

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037612**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.21

(21) Номер заявки
201891889

(22) Дата подачи заявки
2016.08.30

(51) Int. Cl. *C12N 1/20* (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A23L 29/00 (2016.01)
C12R 1/225 (2006.01)

**(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ LACTOBACILLUS RHAMNOSUS, КОМПОЗИЦИЯ НА ЕГО
ОСНОВЕ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННОГО МОЛОЧНОГО
ПРОДУКТА С ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ**

(31) 15183198.9

(32) 2015.08.31

(33) EP

(43) 2019.02.28

(62) 201890404; 2016.08.30

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

(72) Изобретатель:
**Нильсен Сесилие Люкке Марвиг,
Хорнбек Тина, Расмуссен Пиа,
Польсен Лоне, Экхардт Томас,
Оэрегорд Гуннар, Могхадам Элахе
Гханей (DK)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В. (RU)**

(56) VOULGARI K. ET AL.: "Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products", FOOD CONTROL, BUTTERWORTH, LONDON, GB, vol. 21, no. 2, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 136-142, XP026574807, ISSN: 0956-7135, DOI: 10.1016/J.FOODCONT.2009.04.007 [retrieved on 2009-05-03] *Material & Methods; under 2.1, 2.2 and 2.4* page 138; table 1 page 140, column 1, paragraph 2 page 140, column 2, paragraph 1

GEREZ C.L. ET AL.: "Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria", BIOLOGICAL CONTROL, SAN DIEGO, CA, US, vol. 64, no. 3, 7 November 2012 (2012-11-07), pages 231-237, XP028983262, ISSN: 1049-9644, DOI: 10.1016/J.BIOCONTROL.2012.10.009 cited in the application the whole document

WO-A1-2013153070

(57) Изобретение относится к штамму бактерий вида *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15860, депонированному в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM32092, для получения ферментированного молочного продукта. Изобретение дополнительно относится к композициям и пищевым или кормовым продуктам, содержащим указанный штамм, способам получения ферментированных молочных продуктов с использованием указанного штамма и к продуктам, полученным таким образом.

B1

037612

037612 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к бактериям *Lactobacillus fermentum* с противогрибковой активностью, композициям, содержащим указанные бактерии, в частности к вспомогательным культурам, содержащим указанные бактерии, способам получения ферментированного молочного продукта с использованием указанных бактерий или к культурам и ферментированным молочным продуктам, полученным таким образом, включая пищевые, кормовые и фармацевтические продукты.

Предшествующий уровень техники

Молочнокислые бактерии (LAB) использовали десятилетиями для увеличения срока хранения пищевых продуктов. Во время ферментации LAB продуцируют молочную кислоту, а также другие органические кислоты, которые вызывают снижение pH ферментированного продукта. Продукты, имеющие кислотный pH, не поддерживают дальнейший рост большинства микроорганизмов, включая патогенные бактерии и бактерии, вызывающие порчу продуктов. Однако рост дрожжей и плесневых грибов не поддается влиянию низкого pH и часто вызывает порчу ферментированных молочных продуктов.

Помимо продукции органических кислот, некоторые LAB также продуцируют метаболиты с антимикробной и, в частности, противогрибковой активностью.

Например, в Европейской патентной заявке № EP 0221499 описаны противогрибковые свойства *Lactobacillus rhamnosus* NRRL-B-15972, которая способна ингибировать рост разных плесневых грибов при культивировании на агаризованной среде, дополненной огуречным соком. Аналогичным образом, Европейская патентная заявка № EP 0576780 относится к *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 - штамму, который, по-видимому, ингибирует рост *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* и *Candida* на среде на основе лактосыворотки, дополненной гидролизатом казеина и дрожжевым экстрактом. В Европейской патентной заявке № EP 1442113 описаны смеси *Propionibacterium jensenii* и *Lactobacillus* sp., такой как *Lactobacillus rhamnosus*, с антимикробными эффектами и их применение для биозащиты. В Европейской патентной заявке № EP 13717237 описаны штаммы *Lactobacillus rhamnosus* с противогрибковыми эффектами, и в Европейской патентной заявке № EP 13714671 описаны штаммы *Lactobacillus rhamnosus* с противогрибковыми эффектами.

Обзор LAB с противогрибковыми эффектами и их применение для защиты хлеба и фруктов приводится Gerez et al., 2013.

Культуры с противогрибковыми эффектами, кроме того, имеются в продаже и включают культуры FreshQ® Chr Hansen, а также культуры Dupont, SACCО и Bioprox. Разработка культур с противогрибковыми эффектами представляет сложную задачу, так как она требует идентификации культур, которые обеспечивают значительный противогрибковый эффект в реальных пищевых приложениях. Другим фактором, для которого необходима тщательная оценка при отборе биозащитных культур-кандидатов, является влияние на органолептические свойства пищевого продукта. Проблемой, которая была идентифицирована в имеющихся в продаже продуктах, является степень последующего закисления, т.е. продолжение закисления культуры после достижения продуктом желательного pH. Это представляет проблему, в частности, при повышенных температурах хранения, во время выдерживания ферментированного продукта в ферментационных чанах перед охлаждением продукта или на протяжении стадий созревания.

Кроме того, считается, что имеющиеся в продаже биозащитные культуры дают избыточный диацетильный вкусовой компонент, вызывающий "кремовый" привкус, который может восприниматься в качестве нежелательного вкусового влияния (Aunsbjerg et al., 2015).

Следовательно, все еще существует потребность в новых и имеющих преимущества бактериях, подходящих для пищевого применения, с противогрибковыми эффектами и минимальным влиянием на вкус.

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно настоящему изобретению предложены бактерии вида *Lactobacillus fermentum*, имеющие способность ингибировать рост гриба *Penicillium solitum*, депонированного под № доступа DSM32093, или рост гриба *Penicillium brevicompactum*, депонированного под № доступа DSM32094, по меньшей мере на 50%.

Посредством целенаправленных усилий была идентифицирована новая группа штаммов *Lactobacillus fermentum*, которые обеспечивают значимые противогрибковые эффекты и дополнительные преимущества при использовании в качестве биозащитного штамма в способах получения ферментированных продуктов. Всего было идентифицировано 10 разных штаммов *Lactobacillus fermentum*, которые ингибируют рост *P. solitum* или *P. brevicompactum* по меньшей мере на 50%.

Штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению могут быть дополнительно охарактеризованы по наличию способности уменьшать концентрацию ацетальдегида, продуцированного заквасочной культурой на протяжении ферментации, в ферментированном молочном продукте по меньшей мере на 50%.

В родственном воплощении штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению могут быть дополнительно охарактеризованы тем, что указанная бактерия секретирует только маленькие количества диацетила, например в интервале от 0 до 5 млн⁻¹.

Штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению могут альтернативно или дополни-

тельно быть охарактеризованы тем, что они увеличивают pH ферментированного молочного продукта, содержащего *Lactobacillus fermentum*, во время хранения после ферментации по сравнению с молочным продуктом, ферментированным такой же заквасочной культурой, не содержащей *Lactobacillus fermentum*.

Согласно настоящему изобретению, следовательно, предложены бактерии, как описано выше, содержащие их композиции, способы применения данных бактерий для получения ферментированных молочных продуктов, а также продукты, полученные таким образом.

Подробное описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложена бактерия вида *Lactobacillus fermentum*, имеющая способность ингибировать рост гриба *Penicillium solitum*, депонированного под № доступа DSM32093, или рост гриба *Penicillium brevicompactum*, депонированного под № доступа DSM32094, по меньшей мере на 50%. В предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к бактерии вида *Lactobacillus fermentum*, имеющей способность ингибировать рост гриба *Penicillium solitum*, депонированного под № доступа DSM32093, или рост гриба *Penicillium brevicompactum*, депонированного под № доступа DSM32094, по меньшей мере на 50% при выращивании в молоке или субстрате на основе молока, таком как, например, ферментированный молочный продукт. Способность ингибировать рост гриба может быть определена многочисленными разными анализами, известными в данной области. В контексте настоящего изобретения способность ингибировать рост гриба *Penicillium solitum*, депонированного под № доступа DSM32093, или рост гриба *Penicillium brevicompactum*, депонированного под № доступа DSM32094, по меньшей мере на 50% предпочтительно определена с использованием анализа, включающего:

- (1) приготовление ферментированного молочного продукта посредством:
 - (а) инокулирования молока *Lactobacillus fermentum* в концентрации по меньшей мере 10^7 КОЕ (колониобразующая единица)/г и заквасочной культурой,
 - (б) ферментирования до достижения pH 4,6 и
 - (в) отверждения ферментированного молока посредством добавления агара;
- (2) получение по меньшей мере одного пятна *P. solitum* или *P. brevicompactum* на отвержденном агаром ферментированном молоке с концентрацией 500 спор/пятно и его инкубирование в течение 7 суток при 25°C;
- (3) определение процента ингибирования посредством определения наибольшего диаметра колонии, образованной ростом *P. solitum* или *P. brevicompactum*, и выражения указанного диаметра в виде процентной доли наибольшего диаметра, образованного при тех же самых условиях, но в отсутствие штамма *Lactobacillus fermentum*.

Штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению имеют особые преимущества, так как они увеличивают срок хранения пищевых продуктов, полученных с этими бактериями. При одной альтернативе штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению ингибируют рост гриба *Penicillium solitum*, депонированного под № доступа DSM32093, и рост гриба *Penicillium brevicompactum*, депонированного под № доступа DSM32094, по меньшей мере на 50%. В родственном воплощении штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению ингибируют рост гриба *Penicillium solitum*, депонированного под № доступа DSM32093, и/или рост гриба *Penicillium brevicompactum*, депонированного под № доступа DSM32094, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 75%.

Следует понимать то, что концентрация штаммов *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению по меньшей мере 10^7 КОЕ/г, идентифицированная в приведенном выше анализе, представляет собой концентрацию, дающую превосходные противогрибковые эффекты. В то время как данное изобретение, следовательно, охватывает штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению в концентрации по меньшей мере 10^7 КОЕ/г, как, например, в концентрации от 10^7 КОЕ/г до 10^{11} КОЕ/г, от 10^7 КОЕ/г до 10^{10} КОЕ/г и от 10^7 КОЕ/г до 10^9 КОЕ/г, данное изобретение не ограничивается данными концентрациями, так как хорошие противогрибковые эффекты также были получены с меньшей концентрацией.

Согласно одному аспекту бактерии по изобретению дополнительно характеризуются секрецией малых количеств или, по существу, отсутствием секреции летучих соединений, которые влияют на органолептические свойства пищевого продукта. Известно, что обычные заквасочные культуры, такие как имеющиеся в продаже смеси *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, продуцируют летучие соединения, которые значительно содействуют органолептическим свойствам ферментированных продуктов. Например, ацетальдегид, диацетил и ацетоин представляют собой известные летучие соединения, которые влияют на органолептические свойства пищевого продукта. В родственном воплощении бактерии по настоящему изобретению характеризуются уменьшением присутствия ацетальдегида, продуцируемого другими бактериями в заквасочной культуре. Например, определенные штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению могут дополнительно характеризоваться наличием способности уменьшать концентрацию ацетальдегида, продуцируемого заквасочной культурой во время ферментации, в ферментированном молочном продукте по меньшей мере на 50%. Данное уменьшение, таким образом, определено по сравнению с ферментированным продуктом, приготовленным без штаммов *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению. В данной области известны разные анализы для определения концентрации ацетальдегида в ферментированном продукте, и их можно использовать

для этой цели согласно настоящему изобретению. Способность уменьшать концентрацию ацетальдегида, продуцируемого заквасочной культурой на протяжении ферментации, в ферментированном молочном продукте по меньшей мере на 50% предпочтительно определена в анализе, включающем:

(1) приготовление ферментированного молочного продукта посредством:

(а) инокулирования молока *Lactobacillus fermentum* в концентрации по меньшей мере 10^7 КОЕ/г и заквасочной культурой,

(б) ферментирования до достижения pH 4,6, и;

(2) хранение ферментированного молочного продукта при 7 плюс/минус 1°C в течение 14 суток;

(3) добавление 200 мкл 4 н. H_2SO_4 к 1 г ферментированного молочного продукта и определение концентрации ацетальдегида посредством статической парофазной газовой хроматографии.

Ацетальдегид представляет собой вкусовой компонент, продуцируемый молочнокислыми бактериями во время ферментации. В то время как данный компонент является желательным в некоторых применениях, в других применениях было бы полезным уменьшение или устранение присутствия ацетальдегида. Бактерии *Lactobacillus fermentum*, уменьшающие концентрацию ацетальдегида в ферментированном молочном продукте, следовательно, дают преимущества в конкретных применениях, например при приготовлении йогурта с легким вкусом или подслащенного йогурта. Штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению, например, могут уменьшать концентрацию ацетальдегида, продуцируемого заквасочной культурой во время ферментации, в ферментированном молочном продукте по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98%.

Альтернативно или дополнительно, штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению могут характеризоваться тем, что указанная бактерия секретирует диацетил в интервале от 0 до 5 млн⁻¹. Секрецию диацетила можно определять с использованием разных анализов, известных в данной области, но предпочтительно она определена в анализе, включающем:

(1) приготовление ферментированного молочного продукта посредством:

(а) инокулирования молока *Lactobacillus fermentum* в концентрации по меньшей мере 10^7 КОЕ/г и заквасочной культурой,

(б) ферментирования до достижения pH 4,6, и

(2) хранение ферментированного молочного продукта при 7 плюс/минус 1°C в течение 14 суток;

(3) добавление 200 мкл 4 н. H_2SO_4 к 1 г ферментированного молочного продукта и определение концентрации диацетила посредством статической парофазной газовой хроматографии.

Бактерии *Lactobacillus fermentum*, секретирующие низкие концентрации диацетила, имеют преимущества в способах производства пищевых продуктов с данными бактериями, поскольку другие штаммы, оказывающие противогрибковую активность, которые продуцируют высокие концентрации данных летучих соединений, влияют на вкус конечного продукта и, следовательно, не могут использоваться для всех применений. Штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению могут характеризоваться тем, что указанная бактерия секретирует диацетил в интервале от 0 до 3 млн⁻¹ или от 0 до 2 млн⁻¹.

Штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению могут характеризоваться дополнительными полезными эффектами. Например, данные штаммы могут характеризоваться тем, что они увеличивают pH (т.е. противодействуют последующему закислению) ферментированного молочного продукта, содержащего *Lactobacillus fermentum*, на протяжении хранения после ферментации по сравнению с молочным продуктом, ферментированным такой же заквасочной культурой, не содержащей *Lactobacillus fermentum*. Увеличение pH составляет по меньшей мере на значение 0,1 и предпочтительно определяется после хранения ферментированного продукта на протяжении 21 суток при 25°C. Как указано выше, наблюдали то, что противогрибковые бактерии предшествующего уровня техники способствуют последующему закислению. Авторы изобретения неожиданно обнаружили то, что штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению не только не могут способствовать последующему закислению, но, на самом деле, оказывают антагонистический эффект на последующее закисление посредством увеличения значения pH. Как показано в Примерах ниже, данный эффект является особенно заметным в ферментационных процессах с использованием заквасочных культур, демонстрирующих значительное последующее закисление, включая целый ряд имеющихся в продаже заквасочных культур и, в частности, при использовании совместно с имеющимися в продаже противогрибковыми бактериями.

Штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению, например, могут характеризоваться тем, что они увеличивают pH ферментированного молочного продукта, содержащего *Lactobacillus fermentum*, на протяжении хранения после ферментации по сравнению с молочным продуктом, ферментируемым такой же заквасочной культурой, не содержащей *Lactobacillus fermentum*, где указанное увеличение pH осуществляется по меньшей мере на значение 0,1 и определено после хранения ферментированного продукта на протяжении 21 суток при 25°C, и где заквасочная культура содержит LAB, которые способны уменьшать pH молочного продукта на протяжении ферментации до значения pH 4,6 за 10 ч или меньше. Например, данный анализ может быть основан на смесях *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*. Соответствующие смеси часто используются для производства йогурта, и известно то, что они вызывают последующее закисление.

В родственном воплощении в ферментированном молочном продукте, содержащем *Lactobacillus*

fermentum, поддерживается pH выше 4,0 при хранении в течение по меньшей мере 14 суток при 25°C, где данный ферментированный молочный продукт получают способом, включающим инокулирование молока *Lactobacillus fermentum* в концентрации по меньшей мере 10⁷ КОЕ/г и заквасочной культурой, ферментирование до достижения pH 4,6, встряхивание ферментированного продукта и охлаждение. Данные штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению, следовательно, уменьшают эффект последующего закисления, наблюдаемый в биозащитных культурах предшествующего уровня техники и даже в традиционных заквасочных культурах. Следует понимать то, что свойство, определяющее то, что штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению могут поддерживать pH выше 4,0 при хранении в течение по меньшей мере 14 суток при 25°C, просто характеризует анализ, обычно используемый для определения данного эффекта. Не является необходимым или не требуется, чтобы штаммы *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению, содержащие их композиции, включающие пищевые или кормовые продукты, на самом деле хранились при данных условиях. Опять-таки, в одном аспекте данный анализ можно проводить с использованием заквасочной культуры, содержащей LAB, которые способны снижать pH молочного продукта во время ферментации до значения pH 4,6 за 10 ч или меньше. Например, данный анализ может быть основан на смесях *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

Бактерии по настоящему изобретению преимущественно могут происходить из одного из следующих депонированных штаммов:

(а) штамм CHCC12798 *Lactobacillus fermentum*, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, под № доступа 32084;

(б) штамм CHCC12797 *Lactobacillus fermentum*, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, под № доступа 32085;

(в) штамм CHCC14591 *Lactobacillus fermentum*, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, под № доступа 32086;

(г) штамм CHCC14588 *Lactobacillus fermentum*, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, под № доступа 32087;

(д) штамм CHCC15844 *Lactobacillus fermentum*, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, под № доступа 32088;

(е) штамм CHCC15865 *Lactobacillus fermentum*, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, под № доступа 32089;

(ж) штамм CHCC15847 *Lactobacillus fermentum*, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, под № доступа 32090;

(з) штамм CHCC15848 *Lactobacillus fermentum*, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, под № доступа 32091;

(и) штамм CHCC15926 *Lactobacillus fermentum*, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, под № доступа 32096;

(й) штамм CHCC2008 *Lactobacillus fermentum*, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, под № доступа 22584;

(к) мутантный штамм, получаемый из одной из депонированных бактерий согласно (а)-(й), имеющий способность ингибировать рост гриба *Penicillium solitum*, депонированного в DSMZ под № доступа 32093, или рост гриба *Penicillium brevicompactum*, депонированного в DSMZ под № доступа 32094, по меньшей мере на 50% в анализе, включающем:

(1) приготовление ферментированного молочного продукта посредством:

(а) инокулирования молока *Lactobacillus fermentum* в концентрации по меньшей мере 10⁷ КОЕ/г и заквасочной культурой,

(б) ферментирования до достижения pH 4,6 и

(в) отверждения ферментированного молока посредством добавления агара;

(2) получение по меньшей мере одного пятна *P. solitum* или *P. brevicompactum* на отвержденном агаром ферментированном молоке с концентрацией 500 спор/пятно и его инкубирование в течение 7 суток при 25°C;

(3) определение процента ингибирования посредством определения наибольшего диаметра колонии, образованной ростом *P. solitum* или *P. brevicompactum*, и выражения указанного диаметра в виде

процентной доли наибольшего диаметра, образованного при тех же самых условиях, но в отсутствие штамма *Lactobacillus fermentum*.

В контексте настоящей заявки термин "молочнокислая бактерия" или "LAB" используется для названия бактерии, пригодной для применения в пищевых продуктах, продуцирующей молочную кислоту в качестве главного метаболического конечного продукта брожения углеводов. Данные бактерии являются родственными по их общим метаболическим и физиологическим характеристикам и обычно представляют собой грамположительные, кислотоустойчивые, неспорообразующие, недышащие палочковидные бациллы или кокки с низким содержанием GC. На протяжении стадии ферментации потребление лактозы данными бактериями вызывает образование молочной кислоты, уменьшая pH и приводя к образованию белкового сгустка. Данные бактерии, таким образом, отвечают за скисание молока и за текстуру молочного продукта. Термин "молочнокислая бактерия" в том виде, в котором он используется в данном документе, охватывает бактерии, принадлежащие к роду *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., как, например, *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* и *Leuconostoc* spp., но не ограничивающиеся ими.

В зависимости от оптимальной температуры для размножения LAB характеризуются как мезофильные или термофильные LAB. Термин "мезофильный" относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при умеренных температурах. Термин "мезофильная ферментация" относится в данном документе к ферментации при температуре от примерно 22°C до примерно 35°C. Термин "мезофильно ферментированный молочный продукт" относится к ферментированным молочным продуктам, полученным посредством мезофильной ферментации мезофильной заквасочной культуры, и включает такие ферментированные молочные продукты, как пахта, простокваша, сквашенное молоко, сметана, сквашенные сливки и молодой сыр, такой как творог кварк, творог и творожный сыр. Наиболее полезные с промышленной точки зрения мезофильные бактерии включают *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp.

Термин "термофил" относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при высоких температурах. Термин "термофильная ферментация" относится к способам ферментации, проводимым при температуре от примерно 35°C до примерно 45°C. Термин "термофильно ферментированный молочный продукт" относится к ферментированным молочным продуктам, полученным посредством термофильной ферментации с использованием термофильной заквасочной культуры, и он включает такие ферментированные молочные продукты, как йогурт термостатного способа производства, перемешанный йогурт, процеженный йогурт и питьевой йогурт. Самые полезные с промышленной точки зрения термофильные бактерии включают *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp.

Как будет описано ниже, настоящее изобретение охватывает способы с использованием мезофильной и термофильной ферментации.

Термин "ингибировать" в связи с грибами, дрожжами и плесневыми грибами относится к уменьшению роста или спорообразования или к уменьшению числа или концентрации грибов, дрожжей и плесневых грибов, например, в пищевых продуктах и/или на поверхности пищевых продуктов, содержащих бактерии по настоящему изобретению, относительно пищевых продуктов, которые не содержат таких бактерий. Степень ингибирования, обеспечиваемая бактериями *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению, предпочтительно определяется по росту на отвержденном агаром ферментированном молоке в присутствии и в отсутствие бактерий *Lactobacillus fermentum*.

В настоящем контексте термин "мутант" следует понимать как штамм, полученный из штамма по изобретению, например, посредством генной инженерии, радиации и/или химической обработки. Предпочтительно, чтобы мутант был функционально эквивалентным мутантом, например мутантом, который имеет, по существу, такие же или улучшенные свойства, в частности, в отношении противогрибковых свойств, что и депонированный штамм. Такой мутант является частью настоящего изобретения. В особенности, термин "мутант" относится к штамму, полученному посредством подвергания штамма по изобретению любой традиционно используемой мутагенизирующей обработке, включающей обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ (ультрафиолетовый) светом, или к спонтанно появляющемуся мутанту. Мутант возможно был подвергнут нескольким мутагенизирующим обработкам (одну обработку следует понимать как одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/селекции), но в настоящем изобретении предпочтительным является то, что проводится не более чем 20, или не более чем 10, или не более чем 5 обработок (или стадий скрининга/отбора). У предпочтительного в настоящем изобретении мутанта меньше чем 5%, или меньше чем 1%, или даже меньше чем 0,1% нуклеотидов в бактериальном геноме были заменены на другой нуклеотид или подвергнуты делеции по сравнению с материнским штаммом.

Применение терминов в единственном числе в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее и термины в единственном, и во множественном числе, если здесь не указано иное, или это явно не противоречит контексту.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены композиции, содержащие по

меньшей мере одну бактерию вида *Lactobacillus fermentum* со способностью ингибировать рост гриба *Penicillium solitum* CHCC16948, депонированного в DSMZ под № доступа 32093, или рост гриба *Penicillium brevicompactum* CHCC16935, депонированного в DSMZ под № доступа 32094, на отвержденном агаром ферментированном молоке по меньшей мере на 50% в анализе, описанном выше.

Соответствующие композиции могут содержать многочисленные другие бактерии, включающие LAB. Предпочтительная композиция по настоящему изобретению, следовательно, характеризуется тем, что данная композиция дополнительно содержит по меньшей мере одну дополнительную бактерию, выбранную из одного или более чем одного из следующих родов и видов: *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., как, например, *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* и *Leuconostoc* spp.

В особенно предпочтительном воплощении композиции по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну бактерию вида *Lactobacillus fermentum* с противогрибковой активностью, как описано выше, и одну или более чем одну вторую бактерию с противогрибковой активностью. В одном воплощении несколько разных штаммов бактерий *Lactobacillus fermentum* с противогрибковой активностью по настоящему изобретению объединяются. В качестве альтернативы эти дополнительные бактерии, например, могут быть выбраны из:

- (а) бактерии *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC15860, депонированного в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под № доступа DSM32092;
- (б) бактерии *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC5366, депонированного в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под № доступа DSM23035;
- (в) бактерии *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC12697, депонированного в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под № доступа DSM24616;
- (г) бактерии *Lactobacillus paracasei* штамма CHCC12777, депонированного в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под № доступа DSM24651; и
- (д) бактерии *Lactobacillus paracasei* штамма CHCC14676, депонированного в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под № доступа DSM25612.

Авторы настоящего изобретения обнаружили дополнительные противогрибковые эффекты данных штаммов и неожиданный синергетический противогрибковый эффект, вызванный комбинацией *Lb. rhamnosus* CHCC15860 и *Lb. fermentum* CHCC14591, по сравнению с ингибирующим эффектом каждого штамма, используемого одиночно.

Композиции по настоящему изобретению, кроме того, могут содержать многочисленные дополнительные компоненты, включающие одно или более чем одно криопротекторное соединение, а также ароматические соединения.

LAB чаще всего добавляют в молоко в виде заквасочной культуры. Термин "закваска" или "заквасочная культура" в том виде, в котором он используется в настоящем контексте, относится к культуре одного или более чем одного микроорганизма, подходящего для применения в пищевых продуктах, в частности молочнокислых бактерий, которые отвечают за скисание молочной основы. Заквасочные культуры могут быть свежими, но чаще всего являются замороженными или лиофилизированными. Данные продукты также известны как культуры "для прямого внесения" (DVS), и они производятся для непосредственной инокуляции ферментационного сосуда или ванны для производства молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт или сыр. Соответствующие заквасочные культуры имеются в продаже во многих источниках и включают F-DVS YoFlex Mild 2.0, F-DVS YF-L901, FD-DVS YF-812 и F-DVS CH-1 - четыре культуры, имеющиеся в продаже у Chr. Hansen, содержащие смеси *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

В одном аспекте настоящего изобретения, следовательно, предложены композиции в виде твердой замороженной или лиофилизированной заквасочной культуры, содержащей молочнокислые бактерии в концентрации по меньшей мере 10^9 колониеобразующих единиц на г замороженного вещества, или в концентрации по меньшей мере 10^{10} колониеобразующих единиц на г замороженного вещества, или в концентрации по меньшей мере 10^{11} колониеобразующих единиц на г замороженного вещества, причем данные композиции включают бактерию вида *Lactobacillus fermentum* с противогрибковой активностью, как описано выше.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены бактерии *Lactobacillus fermentum* и содержащие их композиции, которые характеризуются более чем одним из приведенных выше свойств. Например, согласно настоящему изобретению предложена бактерия вида *Lactobacillus fermentum*, имеющая способность ингибировать рост гриба *Penicillium solitum*, депонированного под № доступа DSM32093, или рост гриба *Penicillium brevicompactum*, депонированного под № доступа DSM32094, по меньшей мере на 50% при определении в анализе, включающем:

(1) приготовление ферментированного молочного продукта посредством:

(а) инокулирования молока *Lactobacillus fermentum* в концентрации по меньшей мере 10^7 КОЕ/г и заквасочной культурой,

(б) ферментирования до достижения рН 4,6 и

(в) отверждения ферментированного молока посредством добавления агара;

(2) получение по меньшей мере одного пятна *P. solitum* или *P. brevicompactum* на отвержденном агаром ферментированном молоке с концентрацией 500 спор/пятно и его инкубирование в течение 7 суток при 25°C;

(3) определение процента ингибирования посредством определения наибольшего диаметра колонии, образованной ростом *P. solitum* или *P. brevicompactum*, и выражения указанного диаметра в виде процентной доли наибольшего диаметра, образованного при тех же самых условиях, но в отсутствие штамма *Lactobacillus fermentum*;

и дополнительно характеризуемая тем, что бактерия вида *Lactobacillus fermentum* секретирует ди-ацетил в интервале от 0 до 5 млн⁻¹, где концентрация ди-ацетила определена в анализе, включающем:

(4) приготовление ферментированного молочного продукта посредством:

(а) инокулирования молока *Lactobacillus fermentum* в концентрации по меньшей мере 10⁷ КОЕ/г и заквасочной культурой,

(б) ферментирования до достижения рН 4,6, и

(5) хранение ферментированного молочного продукта при 7 плюс/минус 1°C в течение 14 суток;

(6) добавление 200 мкл 4 н. H₂SO₄ к 1 г ферментированного молочного продукта и определение концентрации ди-ацетила посредством статической парофазной газовой хроматографии.

Данные бактерии могут дополнительно характеризоваться способностью уменьшать концентрацию ацетальдегида, продуцированного заквасочной культурой во время ферментации, в ферментированном молочном продукте по меньшей мере на 50%.

Альтернативно или дополнительно, бактерии вида *Lactobacillus fermentum* могут дополнительно характеризоваться тем, что они повышают рН ферментированного молочного продукта, содержащего *Lactobacillus fermentum*, на протяжении хранения после ферментации по сравнению с молочным продуктом, ферментированным такой же заквасочной культурой, не содержащей *Lactobacillus fermentum*.

В отдельном воплощении согласно изобретению дополнительно предложена бактерия *Lactobacillus fermentum*, имеющая способность ингибировать рост гриба *Penicillium solitum*, депонированного под № доступа DSM32093, или рост гриба *Penicillium brevicompactum*, депонированного под № доступа DSM32094, по меньшей мере на 50% при определении в анализе, включающем:

(1) приготовление ферментированного молочного продукта посредством:

(а) инокулирования молока *Lactobacillus fermentum* в концентрации по меньшей мере 10⁷ КОЕ/г и заквасочной культурой,

(б) ферментирования до достижения рН 4,6 и

(в) отверждения ферментированного молока посредством добавления агара;

(2) получение по меньшей мере одного пятна *P. solitum* или *P. brevicompactum* на отвержденном агаром ферментированном молоке с концентрацией 500 спор/пятно и его инкубирование в течение 7 суток при 25°C;

(3) определение процента ингибирования посредством определения наибольшего диаметра колонии, образованной ростом *P. solitum* или *P. brevicompactum*, и выражения указанного диаметра в виде процентной доли наибольшего диаметра, образованного при тех же самых условиях, но в отсутствие штамма *Lactobacillus fermentum*;

и дополнительно характеризуемая тем, что бактерия вида *Lactobacillus fermentum* повышает рН ферментированного молочного продукта, содержащего *Lactobacillus fermentum*, на протяжении хранения после ферментации по сравнению с молочным продуктом, ферментированным такой же заквасочной культурой, не содержащей *Lactobacillus fermentum*, где увеличение рН происходит по меньшей мере на значение 0,1, и где увеличение рН определено после хранения ферментированного продукта на протяжении 21 суток при 25°C. Опять-таки, в одном воплощении данные бактерии могут дополнительно иметь способность уменьшать концентрацию ацетальдегида, продуцированного заквасочной культурой на протяжении ферментации, в ферментированном молочном продукте по меньшей мере на 50%.

В другом воплощении согласно настоящему изобретению предложены способы получения ферментированного молочного продукта, которые включают добавление бактерии *Lactobacillus fermentum* с противогрибковой активностью, как описано выше, или содержащей ее композиции в молоко или в молочный продукт и ферментирование данной смеси при температуре от примерно 22°C до примерно 43°C до достижения рН меньше чем 4,6.

В контексте настоящей заявки термин "молоко" используется в широком смысле в его обычном значении для названия жидкостей, продуцируемых молочными железами животных или растениями. Согласно настоящему изобретению молоко возможно было переработано, и термин "молоко" включает цельное молоко, снятое молоко, обезжиренное молоко, молоко с низким содержанием жира, молоко с полным содержанием жира, молоко с пониженным содержанием лактозы или концентрированное молоко. Обезжиренное молоко представляет собой нежирный или снятый молочный продукт. Молоко с низким содержанием жира типично определяется как молоко, которое содержит от примерно 1% до примерно 2% жира. Молоко с полным содержанием жира часто содержит 2% жира или больше. Подразуме-

вается то, что термин "молоко" охватывает молоко от разных млекопитающих и из разных растительных источников. Млекопитающие - источники молока включают корову, овцу, козу, буйвола, верблюда, ламу, кобылу и оленя, но не ограничиваются ими. Растительные источники молока включают молоко, выделенное из соевых бобов, гороха, арахиса, ячменя, риса, овса, квиноа, миндаля, кешью, кокоса, фундука, конопли, семян кунжута и семян подсолнечника, но не ограничиваются ими. В способах и продуктах по настоящему изобретению молоко, полученное от коров, наиболее предпочтительно используется в качестве исходного вещества для ферментации.

Термин "молоко" также включает молочные продукты с пониженным содержанием жира и/или с пониженным содержанием лактозы. Соответствующие продукты могут быть получены с использованием способов, хорошо известных в данной области, и они имеются в продаже (например, у Select Milk Producers Inc., Техас, США). Молоко с пониженным содержанием лактозы может быть получено согласно любому способу, известному в данной области, включающему осуществление гидролиза лактозы до глюкозы и галактозы ферментом лактазой или посредством нанофильтрации, электродиализа, ионообменной хроматографии и центрифугирования.

Термин "молочный продукт" или "молочная основа" широко используется в настоящей заявке для названия композиции, основанной на молоке или компонентах молока, которую можно использовать в качестве среды для роста и ферментации LAB. Молочный продукт или основа содержат компоненты, происходящие из молока, и любой другой компонент, который может быть использован с целью выращивания или осуществления ферментации LAB.

Стадия ферментации способа изготовления ферментированных молочных продуктов включает добавление LAB в молоко. Способы ферментации, используемые в производстве молочных продуктов, хорошо известны, и обычный специалист может выбрать условия ферментационного процесса, включающие температуру, содержание кислорода, количество и характеристики микроорганизма(ов) и время ферментации.

До ферментации молочный субстрат можно гомогенизировать и пастеризовать согласно способам, известным в данной области. Термин "гомогенизация" в том виде, как он здесь используется, означает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. При проведении гомогенизации до ферментации ее можно проводить таким образом, чтобы разрушать молочный жир до меньших размеров таким образом, что он больше не отделяется от молока. Это может осуществляться посредством пропускания молока под высоким давлением через маленькие отверстия. Термин "пастеризация" в том виде, как он здесь используется, означает обработку молочного субстрата для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно пастеризация достигается поддержанием определенной температуры в течение определенного периода времени. Определенная температура обычно достигается посредством нагревания. Температуру и продолжительность можно выбирать для того, чтобы умерщвлять или инактивировать определенные бактерии, такие как вредные бактерии. Затем может следовать стадия быстрого охлаждения.

В особенно полезном способе по настоящему изобретению бактерию *Lactobacillus fermentum* с противогрибковыми эффектами, как описано выше, или содержащую ее композицию добавляют в молоко или в молочный продукт, и данную смесь ферментируют таким образом, что

(а) концентрация бактерий *Lactobacillus fermentum* с противогрибковыми эффектами составляет по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/г или по меньшей мере 1×10^7 КОЕ/г при завершении ферментации в ферментированном молочном продукте; и/или

(б) таким образом, что концентрация бактерий *Lactobacillus fermentum* с противогрибковыми эффектами составляет по меньшей мере 1×10^5 КОЕ/см² на поверхности ферментированного молочного продукта.

Этот способ действий имеет преимущество в том, что может полностью использоваться противогрибковый эффект бактерии *Lactobacillus fermentum*.

Одним способом достижения данной концентрации является применение способа производства ферментированного молочного продукта, в котором параметры ферментации поддерживаются таким образом, что описанная выше концентрация бактерий *Lactobacillus fermentum* возрастает на протяжении ферментации. Применение традиционных заквасочных культур и условий для ферментации (как описано в Примерах) обычно будет увеличивать описанную выше концентрацию бактерий *Lactobacillus fermentum* на протяжении ферментации по меньшей мере на 0,5 log. В качестве альтернативы, параметры ферментации поддерживаются таким образом, что описанная выше концентрация бактерий *Lactobacillus fermentum* значимо не уменьшается, например не уменьшается больше чем на 30%, не больше чем на 25% или не больше чем на 20% на протяжении ферментации и хранения.

Согласно настоящему изобретению также предложен ферментат, который можно получать посредством ферментирования молочного продукта бактериями *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению. Термин "ферментат" используется для названия продукта ферментации. Соответствующий ферментат может представлять собой жидкость, полученную в результате процесса ферментации с использованием бактерий *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению. Данная жидкость может содер-

жать бактерии, но не обязательно должна их содержать. Данная жидкость предпочтительно содержит противогрибковые метаболиты, продуцируемые бактериями *Lactobacillus fermentum* по настоящему изобретению. Ферментат можно использовать для производства пищевых, кормовых или фармацевтических продуктов. Например, ферментат можно распылять на пищевые или кормовые продукты с достижением противогрибкового эффекта.

Согласно изобретению дополнительно предложены способы производства пищевого, кормового или фармацевтического продукта, включающие способ производства ферментированного молочного продукта, как описано выше, и пищевого, кормового или фармацевтического продукта, которые можно получать этим способом.

Ферментация проводится для получения пищевых продуктов, кормовых продуктов или фармацевтических средств. Термины "ферментированный молочный продукт", "пищевой" или "кормовой" продукт относятся к продуктам, которые можно получать способами ферментации по настоящему изобретению, и они включают сыр, йогурт, фруктовый йогурт, йогуртовый напиток, процеженный йогурт (греческий йогурт, лабне), творог, вареный сыр (*fromage frais*) и творожный сыр. Термин "пицца" дополнительно охватывает другие ферментированные пищевые продукты, включающие ферментированное мясо, такое как ферментированные колбасы и ферментированные рыбные продукты.

Понятно то, что термин "сыр" охватывает любой сыр, включающий твердый, полутвердый и мягкие сыры, такие как сыры следующих типов: домашний, фета, чеддер, пармезан, моцарелла, эмменталер, данбо, гауда, эдам, фетаподобные сыры, сыры с плесенью, соленые сыры, камамбер и бри. Специалисту в данной области известно как превращать сгусток в 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. Термин "сыр с низким содержанием соли" в том виде, в котором он здесь используется, относится к сыру, который имеет концентрацию NaCl меньше 1,7% (мас./мас.).

В контексте настоящей заявки термин "йогурт" относится к продуктам, содержащим *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* и, возможно, другие микроорганизмы, такие как *Lactobacillus delbrueckii* подвид *lactis*, *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus paracasei*, или любой микроорганизм, полученный из них. Штаммы, продуцирующие молочную кислоту, отличные от *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, включены для придания конечному продукту разных свойств, таких как свойство стимуляции равновесия флоры. Термин "йогурт" в том виде, в котором он здесь используется, охватывает йогурт термостатного способа производства, перемешанный йогурт, питьевой йогурт, Petit Suisse, термообработанный йогурт, процеженный йогурт или йогурт в греческом стиле, характеризующийся высоким уровнем белка, и йогуртоподобные продукты.

В частности, термин "йогурт" охватывает йогурт, определенный согласно французским и европейским правилам, например молочные продукты свертывания, полученные посредством молочнокислого брожения, посредством лишь специфических термофильных молочнокислых бактерий (т.е. *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*), которые культивируются одновременно и обнаруживаются в конечном продукте живыми в количестве по меньшей мере 10 миллионов КОЕ (колониеобразующих единиц)/г, но не ограничивается им. Йогурты возможно могут содержать добавленное молочное сырье (например, сливки) или другие ингредиенты, такие как сахар или подсластители, один или более чем один корригент, фрукты, злаки или питательные вещества, особенно витамины, минералы и волокна, а также стабилизаторы и загустители. Возможно данный йогурт удовлетворяет спецификациям ферментированного молока и йогуртов стандарта AFNOR NF 04-600 и/или кодексу стандарта StanA-Па-1975. Для того чтобы удовлетворять стандарту AFNOR NF 04-600, данный продукт не должен нагреваться после ферментации, и молочное сырье должно представлять минимум 70% (мас./мас.) конечного продукта.

В другом воплощении согласно настоящему изобретению предложены пищевые, кормовые или фармацевтические продукты, содержащие одну или более чем одну бактерию вида *Lactobacillus fermentum* с противогрибковыми эффектами, как описано выше, и одну или более чем одну из:

(а) по меньшей мере одной дополнительной бактерии, выбранной из одного или более чем одного из следующих родов: *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp. и *Enterococcus* spp.;

(б) бактерии *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC15860, депонированного в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под № доступа DSM32092;

(в) бактерии *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC5366, депонированного в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под № доступа DSM23035;

(г) бактерии *Lactobacillus rhamnosus* штамма CHCC12697, депонированного в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под № доступа DSM24616;

(д) бактерии *Lactobacillus paracasei* штамма CHCC12777, депонированного в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под № доступа DSM24651; и

(е) бактерии *Lactobacillus paracasei* штамма CHCC14676, депонированного в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под № доступа DSM25612.

Описание графических материалов

Фиг. 1 - рост плесневых грибов на чашках, полученных с использованием молока, ферментированного одной заквасочной культурой (контроль, первая колонка), вместе с FreshQ®4 (вторая колонка), вместе с Holdbac® YM-C Plus (третья колонка) или вместе с *Lb. fermentum* CHCC14591 (четвертая колонка). Чашки инкубировали при 7 плюс/минус 1°C в течение 19 суток (верхний ряд) и 27 суток (нижний ряд). Добавляли целевые загрязнители в концентрациях 500 спор/пятно: (A) *P. carneum*, (B) *P. paneum* и (C) *P. roqueforti*.

Фиг. 2 - рост плесневых грибов на чашках, полученных с использованием молока, ферментированного одной заквасочной культурой (контроль, первая колонка), вместе с FreshQ®4 (вторая колонка), вместе с Holdbac® YM-C Plus (третья колонка) или вместе с *Lb. fermentum* CHCC14591 (четвертая колонка). Чашки инкубировали при 25 плюс/минус 1°C в течение 6 суток (верхний ряд) и 11 суток (нижний ряд). Добавляли целевые загрязнители в концентрациях 500 спор/пятно: (A) *P. carneum*, (B) *P. paneum* и (C) *P. roqueforti*.

Фиг. 3 - рост плесневых грибов на чашках, полученных с использованием молока, ферментированного одной заквасочной культурой (контроль, первая колонка), вместе с FreshQ®4 (вторая колонка), вместе с Holdbac® YM-C Plus (третья колонка) или вместе с *Lb. fermentum* CHCC14591 (четвертая колонка). Чашки инкубировали при 7 плюс/минус 1°C в течение 19 суток (верхний ряд) и 27 суток (нижний ряд). Добавляли целевые загрязнители в концентрациях 500 спор/пятно: (A) *P. brevicompactum*, (B) *P. crustosum* и (C) *P. solitum*.

Фиг. 4 - рост плесневых грибов на чашках, полученных с использованием молока, ферментированного одной заквасочной культурой (контроль, первая колонка), вместе с FreshQ®4 (вторая колонка), вместе с Holdbac® YM-C Plus (третья колонка) или вместе с *Lb. fermentum* CHCC14591 (четвертая колонка). Чашки инкубировали при 25 плюс/минус 1°C в течение 6 суток (верхний ряд) и 11 суток (нижний ряд). Добавляли целевые загрязнители в концентрациях 500 спор/пятно: (A) *P. brevicompactum* (DSM32093), (B) *P. crustosum* и (C) *P. solitum* (DSM32093).

Фиг. 5 - рост дрожжей на чашках, полученных с использованием молока, ферментированного одной заквасочной культурой (контроль, первая колонка), вместе с FreshQ®4 (вторая колонка), вместе с Holdbac® YM-C Plus (третья колонка) или вместе с *Lb. fermentum* CHCC14591 (четвертая колонка). Чашки инкубировали при 7 плюс/минус 1°C в течение 11 суток (верхний ряд) или при 25 плюс/минус 1°C в течение 5 суток (нижний ряд). Добавляли целевые загрязнители в концентрациях 1×10^3 КОЕ/пятно (верхний ряд), 1×10^2 КОЕ/пятно (средний ряд) и 1×10^1 КОЕ/пятно (нижний ряд): (A) *Torulaspora delbrueckii*, (B) *Styrococcus hansenii*, (C) *Debaromyces hansenii* и (D) *Yarrowia lipolytica*.

Фиг. 6 - уровни диацетила после хранения при 7 плюс/минус 1°C в течение 14 суток в ферментированных молочных продуктах, ферментированных одной заквасочной культурой (контроль) или заквасочными культурами в комбинации с FreshQ®4, Holdbac® YM-C Plus или *Lb. fermentum* CHCC14591. LOD - предельный уровень определения. LOQ - предельный уровень количественного измерения.

Фиг. 7 - рост плесневых грибов на чашках, полученных с использованием молока, ферментированного одной заквасочной культурой (контроль, первая колонка), вместе с *Lb. rhamosus* CHCC15860 (вторая колонка), вместе с *Lb. fermentum* CHCC14591 (третья колонка) или вместе с комбинацией *Lb. rhamosus* CHCC15860 и *Lb. fermentum* CHCC14591 (четвертая колонка). Чашки инкубировали при 25 плюс/минус 1°C в течение 5 суток. Добавляли целевые загрязнители в концентрациях 500 спор/пятно: (A) *P. carneum*, (B) *P. paneum* и (C) *P. roqueforti*.

Фиг. 8 - рост плесневых грибов на чашках, полученных с использованием молока, ферментированного (1) одной заквасочной культурой, вместе с (2) *Lb. fermentum* CHCC12798, (3) *Lb. fermentum* CHCC12797, (4) *Lb. fermentum* CHCC14591, (5) *Lb. fermentum* CHCC14588, (6) *Lb. fermentum* CHCC15844, (7) *Lb. fermentum* CHCC15865, (8) *Lb. fermentum* CHCC15847, (9) *Lb. fermentum* CHCC15848, (10) *Lb. fermentum* CHCC15926 и (11) *Lb. fermentum* CHCC2008. Чашки инкубировали при 25 плюс/минус 1°C в течение 5 суток (левая колонка фотографий) или 7 суток (правая колонка фотографий). Добавляли целевые загрязнители в концентрациях 500 спор/пятно: (A) *P. brevicompactum* (DSM32094), (B) *P. crustosum* и (C) *P. solitum* (DSM32093).

Фиг. 9 - уровни диацетила после хранения при 7 плюс/минус 1°C в течение 14 суток в ферментированных молочных продуктах, ферментированных одной заквасочной культурой (контроль) или заквасочными культурами в комбинации с FreshQ®4, Holdbac® YM-C Plus или штаммами *Lb. fermentum*. LOD - предельный уровень определения. LOQ - предельный уровень количественного измерения.

Фиг. 10 - развитие pH в ферментированных молочных продуктах с течением времени при хранении при (A) 7 плюс/минус 1°C и (B) 25 плюс/минус 1°C в течение 28 суток. Данные продукты ферментируются только заквасочной культурой - контроль, или заквасочной культурой в комбинации с FreshQ®4, Holdbac® YM-C Plus или штаммами *Lb. fermentum*.

Фиг. 11 - развитие pH в ферментированных молочных продуктах с течением времени при хранении при (A) 7 плюс/минус 1°C или (B) 25 плюс/минус 1°C в течение 21 суток. Данные продукты ферментируются только заквасочной культурой (контроль, A) или заквасочной культурой в комбинации с

FreshQ®4 (◇), Holdbac® YM-C Plus (○) или *Lb. fermentum* CHCC14591 (□).

Фиг. 12 - уровни ацетальдегида после хранения при 7 плюс/минус 1°C в течение 14 суток в ферментированных молочных продуктах, ферментированных одной заквасочной культурой (контроль) или заквасочными культурами в комбинации со штаммами *Lb. fermentum*. LOD - предельный уровень определения. LOQ - предельный уровень количественного измерения.

Фиг. 13 - уровни ацетальдегида после хранения при 7 плюс/минус 1°C в течение 14 суток в ферментированных молочных продуктах, ферментированных одной заквасочной культурой (контроль) или заквасочными культурами в комбинации с *Lb. fermentum* CHCC14591. LOD - предельный уровень определения. LOQ - предельный уровень количественного измерения.

Фиг. 14 - кривые закисления четырех имеющихся в продаже заквасочных культур: FD-DVS YF-L812, F-DVS YF-L901, F-DVS YoFlex Mild 2.0 и F-DVS CH-1, выращенных в молоке (1% жира и 4,5% белка) при 43°C.

Фиг. 15 - кривые последующего закисления йогурта, ферментированного одной из четырех имеющихся в продаже заквасочных культур: FD-DVS YF-L812, F-DVS YF-L901, F-DVS YoFlex Mild 2.0 и F-DVS CH-1 после хранения при 6°C в течение вплоть до 43 суток.

Фиг. 16 - рост плесневых грибов на чашках, полученных с использованием молока, ферментированного (1) одной заквасочной культурой - FD-DVS YF-L812, вместе с (2) *Lb. fermentum* CHCC12798, (3) *Lb. fermentum* CHCC12797, (4) *Lb. fermentum* CHCC14591, (5) *Lb. fermentum* CHCC14588, (6) *Lb. fermentum* CHCC15844, (7) *Lb. fermentum* CHCC15865, (8) *Lb. fermentum* CHCC15847, (9) *Lb. fermentum* CHCC15926 и (10) *Lb. fermentum* CHCC2008. Чашки инкубировали при 25 плюс/минус 1°C в течение 4 суток (левый столбец фотографий) или 8 суток (правый столбец фотографий). Добавляли целевой загрязнитель - *P. brevicompactum* (DSM32094) - в концентрации 500 спор/пятно.

Фиг. 17 - рост плесневых грибов на чашках, полученных с использованием молока, ферментированного (1) одной заквасочной культурой - FD-DVS CH-1, вместе с (2) *Lb. fermentum* CHCC12798, (3) *Lb. fermentum* CHCC12797, (4) *Lb. fermentum* CHCC14591, (5) *Lb. fermentum* CHCC14588, (6) *Lb. fermentum* CHCC15844, (7) *Lb. fermentum* CHCC15865, (8) *Lb. fermentum* CHCC15847, (9) *Lb. fermentum* CHCC15926 и (10) *Lb. fermentum* CHCC2008. Чашки инкубировали при 25 плюс/минус 1°C в течение 4 суток (левый столбец фотографий) или 8 суток (правый столбец фотографий). Добавляли целевой загрязнитель - *P. brevicompactum* (DSM32094) - в концентрации 500 спор/пятно.

Фиг. 18 - рост плесневых грибов на чашках, полученных с использованием молока, ферментированного (1) одной заквасочной культурой - FD-DVS YF-L812, вместе с (2) *Lb. fermentum* CHCC12798, (3) *Lb. fermentum* CHCC12797, (4) *Lb. fermentum* CHCC14591, (5) *Lb. fermentum* CHCC14588, (6) *Lb. fermentum* CHCC15844, (7) *Lb. fermentum* CHCC15865, (8) *Lb. fermentum* CHCC15847, (9) *Lb. fermentum* CHCC15926 и (10) *Lb. fermentum* CHCC2008. Чашки инкубировали при 25 плюс/минус 1°C в течение 4 суток (левый столбец фотографий) или 8 суток (правый столбец фотографий). Добавляли целевой загрязнитель - *P. solitum* (DSM32093) - в концентрации 500 спор/пятно.

Фиг. 19 - рост плесневых грибов на чашках, полученных с использованием молока, ферментированного (1) одной заквасочной культурой - F-DVS CH-1, вместе с (2) *Lb. fermentum* CHCC12798, (3) *Lb. fermentum* CHCC12797, (4) *Lb. fermentum* CHCC14591, (5) *Lb. fermentum* CHCC14588, (6) *Lb. fermentum* CHCC15844, (7) *Lb. fermentum* CHCC15865, (8) *Lb. fermentum* CHCC15847, (9) *Lb. fermentum* CHCC15926 и (10) *Lb. fermentum* CHCC2008. Чашки инкубировали при 25 плюс/минус 1°C в течение 4 суток (левый столбец фотографий) или 8 суток (правый столбец фотографий). Добавляли целевой загрязнитель - *P. solitum* (DSM32093) - в концентрации 500 спор/пятно.

Фиг. 20 - уровни диацетила после хранения при 7 плюс/минус 1°C в течение 14 суток в ферментированных молочных продуктах, ферментированных одной заквасочной культурой (контроль) - FD DVS YF-L812 или F-DVS CH-1 - или заквасочными культурами в комбинации с одним из девяти штаммов *Lb. fermentum*. LOD - предельный уровень определения. LOQ - предельный уровень количественного измерения.

Фиг. 21 - уровни ацетальдегида после хранения при 7 плюс/минус 1°C в течение 14 суток в ферментированных молочных продуктах, ферментированных одной заквасочной культурой (контроль) - FD DVS YF-L812 или F-DVS CH-1 - или заквасочными культурами в комбинации с одним из девяти штаммов *Lb. fermentum*. LOD - предельный уровень определения. LOQ - предельный уровень количественного измерения.

Пример 1. Полуколичественный анализ ингибирующего эффекта *Lb. fermentum* CHCC14591 против разных дрожжевых и плесневых загрязнителей и образования диацетила.

Для полуколичественного анализа ингибирующего эффекта *Lb. fermentum* CHCC14591 использовали анализ на основе агара, имеющий сходство со способом изготовления и продуктом - йогуртом.

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% мас./об.) обрабатывали нагреванием при 90 плюс/минус 1°C в течение 20 мин и немедленно охлаждали. Имеющуюся в продаже заквасочную культуру (F-DVS Mild 2.0) инокулировали в концентрации 0,02% (об./мас.), и инокулированное молоко распределяли в 200 мл бутылки. Одну бутылку инокулировали *Lb. fermentum* CHCC14591 в

общей концентрации 2×10^7 КОЕ/г, две бутылки инокулировали одной из двух имеющихся в продаже био-защитных культур (FreshQ®4 и Holdbac® YM-C Plus) в рекомендованных дозировках (100 U/Т и 20 DCU/100 л для FreshQ®4 и Holdbac® YM-C Plus соответственно), и одну бутылку использовали в качестве контроля и инокулировали лишь заквасочной культурой. Все бутылки выдерживали на водяной бане при 43 плюс/минус 1°C и ферментировали при данных условиях до достижения pH 4,60 плюс/минус 0,1. После ферментации бутылки энергично встряхивали для разрушения сгустка и охлаждали на льду. Затем ферментированное молоко нагревали до температуры 40°C и добавляли 40 мл 5%-го стерильного раствора агара, который был расплавлен и охлажден до 60°C. Этот раствор ферментированного молока и агара затем разливали в стерильные чашки Петри, и данные чашки сушили в ламинаре в течение 30 мин.

Суспензию спор шести разных плесневых грибов наносили в виде пятен в концентрации 500 спор/пятно: *Penicillium brevicompactum* (DSM32094), *P. crustosum*, *P. solitum* (DSM32093), *P. carneum*, *P. raupem* и *P. roqueforti*. На каждую чашку наносили в виде пятен три плесневых гриба. Наносили в виде пятен четыре вида дрожжей, включающих *Torulasporea delbrueckii*, *Cryptococcus hansenii*, *Debaryomyces hansenii* и *Yarrowia lipolytica*, в концентрациях 10^4 , 10^3 и 10^2 КОЕ/пятно. Чашки инкубировали при 7 плюс/минус 1°C и 25 плюс/минус 1°C и регулярно проверяли на рост плесневых грибов и дрожжей.

В сутки 14 образцы анализировали на диацетил посредством статической парофазной газовой хроматографии (HSGC) - чувствительного способа проведения анализа летучих веществ в сложных матрицах. Данная установка состояла из статического парофазного пробоотборника, соединенного с газовым хроматографом с пламенным ионизационным детектором (FID). С этой целью использовали следующее оборудование:

HS-пробоотборник: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

Программа HS: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

Программа GC: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

Колонка: HP-FFAP 25 м×0,20 мм×0,33 мкм, Agilent Technologies.

Для определения коэффициентов отклика (калибровка) использовали стандарты известной концентрации, контроли использовали для контроля того, что использованные коэффициенты отклика были стабильными в пределах аналитической серии, а также между сериями и с течением времени (месяцы). Концентрацию летучих веществ (млн^{-1}) в образцах и контролях определяли с использованием коэффициентов отклика, полученных от стандартов. Образцы получали путем добавления 200 мкл 4 н. H_2SO_4 к 1 г образца йогурта и немедленно анализировали посредством HSGC.

Результаты анализа на основе агара представлены на фиг. 1-5, демонстрируя то, что все протестированные плесневые грибы очень хорошо росли на чашках с агаром, полученных с использованием молока, ферментированного только заквасочной культурой (контроль). Однако, когда на протяжении ферментации молока присутствовала *Lb. fermentum* CHCC14591, на полученных в результате чашках ингибировался рост всех протестированных видов *Penicillium*. Уровень ингибирования был сравнимым или даже более высоким, чем ингибирование, наблюдаемое для двух имеющихся в продаже био-защитных культур. На фиг. 3 показано то, что все протестированные дрожжи росли на чашках с агаром, полученных с использованием молока, ферментированного только заквасочной культурой (контроль). Когда на протяжении ферментации молока присутствовала *Lb. fermentum* CHCC14591, на полученных в результате чашках предотвращался рост *S. fragioli* и *Y. lipolytica*, добавленных во всех концентрациях. Рост *T. delbrueckii* и *D. hansenii* ингибировался в меньших концентрациях при наличии *Lb. fermentum* CHCC14591 на протяжении ферментации молока. Уровень ингибирования был сравнимым или даже более высоким, чем ингибирование, наблюдаемое для двух имеющихся в продаже био-защитных культур.

Влияние на продукцию диацетила проиллюстрировано на фиг. 6, демонстрирующей то, что добавление *Lb. fermentum* CHCC14591 во время ферментации молока дает минимальное количество диацетила по сравнению с альтернативами, имеющимися в продаже.

Пример 2. Полуколичественный анализ ингибирующего эффекта *Lb. fermentum* CHCC14591 в комбинации с *Lb. rhamnosus* CHCC15860 против разных плесневых загрязнителей.

Для полуколичественного анализа ингибирующего эффекта комбинации *Lb. fermentum* CHCC14591 и *Lb. rhamnosus* CHCC15860 использовали анализ на основе агара, имеющий сходство со способом изготовления и продуктом - йогуртом.

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% мас./об.) обрабатывали нагреванием при 90 плюс/минус 1°C в течение 20 мин и немедленно охлаждали. Имеющуюся в продаже заквасочную культуру (F-DVS Mild 2.0) инокулировали в концентрации 0,02% (об./мас.), и инокулированное молоко распределяли в 200 мл бутылки. Одну бутылку инокулировали *Lb. rhamnosus* CHCC15860 в общей концентрации 1×10^7 КОЕ/г, одну бутылку инокулировали *Lb. fermentum* CHCC14591 в общей концентрации 1×10^7 КОЕ/г, одну бутылку инокулировали *Lb. fermentum* CHCC14591 и *Lb. rhamnosus* CHCC15860 в концентрации 5×10^6 КОЕ/г каждой, и одну бутылку использовали в качестве контроля и инокулировали лишь заквасочной культурой. Все бутылки выдерживали на водяной бане при 43 плюс/минус 1°C и ферментировали при данных условиях до достижения pH 4,60 плюс/минус 0,1. После

ферментации бутылки энергично встряхивали для разрушения сгустка и охлаждали на льду. Затем ферментированное молоко нагревали до температуры 40°C и добавляли 40 мл 5%-го стерильного раствора агара, который был расплавлен и охлажден до 60°C. Этот раствор ферментированного молока и агара затем разливали в стерильные чашки Петри, и данные чашки сушили в ламинаре в течение 30 мин.

Суспензию спор трех разных плесневых грибов наносили в виде пятен в концентрации 500 спор/пятно: *P. carneum*, *P. raneum* и *P. roqueforti*. На каждую чашку наносили в виде пятен три плесневых гриба. Чашки инкубировали при 25 плюс/минус 1°C и регулярно проверяли на рост плесневых грибов.

Результаты анализа на основе агара представлены на фиг. 7, демонстрирующей то, что все протестированные плесневые грибы очень хорошо росли на чашках с агаром, полученных с использованием молока, ферментированного только заквасочной культурой (контроль). Однако, когда на протяжении ферментации молока присутствовали *Lb. rhamnosus* CHCC15860 или *Lb. fermentum* CHCC14591, на полученных в результате чашках ингибировался рост трех протестированных видов *Penicillium*. Кроме того, при использовании *Lb. rhamnosus* CHCC15860 и *Lb. fermentum* CHCC14591 в комбинации был обнаружен синергетический ингибирующий эффект, по сравнению с ингибирующим эффектом каждого штамма, использованного одиночно.

Пример 3. Полуколичественный анализ ингибирующего эффекта десяти штаммов *Lb. fermentum* против разных плесневых загрязнителей.

Для полуколичественного анализа ингибирующего эффекта десяти штаммов *Lb. fermentum* использовали анализ на основе агара, имеющий сходство со способом изготовления и продуктом - йогуртом.

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% мас./об.) обрабатывали нагреванием при 90 плюс/минус 1°C в течение 20 мин и немедленно охлаждали. Имеющуюся в продаже заквасочную культуру (F-DVS YF-L901) инокулировали в концентрации 0,02% (об./мас.), и инокулированное молоко распределяли в 200 мл бутылки. 10 бутылей инокулировали штаммами *Lb. fermentum* в концентрациях 1×10^7 КОЕ/г, и одну бутылку использовали в качестве контроля и инокулировали лишь заквасочной культурой. Все бутылки выдерживали на водяной бане при 43 плюс/минус 1°C и ферментировали при данных условиях до достижения pH 4,60 плюс/минус 0,1. После ферментации бутылки энергично встряхивали для разрушения сгустка и охлаждали на льду. Затем ферментированное молоко нагревали до температуры 40°C и добавляли 40 мл 5%-го стерильного раствора агара, который был расплавлен и охлажден до 60°C. Этот раствор ферментированного молока и агара затем разливали в стерильные чашки Петри, и данные чашки сушили в ламинаре в течение 30 мин.

Протестированными штаммами *Lb. fermentum* были следующие: *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15848, *Lb. fermentum* CHCC15926 и *Lb. fermentum* CHCC2008.

Суспензию спор шести разных плесневых грибов наносили в виде пятен в концентрации 500 спор/пятно: *Penicillium brevicompactum* (DSM32094), *P. crustosum*, *P. solitum* (DSM32093), *P. carneum*, *P. raneum* и *P. roqueforti*. На каждую чашку наносили в виде пятен три плесневых гриба. Чашки инкубировали при 25 плюс/минус 1°C и регулярно проверяли на рост плесневых грибов.

В сутки 14 образцы анализировали на диацетил посредством статической парофазной газовой хроматографии (HSGC) - чувствительного способа проведения анализа летучих веществ в сложных матрицах. Данная установка состояла из статического парофазного пробоотборника, соединенного с газовым хроматографом с пламенным ионизационным детектором (FID). С этой целью использовали следующее оборудование:

HS-пробоотборник: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

Программа HS: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

Программа GC: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

Колонка: HP-FFAP 25 м×0,20 мм×0,33 мкм, Agilent Technologies.

Для определения коэффициентов отклика (калибровки) использовали стандарты известной концентрации, контроли использовали для контроля того, что использованные коэффициенты отклика были стабильными в пределах аналитической серии, а также между сериями и с течением времени (месяцы). Концентрацию летучих веществ (млн^{-1}) в образцах и контролях определяли с использованием коэффициентов отклика, полученных от стандартов. Образцы получали путем добавления 200 мкл 4 н. H_2SO_4 к 1 г образца йогурта и немедленно анализировали посредством HSGC.

Для отслеживания влияния на последующее закисление 11 образцов ферментированного молока (одна заквасочная культура и заквасочная культура в комбинации с 10 штаммами *Lb. fermentum*) хранили при 7 плюс/минус 1°C и 25 плюс/минус 1°C в течение 28 суток, и pH измеряли в сутки 1, 7, 14, 21 и 28.

Результаты анализа на основе агара представлены на фиг. 8, демонстрируя то, что все протестированные плесневые грибы очень хорошо росли на чашках с агаром, полученных с использованием молока, ферментированного только заквасочной культурой (контроль). Для *P. brevicompactum* (DSM32094) и *P. solitum* (DSM32093) наблюдали большую задержку роста для всех штаммов *Lb. fermentum*, когда они

присутствовали во время ферментации молока. Для остальных протестированных плесневых грибов наблюдали варьирующую задержку роста в присутствии во время ферментации молока штаммов *Lb. fermentum*. Бактерии штамма *Lb. fermentum* CHCC14591 достигали значимого ингибирования, по существу, всех протестированных в данном анализе плесневых грибов.

Влияние на продукцию диацетила проиллюстрировано на фиг. 9, демонстрирующей то, что каждый из противогрибковых штаммов *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15848, *Lb. fermentum* CHCC15926 и *Lb. fermentum* CHCC2008 либо не секретирует, либо секретирует очень мало диацетила.

Эффекты на последующее закисление проиллюстрированы на фиг. 10 и показывают то, что каждая из *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15848, *Lb. fermentum* CHCC15926 и *Lb. fermentum* CHCC2008 не способствует последующему закислению или даже уменьшает последующее закисление по сравнению с контрольным йогуртом.

Эти данные были неожиданными и весьма важными, так как наблюдали то, что противогрибковые бактерии предшествующего уровня техники, пригодные для применения в пищевых продуктах, способствуют секреции летучих соединений и увеличивают эффекты последующего закисления, вызванного заквасочной культурой.

Пример 4. Эффект одного штамма *Lb. fermentum* на последующее закисление.

Один штамм *Lb. fermentum* (CHCC14591) тестировали на влияние на последующее закисление.

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% мас./об.) обрабатывали нагреванием при 90 плюс/минус 1°C в течение 20 мин и немедленно охлаждали. Имеющуюся в продаже заквасочную культуру (F-DVS Mild 2.0) инокулировали в концентрации 0,02% (об./мас.), и инокулированное молоко распределяли в 200 мл бутылки. Одну бутылку инокулировали *Lb. fermentum* CHCC14591 в общей концентрации 2×10^7 КОЕ/г, две бутылки инокулировали одной из двух имеющихся в продаже био-защитных культур (FreshQ®4 и Holdbac® YM-C Plus) в рекомендованных дозировках (100U/T и 20 DCU/100 л для FreshQ®4 и Holdbac® YM-C Plus соответственно), и одну бутылку использовали в качестве контроля и инокулировали лишь заквасочной культурой. Все бутылки выдерживали на водяной бане при 43 плюс/минус 1°C и ферментировали при данных условиях до достижения pH 4,60 плюс/минус 0,1. После ферментации бутылки энергично встряхивали для разрушения сгустка и охлаждали на льду.

Для отслеживания влияния на последующее закисление четыре образца ферментированного молока (только заквасочная культура, FreshQ®4, Holdbac® YM-C Plus и *Lb. fermentum* CHCC14591) хранили при 7 плюс/минус 1°C и 25 плюс/минус 1°C в течение 21 суток, и pH измеряли в сутки 1, 7, 14 и 21.

Влияние на последующее закисление проиллюстрировано на фиг. 11, демонстрирующей то, что добавление *Lb. fermentum* CHCC14591 во время ферментации молока предотвращает последующее закисление ферментированного молочного продукта. Одна заквасочная культура дает легкое последующее закисление, и две имеющиеся в продаже био-защитные культуры обе способствуют последующему закислению.

Пример 5. Влияние 10 штаммов *Lb. fermentum* на содержание ацетальдегида.

10 штаммов *Lb. fermentum* тестировали на их способность снижать содержание ацетальдегида.

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% мас./об.) обрабатывали нагреванием при 90 плюс/минус 1°C в течение 20 мин и немедленно охлаждали. Имеющуюся в продаже заквасочную культуру (F-DVS YF-L901 Yo-Flex®) инокулировали в концентрации 0,02% (об./мас.), и инокулированное молоко распределяли в 200 мл бутылки. 10 бутылей инокулировали штаммами *Lb. fermentum* в концентрациях 1×10^7 КОЕ/г, и одну бутылку использовали в качестве контроля и инокулировали лишь заквасочной культурой. Все бутылки выдерживали на водяной бане при 43 плюс/минус 1°C и ферментировали при данных условиях до достижения pH 4,60 плюс/минус 0,1. После ферментации бутылки энергично встряхивали для разрушения сгустка и охлаждали на льду. Бутылки хранили при 7 плюс/минус 1°C в течение 14 суток.

В сутки 14 образцы анализировали на ацетальдегид посредством статической парофазной газовой хроматографии (HSGC) - чувствительного способа проведения анализа летучих веществ в сложных матрицах. Данная установка состояла из статического парофазного пробоотборника, соединенного с газовым хроматографом с пламенным ионизационным детектором (FID). С этой целью использовали следующее оборудование:

HS-пробоотборник: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

Программа HS: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

Программа GC: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

Колонка: HP-FFAP 25 м×0,20 мм×0,33 мкм, Agilent Technologies.

Для определения коэффициентов отклика (калибровки) использовали стандарты известной концентрации, контроля использовали для контроля того, что использованные коэффициенты отклика были

стабильными в пределах аналитической серии, а также между сериями и с течением времени (месяцы). Концентрацию летучих веществ (млн^{-1}) в образцах и контролях определяли с использованием коэффициентов отклика, полученных от стандартов. Образцы получали путем добавления 200 мкл 4 н. H_2SO_4 к 1 г образца йогурта и немедленно анализировали посредством HSGC.

Результаты проиллюстрированы на фиг. 12 и показывают то, что каждый из штаммов *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15848, *Lb. fermentum* CHCC15926 и *Lb. fermentum* CHCC2008 имеет способность уменьшать концентрацию ацетальдегида, продуцированного заквасочной культурой во время ферментации, в ферментированном молочном продукте.

Пример 6. Влияние одного штамма *Lb. fermentum* на содержание ацетальдегида.

Один штамм *Lb. fermentum* тестировали на способность снижать содержание ацетальдегида.

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% мас./об.) обрабатывали нагреванием при 90 плюс/минус 1°C в течение 20 мин и немедленно охлаждали. Имеющуюся в продаже заквасочную культуру (F-DVS Mild 2.0) инокулировали в концентрации 0,02% (об./мас.), и инокулированное молоко распределяли в 200 мл бутылки. Одну бутылку инокулировали штаммами *Lb. fermentum* в концентрациях 1×10^7 КОЕ/г, и одну бутылку использовали в качестве контроля и инокулировали лишь заквасочной культурой. Все бутылки выдерживали на водяной бане при 43 плюс/минус 1°C и ферментировали при данных условиях до достижения pH 4,60 плюс/минус 0,1. После ферментации бутылки энергично встряхивали для разрушения сгустка и охлаждали на льду. Бутылки хранили при 7 плюс/минус 1°C в течение 14 суток.

В сутки 14 образцы анализировали на ацетальдегид посредством статической парофазной газовой хроматографии (HSGC) - чувствительного способа проведения анализа летучих веществ в сложных матрицах. Данная установка состояла из статического парофазного пробоотборника, соединенного с газовым хроматографом с пламенным ионизационным детектором (FID). С этой целью использовали следующее оборудование:

HS-пробоотборник: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

Программа HS: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

Программа GC: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

Колонка: HP-FFAP 25 м×0,20 мм×0,33 мкм, Agilent Technologies.

Для определения коэффициентов отклика (калибровки) использовали стандарты известной концентрации, контроли использовали для контроля того, что использованные коэффициенты отклика были стабильными в пределах аналитической серии, а также между сериями и с течением времени (месяцы). Концентрацию летучих веществ (млн^{-1}) в образцах и контролях определяли с использованием коэффициентов отклика, полученных от стандартов. Образцы получали путем добавления 200 мкл 4 н. H_2SO_4 к 1 г образца йогурта и немедленно анализировали посредством HSGC.

Результаты проиллюстрированы на фиг. 13 и показывают то, что *Lb. fermentum* CHCC14591 имеет способность уменьшать концентрацию ацетальдегида, продуцированного заквасочной культурой во время ферментации, в ферментированном молочном продукте.

Пример 7. Функциональный анализ имеющихся в продаже заквасочных культур.

Включенные сюда четыре имеющиеся в продаже заквасочные культуры были выбраны на основе их разных профилей закисления. Три были замороженными - F-DVS CH-1, F-DVS YoFlex Mild 2.0 и F-DVS YF-L901, и одна была лиофилизированной - FD-DVS YF-L812. Для тестирования различия в профилях закисления полужирное молоко стандартизировали до содержания 1% жира и 4,5% белка с использованием обезжиренного сухого молока, обрабатывали нагреванием при 85 плюс/минус 1°C в течение 30 мин и немедленно охлаждали. Одну из четырех разных имеющихся в продаже заквасочных культур (F-DVS CH-1, F-DVS YoFlex Mild 2.0, F-DVS YF-L901 или FD-DVS YF-L812) инокулировали в концентрации 0,02% (об./мас.), и инокулированное молоко распределяли в 200 мл бутылки. Данные бутылки выдерживали на водяной бане при 43 плюс/минус 1°C и ферментировали при данных условиях до достижения pH 4,5. pH непрерывно измеряли на всем протяжении ферментации. Затем бутылки хранили при 6°C в течение 43 суток, и pH измеряли с интервалами 7 суток для определения уровня последующего закисления.

Профили закисления четырех имеющихся в продаже заквасочных культур - F-DVS CH-1, F-DVS YoFlex Mild 2.0, F-DVS YF-L901 и FD-DVS YF-L812 - показаны на фиг. 14. F-DVS CH-1 демонстрировала быстрое время ферментации, достигая pH 4,55 за 4,87 ч. F-DVS YoFlex Mild 2.0 демонстрировала промежуточное время ферментации, достигая pH 4,55 за 5,29 ч. FD-DVS YF-L812 и F-DVS YF-L901 демонстрировали более медленную ферментацию, достигая pH 4,55 за 6,45 и 5,87 ч соответственно. Профили последующего закисления демонстрировали очень низкие уровни последующего закисления для FD-DVS YF-L812 и F-DVS YoFlex Mild 2.0 (ΔpH равно 0,12 и (ΔpH равно 0,11 после хранения при 6°C в течение 43 суток), промежуточные уровни последующего закисления для F-DVS YF-L901 (ΔpH равно 0,26

после хранения при 6°C в течение 43 суток) и высокий уровень последующего закисления для F-DVS CH-1 (рН равно 0,55 после хранения при 6°C в течение 43 суток) (фиг. 15).

Пример 8. Полуколичественный анализ ингибирующего эффекта девяти штаммов *Lb. fermentum* против разных плесневых загрязнителей при ферментации с использованием двух разных заквасочных культур.

Для полуколичественного анализа ингибирующего эффекта девяти штаммов *Lb. fermentum* использовали анализ на основе агара, имеющий сходство со способом изготовления и продуктом - йогуртом.

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% мас./об.) обрабатывали нагреванием при 90 плюс/минус 1°C в течение 20 мин и немедленно охлаждали. Молоко инокулировали одной из двух имеющихся в продаже заквасочных культур (F-DVS CH-1 или FD-DVS YF-L812) в концентрации 0,02% (об./мас.), и инокулированное молоко распределяли в 200 мл бутылки. Девять бутылей, инокулированных каждой заквасочной культурой, дополнительно инокулировали штаммами *Lb. fermentum* в концентрациях 1×10^7 КОЕ/г, и одну бутылку, инокулированную каждой заквасочной культурой, использовали в качестве контроля и инокулировали лишь заквасочной культурой. Все бутылки выдерживали на водяной бане при 43 плюс/минус 1°C и ферментировали при данных условиях до достижения рН 4,55 плюс/минус 0,1. После ферментации бутылки энергично встряхивали для разрушения сгустка и охлаждали на льду. Затем ферментированное молоко нагревали до температуры 40°C и добавляли 40 мл 5%-го стерильного раствора агара, который был расплавлен и охлажден до 60°C. Этот раствор ферментированного молока и агара затем разливали в стерильные чашки Петри, и данные чашки сушили в ламинаре в течение 30 мин.

Протестированными штаммами *Lb. fermentum* были следующие: *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC 15926 и *Lb. fermentum* CHCC2008.

Суспензии спор двух разных плесневых грибов наносили в виде пятен в концентрации 500 спор/пятно; *Penicillium brevicompactum* (DSM32094) и *P. solitum* (DSM32093). На каждую чашку наносили в виде пятен один плесневый грибок. Чашки инкубировали при 7 плюс/минус 1°C и 25 плюс/минус 1°C и регулярно проверяли на рост плесневых грибов.

В сутки 14 образцы анализировали на диацетил посредством статической парофазной газовой хроматографии (HSGC) - чувствительного способа проведения анализа летучих веществ в сложных матрицах. Данная установка состояла из статического парофазного пробоотборника, соединенного с газовым хроматографом с пламенным ионизационным детектором (FID). С этой целью использовали следующее оборудование:

HS-пробоотборник: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

Программа HS: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

Программа GC: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

Колонка: HP-FFAP 25 м×0,20 мм×0,33 мкм, Agilent Technologies.

Для определения коэффициентов отклика (калибровки) использовали стандарты известной концентрации, контроли использовали для контроля того, что использованные коэффициенты отклика были стабильными в пределах аналитической серии, а также между сериями и с течением времени (месяцы). Концентрацию летучих веществ (млн⁻¹) в образцах и контролях определяли с использованием коэффициентов отклика, полученных от стандартов. Образцы получали путем добавления 200 мкл 4 н. H₂SO₄ к 1 г образца йогурта и немедленно анализировали посредством HSGC.

Результаты анализа на основе агара представлены на фиг. 16-19, демонстрируя то, что оба протестированных плесневых гриба очень хорошо росли на чашках с агаром, полученных с использованием молока, ферментированного только одной из заквасочных культур (контроль). И для *P. brevicompactum* (DSM32094), и для *P. solitum* (DSM32093) наблюдали большую задержку роста для всех штаммов *Lb. fermentum*, когда они присутствовали во время ферментации молока, независимо от использованной заквасочной культуры.

Влияние на продукцию диацетила проиллюстрировано на фиг. 20, демонстрирующей то, что каждый из противогрибковых штаммов *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15926 и *Lb. fermentum* CHCC2008 не добавляет диацетила к уровню, продуцированному заквасочной культурой.

Эти данные были неожиданными и весьма важными, так как наблюдали то, что противогрибковые бактерии предшествующего уровня техники, пригодные для применения в пищевых продуктах, способствуют секреции летучих соединений, что вызвано заквасочной культурой.

Пример 9. Влияние девяти штаммов *Lb. fermentum* на содержание ацетальдегида при ферментации с использованием двух разных заквасочных культур.

Девять штаммов *Lb. fermentum* тестировали на их способность уменьшать содержание ацетальдегида.

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% мас./об.) обрабатывали нагреванием при 90 плюс/минус 1°C в течение 20 мин и немедленно охлаждали. Молоко инокулировали одной из двух имеющихся в продаже заквасочных культур (F-DVS CH-1 или FD-DVS YF-L812) в концентрации 0,02% (об./мас.), и инокулированное молоко распределяли в 200 мл бутылки. Девять бутылей, инокулированных штаммами *Lb. fermentum* в концентрациях 1×10^7 КОЕ/г, и одну бутылку, инокулированную каждой заквасочной культурой, использовали в качестве контроля и инокулировали лишь заквасочной культурой. Все бутылки выдерживали на водяной бане при 43 плюс/минус 1°C и ферментировали при данных условиях до достижения pH 4,55 плюс/минус 0,1. После ферментации бутылки энергично встряхивали для разрушения сгустка и охлаждали на льду. Бутылки хранили при 7 плюс/минус 1°C в течение 14 суток.

Протестированными штаммами *Lb. fermentum* были следующие: *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15926 и *Lb. fermentum* CHCC2008.

В сутки 14 образцы анализировали на ацетальдегид посредством статической парофазной газовой хроматографии (HSGC) - чувствительного способа проведения анализа летучих веществ в сложных матрицах. Данная установка состояла из статического парофазного пробоотборника, соединенного с газовым хроматографом с пламенным ионизационным детектором (FID). С этой целью использовали следующее оборудование:

HS-пробоотборник: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

Программа HS: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

Программа GC: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

Колонка: HP-FFAP 25 м×0,20 мм×0,33 мкм, Agilent Technologies.

Для определения коэффициентов отклика (калибровки) использовали стандарты известной концентрации, контроли использовали для контроля того, что использованные коэффициенты отклика были стабильными в пределах аналитической серии, а также между сериями и с течением времени (месяцы). Концентрацию летучих веществ (млн^{-1}) в образцах и контролях определяли с использованием коэффициентов отклика, полученных от стандартов. Образцы получали путем добавления 200 мкл 4 н. H_2SO_4 к 1 г образца йогурта и немедленно анализировали посредством HSGC.

Результаты проиллюстрированы на фиг. 21 и показывают то, что каждый из штаммов *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15926 и *Lb. fermentum* CHCC2008 имеет способность уменьшать концентрацию ацетальдегида, продуцированного заквасочной культурой во время ферментации, в ферментированном молочном продукте.

Ссылки

- EP0221499
- EP0576780
- EP1442113
- US5378458
- EP2693885
- EP13717237
- EP13714671
- Gerez et al., Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria, *Biological Control*, vol. 64 (2013): 231-237
- Aunsbjerg et al., Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yoghurt, *Int J Food Microbiology*, vol. 194 (2015): 46-53
- Kosikowski, F.V. and Mistry, V.V., "Cheese and Fermented Milk Foods", 1997, 3rd Ed. F.V. Kosikowski, L.L.C. Westport, CT

Депонирования и экспертное решение.

Заявитель ходатайствует о том, чтобы образец депонированных микроорганизмов, изложенных ниже, мог быть сделан доступным только для эксперта до даты, на которую выдан патент.

Штамм CHCC12798 *Lactobacillus fermentum* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 16.07.2015 г. под № доступа 32084.

Штамм CHCC12797 *Lactobacillus fermentum* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 16.07.2015 г. под № доступа 32085.

Штамм CHCC14591 *Lactobacillus fermentum* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 16.07.2015 г. под № доступа 32086.

Штамм CHCC14588 *Lactobacillus fermentum* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 16.07.2015 г. под № доступа 32087.

Штамм CHCC15844 *Lactobacillus fermentum* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 16.07.2015 г. под № доступа 32088.

Штамм CHCC15865 *Lactobacillus fermentum* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 16.07.2015 г. под № доступа 32089.

Штамм CHCC15847 *Lactobacillus fermentum* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 16.07.2015 г. под № доступа 32090.

Штамм CHCC15848 *Lactobacillus fermentum* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 16.07.2015 г. под № доступа 32091.

Штамм CHCC15926 *Lactobacillus fermentum* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 22.07.2015 г. под № доступа 32096.

Штамм CHCC2008 *Lactobacillus fermentum* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 19.05.2009 г. под № доступа 22584.

Штамм CHCC15860 *Lactobacillus rhamnosus* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 16.07.2015 г. под № доступа 32092.

Штамм CHCC16948 *Penicillium solitum* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 16.07.2015 г. под № доступа 32093.

Штамм CHCC16935 *Penicillium brevicompactum* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig с депонированием 16.07.2015 г. под № доступа 32094.

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм бактерий вида *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15860, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур под номером доступа DSM32092, для получения ферментированного молочного продукта.

2. Композиция для получения ферментированного молочного продукта, содержащая штамм *Lactobacillus rhamnosus* по п.1.

3. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что дополнительно содержит штамм *Lactobacillus fermentum* DSM32086.

4. Композиция по п.2 или 3, отличающаяся тем, что дополнительно содержит по меньшей мере одно криопротекторное соединение.

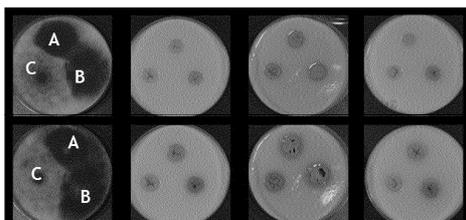
5. Композиция по любому из пп.2-4, отличающаяся тем, что представляет собой твердую замороженную или лиофилизированную заквасочную культуру, содержащую молочнокислые бактерии в концентрации по меньшей мере 10^9 КОЕ/г, или в концентрации по меньшей мере 10^{10} КОЕ/г, или в концентрации по меньшей мере 10^{11} КОЕ/г.

6. Способ получения ферментированного молочного продукта, включающий добавление штамма бактерий *Lactobacillus rhamnosus* по п.1 или композиции по любому из пп.2-5 в молоко или в молочный продукт и ферментирование указанной смеси при температуре от примерно 22°C до примерно 43°C до достижения pH 4,5-4,7.

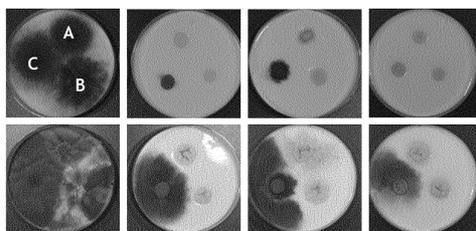
7. Ферментированный молочный продукт, полученный способом по п.6.

8. Пищевой или кормовой продукт, содержащий штамм бактерий вида *Lactobacillus rhamnosus* по п.1.

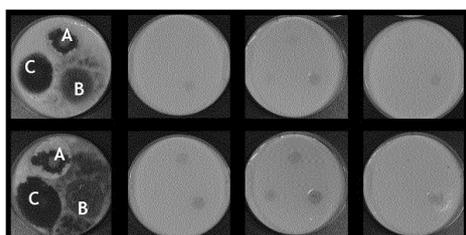
9. Применение штамма бактерий вида *Lactobacillus rhamnosus* по п.1 для получения пищевого или кормового продукта.



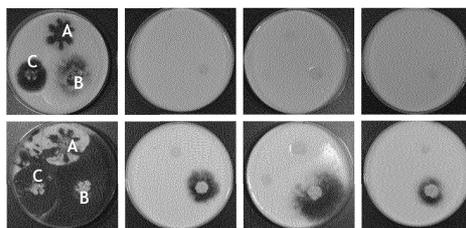
Фиг. 1



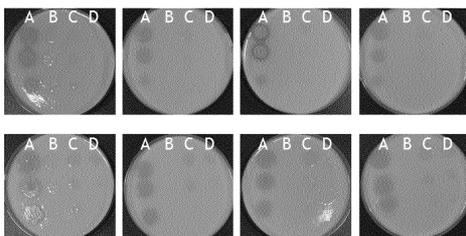
Фиг. 2



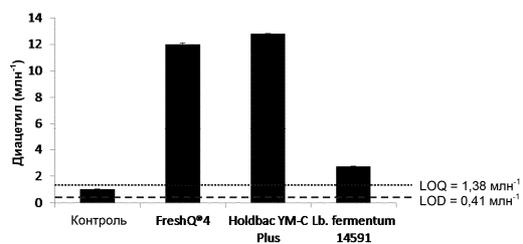
Фиг. 3



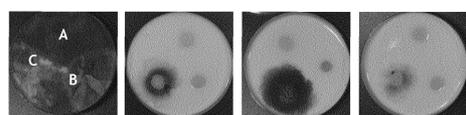
Фиг. 4



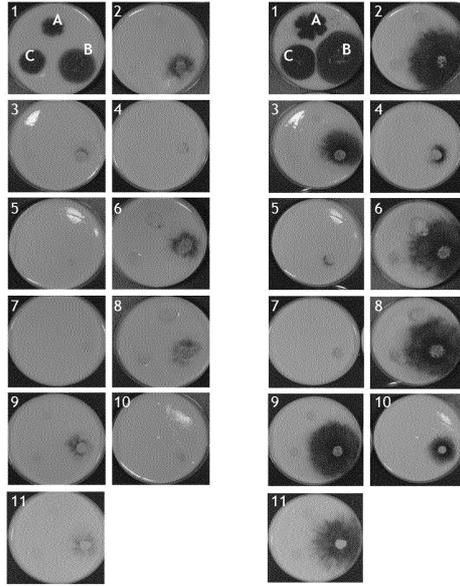
Фиг. 5



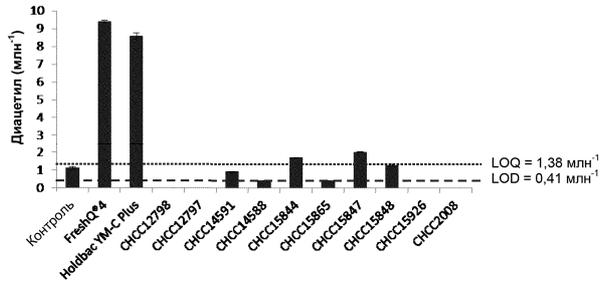
Фиг. 6



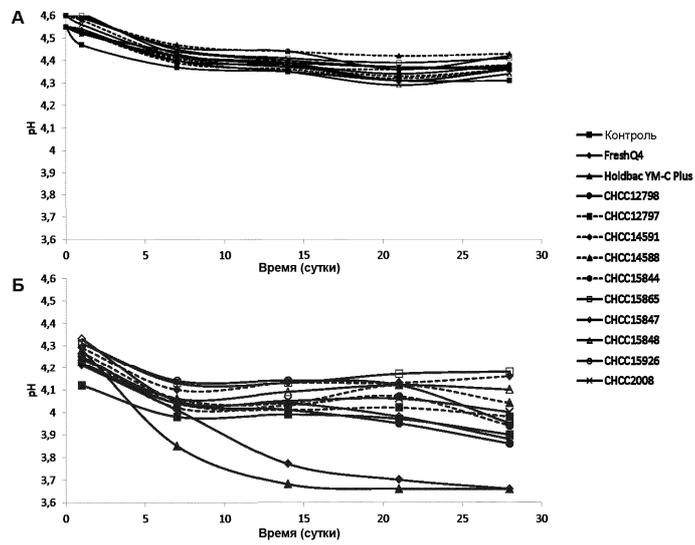
Фиг. 7



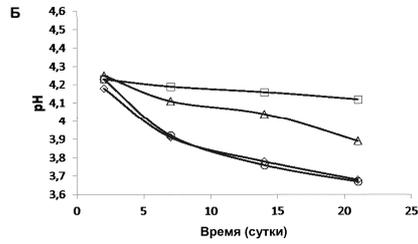
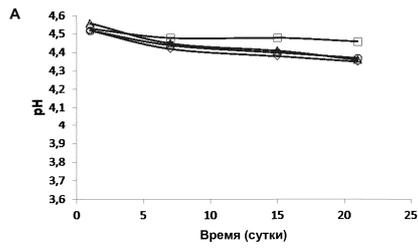
Фиг. 8



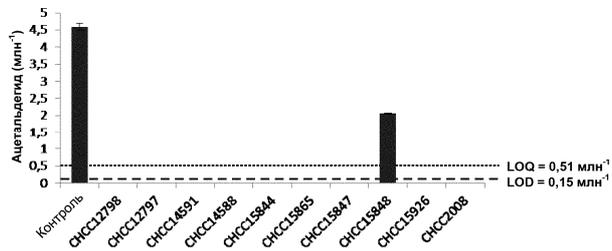
Фиг. 9



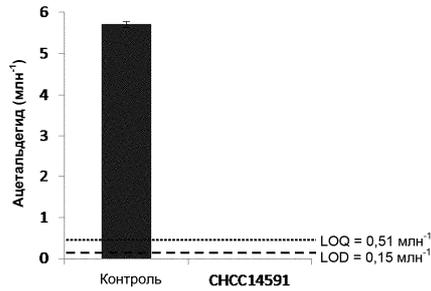
Фиг. 10



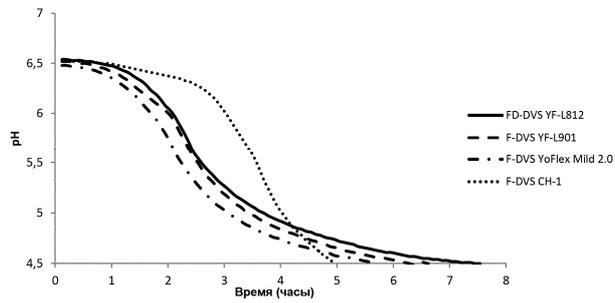
Фиг. 11



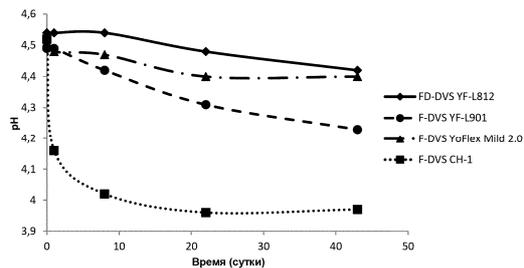
Фиг. 12



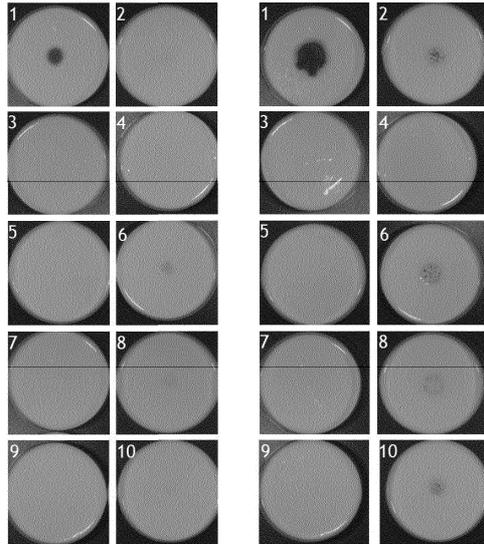
Фиг. 13



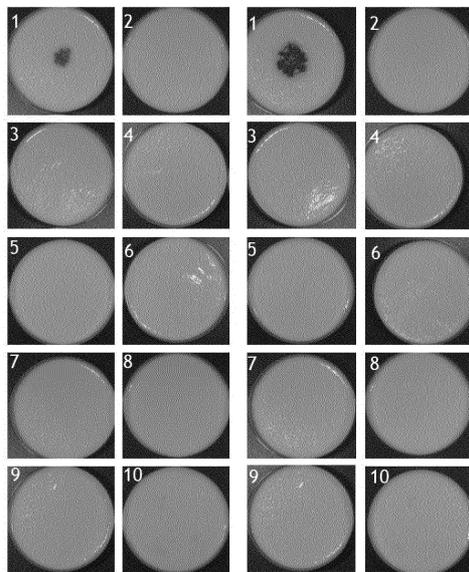
Фиг. 14



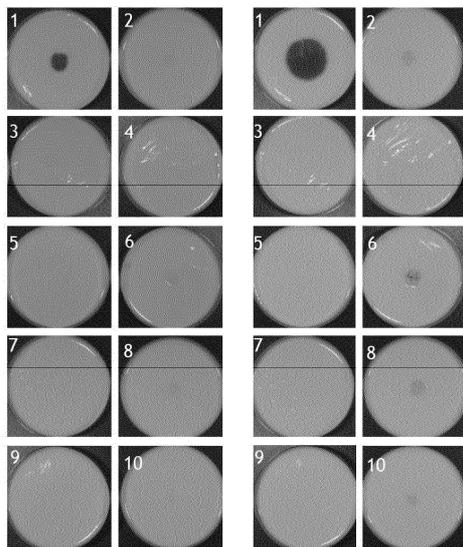
Фиг. 15



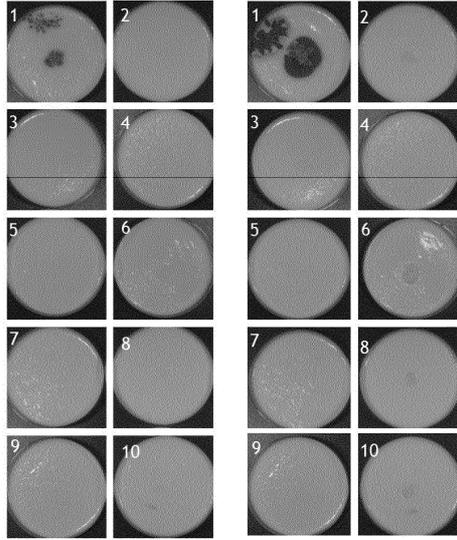
Фиг. 16



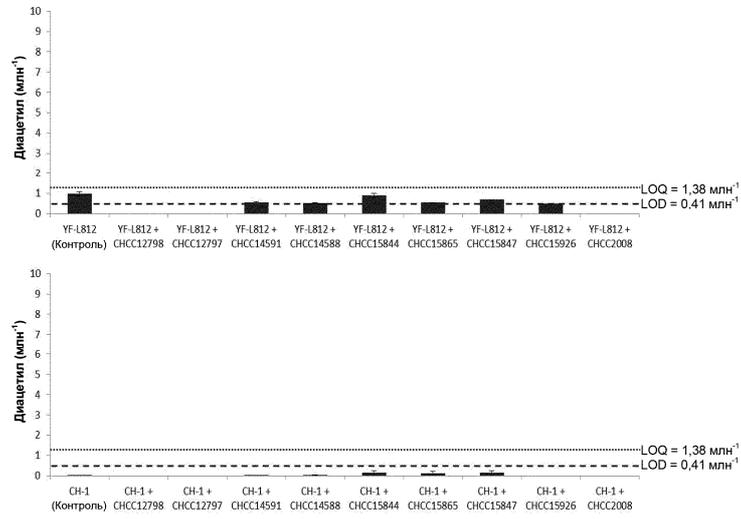
Фиг. 17



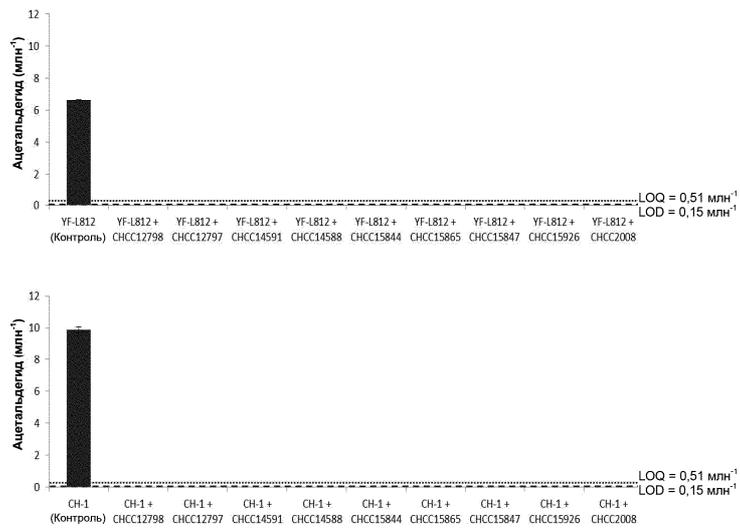
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

