

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092322 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.02

(22) Дата подачи заявки
2019.04.17

(51) Int. Cl. A23C 3/00 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
A23C 19/097 (2006.01)
A23L 3/00 (2006.01)
A23L 3/3571 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23C 9/146 (2006.01)
A23L 3/3508 (2006.01)
A23L 3/3517 (2006.01)

(54) ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТА ГРИБОВ ЗА СЧЕТ ИСТОЩЕНИЯ УРОВНЯ МАРГАНЦА

(31) 18168109.9
(32) 2018.04.19
(33) EP
(86) PCT/EP2019/059942
(87) WO 2019/202003 2019.10.24
(88) 2019.11.28
(71) Заявитель:
КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Сидлер Сольвей, Рау Мартин Хольм,
Нильсен Стин Динсинг Аунсбьерг
(DK)
(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложен способ контролирования роста нежелательных микроорганизмов путем ограничения их доступа к марганцу. Конкретней, в настоящем изобретении предложен способ подавления или задержки роста дрожжей и плесневых грибов путем уменьшения концентрации марганца в продукте, который предпочтительно представляет собой продукт питания. В изобретении также предложены агенты, поглощающие марганец, и их применения для подавления или задержки роста грибов.

A1

202092322

202092322

A1

PCT/EP2019/059942	МПК:	<i>A23C 3/00</i> (2006.01)	<i>A23C 9/123</i> (2006.01)
		<i>A23C 9/12</i> (2006.01)	<i>A23C 9/146</i> (2006.01)
		<i>A23C 19/097</i> (2006.01)	<i>A23L 3/3508</i> (2006.01)
		<i>A23L 3/00</i> (2006.01)	<i>A23L 3/3517</i> (2006.01)
			<i>A23L 3/3571</i> (2006.01)

ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТА ГРИБОВ ЗА СЧЕТ ИСТОЩЕНИЯ УРОВНЯ МАРГАНЦА

Область изобретения

Настоящее изобретение принадлежит к области микробиологии и относится к способам контроля грибковой порчи. Изобретение также относится к продуктам питания и способам их приготовления.

Предшествующий уровень техники

Основной проблемой в пищевой промышленности является порча нежелательными микроорганизмами. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО), каждая четвертая калория, предназначенная для потребления людьми, в конечном итоге не потребляется ими. В период нехватки продовольствия, когда более 800 миллионов человек страдают от голода, вопрос о пищевых отходах стал одним из приоритетных вопросов для глобальных представителей правительственных структур и производителей продовольствия. В дополнение к негативным социальным и экономическим последствиям для общества испорченное продовольствие также приводит к целому ряду связанных с этим экологических последствий, включая ненужные выбросы парниковых газов и неэффективное использование скудных ресурсов, таких как вода и земля.

Дрожжи и плесневые грибы очень важны, вызывая порчу продуктов, и являются проблемой для большинства производителей продуктов питания. Порча из-за дрожжей и плесневых грибов хорошо видна в виде пятен плесени или обесцвечивания на поверхности продукта питания, обеспечивая его изъятие до употребления. Дрожжи имеют тенденцию расти внутри пищевых и питьевых матриц в планктонной форме, и они демонстрируют тенденцию ферментировать сахара, и хорошо расти в анаэробных условиях. Наоборот, плесневые грибы демонстрируют тенденцию расти на поверхности продуктов в форме видимого мицелия, состоящего из клеток.

В частности, в молочном секторе ежегодно в Европе в отходы поступает 29 миллионов тонн молочной продукции. Одна из основных проблем в поддержании

свежести молочных продуктов заключается в борьбе с контаминацией дрожжами и плесневыми грибами, которые в природе присутствуют повсюду, особенно в случае нарушений холодовой цепи от производства до стола потребителя.

По экономическим и экологическим причинам существует постоянная потребность в новых или усовершенствованных способах, которые являются эффективными для контроля контаминации дрожжами и плесневыми грибами.

Краткое изложение сущности изобретения

Авторы настоящего изобретения попытались найти эффективные способы сдерживания грибковой контаминации и неожиданно идентифицировали марганец в качестве существенного ограничителя ее роста. В настоящем изобретении предложен новый способ ингибирования роста грибов путем ограничения свободного марганца, доступного для дрожжей или плесневых грибов. Настоящее изобретение частично основано на неожиданном открытии того, что путем уменьшения уровня свободного марганца в продукте питания, например путем удаления свободного марганца с использованием агентов, поглощающих марганец, контаминация дрожжами и/или плесневыми грибами может быть уменьшена или отсрочена. Кроме того, авторы изобретения показали, что обычные дрожжи и плесневые грибы чувствительны к описанным здесь способам.

Марганец считается жизненно важным для здоровья человека и, таким образом, незаменимым микроэлементом. Марганец незаменим для надлежащей жизнедеятельности как человека, так и животных, поскольку он необходим для функционирования многих клеточных ферментов, таких как супероксиддисмутаза марганца, пируваткарбоксилаза, и он может служить для активации множества других ферментов, таких как киназы, декарбоксилазы, трансферазы и гидролазы.

Марганец можно найти естественным образом во многих источниках продуктов питания, включая листовые овощи, орехи, злаки и продукты животного происхождения. Типичные диапазоны концентраций марганца в обычных продуктах питания составляют, например, $0,4\text{--}40\text{ млн}^{-1}$ в зерновых продуктах, $0,1\text{--}4\text{ млн}^{-1}$ в мясе, птице, рыбе и яйцах, $0,4\text{--}7\text{ млн}^{-1}$ в овощных продуктах.

Помимо пищевых добавок марганец иногда добавляют в ферментированные продукты в качестве активного ингредиента для увеличения роста бифидобактерий в молоке (смотри, например, WO2017/021754, Compagnie Gervais Danone, Франция). Тем не менее, авторы изобретения обнаружили, что это может иметь неблагоприятный эффект, и

было бы благоприятно ограничить концентрацию марганца в продуктах питания для предотвращения или задержки роста нежелательных микроорганизмов.

Для борьбы с проблемы микробной порчи в настоящем изобретении в первом аспекте предложен способ подавления или задержки роста гриба/грибов в продукте, включающий стадию уменьшения уровня свободного марганца, представленного в указанном продукте. Концентрация свободного марганца может быть уменьшена с использованием способов, описанных в данном изобретении. В предпочтительном воплощении для уменьшения уровня свободного марганца добавляют один или несколько агентов, поглощающих марганец. Концентрация свободного марганца предпочтительно уменьшается до уровня менее чем приблизительно $0,01 \text{ млн}^{-1}$, например менее чем приблизительно $0,008 \text{ млн}^{-1}$ или менее чем приблизительно $0,003 \text{ млн}^{-1}$. Используя этот способ, можно получить продукт, в котором нежелательные дрожжи и/или плесневые грибы вряд ли могут успешно произрастать. Этот продукт характеризуется концентрацией свободного марганца менее чем приблизительно $0,01 \text{ млн}^{-1}$, такой как $0,009 \text{ млн}^{-1}$, $0,008 \text{ млн}^{-1}$, $0,007 \text{ млн}^{-1}$, $0,006$, $0,005 \text{ млн}^{-1}$ или менее. Этот способ дополнительно включает стадию измерения концентрации свободного марганца в продукте и получения величины менее чем приблизительно $0,01 \text{ млн}^{-1}$.

В частности, в настоящем изобретении предложен способ подавления или задержки роста дрожжей и/или плесневых грибов в ферментированном пищевом продукте, приготовленном из молока, таком как йогурт или сыр. Способ характеризуется стадией уменьшения концентрации марганца в продукте питания для того, чтобы лишить дрожжи и/или плесневые грибы марганца и, таким образом, задержать или подавить их рост в продукте питания.

В одном из предпочтительных воплощений в настоящем изобретении предложен способ подавления или задержки роста *Torulaspora spp.*, *Cryptococcus spp.* и *Rhodotulola spp.* в продукте, включающий стадию уменьшения свободного марганца, представленного в указанном продукте.

Во втором аспекте в настоящем изобретении предложен способ приготовления продукта, такого как продукт питания, включающий уменьшение уровня свободного марганца, присутствующего в указанном продукте. Концентрация свободного марганца может быть уменьшена при помощи способов, описанных в данном изобретении, или при помощи других способов, известных специалистам в данной области техники. В предпочтительном воплощении один или более чем один агент, поглощающий марганец, добавляют для уменьшения уровня свободного марганца. Концентрация свободного

марганца предпочтительно уменьшается до уровня менее чем приблизительно $0,01 \text{ млн}^{-1}$, например менее чем приблизительно $0,005 \text{ млн}^{-1}$ или менее чем приблизительно $0,003 \text{ млн}^{-1}$. С использованием этого способа можно получить продукт, содержащий концентрацию свободного марганца менее чем приблизительно $0,01 \text{ млн}^{-1}$.

В третьем аспекте в настоящем изобретении предложены продукты, такие как продукты питания, полученные описанными здесь способами. В одном из воплощений настоящее изобретение относится к способу получения продукта, включающему стадии снижения содержания свободного марганца в продукте и получения продукта, в котором концентрация свободного марганца менее чем приблизительно $0,01 \text{ млн}^{-1}$.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложено применение одного или более чем одного агента, поглощающего марганец, для подавления или задержки роста грибов, а также для приготовления продуктов питания. Агенты, поглощающие марганец, оказывают действие, уменьшающее уровень свободного марганца, доступного в продукте для дрожжей и плесневых грибов, таким образом ингибируя или задерживая их рост.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предложены агенты, поглощающие марганец, их выбор и их применение для поглощения марганца.

Краткое описание графических материалов

Фиг.1 и 2 демонстрируют рост 2 различных *Debaryomyces hansenii* в химически определенной среде при pH 6,5 (открытые окружности) или 4,5 (черные квадраты) с различными концентрациями марганца. Рост измеряли после 6 суток инкубации при 17°C и определяли по поглощению при 600 нм.

Фиг.3 и 4 демонстрируют рост 2 различных *Debaryomyces hansenii* в водной фазе ферментированного молока в присутствии агентов, поглощающих марганец, и с добавлением различных концентраций марганца. Поглощение при 600 нм измеряли после 7 суток инкубации при 17°C . Рост после добавления марганца к водной фазе продемонстрирован на фиг. 3 для *Debaryomyces hansenii* (штамм 1) и фиг. 4 для *Debaryomyces hansenii* (штамм 2) (открытые окружности) по сравнению со случаем, когда не добавляют дополнительное количество марганца (квадрат). Представлено среднее значение и стандартное отклонение для технических повторений $n = 6$ (A) и $n = 3$ (B).

Фиг. 5 демонстрирует рост *Debaryomyces hansenii* (штамм 2) в ферментированном молоке, приготовленном с различными агентами, поглощающими марганец, и без них, после добавления различных концентраций марганца, находящихся в диапазоне от 6 млн^{-1} (верхний ряд) до $0,000006 \text{ млн}^{-1}$ (нижний ряд).

Фиг. 6 демонстрирует рост 3 различных видов дрожжей на планшетах, приготовленных с использованием молока, ферментированного только с заквасочной культурой (контроль, верхний ряд) или вместе с агентом, поглощающим марганец (нижний ряд). Добавляли различные концентрации марганца, как представлено выше на графических материалах. Три целевых загрязнителя (столбец А: *Debaryomyces hansenii* (штамм 2), столбец В: *Cryptococcus fragicola*, столбец С: *Debaryomyces hansenii* (штамм 1) добавляли в трех различных концентрациях: 1×10^3 КОЕ/пятно (верхний ряд на планшете), 1×10^2 КОЕ/пятно (средний ряд на планшете) и 1×10^1 КОЕ/пятно (нижний ряд на планшете).

Фиг.7 демонстрирует рост 3 различных видов плесневых грибов в планшетах, приготовленных с использованием молока, ферментированного только с заквасочной культурой (контроль, верхний ряд) или вместе с агентом, поглощающим марганец (нижний ряд). Добавляли различные концентрации марганца, как показано выше на графических материалах. Три целевых загрязнителя (А: *Penicillium brevicompactum*, В: *Penicillium crustosum* и С: *Penicillium solitum*) добавляли в концентрациях 500 спор/пятно. Планшеты инкубировали при $7 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 25 суток.

Фиг. 8 показывает рост 3 различных видов плесневых грибов на планшетах, приготовленных с использованием молока, ферментированного только с заквасочной культурой (контроль, верхний ряд) или вместе с агентом, поглощающим марганец (нижний ряд). Добавляли различные концентрации марганца, как показано выше на графических материалах. Три целевых загрязнителя (А: *Penicillium brevicompactum*, В: *Penicillium crustosum* и С: *Penicillium solitum*) добавляли в концентрациях 500 спор/пятно. Планшеты инкубировали при $22 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 8 суток.

Фиг. 9 показывает рост 3 различных видов плесневых грибов в планшетах, приготовленных с использованием молока, ферментированного только с заквасочной культурой (контроль, верхний ряд) или вместе с агентом, поглощающим марганец (нижний ряд). Далее добавляли различные концентрации марганца, как показано выше. Три целевых загрязнителя (А: *Penicillium carneum*, В: *Penicillium paneum* и С: *Penicillium roqueforti*) добавляли в концентрациях 500 спор/пятно. Планшеты инкубировали при $7 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 25 суток.

Фиг.10 демонстрирует рост 3 различных штаммов плесневых грибов на планшетах, приготовленных с молоком, ферментированным только с заквасочной культурой (контроль, верхний ряд) или дополнительно с агентом, поглощающим марганец (нижний ряд). Дополнительно добавляли различные концентрации марганца, как представлено

выше. Три целевых загрязнителя (А: *Penicillium carneum*, В: *Penicillium paneum* и С: *Penicillium roqueforti*) добавляли в концентрациях 500 спор/пятно. Планшеты инкубировали при $22 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 8 суток.

Фиг.11 демонстрирует пример филогенетического дерева переносчиков марганца MntH выбранных видов *Lactobacillus*.

На фигуре 12 представлен рост штамма *Debaryomyces hansenii* (штамм 1 или штамм 2) в водной фазе, профильтрованной через фильтр 1,2 мкм (водная фильтрация), предпочтительно с использованием водной фазы ферментированного молока, с различными концентрациями EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), с другими агентами, поглощающими марганец, и без них, предпочтительно с 1 агентом, поглощающим марганец, и с 6 млн^{-1} марганца и без него. Поглощение при 600 нм измеряли после 7 суток инкубации при 17°C по сравнению с референсным образцом. Образцы анализировали в трех параллелях.

На фиг.13 представлен рост штамма *Debaryomyces hansenii* (штамм 1 или штамм 2) в водной фазе, профильтрованной через фильтр 0,2 мкм (водная стерильная фильтрация), предпочтительно с использованием водной фазы ферментированного молока с различными концентрациями EDTA, с другими агентами, поглощающими марганец, предпочтительно с 1 агентом, поглощающим марганец, и с 6 млн^{-1} марганца и без него. Поглощение при 600 нм измеряли после 7 суток инкубации при 17°C по сравнению с референсным образцом. Образцы анализировали в трех параллелях.

На фиг.14 представлен рост штамма *Debaryomyces hansenii* (штамм 1 или штамм 2) в йогурте с различными агентами, поглощающими марганец, и без них, такими как бактерии, предпочтительно молочнокислые бактерии, и/или химическое хелатирующее вещество, такое как ЭДТА, после добавления 6 млн^{-1} марганца. Концентрация ЭДТА находится в диапазоне от 14 мг/мл (верхний ряд), 7,10 мг/мл, 3,55 мг/мл, 1,78 мг/мл, 0,89 мг/мл, 0,44 мг/мл, 0,22 мг/мл до 0 мг/мл (нижний ряд).

Подробное описание изобретения

Потери продовольствия представляют собой основной причину беспокойства во всем мире - приблизительно одна треть всех продуктов питания, произведенных для потребления человеком, или утрачивается или портится. Причины этой массовой глобальной потери продовольствия разнообразны, но основную роль играет бактериальная порча, которая влияет на качество органолептических продуктов (аспект, консистенция, вкус и аромат). Поскольку грибы могут расти в различных и даже суровых условиях окружающей среды, они представляют собой основные микроорганизмы,

вызывающие порчу, обнаруживаемые на всех стадиях цепи пищевого процесса. Поэтому крайне важно сократить утраты продуктов питания путем контроля грибковой контаминации.

В ответ на эту потребность в настоящем изобретении предложен новый способ подавления или задержки роста грибов в продукте. Этот способ основан на неожиданном обнаружении того, что низкие концентрации свободного марганца могут служить ограничивающим фактором для роста дрожжей и/или плесневых грибов. Марганец присутствует в следовых количествах в природе и многих наших товарах широкого потребления. Тем не менее, до сих пор не было никаких сообщений, свидетельствующих о том, что, путем манипуляции концентрацией свободного марганца, можно эффективно управлять бактериальной порчей. На основании этого неожиданного открытия предполагается, что такая стратегия предотвращения порчи применима даже за пределами продуктов питания и распространяется на другие продукты, которые обычно подвержены микробному загрязнению, такие как кормовые продукты, биологические продукты, продукты медицинского назначения, фармацевтические продукты и т.п.

В первом аспекте настоящего изобретения предложен способ подавления или задержки роста грибов в продукте, включающий уменьшение уровня свободного марганца в указанном продукте до концентрации менее чем приблизительно $0,01 \text{ млн}^{-1}$.

В общем, ингибирование означает уменьшение, частичное или полное, функции и активности клеток или микроорганизмов. Используемые здесь термины «подавлять» и «подавление» в отношении дрожжей и плесневых грибов означают, что рост, количество или концентрация дрожжей и плесневых грибов являются одинаковыми или уменьшены. Последнее может быть измерено при помощи любых способов, известных в области микробиологии. Подавление может наблюдаться путем сравнения грибкового роста, количества или концентрации в/на продукте с пониженным содержанием свободного марганца с контролем. Контроль может представлять собой тот же самый продукт, но без уменьшения свободного марганца.

Термин «замедление» в общем означает акт остановки, отсрочки, препятствования или побуждения к тому, чтобы что-то происходило медленнее, чем обычно. Используемый здесь термин «замедление роста грибов» относится к отсрочке роста грибов. Это можно наблюдать, сравнивая время, необходимое для роста грибов до заданного уровня в двух продуктах, один из которых с уменьшенным содержанием марганца, а другой без (но в остальном такой же).

В некоторых воплощениях «задержка роста грибов» относится к задержке роста на 7 суток, такой как 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 суток.

Гриб представляет собой член царства грибов. Грибковый рост может быть измерен при помощи различных способов, известных специалисту в данной области техники. Например, грибковый рост может быть измерен по плотности или размеру колонии, количеству клеток, изменениям мицелиальной массы, продукции спор, росту гиф, колониеобразующим единицам (КОЕ) и т.п. в зависимости от типа гриба и продукта, в отношении которого применяется способ. Грибковый рост можно также наблюдать путем измерения изменения концентраций питательных веществ или метаболитов, таких как выделение диоксида углерода и поглощение кислорода. Термины «подавление грибкового роста» или «подавление роста грибов» относятся к подавлению пролиферации клетки гриба. Термины «задержка грибкового роста» или «задержка роста грибов» относятся к замедлению пролиферации клетки гриба. Последнее можно наблюдать, например, путем измерения роста гриба и сравнение его с контролем. Такой контроль может представлять собой, например, продукт без применения агентов, поглощающих марганец. Способы определения подавления или задержки грибкового роста известны специалистам в данной области.

«Свободный марганец» или иногда «марганец» в соответствии с настоящим изобретением относится к марганцу, который присутствует в продукте (т.е. образует часть продукта, например внутри продукта или на поверхности продукта), который может быть поглощен грибами, включая дрожжи и плесневые грибы. Например, свободный марганец относится к марганцу, который присутствует в пищевой матрице продукта.

В одном из предпочтительных воплощений настоящее изобретение относится к способу подавления или задержки роста грибов в продукте питания, включающему уменьшение концентрации свободного марганца в пищевой матрице продукта питания. Используемый здесь термин «матрица пищевого продукта» относится к составу и структуре продукта питания. Он основан на концепции того, что питательные вещества заключены в непрерывной среде.

Термин «уменьшить» или «уменьшение» обычно означает уменьшение количества вещества в данном контексте. Используемый здесь термин «для уменьшения содержания свободного марганца» или «уменьшение содержания свободного марганца» означает уменьшение количества марганца, присутствующего в продукте, который может быть доступен для поглощения грибами, включая дрожжи и плесневые грибы.

Например, последнее может быть осуществлено путем удаления марганца, присутствующего в продукте или в материале, который должен стать частью продукта. Например, последнее может быть осуществлено путем того, что исходное вещество подвергают ионообменной хроматографии для удаления марганца таким образом, что концентрация в конечном продукте уменьшается.

Получив доступ, грибы быстро колонизируют, увеличивают численность и поглощают питательные вещества из своего ближайшего окружения. В некоторых воплощениях, учитывая то, что грибы могут сначала войти в контакт с продуктом на поверхности, в сущности настоящего изобретения стадию уменьшения осуществляют с частями продукта, например на внешней части продукта, такой как покрытие или внешний слой. Тем не менее, в таких случаях стадия уменьшения приводит к общему уменьшению концентрации в продукте.

Используемые здесь концентрация марганца или уровень марганца выражены в миллионных долях («млн⁻¹»), рассчитанных на основе масса/масса. Уменьшение уровня свободного марганца в продукте до концентрации меньше заданной величины означает уменьшение уровня свободного марганца в продукте или его частях таким образом, что концентрация свободного марганца во всем продукте по массе уменьшается. Способы определения микроэлементов, таких как марганец, известны в данной области техники и описаны, например, в Nielsen, S. Suzanne, ed. *Food analysis*. Vol. 86. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, 1998.

При применении способов в соответствии с настоящим изобретением специалист в данной области может сначала определить уровень марганца, который присутствует в продуктах, подлежащих обработке. Концентрация марганца для продуктов питания хорошо изучена и может быть найдена в национальных базах данных о составе продуктов питания, таких как Датская база данных о составе продуктов питания, Канадская база данных питательных веществ. Как правило, марганец представлен в концентрации по меньшей мере 0,03 млн⁻¹ для молока, что делает молочные продукты чувствительными к грибковой контаминации. Сообщалось о том, что уровни марганца составляют от 0,04 до 0,1 млн⁻¹ в коровьем молоке и до 0,18 млн⁻¹ в козьем или овечьем молоке (Muehlhoff et al., *Milk and dairy products in human nutrition*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2013). В отношении кисломолочных продуктов, таких как сыр, уровень марганца обычно увеличивается за счет процесса концентрирования из молока, часто до 10-ти раз и более. О различных уровнях сообщалось для различных типов сыров, например приблизительно 0,06 млн⁻¹ для сыра рикотта, 0,11 млн⁻¹ для сливочного сыра,

0,34 млн⁻¹ для бри, 0,3 млн⁻¹ для моцареллы, 0,7 млн⁻¹ для домашнего сыра, 0,68 млн⁻¹ для гауды и 0,74 млн⁻¹ для сыра чеддер (Smit, L. E., et al. *The nutritional content of South African cheeses*. ARC-Animal Improvement Institute, 1998; Gebhardt, Susan, et al. "USDA national nutrient database for standard reference, release 12." *United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service*, 1998).

Свободный марганец в продукте предпочтительно уменьшают до концентрации менее чем приблизительно 0,01 млн⁻¹, такой как менее чем приблизительно 0,009 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,008 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,007 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,006 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,005 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,004 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,003 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,002 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,001 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,0009 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,0008 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,0007 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,0006 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,0005 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,0004 млн⁻¹, менее чем приблизительно 0,0003 млн⁻¹ или менее.

Используемый здесь термин «приблизительно» указывает на то, что значения незначительно выходят за пределы цитируемых значений, то есть плюс или минус от 0,1% до 10%. Таким образом, концентрации, незначительно выходящие за указанные пределы, также охвачены в объеме настоящего изобретения.

В одном из воплощений в настоящем изобретении предложен способ подавления или задержки роста грибов в продукте, предпочтительно продукте питания, включающий стадии:

- уменьшения содержания свободного марганца в продукте, и
- получения продукта, в котором концентрация свободного марганца составляет менее чем приблизительно 0,01 млн⁻¹ в продукте.

Способ в соответствии с настоящим изобретением дополнительно включает стадию измерения концентрации свободного марганца. Последнее может быть осуществлено после стадии уменьшения, чтобы определить, уменьшена ли концентрация свободного марганца. В одном из воплощений в настоящем изобретении предложен способ подавления или задержки роста грибов в продукте питания, включающий уменьшение содержания уровня свободного марганца в продукте до концентрации менее чем приблизительно 0,01 млн⁻¹ в продукте и измерение содержания свободного марганца в продукте и, возможно, достижение значения менее 0,01 млн⁻¹.

В одном из воплощений в настоящем изобретении предложен способ подавления или задержки роста грибов в продукте, включающий стадии:

- уменьшения содержания свободного марганца в продукте до концентрации менее чем приблизительно $0,01 \text{ млн}^{-1}$ в продукте,
- измерения концентрации свободного марганца в продукте и достижения величины менее $0,01 \text{ млн}^{-1}$.

Способы измерения уровня марганца в низкой концентрации хорошо известны специалистам в данной области техники. Такие способы включают атомно-абсорбционную спектроскопию, атомно-эмиссионную спектроскопию, масс-спектрометрию, нейтронно-активационный анализ и рентгеновскую флуориметрию (смотри, например Williams et al. "*Toxicological profile for manganese*." (2012)).

Предпочтительно, концентрацию марганца измеряют в соответствии со стандартным способом, как описано в "*Foodstuffs - Determination of trace elements - Pressure digestion*" в Европейском стандарте EN13805:2014, опубликованном Европейским комитетом по стандартизации, или как описано в "*Water quality - Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)*" в ISO 11885:2007, опубликованном Международной организацией по стандартизации.

Гриб

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что рост как дрожжей, так и плесневых грибов может быть подавлен за счет истощения уровня марганца. В одном из предпочтительных воплощений в настоящем изобретении предложен способ подавления или задержки роста дрожжей в продукте, предпочтительно продукте питания, включающий стадию уменьшения уровня свободного марганца в продукте. В еще одном предпочтительном воплощении в настоящем изобретении предложен способ подавления или задержки роста плесневых грибов в продукте, предпочтительно продукте питания, включающий стадию уменьшения уровня свободного марганца в продукте.

В одном из воплощений этот способ используют для подавления роста дрожжей, таких как *Candida* spp., *Meyerozyma* spp., *Kluyveromyces* spp., *Pichia* spp., *Galactomyces* spp., *Trichosporon* spp., *Sporidiobolus* spp., *Torulaspora* spp., *Cryptococcus* spp., *Sacharomyces* spp., *Yarrowia* spp., *Debaryomyces* spp., и *Rhodotulola* spp. Предпочтительно, гриб представляет собой дрожжи, выбранные из группы, состоящей из *Torulaspora* spp., *Cryptococcus* spp., *Sacharomyces* spp., *Yarrowia* spp., *Debaryomyces* spp., *Candida* spp. и *Rhodotulola* spp. Более предпочтительно, гриб представляет собой дрожжи, выбранные из

группы, состоящей из *Torulaspora delbrueckii*, *Cryptococcus fragicola*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* и *Rhodotulola mucilaginosa*.

В одном из воплощений этот способ используют для подавления роста плесневых грибов. Предпочтительно, гриб представляет собой плесневый гриб, выбранный из группы, состоящей из *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Didymella* spp. или *Penicillium* spp. Предпочтительней, гриб представляет собой плесневый гриб, выбранный из группы, состоящей из *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium solitum*, *Penicillium carneum*, *Penicillium paneum* и *Penicillium roqueforti*.

Удаление марганца

Способы удаления марганца известны в области техники. Марганец является обычным загрязнителем во многих шахтных водах, грунтовых водах и пресных водах. При очистке сточных вод ионы марганца могут быть химически удалены из сточных вод путем окисления до MnO_2 , адсорбции или осаждения в виде карбоната.

Альтернативно, удаление марганца может включать биологические процессы в качестве альтернатив химическим путям. Роль микробной активности в очистке загрязненных марганцем вод описана в различных источниках, например Burger et al. Manganese removal during bench-scale biofiltration. *Water Research*. 2008;42(19):4733–4742; Johnson et al. Rapid manganese removal from mine waters using an aerated packed-bed bioreactor. *Journal of Environmental Quality*. 2005;34(3):987–993; Tekerlekopoulou et al. "Removal of ammonium, iron and manganese from potable water in biofiltration units: a review." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 88.5 (2013): 751-773; Patil et al. "A review of technologies for manganese removal from wastewaters." *Journal of Environmental Chemical Engineering* 4.1 (2016): 468-487. В одном из воплощений стадия уменьшения уровня свободного марганца в продукте включает использование ионообменной хроматографии. Последнее особенно применимо в том случае, если продукт находится в жидкости или по существу является жидким.

В одном из предпочтительных воплощений стадию уменьшения уровня свободного марганца в продукте осуществляют путем добавления агента, поглощающего марганец. Используемые здесь термины «агент, поглощающий марганец» или «поглотитель марганца» относятся к материалу, который способен сделать марганец не доступным для дрожжей или плесневых грибов. Материал может представлять собой химическое вещество, такое как химическое хелатообразующее вещество, выбранное из группы, состоящей из этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), этиленгликоль-бис-(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (EGTA),

диаминоциклогексантауксусной кислоты (DCTA), нитрилотриуксусной кислоты (NTA), 1,2-бис-(о-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (BAPTA) или диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA), предпочтительно химическое хелатообразующее вещество представляет собой этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA). Материал также может представлять собой биологический материал, такой как бактерии.

В одном из предпочтительных воплощений агент, поглощающий марганец, представляет собой один или более чем один бактериальный штамм. В таких случаях следует отметить, что при измерении свободного марганца такой свободный марганец не включает марганец, который обнаруживается внутриклеточно. Скорее, свободный марганец относится к марганцу, который обнаруживается внеклеточно, то есть в свободных от клеток частях продукта, поскольку они могут быть доступны для поглощения грибами. Таким образом, в таких случаях концентрацию свободного марганца следует измерять, принимая во внимание только внеклеточный марганец. Последнее может быть осуществлено, например, путем удаления клеток (таких как затравочные культуры) путем центрифугирования и получением бесклеточного супернатанта с последующим измерением марганца в бесклеточном супернатанте. Используемый здесь термин «бактериальный штамм» имеет общее значение в области микробиологии и относится к генетическому варианту бактерии.

В одном из воплощений в настоящем изобретении предложен способ подавления или задержки роста грибов в продукте, включающий стадии:

- выбора одного или более чем одного бактериального штамма в качестве агента, поглощающего марганец, и
- уменьшения уровня свободного марганца в продукте до концентрации ниже приблизительно $0,03 \text{ млн}^{-1}$ в продукте путем добавления агента, поглощающего марганец.

В соответствии с предпочтительными воплощениями настоящего изобретения способ включает выбор бактериального штамма, обладающего активностями поглощения марганца, в качестве агента, поглощающего марганец. Выбор основан на том, имеет ли бактериальный штамм системы транспортирования марганца.

Марганец вовлечен во множество важных биологических процессов и повсеместно встречается во всех организмах. Марганец также вносит вклад в защиту от окислительного стресса, а также может вносить вклад в каталитическую детоксикацию активных форм кислорода. Многие бактерии разработали сложную систему сбора для захвата незаменимых металлов из окружающей среды, используя системы переноса с

низкой и высокой аффинностью для хелатированных или свободных металлов. Марганец, который поглощается бактериями, образует большой комплекс недифференцирующихся полифосфат-белковых агрегатов в белке, которые могут достигать очень высоких внутриклеточных концентраций.

Системы переноса для марганца были изучены и описаны, например, в Kehres et al., "Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria." *FEMS microbiology reviews* 27.2-3 (2003): 263-290.

В одном из воплощений бактериальный штамм, обладающий активностями поглощения марганца, включает переносчики бактериального Mn^{2+} . Переносчики Mn^{2+} могут представлять собой ABC-переносчик (например SitABCD и YfeABCD) или протонозависимая связанная с Nramp транспортная система, принадлежащая семейству, обозначенному как TC#3.A.1.15 и TC#2.A.55 в системе классификации переносчиков, заданной базой данных классификации переносчиков (M. Saier; U of CA, San Diego, Saier MN, Reddy VS, Tamang DG, Vastermark A. (2014)). Система TC представляет собой систему классификации для белков переносчиков, которая аналогична системе Комиссии по ферментам (EC) для классификации ферментов. Система классификации переносчиков (TC) является утвержденной системой номенклатуры для классификации белков переносчиков Международным союзом биохимии и молекулярной биологии. TCDB свободно доступен в <http://www.tcdb.org>, на котором предлагается несколько различных способов доступа к данным, включая пошаговый доступ к иерархической классификации, прямой поиск по последовательности или номеру TC и полнотекстовый поиск.

В одном из воплощений способ включает выбор бактериального штамма, содержащего белок, относящийся к семейству, обозначенному как TC#3.A.1.15 (семейство переносчиков, захватывающих хелат марганца (MZT)), в качестве агента, поглощающего марганец.

Например, агент, поглощающий марганец, представляет собой бактериальный штамм, содержащий переносчик, захватывающий хелат марганца, обозначенный как TC#3.A.1.15.2, TC#3.A.1.15.6, TC#3.A.1.15.8, TC#3.A.1.15.14, или его функциональные варианты.

Хотя ABC-переносчик в основном активен при более высоком pH, переносчики, действующие за счёт протонов, могут быть более активными в кислых условиях. Последнее делает их особенно полезными в качестве агентов, поглощающих марганец, в ферментированных пищевых продуктах. Таким образом, в одном из воплощений выбран

бактериальный штамм, содержащий белок, относящийся к семейству, обозначенному как ТС#2.А.55 (семейство переносчиков ионов металлов (Mn^{2+} -железо) (Nramp)).

Стадия выбора одного или более чем одного бактериального штамма в качестве агента, поглощающего марганец, включает определение того, содержит ли один или более чем один бактериальный штамм переносчик марганца, обозначенный как ТС#2.А.55, или его функциональные варианты.

Более предпочтительно, переносчик относится к подсемейству, обозначенному как ТС#2.А.55.2, или подсемейству, обозначенному как ТС#2.А.55.3, в качестве агента, поглощающего марганец.

Например, агент, поглощающий марганец, представляет собой бактериальный штамм, содержащий переносчик ионов металлов (Mn^{2+} -железо) (Nramp), обозначенный как ТС#2.А.55.3.1, ТС#2.А.55.3.2, ТС#2.А.55.3.2, ТС#2.А.55.3.3, ТС#2.А.55.3.4, ТС#2.А.55.3.5, ТС#2.А.55.3.6, ТС#2.А.55.3.7, ТС#2.А.55.3.8 или ТС#2.А.55.3.9, или его функциональные варианты в качестве агента, поглощающего марганец.

Наиболее предпочтительно, способ включает выбор бактериального штамма, содержащего белок, обозначенный как ТС#2.А.55.2.6, или его функциональные варианты в качестве агента, поглощающего марганец.

Предпочтительно, агент, поглощающий марганец, выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus. reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus alimentarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus kefir*.

Термин «функциональный вариант» представляет собой белковый вариант, обладающий по существу похожей биологической активностью, т.е. активностями поглощения марганца.

Используемый здесь термин «вариант» относится к варианту формы белка, обладающему по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с конкретной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью белка.

В изобретении дополнительно предложены полипептидные последовательности переносчиков марганца для выбора подходящих агентов, поглощающих марганец, для реализации настоящего изобретения.

В одном из предпочтительных воплощений агент, поглощающий марганец, представляет собой бактериальный штамм, содержащий полипептид, имеющий последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1 (MASEDKKSKREHIIHFEDTPSKSLDEVNGSVEVPHNAGFWKTLAAYTGPGILVAVGYM DPGNWITSIAGGASFKYSLLSVILISLIAMLLQAMAARLGIVTGRDLAQMTRDHTSKAM GGFLWVITELAIMATDIAEII GSAIALKLLFNMP LIVGIIIT TADVLILL LLMRLGFRKIEAV VATLV LVILL VFAYEVILAQPNVPELLKGYLPHADIVTNKSM LYL S LGIVGATVMPHDLF LGSSISQTRKIDRTKHEEVKKA IKFSTIDSNLQLTMAFIVNSLLLILGAALFFGTSSSVGRF VDLFNALSNSQIVGAIASPMLSMLFAVALLASGQSSTITGTLAQIIMEGFIHLKMPLWA QRL LTRLMSVTPVLIFAIYYHGNEAKIENLLTFSQVFLSIALPFAVIPLVLYTSDKKIMGEF ANRAWVKWTAWFISGVLII LNLYLIAQTLGFVK) или его функциональные варианты.

В других предпочтительных воплощениях агент, поглощающий марганец, представляет собой бактериальный штамм, содержащий полипептид, обладающий по меньшей мере 55% идентичностью последовательности, такой как по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 1.

В таблице 1 представлены примеры последовательностей, которые кодируют функциональные варианты SEQ ID NO: 1, и идентичность их последовательностей с SEQ ID NO: 1.

Таблица 1

Происхождение	SEQ ID NO	ID белка	% идентичности	Последовательность
<i>Lactobacillus casei</i>	4	WP_013245308.1	99,8	MASEDKKSKREHIIHFEDTPSKSLDEVNGSVEVPHNAGFWKTLAAYTVPGILVAVGYMDPGNWITSIAGGASFKYSLLSVILISLIAMLLQAMAARLGIVTGRDLAQMTRDHTSKAMGGFLWVITELAIMATDIAEII GSAIALKLLFNMP LIVGIIIT TADVLILL LLMRLGFRKIEAVVATLV LVILL VFAYEVILAQPNVPELLKGYLPHADIVTNKSM LYL S LGIVGATVMPHDLFLGSSISQTRKIDRTKHEEVKKA IKFSTIDSNLQLTMAFIVN

				SLLLILGAALFFGTSSSVGRFVDLFNALS NSQIVGAIASPMLSMLFAVALLASGQSS TITGTLAGQIIMEGFIHLKMPLWAQRLL TRLMSTPVLIFAIYYHGNEAKIENLLTF SQVFLSIALPFAVIPLVLYTSDKKIMGEF ANRAWVKWTAWFISGVLIILNLYLIAQT LGFVK
<i>Lactobacillus brevis</i>	5	WP_011667 125.1	76,5	MKNHETDTKTKHHMIESTGSGQKSLDE VNGTVEVPQNAGFWRTLMA YTGPGALI AVGYMDPGNWITSIAGGAQYKYTLLTV VLLSSLVAMLLQAMSARLGIVTGKDLA QLTREHTGKRTGFALWIITELAIMATDI AEIIGSAIALKLLFGFPLIVGIITAMDVL VLLVLMKLGFRKIEAIVATLVAVILFVF LYEVILAQPHMGEVLKGYLPSSTVVTN HGMLYLSLGIVGATVMPHDLYLGSSISQ TRSFDRKNRKSVAQAIKFTTIDSNIQLTL AFVVNSLLLILGAALFFGTNSDLGRFVD LFNALSDSQIVGAIASPMLSMLFALALL SSGQSSTITGTLAGQIIMEGFINLKMPLW AQRLITRLLSVTPVIIFAIYYHGNEAKIED LLTFSQVFLSIALPFAMIPLVIFTSSKKLM GEFANRTWSKILGWIIAVILIILNIYLILN TLHIVQ
<i>Pediococcus acidilactici</i>	6	WP_070366 435.1	76,4	MSKKLDEV DNKSLDEINGSIKVPKNAG FFKTLMAYTGPGILIAVGYMDPGNWITS IAGGAQFKYTLLSVVLISSLIAMLLQAM SARLGIVTGKDLAQLTRERTSKRVGFM LWVVAELAIMATDIAEIIGSGIALELLFH IPLIIGILITAADVLIILLLLMLRGLFRKIEAI VATLVMVILIVFAYEVFLSDPSISGIKKG YVPAPVILQNNSMLYLSLGIVGATVMP

				HDLYLGSSISQTREIDRRDRKNVAQAIR FSTIDSNMQLFLAFIVNSLLLILGAALFY GTDSSLGRFVDLFDNALSDNQIVGAIASP MLSMLFAVALLASGQSSTITGTLSGQII MEGFIRLRVPLWVQRLVTRLLSVAPVLI FAIYYHGDEAKIENLLTFSQVFLSVALPF AVIPLVMYTSSKKLMGEFANRQWVKW CAWIATILILLNIYLILQTLGIVK
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7	YP_0048883 16.1	74,3	MKSAKTKDHAKMKA AEEKAIHSTGAD SKSLDEVNGSVRVPKDASFWRTLIAYT GPGALVAVGYMDPGNWITSIAGGSQYK YALLSVILLSSLIAMLLQAMAARLGIVT GKDLAQLTRERTSKGMGIFLWIITELAI MATDVAEIIGSGIALKLLFGFPLIVGILIT TADVLILLLLMKLGFRKIEAIVATLVAVI LFVFLYEVIISQPNIPMLKGYVPTSRIVS NRSMLFLALGIVGATVMPHNLYLGSSIS QTRQVDRSDEKEVAKAVKFTTIDSNIQL SVAFVVNSLLLILGAALFFGTKGDLGRF VDLYNALGDSKVVGSIASPLLSMLFAIA LLSSGQSSTITGTLSGQIIMEGFIRLKMPL WAQRLLTRLISVTPVLAFIYYHGNIAK IEDLLTMSQVFLSIALPFAMIPLVMFTSN RALMGNFTNRVWVKWTAWIVTVILIL NIYLILQTVGLVK
<i>Lactobacillus sakei</i>	8	WP_089535 161.1	67,9	MHYADGSSLEEINNTVAIPKNAGFWKT LMAFMGPGALVAVGYMDPGNWITSIA GGAQFAYTLISVILVSNLIAMLLQAMAA RLGIVTGMDLAQMTRAKTGKKMGIFL WIVTELAIMATDIAEIIGSAIALELIFNIPL LWGVLITAFDVLLLLLLMKLGFRKIEAI VATLVAVILFVFLYEVIQAQPNMGDVV

				RGFVSPRIMTDKKMLFLALGIVGATV MPHNLYLHSSIAQARQYDRDDVAEKRK AIKFTVIDSNIQLTIAFVVNCLLLILGAA MFYGTNSDLGRFVDLFNALQNKEIVGSI ASPMLSLLFAVALLASGQNSTITGTLSG QIVMEGFVRMKIPLWARRVITRGLSILP VIIFTVYYHGNEAQVENLLIYSQVFLSIA LPVSMIPLTLFTSDEKIMGPFVNRPWVK YTAWFVTIVLTLLNIYLILQTVGLAA
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	9	WP_057737 113.1	68,3	MSSKNKKHESLIHYANGPSLEEINDTVE IPKDAGFFKTLLAYSGPGALVAVGYMD PGNWVTSIAGGAQFKYKLLSVILISLIA MLLQYMSAKLGIVTGRDLAQLTRDRTS RVGGFILWIITELAIMATDIAEIIGSAIAL KLLFNIPVLWGVIIATFDVLLLLVLMKL GFRKIEAIVATLIMVILLVFLYEVIKAP DVGQMMVGFPEPKILQNSMLYLSLGI VGATVMPHNLYLHSSISQARKYDRDDP KSIHQAVRFSTWDSNIQLTLAFVVNTLL LLLGAALFYGTSSDLGRFVDLFNALQDP KVAGAVASPVLSILFAVALLASGQNSTI TGTLSGQIVMEGFHMKMKLWARRVIT RLMSIIPVITFAIIYHGNEAKIESLLTFSQ VFLSVALPFSIFPLIKFTSNKKLMGEFVN NKLVEYIGYFVAIVLTILNIWLIYTTTFVP TA
<i>Lactobacillus floricola</i>	10	WP_056974 015.1	65,1	MTKEETKLFHYADGPSLEEINGTVAVP KKGGFWKTLFAFSGPGALVAVGYMDP GNWVTSIAGGAQYQYTLLSVILISLIA MLLQAMSARLGIASGLDLAQATAKHSP KWLRYTLWIITELAIMATDIAEIVGAAIA LKLLFNLPLIVGIFLTTLDVMLLLLLMK

				LGFRKIEAIVGALIVSILVIFLYEVILARP DVGAMFAGYIPQPEVVTKGAFYIALGI VGATVMPHNLYLHSSIAQARQYDRNDI EEKKRAIKFTVLDSNIQLSVAFVVNTLL LLLGAALFYGAQTDLGTFSELYNALQN PQVAGVIASPILSVLFAVALLASGQNSTI TGTLSGQIVMEGFIHLKMPMWARRVIT RLISVIPVLIFAIYHSNEAKIEDLLVFSQ VFLSIALPVSIPLVMFTANKKIMGPFVN KKWVTITSSLVAIILTGLNIFLILQTLGW VQ
<i>Lactobacillus brevis</i>	11	WP_011667 396.1	57,6	MTDNVSAKSVQGDLTNGPSLAEINGSV RVPKEKGFVRNLLAFSGPGALVAVGYM DPGNWVTSIGGGAQYGYLLMSVILMSS LIAMLLQYMAAKLGIVTQMDLARATR AHTGKRIGAVLWVMTELAIMATDIAEV IGGAIALKLLFGVPLILGVSLTVLDVLLL LLLTRLGFRKIEAIVLCLILVILVVFAYE VVIAQPSMGQAVASFVPQAEIMRPGQL TMALGIVGATVMPHNLYLHSSIAQTRK FDRQDPAEMARAVKFTAWDSNIQLFGA FIINCLLLLGAAMFFGKDAGALGTFGQ LYDALQDNRLAGAVASPVLTSLFAVAL LASGQNSTITGTLTGQVIMEGFINMRLPI WVRRLVTRLISVAPVIIVTILYGGSEQAL DRLLVNSQVFLSIALPFSMIPLTIFTSSKR IMGTRWVNRWWVTALAWGCTAILTVL NIQIVWATMTTLF

В одном из предпочтительных воплощений агент, поглощающий марганец, представляет собой бактериальный штамм, содержащий полипептид, имеющий последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2 (MARPDRLTVQREKRSLLDINRSVQVPSVYESSFFQKFLAYSGPGALVAVGYMDPGN WLTALEGGSRHYALLSVLLMSILVAMFMQTLAIKLGVARLDLAQAIAAFIPNWSRIC

LWLINEAAMMATDMTG VVGTAIALKLLFGLPLMWGM LLLTIADV LVLLFLRFGIRRIEL
IVLVSILTVGIIFGIEVARADPSIGGIAGGFVPHTDILT NHGM LLLSLGIMGATIMPHNIYLH
SSLAQSRKYDEHIPAQVTEALRFGKWDSNVHLVAAFLINALLLILGAALFYGVGGHVTAF
QGAYNGLKNPMIVGGLASPLMSTLFAFALLITGLISSIASTLAGQIVMEGYLNIRMPLW
ERRLLTRLVTLIPIMVIGFMIGFSEHNFEQVIVYAQVSLSIALPFTLFPPLVALTNRRDLMGI
HVNSQLVRWVG YFLTGVITVLNIQLAISVFV) или его функциональные варианты.

В других предпочтительных воплощениях агент, поглощающий марганец, представляет собой бактериальный штамм, содержащий полипептид, обладающий по меньшей мере 55% идентичностью последовательности, такой как по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 2.

В таблице 2 представлены примеры последовательностей, которые кодируют функциональные варианты SEQ ID NO: 2, и идентичность их последовательностей с SEQ ID NO: 2.

Таблица 2

Происхождение	SEQ ID NO	ID белка	% идентичности	Последовательность
<i>Lactobacillus casei</i>	12	WP_012491767.1	99,3	MARPDERLTVQREKRS LDDINRSVQVP SVYESSFFQKFLAYSGPGALVAVGYM DPGNWLTALEGGSR YHYALLSVLLMSI LVAMFMQTLAIKLG VVARLDLAQAIA AFIPHWSRICLWLINEAAMMATDMTG VVGTAIALKLLFGLPLMWGM LLLTIADV LVLLFLRFGIRRV ELIVLVSILTVGIIFG IEVARADPSIGGIAGGFVPHTDILT NHG MLLLSLGIMGATIMPHNIYLHSSLAQSR KYDEHIPAQVTEALRFGKWDSNVHLV AAFLINALLLILGAALFYGVGGHVTAF QGVYNGLKNPMIVGGLASPLMSTLFAF ALLITGLISSIASTLAGQIVMEGYLNIRM PLWERRLLTRLVTLIPIMVIGFMIGFSEH NFEQVIVYAQVSLSIALPFTLFPPLVALT

				NRRDLMGIHVNSQLVRWVG YFLTGVITVLNIQLAISVFV
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	13	WP_005712842.1	85,6	MTKRNEQLSVQQAKPSLDEINRSVQVP GVYEPSFVQKFLAYSGPGALVAVGYM DPGNWLTALEGGSRYHETLLAVLLLSI LAAMFMQTLAIKLGVARLDLAQAIA AFVPKWSRIGLWLVNEAAMMATDMT GVVGTAIALKLLFGLPLMWGMLLTIA VLVLMFLRFGIRRIELIVLASILTVGIIF GIEVVRARPSMGGIVAGLVPHTTEIL TNRGMLLLSLGIMGATIMPHNIY LHSSLAQSRRYDEHIPAQVTEALRFGK WDSNVHLVAAFIINALLILGATLFYGM SSHATAFEGVYNGLKNPAIVGGLASPL MSTLFAFALLITGLISSIASTLAGQIV MEGYLNIQIPLWARRLLTRLVTLIPIM IIGFVMGFSEQHFEQVIVYAQVALSIA LPFTLFPLVALTDRRDLMGQHVNSPV VRWMGYVLTGII TLLNVQLILSVILP
<i>Lactobacillus kefiri</i>	14	WP_054768793.1	72,4	MSQEPTHKSLDEINQSVEVPSVYETSFL QKFLAYSGPGALVAVGYMDPGNWLT LSGGSQFRYALLSVLLMSILVAMFMQT LSIKLGVARLDLAQAIAQKVPKSGRY TLWIINELAMMATDMTGVVGTAIALK LLFGLPLVYGILLTIFDVLLVLLFLRFGI RRIEFIVLAAILIVGVIFGIEVTRATPNIV EIAGGLIPTTHIVTNHEMLIMSLGIVGA TIMPHNVYLHSSLAQSRRYDYHNPKQ VNEALRFAKWDSNVHLVAAFLINALL LVLGGTLFFHTNSHFSAFQDVYNG LKS SAIVGSLASPLMSTLFAFALLITGM ISSITSTLSGQIVMEGYLHIRLPLWERRLLTR

				FVTLIPILAIGFLVGFNDHDFEEIIVYAQI ALSIALPFTLFPMVALTSNHDLMGVHT NRRYVTVIGYLLTSIITILNLQFVLASI
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	15	WP_0577389 92.1	68,7	MPNKKSLDEINESVKVPSVYDTSFLQK FLAYSGPGALVAVGYMDPGNWLTSLS GGSQYRYDLLSVLLISILVAMFMQTL KLGVARLDLAQAIATKVSPIRYFLW ILNEIAMMATDLTGVIPTAIALKLLFNL PLVFGILLTVFDVLIVLIFLRFGRIRIEFI VLAAILTVGIIFGIEVFRAQPKLFSIISGV IPSTDFTNHRKLVLSLGIVGATIMPHNI YLHSSLAQSRRYDHNDPLQVNEALRFA KWDSNVHLIAAFIINALLLVLGGTLFY HMTNQLASLQDVFTGLKSHAIVGTLAS PLMSWLFALALLITGMISSITSTLSGQIV MEGYLNIRLPLWQRRLLTRFVTLIPILII GFIVHFNEQDFENLIVYAQIILSIALPFTL FPMIFLTNDKKIMGNHVNSKLT TTVGII LASAITILNLQLLFSLI
<i>Lactobacillus plantarum</i>	16	YP_0048891 77.1	67,4	MQSHRHQSLEEINQSVAVPDVHQTA WRKFLAYSGPGALVAVGYMDPGNWL TSLAGGGQFQYRLAVLALAIIVAMFM QGLAIRLGVARQDLAQAIASKLPRPV RYAAWILNEVAMMATDMTGVIPTAIA LKMLFGLPLLAGILLTIADVLLVLLFLR FGIRRVIVLVAILTVGIIFGIEVGRAH VQFGNVLLGLVPTPLIVKNHTALVLSL GILGATIMPHNLYLHSSLAQSRRYDYH NPAQVTEALRFANWDSTVHLIAAFLIN ALLVLGGTLFFGHTNALASLQAVFDG LKSTTVVGALASPVMSWLFALALLITG LISSITSTLAGQIVMEGYLHIRLPLWQR

				RLLTRAVTLIPILIIGMLVGFSDAAFENL IIYAQVALSIALPFTLLPLVALTNDASL MKAHVNRPAVTWVG YGLAGIITVLNI YLVYSLF
<i>Lactobacillus reuteri</i>	17	WP_0036689 01.1	65,8	MERKSLDEINGSVDVPNVYQSAFWQK FLAYSGPGALVAVGYMDPGNWLTSLA GGSQYRYQLLVLF TAILIAMYMQSLA IKLGVTTRTDLAQAIARRLPTPLRIALW LFNEIAMMATDLTG VVGTAVALNMLF KLPLLIGVLLTIADVLVVLFFLHFGIRRI EFIVLTAILVVG AIFAIEVCRAHPEFSAI MDGFVPRSTIFTNHSELLISLGIVGATIM PHNIYLHSSLAQSRRYDEHDPKQVKET LRFANWDSLHLFAAFIVNALLLILGGT LFFHAASLGSLEDVFFGLKNPQIVGSLA SPLMSWLFAFALLVTGLISSITSTLAGQI VMEGFINIRLPLWKRRLLTRAVTLVPIL IIGFMINFKEEQFEQLIYAQIVLSIALPF TLYPLVALTGNKKLMGPHVNSRWQTV LGYILASLVTGLNLLVLV
<i>Lactobacillus crustorum</i>	18	WP_0758872 52.1	61,4	MTEKKSLDEINGSVAVPQYNTSFFRKF LAYSGPGALIAVGYMDPGNWLTSLVG GAHHKYQLLSVLLISILVATFMQSLSIR LGIASRQDLAQAI AKKAKKPVR YCLWI INELAMMATDLTG VIGTALALNMLFKL PLVFGVLITILDVFLILWFMRFGIRRIESI VVISILTVGLIFAFEVSHVQPNLTAIFKG FVPSQTIITNQNKLLISLGIIGATIMPHNI YLHSALAQSRRYDYHDSRQVREALRF ANWDSIVHLIAALIINCLLLILGGTIFYD KADQLASLMTVFKGLMNYQVVGSLAS SFMSYLF AFALLVTGLISSITSTLSGQIV

				MEGYLNIRLPLWQRRLLTRIITLIPILVI GFLVHFNEVIFEDLIVYAQIALSVALPF TLFPLVYLTNNAKIMGKHAVNKKWQTI LGFVLALIITILNIVLIATTLSH
--	--	--	--	---

В одном из предпочтительных воплощений агент, поглощающий марганец, представляет собой бактериальный штамм, содержащий полипептид, имеющий последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3 (MSDDHKKRHPKLIQYANGPSLEEINGTVEVPHGKGFWRTLFAYSGPGALVAVGYMDP GNWSTSITGGQNFQYLLISVILMSSLIAMLLQYMAAKLGIVSQMDLAQAIRARTSKKLGIVLWILTELAIMATDIAEVIGAAIALYLLFHIPLVIAVLVTVLDVLVLLLLTKIGFRKIEAIV VALILVILLVFVYQVALSDPNMGALLKGFIP TGETF ASSPSINGMSPIQGALGIIGATVMP HNLYLHSAISQTRKIDYKNPDDVAQAVKFSAWDSNIQLSFAFV VNCLLLVMGVAVFKS GAVKDPSFFGLFQALSDSSTLSNGVLI A VAKSGILSILFAVALLASGQNSTITGTLTGQVI MEGFVHMKMPLWARRLVTRIISVIPVIVCVMLTARDTPIQQHEALNTLMNNSQVFLAFA LPFSMLPLLMFTNSKVEMGDRFKNTGWVKVLGWISVLGLTGLNLKGLPDSIAGFFGDH PTATQTNMANIIAIVLIVAILALLAWTIWDL YKGNQRYEAHLAAVADEKEAKADVDEQ) или его функциональные варианты.

В других предпочтительных воплощениях агент, поглощающий марганец, представляет собой бактериальный штамм, содержащий полипептид, обладающий по меньшей мере 55% идентичностью последовательности, такой как по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность в соответствии с SEQ ID NO: 3.

В таблице 3 представлены примеры последовательностей, которые кодируют функциональные варианты SEQ ID NO: 3, и идентичность их последовательностей с SEQ ID NO: 3.

Таблица 3

Происхождение	SEQ ID NO	ID белка	% идентичности	Последовательность
<i>Lactobacillus casei</i>	19	WP_003567390.1	99,8	MSDDHKKRHPKLIQYANGPSLEEINGTVEVPHGKGFWRTLFAYSGPGALVAVGYMDP GNWSTSITGGQNFQYLLISVILMSSLIAMLL

				QYMAAKLGIVSQMDLAQAIRARTSKKLG VLWILTELAIMATDIAEVIGAAIALYLLFHIP LVIAVLVTVLDVLVLLLLTKIGFRKIEAIVV ALILVILLVFVYQVALSDPNMGALLKGFIP GETFASSPSINGMSPIQGALGIIGATVMPHN LYLHSAISQTRKIDHKNPDDVAQAVKFSA WDSNIQLSFAFVFNCLLLVMGVAVFKSGA VKDPSFFGLFQALSDSSTLSNGVLI-AVAKS GILSILFAVALLASGQNSTITGTLTGQVIME GFVHMKMPLWARRLVTRIISVIPVIVCVML TARDTPIQQHEALNTLMNNSQVFLAFALP SMLPLLMFTNSKVEMGDRFKNTGWVKVL GWISVLGLTGLNLKGLPDSIAGFFGDHPTA TQTNMANIIAIVLIVAILALLAWTIWDLYK GNQRYEAHLAAVADEKEAKADVDEQ
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	20	WP_005 686822.1	95	MSDDHKKKHSMKLIQYANGPSLEEINGTV EVPHGKGFWRTLFAYSGPGALVAVGYMD PGNWSTSITGGQNFQYLLISVILMSSLIAML LQYMAAKLGIVSQMDLAQAIRARTSKKLG IVLWILTELAIMATDIAEVIGAAIALYLLFHI PLVIAVLVTVLDVLVLLLLTKIGFRKIEAIV VALILVILLVFVYQVALSDPNMGALLKGFIP PTGETFASSPSVNGMSPIQGALGIIGATVMP HNLYLHSAISQTRKIDHKDPEDVAQAVKFSA AWDSNIQLTFAFVFNCLLLVMGVAVFKSG AVKDPSFFGLFQALSDSSTLSNGVLI-AVAK SGILSILFAVALLASGQNSTITGTLTGQVIM EGFIHMKMPLWARRLVTRVISVIPVIVCVM LTARETPIQQHEALNTLMNNSQVFLAFALP FSMLPLLMFTNSKVEMGDRFKNTGWVKV LGWVSVIGLTYLNLKGLPDSIAGFFGDNPT AAQTNIANMIAVVLIAAVLALLAWTIWDL

				YKGNKRYEAHLEAVADEEEEAKANDDVQ
<i>Lactobacillus plantarum</i>	21	YP_0048 90566.1	76,3	MSEKTNTPNRKHKLIEYANGPSLEEINGTIE VPKNLNFWKTLFAYSGPGALVAVGYMDP GNWSTSITGGQNYQYMLMSVILISSLIAML LQYMAAKLGIVSQMDLAQAIRARTSKSLGI VLWILTELAIMATDIAEVIGAAIALYLLFNIP LVIAVFITVLDVLVLLLLTKIGFRKIEAIVVC LILVILFVFVYQVALSNPDWGGVIKGLVPT ADTFSTSRVNGMTPLSGALGIIGATVMPH NLYLHSAISQTRKIDHNDEEDVARTVKFAA WDSNIQLSFAFVVNSLLIMGVAVFKSGAV KDPSFFGLYEALSNTSMLSNGILISVAKSGA LSALFAIALLASGQNSTITGTLTGQVIMEGF VHMRMPLWLRRLVTRLISVIPVLICVLLTS GKSAIDEHTALNNLMNNSQVFLAFALPFS MLPLLMMTDSAAEMGKRFKNSLWIKGLG WLSVIGLTFLNLLGLPDSILGFFGDNPAGE QTFISKILAYLLIAAILALLVWTVFDLQGRN KRYVEQQLAAAAKEANK
<i>Pediococcus acidilactici</i>	22	WP_065 124048.1	76,2	MSNEIKNPCKRRKLISYANGRSLEEINGTV KVPKNIGFWKTLFMYSGPGALVAVGYMD PGNWSTSITGGQNFQYMLMSIILISSLIAML LQYMAAKLGIVSQMDLAQAIRARTSRALG IVLWILTELAIMATDIAEVIGAAIALYLLFHI PLVVAVFITVFDVLLLLLLTKIGFRKIEAIVV CLIMVILVVFVYQVALSHPSWGAVFGGLIP TTKAFATTPTVGGMTPLSGSLGIIGATVMP HNLYLHSAVSQTRKINHDEEDVARTVRF STWDSNIQLSFAFVVNALLVMGVAVFKT GAVQDPSFFGLFHALNDTSTLSNGILIGVA KTGILSTLFAVALLASGQNSTITGTLTGQVI MEGFVHMRMPLWARRLITRLISVVPVLICV

				MLTSGKGTIQEHEALNNLMNNSQVFLAFA LPFSMVPLLMMTDSRVEMGDRFKNRWIVR ILGWISVIFLTLYLNLTGLPDSIAAFFGENASA AEISMAHDIA YALIVAVLALLAWTVIELYK GNKRYEIELAEKANAKEAA
<i>Lactobacillus salivarius</i>	23	YP_5357 97.1	72,7	MVNNENNHHKKHKMIQYANGKSLEEANGT VEIPKGKGFWKTLFAYSGPGALVAVGYMD PGNWSTSITGGQNFQYLLMSVILLSSLIAML LQYMAAKLGIVSQMDLAQAIRARTSKALG IVLWILTELAIMATDIAEVIGAAIALYLLFDI PLIIAVFITVFDVLLLLLLTKVGFRKIEAIVV CLIFVILFVFVYQVALSNPDWGGVFKGLIPT SETFAKHPVVHDMSPNLGALGIIGATVMPH NLYLHSAISQTRKFDRNNEDDIANAVRFTA WDSNIQLGLAFVVNSLLLIMGVAVFKSGA VEDPSFFGLYQALSDTSVMSNGLLAAAAR TGILSTLFAVALLASGQNSTITGTLTGQVIM EGFIHLRMPLWARRLITRLLSVIPVLICVAL TSGKSTIEEHEALNNLMNNSQVFLAFALPF SMLPLVIMTGSKVEMGERFKNRLWINILG WISVISLTYLNMIGLPQNLEPFFPADKVGLA HTVAYILIVLIIALLIWTLVELHLGNKRFAA EQAKKHNK
<i>Lactobacillus fermentum</i>	24	WP_012 391805.1	69,6	MDNTKNQHRKLRLIEHANGKSLEEINGTV EVPHGKGFFRTLFAYS GP GALVAVGYMDP GNWSTSITGGQSFQYTLMTTILISSLIAMLL QYMAAKLGIVSQMDLAQAIRARTGKALG VILWLMTELAIMATDIAEVIGAAIALNLLFH IPLVLAVFITVLDVLVLLLLTKIGFRKIEAIV ACLILVILAVFAYQVALSHPDWAGVFKGLL PTKEAIAKEPVVGGISPLTGSLGIIGATVMP HNLYLHSAISQTRKIDHTNAEDIKQTVRFT

				AWDSNIQLTLAFFVNALLIMGVAVFKNG AVQDSSFFGLYDALNNTDMLSNGLLIAVA KSGVLSTLFAIALLASGQNSTITGTLTGQVI MEGFVHMKMPLWARRLITRLLSVVPVLVC VAMTAHESTIDQHASLNILMENSQVFLAFA LPFSMLPLLIMTNSDTEMGQFKNSLWVRV LGWISVIGLTFLNLYNLPQTYEGFGIWSKG LSDVLAWISIVVIVVLLAWTCFELIRGDRRL AAEREKHTWEK
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	25	WP_080881380.1	63,7	MCSRKVLLTKQKGKHYLIRYANGKSLSEIN GTIEIPKKRTFWRMLWAYTGPGALVAVGY MDPGNWATSITGGQSFQYILMSTILISSLMA MLLQYMAAKLGIVTQMDLAQAIRLRTGK ALGIVLWLMTELAIMATDIAEVIGAAIALN LLFDIPLVPAVFITVLDVLLLLLLARIGFRKI EAVVSCLILVILLVFVYEVLLSNPDWSKAF VGLVPSAKIIQTHPVVGGISPLTGTGLGIIGAT VMPHNLYLHSAISQTRKINHHNLQLIRDAV KYTALDSNIQLSLAFLVNALLIMGAAVFK SGAVRDSSFFGLYQALDNAKMLSDPLL VH VARTGILSTLFAVALLASGQNSTITGTLTGQ VIMEGYIHLKMPLWARRLVTRLLSVIPVLL CVSFTMND SVMQQHFALNMLMENSQVFL AFALPFSVLPLLIMTNNKAEMGEFKNKPL WHYLGWACALVLTFLNLYNLP SQFVNFKF ASKEVSTIIAYFVIVVIAALLLWTCIEIYIGD RKVKIHHSGFDAKEKELKEEGQK

Для задач настоящего изобретения степень «идентичности последовательности» между двумя аминокислотными последовательностями определяют с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), встроенного в программу Needle пакета EMBOSS package (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), предпочтительно версия 3.0.0 или более поздняя. Используемые возможные параметры

представляют собой штраф за открытие гэта, равный 10, штраф за продление гэта, равный 0,5, и матрица замен EBLOSUM62 (EMBOSS версия BLOSUM62). Результат программы Needle, обозначаемый как «самая длинная идентичность» (полученный с использованием опции nobrief), используют в качестве процентной идентичности и рассчитывают следующим образом:

$(\text{Идентичные остатки} \times 100) / (\text{Длина выравнивания} - \text{Общее количество гэпов в выравнивании})$.

Для задач настоящего изобретения степень идентичности последовательности между двумя дезоксирибонуклеотидными последовательностями определяют с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, выше), встроенного в программу Needle пакета EMBOSS package (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, выше), предпочтительно версия 3.0.0 или более поздняя. Используемые возможные параметры представляют собой штраф за открытие гэта, равный 10, штраф за продление гэта, равный 0,5, и матрица замен EDNAFULL (EMBOSS версия NCBI NUC4.4). Результат программы Needle, обозначаемый как «самая длинная идентичность» (полученный с использованием опции nobrief), используют в качестве процентной идентичности и рассчитывают следующим образом:

$(\text{Идентичные дезоксирибонуклеотиды} \times 100) / (\text{Длина выравнивания} - \text{Общее количество гэпов в выравнивании})$.

В одном из воплощений, стадия выбора включает определение того, содержит ли бактериальный штамм переносчик марганца, обладающий 3 идентичностью последовательности, такой как по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-3. Определение может быть основано на секвенировании бактериального штамма или поиске blast в базах данных с известными последовательностями.

У агентов, поглощающих марганец, используемых в разделе «Примеры» в данном изобретении, имеется переносчик марганца, кодируемый в соответствии с SEQ ID NO: 1-3 или его функциональными вариантами.

В других воплощениях в настоящем изобретении предложен способ подавления или задержки роста грибов в продукте, включающий стадии:

- выбора одного или более чем одного бактериального штамма в качестве агента, поглощающего марганец, и

- уменьшения уровня свободного марганца в продукте до концентрации менее чем приблизительно $0,01 \text{ млн}^{-1}$ в продукте путем добавления агента, поглощающего марганец, при этом стадия выбора включает измерение активности поглощения марганца одного или более чем одного бактериального штамма.

Активность поглощения марганца может быть измерена с использованием обычных способов, известных в области техники, см., например Kehres et al. "The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen." *Molecular microbiology* 36.5 (2000): 1085-1100.

Для ферментированных пищевых продуктов, таких как кисломолочные продукты, агент, поглощающий марганец, предпочтительно относится к виду лактобактерий. У *Lactobacillus* представлены различные семейства переносчиков марганца, и часто присутствуют также их многочисленные гомологи. На фиг.11 авторы изобретения представляют древо, отражающее обзор филогении семейства переносчиков марганца MntH у видов *Lactobacillus*. В соответствии с представленным, переносчики марганца можно найти среди видов *Lactobacillus*. Помимо *Lactobacillus* spp. семейство переносчиков MntH можно найти также и в других бактериях. Древо было построено путем выравнивания последовательностей белка MntH *Lactobacillus* с использованием mafft v.7, в то время как филогения была выведена путем кластеризации по методу объединения соседних пар.

В предпочтительных воплощениях агент, поглощающий марганец, представляет собой бактериальный штамм, выбранный из группы, состоящей из *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. sakei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. kefir*, *L. alimentarius* и *Pedococcus acidilactici*.

С другой стороны, такой переносчик, по-видимому, отсутствует у *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, и *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, что делает их менее пригодными для удаления свободного марганца.

В соответствии с предпочтительным воплощением настоящего изобретения способ включает этап выбора для определения того, что один или более чем один бактериальный штамм не содержит супероксиддисмутазу, предпочтительно супероксиддисмутазу марганца.

Супероксиддисмутазы, такие как супероксиддисмутаза марганца, были изучены и описаны среди прочих, например, в работе Kehres et al., "Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria." *FEMS microbiology reviews* 27.2-3 (2003): 263-290; Culotta V.C "Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism"

Curr. Top. Cell Regul. 36, 117–132 (2000) or Whittaker J.W “Manganese superoxide dismutase” *Met. Ions Biol. Syst.* 37, 587–611 (2000).

В контексте настоящего изобретения термин «не содержащий» означает, что геном одного или более чем одного бактериального штамма не несет ген, кодирующий супероксиддисмутазу, или даже если геном одного или более чем одного бактериального штамма несет ген, кодирующий супероксиддисмутазу, то этот ген не экспрессируется одним или более чем одним бактериальным штаммом.

Продукты

В некоторых воплощениях продукт представляет собой пищевой продукт, косметический продукт, продукт медицинского назначения или фармацевтический продукт. «Продукт питания» и «пищевой продукт» имеют общее значение этих терминов. «Пищевой продукт» означает любой пищевой или кормовой продукт, пригодный для употребления человеком или животными. Пищевыми продуктами могут быть свежие или скоропортящиеся продукты питания, а также хранящиеся или переработанные продукты питания. Продукты питания включают фрукты и овощи, включая производные продукты, зерновые продукты и продукты, полученные из зерновых, молочные продукты, мясо, птицу и морепродукты, но не ограничиваются ими. Более предпочтительно пищевой продукт представляет собой мясной продукт или молочные продукты, такие как йогурт, творог, сметана, сыр и т.п.

Тем не менее, следует отметить, что в контексте настоящего изобретения термин «продукт» и «пищевой продукт» в настоящем изобретении относится к самой воде. Хотя марганец имеет важное значение для питания человека, в воде он, как правило, считается вредным для здоровья человека по данным Агентства по охране окружающей среды США (EPA). Поэтому обработку питьевой воды или сточных вод для удаления избытка марганца иногда проводят для обеззараживания и оздоровления, что не относится к сущности настоящего изобретения.

Настоящее изобретение особенно применимо для пищевых продуктов, имеющих активность воды от промежуточной до высокой. Активности воды (a_w) определяют жизнеспособность и функциональность микроорганизмов. Активность воды или a_w представляет собой парциальное давление пара воды в веществе, разделенное на стандартное состояние парциального давления пара воды. В области науки о продуктах питания стандартное состояние чаще всего определяется как парциальное давление пара чистой воды при той же температуре. Используя это конкретное определение, чистая дистиллированная вода имеет активность воды, равную 1.

Основными категориями продуктов питания, склонными к грибковой порче, являются молочные продукты, имеющие промежуточную или высокую активность воды, такие как йогурт, сливки, сливочное масло, сыр и т.п. Тем не менее, также предполагается, что настоящее изобретение подходит для продуктов питания, обладающих более низкой активностью воды, таких как обработанное мясо, зерновые, орехи, специи, сухое молоко, сушеное мясо и ферментированное мясо.

В предпочтительном воплощении продукт, в отношении которого могут применяться способы, раскрытые в настоящем изобретении, представляет собой продукт, обладающий активностью воды (a_w) менее 0,98, например менее чем приблизительно 0,97, менее чем приблизительно 0,96, менее чем приблизительно 0,95, менее чем приблизительно 0,94, менее чем приблизительно 0,93, менее чем приблизительно 0,92, менее чем приблизительно 0,91, менее чем приблизительно 0,90, менее чем приблизительно 0,89, менее чем приблизительно 0,88, менее чем приблизительно 0,87, менее чем приблизительно 0,86, менее чем приблизительно 0,85, менее чем приблизительно 0,84, менее чем приблизительно 0,83, менее чем приблизительно 0,82, менее чем приблизительно 0,81, менее чем приблизительно 0,80, менее чем приблизительно 0,79, менее чем приблизительно 0,78, менее чем приблизительно 0,77, менее чем приблизительно 0,76, менее чем приблизительно 0,75, менее чем приблизительно 0,74, менее чем приблизительно 0,73, менее чем приблизительно 0,72, менее чем приблизительно 0,71, менее чем приблизительно 0,70 или еще меньше.

В некоторых воплощениях продукт представляет собой продукт, имеющий активность воды (a_w) от приблизительно 0,70 до приблизительно 0,98, такую как от приблизительно 0,75 до приблизительно 0,97, такую как от приблизительно 0,80 до приблизительно 0,96, такую как от приблизительно 0,85 до приблизительно 0,95.

Способы измерения активности воды известны в области техники, например, как описано в Fontana Jr, Anthony J. "Measurement of water activity, moisture sorption isotherms, and moisture content of foods." Water activity in foods: Fundamentals and applications (2007): 155-173.

В одном из воплощений описанные здесь стадии осуществляют для подавления или задержки роста грибов в ферментированных пищевых продуктах. Ферментированные пищевые продукты представляют собой продукты, производимые или консервируемые под действием микроорганизмов. Ферментация означает превращение углеводов в спирты или кислоты под действием микроорганизма. Ферментация обычно относится к ферментации сахара до спирта с использованием дрожжей. Тем не менее, она может также

включать превращение лактозы в молочную кислоту. Например, ферментацию можно использовать для приготовления продуктов питания, таких как йогурт, сыр, саями, квашеная капуста, кимчи, маринованные огурцы и т.п.

В одном из воплощений продукт питания представляет собой продукт молочнокислой ферментации, т.е. полученный путем ферментации молочнокислыми бактериями (LAB). «Молочнокислая бактерия» обозначает грамположительную микроаэрофильную или анаэробную бактерию, которая ферментирует сахара с образованием кислот, включая молочную кислоту, в качестве преимущественно продуцируемой кислоты. Продукт питания как правило имеет pH от приблизительно 3,5 до приблизительно 6,5, такой как от приблизительно 4 до приблизительно 6, такой как от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,5, такой как приблизительно 5.

Настоящее изобретение особенно полезно для подавления или задержки роста грибов в молочных продуктах. В таких продуктах загрязнение дрожжами и плесневыми грибами является обычным явлением и ограничивает срок годности таких продуктов. «Молочный продукт» включает в дополнение к молоку продукты, полученные из молока, такие как сливки, мороженое, масло, сыр и йогурт, а также вторичные продукты, такие как молочная сыворотка и казеин, и любые приготовленные пищевые продукты, содержащие молоко или компоненты молока в качестве основного ингредиента, такие как молочная смесь. В одном из предпочтительных воплощений молочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт. Термин «молоко» понимается как молочная секреция, полученная путем доения любого млекопитающего, такого как коровы, овцы, козы, буйволы или верблюды. В предпочтительном воплощении молоко представляет собой коровье молоко. Термин молоко также включает белково/жировые растворы, изготовленные из растительных материалов, например соевое молоко.

Концентрация марганца варьирует в молоке в зависимости от животного, из которого оно произведено, корма, а также сезона. Обычно марганец присутствует в молочных продуктах в концентрации по меньшей мере $0,03 \text{ млн}^{-1}$, например по меньшей мере $0,08 \text{ млн}^{-1}$ для обезжиренного молока и по меньшей мере $0,1 \text{ млн}^{-1}$ для цельного молока. В соответствии с открытием авторов настоящего изобретения, уменьшение количества марганца в таких продуктах или продуктах, приготовленных из них, делает их более устойчивыми к порче.

В одном из воплощений продукт питания представляет собой продукт, полученный путем ферментации с термофилами, т.е. термофильный ферментированный пищевой продукт. Термин «термофил» относится к микроорганизмам, которые лучше всего

процветают при температурах выше 43°C. Наиболее полезные в промышленности термофильные бактерии включают *Streptococcus spp.* и *Lactobacillus spp.* Используемый здесь термин «термофильная ферментация» относится к ферментации при температуре выше приблизительно 35°C, такой как от приблизительно 35°C до приблизительно 45°C. «Термофильный ферментированный пищевой продукт» относится к ферментированным пищевым продуктам, приготовленным путем термофильной ферментации термофильной заквасочной культуры. К таким продуктам относятся, например йогурт, скир, лабне, ласси, айран и дук.

В одном из воплощений пищевой продукт представляет собой продукт, приготовленный путем ферментации с мезофилами, т.е. мезофильный ферментированный пищевой продукт. Термин «мезофил» относится к микроорганизмам, которые лучше всего процветают при умеренных температурах (15°C-40°C). Наиболее полезные для промышленности мезофильные бактерии включают *Lactococcus spp.* и *Leuconostoc spp.* Используемый здесь термин «мезофильная ферментация» относится к ферментации при температуре от приблизительно 22°C до приблизительно 35°C. «Мезофильный ферментированный пищевой продукт», который относится к ферментированным пищевым продуктам, приготовленным путем мезофильной ферментации мезофильной заквасочной культуры. В такие продукты включены, например пахта, кислое молоко, сквашенное молоко, сметана, кислые густые сливки и свежий сыр, такой как кварк, творог и сливочный сыр.

Приготовление ферментированных продуктов

Описанные здесь способы особенно полезны для ингибирования или задержки роста дрожжей и/или плесневых грибов в кисломолочном продукте, таком как термофильный и мезофильный кисломолочный продукт, например йогуртовый продукт. Термин «кисломолочный продукт» представляет собой термин, обычно определенный в соответствии с официальными правилами, и стандарты хорошо известны в области техники. Например, симбиотические культуры *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* используют в качестве заквасочной культуры для йогурта, тогда как *Lactobacillus acidophilus* используют для получения ацидофилина. Другие мезофильные молочнокислые бактерии используются для получения кварка или мягкого сыра низкой жирности.

Выражение «кисломолочный продукт» обозначает пищевой или кормовой продукт, где приготовление пищевого или кормового продукта включает ферментацию молочной основы при помощи молочнокислой бактерии. Используемый здесь термин

«кисломолочный продукт» включает такие продукты, как термофильные кисломолочные продукты (например йогурт) и мезофильные кисломолочные продукты (например кислое молоко и пахта, а также ферментированную сыворотку, кварк и мягкий сыр низкой жирности), но не ограничивается ими. Кисломолочный продукт также включает сыр, такой как сыр континентального типа, свежий сыр, мягкий сыр, чеддер, маскарпоне, вытяжной сыр, моцарелла, проволоне, белый рассольный сыр, сыр для пиццы, фета, бри, камамбер, домашний сыр, эдам, гауда, тильзитер, хаварти или эмменталь, швейцарский сыр и маасдам.

Термин «йогурт» имеет свое обычное значение и обычно определяется в соответствии с официальными правилами, и стандарты хорошо известны в области техники. Заквасочные культуры для получения йогурта включают по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*. Интересно, что переносчик марганца отсутствует в *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* и демонстрирует низкую экспрессию только в *Streptococcus thermophilus*, двух штаммах, обнаруженных в заквасочной культуре в йогурте, что делает их особенно восприимчивыми к грибковой порче. Поэтому предпочтительно включать другой(ие) бактериальный(ые) штамм(ы) для поглощения свободного марганца, присутствующего в йогурте.

Предпочтительно свободный марганец в ферментированном продукте уменьшают до концентрации ниже приблизительно $0,005 \text{ млн}^{-1}$.

Во время пищевой переработки для предотвращения грибковой порчи традиционно использовались химические консерванты. Тем не менее, ввиду высокой социальной потребности на менее переработанные и не содержащие консервантов продукты питания, изобретение вносит вклад в обеспечение эффективного решения для регулирования роста дрожжей и плесневых грибов путем использования биологических агентов, поглощающих марганец, для снижения концентрации марганца.

При использовании биологического агента, поглощающего марганец, специалист может регулировать различные параметры, такие как pH, температура и количество агента, поглощающего марганец, или бактерий для достижения желаемых результатов, принимая во внимание примеры, представленные в настоящем изобретении, а также свойства продукта питания, такие как активность воды, питательные вещества, уровень природного марганца, срок годности, условия хранения, упаковка и т.д.

Продукт, в котором уменьшается концентрация свободного марганца, предпочтительно упаковывают для дальнейшего ограничения контакта с дрожжами и

плесневыми грибами. Также предпочтительно хранить продукт при холодной температуре (ниже 15°C), чтобы способствовать увеличению срока годности.

Для ферментированного пищевого продукта до, в начале или во время ферментации можно добавлять бактерии, поглощающие марганец. В зависимости от выбранных параметров шаг уменьшения уровня марганца до предпочтительного уровня может составлять несколько часов, такой как, по меньшей мере, 5 часов, такой как, по меньшей мере, 10 часов, такой как, по меньшей мере, 15 часов, такой как, по меньшей мере, 20 часов, такой как, по меньшей мере, 1 день, 2 дня, 3 дня или больше. Специалист в данной области техники может выбрать подходящие параметры в зависимости от продукта, в котором желательно подавление или задержка роста грибов.

В изобретении предложен способ приготовления ферментированного пищевого продукта, включающий добавление заквасочной культуры и агента, поглощающего марганец, к субстрату продукта питания, ферментацию субстрата в течение времени до тех пор, пока не будет достигнуто желаемое значение pH. Предпочтительно агент, поглощающий марганец, представляет собой штамм молочнокислых бактерий.

Используемый здесь термин «субстрат пищевого продукта» относится к субстрату, в котором должна осуществляться ферментация.

Для получения кисломолочных продуктов пищевой субстрат представляет собой молочную основу. «Молочная основа» широко используется в настоящем изобретении для обозначения композиции на основе молока или молочных компонентов, которая может быть использована в качестве среды для роста и ферментации заквасочной культуры. «Молоко» обычно относится к молочной секреции, полученной путем доения любого млекопитающего, такого как коровы, овцы, козы, буйволы или верблюды. Молочная основа может быть получена из любого сырого и/или переработанного молочного материала, а также из восстановленного сухого молока. Молочная основа может быть также растительной, т.е. приготовлена из растительного материала, например соевого молока. Предпочтительна молочная основа, приготовленная из молока или молочных компонентов, полученных у коров.

Молочные основы включают растворы/суспензии любого молока или подобных молоку продуктов, содержащих белок, таких как цельное молоко или молоко пониженной жирности, обезжиренное молоко, пахту, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, но не ограничиваются ими.

Молочная основа также может быть с пониженным содержанием лактозы в зависимости от потребности покупателей. Молоко с пониженным содержанием лактозы

может быть получено при помощи любого способа, известного в данной области техники, включая гидролиз лактозы ферментом лактазой до глюкозы и галактозы, или путем нанофильтрации, путем электродиализа, ионообменной хроматографии и путем центрифугирования.

Для закваски молочной основы добавляют заквасочную культуру. Термины «закваска» или «заквасочная культура», используемые в контексте настоящего изобретения, относятся к культуре одного или более чем одного пищевого микроорганизма, в частности молочнокислых бактерий, которые ответственны за подкисление молочной основы.

Агент, поглощающий марганец, можно добавлять до, в начале или во время ферментации одновременно с заквасочной культурой или в другое время.

После добавления заквасочной культуры и агентов, поглощающих марганец, и воздействия на молочную основу подходящими условиями, начинается процесс ферментации и продолжается в течение некоторого периода времени. Специалист в данной области техники знает, как выбрать подходящие условия процесса, такие как температура, кислород, добавление углеводов, количество и характеристики микроорганизма(ов) и время процесса, которое он занимает. Этот процесс может занять от трех, четырех, пяти, шести часов или более.

Эти условия включают в себя установление температуры, которая подходит для конкретных штаммов заквасочной культуры. Например, когда заквасочная культура содержит мезофильные молочные бактерии, тогда температура может быть установлена на уровне приблизительно 30°C, и если культура содержит термофильные молочнокислые бактериальные штаммы, тогда температура поддерживается в диапазоне от приблизительно 35°C до 50°C, например от 40°C до 45°C. Установка температуры ферментации также зависит от фермента (ферментов), добавляемого(ых) для ферментации, которой(е) может(гут) быть легко определен(ы) специалистом в данной области техники. В конкретном воплощении изобретения температура ферментации составляет от 35°C до 45°C, предпочтительно от 37°C до 43°C, и более предпочтительно от 40°C до 43°C. В другом воплощении температура ферментации составляет от 15°C до 35°C, предпочтительно от 20°C до 35°C и более предпочтительно от 30°C до 35°C.

Ферментация может быть остановлена с использованием любых способов, известных в области техники. В целом, в зависимости от различных параметров процесса, ферментация может быть остановлена за счет того, что молочную основу делают не подходящей для роста штамма(ов) заквасочной культуры. Например, остановка может

быть осуществлена путем быстрого охлаждения кисломолочного продукта при достижении желаемого pH. Известно, что при ферментации происходит подкисление, что приводит к образованию трехмерной сети, состоящей из кластеров и цепей казеинов. Термин «желаемый pH» обозначает pH, при котором прекращается стадия ферментации. Желаемый pH зависит от получаемого кисломолочного продукта и может быть легко определен специалистом в данной области техники.

В конкретном воплощении изобретения ферментацию проводят до достижения, по меньшей мере, pH 5,2, например до достижения pH 5,1, 5,0, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0, 3,9, 3,8 или 3,7. Предпочтительно, ферментацию проводят до достижения желаемого pH от 4,0 до 5,0 и, более предпочтительно, от 4,0 до 4,6. В предпочтительном воплощении ферментацию проводят до достижения желаемого pH ниже 4,6.

В предпочтительном воплощении ферментируемый продукт питания выбран из группы, состоящей из кварка, сливочного сыра, мягкого сыра низкой жирности, греческого йогурта, скира, лабне, пахты, сметаны, кислого молока, сквашенного молока, кефира, ласси, айрана, творога, дука, сметаны, якульта и дахи.

В еще одном предпочтительном воплощении ферментированный пищевой продукт представляет собой сыр, включающий сыр континентального типа, свежий сыр, мягкий сыр, чеддер, маскарпоне, вытяжной сыр, моцареллу, проволоне, белый рассольный сыр, сыр для пиццы, фету, бри, камамбер, домашний сыр, эдам, гауда, тильзитер, хаварти или эмменталь, швейцарский сыр и маасдам.

В еще одном воплощении способ дополнительно включает упаковку продукта питания для уменьшения контакта с дрожжами и плесневыми грибами.

В настоящее изобретение включен продукт питания, полученный при помощи описанных здесь способов.

Продукт, полученный в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно представляет собой кисломолочный продукт с концентрацией свободного марганца, уменьшенной до менее чем $0,01 \text{ млн}^{-1}$ после хранения в течение, по меньшей мере, двух суток, например, по меньшей мере, 3 суток, по меньшей мере, 4 суток, более предпочтительно, по меньшей мере, 5 суток, по меньшей мере, 6 суток, по меньшей мере, 7 суток, по меньшей мере, 8 суток, по меньшей мере, 9 суток, по меньшей мере, 10 суток, по меньшей мере, 11 суток, по меньшей мере, 12 суток, по меньшей мере, 13 суток и, по меньшей мере, 14 суток.

Другие особенности и преимущества изобретения станут очевидными из следующего описания в сочетании с прилагаемыми графическими материалами. Если не

определено иначе, то все термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. Использование терминов “a” и “an”, и “the” и аналогичных в контексте описания изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения) должно быть истолковано как охватывающее как единственное, так и множественное число, если здесь не указано иное или явно не противоречит контексту. Если не указано иное, то термины «содержащий», «имеющий», «включающий» и «содержащий» следует понимать как открытые термины (т.е. означающие «включающий, но не ограничивающийся»). Перечисление диапазонов значений здесь просто предназначено для того, чтобы служить в качестве краткого способа ссылки отдельно на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон, если не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было индивидуально указано здесь. Все способы, описанные здесь, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если здесь не указано иное или если иное явно не противоречит контексту. Если не указано иное, то все точные значения, представленные здесь, являются представителями для соответствующих приблизительных значений (например все точные примерные значения, предоставленные в отношении конкретного фактора или измерения, могут также рассматриваться как обеспечивающие соответствующее приблизительное измерение, модифицированное «приблизительно», где это уместно). Использование любого и всех примеров, или примерного языка (например, «такого, как»), представленного здесь, предназначено только для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании не должны толковаться как указывающие на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практической реализации изобретения.

Примеры

Изобретение, описанное и заявленное здесь, не должно быть ограничено в объеме конкретными раскрытыми здесь аспектами, поскольку эти аспекты предназначены для иллюстрации некоторых аспектов изобретения. Предполагается, что любые эквивалентные аспекты находятся в пределах объема данного изобретения. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые показаны и описаны здесь, станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и следующих примеров. Предполагается, что такие модификации также оказываются в объеме формулы изобретения. В случае конфликта приоритет имеет описание настоящего изобретения, включающее определения.

Пример 1 Рост дрожжей при различных концентрациях марганца

В этом примере продемонстрированы потребности в марганце *Debaryomyces hansenii* в минимальной среде. Использовали два штамма *D. hansenii*, выделенные соответственно из испорченного йогурта (штамм 1) и квarka (штамм 2). Штаммы выращивали в химически определенной среде с различными концентрациями марганца.

Минимальная среда содержит биотин 2 мкг/л, пантотенат кальция 400 мкг/л, фолиевую кислоту 2 мкг/л, инозит 2 мг/л, никотиновую кислоту 400 мкг/л, *para*-аминобензойную кислоту 200 мкг/л, пиридоксин 400 мкг/л, рибофлавин 200 мкг/л, тиамин 400 мкг/л, борную кислоту 500 мкг/л, сульфат меди 40 мкг/л, йодид калия 100 мкг/л, хлористое железо 200 мкг/л, молибдат натрия 200 мкг/л, сульфат цинка 400 мкг/л, однозамещенный фосфат калия 0,5 г/л, двухосновный фосфат калия 0,5 г/л, сульфат магния 0,5 г/л, хлорид натрия 0,1 г/л, хлорид кальция 0,2 г/л, глюкозу 20 г/л, сульфат аммония 5 г/л.

Используемая концентрация марганца: 6 млн⁻¹, 0,6 млн⁻¹, 0,06 млн⁻¹, 0,006 млн⁻¹, 0,0006 млн⁻¹, 0,00006 млн⁻¹, 0,000006 млн⁻¹.

Тестировали два отличающихся значения pH: pH 6,5 и 4,5.

Штаммы инокулировали в 150 мкл отличающейся среды в 96-луночном планшете. Планшеты инкубировали при 17°C в течение нескольких суток, и за ростом штаммов дрожжей следили путем измерения поглощения при 600 нм в планшетном ридере.

Влияние различных pH и различных концентраций марганца на рост двух отличающихся штаммов *D. hansenii* представлены на фиг. 1 (штамм 1) и фиг. 2 (штамм 2). Как можно видеть, рост *D. hansenii* подавляется ниже концентрации, составляющей приблизительно 0,01 млн⁻¹ марганца. Отсутствует различие между двумя различными pH, демонстрируя то, что этот механизм является эффективным в этом диапазоне pH.

Пример 2 Подавление дрожжей в кисломолочных продуктах

Этот пример демонстрирует требования в марганце *Debaryomyces hansenii* в кисломолочных продуктах.

Готовили кисломолочные продукты с заквасочной культурой (*Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) или дополнительно с агентами, поглощающими марганец (*L. rhamnosus* и *L. paracasei*). Кисломолочные продукты центрифугировали (10 мин при 5000 об./мин) и супернатант подвергали стерильной фильтрации. Супернатант переносили в стерильный 96-луночный планшет (150 мкл в каждой лунке), и марганец добавляли в первую лунку до конечной концентрации 6 млн⁻¹, затем осуществляли 10-кратное серийное разведение, получая в результате достижение

различных концентраций марганца от 6 млн^{-1} до $0,000006 \text{ млн}^{-1}$. *D. hansenii* инокулировали до приблизительно 20 клеток/лунку, и планшеты инкубировали при 17°C в течение нескольких суток, и рост штаммов дрожжей контролировали путем измерения поглощения при 600 нм в планшетном ридере на 7 сутки.

Фиг. 3 и 4 демонстрируют рост *D. hansenii* (штамм 1 и штамм 2, соответственно). Рост дрожжей после добавления в водную фазу марганца представлен на фиг. 3 для штамма 1 и фиг. 4 для штамма 2 (светлые окружности). Представлены среднее значение и стандартное отклонение для технических повторов $n=6$ (А) и $n=3$ (В). Для сравнения рост дрожжей также представлен в используемой для сравнения водной фазы йогурта, к которой не добавляли ни агенты, поглощающие марганец, ни дополнительное количество марганца (квадрат). Отмечается, что в образце, используемом для сравнения, концентрация марганца составляет $0,03 \text{ млн}^{-1}$. Для светлых окружностей ось x указывает на концентрацию добавляемого марганца, а для квадратов (водная фаза йогурта, используемого для сравнения) ось x указывает на марганец, характерный для водной фазы.

Этот результат демонстрирует, что рост штаммов дрожжей в матрице продукта питания зависит от марганца. Добавление марганца приводит в результате к росту, близкому к росту в образце, используемом для сравнения, обеспечивая то, что низкие концентрации марганца представляют собой основное ограничение для роста дрожжей в кисломолочном продукте.

Пример 3 Подавление *Debaryomyces* и *Rhodotulola*

В этом примере представлены активности поглощения марганца для различных бактерий и их подавляющее действие в отношении *Debaryomyces* и *Rhodotulola*. Оценивали подавляющее действие в кисломолочных продуктах с низкой концентрацией марганца и повышенной концентрацией марганца.

В таблице 4 перечислены добавляемые бактерии и то, включают ли они переносчики марганца.

Таблица 4

№.	Виды	Содержит переносчик марганца
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Да
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Да
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Да

4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (ATCC 7469)	Да
5	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Да
6	<i>Lactobacillus casei</i>	Да
7	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Да
8	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Да
9	<i>Lactobacillus sakei</i> (ATCC 15521)	Да
10	<i>Lactobacillus reuteri</i> (ATCC 23272)	Да
11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Да
12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	No
13	<i>Lactobacillus helveticus</i>	No
14	<i>Lactobacillus gasseri</i> (ATCC 33323)	No
15	<i>Lactobacillus brevis</i>	Да
16	<i>Lactobacillus kefir</i> (ATCC 35411)	Да
17	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	Да
18	<i>Pediococcus acidilactici</i> (DSM20284)	Да
19	Контроль (только заквасочная культура)	

Перечисленные бактерии выращивали в среде MRS (deMan, Rogosa и Sharpe) в течение ночи.

Приготовление: 2 мл молока, содержащего заквасочную культуру (*Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) инокулировали 10 мкл ночной культуры. Молоко ферментировали при 43°C в течение приблизительно 6 часов до достижения pH 4,5. Ферментированное молоко хранили в холодильнике до дальнейшего применения. 150 мкл ферментированного молока переносили в отдельные лунки в 96-луночный планшет в двух параллелях. К половине образца добавляли марганец до достижения увеличения марганца до 6 млн^{-1} , и все лунки инокулировали приблизительно 20 клетками *Debaryomyces hansenii* или *Rhodotulrola mucilaginosa*. После 4 суток ряд разведения вносили в селективные планшеты YGC для анализа роста дрожжей. Рост дрожжей измеряли путем оптического наблюдения, где величина 0 присваивается для отсутствия роста, а 5 для полного роста. Среднее значение для двух биологических

независимых экспериментов представлено в таблице 5 для *Debaryomyces* и таблице 6 для *Rhodotulola*.

Таблица 5 Подавление *Debaryomyces*

	Агент, поглощающий марганец	Рост дрожжей (е.п.)	Рост дрожжей (е.п.) с 6 млн ⁻¹ марганца
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0	5
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0	5
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0	5
4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0	4,5
5	<i>Lactobacillus salivarius</i>	3,75	5
6	<i>Lactobacillus casei</i>	3,75	5
7	<i>Lactobacillus paracasei</i>	0	5
8	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	5
9	<i>Lactobacillus sakei</i>	0,5	5
10	<i>Lactobacillus reuteri</i>	4	5
11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,5	5
12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	4,5	4,5
13	<i>Lactobacillus helveticus</i>	5	3
14	<i>Lactobacillus gasseri</i>	5	5
15	<i>Lactobacillus brevis</i>	3,5	5
16	<i>Lactobacillus kefir</i>	1,5	5
17	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	3,5	5
18	<i>Pediococcus acidilactici</i>	4	5
19	Контроль (только заквасочная культура)	5	5

Таблица 6 Подавление *Rhodotulola*

	Агент(ы), поглощающий(ие) марганец	Рост дрожжей (е.п.)	Рост дрожжей (е.п.) с 6 млн ⁻¹ марганца
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	4,5
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1,5	4,5
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	4,5
4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	4,5
5	<i>Lactobacillus salivarius</i>	3,5	5
6	<i>Lactobacillus casei</i>	3,5	5
7	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	5
8	<i>Lactobacillus fermentum</i>	3	5
9	<i>Lactobacillus sakei</i>	1	4,5
10	<i>Lactobacillus reuteri</i>	4	5
11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2,5	4
12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	4	4
13	<i>Lactobacillus helveticus</i>	4,5	5
14	<i>Lactobacillus gasseri</i>	4,5	4,5
15	<i>Lactobacillus brevis</i>	3,5	4,5
16	<i>Lactobacillus kefir</i>	3,5	4,5
17	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	5	5
18	<i>Pediococcus acidilactici</i>	5	5
19	Control (starter culture only)	5	5

Результаты демонстрируют, что штаммы, которые поглощают марганец, могут быть использованы для подавления *D. hansenii* and *R. mucilaginosa*, но подавление ослабляется при добавлении марганца.

Пример 4 Подавление *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Rhodotulola*, *Cryptococcus* и *Torulaspora*

В этом примере оцениваются различия в росте дрожжей в водной фазе ферментированного молока, которую готовят с заквасочной культурой с агентами, поглощающими марганец, и без них.

В таблице 7 перечислены использованные агенты, поглощающие марганец:

Таблица 7

№	Агент(ы), поглощающий(ие) марганец	Переносчик марганца
1	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i>	Да
2	<i>L. rhamnosus</i>	Да
3	<i>L. rhamnosus</i>	Да

В этом примере представлен рост дрожжей при 2 различных концентрациях марганца. Оценивали подавляющие действия в отношении 6 различных дрожжей в кисломолочных продуктах с низкой концентрацией марганца и увеличенными концентрациями марганца.

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% масс./об.) подвергали термической обработке при $90 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 20 мин и немедленно охлаждали. Имеющуюся в продаже заквасочную культуру (*Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) инокулировали в количестве 0,02% (об./масс.) в контейнеры объемом 3 л. Один контейнер инокулировали агентами, поглощающими марганец, в общей концентрации 100 Е/Т, и один контейнер использовали в качестве контрольного, инокулируя его исключительно заквасочной культурой. Все контейнеры инкубировали в водяной бане при $43 \pm 1^\circ\text{C}$ и ферментировали при этих условиях до достижения $\text{pH } 4,60 \pm 0,1$. Кисломолочные продукты аликвотировали во флаконы объемом 200 мл и охлаждали.

Кисломолочный продукт затем центрифугировали (10 мин при 5000 об/мин), и супернатант подвергали стерильной фильтрации. Супернатант переносили в стерильный 96-луночный планшет (150 мкл в каждой лунке), и к половине образцов добавляли марганец до достижения увеличения марганца до 6 млн^{-1} . Шесть различных дрожжей

отбирали и инокулировали приблизительно 20 клетками на лунку для выращивания в течение 7 суток при 17°C. В качестве контроля использовали молоко, ферментированное только с заквасочной культурой (контроль). Рост определяли путем измерения поглощения при 600 нм.

Среднее значение и стандартное отклонение для по меньшей мере 5 повторов представлены в таблицах 8-13.

Таблица 8 Подавление *Debaryomyces hansenii* (штамм 1):

	Агент(ы), поглощающий(ие) марганец	Рост дрожжей (поглощение при 600 нм)	Рост дрожжей (поглощение при 600 нм) с 6 млн ⁻¹ марганца
1	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i>	0,14 ± 0,01	0,48 ± 0,07
2	<i>L. rhamnosus</i>	0,18 ± 0,01	0,46 ± 0,05
3	<i>L. rhamnosus</i>	0,27 ± 0,01	0,62 ± 0,08
Контроль	Отсутствие	0,40 ± 0,03	

Таблица 9 Подавление *Debaryomyces hansenii* (штамм 2)

	Агент(ы), поглощающий(ие) марганец	Рост дрожжей (поглощение при 600 нм)	Рост дрожжей (поглощение при 600 нм) с 6 млн ⁻¹ марганца
1	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i>	0,01 ± 0,01	0,43 ± 0,06
2	<i>L. rhamnosus</i>	0,01 ± 0,00	0,44 ± 0,03
3	<i>L. rhamnosus</i>	0,10 ± 0,02	0,51 ± 0,06
Контроль	Отсутствие	0,33 ± 0,04	

Таблица 10 Подавление *Saccharomyces cerevisiae*

	Агент(ы), поглощающий(ие) марганец	Рост дрожжей (поглощение при 600 нм)	Рост дрожжей (поглощение при 600 нм) с 6 млн ⁻¹ марганца
1	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i>	0,51 ± 0,06	0,63 ± 0,09
Контроль	Отсутствие	0,62 ± 0,02	

Таблица 11 Подавление *Rhodotulrola mucilaginoso*

	Агент(ы), поглощающий(ие) марганец	Рост дрожжей (поглощение при 600 нм)	Рост дрожжей (поглощение при 600 нм) с 6 млн ⁻¹ марганца
1	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i>	0,15 ± 0,01	0,19 ± 0,01
2	<i>L. rhamnosus</i>	0,13 ± 0,01	0,23 ± 0,02
3	<i>L. rhamnosus</i>	0,17 ± 0,01	0,22 ± 0,02
Контроль	Отсутствие	0,24 ± 0,01	

Таблица 12 Подавление *Cryptococcus fragicola*

	Агент(ы), поглощающий(ие) марганец	Рост дрожжей (поглощение при 600 нм)	Рост дрожжей (поглощение при 600 нм) с 6 млн ⁻¹ марганца
1	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i>	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01
2	<i>L. rhamnosus</i>	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01
3	<i>L. rhamnosus</i>	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,01
Контроль	Отсутствие	0,10 ± 0,01	

Таблица 13 Подавление *Torulaspora delbrueckii*

	Агент(ы), поглощающий(ие) марганец	Рост дрожжей (поглощение при 600 нм)	Рост дрожжей (поглощение при 600 нм) с 6 млн ⁻¹ марганца
1	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i>	0,11 ± 0,00	0,16 ± 0,02
Контроль	Отсутствие	0,20 ± 0,02	

Результаты демонстрируют то, что штаммы *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Rhodotulrola*, *Cryptococcus* и *Torulaspora* могут подавляться бактериями, которые поглощают марганец, и подавляющее действие уменьшается после добавления марганца.

Пример 5 Подавление *Debaryomyces hansenii*

В этом примере оценивается влияние различных концентраций марганца в ферментированном молоке, приготовленном с заквасочной культурой, с агентами, поглощающими марганец, и без них.

В таблице 14 перечислены использованные агенты, поглощающий марганец:

Таблица 14

№.	Агент(ы), поглощающий(ие) марганец	Содержит переносчик марганца
1	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i>	Да
2	<i>L. rhamnosus</i>	Да
3	<i>L. rhamnosus</i>	Да

Кисломолочный продукт готовили как в примере 4.

150 мкл ферментированного молока переносили в отдельные лунки 96-луночного планшета в двух или трех параллелях. Осуществляли серийное разведение, результатом которого стало то, что добавляли различные концентрации марганца, начиная с 6 млн^{-1} до $0,000006 \text{ млн}^{-1}$. Все лунки инокулировали приблизительно 20 клетками *Debaryomyces hansenii* (штамм 2), и планшеты инкубировали при 17°C в течение 5 суток. После этого 10 мкл 1000-кратного разведения, приготовленного в солевом пептоне, наносили в избирательные планшеты YGC для анализа роста дрожжей.

На фиг. 5 представлен рост *Debaryomyces hansenii* в ферментированном молоке, приготовленном с агентами, поглощающими марганец (№ 1, № 2 и № 3) и без агентов, поглощающих марганец (REF), после добавления различных концентраций марганца: 6 млн^{-1} (верхний ряд), $0,6 \text{ млн}^{-1}$ (ряд 2), $0,06 \text{ млн}^{-1}$ (ряд 3), $0,006 \text{ млн}^{-1}$ (ряд 4), $0,0006 \text{ млн}^{-1}$ (ряд 5), $0,00006 \text{ млн}^{-1}$ (ряд 6), $0,000006 \text{ млн}^{-1}$ (ряд 7) и 0 млн^{-1} (нижний ряд).

В соответствии с представленным ростом дрожжей в ферментированном молоке с агентом(ами), поглощающим(ими) марганец № 1 и № 2, подавлялся после добавления $0,6 \text{ млн}^{-1}$ (сравните ряд 3 с рядом 2); добавление $0,006 \text{ млн}^{-1}$ приводило в результате к некоторому росту дрожжей в присутствии агента, поглощающего марганец № 3.

Пример 6 Подавление дрожжей в кисломолочном продукте с различными уровнями марганца

Оценивали влияние марганца на подавляющее действие против различных видов плесневых грибов. Использовали анализ на агаре, аналогичном способу приготовления и производства кисломолочных продуктов. *L. rhamnosus* и *L. paracasei* использовали вместе в качестве агентов, поглощающих марганец.

Приготовление кисломолочных образцов:

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% масс./об.) подвергали термической обработке при $90 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 20 мин и немедленно охлаждали. Имеющуюся в продаже заквасочную культуру (*Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) инокулировали в количестве 0,02% (об./масс.) в контейнеры объемом 3 л. Один контейнер инокулировали агентами, поглощающими марганец, в общей концентрации 100 Е/Т, и контейнер использовали в качестве контрольного, инокулируя его исключительно заквасочной культурой. Все контейнеры инкубировали в водяной бане при $43 \pm 1^\circ\text{C}$ и ферментировали при этих условиях до достижения $\text{pH } 4,60 \pm 0,1$. Кисломолочные продукты аликвотировали во флаконы объемом 200 мл и охлаждали. Определенная ранее концентрация марганца, уже присутствующего в контрольном продукте, составляла приблизительно $0,03 \text{ млн}^{-1}$ и в продукте со штаммами, поглощающими марганец, ниже порога обнаружения, составляющего $0,003 \text{ млн}^{-1}$.

Добавление марганца:

Различные концентрации марганца добавляли в кисломолочные продукты с агентом, поглощающим марганец, и без него, для достижения добавления уровней марганца (0, 0,006 и 6 млн^{-1} марганца в контрольных продуктах и 0, 0,000006, 0,00006, 0,0006, 0,006, 0,06, 0,6 и 6 млн^{-1} марганца).

Все образцы ферментированного молока нагревали до температуры 40°C и добавляли 40 мл 5% стерильного раствора агара, который расплавили и охладили до 60°C . Этот раствор ферментированного молока и агара затем выливали в стерильные чашки Петри и планшеты сушили в ламинарном боксе в течение 30 мин.

Нагрузочный тест с использованием дрожжей:

Три целевых источника контаминации, включающие два *Debaryomyces hansenii* (штамм 1 и штамм 2) и один *Cryptococcus fragicola* наносили в концентрациях 10^3 , 10^2 и 10^1 КОЕ/пятно. Планшеты инкубировали при $7 \pm 1^\circ\text{C}$ и регулярно исследовали в отношении роста дрожжей.

Результаты:

Результаты анализа дрожжей на агаре представлены на фиг. 6, демонстрирующей рост 3 различных дрожжей на планшетах, приготовленных с молоком, ферментированным только с заквасочной культурой (контроль, верхний ряд) или вместе с агентами, поглощающими марганец (нижний ряд). Добавляли различные концентрации марганца, как представлено выше на графических материалах. Три целевых источника

контаминации (столбец А: *Debaryomyces hansenii* (штамм 2), столбец В: *Cryptococcus fragicola*, столбец С: *Debaryomyces hansenii* (штамм 1) добавляли в трех различных концентрациях: 1×10^3 КОЕ/пятно (верхний ряд на планшете), 1×10^2 КОЕ/пятно (средний ряд на планшете) и 1×10^1 КОЕ/пятно (нижний ряд на планшете).

Как можно видеть на фиг. 6, протестированные дрожжи хорошо росли на агаровых планшетах, приготовленных на основе молока, ферментированного только с заквасочной культурой (контроль). Тем не менее, когда агенты, поглощающие марганец, присутствуют во время ферментации молока, разрастание всех дрожжей замедлялось.

При уровнях марганца до $0,0006 \text{ млн}^{-1}$ агент, поглощающий марганец, сохраняет высокую подавляющую активность в отношении всех трех видов дрожжей. При уровнях марганца от $0,006 \text{ млн}^{-1}$ до $0,6 \text{ млн}^{-1}$ подавляющая активность агента, поглощающего марганец, в отношении *C. fragicola* уменьшалась. Концентрация марганца 6 млн^{-1} по видимому подавляет рост *C. fragicola*. *D. hansenii* (штамм 1) подавлялся агентом, поглощающим марганец, при уровнях марганца до $0,006 \text{ млн}^{-1}$. При уровнях марганца $0,06 \text{ млн}^{-1}$ и выше агент, поглощающий марганец, утрачивает подавляющее действие в отношении *D. hansenii* (штамм 1). *D. hansenii* (штамм 2) подавлялся агентом, поглощающим марганец, при уровнях марганца до $0,6 \text{ млн}^{-1}$, и при 6 млн^{-1} марганца активность утрачивалась.

Пример 7 Подавление плесневых грибов в кисломолочном продукте с различными уровнями марганца

Образцы кисломолочного продукта с различными уровнями марганца готовили как описано в примере 6.

Нагрузочный тест с использованием плесневых грибов:

Фиг.7 демонстрирует рост 3 различных штаммов плесневых грибов в планшетах, приготовленных с молоком, ферментированным только с заквасочной культурой (контроль, верхний ряд) или дополнительно вместе с агентом, поглощающим марганец (нижний ряд). Дополнительно добавляли различные концентрации марганца, как показано выше над фигурой. Три целевых источника контаминации (А: *Penicillium brevicompactum*, В: *Penicillium crustosum* и С: *Penicillium solitum*) добавляли в концентрациях 500 спор/пятно. Планшеты инкубировали при $7 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 25 суток.

Фиг. 8 показывает рост 3 различных штаммов плесневых грибов на планшетах, приготовленных с молоком, ферментированным только с заквасочной культурой (контроль, верхний ряд) или вместе с агентом, поглощающим марганец (нижний ряд). Дополнительно добавляли различные концентрации марганца, как показано выше над

фигурой. Три целевых источника контаминации (А: *Penicillium brevicompactum*, В: *Penicillium crustosum* и С: *Penicillium solitum*) добавляли в концентрациях 500 спор/пятно. Планшеты инкубировали при $22 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 8 суток.

Фиг. 9 показывает рост 3 различных штаммов плесневых грибов в планшетах, приготовленных с молоком, ферментированным только с заквасочной культурой (контроль, верхний ряд) или дополнительно с агентом, поглощающим марганец (нижний ряд). Дополнительно добавляли различные концентрации марганца, как показано выше над фигурой. Три целевых источника контаминации (А: *Penicillium carneum*, В: *Penicillium paneum* и С: *Penicillium roqueforti*) добавляли в концентрациях 500 спор/пятно. Планшеты инкубировали при $7 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 25 суток.

Фиг.10 демонстрирует рост 3 различных штаммов плесневых грибов на планшетах, приготовленных с молоком, ферментированным только с заквасочной культурой (контроль, верхний ряд) или дополнительно с агентом, поглощающим марганец (нижний ряд). Дополнительно добавляли различные концентрации марганца, как представлено выше над фигурой. Три целевых источника контаминации (А: *Penicillium carneum*, В: *Penicillium paneum* и С: *Penicillium roqueforti*) добавляли в концентрациях 500 спор/пятно. Планшеты инкубировали при $22 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 8 суток.

Все протестированные штаммы плесневых грибов очень хорошо росли на агаровых планшетах, приготовленных на основе молока, ферментированного только с заквасочной культурой (контроль). Тем не менее, когда агенты, поглощающие марганец, присутствовали во время ферментации молока, разрастание всех протестированных штаммов плесневых грибов подавлялось. Подавляющее действие было более сильным при низкой температуре (фиг. 7 и 9).

Агент, поглощающий марганец, сохранял высокую подавляющую активность в отношении всех штаммов плесневых грибов при дополнительных уровнях марганца до $0,006 \text{ млн}^{-1}$. При уровнях марганца от $0,06 \text{ млн}^{-1}$ и выше подавляющее действие агентов, поглощающих марганец, уменьшалось. Агенты, поглощающие марганец, утрачивали большую часть подавляющего действия при 6 млн^{-1} в отношении чувствительных (фиг. 7 и 8) и при $0,06 \text{ млн}^{-1}$ в отношении малочувствительных штаммов плесневых грибов (фиг. 9 и 10).

Более высокая добавленная концентрация марганца, которая уменьшает подавляющее действие, обнаруженное в этом анализе по сравнению с концентрациями, обнаруженными в водной фазе, является следствием непрерывного потребления живым и метаболически активным агентом, поглощающим марганец, в кисломолочном продукте.

Пример 8 Подавление *Debaromyces hansenii* в водной фазе и при различных концентрациях химического хелатирующего вещества

В примере 8 использовали две концентрации марганца 6 млн^{-1} и $0,6 \text{ млн}^{-1}$. Показано, что концентрация 6 млн^{-1} обладает подавляющим/токсическим действием в отношении роста дрожжей, тогда как $0,6 \text{ млн}^{-1}$ использовали в качестве стандартной концентрации, которой достаточно для устранения дефицита марганца, вызванного одним или более чем одним бактериальным штаммом, действующим в качестве агентов, поглощающих марганец.

Фиг. 12 и 13 демонстрируют, что химическое хелатирующее вещество, такое как EDTA, обладает подавляющим действием в отношении роста *Debaromyces hansenii* в водной фазе.

На фиг. 12 представлено, что клетки *Debaromyces hansenii* останавливают рост, когда сталкиваются с концентрацией $0,05 \text{ мг/мл}$ EDTA. Таким образом, EDTA демонстрирует подавляющее действие в концентрации $0,05 \text{ мг/мл}$.

На фиг. 13 представлено, что при концентрации $0,05 \text{ мг/мл}$ EDTA и в отсутствие марганца ($0,6 \text{ млн}^{-1}$) *Debaromyces hansenii* прекращают расти; таким образом, EDTA обладает подавляющим действием в отношении *Debaromyces hansenii* в этих условиях. Добавление $0,6 \text{ млн}^{-1}$ марганца и $0,05 \text{ мг/мл}$ EDTA восстанавливает рост *Debaromyces hansenii*, и действие EDTA прекращается при избытке марганца.

Пример 9 Подавление *Debaryomyces hansenii* в йогурте

В йогурте возможно воспроизвести подавление агентами, поглощающими марганец, выбранными из одного или более чем одного бактериального штамма (агент 1, поглощающий марганец), путем добавления в йогурт до $0,89 \text{ мг/мл}$ EDTA, представляющего собой агент, поглощающий марганец. В указанной концентрации используемый в качестве контроля йогурт демонстрировал подавление, близкое к обнаруживаемому тогда, когда добавляют агент 1, поглощающий марганец. Отрицательные контроли в нижнем ряду на фиг. 14 (без добавления EDTA) демонстрируют нормальное подавление в присутствии агента 1, поглощающего марганец, и восстанавливали рост дрожжей при добавлении марганца.

В примере 9 представлено, что химическое хелатирующее вещество, такое как EDTA, обладает тем же самым действием, как агенты, поглощающие марганец, выбранные из одной или более чем одной раскрытой здесь бактерии (фиг. 14). Следовательно, в примере 9 продемонстрировано, что EDTA обладает тем же самым

действием, как один или более чем один бактериальный штамм, раскрытый здесь в качестве агентов, поглощающих марганец.

Агенты, поглощающие марганец, как химическое хелатирующее вещество, так и/или биологический материал, такой как один или более чем один бактериальный штамм, находящиеся в данном продукте, таком как продукт питания, приводят к истощению марганца для вызывающих порчу грибов, таким образом, подавляя рост грибов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ подавления или задержки роста грибов в продукте, включающий стадию уменьшения уровня свободного марганца в продукте до концентрации менее чем приблизительно $0,01 \text{ млн}^{-1}$ в продукте, где стадия уменьшения уровня свободного марганца в продукте включает добавление одного или более чем одного агента, поглощающего марганец, где агент, поглощающий марганец, представляет собой один или более чем один бактериальный штамм и/или химическое хелатирующее вещество.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию измерения концентрации свободного марганца в продукте и достижения величины менее $0,01 \text{ млн}^{-1}$.

3. Способ по любому из пп. 1-2, где грибы представляют собой дрожжи или плесневые грибы.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где грибы представляют собой дрожжи, выбранные из группы, состоящей из *Torulaspora* spp., *Cryptococcus* spp., *Saccharomyces* spp., *Yarrowia* spp., *Debaryomyces* spp., *Candida* spp. и *Rhodotulola* spp., или где грибы представляют собой плесневые грибы, выбранные из группы, состоящей из *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Didymella* spp. или *Penicillium* spp.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где продукт представляет собой пищевой продукт.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где продукт представляет собой ферментированный продукт.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где продукт представляет собой термофильный или мезофильный ферментированный пищевой продукт.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где уровень свободного марганца в продукте уменьшают до концентрации менее чем приблизительно $0,005 \text{ млн}^{-1}$.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где стадия уменьшения уровня свободного марганца в продукте включает использование ионообменной хроматографии.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где химическое хелатирующее вещество выбрано из группы, состоящей из этилендиаминтетрауксусной кислоты, этиленгликоль-бис-(β -аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты, диаминоциклогексантиуксусной кислоты, нитрилотриуксусной кислоты, 1,2-бис-(α -аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты или диэтилентриаминпентауксусной кислоты, предпочтительно химическое хелатирующее вещество представляет собой этилендиаминтетрауксусную кислоту.

11. Способ по любому из пп. 1-10, дополнительно включающий стадию выбора

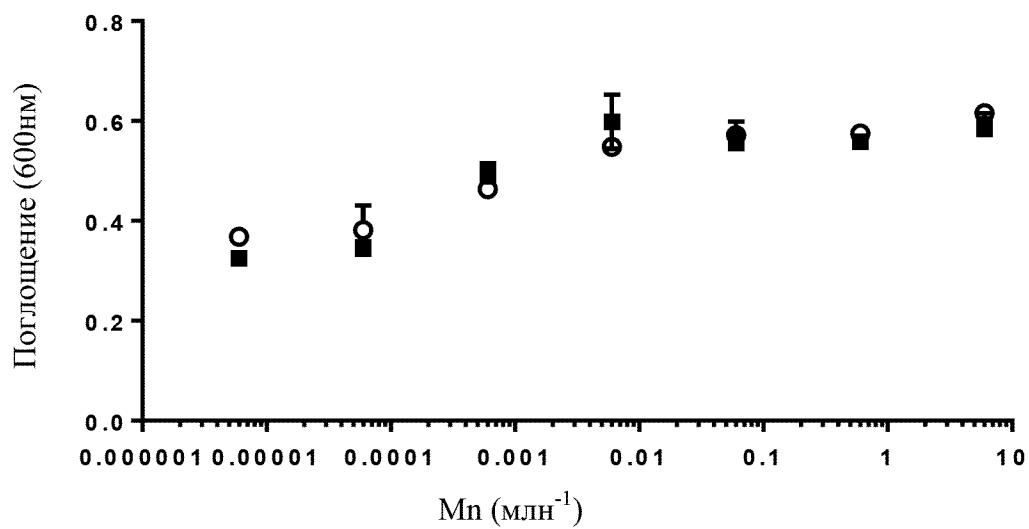
одного или более чем одного бактериального штамма в качестве агента, поглощающего марганец.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где стадия выбора включает определение того, содержит ли один или более чем один бактериальный штамм переносчик марганца, обладающий по меньшей мере 55% идентичностью последовательности, такой как по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность, с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-3.

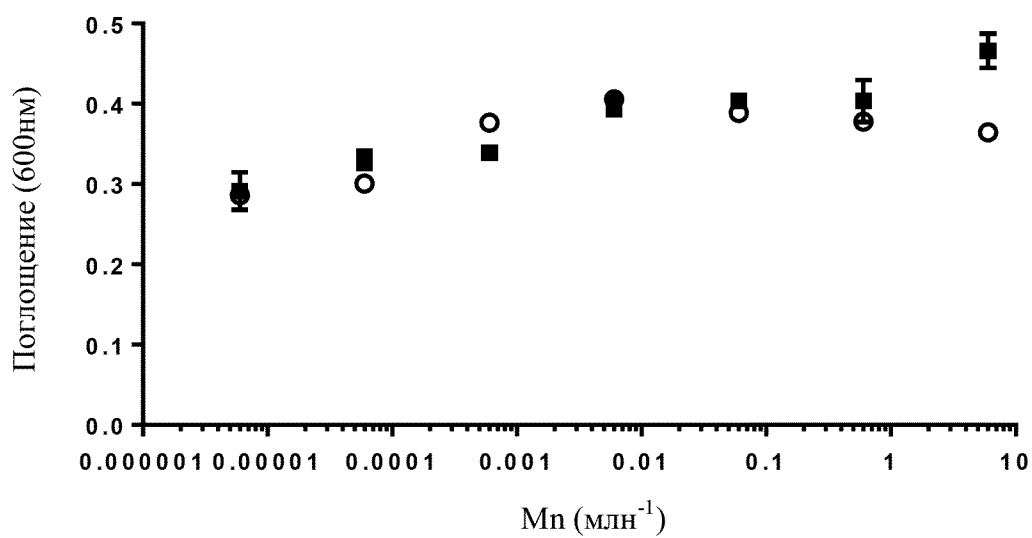
13. Способ по любому из пп. 1-12, где стадия выбора включает определение того, что один или более чем один бактериальный штамм не содержит супероксиддисмутазу, предпочтительно не содержит супероксиддисмутазу марганца.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где стадия выбора включает измерение активности поглощения марганца одним или более чем одним бактериальным штаммом.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где стадия уменьшения уровня свободного марганца включает добавление в качестве агента, поглощающего марганец, одной или более чем одной молочнокислой бактерии, возможно выбранной из группы, состоящей из *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus alimentarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus kefir*.

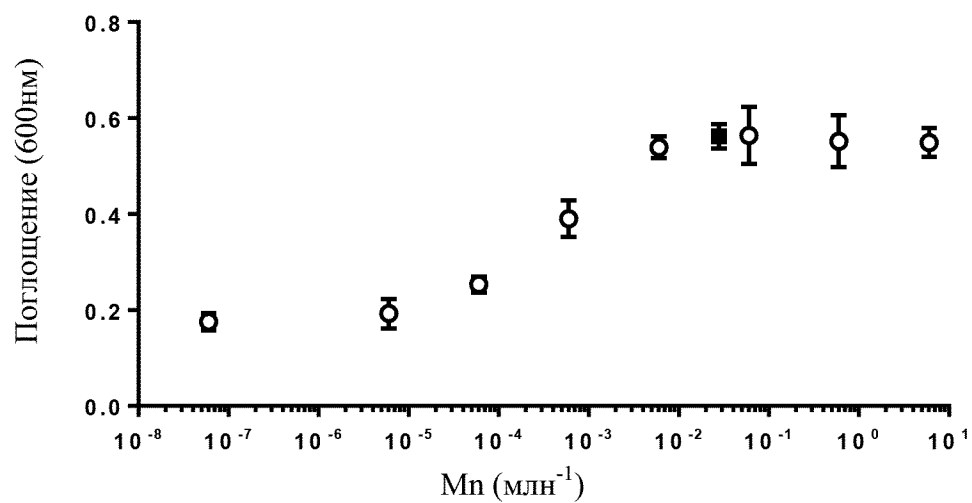


ФИГ. 1



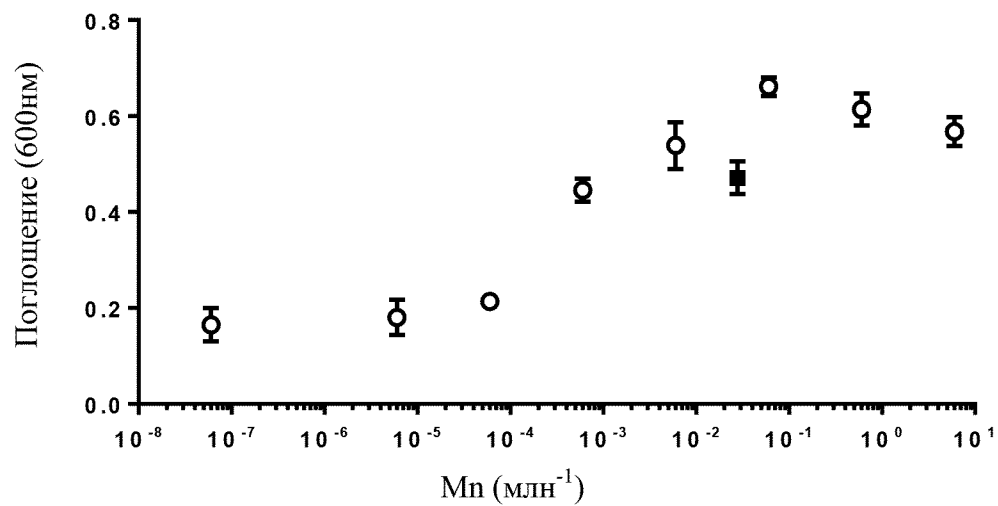
ФИГ. 2

7 сутки

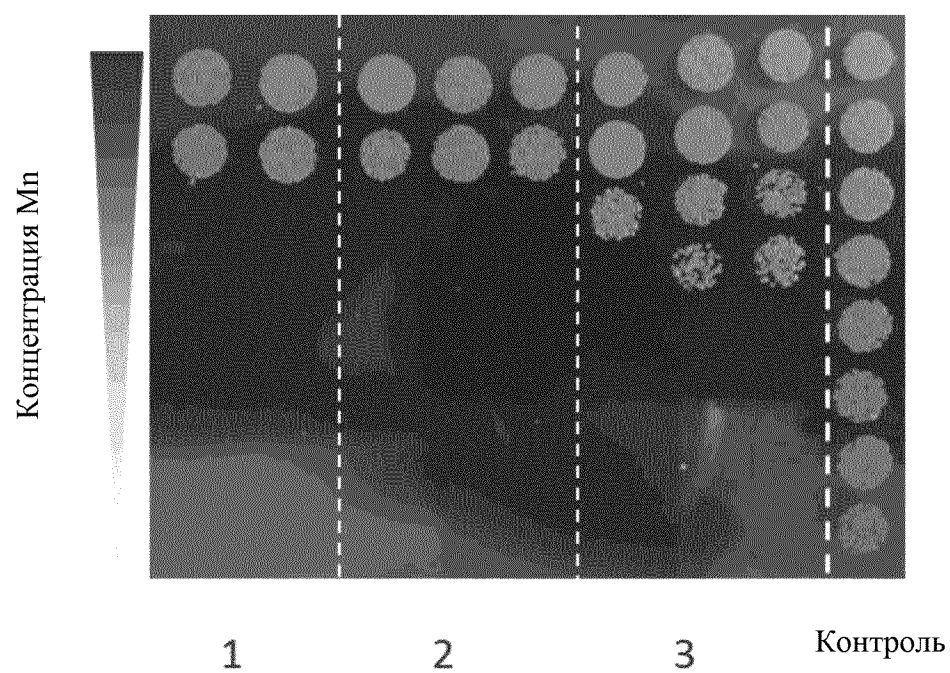


ФИГ. 3

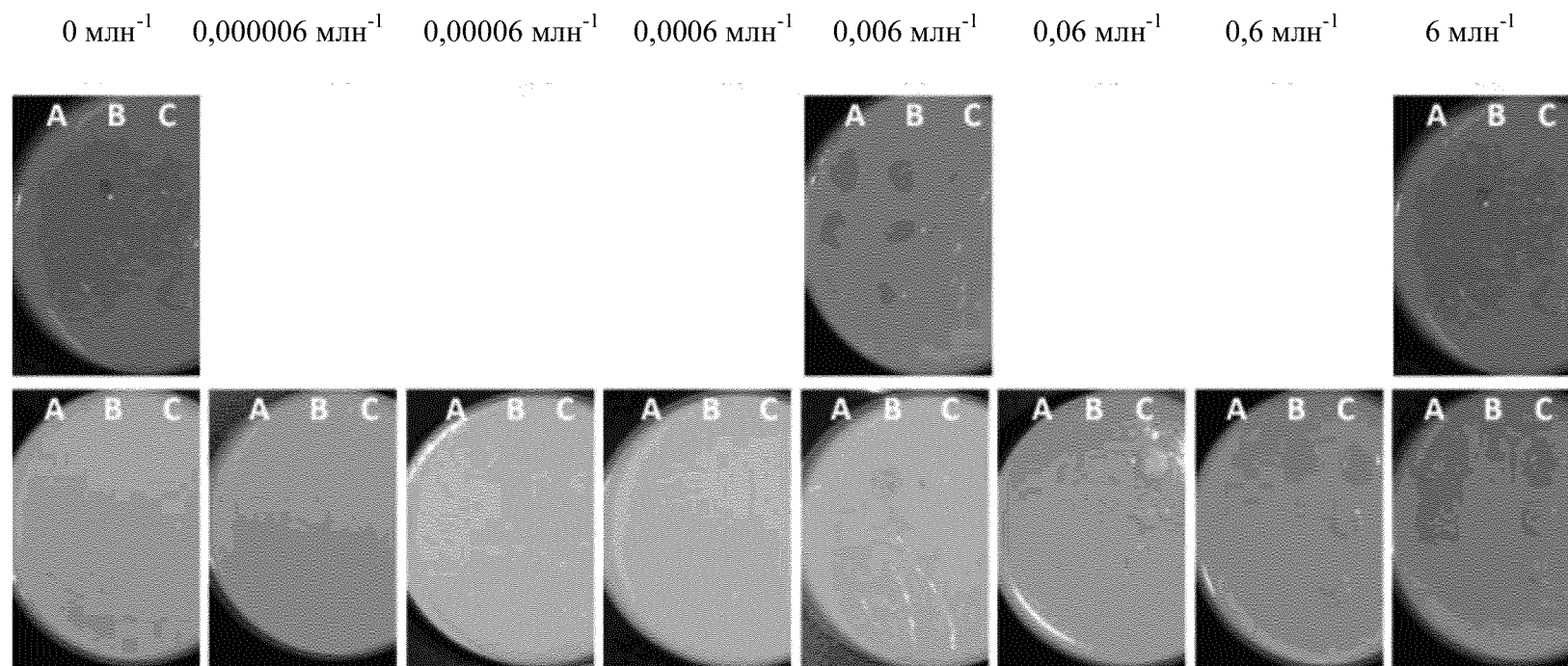
7 сутки



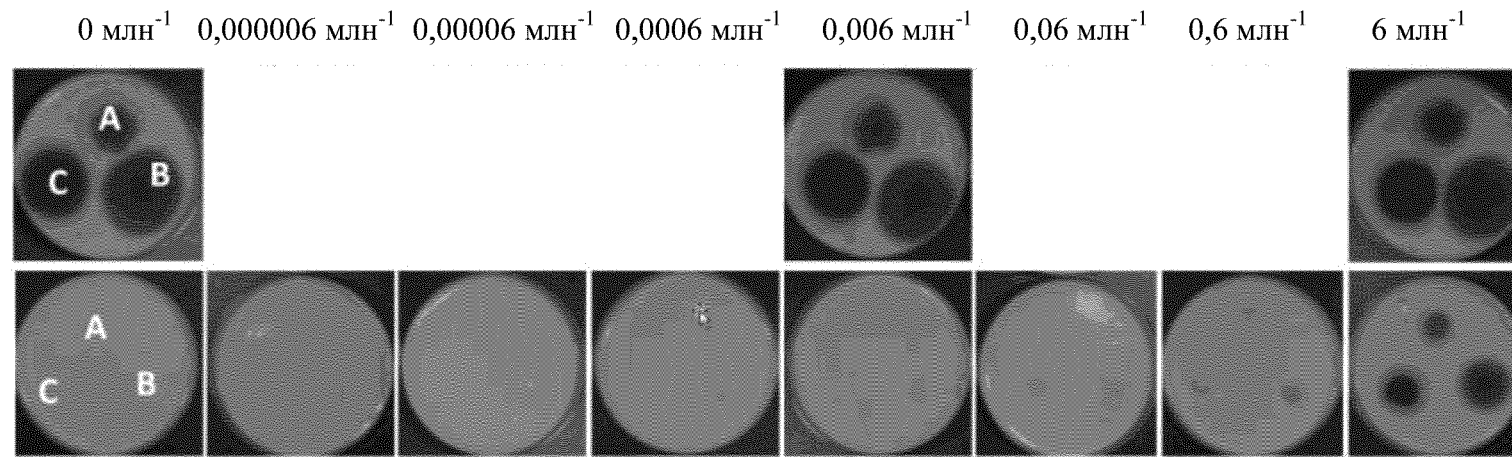
ФИГ. 4



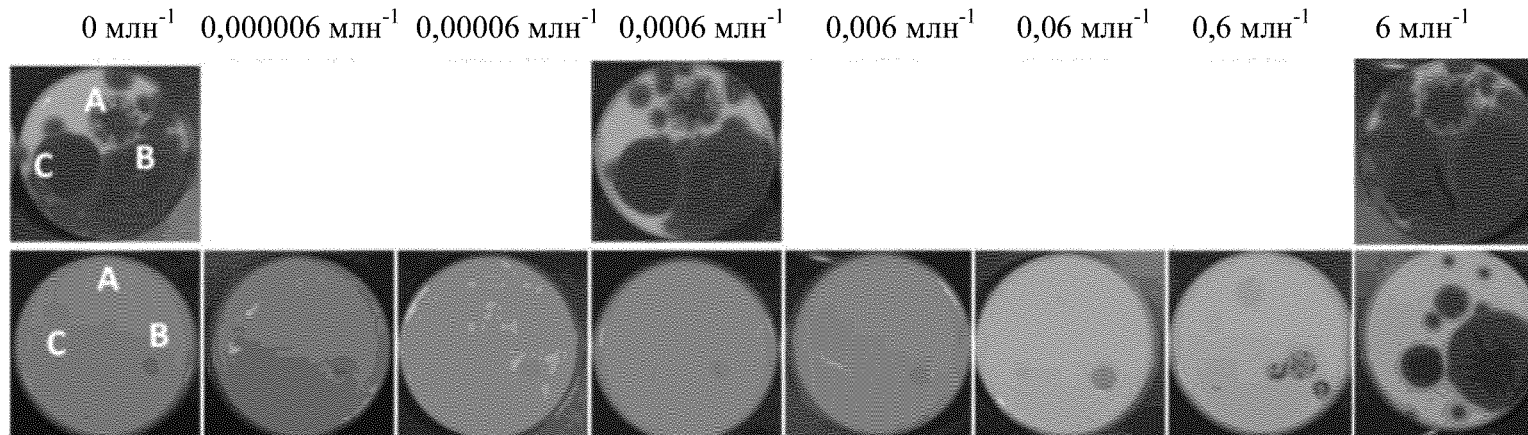
ФИГ. 5



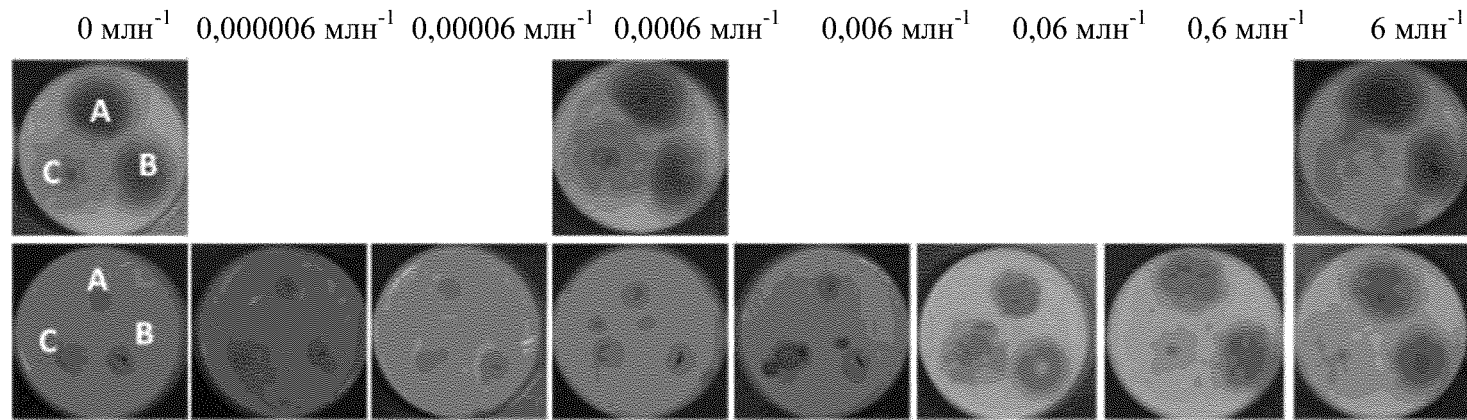
ФИГ. 6



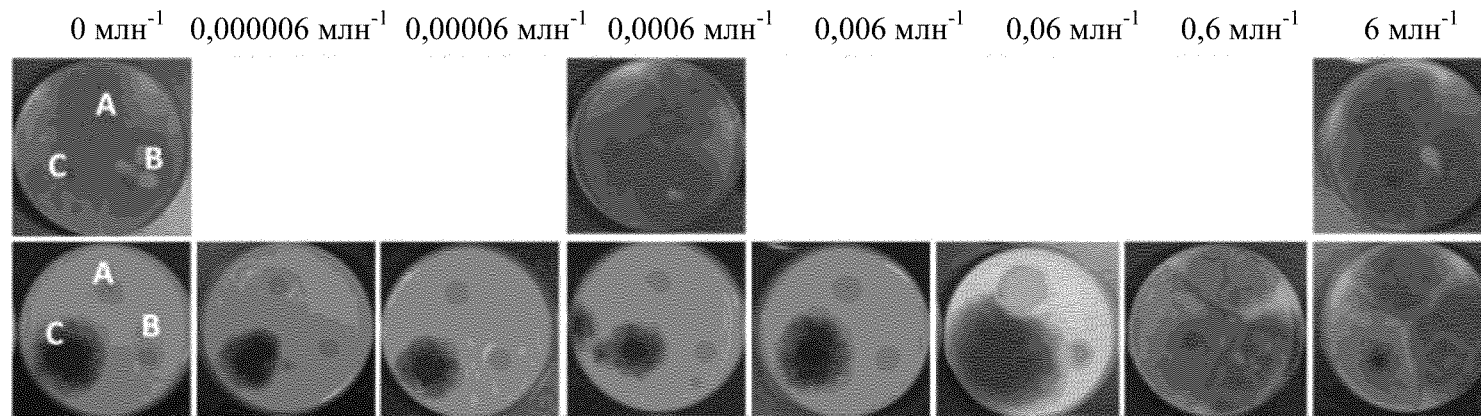
ФИГ. 7



ФИГ. 8



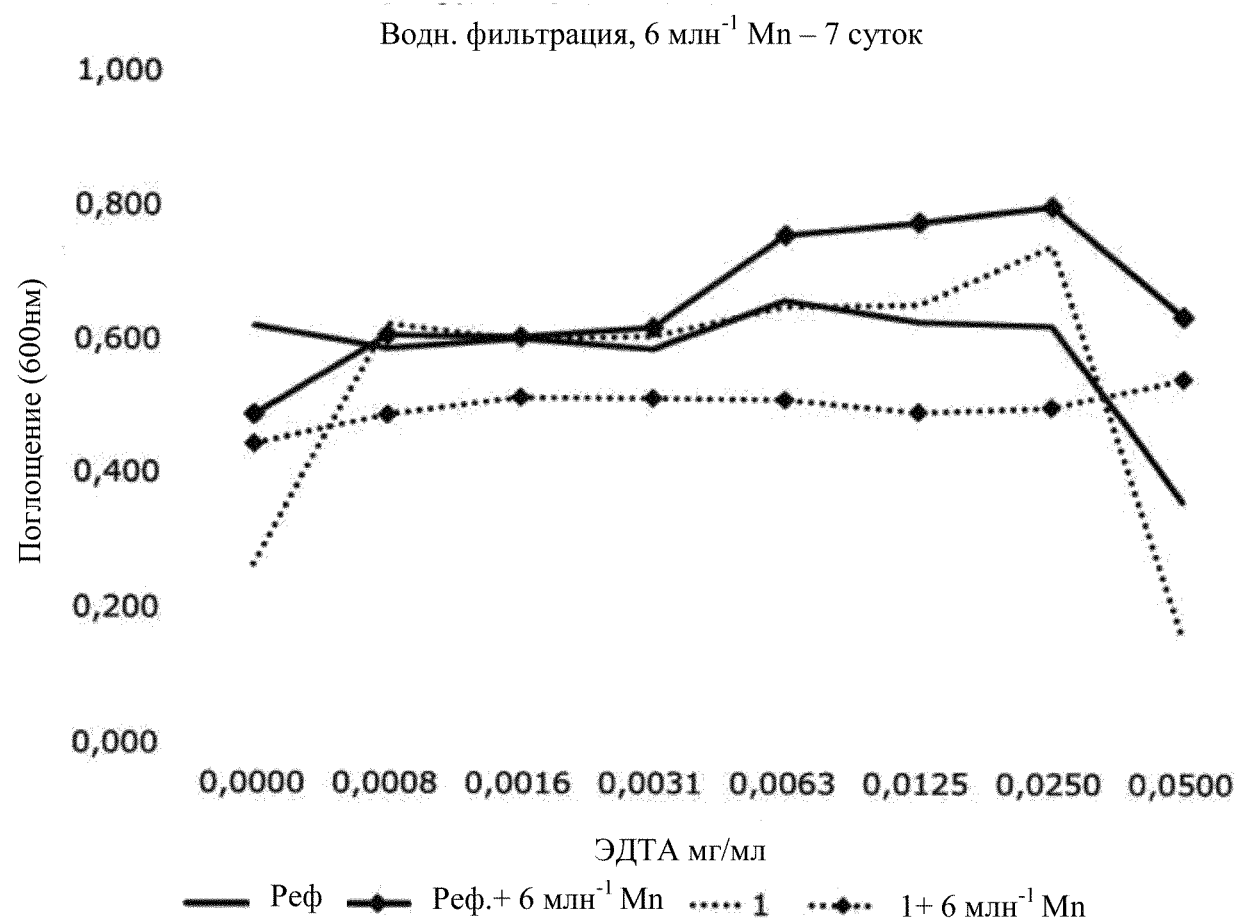
ФИГ. 9



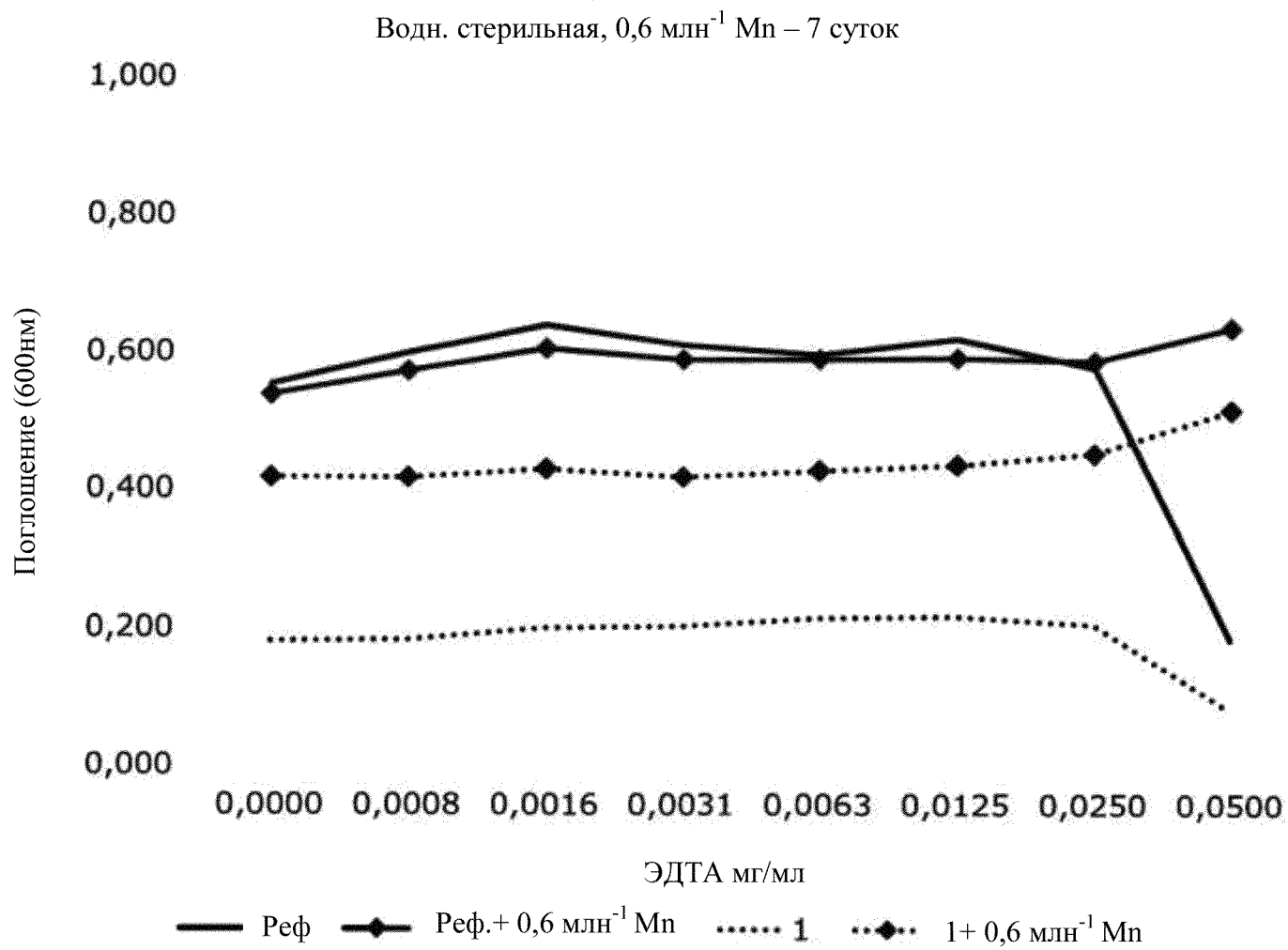
ФИГ. 10



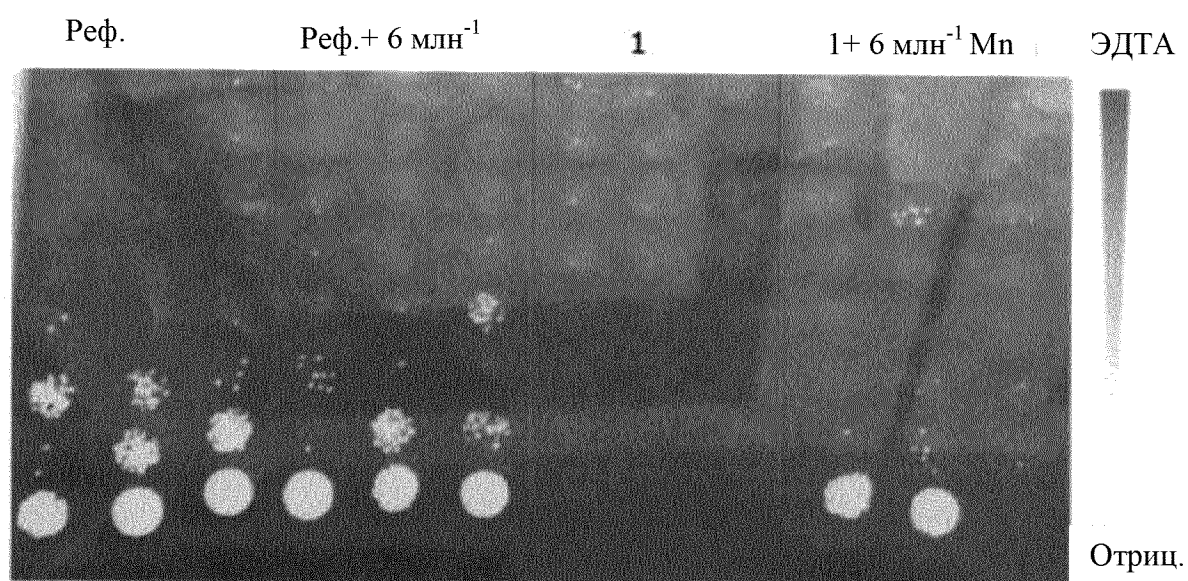
ФИГ. 11



ФИГ. 12



ФИГ. 13



ФИГ. 14