

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036597**

(13) **B9**

**(12) ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К
ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(15) Информация об исправлении
**Версия исправления: 1 (W1 B1)
исправления в формуле: п.4**

(48) Дата публикации исправления
2021.02.20, Бюллетень №2'2021

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.27

(21) Номер заявки
201691699

(22) Дата подачи заявки
2015.05.08

(51) Int. Cl. *A23C 9/12* (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)
A23L 1/00 (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

(54) ПРОИЗВОДСТВО ЙОГУРТА

(31) **14167734.4**

(32) **2014.05.09**

(33) **EP**

(43) **2017.05.31**

(86) **PCT/NL2015/050324**

(87) **WO 2015/170985 2015.11.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КООПЕРАТИ АВЕБЕ Ю.А. (NL)

(72) Изобретатель:
**Джузеппин Марко Луиджи Федерико,
Спелбринк Робин Эрик Якобус, Мозй
Катарина Мария Антуанетта (NL)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) EP-A1-1920662
WO-A1-2009061186
EP-A1-2191731
ANNA S. SPERANSKY ET AL.: "Kunitz-
type protease inhibitors group B from Solanum
palustre", BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 2,
no. 11, 1 November 2007 (2007-11-01), pages
1417-1424, XP055014819, ISSN: 1860-6768, DOI:
10.1002/biot.200700022 the whole document

(57) Изобретение относится к области ферментации и относится к способу приготовления йогурта путем ферментации, причем способ включает стадии обеспечения стартовой культуры ферментации, содержащей выбранный микроорганизм в подходящей культуральной среде, добавления картофельного белка-ингибитора протеазы в культуральную среду, культивирования микроорганизма и сбора йогурта. Преимуществом данного способа является то, что лаг-период ферментации может быть сокращен путем добавления относительно небольших количеств картофельного белка-ингибитора протеазы. Помимо этого дополнительное преимущество заключается в том, что картофельный белок-ингибитор протеазы позволяет применение настоящего способа в широком диапазоне pH и в широком диапазоне температур, включая пастеризацию, картофельный белок-ингибитор протеазы можно стерилизовать на фильтре, и он не является аллергенным.

B9

036597

036597

B9

Уровень техники

Изобретение относится к области производства йогурта путем ферментации. Ферментация представляет собой хорошо известный метод производства йогурта с использованием метаболической активности микроорганизмов, которые высвобождают кислоту.

Хорошо известно, что микроорганизмы, которые высвобождают кислоту, используются в питательной культуре, содержащей молоко, с получением йогурта, который имеет более длительный срок хранения, чем молоко. Примерами хорошо известных микроорганизмов, высвобождающих кислоту, которые используются в производстве йогурта, являются микроорганизмы из рода *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Streptococcus*.

В типичном процессе ферментации йогурта можно различить три фазы. Первая фаза начинается, когда микроорганизмы объединяют с подпиткой для ферментации, как правило, на основе молока. Микроорганизмы адаптируются к новой среде и начинают поглощать питательные вещества, такие как пептиды, аминокислоты, витамины и минералы. Во время этой фазы микроорганизмы вырабатывают ферменты, необходимые для деления и роста клеток, для расходования энергии, а также для создания запасов веществ, строительных элементов или питательных веществ. Однако во время этой фазы имеет место едва заметный рост микроорганизмов или едва заметное любое другое визуальное проявление того, что что-то происходит в процессе ферментации. По этой причине эту фазу называют лаг-фазой.

Лаг-фаза характеризуется тем, что присутствие некоторых питательных веществ может быть ограничивающим фактором для роста. Примером может служить система, в которой количество пептидов является недостаточным для обеспечения нормального роста микроорганизмов или нормальной скорости роста микроорганизмов. До тех пор, пока присутствие пептида остается недостаточным, рост остается ограниченным концентрацией пептида. Несмотря на то, что кажется, что ничего не происходит, эта фаза очень важна для процесса ферментации, так как состояние популяции микроорганизмов определяет качество получаемого йогурта.

Когда микроорганизмы приспособились к среде, происходит инициация второй фазы. Эту фазу, характеризующуюся ростом микроорганизмов, не ограниченным субстратом, называют экспоненциальной фазой. Во время экспоненциальной фазы микроорганизмы начинают расти путем деления клеток и, следовательно, размножаются в геометрической прогрессии. Во время этой фазы микроорганизмы, вследствие их метаболического характера, вырабатывают, среди прочего, молочную кислоту.

В конце экспоненциальной фазы количество подходящих питательных веществ часто уменьшается таким образом, что экспоненциальный рост уже не может более поддерживаться с помощью ферментации молочной смеси. Таким образом, рост замедляется, и ферментация переходит в стационарную фазу. В этой фазе рост больше не является экспоненциальным, хотя деление клеток все еще имеет место, и ферментация смеси медленно достигает равновесия между всеми присутствующими соединениями. Если все обстоятельства отвечают требованиям, то это приводит к получению йогуртового продукта высокого качества, с хорошо сбалансированным вкусом и запахом.

Время, которое требуется для этих стадий, сильно варьируется и зависит от вида используемых микроорганизмов, типа подпитки для ферментации, температуры и многих других параметров. Учитывая наличие этих различных фаз, производство йогурта обычно представляет собой периодический процесс. Как обычно для периодических процессов, важным фактором в определении стоимости является время, необходимое для готовности продукта.

Важным фактором времени производства является лаг-фаза. Во время этой фазы подготавливается сам процесс ферментации. Помимо создания адекватных условий для роста микроорганизмов не существует больше никакого вклада в создании интересующего продукта, и поэтому более короткая лаг-фаза будет иметь огромное влияние на экономичность процесса ферментации. Однако лаг-фаза является очень важной для определения состояния популяции микроорганизмов, что, в свою очередь, имеет важное значение для качества йогурта. Время, необходимое для прохождения лаг-фазы и для достижения экспоненциальной фазы в процессе ферментации, называют лаг-периодом.

Ранее осуществлялись попытки сокращения лаг-периода. Одним из вариантов является использование полунепрерывного процесса ферментации, в котором микроорганизмы приспособляются к стадии производства и остаются в экспоненциальной фазе в течение длительного времени. Это, однако, часто не удобно, так как стационарная фаза имеет важное значение для определения окончательного вкуса и/или качества йогурта, и эта фаза оказывается пропущенной в таком полунепрерывном процессе.

Кроме того, можно добавить смесь микроорганизмов, называемую стартовой культурой, которые уже были приспособлены к условиям среды ферментации. Однако это создает различные проблемы, потому что при использовании в мелком масштабе предварительного смешивания микроорганизмов для подпитки затем трудно воспроизвести среду полномасштабного ферментера. Можно использовать больший объем предкультуры (посевной материал), но это оказывает большое влияние на процесс производства и затраты на стадии предкультуры. Поэтому было бы предпочтительно сократить лаг-период, возможно, еще больше, чем это возможно с использованием данного метода, надежным способом, с ограниченным количеством стартовой культуры.

Для сокращения лаг-периода также можно добавлять в предварительную смесь дополнительные

легко транспортируемые и энергетически полезные питательные вещества, как, например, дополнительные пептиды. Однако это создает дополнительные затраты и проблемы, связанные, например, с привкусом и цветом.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способу приготовления йогурта путем ферментации, включающему стадии обеспечения стартовой культуры ферментации, содержащей выбранный микроорганизм в подходящей культуральной среде, добавления в культуральную среду растительного белка-ингибитора протеазы, предпочтительно картофельного белка-ингибитора протеазы, культивирования микроорганизма в культуральной среде и сбора йогурта.

Было обнаружено, что добавление картофельного белка-ингибитора протеазы в подпитку для ферментации значительно сокращает лаг-период ферментации. Необходимое количество картофельного белка является достаточно низким, чтобы не влиять на вкус йогурта, и сокращение лаг-периода происходит как в периодическом, так и в полунепрерывном процессах.

Описание чертежей

Фиг. 1. Блок-схема производства йогурта.

Фиг. 2. Зависимости от времени снижения pH в процессе производства йогурта при варьирующихся концентрациях РПИ; более высокие концентрации РПИ приводят к более быстрому снижению pH.

Фиг. 3. Фотографии йогуртовых продуктов.

Фиг. 4. Уменьшение времени достижения pH 5 во время производства йогурта с использованием стандартной культуры и 3,5% молочного белка при варьирующихся концентрациях РПИ вместе и без термообработки, предшествующей ферментации.

Фиг. 5. Кривая роста времени ферментации до pH 5, 5,3 и 4,7 йогурта, полученного с использованием стандартной культуры и при варьирующейся концентрации РПИ, добавляемого к 3,5% молочному белку в процессе производства йогурта.

Фиг. 6. Уменьшение времени достижения целевого pH 5 для ферментаций в присутствии варьирующихся концентраций РПИ вместе и без термообработки, предшествующей ферментации, при различных температурах, с использованием стандартной культуры, добавляемой к 3,5% молочному белку.

Фиг. 7. Ингибирование протеазы с помощью белка Solanic РПИ на лиофилизированной фракции получения Пероксидазы *Arthomyces ramosus* (Arp) с помощью модифицированных Awamori *Aspergillus*.

Фиг. 8a. Дозозависимое уменьшение времени производства йогурта с помощью изолята картофельного ингибитора протеазы, соевых ингибиторов протеазы и гороховых ингибиторов протеазы.

Фиг. 8b. Дозозависимое уменьшение времени достижения pH 5 в процессе производства йогурта с использованием стандартной стартовой культуры и с использованием РПИ, горохового белка и соевой муки вместе и без термообработки, предшествующей ферментации (80°C, 30 мин).

Фиг. 9. Дозозависимое уменьшение времени достижения pH 5 в производстве йогурта с использованием шести различных йогуртовых стартовых культур.

Фиг. 10a. Рост микроорганизмов с течением времени, наблюдаемый с помощью измерений при OD600, при увеличении концентраций пептидов. Явное преимущество в росте наблюдалось, когда пептиды добавляли к среде. Эта среда действительно демонстрирует отсутствие ограничений по пептидам в этой конкретной ситуации с этой стартовой культурой при концентрациях пептидов выше 75% пептидов.

Фиг. 10b. Дозозависимое уменьшение времени путем оценки OD600nm для различных концентраций пептидов при добавлении РПИ. В этом конкретном примере в средах с концентрациями пептидов выше 75% дрожжевого экстракта и казеинового пептона не может наблюдаться сокращение лаг-периода для РПИ. Дозозависимое уменьшение времени для этой ферментации с помощью РПИ представлено в средах с концентрациями пептидов ниже 75% YE и CP.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способу приготовления йогурта, включающему стадии обеспечения стартовой культуры ферментации, содержащей выбранный микроорганизм в подходящей культуральной среде, добавления растительного белка-ингибитора протеазы в культуральную среду, предпочтительно картофельного белка-ингибитора протеазы, культивирования микроорганизма в культуральной среде и сбора йогурта.

Было установлено, что добавление небольших количеств картофельного белка-ингибитора протеазы, такого изолята картофельного ингибитора протеазы ("РПИ"), в подпитку для ферментации значительно сокращает лаг-период ферментации, что имеет экономические преимущества в производстве йогурта. Необходимое количество картофельного белка достаточно низкое, чтобы не влиять на вкус йогурта, и сокращение лаг-периода имеет место как в периодическом, так и в полунепрерывном процессах. Сокращение лаг-периода в контексте настоящего изобретения может также называться "стимулирующей активностью" (СА).

Кроме того, настоящее изобретение может применяться в широком диапазоне pH и температур.

Данный способ относится к способам ферментации для производства йогурта. Предпочтительно настоящее изобретение применяется в способе ферментации, в котором рост микроорганизма ограничен пептидами. Пептиды в объеме настоящего изобретения представляют собой небольшие белковые фраг-

менты, состоящие из 5-30 аминокислот; такие фрагменты также называются "питательными пептидами".

Ферментация, ограниченная пептидами, представляет собой ферментацию, где концентрация свободных питательных пептидов ограничена, но при этом в свободном доступе присутствуют другие необходимые питательные вещества, такие как (микроэлементы) минералы, углеводы и белки. Это ограничение пептидов происходит тогда, когда скорость деградации питательных пептидов протеазами/пептидазами до аминокислот выше, чем скорость образования питательных пептидов из белка. Можно проверить, ограничена ли ферментация пептидами, наблюдая влияние добавления небольших количеств пептидов на рост и лаг-период. Когда добавление питательных пептидов не приводит к значительному ускорению ферментации, то ферментация не ограничена пептидами. Когда добавление питательных пептидов действительно приводит к ускоренной ферментации, то ферментацию можно назвать ограниченной пептидами.

Это означает, что скорость ферментации зависит от концентрации доступных питательных пептидов. В случае ограничения ферментации пептидами недостаточно питательных пептидов для поддержания или для адаптации к условиям экспоненциального роста микроорганизма. Это приводит к увеличению лаг-периода.

В способе согласно настоящему изобретению было установлено, что добавление относительно небольшого количества картофельного белка-ингибитора протеазы уменьшает лаг-период, в частности, для ферментации, ограниченных пептидами, и, в частности, где доступно достаточное количество белков.

Оказалось неожиданным, что, в частности, в способах, включающих ферментацию, ограниченную пептидами, лаг-период уменьшался. Хорошо известно, что важным фактором в определении лаг-периода ферментации является деградация белков в среде до небольших питательных пептидов из 5-30 аминокислот. Это превращение осуществляется с помощью широкого спектра протеаз. Хорошо известная функция ингибиторов протеаз состоит в том, чтобы ингибировать протеазы, эффективно при этом ингибируя протеазы, которые отвечают за деградацию белков до питательных пептидов. Таким образом, можно было бы ожидать, что добавление ингибиторов протеаз из любого источника приведет к увеличению лаг-периода из-за замедленной ферментативной деградации белков и ассоциированного с этим замедленного формирования питательных пептидов. Однако в настоящее время установлено, что в действительности происходит обратное, и добавление картофельных белков-ингибиторов протеаз приводит к снижению, а не увеличению лаг-периода.

Лаг-период в данном контексте определяется как продолжительность времени, необходимого микроорганизму для адаптации к новой среде, а именно к культуральной среде. Эта и есть продолжительность времени, необходимого для лаг-фазы.

Процесс ферментации йогурта можно контролировать с помощью различных подходящих метаболических выходных параметров. Например, значение pH может быть подходящим метаболическим выходным параметром. В качестве альтернативы, оптическая плотность (OD при 600 нм, OD 600) может обеспечить подходящий выходной параметр с получением количественной оценки присутствующих микроорганизмов. Однако специалист в данной области может предложить множество способов определения того, как развивается процесс ферментации, и определения времени, необходимого для лаг-фазы в процессе производства йогурта.

Ферментация, как правило, развивается согласно S-образной кривой выходных параметрах, таких как оптическая плотность или pH, как это хорошо известно в данной области техники. В настоящем изобретении время, необходимое для достижения точки середины на экспоненциальной кривой, находят путем расчета точки перегиба в сглаженной S-образной кривой из ее второй производной. В качестве альтернативы, при использовании pH в качестве показателя метаболического прогресса берут значение pH, соответствующее середине экспоненциальной кривой, и записывают время, пока это значение pH не будет достигнуто. В производстве йогурта может быть использовано любое значение pH от 5 до 5,5 при условии, что это значение применяется последовательно, чтобы обеспечить соответствующее сравнение. Уменьшение лаг-периода можно определить путем сравнения лаг-периода ферментации без добавления картофельного белка-ингибитора протеазы с такой же ферментацией, где добавляют соответствующее количество картофельного белка-ингибитора протеазы. Абсолютное уменьшение лаг-периода, как правило, оценивается количественно в виде часов уменьшения, в то время как относительное уменьшение лаг-периода оценивается количественно в виде "%".

Нативные картофельные белки можно условно разделить на три класса (i) семейство пататина, высокомолекулярные кислотные гликопротеины с молекулярной массой 43 кДа (40-50 мас.% картофельных белков), (ii) основные ингибиторы протеазы с молекулярной массой 5-25 кДа (картофельные белки-ингибиторы протеаз), которые при выделении обозначаются как изолят картофельных ингибиторов протеаз или "РРП"; 30-40 мас.% картофельных белков) и (iii) другие белки, по большей части высокомолекулярные (10-20 мас.% картофельных белков) (Pots et al., J. Sci. Food. Agric. 1999, 79, 1557-1564).

РРП могут подразделяться на различные группы в зависимости от их молекулярной массы. Различные группы ингибиторов протеаз идентифицируются как ингибитор протеазы I (молекулярная масса примерно 39 кДа), ингибитор карбоксипептидазы (молекулярная масса примерно 4100 Да), ингибиторы протеазы, Pa и Pb (молекулярная масса примерно 20,7 кДа) и ингибитор протеазы A5 (молекулярная

масса примерно 26 кДа). Соотношение этих различных групп ингибиторов протеаз в суммарном картофельном белке зависит от сорта картофеля.

Для объема настоящего изобретения картофельный белок-ингибитор протеаз включает любой картофельный белок-ингибитор протеаз или любую смесь различных картофельных белков, которая включает один или несколько картофельных белков-ингибиторов протеаз или группу ингибиторов, как определено выше. Изолят картофельных ингибиторов протеаз (РПИ) представляет собой изолят, содержащий картофельный белок-ингибитор протеаз. РПИ может быть получен любым известным способом, таким как, например, преципитация, термофракционирование при 60-80°C, разделение на мембране, преципитация с использованием сульфата аммония или насыщенных жирных кислот или других компонентов, методы фильтрации, такие как ультрафильтрация или гель-фильтрация.

Предпочтительно РПИ используется в настоящем изобретении. Он может быть получен, как описано в WO 2008/069650, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки, где приведено подробное описание выделения ингибиторов протеаз из картофельного плодового сока (PFJ) или картофельной плодовой воды (PFW).

Этот процесс предполагает воздействие на картофельный плодовой сок флокуляции с помощью катиона двухвалентного металла при pH 7-9 и центрифугирования флокулированного картофельного плодового сока с образованием надосадочной жидкости. Затем надосадочную жидкость подвергают адсорбционной хроматографии со слоем вступенного адсорбента, работающей при pH менее 11 и температуре 5-35°C с использованием адсорбента, способного связывать картофельный белок, адсорбируя таким образом нативный картофельный белок на адсорбент. Колоночные материалы, которые связывают некоторое количество нативных картофельных белков, включают адсорбенты смешанного типа, такие как, например, Amersham Streamline™ Direct CST I (GE Healthcare), адсорбенты Fastline (Upfront Chromatography A/S), макропористые адсорбенты, такие как Amberlite™ XAD7HP (Rohm & Haas Company), и ионообменные адсорбенты. В качестве альтернативы, адсорбенты, включающие лиганды, такие как описанные в Европейской патентной заявке 12175944.3, особенно предпочтительны для выделения РПИ, подходящего для применения в настоящем изобретении.

Наконец, по меньшей мере один изолят нативного картофельного белка элюируют из адсорбента с помощью элюента. Этот метод приводит, среди прочего, к получению выделенного РПИ высокой степени чистоты с минимальным присутствием денатурированного белка и характеризующегося стабильной растворимостью. В результате, этот метод приводит к получению нативного РПИ. Нативный РПИ, как правило, предпочтителен в способе согласно настоящему изобретению.

Количество картофельных белков-ингибиторов протеаз может быть определено путем измерения ингибирующего эффекта против трипсина в соответствии с методом, описанным в Spelbrink et al., The Open Food Science Journal 2011 (5) p42-46 "Quantitative Determination Trypsin Inhibitory Activity in Complex Matrices" или в ISO 14902:2001E "Animal Feed Stuffs -Determination of soya products".

В качестве альтернативы использованию картофельного белка-ингибитора протеаз, такого как РПИ, можно использовать дополнительно очищенную белковую фракцию, выделенную из РПИ. Предпочтительная белковая фракция

Растворима при pH 8.

Имеет pKa <8.

Обладает как TIA, так и STIA активностью, но никакая активность не выдерживает термообработку при 80°C в течение 30 мин. Тем не менее, способность уменьшения лаг-периода остается неизменной до по меньшей мере 90°C.

Имеет молекулярную массу в диапазоне от 17,5 до 18,2 кДа.

Активность TIA определяется путем измерения ингибирующего эффекта белка против трипсина согласно способу, описанному в Spelbrink et al. The Open Food Science Journal 2011 (5) p 42-46 "Quantitative Determination Trypsin Inhibitory Activity in Complex Matrices" или в ISO 14902:2001E "Animal Feed Stuffs -Determination of soya products".

Активность STIA определяется путем измерения ингибирующего эффекта белка против химотрипсина. Используемый метод по существу такой же, как метод, описанный для TIA, но необходимы более высокие дозы фермента для компенсации более низкой удельной активности химотрипсинов.

Преимуществом использования картофельного белка-ингибитора протеаз является то, что большинство из них очень термостабильны. Активная фракция изолята картофельного белка-ингибитора протеазы, которая отвечает за уменьшение лаг-периода, сохраняет свое нативное состояние до температуры 60°C, предпочтительно 70°C, более предпочтительно 80°C и наиболее предпочтительно 90°C в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 15 мин, предпочтительно по меньшей мере 90 мин. Это делает возможным добавление картофельного белка-ингибитора протеазы в различные моменты в процессе ферментации. Он может быть добавлен в среду до, после или во время добавления стартовой культуры или он может быть добавлен к самой стартовой культуре.

Кроме того, он может быть добавлен в подпитку для ферментации в процессах, где подпитку для ферментации нагревают перед ферментацией. Так обстоит дело, например, в процессах, требующих пас-

теризации или стерилизации перед ферментацией, которые являются общими для многих процессов производства йогурта.

Дополнительным преимуществом настоящего изобретения является то, что картофельный белок-ингибитор протеазы функционален в описанных процессах ферментации при очень низких концентрациях. В частности, добавления менее 1 г/л, предпочтительно менее 0,5 г/л, более предпочтительно менее 0,1 г/л, еще более предпочтительно менее 0,05 г/л картофельного белка-ингибитора протеазы достаточно для уменьшения лаг-периода в процессах ферментации согласно изобретению. Минимальное количество, составляющее по меньшей мере 0,01 г/л, предпочтительно 0,005 г/л, более предпочтительно 0,001 г/л картофельного белка-ингибитора протеазы требуется для уменьшения лаг-периода ферментаций согласно настоящему изобретению.

Предпочтительные концентрации картофельного белка-ингибитора протеазы составляют, например, от 5 до 0,001 г/л, предпочтительно от 5 до 0,05 г/л, более предпочтительно от 5 до 0,01 г/л, как например от 1 до 0,01 г/л. Концентрация картофельного белка-ингибитора протеазы в этом контексте выражается в виде грамм картофельного белка-ингибитора протеазы на литр культуральной среды.

При этих концентрациях картофельный белок-ингибитор протеазы не придает никакого вкуса йогурту, что является дополнительным преимуществом. Кроме того, дополнительно, такие низкие концентрации картофельного белка-ингибитора протеазы не обладают детектируемым влиянием на органолептические характеристики йогурта. Однако более высокая концентрация картофельного белка-ингибитора протеазы, составляющая более чем 0,5-2%, улучшает структурные и органолептические характеристики, например однородность конечного йогуртового продукта.

Также преимуществом настоящего изобретения является то, что картофельный белок-ингибитор протеазы функционален в процессах ферментации в широком диапазоне pH. В частности, значение pH в культуральной среде может составлять до 6,7, предпочтительно 8, более предпочтительно до 10. Кроме того, pH может быть настолько низким как 4, предпочтительно настолько низким как 3, более предпочтительно настолько низким как 2. Стабильность картофельного белка-ингибитора протеазы в широком диапазоне pH является предпочтительной, так как это дает возможность применения при ферментации культуральных сред с различными значениями pH. Кроме того, это дает возможность ферментации йогурта воспользоваться добавлением картофельного белка-ингибитора протеазы в процессе ферментации.

Кроме того, особым преимуществом настоящего изобретения является то, что картофельный белок-ингибитор протеазы не является аллергенным. Это означает, что он может быть использован в процессах ферментации йогурта, выполняемых людьми с аллергией на другие белки. Кроме того, это означает, что он может быть использован для ферментации йогурта, где йогурт может потребляться людьми, страдающими аллергией, без риска аллергического шока.

Кроме того, преимуществом картофельного белка-ингибитора протеазы является то, что раствор этого белка, предпочтительно водный раствор, является прозрачным, или, по меньшей мере, по существу, не мутным, вплоть до концентрации, составляющей по меньшей мере 10 г/л, предпочтительно 50 г/л, более предпочтительно 250 г/л. Эти концентрации предпочтительно достигаются при pH раствора от 2 до 5, предпочтительно 2-4, более предпочтительно 2,5-3,5. Прозрачные и, по существу, не мутные растворы картофельного белка-ингибитора протеазы обеспечивают удобную стерилизацию на фильтре и привлекательный внешний вид йогурта.

При сравнении картофельных белков-ингибиторов протеаз с ингибиторами протеаз из других источников было установлено, что яичные белки-ингибиторы протеаз не демонстрировали уменьшение лаг-периода при сопоставимых дозах в отличие от картофельных белков-ингибиторов протеаз. Кроме того, изоляты сывороточных белков (WPI) и ингибиторы карбоксипептидаз (CPI) не демонстрировали уменьшения лаг-периода при сопоставимых дозах.

Однако соевые белки-ингибиторы протеаз и гороховые белки-ингибиторы протеаз могут демонстрировать уменьшение лаг-периода при добавлении к подходящей культуральной среде, такой как среда, содержащая молоко. Однако необходимы более высокие дозы соевых белков-ингибиторов протеаз или гороховых белков-ингибиторов протеаз, так как уменьшение лаг-периода при той же дозе значительно ниже для горохового и соевого белка, чем для картофельного белка (см. фиг. 8a).

Все описанные в настоящее время параметры для применения картофельных белков-ингибиторов протеаз в способе ферментации с уменьшенным лаг-периодом сохраняются и для гороховых и соевых белков-ингибиторов протеаз, а также любой параметр или комбинация параметров, описанных для ингибиторов картофельных белков-ингибиторов протеаз, считаются действительными для гороховых белков-ингибиторов протеаз и соевых белков-ингибиторов протеаз. Поэтому растительные белки-ингибиторы протеаз, такие как полученные из покрытосеменных (цветковых растений) или из кулинарных овощей, предпочтительно гороховые, соевые или картофельные белки-ингибиторы протеаз, могут быть аналогичным образом использованы в способе ферментации йогурта с уменьшенным лаг-периодом согласно настоящему изобретению.

Однако не все преимущества картофельных белков-ингибиторов протеаз также применимы и к другим растительным белкам-ингибиторам протеаз. В частности, соевая мука не демонстрирует термостабильности картофельных белков-ингибиторов протеаз. Следовательно, соевая мука не может быть ис-

пользована в способе ферментации для уменьшения лаг-периода, в котором ее нагревают вместе с культуральной средой перед ферментацией, как например, в способе, который включает стадию пастеризации или стерилизации (фильтр/термообработка) перед ферментацией. Это является преимуществом картофельных белков-ингибиторов протеаз по сравнению с соевыми белками-ингибиторами протеаз в соевой муке.

Выделенные гороховые и соевые белки-ингибиторы протеаз демонстрируют термостабильность. При осуществлении ферментации с использованием РПИ согласно настоящему изобретению уменьшение лаг-периода после стадии термообработки является более или менее таким же, как уменьшение лаг-периода, наблюдаемое без предварительной стадии термообработки. Это аналогично для выделенного горохового и соевого белка, чья активность является более или менее такой же вместе или без предварительной стадии термообработки, даже при том, что уменьшение лаг-периода для горохового и соевого белка в абсолютном выражении ниже, чем для картофельного белка, как описано выше.

Еще одним недостатком использования горохового или соевого белка по сравнению с использованием картофельного белка, является то, что более низкая активность в уменьшении лаг-периода делает необходимыми более высокие концентрации. Это приводит к повышенному риску того, что добавленный белок придаст вкус йогурту, что является недостатком.

Кроме того, как гороховый, так и соевый белок-ингибитор протеаз являются аллергенными белками, которые затруднительно применять в общих пищевых производственных процессах из-за повышенного риска и необходимости регуляции по сравнению с картофельным белком.

Таким образом, картофельные белки-ингибиторы протеаз являются превосходящими по термостабильности, уменьшению лаг-периода и общей промышленной применимости в ферментации по сравнению с ингибиторами протеаз из других источников. Однако любые растительные белки-ингибиторы протеаз, такие как полученные из покрытосеменных (цветковых растений) или из кулинарных овощей, предпочтительно гороховые, соевые или картофельные белки-ингибиторы протеаз, демонстрируют уменьшение лаг-периода при добавлении в подпитку для ферментации йогурта.

Все вышеперечисленные преимущества картофельного белка-ингибитора протеазы также применимы к РПИ, где его используют в качестве картофельного белка-ингибитора протеазы.

В частности, в случае РПИ является преимуществом то, что РПИ содержит высокое количество термостабильной фракции, которая аналогичным образом дает возможность использования картофельного белка-ингибитора протеаз согласно настоящему изобретению в способах, где подпитку для ферментации нагревают перед ферментацией. РПИ, как правило, содержит от 20 до 80 мас.%, предпочтительно от 40 до 60 мас.% термостабильных картофельных белков-ингибиторов протеаз, так что добавление даже низких количеств РПИ приводит к уменьшенному лаг-периоду. Кроме того, в этом случае конечному продукту не придается никакого постороннего вкуса.

В качестве альтернативы, термостабильная фракция РПИ может быть выделена из РПИ до применения картофельного белка-ингибитора протеазы в процессе ферментации. Это может быть осуществлено путем термопреципитации и последующей фильтрации нетермостабильных белков в РПИ, после чего термостабильную фракцию РПИ выделяют в виде раствора термостабильного картофельного белка-ингибитора протеаз, которая необязательно может быть выделена в виде порошка, например, путем лиофилизации. В качестве альтернативы, термостабильный картофельный белок-ингибитор протеазы может быть получен путем фракционирования РПИ, как например, с помощью ионообменной хроматографии, путем элюирования при pH, которое соответствует значению pH большинства термостабильных ингибиторов протеаз, а также с помощью процессов адсорбции, мембранной фильтрации, гель-фильтрации или селективной преципитации.

Микроорганизмы для способа приготовления йогурта путем ферментации представляют собой такие, которые пригодны для получения йогурта. Подходящие микроорганизмы включают, например, микроорганизмы из *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* и *Bifidobacterium*.

Стартовая культура ферментации в контексте настоящего изобретения представляет собой культуру, содержащую один или более микроорганизмов, подходящих для получения йогурта. Стартовая культура может содержать один тип микроорганизма либо она может содержать два или более микроорганизмов. Подходящие стартовые культуры включают организмы, присутствующие в кефире, такие как молочнокислые бактерии и дрожжи, а также *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium Breve*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus Lactis*, *Lactococcus cremoris*, например, смеси *Lactococcus diacetylactis* и *Leuconostoc cremoris*.

Культуральная среда должна быть подходящей для ферментации йогурта. Подходящая культуральная среда содержит молоко, такое как, например, коровье молоко, козье молоко, овечье молоко, молоко яка, кобылье молоко, оленье молоко, молоко лося, буйволиное молоко, ослиное молоко и/или верблюжье молоко, предпочтительно коровье молоко.

Условия культивирования в процессе ферментации могут быть такими, которые известны для ферментации йогурта. Условия культивирования могут быть аэробными или анаэробными, и, если они аэробные, то могут включать слабую, среднюю или сильную аэрацию. Культивирование может представлять собой культивирование в твердом состоянии или в жидком состоянии и может быть осуществ-

лено в любом масштабе периодическим или полунепрерывным методом. Уровень кислорода может варьироваться от отсутствия (анаэробная ферментация) до присутствия (аэробная ферментация). Процесс может осуществляться как с перемешиванием, так и быть статичным.

Температура во время ферментации может варьироваться от -10 до +60°C, предпочтительно 13-45°C. Предпочтительно температура остается постоянной. Значение pH может варьироваться в диапазоне pH 2-10, предпочтительно 4-6,7. Время культивирования сильно варьируется и зависит от вида культуры. Специалисту хорошо известно подходящее время культивирования для йогурта. Соответственно время культивирования может варьироваться от 0,5 ч до 10 лет или более, или любое время между ними.

Добавление картофельного белка-ингибитора протеазы может происходить в любой момент времени до начала ферментации. Такое добавление может быть осуществлено путем объединения картофельного белка-ингибитора протеазы с культуральной средой в качестве отфильтрованного или пастеризованного белкового концентрированного раствора, а затем путем добавления стартовой культуры, или, в качестве альтернативы, путем объединения стартовой культуры с нативным картофельным белком и путем объединения этой смеси с культуральной средой. В качестве альтернативы, все компоненты могут быть добавлены по отдельности или в комбинации с другими составляющими культуральной среды в зависимости от обстоятельств. Такие дополнительные составляющие культуральной среды могут включать, например, углеводы, микроэлементы, основную массу минералов, белки, пептиды.

В гораздо более предпочтительном варианте реализации изобретения картофельный белок-ингибитор протеазы может быть добавлен к культуральной среде перед стадией нагревания. Это является преимуществом, когда культуральная среда должна быть нагрета, как например, для пастеризации или стерилизации, перед добавлением стартовой культуры. Благодаря предпочтительной термостабильности картофельного белка-ингибитора протеазы он сохраняет свое нативное состояние даже после такого нагревания, так что его естественная биохимическая функция сохраняется, и лаг-период ферментации уменьшается даже после нагревания.

Добавление картофельного белка-ингибитора протеазы предпочтительно в нативном состоянии обладает эффектом уменьшения лаг-периода ферментации. Лаг-период значительно уменьшается в зависимости от культуры и среды, как например, по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 25%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%, более предпочтительно по меньшей мере на 60% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90% по сравнению с таким же способом ферментации, в котором не добавляют картофельный белок-ингибитор протеазы.

Сбор йогурта может принимать любую форму, известную в данной области для выделения йогурта после ферментации. В частности, йогурт может быть получен путем контроля подходящего метаболического выходного параметра (такого как pH или оптическая плотность), путем определения конечной точки ферментации и выделения йогурта.

Изобретение будет дополнительно пояснено следующими не ограничивающими примерами.

Примеры

Пример 1. Получение йогурта.

РРІ-изолят представляет собой изолят картофельного ингибитора протеазы и может быть сокращенно обозначен РРІІ. РРІ-изолят добавляли в ферментационную смесь в 2-х различных точках процесса, а именно 1) в молоко перед пастеризацией и 2) в молоко после пастеризации вместе со стартовой культурой. Третий вариант - это добавление РРІІ во время получения стартовой культуры, учитывая конечную концентрацию РРІІ в молоке/йогурте.

Процесс схематично представлен на фиг. 1. Свежий йогурт готовили путем пастеризации молока (если не указано иное, 30 мин, 80°C) и охлаждали до 40-42°C. Возможные стадии процесса, где может быть добавлен РРІ-изолят, представлены на фигуре. Было отмечено, что когда добавляли РРІІ в более высоких дозах, то pH снижалось. Поэтому рекомендуется скорректировать pH до pH 6,7 с помощью, например, NaOH, поскольку более низкое pH будет влиять на текстуру йогурта.

Для приготовления йогуртов молоко инокулировали с помощью либо 2% (мас./мас.) коммерческого йогурта или с помощью рекомендованного количества стартовой культуры, например из CSK Food Enrichment B.V. (1ед./10 л ≈ 0,02% (м/м)) или из DSM, Delvo-Yog® CY (5 ед./1000 л), и ферментировали в течение 4-7 ч до достижения pH 4,5. Используемая стандартная йогуртовая культура, CЕСKА®-Star Y200, содержит молочнокислые бактерии *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus Bulgaricus*. Эксперименты проводили в мелком масштабе (25-50 мл) и сразу же после инокуляции образцы инкубировали на водяной бане при температуре 40-42°C.

Все эксперименты останавливали, как только pH достигало pH 4,5. Значение pH автоматически записывали во время ферментации с 2-15-минутными интервалами (WTW, Германия).

Кривая подкисления в процессе ферментации с дозировкой йогурта 2% в качестве посевного материала представлена на фиг. 2. Эталонный йогурт с 0% РРІІ достигал pH 5 через 5:45 ч. Йогурт с 0,025% РРІІ достигал pH 5 через 3 ч. Время ферментации для йогуртов, приготовленных с использованием РРІІ, было значительно короче времени, необходимого для контрольного йогурта. Уменьшение времени, которое может быть достигнуто, зависит в большой степени от выживаемости и от фазы роста посевного

материала. Когда клетки в посевном материале находятся в стационарной фазе (например, когда в качестве посевного материала используют 2% йогурт), лаг-период контрольного/эталонного йогурта очень большой и, таким образом, возможное уменьшение времени является очень высоким.

Пример 2. РПИ-зависимость уменьшения лаг-периода в производстве йогурта.

Йогурты готовили согласно примеру 1 с различными дозировками РПИ в диапазоне от 0,005 до 0,025% (мас./мас.). Достигнутое уменьшение времени путем добавления РПИ наносили на график против дозированной концентрации РПИ. Время, необходимое ферментации для достижения pH 5, использовали для сравнения влияния на лаг-период различных доз РПИ. С увеличением количества изолята картофельного белка-ингибитора протеазы время ферментации значительно уменьшалось, как показано на фиг. 2.

Пример 3. Термостабильность изолята картофельного белка-ингибитора протеазы.

Добавление РПИ до или после пастеризации приводило к сопоставимым дозозависимым кривым уменьшения времени (фиг. 4 и 6). Йогурты готовили с использованием заранее определенной стартовой культуры, как описано в предыдущих примерах. РПИ добавляли к молоку перед пастеризацией. Предварительную смесь молоко-РПИ не пастеризовали (комнатная температура, КТ) или пастеризовали в течение 30 мин при 3 различных температурах 80, 85 и 90°C. Полученные (абсолютные и относительные) значения уменьшения времени для всех образцов зависели от дозы РПИ, и не наблюдалось никаких существенных различий между различными термообработками. Было обнаружено, что оптимальная дозировка РПИ в этом эксперименте составляет 0,1% РПИ, и это привело к значительному относительному уменьшению времени ($\approx 20\%$).

Пример 4. Картофельные белки-ингибиторы протеазы для применения в настоящем изобретении могут быть нативными.

Готовили исходный раствор 30 г/л азоказеина (Sigma-Aldrich, A2765) путем растворения белка в 100 мМ pH 5 Цитрат-буфера, содержащего 5 мМ CaCl_2 (Sigma-Aldrich, C3881) при 50°C и охлаждали до 37°C. Лиофилизированные грибковые лизаты, содержащие протеазную активность, растворяли в 1 мМ растворе HCl. РПИ растворяли в растворе ацетата pH 3.

Из раствора РПИ готовили серию разведений таким образом, чтобы привести к потере $\sim 50\%$ сигнала при инкубации для образца с самой высокой концентрацией. Из каждого разведения 125 мкл смешивали с 25 мкл раствора грибковой протеазы в чашке Эппендорф или с 25 мкл деминерализованной воды в качестве контроля. Для положительных и отрицательных контролей для протеолитической реакции использовали 125 мкл деминерализованной воды, а не материал образца. К этим смесям добавляли 225 мкл теплого азоказеина с последующей 30-минутной инкубацией при 37°C. Реакцию затем гасили путем добавления 150 мкл 15% мас.:об. раствора ТСА. Порядок добавления азоказеина был таким же, как и порядок добавления ТСА, чтобы гарантировать одинаковое время инкубации для всех образцов. (см. фиг. 7)

Негидролизированный азоказеин и другие нерастворимые вещества удаляли центрифугированием при 15000 g при 40°C в течение 10 мин в Heraeus Multifuge 1S-R с использованием ротора Thermo Scientific. 100 мкл надосадочной жидкости переносили в микропланшет осторожным пипетированием и добавляли 100 мкл 1,5 М раствора NaOH. Затем планшет анализировали на поглощение при 450 нм на ридере Bio-Rad Model 680 для микропланшетов.

Значения поглощения наносили на график в виде зависимости от количества материала образца в планшете. Угол наклона полученной линии получали с помощью линейной регрессии с использованием метода наименьших квадратов, что указывало количество потерь поглощения на количество материала образца. Положительный контроль при отсутствии образца указывает на максимальное поглощение, вызванное известным количеством раствора протеазы. Следовательно, путем деления угла наклона на поглощение положительного контроля получали трипсиновую ингибирующую активность, выраженную в виде количества ингибированной протеазы на количество материала образца.

Отсюда следует, что РПИ, используемый в настоящих экспериментах, может быть нативным.

Пример 5. Сравнение с белками-ингибиторами протеаз белков из других источников, отличных от картофеля.

Ингибиторы протеаз из двух растительных источников, гороха и сои, тестировали на их способность уменьшать лаг-период ферментации йогурта, поскольку эти белки являются наиболее легко доступными для крупномасштабного коммерческого использования. Кроме того, тестировали яичный белок, так как он представляет собой основной источник пищевых ингибиторов протеазы животного происхождения.

Тестировали два типа горохового белка, Pisane® C9 и Pisane® F9 от Cosucra. Кроме того, тестировали неочищенную соевую муку (Sigma-Aldrich) и соевый белок (Profam, ADM), а также использовали яичный белок и РПИ. На фиг. 8а представлено дозозависимое снижение времени как для соевого, так и для горохового белка, в ферментациях с использованием CESKA®-Star Y200 CSK Food Enrichment B.V., где белки не подвергаются термообработке перед ферментацией. Яичный белок продемонстрировал только незначительное уменьшение лаг-периода (не показано). Неочищенная соевая мука продемонстрировала более сильное уменьшение лаг-периода, чем гороховый белок, но дозировку готовили из расчета конечной концентрации белка, а это значит, что требовались очень высокие дозировки соевой муки.

Уменьшение лаг-периода с использованием соевого белка, однако, было заметно меньше, чем уменьшение лаг-периода с использованием картофельного белка-ингибитора протеазы, как представлено на примере использования РПИ.

Для горохового белка использовали как Pisane® C9, так и Pisane® F9. Оба типа давали одинаковое уменьшение лаг-периода, которое было намного меньше, чем уменьшение лаг-периода, наблюдаемое для картофельного белка-ингибитора протеазы, в качестве примера которого использовали РПИ.

Показано, что РПИ вызывает наиболее сильное уменьшение лаг-периода и превосходит по этой части как гороховый, так и соевый белок для ферментации йогурта, приводя в результате к более короткому времени ферментации, как можно видеть из фиг. 8а.

Было показано, что картофельный белок, выделенный соевый белок и выделенный гороховый белок являются термостабильными. Никаких существенных изменений в дозозависимом уменьшении лаг-периода йогурта не наблюдали для этих белков в период между моментами до и после термообработки (80°C в течение 30 мин). Однако уменьшение лаг-периода неочищенной соевой муки не выдерживало термообработки (фиг. 8b).

Пример 6. Уменьшение лаг-периода в различных системах ферментации, первый пример.

Для подтверждения уменьшения лаг-периода РПИ в различных йогуртовых системах тестировали различные коммерческие стартовые культуры. Стартовые культуры выбирали таким образом, чтобы можно было оценить максимальное изменение в порядках вязкости и постподкисления конечного йогурта. Тестируемые стартовые культуры представляют собой Ceska®-star йогуртовые культуры Y200, Y700, Y900, Y104 и Y508 (различные смеси *St. thermophilus* и *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) и B193 (смесь *St. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* и *Bifidobacteria*), CSK Food Enrichment B.V.

Из 6 протестированных стартовых культур все 6 демонстрировали значительное уменьшение лаг-периода при добавлении РПИ в дозировке 0,05-0,20% РПИ (фиг. 9а), что приводило к уменьшению времени производства йогурта.

Пример 7. Определение того, ограничена ли система ферментации пептидами.

Тест дозозависимого эффекта может быть осуществлен для оценки того, ограничена ли система пептидами. Принцип показан здесь на модельной системе, в которой варьируется концентрация доступных пептидов в процессе ферментации. В системе ферментации йогурта концентрация пептида может аналогичным образом варьироваться для определения того, ограничена ли ферментация йогурта пептидами.

Используемые в данном тесте среды представляют собой маркированные среды А-Н, а стартовая культура соответствовала примеру 1. Развитие процесса ферментации контролировали с помощью оптической плотности при 600 нм (OD600).

Все среды А-Н готовили путем добавления к 1000 мл воды при рН 6,2-6,5: 20 г раммглюкозы (Merck 1,08342), 1 г Tween-80 (Merck 822187), 2 г K_2HPO_4 (Merck 1,05104), 5 г ацетата натрия (Merck 1,06267), 2 г цитрата аммония (Sigma-Aldrich 09833), 0,2 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma-Aldrich M5921), 0,05 г $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Sigma-Aldrich M7634) и 10 г мясного экстракта (Fluka 70164). Кроме того, среда содержала количества дрожжевого экстракта ("YE", Fluka 92144) и трипсиновый гидролизат казеинового пептона ("CP", источник пептидов, Fluka 70172), как показано в табл. 1.

Таблица 1

Составы для сред А-Н

среда	Дрожжевой экстракт, YE [г]	трипсиновый гидролизат казеинового пептона, CP [г]
А	0	0
В	0,5 (10 %)	0,1 (10 %)
С	1,25 (25 %)	2,5 (25 %)
Д	2,5 (50 %)	5 (50 %)
Е	3,75 (75 %)	7,5 (75 %)
F	5 (100 %)	10 (100 %)
G	7,5 (150 %)	15 (150 %)
Н	10 (200 %)	20 (200 %)

На фиг. 10А четко показан эффект увеличения количества пептидов на рост йогуртовой стартовой культуры. Составы "Е", "F", "G" и "H" продемонстрировали более или менее одинаковые результаты, что свидетельствует о невозможности достижения дальнейшего уменьшения лаг-периода. Это означает, что состав "Е" (75% YE и CP) является оптимальной средой для этой стартовой культуры. Для "В" наблюдали явное преимущество в росте по отношению к минимальной среде "А". То же самое касается и сред "С" и "D". Это означает, что в этих случаях среды для этой стартовой культуры были ограничены пептидами, что приводило к значительному уменьшению лаг-периода.

На фиг. 10b представлен эффект РПИ-добавления к средам с различными дозировками пептидов (YE и CP). В этом конкретном примере в средах с концентрациями пептидов до 75% дрожжевого экстракта и казеинового пептона уменьшение лаг-периода можно было наблюдать после добавления РПИ. Дозозависимое уменьшение лаг-периода с помощью РПИ для этой ферментации представлено в средах с концентрациями пептидов 75% YE и CP и ниже.

Пример 8. Очистка и характеристика стимулирующего агента.

Картофельный белок фракционировали по существу в соответствии с методом Pouvreau (Pouvreau 2001).

Концентрат картофельного белка (AVEBE) разводили деминерализованной водой до 1%-го раствора белка и устанавливали pH 8. Нерастворимые вещества удаляли путем центрифугирования при 5000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость загружали на колонку 15×2,6 см, содержащую смолу Source 30Q (GE Healthcare), и элюировали с использованием линейного градиента NaCl 0-0,6 M. Это приводило к получению 8 дискретных белковых фракций, которые были маркировали F1-F8.

Все фракции тестировали на уменьшение лаг-периода в соответствии с методом примера 1. Обнаружили, что фракции F1 и F6 демонстрируют сильное уменьшение лаг-периода, что свидетельствует о том, что активный ингредиент, картофельный белок-ингибитор протеазы, присутствует в этих фракциях. Фракции, F2, F3, F4, F7 и F8 вызывают умеренное уменьшение лаг-периода согласно этим экспериментам, и F5 продемонстрировала полное отсутствие уменьшения лаг-периода. Следовательно, активный ингредиент, картофельный белок-ингибитор протеазы, отсутствует в F5. Тот факт, что активный ингредиент связывается с колонкой в условиях эксперимента, продемонстрировал, что он растворим в воде при pH 8 и имеет изоэлектрическую точку 8 или ниже.

Молекулярные массы фракций определяли на автоматизированной системе электрофореза Expreion (BioRad) в соответствии с инструкциями производителя в денатурирующих, восстанавливающих условиях. Фракции F1 и F6, которые демонстрируют сильное уменьшение лаг-периода, содержат несколько полос, соответствующих одинаковой молекулярной массе, но только одна из них отсутствует во фракции F5: полоса находится между 17,5 и 18,2 кДа (табл. 2). Следовательно, из этого следует, что присутствие этой полосы свидетельствует о сильном уменьшении лаг-периода.

Таблица 2

Фракция	Уменьшение лаг-периода при дозе 0,01% (минуты)	Присутствующая белковая полоса		
		9,5 кДа	17,5-18,2 кДа	30 кДа
F1	60	x	x	X
F2	5			
F3	20			
F4	5			
F5	0	x		X
F6	35	x	x	X
F7	5			
F8	15			

Определение ингибирующей активности протеазы в соответствии с указанным методом показало, что белковые фракции F1 и F6 содержат ингибирующую активность как трипсина, так и химотрипсина, но ни одна из активностей не выдерживала термообработки при 80°C в течение 30 мин. Тем не менее, уменьшение лаг-периода остается интактным по меньшей мере до 90°C, как представлено в примере 3. Данный факт демонстрирует то, что ни TIA, ни STIA не является абсолютным требованием для уменьшения лаг-периода.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

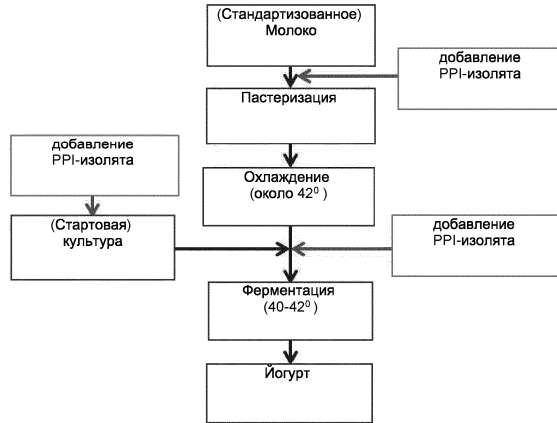
1. Способ приготовления йогурта, включающий стадии обеспечения стартовой культуры для ферментации, содержащей микроорганизм, выбранный из молочнокислых бактерий и дрожжей, в культуральной среде, содержащей молоко, добавления растительного белка-ингибитора протеазы в указанную культуральную среду, обеспечения ферментации молока в йогурт и сбора йогурта.

2. Способ приготовления йогурта по п.1, отличающийся тем, что указанная стартовая культура для ферментации в культуральной среде, содержащей молоко, перед добавлением растительного белка-ингибитора протеазы характеризуется тем, что скорость деградации пептидов, состоящих из 5-30 аминокислот, до аминокислот в результате действия протеаз и/или пептидаз выше, чем скорость образования пептидов, состоящих из 5-30 аминокислот, из белка.

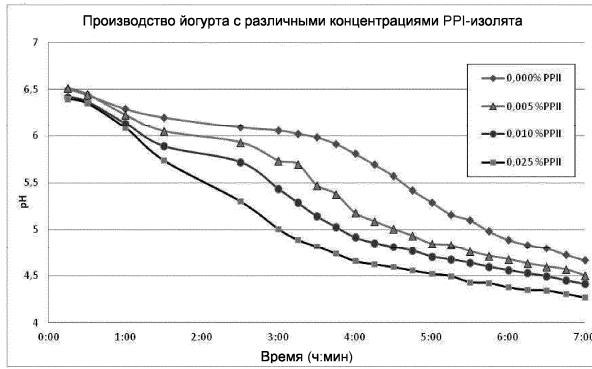
3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что растительный белок-ингибитор протеазы представляет собой картофельный белок-ингибитор протеазы.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что микроорганизм выбран из *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Camobacterium*, *Leuconostoc* и *Pediococcus* или из порядка *Bifidobacteriales*.

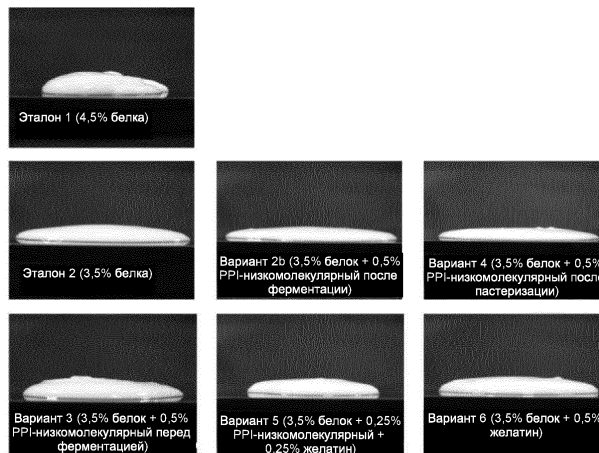
5. Способ по любому из пп.3 и 4, отличающийся тем, что картофельный белок-ингибитор протеазы добавляют в указанную культуральную среду в количестве от 5 до 0,001 г/л.



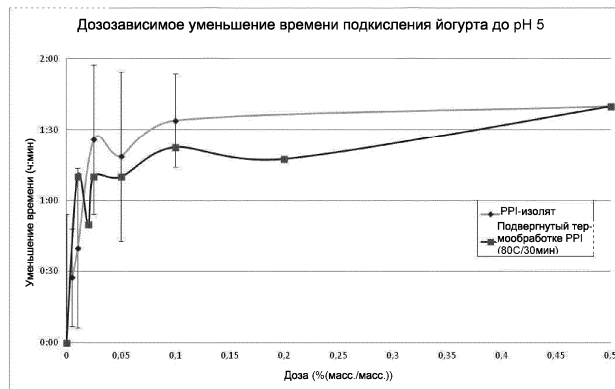
Фиг. 1



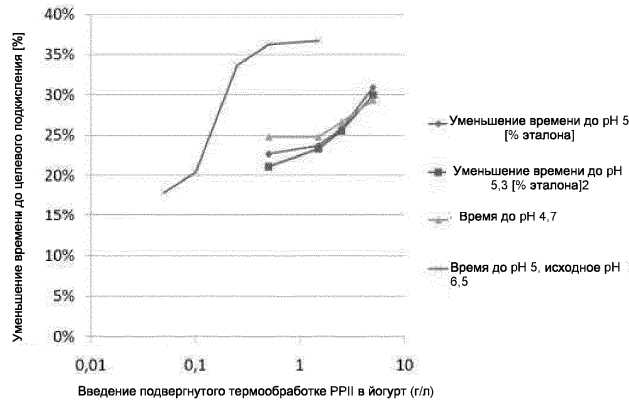
Фиг. 2



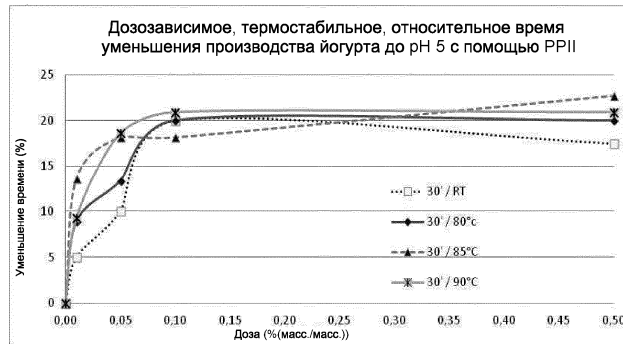
Фиг. 3



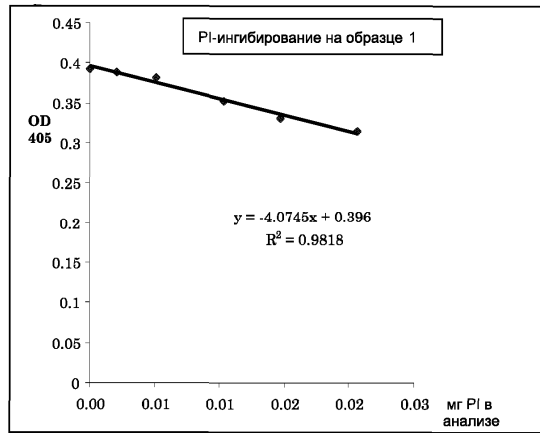
Фиг. 4



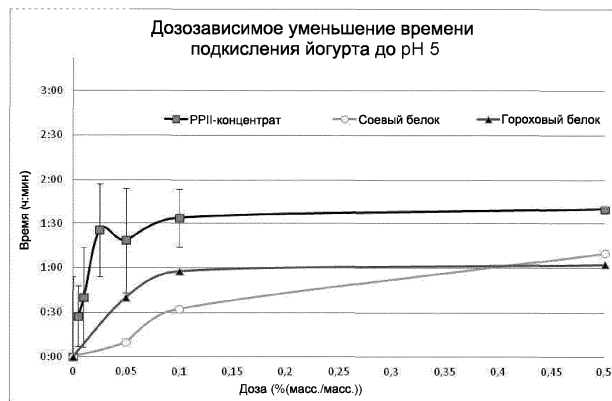
Фиг. 5



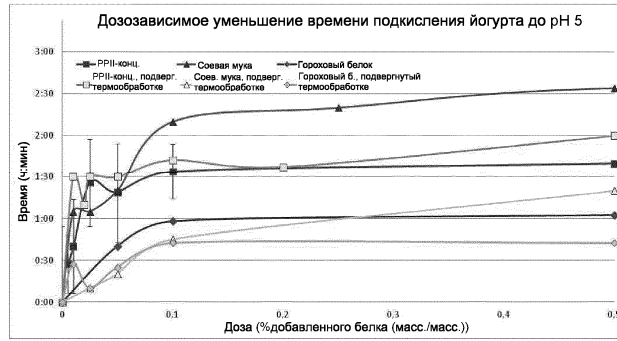
Фиг. 6



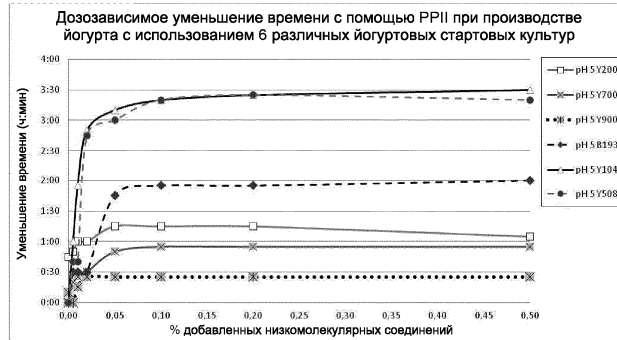
Фиг. 7



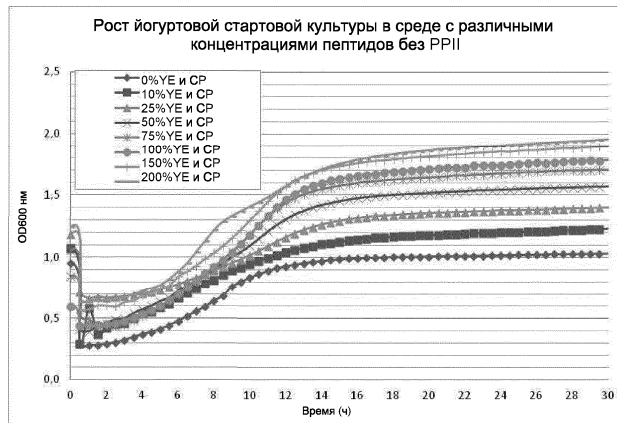
Фиг. 8а



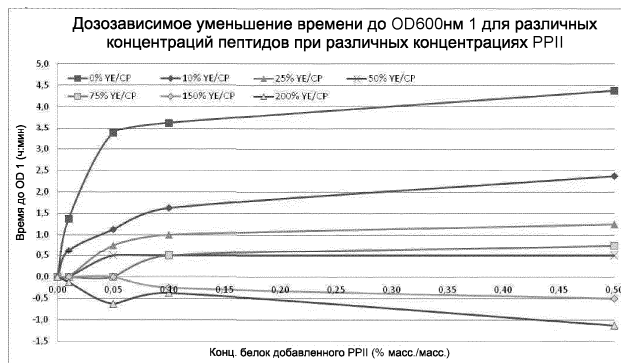
Фиг. 8b



Фиг. 9



Фиг. 10a



Фиг. 10b

