

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092407** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2021.02.17

(51) Int. Cl. *A23C 9/123* (2006.01)  
*A23C 9/12* (2006.01)  
*C12R 1/46* (2006.01)  
*C12R 1/225* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.04.17

---

(54) **КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА, ВКЛЮЧАЮЩИЙ ПРИМЕНЕНИЕ ЛАКТОЗОДЕФИЦИТНОГО ШТАММА *S. THERMOPHILUS*, ЛАКТОЗОДЕФИЦИТНОГО ШТАММА *L. BULGARICUS* И ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА**

---

(31) 18168954.8; 18194018.0

(32) 2018.04.24; 2018.09.12

(33) EP

(86) PCT/EP2019/059876

(87) WO 2019/206754 2019.10.31

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

(72) Изобретатель:

Рунге Метте Орстрём, Блок Соня  
(DK), Хань Хуэй (CN)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,  
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

---

(57) Настоящее изобретение относится к композиции для получения кисломолочного продукта, демонстрирующего низкую степень последующего подкисления во время хранения, содержащей 1) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Vifidobacterium*.

**A1**

**202092407**

**202092407**

**A1**

**Композиция и способ получения кисломолочного продукта, включающий применение лактозодефицитного штамма *S. thermophilus*, лактозодефицитного штамма *L. bulgaricus* и пробиотического штамма**

**ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к композиции и к способу получения кисломолочного продукта.

**ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

В EP-A1-2957180 раскрыт способ получения кисломолочного продукта с использованием лактозодефицитных молочнокислых бактерий, в частности лактозодефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* и штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, которые способны метаболизировать нелактозные углеводы.

При ферментации молока с использованием заквасочной культуры, содержащей лактозодефицитные молочнокислые бактерии, в начале ферментации в молочную основу добавляют нелактозный углевод, такой как сахароза, глюкоза или галактоза, в количестве, отмеренном таким образом, чтобы оно истощалось при целевом pH, и, следовательно, это приводило к остановке роста молочнокислых бактерий и к прекращению ферментации. Таким образом, последующее подкисление при последующем хранении значительно снижается или даже полностью предотвращается.

Однако когда желательно получить кисломолочные продукты, содержащие добавленную сахарозу для подслащивания продукта, существует риск того, что это приведет к неприемлемой степени последующее подкисления во время хранения, в частности при повышенных температурах.

Пробиотические штаммы, такие как штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированный как ATCC53103, широко используются в кисломолочных продуктах. Однако во многих кисломолочных продуктах пробиотические штаммы растут во время хранения, в частности при повышенных температурах, что может привести к нежелательному последующему подкислению.

**Краткое изложение сущности изобретения**

Задачей настоящего изобретения является предложение композиции для получения

кисломолочного продукта с улучшенными свойствами последующего окисления.

Задачей настоящего изобретения является получение композиции для производства кисломолочного продукта, содержащей

- 1) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и
- 2) пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*.

Настоящее изобретение основано на неожиданном экспериментальном обнаружении того, что, при использовании заквасочной культуры, состоящей из лактозодефицитных штаммов в комбинации с пробиотическим штаммом, проблемы, связанные с последующим подкислением, ассоциированным как с указанной заквасочной культурой, так и с указанным пробиотическим штаммом, значительно уменьшаются. В частности, когда в кисломолочный продукт добавляют подслащивающий углевод, такой как сахароза, уровень последующего подкисления, вызванного закваской, во время хранения кисломолочного продукта, сильно снижается. Также сильно снижается уровень последующего подкисления, вызванного пробиотическим штаммом, при хранении кисломолочного продукта.

Кроме того, при ферментации молочной основы с получением кисломолочного продукта, композиции по изобретению требуется меньшее время ферментации по сравнению с соответствующей композицией, не содержащей пробиотического штамма.

Настоящее изобретение также относится к способу получения кисломолочного продукта, включающему следующие стадии:

- 1) добавление к молочной основе заквасочной культуры молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод,
- 2) ферментация молочной основы в течение некоторого периода времени вплоть до достижения целевого pH с получением кисломолочного продукта, а также
- 3) добавление пробиотического штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, в процесс.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Лактозодефицитные молочнокислые бактерии

Термины “дефицит метаболизма лактозы” и “лактозодефицитные” используются в контексте настоящего изобретения для характеристики LAB (молочнокислых бактерий), которые либо частично, либо полностью утратила способность использовать лактозу в качестве источника клеточного роста или для поддержания жизнеспособности клеток. Соответствующие LAB способны метаболизировать один или несколько углеводов, выбранных из сахарозы, галактозы и/или глюкозы или другого ферментируемого углевода. Поскольку эти углеводы естественным образом не присутствуют в молоке в количестве, достаточном для поддержания ферментации лактозодефицитными мутантами, необходимо добавлять такие углеводы в молоко. Лактозодефицитные и частично дефицитные LAB могут быть охарактеризованы как белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D -галактопиранозид).

В конкретном воплощении изобретения лактозодефицитный штамм способен метаболизировать нелактозный углевод, выбранный из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы, предпочтительно сахарозы. В конкретном воплощении изобретения лактозодефицитный штамм способен метаболизировать галактозу.

В конкретном воплощении изобретения лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из:

- (a) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12, с регистрационным номером DSM 28952;
- (2) штамма, имеющего происхождение от DSM 28952, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;
- (б) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с регистрационным номером DSM 28953;
- (2) штамма, имеющего происхождение от DSM 28953, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;
- (в) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2017-08-22 с регистрационным номером DSM 32599;

- (2) штамма, имеющего происхождение от DSM 32599, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal; и
- (г) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2017-08-22 с регистрационным номером DSM 32600; и
- (2) штамма, имеющего происхождение от DSM 32600, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

В конкретном воплощении изобретения лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из:

- (а) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с регистрационным номером DSM 28952;
- (2) штамма, имеющего происхождение от DSM 28952, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal; и
- (б) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с регистрационным номером DSM 28953; и
- (2) штамма, имеющего происхождение от DSM 28953, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

В конкретном воплощении изобретения лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из:

- (в) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2017-08-22 с регистрационным номером DSM 32599;
- (2) штамма, имеющего происхождение от DSM 32599, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal; и
- (г) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2017-08-22 с регистрационным номером DSM 32600; и

- (2) штамма, имеющего происхождение от DSM 32600, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

В конкретном воплощении изобретения лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* выбран из группы, состоящей из:

- (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с регистрационным номером DSM 28910; и
- (2) штамма, имеющего происхождение от DSM 28910, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

### **Пробиотический штамм**

Термин “пробиотические бактерии” относится к жизнеспособным бактериям, которые вводят потребителю в достаточных количествах с целью достижения оздоровительного эффекта у потребителя. Пробиотические бактерии способны выживать в условиях желудочно-кишечного тракта после приема внутрь и колонизировать кишечник потребителя. В конкретном воплощении изобретения пробиотический штамм по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из бактерий рода *Lactobacillus*, таких как *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* и *Lactobacillus johnsonii*, рода *Bifidobacterium*, таких как *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* и *Bifidobacterium infantis*, и подобных.

В конкретном воплощении изобретения пробиотический штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* и *Lactobacillus johnsonii*.

В конкретном воплощении изобретения пробиотический штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus* и штамма *Lactobacillus paracasei*.

В конкретном воплощении изобретения пробиотический штамм представляет собой штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированный как ATCC53103.

В конкретном воплощении изобретения пробиотический штамм представляет собой штамм *Lactobacillus paracasei* CRL 431, депонированный как ATCC 55544.

В конкретном воплощении изобретения пробиотический штамм *Bifidobacterium* выбран из группы, состоящей из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* и *Bifidobacterium infantis*.

В конкретном воплощении изобретения пробиотический штамм *Bifidobacterium* представляет собой штамм *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, депонированный как DSM15954.

#### **Композиция по изобретению**

В конкретном воплощении композиция содержит два или более лактозодефицитных штамма *Streptococcus thermophilus* и один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

В конкретном воплощении композиции нелактозный углевод выбран из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы.

В конкретном воплощении настоящего изобретения композиция содержит от  $10^4$  до  $10^{12}$  КОЕ (колониеобразующих единиц)/г штамма *Streptococcus thermophilus*, например от  $10^5$  до  $10^{11}$  КОЕ/г, например от  $10^6$  до  $10^{10}$  КОЕ/г или например от  $10^7$  до  $10^9$  КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus*.

В конкретном воплощении композиция дополнительно содержит от  $10^4$  до  $10^{12}$  КОЕ/г штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, например от  $10^5$  до  $10^{11}$  КОЕ/г, например от  $10^6$  до  $10^{10}$  КОЕ/г или например от  $10^7$  до  $10^9$  КОЕ/г штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* и другие молочнокислые бактерии обычно используют в качестве заквасок, служащих для технологических целей, в производстве различных пищевых продуктов, например в молочной промышленности, например для кисломолочных продуктов. Таким образом, в другом предпочтительном воплощении композиция подходит для использования в качестве закваски.

Закваски могут быть созданы в виде замороженных или высушенных заквасок в дополнение к жидким закваскам. Так, в еще одном предпочтительном воплощении композиция находится в замороженном, сублимированном или жидком виде.

Как раскрыто в WO 2005/003327, к закваске полезно добавлять некоторые

криопротекторные агенты. Таким образом, композиция закваски по настоящему изобретению может содержать один или более криопротекторных агентов, выбранных из группы, состоящей из инозин-5'-монофосфата (IMP), аденозин-5'-монофосфата (AMP), гуанозин-5'-монофосфата (GMP), уранозин-5'-монофосфата (UMP), цитидин-5'-монофосфата (CMP), аденина, гуанина, урацила, цитозина, аденозина, гуанозина, уридина, цитидина, гипоксантина, ксантина, гипоксантина, оротидина, тимидина, инозина и производного любого из этих соединений.

### **Способ по изобретению**

Настоящее изобретение также относится к способу получения кисломолочного продукта, включающему следующие стадии:

1) добавление к молочной основе закваски молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод,

2) ферментация молочной основы в течение некоторого периода времени вплоть до достижения целевого pH с получением кисломолочного продукта, а также

3) добавление пробиотического штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium* в процесс.

В конкретном воплощении изобретения лактозодефицитные штаммы способны метаболизировать нелактозный углевод, выбранный из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы, предпочтительно сахарозу.

В конкретном воплощении изобретения нелактозный углевод добавляют к молочной основе в начале стадии ферментации.

В конкретном воплощении изобретения стадию ферментации завершают методом, выбранным из группы, состоящей из 1) подкисление кисломолочного продукта, делающее по крайней мере один штамм закваски неспособным расти, 2) охлаждение и 3) истощение нелактозного углевода.

Предпочтительно, нелактозный углевод добавляют к молочной основе в количестве, отмеренном таким образом, чтобы он истощился и, следовательно, привел к остановке роста молочнокислых бактерий и к остановке ферментации. Предпочтительно, нелактозный углевод добавляют к молочной основе в количестве, отмеренном таким образом, чтобы он истощился при целевом pH и, следовательно, привел к остановке роста молочнокислых бактерий и к остановке ферментации.

Количество нелактозного углевода, которое следует добавить к молочной основе, зависит от ряда параметров, включающих штаммы молочнокислых бактерий, используемые в закваске, состав молочной основы, температуру ферментации и необходимый целевой рН. Количество нелактозного углевода, добавляемого в молочную основу, можно определить экспериментально, и проведение такого эксперимента находится в пределах компетенции квалифицированного специалиста.

В конкретном воплощении изобретения целевое значение рН составляет от 3,2 до 4,8, более предпочтительно от 3,6 до 4,6, более предпочтительно от 3,8 до 4,5 и наиболее предпочтительно от 4,0 до 4,4.

В конкретном воплощении изобретения температура ферментации составляет от 35°C до 45°C, предпочтительно от 37°C до 43°C и наиболее предпочтительно от 40°C до 43°C.

В конкретном воплощении изобретения кисломолочный продукт не подвергают стадии охлаждения после окончания стадии ферментации и перед упаковкой.

В конкретном воплощении изобретения кисломолочный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C.

В конкретном воплощении изобретения количество добавленного нелактозного углевода составляет от 1 мг/г до 30 мг/г, предпочтительно от 2 мг/г до 20 мг/г и более предпочтительно от 3 мг/г до 10 мг/г молочной основы.

В конкретном воплощении изобретения количество добавленного нелактозного углевода составляет от 0,1% до 10%, предпочтительно от 0,2% до 8%, предпочтительно от 0,3% до 2%, предпочтительно от 0,4% до 1,5% и наиболее предпочтительно от 0,5% до 1,2%, где % представляет собой (масс./масс.) в расчете на молочную основу.

В предпочтительном воплощении изобретения молочная основа в начале стадии ферментации имеет содержание лактозы от 30,0 мг/мл до 70 мг/мл, предпочтительно от 35 мг/мл до 65 мг/мл, более предпочтительно от 40 мг/мл до 60 мг/мл и наиболее предпочтительно от 50 мг/мл до 60 мг/мл.

В конкретном воплощении изобретения значение рН кисломолочного продукта поддерживается в пределах 0,5 рН единиц при хранении в течение не менее 7 суток после прекращения ферментации при температуре выше 10°C.

В конкретном воплощении изобретения значение рН кисломолочного продукта поддерживается в пределах 0,5 рН единиц, предпочтительно в пределах 0,4 рН единиц, предпочтительно в пределах 0,3 рН единиц, предпочтительно в пределах 0,2 рН единиц и наиболее предпочтительно в пределах 0,1 рН единиц при хранении в течение не менее 7

суток после прекращения ферментации при температуре выше 10°C.

В конкретном воплощении изобретения значение рН кисломолочного продукта поддерживается в пределах 0,5 рН единиц при хранении в течение не менее 7 суток после прекращения ферментации при температуре выше 4°C, предпочтительно выше 6°C, предпочтительно выше 8°C, предпочтительно выше 10°C, предпочтительно выше 12°C, предпочтительно выше 14°C, предпочтительно выше 16°C, предпочтительно выше 18°C, предпочтительно выше 20°C, предпочтительно выше 22°C, предпочтительно выше 24°C, предпочтительно выше 26°C, предпочтительно выше 28°C и наиболее предпочтительно выше 30°C.

В конкретном воплощении изобретения значение рН кисломолочного продукта поддерживается в пределах 0,5 рН единиц, предпочтительно в пределах 0,4 рН единиц, предпочтительно в пределах 0,3 рН единиц, предпочтительно в пределах 0,2 рН единиц и наиболее предпочтительно в пределах 0,1 рН единиц при хранении в течение не менее 7 суток после прекращения ферментации при температуре выше 4°C, предпочтительно выше 6°C, предпочтительно выше 8°C, предпочтительно выше 10°C, предпочтительно выше 12°C, предпочтительно выше 14°C, предпочтительно выше 16°C, предпочтительно выше 18°C, предпочтительно выше 20°C, предпочтительно выше 22°C, предпочтительно выше 24°C, предпочтительно выше 26°C, предпочтительно выше 28°C и наиболее предпочтительно выше 30°C.

Пробиотический штамм может быть добавлен в этот процесс на любом этапе стадии ферментации, в том числе (1) в начале ферментации, (2) во время ферментации и (3) в конце ферментации.

В конкретном воплощении пробиотический штамм добавляют к молочной основе в начале ферментации. В альтернативном конкретном воплощении пробиотический штамм добавляют к молочной основе во время ферментации. В другом альтернативном конкретном воплощении пробиотический штамм добавляют к кисломолочному продукту в конце ферментации.

В конкретном воплощении изобретения пробиотический штамм добавляют в инокуляционной дозе по меньшей мере 1,0e<sup>xp06</sup> КОЕ/г, предпочтительно по меньшей мере 1,0e<sup>xp07</sup> КОЕ/г, более предпочтительно по меньшей мере 1,0e<sup>xp08</sup> КОЕ/г.

В конкретном воплощении изобретения пробиотический штамм представляет собой штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированный как ATCC53103, и пробиотический штамм добавляют в инокуляционной дозе по меньшей мере 1,0e<sup>xp06</sup> КОЕ/г, предпочтительно по меньшей мере 1,0e<sup>xp07</sup> КОЕ/г, более предпочтительно по

меньшей мере  $1,0 \times 10^8$  КОЕ/г.

Неожиданно было обнаружено, что, чем больше инокуляционная доза пробиотического штамма, например LGG®, тем меньше наблюдаемое последующее подкисление в течение периода хранения, например в течение 56 суток при температуре окружающей среды, например при 25°C. В частности, при использовании инокуляционной дозы LGG®  $1,0 \times 10^8$  КОЕ/г, можно полностью избежать последующего подкисления.

В конкретном воплощении изобретения количество добавленного нелактозного углевода составляет от 1 мг/г до 30 мг/г, предпочтительно от 2 мг/г до 20 мг/г и более предпочтительно от 3 мг/г до 10 мг/г молочной основы.

В конкретном воплощении изобретения количество добавленного нелактозного углевода составляет от 0,1% до 10%, предпочтительно от 0,2% до 8%, предпочтительно от 0,3% до 2%, предпочтительно от 0,4% до 1,5% и более предпочтительно от 0,5% до 1,2%, где % представляет собой (масс./масс.) в расчете на молочную основу.

В конкретном воплощении подсластитель добавляют в процесс для того, чтобы получить подслащенный продукт. Подсластитель может быть добавлен в процесс на любом этапе стадии ферментации, в том числе (1) в начале ферментации, (2) во время ферментации и (3) в конце ферментации.

В предпочтительном воплощении изобретения молочный субстрат, используемый для ферментации с помощью закваски, содержит подсластитель. Предпочтительно, подсластитель выбран из группы, состоящей из искусственного сахара; высокоинтенсивного подсластителя; и сахарного сиропа, пюре, сока и нектара, полученных из источника, выбранного из группы, состоящей из фруктов, овощей и зерна. Предпочтительно, сахарный сироп выбран из группы, состоящей из кленового сиропа, кукурузного сиропа, глюкозного сиропа, кукурузного сиропа с высоким содержанием фруктозы и "золотого" сиропа.

В контексте настоящего изобретения термин "подсластитель" означает натуральный сахарид, выбранный из группы, состоящей из фруктозы, глюкозы, сахарозы и их смесей, искусственного сахара или высокоинтенсивного подсластителя.

Предпочтительно, высокоинтенсивный подсластитель представляет собой стевиолгликозид, включая стевию. Предпочтительно, искусственный сахар представляет собой высокоинтенсивный искусственный подсластитель, выбранный из группы, состоящей из аспартама, сукралозы, неотама, ацесульфата калия, сахарина, адвантама и цикламатов.

Большинство имеющихся на рынке кисломолочных продуктов содержат добавленный подсластитель, такой как сахарный сироп или фруктовое пюре. Преимуществом добавления подсластителя вместе с другими ингредиентами молочной основы является то, что можно избежать дополнительной, отдельной стадии добавления подсластителя. Кроме того, когда подсластитель добавляют к кисломолочному продукту после стадии ферментации, подсластитель должен быть подвергнут тепловой обработке или стерилизации, и, кроме того, он должен быть добавлен к кисломолочному продукту на асептической стадии, которая является дорогостоящей и трудной для выполнения. Таким образом, предпочтительной является добавка подсластителя перед этапом ферментации.

В конкретном воплощении изобретения подсластитель представляет собой сахарозу. В конкретном воплощении изобретения сахарозу добавляют в количестве от 2% (масс./масс.) до 12% (масс./масс.), предпочтительно от 4% (масс./масс.) до 11% (масс./масс.), более предпочтительно от 5% (масс./масс.) до 10% (масс./масс.), более предпочтительно от 6% (масс./масс.) до 9% (масс./масс.) и наиболее предпочтительно от 7% (масс./масс.) до 8% (масс./масс.).

В предпочтительном воплощении изобретения молочная основа в начале стадии ферментации содержит от 30,0 мг/мл до 70 мг/мл, предпочтительно от 35 мг/мл до 65 мг/мл, более предпочтительно от 40 мг/мл до 60 мг/мл и наиболее предпочтительно от 50 мг/мл до 60 мг/мл лактозы.

### **Кисломолочный продукт**

Настоящее изобретение также относится к кисломолочному продукту, полученному способом по изобретению.

В конкретном воплощении изобретения кисломолочный продукт представляет собой продукт, который может быть получен с использованием заквасочной культуры штамма молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

В конкретном воплощении изобретения, кисломолочный продукт выбран из группы, состоящей из йогурта, сливочного сыра, простокваши, сквашенных сливок, пахты, ферментированной сыворотки, сквашенного молока, сметаны, кефира, питьевого йогурта и якульта. Предпочтительно, йогурт выбран из группы, состоящей из йогурта термостатного способа производства, йогурта с нарушенным сгустком и питьевого

йогурта.

В предпочтительном воплощении изобретения, кисломолочный продукт содержит дополнительный пищевой продукт, выбранный из группы, состоящей из фруктового напитка, зерновых продуктов, ферментированных зерновых продуктов, химически подкисленных зерновых продуктов, соевых молочных продуктов, ферментированных соевых молочных продуктов и любой их смеси.

Кисломолочный продукт обычно содержит белок в количестве от 2,0% по массе до 3,5% по массе. Кисломолочный продукт может также быть низкобелковым продуктом с уровнем белка от 1,0% по массе до 2,0% по массе. Альтернативно, кисломолочный продукт может быть высокобелковым продуктом с содержанием белка выше 3,5% по массе.

### **Применение изобретения**

Настоящее изобретение также относится к применению в способе получения кисломолочного продукта, включающем следующие стадии:

1) добавление к молочной основе закваски молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод,

2) ферментацию молочной основы в течение определенного периода времени вплоть до достижения целевого pH с получением кисломолочного продукта, и

3) добавление пробиотического штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, в процесс, композиции, содержащей

1) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и

2) пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*.

Конкретное воплощение изобретения относится к применению для снижения последующего подкисления кисломолочного продукта при хранении после прекращения ферментации по сравнению с использованием соответствующей заквасочной культуры

без пробиотического штамма.

Конкретное воплощение изобретения относится к применению для поддержания значения рН кисломолочного продукта в пределах 0,5 рН единиц, при хранении после прекращения ферментации в течение периода по меньшей мере 7 суток при температуре выше 10°C.

### **Определения**

В контексте настоящего изобретения применимы следующие определения:

Выражение "молочнокислые бактерии" ("LAB") обозначает грамположительные, микроаэрофильные или анаэробные бактерии, которые ферментируют сахара с образованием кислот, включая молочную кислоту в качестве преимущественно продуцируемой кислоты, уксусную кислоту и пропионовую кислоту. Наиболее полезные в промышленном отношении молочнокислые бактерии находятся в составе отряда "Lactobacillales", который включает *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pseudoleuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Enterococcus spp.* и *Propionibacterium spp.* Их часто используют в качестве пищевых культур отдельно или в комбинации с другими молочнокислыми бактериями.

Молочнокислые бактерии, включающие бактерии видов *Lactobacillus sp.* и *Lactococcus sp.*, обычно поставляют в молочную промышленность либо в виде замороженных или сублимированных культур для массового размножения закваски, либо в виде так называемых культур "для прямого внесения" (DVS), предназначенных для прямой инокуляции в ферментационный сосуд или резервуар для производства молочного продукта, такого как кисломолочный продукт или сыр. Такие молочнокислые бактериальные культуры обычно называют "заквасочными культурами" или "заквасками". Как правило, заквасочная культура для йогурта содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, и в большинстве стран йогурт законодательно определен как кисломолочный продукт, произведенный с использованием заквасочной культуры, содержащей эти два указанных штамма.

Выражение "заквасочная культура" включает как заквасочную культуру в форме смеси всех трех штаммов композиции, то есть лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*, лактозодефицитного штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и пробиотического штамма, а также заквасочную культуру, содержащую смесь двух штаммов *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, где пробиотический штамм находится в отдельной форме, позволяющей добавлять этот пробиотический штамм в процесс независимо от добавления двух других указанных

штаммов.

Под термином “молоко” следует понимать молочную секрецию, получаемую при доении любого млекопитающего, такого как коровы, овцы, козы, буйволы или верблюды. В предпочтительном воплощении молоко является коровьим молоком. Термин “молоко” также включает белково-жировые растворы, изготовленные из растительных материалов, например соевое молоко.

Термин “молочная основа” может представлять собой любой необработанный и/или обработанный молочный материал, который может быть подвергнут ферментации в соответствии со способом по изобретению. Таким образом, полезная молочная основа включает, без ограничения ими, растворы/суспензии любого молока или молокоподобных продуктов, содержащих белок, таких как цельное молоко или молоко пониженной жирности, обезжиренное молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, сыворотка, сывороточный пермеат, лактоза, маточная жидкость от кристаллизации лактозы, концентрат сывороточного белка или сливки. Очевидно, что молочная основа может быть получена от любого млекопитающего, например представлять собой по существу чистое молоко млекопитающего или восстановленное сухое молоко.

Перед ферментацией молочная основа может быть гомогенизирована и пастеризована в соответствии с методами, известными в данной области техники.

Термин “гомогенизация” при использовании здесь означает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию проводят до ферментации, то она может быть выполнена таким образом, чтобы измельчить молочный жир на более мелкие фрагменты, так чтобы он больше не отделялся от молока. Это может быть достигнуто путем продавливания молока под высоким давлением через небольшие отверстия.

“Пастеризация” при использовании здесь означает обработку молочной основы для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно, пастеризацию выполняют путем поддержания заданной температуры в течение заданного периода времени. Заданную температуру обычно достигают путем нагрева. Температура и продолжительность могут быть выбраны для того, чтобы убить или инактивировать определенные бактерии, такие как опасные бактерии. За этим может следовать быстрое охлаждение.

“Ферментация” в способах по настоящему изобретению означает превращение углеводов в спирты или кислоты под действием микроорганизмов. Предпочтительно,

ферментация в способах по изобретению включает превращение лактозы в молочную кислоту.

Процессы ферментации, которые используются в производстве молочных продуктов, хорошо известны, и специалисту в этой области понятно, как выбрать подходящие условия, такие как температура, кислород, количество и характеристики микроорганизма(ов) и время процесса. Очевидно, что условия ферментации выбирают таким образом, чтобы обеспечить осуществление настоящего изобретения, то есть получить молочный продукт в твердой (такой как сыр) или жидкой форме (такой как кисломолочный продукт).

Выражение “кисломолочный продукт” означает пищевой или кормовой продукт, когда приготовление пищевого или кормового продукта включает ферментацию молочной основы молочнокислыми бактериями. “Кисломолочный продукт” при использовании здесь включает, без ограничения ими, такие продукты как термофильные кисломолочные продукты, например йогурт, мезофильные кисломолочные продукты, например сметану и пахту, а также ферментированную сыворотку.

Термин “термофильные” здесь относятся к микроорганизмам, которые лучше всего размножаются при температуре выше 35°C. Наиболее полезные для промышленности термофильные бактерии включают *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. Термин “термофильная ферментация” здесь относится к ферментации при температуре выше примерно 35°C, например от примерно 35°C до примерно 45°C. Термин “термофильный кисломолочный продукт” относится к кисломолочным продуктам, полученным посредством термофильной ферментации термофильной заквасочной культуры, и включает такие кисломолочные продукты, как йогурт термостатного способа производства, йогурт с нарушенным сгустком и питьевой йогурт, например якульт.

Термин “мезофильные” здесь относится к микроорганизмам, которые лучше всего развиваются при умеренных температурах (15°C-35°C). Наиболее полезные в промышленности мезофильные бактерии включают *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp. Термин “мезофильная ферментация” здесь относится к ферментации при температуре от примерно 22°C до примерно 35°C. Термин “мезофильный кисломолочный продукт” относится к кисломолочным продуктам, полученным посредством мезофильной ферментации мезофильной закваски, и включает такие кисломолочные продукты, как пахта, простокваша, сквашенное молоко, сметана, кислые густые сливки, жирные сливки, сквашенные сливки, имер, ферментированная сыворотка, кефир, якульт и молодой сыр, такой как кварк, творог и сливочный сыр.

Термин “нелактозный углевод” означает любой углевод, который не является лактозой и который способна метаболизировать молочнокислая бактерия, используемая в способе по изобретению.

Термин “истощение” в отношении нелактозного углевода означает, что концентрация нелактозного углевода равна нулю или настолько низка, что заквасочная культура более не способна расти.

Выражение “в начале стадии ферментации” означает незадолго до, в то же самое время или вскоре после добавления заквасочной культуры к молочной основе. Здесь термин “вскоре” означает менее 30 минут.

Выражение “во время стадии ферментации” означает в любое время во время ферментации после начала и до окончания ферментации.

Выражение “в конце стадии ферментации” означает незадолго до, в то же самое время или вскоре после достижения целевого рН. Здесь термин “вскоре” означает менее 30 минут.

Термин “целевой рН” означает рН, при котором заканчивается стадия ферментации. В зависимости от различных параметров процесса, стадия ферментации завершается методом, выбранным из группы, состоящей из 1) подкисления кисломолочного продукта, которое делает по меньшей мере один штамм закваски неспособным расти, 2) охлаждение и 3) истощение нелактозного углевода.

В настоящем контексте термин “мутантный штамм” следует понимать как штаммы, происходящие, или штаммы, которые могут быть получены от штамма (или их родительского штамма) по изобретению с помощью, например, генной инженерии, радиационной и/или химической обработки. “Штаммы, происходящие от них” также могут представлять собой спонтанно возникающие мутантами. Предпочтительно, чтобы “штаммы, происходящие от них”, были функционально эквивалентны мутантам, например мутантам, которые имеют по существу такие же или улучшенные свойства, что и их родительский штамм. В частности, термин “мутантные штаммы” относится к штаммам, полученным путем воздействия на штамм по изобретению любой традиционно используемой мутагенизирующей обработкой, включая обработку химическим мутагеном, таким как этан-метансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), ультрафиолетовым светом, или к спонтанно возникающему мутанту. Мутант может быть подвергнут нескольким мутагенизирующим обработкам (под одной обработкой следует понимать одну стадию мутагенизации, за которой следует стадия скрининга/отбора), но в настоящее время предпочтительно, чтобы проводилось не

более 20, или не более 10, или не более 5 обработок (или стадий скрининга/отбора). У предпочтительного в настоящее время мутанта менее 1%, менее 0,1%, менее 0,01%, менее 0,001% или даже менее 0,0001% нуклеотидов в бактериальном геноме были заменены другим нуклеотидом или удалены по сравнению с родительским штаммом.

### **ДЕПОНИРОВАНИЯ И ЭКСПЕРТНОЕ РЕШЕНИЕ**

Заявитель просит предоставлять образец депонированного микроорганизма только эксперту, одобренному заявителем.

Штамм *Streptococcus thermophilus* депонирован в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с регистрационным номером DSM 28952.

Штамм *Streptococcus thermophilus* депонирован в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с регистрационным номером DSM 28953.

Штамм *Streptococcus thermophilus* депонирован в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2017-08-22 с регистрационным номером DSM 32599.

Штамм *Streptococcus thermophilus* депонирован в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2017-08-22 с регистрационным номером DSM 32600.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* депонирован в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 с регистрационным номером DSM 28910.

Штамм *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain BB-12 deposited with DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg. 1b, D-38124 Braunschweig, 2003-09-30 с регистрационным номером DSM 15954.

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

### **Примеры**

#### **Пример 1**

*Последующее подкисление йогурта при повышенной температуре при использовании лактозодефицитных и лактозоположительных культур в комбинации с пробиотиками*

Целью настоящего эксперимента является сравнение эффекта, который оказывает

добавление пробиотических культур LGG и BB-12 на последующее подкисление при длительном хранении при комнатной температуре для лактозодефицитных культур по изобретению и сравнительной лактозоположительной культуры.

### **Заквасочные культуры**

Acidifix: Лактозодефицитная культура, содержащая лактозодефицитные штаммы *Streptococcus thermophilus* и лактозодефицитные штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Представленный на рынке штамм YoFlex Acidifix 1.0 от Chr. Hansen A/S.

Premium: Представленная на рынке лактозоположительная культура, содержащая лактозодефицитные штаммы *Streptococcus thermophilus* и лактозоположительные штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Представленный на рынке штамм YoFlex Premium 1.0 от Chr. Hansen A/S.

### **Пробиотические культуры**

LGG: штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированный как ATCC53103

BB-12: штамм *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, депонированный как DSM 15954.

### **Композиции культур**

Таблица 1

	Сахароза (%)
Acidifix Ref.	0,75%
Acidifix Ref. с сахарозой до	7,00%
Acidifix Ref. с сахарозой после	7,00%
Acidifix LGG	0,75%
Acidifix LGG с сахарозой до	7,00%
Acidifix LGG с сахарозой после	7,00%
Acidifix BB-12	0,75%
Acidifix BB-12 сахароза до	7,00%
Acidifix BB-12 сахароза после	7,00%
Premium Ref.	0%
Premium Ref. с сахарозой до	7,00%
Premium Ref. с сахарозой после	7,00%
Premium LGG	0%
Premium LGG с сахарозой до	7,00%
Premium LGG с сахарозой после	7,00%

**Молочные основы**

Таблица 2: Композиция молочных основ

	Количество	Белок	Углевод	Жир
3,5% молоко	2550,0 г	3,8%	4,7%	3,5%
Вода	450 г	0,0%	0,0%	0,0%
Сахароза	225 г	0,0%	100,0%	0,0%
Молочная основа 7% сахароза до	3225 г	3,00%	10,70%	2,75%
3,5% молоко	2650 г	3,8%	4,7%	3,5%
Вода	380 г	0,0%	0,0%	0,0%
Сахароза *	22,9 г	0,0%	100,0%	0,0%
Молочная основа 7% сахароза после (0,75% сахароза добавлена до	3053 г	3,30%	4,84%	3,02%
3,5% молоко	2650 г	3,8%	4,7%	3,5%
Вода	400 г	0,0%	0,0%	0,0%
Сахароза *	0 г	0,0%	100,0%	0,0%
Молочная основа для Premium (без сахарозы)	3050 г	3,30%	4,09%	3,02%

\* добавляют 100 г раствора сахарозы (66%) на 1 л кисломолочного продукта.

**Метод**

Ферментацию молока проводили в 3 л емкостях ферментера при температуре 43°C до достижения конечного рН 4,55 с получением йогурта. Затем йогурт охлаждали в установке для последующей обработки (PTU) при температуре 25°C и при 2 бар ( $2 \cdot 10^5$  Па) и переносили в 100 мл чашки, которые хранили при температуре 25°C. Для каждого йогурта с 0,75% сахарозой, добавленной до ферментации, хранили как образцы без сахара, добавленного после ферментации, так и образцы с сахаром, добавленным после ферментации (до достижения в общей сложности 7% сахарозы).

**Измерения**

Было измерено время достижения конечного рН, последующее подкисление и количество клеток для пробиотических штаммов

**Результаты***Время достижения конечного рН*

Таблица 3

	Сахароза в молочной основе (%)	рН в конце ферментации	Время достижения конечного рН	Сокращение времени (часы (ч) и минуты (мин))
Acidifix Ref.	0,75%	4,55	6 ч 30 мин	
Acidifix Ref. с сахарозой до	7,00%	4,55	4 ч 50 мин	1 ч 40 мин по сравнению с низким содержанием сахарозы
Acidifix LGG	0,75%	4,55	5 ч 30 мин	1 ч по сравнению с отсутствием LGG
Acidifix LGG с сахарозой до	7,00%	4,55	4 ч 30 мин	20 мин по сравнению с отсутствием LGG. 1 ч по сравнению с низким содержанием сахарозы.
Acidifix ВВ-12	0,75%	4,54	6 ч 00 мин	30 мин по сравнению с отсутствием ВВ-12
Acidifix ВВ-12 сахароза до	7,00%	4,55	4 ч 30 мин	20 мин по сравнению с отсутствием ВВ-12. 1 ч 30 мин по сравнению с низким содержанием сахарозы.
Premium Ref.	0%	4,54	5 ч 30 мин	
Premium Ref. с сахарозой до	7,00%	4,53	5 ч 00 мин	30 мин по сравнению с отсутствием сахарозы
Premium LGG	0%	4,55	5 ч 15 мин	15 мин по сравнению с отсутствием LGG
Premium LGG с сахарозой до	7,00%	4,55	4 ч 45 мин	15 мин по сравнению с отсутствием LGG. 30 мин по сравнению с отсутствием сахарозы

Из Таблицы 3 следует:

Для Acidifix (низкая сахароза) LGG и ВВ-12 сокращали время ферментации на 1 ч и 30 мин соответственно.

Для Acidifix (7% сахароза) и LGG, и ВВ-12 сокращали время ферментации на 20 мин.

Для Premium (без сахарозы) LGG сокращал время ферментации на 15 мин.

Для Premium (7% сахароза) LGG сокращал время ферментации на 15 мин.

В заключение следует отметить, что для культуры Acidifix LGG сокращает время ферментации значительно больше, чем LGG сокращает время ферментации для культуры Premium.

*Последующее подкисление*

Таблица 4

	Сахароза (%)	pH, 7 сутки, 25°C
Acidifix Ref.	0,75%	4,37
Acidifix Ref. с сахарозой до	7,00%	4,34
Acidifix Ref. с сахарозой после	7,00%	4,34
Acidifix LGG	0,75%	4,27
Acidifix LGG с сахарозой до	7,00%	4,16
Acidifix LGG с сахарозой после	7,00%	4,20
Acidifix BB-12	0,75%	4,38
Acidifix BB-12 сахароза до	7,00%	4,35
Acidifix BB-12 сахароза после	7,00%	4,36
Premium Ref.	0%	4,29
Premium Ref. с сахарозой до	7,00%	4,19
Premium Ref. с сахарозой после	7,00%	4,26
Premium LGG	0%	4,00
Premium LGG с сахарозой до	7,00%	3,96
Premium LGG с сахарозой после	7,00%	3,99

Таблица 5

Разница pH на 7-ые сутки, 25°C между	Acidifix	Premium
Эталонная культура и культура с сахарозой до	0,03	0,10
Эталонная культура и культура с сахарозой после	0,03	0,03
Эталонная культура и культура LGG	0,10	0,29
Эталонная культура и культура BB-12	+0,01	ND
Эталонная культура сахара до и культура LGG сахара до	0,18	0,23
Эталонная культура сахара после и культура LGG сахара после	0,14	0,27
Эталонная культура сахара до и культура BB-12 сахара до	+0,01	ND
Эталонная культура сахара после и культура BB-12 сахара после	+0,02	ND

Как видно из таблицы 5, влияние добавления LGG на последующее подкисление значительно меньше для культуры Acidifix, чем для культуры Premium на 7-ые сутки при 25°C. Кроме того, для комбинации культуры Acidifix и BB-12 добавление BB-12 вообще не оказывает влияния на последующее подкисление.

Также, для комбинации культуры Acidifix и LGG, эффект от добавления сахарозы до ферментации лишь незначительно выше, чем при добавлении сахарозы после ферментации и этот эффект меньше, чем для комбинации культуры Premium и LGG. Это показывает, что при использовании комбинации культуры Acidifix и LGG фактически можно добавлять сахарозу в очень избыточном количестве перед ферментацией и все же поддерживать приемлемый низкий уровень последующего подкисления во время хранения. Это справедливо и для комбинации культуры Acidifix и BB-12.

*Количество пробиотических клеток*

Таблица 6

	LGG (КОЕ/мл)	BB-12 (КОЕ/мл)
Acidifix LGG	2,5E08	
Acidifix LGG с сахарозой до	2,7E08	
Acidifix LGG с сахарозой после	1,8E08	
Acidifix BB-12		1,6E07
Acidifix BB-12 сахара до		1,8E07
Acidifix BB-12 сахара после		1,3E07
Premium LGG	3,6E08	
Premium LGG с сахарозой до	3,3E08	
Premium LGG с сахарозой после	1,9E08	

**Пример 2**

*Последующее подкисление йогурта при использовании лактозодефицитных и лактозоположительных культур в комбинации с пробиотиками*

Целью настоящего эксперимента является сравнение эффекта, который оказывает добавление пробиотической культуры LGG на последующее подкисление при длительном хранении при температуре охлаждения и комнатной температуре, для лактозодефицитной культуры по изобретению и сравнительной лактозоположительной культуры.

**Молочная основа**

Таблица 7: Композиция молочной основы

	Количество	Белок	Углевод	Жир	Сахароза
3,5% молоко	3500 г	3,4%	4,7%	3,5%	
Вода	200 г	0,0%	0,0%	0,0%	
Сахароза	278 г	0,0%	100,0%	0,0%	
Молочная основа 7% сахарозы	3978 г	2,99%	11,12%	3,08%	6,99%

### **Заквасочные культуры**

Acidifix: Лактозодефицитная культура, содержащая лактозодефицитные штаммы *Streptococcus thermophilus* и лактозодефицитные штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Представленный на рынке штамм YoFlex Acidifix 1.0 от Chr. Hansen A/S.

Premium: Представленная на рынке лактозоположительная культура, содержащая лактозодефицитные штаммы *Streptococcus thermophilus* и лактозоположительные штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Представленный на рынке штамм YoFlex Premium 1.0 от Chr. Hansen A/S.

### **Пробиотические культуры**

LGG: штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированный как ATCC53103

### **Композиции культуры**

Таблица 8

Acidifix
Premium
Acidifix + LGG
Premium + LGG

### **Метод**

Ферментацию молока проводили в 3-литровых емкостях ферментера при температуре 43°C до достижения конечного pH 4,55 с получением йогурта. Затем йогурт охлаждали в установке для последующей обработки (PTU) при температуре 4°C и 2 бар и переносили в чашки объемом 120 мл, которые хранили при температуре 4°C и 25°C.

### **Измерения**

Измеряли последующее подкисление и количество клеток для пробиотических штаммов.

### **Результаты**

#### *Последующее подкисление*

Таблица 9

	рН на 14 сутки, при 4°C	рН на 14 сутки, при 21°C
Acidifix	4,52	4,15
Premium	4,36	4,02
Acidifix + LGG	4,49	4,15
Premium + LGG	4,08	3,97

Таблица 10

Разница pH между	pH на 14 сутки, при 4°C	pH на 14 сутки, при 21°C
Acidifix и Acidifix +LGG	0,03	0,00
Premium и Premium + LGG	0,28	0,05

Как видно из таблицы 10, эффект от добавления LGG на последующее подкисление значительно меньше для культуры Acidifix, чем для культуры Premium как при 4°C, так и при 21°C.

*Количество пробиотических клеток*

Таблица 11

	LGG (КОЕ/г) 14 сутки, 4°C	LGG (КОЕ/г) 14 сутки, 21°C
Acidifix + LGG	2,3E07	2,6E08
Premium + LGG	2,7E07	2,7E08

**Пример 3**

*Последующее подкисление йогурта при повышенной температуре с использованием лактозодефицитных культур в комбинации с пробиотиками в разных инокуляционных дозах*

Целью данного эксперимента является сравнение эффекта, который оказывает добавление разных инокуляционных доз пробиотической культуры LGG на последующее подкисление во время длительного хранения при комнатной температуре для лактозодефицитных культур по изобретению.

Таблица 12: Композиция молочной основы

	Количество (г)	Белки (%)	Углеводы (%)	Жиры (%)	Сахароза
3,4% молоко	11910	3,0	4,6	3,4%	
Вода	0,0	0,0	0,0	0,0	
Сахароза	90	0,0	100	0,0	
Молочная основа 0,75% сахароза	12000	2,98	4,56	3,37	0,75%

**Заквасочные культуры**

Acidifix: Лактозодефицитная культура, содержащая лактозодефицитные штаммы *Streptococcus thermophilus* и лактозодефицитные штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Представленный на рынке штамм YoFlex Acidifix 1.0 от Chr. Hansen A/S.

**Пробиотические культуры**

LGG: штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированный как ATCC53103

**Композиции культуры**

Таблица 13

Acidifix
Acidifix + LGG (10exp06 КОЕ/г)
Acidifix + LGG (10exp07 КОЕ/г)
Acidifix + LGG (10exp08 КОЕ/г)

**Метод**

Ферментацию молока проводили в бутылках SCHOTT blue cap объемом 1 л при температуре 43°C. Когда сахара в образце с Acidifix и без LGG была израсходована (pH 4,39), ферментация всех образцов останавливалась. Бутылки встряхивали, чтобы разбить сгусток, и затем хранили при 4°C для охлаждения. На следующие сутки образцы йогурта асептически переносили в чашки объемом 120 мл, которые хранили при температуре 25°C в течение 56 суток.

**Измерения**

Измеряли последующее подкисление и количество клеток пробиотических штаммов.

**Результаты**

*Последующее подкисление*

Таблица 14

pH	Acidifix	Acidifix + LGG (10exp06 КОЕ/г)	Acidifix + LGG (10exp07 КОЕ/г)	Acidifix + LGG (10exp08 КОЕ/г)
1 Сутки	4,39	4,39	4,38	4,34
7 Сутки	4,41	4,16	4,19	4,32
14 Сутки	4,41	4,17	4,20	4,43
21 Сутки	4,42	4,19	4,22	4,43
28 Сутки	4,43	4,20	4,26	4,44
35 Сутки	4,44	4,23	4,27	4,47
42 Сутки	4,41	4,21	4,25	4,42
49 Сутки	4,41	4,19	4,26	4,39
56 Сутки	4,43	4,20	4,27	4,35

*Количество пробиотических клеток*

Таблица 15

LGG количество клеток (КОЕ/г)	Acidifix	Acidifix + LGG (10exp06 КОЕ/г)	Acidifix + LGG (10exp07 КОЕ/г)	Acidifix + LGG (10exp08 КОЕ/г)
0 Сутки	0,00E00	1,00E06	8,30E06	9,70E07
1 Сутки	0,00E00	1,60E06	1,35E07	1,39E08
7 Сутки	0,00E00	4,29E08	3,44E08	4,30E08
14 Сутки	0,00E00	5,70E08	5,05E08	8,75E08
21 Сутки	0,00E00	5,70E08	6,15E08	5,55E08
28 Сутки	0,00E00	4,45E08	4,35E08	3,80E08
35 Сутки	0,00E00	6,20E07	1,29E08	1,78E08
42 Сутки	0,00E00	5,85E07	1,04E08	1,68E08
49 Сутки	0,00E00	6,05E07	1,72E08	2,11E08
56 Сутки	0,00E00	7,75E07	1,69E08	1,70E08

Как видно из таблицы 15, уровень культуры LGG поддерживается на высоком в течение всего периода хранения, составляющего 56 суток при температуре 25°C. Кроме того, как видно из таблицы 14, чем выше инокуляционная доза LGG, тем меньшее последующее подкисление наблюдается в течение периода хранения, составляющего 56 суток. В частности, при использовании инокуляционной дозы LGG  $1.0 \times 10^8$  КОЕ/г полностью избегают последующего подкисления.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для получения кисломолочного продукта, содержащая:

1) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и

2) пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*.

2. Композиция по п. 1, где нелактозный углевод выбран из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы.

3. Композиция по п. 1 или 2, где лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из:

(а) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 под регистрационным номером DSM 28952;

(2) штамма, имеющего происхождение от DSM 28952, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D -галактопиранозид);

(б) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 под регистрационным номером DSM 28953;

(2) штамма, имеющего происхождение от DSM 28953, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(в) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2017-08-22 под регистрационным номером DSM 32599;

(2) штамма, имеющего происхождение от DSM 32599, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal; и

(г) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2017-08-22 под регистрационным номером DSM 32600; и

(2) штамма, имеющего происхождение от DSM 32600, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

4. Композиция по любому из пп. 1-3, где лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* выбран из группы, состоящей из:

(1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12, под регистрационным номером DSM 28910; и

(2) штамма, имеющего происхождение от DSM 28910, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

5. Композиция по любому из пп. 1-4, где пробиотический штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus* и штамма *Lactobacillus paracasei*.

6. Композиция по п. 5, где пробиотический штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированного как ATCC53103, и штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, депонированного как ATCC 55544, и штамма *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, депонированного как DSM15954.

7. Композиция по п. 6, где пробиотический штамм представляет собой штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированный как ATCC53103.

8. Композиция по любому из пп. 1-7, где пробиотический штамм *Bifidobacterium* выбран из группы, состоящей из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* и *Bifidobacterium infantis*.

9. Композиция по п. 8, где пробиотический штамм *Bifidobacterium* представляет собой *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, депонированный как DSM15954.

10. Способ получения кисломолочного продукта, включающий следующие стадии:

1) добавление к молочной основе заквасочной культуры молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей

мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод,

2) ферментация молочной основы в течение некоторого периода времени вплоть до достижения целевого pH с получением кисломолочного продукта, и

3) добавление пробиотического штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, в этот процесс.

11. Способ по п. 10, где пробиотический штамм добавляют к молочной основе в начале ферментации.

12. Способ по п. 10 или 11, где нелактозный углевод выбран из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы.

13. Способ по любому из пп. 10 - 12, где нелактозный углевод добавляют к молочной основе в начале стадии ферментации.

14. Способ по п. 13, где нелактозный углевод добавляют к молочной основе в количестве, отмеренном таким образом, чтобы оно истощилось при целевом pH, что приводит к остановке роста молочнокислых бактерий и к прекращению ферментации.

15. Способ по любому из пп. 10-14, где лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из:

(а) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 под регистрационным номером DSM 28952;

(2) штамма, имеющего происхождение от DSM 28952, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(б) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 под регистрационным номером DSM 28953;

(2) штамма, имеющего происхождение от DSM 28953, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(в) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2017-08-22 под регистрационным номером DSM 32599;

(2) штамма, имеющего происхождение от DSM 32599, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal; и

(г) (1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2017-08-22 под регистрационным номером DSM 32600; и

(2) штамма, имеющего происхождение от DSM 32600, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

16. Способ по любому из пп. 10-15, где лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* выбран из группы, состоящей из:

(1) штамма, депонированного в DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12 под регистрационным номером DSM 28910; и

(2) штамма, имеющего происхождение от DSM 28910, который дополнительно характеризуется способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где пробиотический штамм добавляют в инокуляционной дозе, составляющей по меньшей мере  $1,0 \times 10^6$  КОЕ/г, предпочтительно по меньшей мере  $1,0 \times 10^7$  КОЕ/г, более предпочтительно по меньшей мере  $1,0 \times 10^8$  КОЕ/г.

18. Кисломолочный продукт, полученный способом по любому из пп. 10-17.

19. Применение композиции, содержащей

1) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и

2) пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*,

в способе получения кисломолочного продукта, включающего следующие стадии:

1) добавление заквасочной культуры молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один

лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, к молочной основе,

2) ферментация молочной основы в течение некоторого периода времени вплоть до достижения целевого рН с получением кисломолочного продукта, и

3) добавление пробиотического штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium* в этот процесс.

20. Применение по п. 19 для снижения последующего подкисления кисломолочного продукта при хранении после прекращения ферментации по сравнению с использованием соответствующей заквасочной культуры без пробиотического штамма.