно, пастеризацию осуществляют путем поддержания молочного субстрата при определенной температуре в течение определенного периода времени. Определенную температуру обычно достигают путем нагревания. Температура и длительность могут быть выбраны для того чтобы убить или инактивировать некоторые бактерии, такие как вредные бактерии. За этим может последовать стадия быстрого охлаждения.

На стадии (б) способа в соответствии с изобретением молочный субстрат, выбранный для способа ферментации, ферментируют при помощи заквасочной культуры мезофильных молочнокислых бактерий. В соответствии с настоящим изобретением "заквасочная культура молочнокислых бактерий" или "закваска молочнокислых бактерий" представляет собой композицию, которая включает один или более чем один штамм молочнокислых бактерий, который должен быть использован для ферментации. Заквасочная культура обычно поставляется в замороженной форме или лиофилизированной культуре для культивирования производственной закваски или в виде так называемых культур "для прямого внесения" (DVS), т.е. культуры, предназначенной

для непосредственной инокуляции в ферментирующий сосуд или резервуар для продукции молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт.

В соответствии с изобретением заквасочная культура мезофильных молочнокислых бактерий включает по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*. В одном из воплощений штамм *Lactococcus lactis* представляет собой штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. В еще одном воплощении штамм *Lactococcus lactis* представляет собой штамм *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Кроме по меньшей мере одного штамма *Lactococcus lactis*, заквасочные культуры мезофильных молочнокислых бактерий могут включать дополнительные мезофильные молочнокислые бактерии, такие как другие штаммы *L. lactis* subsp. *lactis* или *L. lactis* subsp. *cremoris*. В конкретном предпочтительном воплощении заквасочные культуры мезофильных молочнокислых бактерий включают один или более чем один штамм *L. lactis* subsp. *lactis* биовар *diacetylactis*, который продуцирует пищевые ароматизаторы. Альтернативно или дополнительно мезофильные заквасочные культуры могут включать одну или более чем одну бактерию следующих родов: *Leuconostoc*, *Pseudoleuconostoc*, *Pediococcus* или *Lactobacillus*. Особенно предпочтительные примеры включают *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus paracasei*. Особенно предпочтительные примеры включают *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* и *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

В особенно предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением заквасочная культура мезофильных молочнокислых бактерий не включает молочнокислую бактерию, которая продуцирует экзополисахариды (EPS). В частности, заквасочная культура мезофильных молочнокислых бактерий не включает штамм *Streptococcus*, такой как штамм *Streptococcus thermophilus*.

В соответствии с изобретением ферментацию молочного субстрата при помощи заквасочной культуры мезофильных молочнокислых бактерий осуществляют в присутствии по меньшей мере одного штамма *Bacillus*, выбранного из группы, состоящей из *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и штамма *Bacillus coagulans*. *Bacillus* представляет собой род грамположительных спорообразующих бактерий, которые привлекают к себе внимание в течение последних лет также в пищевой промышленности. *Bacillus subtilis* subsp. *natto* известен как непатогенная бактерия, которую используют для производства традиционного японского ферментированного соевого продукта питания "натто". *Bacillus*

subtilis subsp. *natto* получил обозначение GRAS ("в целом признанный безопасным") от FDA (Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США) и может быть приобретен у различных производителей. *Bacillus coagulans* используют в качестве пробиотика за его предполагаемое поддержание хорошего здоровья пищеварительной и иммунной системы. Его используют в некоторых продуктах питания, включая кондитерские изделия, молочные продукты и зерновые продукты. *Bacillus coagulans* также получил обозначение GRAS от FDA. Штаммы *Bacillus coagulans* имеются в продаже от различных производителей.

В соответствии с особенно предпочтительным воплощением изобретения штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto*, используемый в процессе ферментации при помощи заквасочной культуры мезофильных молочнокислых бактерий, выбран из группы, состоящей из DSM 32588, DSM 32589, DSM 32606 и мутанта одного из этих депонированных штаммов, которые получены с использованием одного из депонированных штаммов в качестве исходного материала.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением классификацию бактерии как штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* в соответствии с настоящим изобретением осуществляют путем секвенирования генома.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением классификацию бактерии как штамма *Bacillus coagulans* в соответствии с настоящим изобретением осуществляют путем секвенирования генома.

Термин "мутант" относится к штамму, который получен из одного из раскрытых здесь депонированных штаммов путем, например генетической инженерии, радиационной и/или химической обработки. Предпочтительно, чтобы мутант представлял собой функционально эквивалентный мутант, т.е. мутант, который по существу обладает теми же самыми или улучшенными свойствами в отношении текстуры, напряжения сдвига, вязкости, вязкоэластичности и/или жесткости геля как и депонированный штамм, из которого он получен. В частности, термин "мутант" относится к штаммам, полученным путем подвергания штамма в соответствии с изобретением какой-либо обычно используемой мутагенной обработке, включающей обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ-излучение, или к спонтанно возникшему мутанту. Мутант может быть подвергнут нескольким мутагенным обработкам (единичную обработку следует понимать как одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/отбора), но в настоящее время предпочтительно осуществлять не более чем 20, или не более чем 10 или не более чем 5

обработок (или стадий скрининга/отбора). В предпочтительном в настоящее время мутанте менее 1%, в частности менее 0,1%, менее 0,01%, в частности менее 0,001%, и даже в частности менее 0,0001% нуклеотидов в бактериальном геноме заменены на другой нуклеотид или подвергнуты делеции по сравнению с материнским штаммом. В предпочтительном в настоящее время мутанте менее 50, в частности менее 30, в частности менее 20, в частности менее 10 и даже в частности менее 5 нуклеотидов в бактериальном геноме заменены на другой нуклеотид или подвергнуты делеции по сравнению с материнским штаммом.

Хотя молочный субстрат должен быть ферментирован при помощи заквасочной культуры мезофильных молочнокислых бактерий в присутствии по меньшей мере одного штамма *Bacillus*, не обязательно, чтобы штамм *Bacillus* присутствовал в процессе всей ферментации. Достаточно, чтобы по меньшей мере один штамм *Bacillus* был представлен в течение существенной части ферментации, например в течение по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% относительно всей длительности ферментации. Используемый здесь термин "длительность ферментации" определяет период времени между инокуляцией молочного субстрата и достижением predetermined величины pH.

Например, молочный субстрат может быть инокулирован заквасочной культурой мезофильных молочнокислых бактерий с последующей инкубацией молочного субстрата в течение нескольких часов, например в течение 1-5 часов, таком как в течение 2, 3 или 4 часов. Затем один или более чем один штамм *Bacillus* может быть добавлен к молочному субстрату, и ферментация может продолжаться в течение нескольких часов до достижения желаемой величины pH. Наоборот, молочный субстрат сначала может быть инокулирован одним или более чем одним штаммом *Bacillus* и инкубирован в течение нескольких часов, предпочтительно 1-5 часов, таком как 2, 3 или 4 часа, с последующим добавлением заквасочной культуры мезофильных молочнокислых бактерий. Успешная инокуляция молочного субстрата может использоваться в качестве средства для корректирования желаемой текстуры жесткости геля.

В особенно предпочтительном воплощении бактерии из заквасочной культуры мезофильных молочнокислых бактерий и один или более чем один штамм *Bacillus* представлены в молочном субстрате в течение всего времени ферментации, что означает то, что заквасочная культура мезофильных молочнокислых бактерий и один или более чем один штамм *Bacillus* инокулированы вместе в молочный субстрат в начале ферментации.

Как правило, молочный субстрат, например молочные сливки для приготовления кислых сливок, инокулирован заквасочной культурой мезофильных молочнокислых бактерий таким образом, что достигается концентрация живых молочнокислых бактерий в молочном субстрате в диапазоне от 10^4 до 10^{12} кое (колониеобразующих единиц) на мл молочного субстрата, предпочтительно от 10^5 до 10^{11} КОЕ на мл молочного субстрата, более предпочтительно от 10^6 до 10^{10} КОЕ на мл молочного субстрата, и даже предпочтительно от 10^7 до 10^9 КОЕ на мл или от 10^7 до 10^8 КОЕ на мл молочного субстрата. Соответственно, концентрация живых молочнокислых бактерий в молочном субстрате, например в молочных сливках для приготовления кислых сливок, может составлять по меньшей мере приблизительно 10^4 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^5 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^6 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^7 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^8 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^9 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^{10} КОЕ на мл молочного субстрата или по меньшей мере приблизительно 10^{11} КОЕ на мл молочного субстрата.

Когда заквасочная культура мезофильных молочнокислых бактерий содержит смесь двух или более чем двух различных бактерий, тогда предпочтительно, чтобы молочный субстрат, например молочные сливки для приготовления кислых сливок, инокулировали для достижения концентрации штаммов *Lactococcus lactis* в молочном субстрате по меньшей мере приблизительно 10^3 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^4 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^5 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^6 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^7 КОЕ на мл молочного субстрата или по меньшей мере приблизительно 10^8 КОЕ на мл молочного субстрата.

Заквасочная культура может содержать в качестве дополнительных компонентов криоконсерванты и/или другие обычные добавки, такие как красители, дрожжевой экстракт, сахара и витамины.

Bacillus subtilis subsp. *natto* или штамм *Bacillus coagulans* будут инокулированы в молочный субстрат, например молочные сливки для приготовления кислых сливок, таким образом, что после инокуляции концентрация штамма *Bacillus* будет сравнима с концентрацией, приведенной выше, в контексте заквасочной культуры мезофильных молочнокислых бактерий. Последнее означает то, что молочный субстрат, например

молочные сливки для приготовления кислых сливок, инокулируют одним или более чем одним штаммом *Bacillus* для достижения концентрации живых бактерий *Bacillus* перечисленных видов в молочном субстрате в диапазоне от 10^4 до 10^{12} КОЕ на мл молочного субстрата, предпочтительно от 10^5 до 10^{11} КОЕ на мл молочного субстрата, более предпочтительно от 10^6 до 10^{10} КОЕ на мл молочного субстрата, и даже предпочтительно от 10^7 до 10^9 КОЕ на мл или от 10^7 до 10^8 КОЕ на мл молочного субстрата. Соответственно, концентрация живых бактерий *Bacillus* перечисленных видов в молочном субстрате может составлять по меньшей мере приблизительно 10^4 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^5 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^6 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^7 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^8 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^9 КОЕ на мл молочного субстрата, по меньшей мере приблизительно 10^{10} КОЕ на мл молочного субстрата или по меньшей мере приблизительно 10^{11} КОЕ на мл молочного субстрата.

Особенно предпочтительно, чтобы один или более чем один штамм *Bacillus* добавляли в молочный субстрат в концентрации от 10^7 до 10^8 КОЕ/мл молочного субстрата. В еще одном предпочтительном воплощении штамм *Bacillus*, используемый в способе в соответствии с настоящим изобретением, продуцирует значительные количества витамина К.

Еще не полностью понятно, как виды *Bacillus* влияют на текстурирующие свойства молочнокислых бактерий. Тем не менее, представляется, что штаммы *Bacillus* не размножаются во время ферментации в значительной степени. Однако здесь продемонстрировано, что значительный рост штаммов *Bacillus* не требуется для того, чтобы оказывать положительное влияние на ферментацию LAB.

После инокуляции заквасочной культурой мезофильных молочнокислых бактерий и одним или более чем одним штаммом *Bacillus*, молочный субстрат инкубируют в условиях, подходящих для размножения мезофильных молочнокислых бактерий. Эти условия предпочтительно включают температуру от 15°C до 35°C , более предпочтительно от 20°C до 35°C , и даже предпочтительно от 25°C до 35°C , такую как от 26°C до 34°C . Конкретная температура, используемая во время ферментации, в основном будет зависеть от мезофильно ферментированного молочного продукта, который требуется получить. Например, когда способ используют для приготовления кислых сливок, температура во время ферментации будет составлять 26°C - 34°C , предпочтительно 28°C - 32°C .

Как правило, ферментированный молочный продукт, который получают способом в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой молочный продукт любого типа, который обычно получают при помощи мезофильной ферментации. Тем не менее, в предпочтительном воплощении мезофильно ферментированный молочный продукт выбран из группы, состоящей из кислых сливок, кислого молока, пахты, сквашенного молока, сметаны, кварка, творога, молодого сыра и творожного сыра. В предпочтительном воплощении мезофильно ферментированный молочный продукт представляет собой кислые сливки.

Ферментацию осуществляют до тех пор, пока молочный субстрат не достигает желаемого pH, который в норме составляет от pH 4,0 до 5,0, и предпочтительно от pH 4,5 до 4,8. Таким образом, pH будет контролироваться во время способа ферментации, и ферментация будет остановлена тогда, когда predetermined величина pH будет измерена в ферментационном сосуде. В зависимости от концентрации заквасочной культуры и получаемого продукта ферментация может занимать от 5 до 24 часов, предпочтительно от 5 до 20 часов, более предпочтительно от 5 до 16, более предпочтительно от 5 до 14, более предпочтительно от 6 до 12, более предпочтительно от 7 до 11 и наиболее предпочтительно от 8 до 10 часов.

После ферментации ферментированный молочный продукт может быть охлажден и дополнительно обработан. Например, в зависимости от типа ферментированного молочного продукта обработка может включать, например инкубацию продукта, полученного в результате ферментации, с ферментами, такими как химозин и пепсин. Когда ферментированный молочный продукт представляет собой сыр, обработка может также включать вырезание сгустков в частицах сырных сгустков. Обработка продукта также включает упаковывание ферментированного молочного продукта. Подходящая упаковка может представлять собой бутылку, картон и т.п, имеющий объем, например от 50 мл до 1000 мл.

Способ в соответствии с изобретением обладает конкретным преимуществом, заключающимся в том, что когда используют заквасочную культуру мезофильной молочнокислой бактерии вместе со штаммом *Bacillus*, выбранным из группы, состоящей из штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и штамма *Bacillus coagulans*, при получении мезофильно ферментированного молочного продукта, такого как кислые сливки, тогда свойства текстуры образующегося в результате молочного продукта, в частности вязкость, напряжение сдвига, жесткость геля и прочность геля, могут быть существенно улучшены.

Предпочтительно, путем использования способа, как он определен здесь, увеличение напряжения сдвига, жесткости геля и/или прочности геля ферментированного молочного продукта по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450% или по меньшей мере на 500% может быть достигнуто по сравнению с ферментацией того же самого молочного субстрата в идентичных условиях в отсутствие какого-либо штамма *Bacillus*.

В одном из предпочтительных воплощений увеличение напряжения сдвига ферментированного молочного продукта составляет по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 30 Па по сравнению с соответствующим ферментированным молочным продуктом, полученным путем ферментации того же самого молочного субстрата в идентичных условиях в отсутствие какого-либо штамма *Bacillus*.

В еще одном предпочтительном воплощении увеличение жесткости геля ферментированного молочного продукта составляет по меньшей мере 25, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250 Па или по меньшей мере 300 Па по сравнению с соответствующим ферментированным молочным продуктом, полученным путем ферментации того же самого молочного субстрата в идентичных условиях в отсутствие какого-либо штамма *Bacillus*.

В еще одном предпочтительном воплощении увеличение прочности геля ферментированного молочного продукта составляет по меньшей мере 50 (г х с), по меньшей мере 75 (г х с), по меньшей мере 100 (г х с), по меньшей мере 125 (г х с), по меньшей мере 150 (г х с), по меньшей мере 175 (г х с) или по меньшей мере 200 (г х с).

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением напряжение сдвига измеряют при помощи способа, определенного в примере 1.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением жесткость геля определяют как суммарный модуль, используемый в способе, определенном в примере 1.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением жесткость геля определяют как положительную площадь сжатия с использованием способа, определенного в примере 1.

В особенно предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением вышеописанный способ относится к изготовлению кислых сливок. Соответственно, в особенно предпочтительном воплощении предложен способ получения кислых сливок, включающий:

- (а) обеспечение молочных сливок, имеющих содержание жира по меньшей мере 6%,
- (б) инокуляцию указанных молочных сливок заквасочной культурой мезофильных молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*, и возможно дополнительные мезофильные молочнокислые бактерии,
- (в) инокуляцию указанных молочных сливок по меньшей мере одним штаммом *Bacillus*, выбранным из группы, состоящей из штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и штамма *Bacillus coagulans*,
- (г) ферментацию указанных молочных сливок до тех пор, пока pH не достигнет от 4,0 до 5,0, более предпочтительно от 4,5 до 4,6,
- (д) получение кислых сливок.

На первой стадии вышеприведенного способа молочные сливки обеспечивают как молочный субстрат. Молочные сливки, используемые для способа получения кислых сливок, предпочтительно получают из коровьего молока. Содержание жира в молочных сливках составляет по меньшей мере 6%, представляя собой обычное содержание жира для молочных сливок, которые используются при получении сквашенных сливок. Как правило, содержание жира стандартизируют перед ферментацией для того, чтобы оно соответствовало пищевому законодательству. Во время стандартизации сухие ингредиенты могут быть добавлены в молочные сливки, такие как молочная сыворотка или казеины. Если должны быть добавлены стабилизаторы, то они также могут быть добавлены на этой стадии способа получения. Подходящие стабилизаторы включают, например полисахариды, крахмал и желатин.

Затем молочные сливки предпочтительно подвергают гомогенизации для разрушения более крупных жировых частиц до более мелких частиц, таким образом обеспечивая однородную суспензию для предотвращения разделения молочной сыворотки. Гомогенизация молочных сливок может быть осуществлена в стандартном гомогенизаторе, который стандартно используется в молочной промышленности. Условия гомогенизации могут включать давление от 100 до 200 бар (10000 кПа – 20000 кПа), предпочтительно от 130 до 150 бар (13000 кПа – 15000 кПа) и температуру от 50°C до 80°C, предпочтительно от 65°C до 75°C. В конкретном воплощении гомогенизацию

осуществляют в две стадии при 150-200 бар (15000 кПа-20000 кПа) и от 65°C до 75°C на первой стадии и при 30- 60 бар (3000 кПа – 6000 кПа) и от 65°C до 75°C на второй стадии.

После гомогенизации молочные сливки могут быть подвергнуты пастеризации для того, чтобы убить потенциально вредные бактерии. Предпочтительно, пастеризацию осуществляют как при пастеризации с кратковременной обработкой при высокой температуре (HTST), которая обычно означает, что молочные сливки нагревают до 80°C-90°C и инкубируют при этой температуре в течение приблизительно от 2 до 10 минут, в частности от 2 до 5 минут. После пастеризации молочные сливки охлаждают до выбранной температуры ферментации для инокуляции заквасочной культуры мезофильных молочнокислых бактерий.

Молочные сливки затем инокулируют заквасочной культурой мезофильных молочнокислых бактерий, как определено выше, которая содержит по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*, и возможно дополнительные мезофильные молочнокислые бактерии. Обычно молочные сливки инокулируют 0,01-0,02% заквасочной культурой. Инокулированные молочные сливки затем обычно инкубируют в течение приблизительно от 12 до 18 часов до достижения pH от 4,5 до 4,6. После достижения предварительно определенного pH продукт ферментированных кислых сливок охлаждают и упаковывают.

Во втором аспекте изобретение относится к композиции для получения мезофильно ферментированного молочного продукта, содержащей

- (а) заквасочную культуру мезофильных молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*, и
- (б) штамм *Bacillus*, выбранный из группы, состоящей из *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и штамма *Bacillus coagulans*.

Композиция может быть приготовлена таким образом, что подходит для непосредственной инокуляции молочного субстрата или другой культуральной среды до ферментации.

В третьем аспекте изобретение относится к мезофильно ферментированному молочному продукту, получаемому способом, описанным в соответствии с первым аспектом изобретения. Предпочтительно, указанный ферментированный молочный продукт включает

- (а) по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*, и
- (б) по меньшей мере один штамм *Bacillus*, выбранный из группы, состоящей из *Bacillus subtilis* subsp. *natto* или штамма *Bacillus coagulans*.

В четвертом аспекте изобретение относится к мезофильно ферментированному молочному продукту, содержащему

- (а) по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*, и
- (б) по меньшей мере один штамм *Bacillus*, выбранный из группы, состоящей из *Bacillus subtilis* subsp. *natto* или штамма *Bacillus coagulans*.

Штамм *Lactococcus lactis*, который присутствует в композиции в соответствии со вторым аспектом изобретения или в мезофильно ферментированном молочном продукте в соответствии с третьим или четвертым аспектом изобретения, предпочтительно выбран из группы, состоящей из *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* или *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Кроме по меньшей мере одного штамма *Lactococcus lactis*, композиция в соответствии со вторым аспектом изобретения или мезофильно ферментированный молочный продукт в соответствии с третьим или четвертым аспектом изобретения могут включать дополнительные мезофильные молочнокислые бактерии, такие как другие штаммы *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis биовап. diacetylactis* или *L. Lactis* subsp. *cremoris*. Альтернативно, композиция в соответствии со вторым аспектом изобретения или мезофильно ферментированный молочный продукт в соответствии с третьим или четвертым аспектом изобретения могут включать мезофильные бактерии рода *Leuconostoc*, *Pseudoleuconostoc*, *Pediococcus* или *Lactobacillus*. Особенно предпочтительные примеры включают *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus paracasei*. Особенно предпочтительные примеры включают *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pseudoleuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* и *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

Аналогично, композиция в соответствии со вторым аспектом изобретения или мезофильно ферментированный молочный продукт в соответствии с третьим или четвертым аспектом изобретения предпочтительно содержит штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto*, выбранный из группы, состоящей из штаммов DSM 32588, DSM 32589, DSM 32606, и мутанта одного из этих депонированных штаммов, которые получены путем использования одного из депонированных штаммов в качестве исходного материала.

Мезофильно ферментированный молочный продукт в соответствии с третьим или четвертым аспектом изобретения предпочтительно выбран из группы, состоящей из кислых сливок, кислого молока, пахты, сквашенного молока, сметаны, кварка, творога, молодого сыра и творожного сыра, и более предпочтительно представляет собой сквашенные сливки.

В пятом аспекте изобретение относится к применению штамма *Bacillus*, выбранного из группы, состоящей из *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и штамма *Bacillus coagulans*, для улучшения текстуры, вязкости, вязкоэластичности, напряжения сдвига, жесткости геля и/или прочности геля мезофильно ферментированного молочного продукта. Предпочтительно, мезофильно ферментированный молочный продукт выбран из группы, состоящей из кислых сливок, кислого молока, пахты, сквашенного молока, сметаны, кварка, творога, молодого сыра и творожного сыра, и более предпочтительно представляет собой сквашенные сливки. Штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto* в соответствии с пятым аспектом изобретения предпочтительно выбран из группы, состоящей из штаммов DSM 32588, DSM 32589, DSM 32606 и мутанта одного из этих депонированных штаммов, который получен с использованием одного из депонированных штаммов в качестве исходного материала.

Предполагается, что используемые термины в контексте описания изобретения охватывают как единственное, так и множественное число, если здесь не указано иное или явно вступает в противоречие в соответствии с контекстом. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий", если не указано иное, следует рассматривать как неограничивающие термины (т.е. подразумевающие "включающие, но не ограничивающиеся"). Указание диапазонов величин просто предназначено здесь в качестве упрощенного способа индивидуальной ссылки на каждую отдельную величину, оказывающуюся в пределах диапазона, если иное здесь не указано, и каждая отдельная величина включена в описание таким образом, как если бы она была приведена здесь индивидуально. Все описанные здесь способы могут быть осуществлены в любой подходящей последовательности, если здесь не указано иное, или иным образом явно вступает в противоречие в соответствии с контекстом. Использование приведенных здесь любых и всех примеров или вводного слова перед примером (например "такого как") просто предназначено для более хорошего пояснения изобретения и не накладывает ограничение на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакой язык в описании не следует рассматривать как указывающий на какой-либо незаявленный элемент, важный для практической реализации изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: *Bacillus subtilis* subsp. *natto* уменьшает время закисления и улучшает реологические свойства во время получения кислых сливок

Штаммы

Bacillus subtilis natto: DSM 32588

Заквасочная культура LC: Лактококковая заквасочная культура, содержащая множество *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и множество *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Молочная основа

Таблица 1: Композиция молочной основы (основа с 18% жира)

	Количество (г)	Белки (%)	Углеводы (%)	Жиры (%)
Минимолоко	1600	3,5	4,7	0,4
38% молочные сливки	1400	2,1	3,2	38,0
Основа с 18% жира	3000	2,85	4,00	17,95

Способ

Молочную основу во флаконах объемом 200 мл инокулировали заквасочной культурой LC в качестве закислителя (0,01%) (1) без штамма *Bacillus* (контроль) и (2) с 3 количествами добавленного штамма *Bacillus* (10^5 КОЕ/мл, 10^7 КОЕ/мл и 10^8 КОЕ/мл). Ферментацию осуществляли при 30°C с холодным стартом до достижения pH 4,5. Флаконы для измерения реологических свойств охлаждали до 4°C в водяной бане и хранили при 4°C до измерения. Ферментации осуществляли в двух параллелях для каждого образца, и реологические определения суммарного модуля и напряжения сдвига осуществляли в двух параллелях.

Измерения

Закисление

Закисление измеряли с использованием системы Cinas.

Суммарный модуль и напряжение сдвига

Через двое суток после получения ферментированный молочный продукт доводили до 13°C и вручную осторожно перемешивали при помощи ложки (5 раз) до гомогенного состояния образца. Реологические свойства образца оценивали при помощи реометра (Anton Paar Physica Rheometer с ASC, автоматическая смена образца, Anton Paar® GmbH, Austria) с использованием чашки с грузом. Во время измерения реометр устанавливали до постоянной температуры 13°C. Установки были следующими:

Время ожидания (для восстановления до отчасти исходной структуры):

5 минут без какого-либо физического напряжения (качание или вращение), приложенного к образцу

Стадия качания (для измерения модуля упругости и модуля вязкости, G' и G'' , соответственно, таким образом, рассчитывая суммарный модуль G^*)

Постоянное напряжение = 0,3%, частота (f) = [0,5...8] Гц

6 точек измерения в течение 60 с (по одной каждые 10 с)

Стадия вращения (для измерения напряжения сдвига при 300 1/с)

Разработали две стадии:

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

Каждая стадия включала 21 точку измерения в течение 210 с (каждые 10 с).

Напряжение сдвига в точке максимума реологических кривых выбирали для дальнейшего анализа.

Суммарный модуль G^* представляет собой параметр, который отражает жесткость геля.

Положительная площадь сжатия

Тест обратной экструзии проводили для оценки твердости геля. Образцы охлаждали до 13°C в течение одного часа до измерений напряжения сдвига. Перемешивание при помощи ложки использовали для получения гомогенного образца, т.е. пятикратное перемешивание. Измерение осуществляли при помощи TA-XТ plus, программное обеспечение Texture Expert Exceed v6.1.9.0. Цилиндрический акриловый зонд ($\varnothing$ 40 мм) погружали в йогурт на глубину 15 мм со скоростью 2 мм/с и усилием срабатывания 5 г. Положительную площадь использовали в качестве измерения твердости.

Подсчет клеток

Количество клеток *Bacillus* к концу ферментации определяли путем высевания на чашки с агаром TSA (триптический соевый агар).

Результаты

Закисление

Таблица 2: Закисление

Образец	Период времени до pH 4,5 (часы)	Средняя разница по сравнению с контролем (часы)
Заквасочная культура LC A (контроль)	18,40	
Заквасочная культура LC B (контроль)	18,26	
Заквасочная культура LC + <i>Bacillus</i> 10 ⁸ /мл A	14,67	-3,7
Заквасочная культура LC +	14,59	

Bacillus 10 ⁸ /мл В		
Заквасочная культура LC + Bacillus 10 ⁷ /мл А	16,92	-1,6
Заквасочная культура LC + Bacillus 10 ⁷ /мл В	16,92	
Заквасочная культура LC + Bacillus 10 ⁵ /мл А	17,84	-0,4
Заквасочная культура LC + Bacillus 10 ⁵ /мл В	18,09	

Обнаружено, что добавление штамма Bacillus DSM 32588 в концентрации 10⁸ КОЕ/мл в молочную основу кислых сливок, которые инокулировали мультилактококковой заквасочной культурой (заквасочная культура LC), уменьшало время закипания до 3,7 часов.

Как упомянуто выше, ферментацию осуществляли с холодным стартом. Последнее означает, что время закипания существенно длиннее чем то, которое могло бы быть, если бы температура составляла 30°C от старта ферментаций. Тем не менее, все же возможно сравнивать эффективность образцов в соответствии с изобретением с контрольными образцами.

Реология

Таблица 3: Реология

Образец	Положительная площадь сжатия (Г*с)	G* - Суммарный модуль (Па) при 2,6 Гц	Напряжения сдвига (Па) при 90 /с
Заквасочная культура LC А (контроль)	543,37	562	112
		612	115
Заквасочная культура LC В (контроль)	396,72	491	113
		554	112
Заквасочная культура LC + Bacillus 10 ⁸ /мл А	880,05	2280	147
		2040	129
Заквасочная культура LC +	959,38	2310	140

Bacillus 10 ⁸ /мл В			
		2350	145
Заквасочная культура LC + Bacillus 10 ⁷ /мл А	734,47	1520	145
		1630	148
Заквасочная культура LC + Bacillus 10 ⁷ /мл В	638,54	1400	153
		1340	149
Заквасочная культура LC + Bacillus 10 ⁵ /мл А	404,38	617	116
		716	117
Заквасочная культура LC + Bacillus 10 ⁵ /мл В	424,26	656	117
		672	118

Закключение по реологии

Обнаружено, что добавление Bacillus в количествах от 10⁷ до 10⁸ КОЕ/мл оказывает существенное действие на прочность кислых сливок. Последнее продемонстрировано путем значительного увеличения положительной площади сжатия, суммарного модуля и напряжения сдвига. При концентрации инокулирования 10⁵ КОЕ/мл Bacillus текстурные свойства сравнимы с контролем, и не наблюдали никакого эффекта.

Подсчет клеток

Таблица 4: Подсчеты клеток

	КОЕ/мл
Заквасочная культура LC + Bacillus 10 ⁸ /мл	9,0E04
Заквасочная культура LC + Bacillus 10 ⁷ /мл	1,5E04
Заквасочная культура LC + Bacillus 10 ⁵ /мл	3,0E02

Обнаружено, что приблизительно половина клеток Bacillus выживают в способе ферментации.

Пример 2: Приготовление кислых сливок с использованием мезофильных культур, содержащих Bacillus subtilis subsp. natto

Этот эксперимент проводили таким же образом, как пример 1, за исключением того, что вместо использования мезофильной культуры, содержащей штамм Bacillus DSM 32588 при трех уровнях концентраций тестировали две мезофильные культуры, содержащие штамм Bacillus DSM 32588 или штамм Bacillus DSM 32589 в дозе 10⁸

КОЕ/мл.

Результаты

Закисление

Таблица 5: Закисление

Образец	Период времени до pH 4,5 (часы)	Средняя разница по сравнению с контролем (часы)
Заквасочная культура LC A (контроль)	19,67	
Заквасочная культура LC B (контроль)	19,67	
Заквасочная культура LC + Bacillus DSM 32588 10^8 /мл A	16,51	-3,16
Заквасочная культура LC + Bacillus DSM 32588 10^8 /мл B	16,51	
Заквасочная культура LC + Bacillus DSM 32589 10^8 /мл A	16,76	-2,91
Заквасочная культура LC + Bacillus DSM 32589 10^8 /мл B	16,76	

Обнаружено, что обе мезофильные культуры, содержащие штамм Bacillus DSM 32588 или DSM 32589, способны уменьшать время закисления приблизительно на 3 часа.

Реология

Таблица 6: Реология

Образец	Положительная площадь сжатия (г*с)	G* - Суммарный модуль (Па) при 2,6 Гц	Напряжения сдвига (Па) при 75,2 /с
Заквасочная культура LC (контроль)	384,04	486,5	104,0
Заквасочная культура LC + Bacillus DSM 32588 10^8 /мл	464,11	991,0	127,0
Заквасочная культура LC + Bacillus DSM 32589 10^8 /мл	438,63	756,0	129,50

Обнаружено, что добавление обоих штаммов Bacillus DSM 32588 и DSM 32589 в количестве 10^8 КОЕ/мл обладало существенным действием на прочность кислых сливок. Последнее продемонстрировано существенным увеличением положительной площади сжатия, суммарного модуля и напряжения сдвига.

ДЕПОНИРОВАНИЯ И ЭКСПЕРТНОЕ СУЖДЕНИЕ

Штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto* был депонирован в Leibniz Institute DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany 16.08.2017 под регистрационным номером DSM 32588.

Штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto* был депонирован в Leibniz Institute DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany 23.08.2017 под регистрационным номером DSM 32606.

Штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto* был депонирован в Leibniz Institute DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany 16.08.2017 под регистрационным номером DSM 32589.

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

По требованию заявителя образец депонированного микроорганизма должен быть доступен только эксперту, одобренному заявителем.

ССЫЛКИ

- [1] Tasneem et al. (2013 Crit Rev Food Sci Nutr., 54(7):869-79.
- [2] WO 2011/026863
- [3] US 2009/0011081 A1
- [4] US 5077063
- [5] CN 103300147 A
- [6] CN 103190478 A
- [7] US 3674508
- [8] WO 2017/005601 A
- [9] Mehta et al. (2016), Journal of Animal Science, vol. 94 No. supplement 5, p. 264-265

Все ссылки, цитированные в этом патентом документе, включены здесь в полном объеме.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения мезофильно ферментированного молочного продукта, включающий:

(а) обеспечение молочного субстрата,

(б) ферментацию указанного молочного субстрата при помощи заквасочной культуры мезофильных молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*,

где стадию (б) осуществляют в присутствии по меньшей мере одного штамма *Bacillus*, выбранного из группы, состоящей из штамма *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и штамма *Bacillus coagulans*.

2. Способ по п. 1, где содержание жира в молочном субстрате составляет от 16% до 22%.

3. Способ по любому из пп. 1-2, где ферментацию на стадии (б) осуществляют при температуре в диапазоне от 25°C до 35°C.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где молочный субстрат представляет собой молочные сливки.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где указанная заквасочная культура мезофильных молочнокислых бактерий не содержит молочнокислую бактерию, продуцирующую экзополисахариды (EPS).

6. Способ по любому из пп. 1-5, где указанный штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto* выбран из группы, состоящей из DSM 32588, DSM 32589 и DSM 32606.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где указанный штамм *Bacillus* добавляют к молочному субстрату в концентрации от 10^7 до 10^8 КОЕ(колониеобразующая единица)/мл молочного субстрата.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где указанный штамм *Bacillus* продуцирует витамин К.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где указанный мезофильно ферментированный молочный продукт выбран из группы, состоящей из кислых сливок, кислого молока, пахты, сквашенного молока, сметаны, кварка, творога, молодого сыра и творожного сыра.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где ферментация приводит к увеличению напряжения сдвига, жесткости геля и/или прочность геля по меньшей мере на 100% по сравнению с ферментацией в отсутствие штамма *Bacillus*.

11. Композиция для получения мезофильно ферментированного молочного продукта, содержащая

(а) заквасочную культуру мезофильных молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*, и

(б) штамм *Bacillus*, выбранный из группы, состоящей из *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и штамма *Bacillus coagulans*.

12. Композиция по п. 11, где указанный штамм *Lactococcus lactis* выбран из группы, состоящей из *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* или *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

13. Композиция по любому из пп. 11-12, где указанный штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto* выбран из группы, состоящей из штаммов DSM 32588, DSM 32589 и DSM 32606.

14. Мезофильно ферментированный молочный продукт, получаемый способом по любому из пп. 1-10.

15. Мезофильно ферментированный молочный продукт, содержащий

(а) по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*;

(б) по меньшей мере один штамм *Bacillus*, выбранный из группы, состоящей из *Bacillus subtilis* subsp. *natto* или штамма *Bacillus coagulans*.

16. Мезофильно ферментированный молочный продукт по любому из пп. 14-15, выбранный из группы, состоящей из кислых сливок, кислого молока, пахты, сквашенного молока, сметаны, кварка, творога, молодого сыра и творожного сыра.

17. Мезофильно ферментированный молочный продукт по п. 16, где указанный штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto* выбран из группы, состоящей из штаммов DSM 32588, DSM 32589 и DSM 32606.

18. Применение штамма *Bacillus*, выбранного из группы, состоящей из *Bacillus subtilis* subsp. *natto* и штамма *Bacillus coagulans*, для увеличения напряжения сдвига, жесткости геля и/или прочности геля мезофильно ферментированного молочного продукта.

19. Применение по п. 18, где указанный штамм *Bacillus subtilis* subsp. *natto* выбран из группы, состоящей из штаммов DSM 32588, DSM 32589 и DSM 32606.

20. Применение по любому из пп. 18-19, где указанный мезофильно ферментированный молочный продукт выбран из группы, состоящей из кислых сливок, кислого молока, пахты, сквашенного молока, сметаны, кварка, творога, молодого сыра и творожного сыра.