

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 039996

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.06

(21) Номер заявки
201891864

(22) Дата подачи заявки
2017.03.24

(51) Int. Cl. A23C 9/12 (2006.01)
A23C 9/127 (2006.01)
A23C 19/032 (2006.01)
A23C 17/02 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ГЛЮКОЗО-ДЕФИЦИТНЫХ ШТАММОВ STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS В СПОСОБЕ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

(31) 16163186.6

(32) 2016.03.31

(33) EP

(43) 2019.03.29

(86) PCT/EP2017/057083

(87) WO 2017/167660 2017.10.05

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

(72) Изобретатель:
Кристensen Нанна, Хёгхольм Тина,
Енсен Пиа Фрост, Свэйи Клаус (DK)

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

(56) S. SIEUWERTS ET AL.: "Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 74, no. 16, 20 June 2008 (2008-06-20), pages 4997-5007, XP055282735, US ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.00113-08, page 5000, column 2 - page 5001, column 2
US-A1-2015086675
EP-A1-2957180

(57) Изобретение относится к применению штамма Streptococcus thermophilus с недостаточностью метаболизма глюкозы для улучшения роста штамма Lactobacillus в способе получения ферментированного молочного продукта.

039996

B1

039996

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к применению штаммов бактерий *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы в комбинации со штаммом *Lactobacillus* в способе получения ферментированного молочного продукта.

Предшествующий уровень техники

Streptococcus thermophilus представляет собой одну из наиболее широко применяемых молочнокислых бактерий для коммерческой термофильной ферментации молока, где микроорганизм обычно применяют в виде части смешанной заквасочной культуры, где другой компонент представляет собой *Lactobacillus* sp., например *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* для йогурта или *Lactobacillus helveticus* для сыров типа швейцарского (Swiss-type cheese).

В EP-A1-2957180 в одном воплощении раскрыт способ получения ферментированного молочного продукта с использованием комбинации глюкозо-дефицитной заквасочной культуры и обычной лактазы с целью снижения содержания лактозы и уровня конечного подкисления в ферментированном молочном продукте.

В WO 2013/160413 раскрыт ферментирующий галактозу штамм *Streptococcus thermophilus*, где штамм несет мутацию в ДНК-последовательности гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где указанная мутация инактивирует белок глюкокиназу или оказывает негативное действие на экспрессию гена. В конкретном воплощении штамм *Streptococcus thermophilus* также несет мутацию, которая снижает транспорт глюкозы в клетку, например мутацию гена, кодирующего компонент переносчика глюкозы, где мутация инактивирует переносчик глюкозы или имеет негативное влияние на экспрессию гена. В WO 2013/160413 также раскрыты глюкозо-дефицитные штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. При использовании в способе получения ферментированного молочного продукта штаммы *Streptococcus thermophilus* выделяют глюкозу с получением ферментированных молочных продуктов с натуральной (внутренней) сладостью без дополнительной калорийности, повышенной сладости и с пониженными уровнями лактозы.

В Sieuwerts et al., Applied and Environmental Microbiology, Aug. 2008, p. 4997-5007, раскрыто обзорное исследование микробных взаимодействий в процессе ферментации йогурта и сообщается, что, когда виды *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* выращивают в совместной культуре, стимулируется рост обоих видов. Также Sieuwerts сообщает, что *Streptococcus thermophilus* снабжает *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* стимулирующими рост факторами, такими как муравьиная кислота, пировиноградная кислота и фолиевая кислота.

Стандартное определение йогурта во многих странах требует *Streptococcus thermophilus* вместе с *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Оба вида создают требуемые количества ацетальдегида, который, в дополнение к кислотности, представляет собой важный корректирующий компонент в йогурте.

В некоторых типах ферментированных молочных продуктов, содержащих *Streptococcus thermophilus* вместе со штаммом *Lactobacillus*, желательно получать высокий уровень штамма *Lactobacillus*. Также в некоторых странах стандартное определение таких типов ферментированных молочных продуктов требует, чтобы штамм *Lactobacillus* присутствовал в продукте с уровнем примерно 1,0E06 КОЕ/мл. Для таких ферментированных молочных продуктов главной технической проблемой является то, что уровень клеток *Lactobacillus*, полученных при завершении ферментации, не такой высокий, как требуется. Настоящее изобретение относится к получению ферментированного молочного продукта с использованием *Streptococcus thermophilus* вместе со штаммом *Lactobacillus*, где повышенный уровень клеток *Lactobacillus* может быть получен при завершении ферментации.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение направлено на применение штамма *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы для улучшения роста штамма *Lactobacillus* в способе получения ферментированного молочного продукта.

Настоящее изобретение основано на неожиданном экспериментальном открытии, что штаммы *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы способны к усилению роста штаммов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*. Таким образом, применение изобретения дало возможность получения повышенного уровня клеток *Lactobacillus* при завершении ферментации или, альтернативно, применения смеси заквасочных культур с пониженным количеством бактериальных клеток *Lactobacillus*.

Кроме того, при использовании в способе получения ферментированного молочного продукта штаммы *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы обладают способностью выделять глюкозу с получением ферментированных молочных продуктов с натуральной (внутренней) сладостью без дополнительной калорийности, повышенной сладости и с пониженными уровнями лактозы. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением возможно получение ферментированных молочных продуктов с комбинацией повышенного уровня бактериальных клеток *Lactobacillus* и повышенного уровня натуральной сладости.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей штамм *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы и штамм *Lactobacillus*, где отношение КОЕ/г штамма

Streptococcus thermophilus к КОЕ/г штамма *Lactobacillus* составляет по меньшей мере 50.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему инокулирование и ферментирование молочного субстрата композицией по изобретению.

Подробное описание изобретения

Определения

При использовании в настоящем описании изобретения термин "молочнокислая бактерия" обозначает грамположительную, микроаэрофильную или анаэробную бактерию, которая ферментирует сахара с получением кислот, включая молочную кислоту в качестве преимущественно получаемой кислоты, уксусную кислоту и пропионовую кислоту. Наиболее полезные в промышленности молочнокислые бактерии находятся в пределах группы "Lactobacillales", которая включает *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. и *Propionibacterium* spp. Молочнокислые бактерии, включая бактерии виды *Lactobacillus* sp. и *Streptococcus thermophilus*, обычно поставляются в молочную промышленность либо в виде замороженных или лиофилизированных культур для выращивания производственной закваски, либо в виде так называемых культур "для прямого внесения" (DVS). Культуры DVS предназначены для непосредственной инокуляции в резервуар для ферментации или ванну для получения молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт. Такие культуры в целом называются "заквасочными культурами" или "заквасками".

Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "содержащий в себе" следует истолковывать как неограничивающие термины (то есть означающие "включающий, но без ограничения"), если не указано иначе. Перечисление диапазонов величин в настоящем описании изобретения предназначено только для использования в качестве сокращенного способа ссылки на каждое отдельно взятое значение, попадающее в указанный диапазон, если в настоящем описании изобретения не указано иначе, и каждое отдельно взятое значение включено в описание изобретения так, как если бы они были отдельно изложены в настоящем описании изобретения. Все способы, описанные в настоящем описании изобретения, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если в настоящем описании изобретения не указано иное или иным образом не противоречит очевидным образом контексту. Использование любого и всех примеров, или типичное выражение (например "такой как"), предлагаемое в настоящем описании изобретения, предназначены только для того, чтобы лучше разъяснить изобретение, и не представляют собой ограничение объема изобретения, если не заявлено иначе. В описании изобретения ни одно выражение не следует рассматривать как указывающее на то, что какой-либо незаъявленный элемент является существенным для практического применения изобретения.

Бактериальный "штамм" при использовании в настоящем описании изобретения относится к бактерии, которая остается генетически неизменной при выращивании или размножении. Включает большое количество идентичных бактерий.

Термин "ферментирующие галактозу штаммы *Streptococcus thermophilus*" при использовании в настоящем описании изобретения относится к штаммам *Streptococcus thermophilus*, которые способны к росту на/в среде M17+2% галактозы. Ферментирующие галактозу штаммы *Streptococcus thermophilus* определяются в настоящем описании изобретения как штаммы *Streptococcus thermophilus*, которые снижают pH бульона M17, содержащего 2% галактозы в качестве единственного углевода, до 5,5 или ниже при инокулировании из ночной культуры в концентрации 1% и инкубировании в течение 24 ч при 37°C.

Термин "мутация инактивирует белок глюкокиназу" при использовании в настоящем описании изобретения относится к мутации, которая приводит к "инактивированному белку глюкокиназе", то есть к белку глюкокиназе, который, если присутствует в клетке, не способен проявлять свою нормальную функцию, а также к мутациям, которые препятствуют формированию белка глюкокиназы или приводят к расщеплению белка глюкокиназы. В частности, инактивированный белок глюкокиназа представляет собой белок, который по сравнению с функциональным белком глюкокиназой не способен облегчать фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата или облегчает фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфат со значительно пониженной скоростью. Ген, кодирующий такой инактивированный белок глюкокиназу, по сравнению с геном, кодирующим функциональный белок глюкокиназу, содержит мутацию в открытой рамке считывания (ORF) гена, где указанная мутация может включать, без ограничения, делецию, мутацию сдвига рамки считывания, включение стоп-кодона, или мутацию, которая приводит к аминокислотной замене, которая изменяет функциональные свойства белка, или мутацию промотора, которая снижает или отменяет транскрипцию или трансляцию гена.

Термин "функциональный белок глюкокиназа" при использовании в настоящем описании изобретения относится к белку глюкокиназе, который, если имеется в клетке, облегчает фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата. В частности, функциональный белок глюкокиназа может быть кодирован геном, содержащим ORF, которая имеет последовательность, соответствующую положениям 1-966 в SEQ ID NO: 1, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичность, такую как по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность, такую как по меньшей мере 99% идентичность, с последовательностью, соответствующей положениям 1-966 SEQ ID NO: 1.

Процент идентичности двух последовательностей может быть определен посредством использования математических алгоритмов, таких как алгоритм Karlin и Altschul (1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87; 2264), модифицированный алгоритм, описанный у Карлином и Альтшулом (Karlin and Altschul) (1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90; 5873-5877); алгоритм Майерса и Миллера (Myers and Miller) (1988. CABIOS 4;11-17); алгоритм Нидлмана и Вунша (Needleman and Wunsch) (1970. J. Mol. Biol. 48; 443-453); и алгоритм Пирсона и Липмана (Pearson and Lipman) (1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 2444-2448). Также доступна компьютерная программа для определения идентичности последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот на основе этих математических алгоритмов. Например, сравнение нуклеотидных последовательностей может быть выполнено с помощью программы BLASTN, оценка=100, длина слова=12. Сравнение аминокислотных последовательностей может быть выполнено с помощью программы BLASTX, оценка=50, длина слова=3. Для остальных параметров программ BLAST можно использовать стандартные параметры.

"Мутантная бактерия" или "мутантный штамм" при использовании в настоящем описании изобретения относится к натуральной (спонтанной, встречающейся в природе) мутантной бактерии или индуцированной мутантной бактерии, содержащей одну или более мутаций в своем геноме (ДНК), которые отсутствуют в ДНК дикого типа. "Индукцированный мутант" представляет собой бактерию, где мутация индуцировалась человеком посредством обработки, такой как обработка химическими мутагенами, УФ-или гамма излучением и так далее. В отличие от этого, "спонтанный мутант" или "встречающейся в природе мутант" не были подвергнуты мутагенезу человеком. Мутантные бактерии в настоящем описании изобретения не являются ГМО (генетически модифицированный микроорганизм), то есть не модифицированы посредством генной инженерии.

"Штамм дикого типа" относится к немутировавшей форме бактерии, которая находится в природе.

Термины, такие как "штаммы со свойством подслащивания", "штаммы, которые могут давать желательное накопление глюкозы в ферментированном молочном продукте" и "штаммы с усиленными свойствами натурального подслащивания пищевых продуктов" используют в настоящем описании изобретения взаимозаменяемо для описания полезного эффекта применения штаммов по настоящему изобретению в ферментации молочных продуктов.

Термин "устойчивый к 2-дезоксиглюкозе" в настоящем описании изобретения в отношении *Streptococcus thermophilus* определяется тем, что конкретный мутировавший бактериальный штамм обладает способностью вырастать до колонии при нанесении штрихами на планшет со средой M17, содержащей 20 мМ 2-дезоксиглюкозы, после инкубации при 40°C в течение 20 ч. Присутствие 2-дезоксиглюкозы в культуральной среде будет препятствовать росту немутированных штаммов, в то время как рост мутированных штаммов не подвергается изменению или не подвергается изменению значительно. Немутировавшие штаммы, которые можно использовать в качестве чувствительных эталонных штаммов в оценке устойчивости, предпочтительно включают штаммы CHCC14994 и CHCC11976.

Термин "мутация, которая снижает транспорт глюкозы в клетку" при использовании в настоящем описании изобретения относится к мутации гена, кодирующего белок, вовлеченный в транспорт глюкозы, которая приводит к накоплению глюкозы в окружающей среде клетки.

Уровень глюкозы в культуральной среде штамма *Streptococcus thermophilus* может быть легко измерен методами, известными специалисту в данной области техники.

Термин "мутация инактивирует переносчик глюкозы" при использовании в настоящем описании изобретения относится к мутации, которая имеет результатом "инактивированный переносчик глюкозы", то есть белок-переносчик глюкозы, который, если имеется в клетке, не способен проявлять свою нормальную функцию, а также к мутациям, которые препятствуют формированию белка-переносчика глюкозы или приводят к расщеплению белка-переносчика глюкозы.

Термин "функциональный белок-переносчик глюкозы" при использовании в настоящем описании изобретения относится к белку-переносчику глюкозы, который, если имеется в клетке, облегчает транспорт глюкозы через плазматическую мембрану.

В данном контексте термин "штаммы, полученные из них" следует понимать как штаммы, полученные, или штаммы, которые могут быть получены из штамма (или их материнский штамм) по изобретению посредством, например, генной инженерии, излучения и/или химической обработки. "Штаммы, полученные из них" также могут представлять собой спонтанно появляющиеся мутанты. Предпочтительно, чтобы "штаммы, полученные из них" представляли собой функционально эквивалентные мутанты, например мутанты, которые имеют по существу такие же или улучшенные свойства (например, относительно выделения глюкозы) как их материнский штамм. Такие "штаммы, полученные из них" представляют собой часть настоящего изобретения. В особенности, термин "штаммы, полученные из них" относится к штаммам, полученным путем подвергания штамма по изобретению любой традиционно используемой обработке для мутагенеза, включая обработку химическим мутагеном, таким как этилметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ-излучением, или к спонтанно появляющемуся мутанту. Мутант мог быть подвергнут нескольким обработкам для мутагенеза (разовую обработку следует понимать как одну стадию мутагенизации с последующей стадией скрининга/селекции), но в контексте настоящего изобретения предпочтительно, чтобы выполнялось не более 20,

или не более 10, или не более 5 обработок (или стадий скрининга/селекции). В предпочтительном в контексте настоящего изобретения мутанте менее 1%, менее 0,1%, менее 0,01%, менее 0,001% или даже менее 0,0001% нуклеотидов в бактериальном геноме по сравнению с материнским штаммом было заменено другим нуклеотидом или удалено.

Термин "устойчивый к 2-дезоксиглюкозе" в отношении штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* означает, что конкретный бактериальный штамм имеет способность вырастать до колонии после инкубации при 40°C в течение 20 ч при нанесении штрихами на планшет со средой MRS-IM, содержащей 2% лактозы и 20 мМ 2-дезоксиглюкозы. Присутствие 2-дезоксиглюкозы в культуральной среде будет препятствовать росту неустойчивых штаммов, в то время как рост устойчивых штаммов не подвергается изменению или не подвергается изменению значительно. Неустойчивые штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, которые можно использовать в качестве чувствительных эталонных штаммов в оценке устойчивости, включают штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759, который депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур; DSMZ) под учетным номером DSM 26419, и CHCC10019, который депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) под учетным номером DSM 19252.

Термин "глюкозо-дефицитный" используют в контексте настоящего изобретения для характеристики LAB (лактобактерий), которые частично либо полностью утратили способность использовать глюкозу в качестве источника для роста клеток или сохранения жизнеспособности клеток. Соответствующая недостаточность метаболизма глюкозы может быть вызвана, например, мутацией гена, ингибирующего или инактивирующего экспрессию или активность белка глюкокиназы или белка переносчика глюкозы. LAB с недостаточностью метаболизма глюкозы может быть охарактеризована как повышающая концентрацию глюкозы в культуральной среде при выращивании на лактозе в качестве источника углевода. Повышение глюкозы вызывается секрецией глюкозы глюкозо-дефицитными LAB. Повышение концентрации глюкозы в культуральной среде может быть определено посредством анализа HPLC (высокоэффективной жидкостной хроматографией), например с использованием колонки Dionex CarboPac PA 20 3x150 мм (Thermo Fisher Scientific, номер изделия 060142).

Термин "глюкозо-положительный" используют в контексте настоящего изобретения для описания LAB, которые частично либо полностью сохранили способность использовать глюкозу в качестве источника для роста клеток или сохранения жизнеспособности клеток.

Термин "род" означает род, как определено на следующем вебсайте:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

По отношению к штаммам рода *Lactobacillus*, термин "KOE" обозначает колониеобразующие единицы, которые определяют по росту (образование колонии) на планшете с агаром MRS, инкубированном в анаэробных условиях при 37°C в течение 3 суток. Агар MRS имеет следующий состав (г/л):

протеозопептон Bacto № 3: 10,0;
говяжий экстракт Bacto: 10,0;
дрожжевой экстракт Bacto: 5,0;
декстроза: 20,0;
комплекс сорбитан моноолеат: 1,0;
цитрат аммония: 2,0;
ацетат натрия: 5,0;
сульфат магния: 0,1;
сульфат марганца: 0,05;
двухосновный фосфат калия: 2,0;
агар Bacto: 15,0;
вода качества Milli-Q: 1000 мл.

Значение pH доводили до 5,4 или 6,5; pH доводили до 6,5 для *L. rhamnosus*, *L. casei* и *L. paracasei*. Для всех других видов *Lactobacillus* pH доводили до 5,4. В частности, pH доводили до 5,4 для *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; *L. acidophilus* и *L. helveticus*. pH доводили до 6,5 для *L. rhamnosus*, *L. casei* и *L. paracasei*.

По отношению к *Streptococcus thermophilus*, термин "KOE" обозначает колониеобразующие единицы, которые определяют по росту (образование колонии) на планшете с агаром M17, инкубированном в аэробных условиях при 37°C в течение 3 суток. Агар M17 имеет следующий состав (г/л):

триптон: 2,5 г;
пептический гидролизат мяса: 2,5 г;
папаиновый гидролизат соевой муки: 5,0 г;
дрожжевой экстракт: 2,5 г;
мясной экстракт: 5,0 г;
лактоза: 5,0 г;
глицерофосфат натрия: 19,0 г;
сульфат магния, 7 H₂O: 0,25 г;

аскорбиновая кислота: 0,5 г;
агар: 15,0 г;
вода качества Milli-Q: 1000 мл.

Значение pH довели до конечного pH $7,1 \pm 0,2$ (25°C).

Выражение "отношение КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus* к КОЕ/г штамма *Lactobacillus*" обозначает количество клеток штамма *Streptococcus thermophilus* в КОЕ/г, содержащихся в композиции, разделенное на количество клеток штамма *Lactobacillus* в КОЕ/г, содержащихся в указанной композиции. Если в композиции присутствует больше чем один штамм *Streptococcus thermophilus*, указанное количество клеток представляет собой сумму всех присутствующих бактерий *Streptococcus thermophilus*. Если в композиции присутствует больше чем один штамм *Lactobacillus*, указанное количество клеток представляет собой сумму всех присутствующих *Lactobacillus*.

Термин "X,YEZZ" обозначает $X,Y \times 10^{ZZ}$.

Штамм *Streptococcus thermophilus* в применении согласно изобретению

В конкретном воплощении применения по изобретению штамм *Streptococcus thermophilus* является ферментирующим галактозу и несет мутацию в ДНК-последовательности гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где мутация инактивирует белок глюкокиназу или оказывает негативное действие на экспрессию указанного гена. Методы измерения уровня активности глюкокиназы или уровня экспрессии гена глюкокиназы общеизвестны (Porter et al. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 709; 178-186) и включают ферментный анализ с помощью имеющихся в продаже наборов и транскриптомику или количественную PCR (полимеразную цепную реакцию) с использованием веществ, которые являются легкодоступными.

В предпочтительных воплощениях мутация снижает активность (скорость фосфорилирования глюкозы до глюкозо-6-фосфата) белка глюкокиназы по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 90%.

Активность глюкокиназы может быть определена путем ферментных анализов глюкокиназы, как описано в Pool et al. (2006. *Metabolic Engineering* 8; 456-464).

Ферментирующие галактозу штаммы могут быть получены посредством способа, описанного в WO 2011/026863.

В частном воплощении применения по изобретению штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию, которая снижает транспорт глюкозы в клетку. В конкретном воплощении штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию в гене, кодирующем компонент переносчика глюкозы, где мутация инактивирует переносчик глюкозы или негативное действие на экспрессию указанного гена. В более конкретном воплощении штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию в ДНК-последовательности гена *manM*, кодирующего белок ПС^{Man} системы глюкозо/маннозо-фосфотрансферазы, где мутация инактивирует белок ПС^{Man} или оказывает негативное действие на экспрессию гена. В другом конкретном воплощении изобретения штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в ДНК-последовательности гена *manN*, кодирующего белок ПД^{Man} системы глюкозо/маннозо-фосфотрансферазы, где мутация инактивирует белок ПД^{Man} или оказывает негативное действие на экспрессию гена.

В предпочтительных воплощениях мутация снижает транспорт глюкозы в клетку по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 90%.

Транспорт глюкозы в клетку может быть определен посредством анализа поглощения глюкозы, который описан в Cochu et al. (2003. *Appl Environ Microbiol* 69(9); 5423-5432).

Предпочтительно штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию гена, кодирующего компонент переносчика глюкозы, где мутация инактивирует белок-переносчик глюкозы или оказывает негативное действие на экспрессию гена.

Компонент может представлять собой любой компонент белка-переносчика глюкозы, который является критическим для транспорта глюкозы. Например, предполагается, что инактивация любого компонента системы глюкозо/маннозо-фосфотрансферазы у *Streptococcus thermophilus* будет приводить к инактивации функции переносчика глюкозы.

В частности, инактивированный белок-переносчик глюкозы представляет собой белок, который по сравнению с функциональным белком-переносчиком глюкозы не способен облегчать транспорт глюкозы через плазматическую мембрану или облегчает транспорт глюкозы через плазматическую мембрану со значительно пониженной скоростью. Ген, кодирующий такой инактивированный белок-переносчик глюкозы, по сравнению с геном, кодирующим функциональный белок-переносчик глюкозы, содержит мутацию в открытой рамке считывания (ORF) гена, где указанная мутация может включать, без ограничения, делецию, мутацию сдвига рамки считывания, включение стоп-кодона, или мутацию, которая приводит к аминокислотной замене, которая изменяет функциональные свойства белка, или мутацию промотора, которая снижает или отменяет транскрипцию или трансляцию гена.

В предпочтительных воплощениях мутацию снижает активность (скорость транспорта глюкозы) белка-переносчика глюкозы по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по

меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 90%.

Активность переносчика глюкозы может быть определена посредством анализа поглощения глюкозы, как описано в Cochu et al. (2003. Appl Environ Microbiol 69(9); 5423-5432).

В конкретном воплощении применения по изобретению штамм *Streptococcus thermophilus* повышает количество глюкозы в 9,5% В-молоке по меньшей мере до 5 мг/мл при инокуляции в 9,5% В-молоко в концентрации 1,0E06-1,0E07 КОЕ/мл и выращивании при 40°C в течение 20 ч.

В конкретном воплощении применения изобретения штамм *Streptococcus thermophilus* повышает количество глюкозы в 9,5% В-молоке, содержащем 0,05% сахарозы, до по меньшей мере 5 мг/мл при инокулировании в 9,5% В-молоко, содержащее 0,05% сахарозы, в концентрации 1,0E06-1,0E07 КОЕ/мл и выращивании при 40°C в течение 20 ч.

В данном контексте 9,5% В-молоко представляет собой обработанное нагреванием молоко, изготовленное с использованием сухого обезжиренного молока с низкой жирностью, восстановленного до сухой массы 9,5%, и пастеризованное при 99°C в течение 30 мин с последующим охлаждением до 40°C.

В более предпочтительных воплощениях изобретения мутантный штамм приводит к повышению количества глюкозы по меньшей мере до 6 мг/мл, например по меньшей мере до 7 мг/мл, например по меньшей мере до 8 мг/мл, например по меньшей мере до 9 мг/мл, например по меньшей мере до 10 мг/мл, например по меньшей мере до 11 мг/мл, например по меньшей мере до 12 мг/мл, например по меньшей мере до 13 мг/мл, например по меньшей мере до 14 мг/мл, например по меньшей мере до 15 мг/мл, например по меньшей мере до 20 мг/мл, например по меньшей мере до 25 мг/мл.

В конкретном воплощении применения по изобретению штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) под учетным номером DSM 25850, штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC15887, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 25851, штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 26722, *Streptococcus thermophilus* CHCC16731, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 28889, *Streptococcus thermophilus* CHCC19216, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 32227, и мутантного штамма, полученного из них, где мутантный штамм получен путем использования одного из указанных депонированных штаммов в качестве исходного материала и где у мутанта сохранено или дополнительно улучшено свойство ферментирования лактозы и/или свойство секретирования глюкозы указанного депонированного штамма.

В наиболее предпочтительном воплощении настоящего изобретения мутантный штамм представляет собой встречающейся в природе мутант или индуцированный мутант.

В другом воплощении изобретения мутантный штамм *Streptococcus thermophilus* является устойчивым к 2-дезоксиглюкозе.

Lactobacillus штамм в применении согласно изобретению

Бактериальный штамм *Lactobacillus* по изобретению может представлять собой любой бактериальный штамм рода *Lactobacillus*. В конкретном воплощении штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*. В предпочтительном воплощении изобретения штамм *Lactobacillus* выбирают из группы, состоящей из *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus acidophilus*.

В конкретном воплощении бактериальный штамм *Lactobacillus* по изобретению представляет собой *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* представляет собой молочнокислую бактерию, которую часто используют для коммерческой молочной ферментации, где микроорганизм обычно используют в виде части смешанной заквасочной культуры.

В одном воплощении изобретения бактериальный штамм *Lactobacillus* по изобретению является глюкозо-дефицитным. В альтернативном воплощении изобретения бактериальный штамм *Lactobacillus* по изобретению является глюкозо-положительным.

В частности, штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* по изобретению представляет собой штамм, который является устойчивым к 2-дезоксиглюкозе. В конкретном воплощении изобретения штамм *Lactobacillus* представляет собой штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, где штамм является устойчивым к 2-дезоксиглюкозе и где штамм повышает количество глюкозы в 9,5% В-молоке по меньшей мере до 5 мг/мл при инокуляции в 9,5% В-молоко в концентрации 1,0E06- 1,0E07 КОЕ/мл и выращивании при 40°C в течение по меньшей мере 20 ч.

В конкретном воплощении изобретения штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 26420, штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160, который был депонирован в Deutsche

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 26421, и мутантного штамма, полученного из них, где мутантный штамм получен путем использования одного из указанных депонированных штаммов в качестве исходного материала и где у мутанта сохранено или дополнительно улучшено свойство ферментирования лактозы и/или свойство секретирования глюкозы указанного депонированного штамма.

В другом конкретном воплощении изобретения штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC4351, который депонировали в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) под учетным номером DSM22586, и мутантного штамма, полученного из них, где мутантный штамм получен путем использования одного из депонированных штаммов в качестве исходного материала.

В конкретном воплощении изобретения штамм *Lactobacillus paracasei* выбран из группы, состоящей из штамма CHCC2115, который депонировали в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH под учетным номером DSM 19465, и мутантного штамма, полученного из него, где мутантный штамм получен путем использования одного из депонированных штаммов в качестве исходного материала.

В конкретном воплощении изобретения штамм *Lactobacillus acidophilus* выбран из группы, состоящей из штамма CHCC2169, который был депонирован как DSM13241 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, и мутантного штамма, полученного из него, где мутантный штамм получен путем использования одного из депонированных штаммов в качестве исходного материала.

Ферментированные молочные продукты, полученные применением согласно изобретению

Термин "молоко" следует понимать как секрецию молока, полученную путем доения любого млекопитающего, такого как корова, овца, коза, буйволица или верблюдица. В предпочтительном воплощении молоко представляет собой коровье молоко.

Термин "молочный субстрат" может представлять собой любой сырое и/или переработанное молочное сырье, которое можно подвергать ферментации согласно способу по изобретению. Таким образом, пригодные молочные субстраты включают, без ограничения, растворы/суспензии любых молочных или молочноподобных продуктов, содержащих белок, такой как цельное молоко или молоко пониженной жирности, обезжиренное молоко, пахта, восстановленный молочный порошок, сгущенное молоко, сухое молоко, сыворотка, сывороточный пермеат, лактоза, маточная жидкость от кристаллизации лактозы, концентрат сывороточного белка или сливки. Очевидно молочный субстрат может происходить от любого млекопитающего, например представлять собой по существу чистое молоко млекопитающего или восстановленный молочный порошок.

Предпочтительно по меньшей мере часть белка в молочном субстрате представляет собой белки, встречающиеся в природе в молоке, такие как казеин или сывороточный белок. Однако часть белка может представлять собой белки, которые не встречаются в природе в молоке.

Перед ферментацией молочный субстрат может быть гомогенизирован и пастеризован в соответствии с методами, известным в данной области техники.

"Гомогенизирование" при использовании в настоящем описании изобретения означает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию выполняют до ферментации, она может быть выполнена таким образом, чтобы измельчить молочный жир до меньших размеров так, чтобы он больше не отделялся от молока. Это может быть достигнуто пропусканием молока под высоким давлением через маленькое отверстие.

"Пастеризация" при использовании в настоящем описании изобретения означает обработку молочного субстрата для уменьшения или исключения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно пастеризация достигается путем поддержания заданной температуры в течение заданного периода времени. Заданная температура обычно достигается путем нагревания. Температуру и продолжительность можно выбирать для того, чтобы уничтожить или инактивировать некоторые бактерии, такие как вредные бактерии. Может последовать стадия быстрого охлаждения.

"Ферментация" в способах по настоящему изобретению означает превращение углеводов в спирты или кислоты, вызванное метаболизмом микроорганизма. Предпочтительно ферментации в способах по изобретению включает превращение лактозы в молочную кислоту.

Процессы ферментации для использования в получении ферментированных молочных продуктов хорошо известны и специалист в данной области техники будет знать, как выбрать подходящие условия процесса, такие как температура, количество кислорода, количество и характеристики микроорганизма(ов) и время процесса. Очевидно, что условия ферментации выбираются так, чтобы способствовать осуществлению настоящего изобретения, то есть получать молочный продукт в твердой или жидкой форме (ферментированный молочный продукт).

Термин "ферментированный молочный продукт" при использовании в настоящем описании изобретения относится к пищевому или кормовому продукту, где в получение пищевого или кормового продукта вовлечена ферментация молочного субстрата молочнокислыми бактериями. "Ферментированный молочный продукт" при использовании в настоящем описании изобретения включает без ограничения продукты, такие как йогурт и сыр.

Примеры сыров, которые получают посредством ферментации с *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, включают моцареллу и сыр для пиццы (Høier et al. (2010) in *The Technology of Cheesemaking*, 2nd Ed. Blackwll Publishing, Oxford; 166-192).

Предпочтительно, ферментированный молочный продукт представляет собой йогурт.

В контексте настоящего изобретения заквасочная культура для йогурта представляет собой бактериальную культуру, которая содержит по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*. В соответствии с этим термин "йогурт" относится к ферментированному молочному продукту, получаемому путем инокуляции и ферментации молока с помощью композиции, содержащей штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и штамм *Streptococcus thermophilus*.

Применение согласно изобретению

В одном воплощении применения штамма *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы для улучшения роста штамма *Lactobacillus* в способе получения ферментированного молочного продукта, соотношение штамма *Streptococcus thermophilus* к штамму *Lactobacillus* выбирают на обычном уровне, и в результате в ферментированном молочном продукте получают повышенный уровень штамма *Lactobacillus*. В частности, отношение КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus* к КОЕ/г штамма *Lactobacillus* составляет от 10 до 500, предпочтительно от 50 до 400, более предпочтительно от 80 до 300 и наиболее предпочтительно от 100 до 200.

Во втором воплощении применения штамма *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы для улучшения роста штамма *Lactobacillus* в способе получения ферментированного молочного продукта, отношение штамма *Streptococcus thermophilus* к штамму *Lactobacillus* выбирают на пониженном уровне, и в результате получают обычный уровень штамма *Lactobacillus* в ферментированном молочном продукте. В частности, в начале ферментации отношение КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus* к КОЕ/г штамма *Lactobacillus* составляет по меньшей мере 50, предпочтительно по меньшей мере 80, более предпочтительно по меньшей мере 100, более предпочтительно по меньшей мере 150, более предпочтительно по меньшей мере 200, более предпочтительно по меньшей мере 250, более предпочтительно по меньшей мере 300, более предпочтительно по меньшей мере 350, более предпочтительно по меньшей мере 400, более предпочтительно по меньшей мере 450, более предпочтительно по меньшей мере 500, более предпочтительно по меньшей мере 550, более предпочтительно по меньшей мере 600, более предпочтительно по меньшей мере 650, более предпочтительно по меньшей мере 700, более предпочтительно по меньшей мере 750, более предпочтительно по меньшей мере 800, более предпочтительно по меньшей мере 850, более предпочтительно по меньшей мере 900 и наиболее предпочтительно по меньшей мере 950. В этом случае отношение КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus* к КОЕ/г штамма *Lactobacillus* составляет ниже 2000, более предпочтительно ниже 1800, более предпочтительно ниже 1600, более предпочтительно ниже 1400, более предпочтительно ниже 1200 и наиболее предпочтительно ниже 1000.

В конкретном воплощении применения по изобретению штамм *Streptococcus thermophilus* повышает количество штамма *Lactobacillus* по меньшей мере до 5,0E06 КОЕ/г в ферментированном молочном продукте в конце ферментации при инокуляции в молочный субстрат в концентрации 1,0E07-1,0E08 КОЕ/г в молочном субстрате и выращивании при 43°C до достижения pH 4,55, где молочный субстрат представляет собой смесь свежего обезжиренного молока с содержанием жира 0,1%, свежего полужирного молока с содержанием жира 1,5% и сухого обезжиренного молока и где молочный субстрат содержит 4,7% белка, и 1,0% жира, и 0,05% сахарозы.

Композиция по изобретению

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей штамм *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы и штамм *Lactobacillus*, где отношение КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus* к КОЕ/г штамма *Lactobacillus* равно по меньшей мере 50.

Композиция по изобретению основана на неожиданном экспериментальном обнаружении, что штаммы *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы способны усиливать рост штаммов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* и что вследствие этого возможно выполнять ферментацию молока с помощью смеси заквасочных культур, имеющей пониженный уровень штамма *Lactobacillus* по отношению к штамму *Streptococcus thermophilus*, и по-прежнему получать приемлемый уровень штамма *Lactobacillus* при завершении ферментации.

В конкретном воплощении композиции по изобретению отношение КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus* к КОЕ/г штамма *Lactobacillus* составляет по меньшей мере 80, предпочтительно по меньшей мере 100, более предпочтительно по меньшей мере 150, более предпочтительно по меньшей мере 200, более предпочтительно по меньшей мере 250, более предпочтительно по меньшей мере 300, более предпочтительно по меньшей мере 350, более предпочтительно по меньшей мере 400, более предпочтительно по меньшей мере 450, более предпочтительно по меньшей мере 500, более предпочтительно по меньшей мере 550, более предпочтительно по меньшей мере 600, более предпочтительно по меньшей мере 650, более предпочтительно по меньшей мере 700, более предпочтительно по меньшей мере 750, более предпочтительно по меньшей мере 800, более предпочтительно по меньшей мере 850, более предпочтительно

по меньшей мере 900 и наиболее предпочтительно по меньшей мере 950.

В конкретном воплощении композиции по изобретению отношение КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus* к КОЕ/г штамма *Lactobacillus* составляет ниже 2000, более предпочтительно ниже 1800, более предпочтительно ниже 1600, более предпочтительно ниже 1400, более предпочтительно ниже 1200 и наиболее предпочтительно ниже 1000.

В конкретном воплощении композиция по изобретению содержит от 1,0E04 до 1,0E12 КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus*, например от 1,0E05 до 1,0E11 КОЕ/г, например от 1,0E06 до 1,0E10 КОЕ/г, или например от 1,0E07 до 1,0E09 КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus*.

В частности, штамм *Streptococcus thermophilus* композиции по изобретению представляет собой штамм *Streptococcus thermophilus*, как описано выше по отношению к применению по изобретению. В частности, штамм *Lactobacillus* композиции по изобретению представляет собой штамм *Lactobacillus*, как описано выше по отношению к применению по изобретению.

В предпочтительной композиции по настоящему изобретению штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) под учетным номером DSM 25850, штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC15887, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 25851, штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 26722, *Streptococcus thermophilus* CHCC16731, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 28889, *Streptococcus thermophilus* CHCC19216, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 32227, и мутантного штамма, полученного из них, где мутантный штамм получен путем использования одного из указанных депонированных штаммов в качестве исходного материала и где у мутанта сохранено или дополнительно улучшено свойство ферментирования лактозы и/или свойство секретирования глюкозы указанного депонированного штамма.

В одном воплощении изобретения бактериальный штамм *Lactobacillus* по изобретению является глюкозо-дефицитным. В альтернативном воплощении изобретения бактериальный штамм *Lactobacillus* по изобретению является глюкозо-положительным.

В предпочтительной композиции по настоящему изобретению штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 26420, штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 26421, и мутантного штамма, полученного из них, где мутантный штамм получен путем использования одного из указанных депонированных штаммов в качестве исходного материала и где у мутанта сохранено или дополнительно улучшено свойство ферментирования лактозы и/или свойство секретирования глюкозы указанного депонированного штамма.

В другом конкретном воплощении композиции по изобретению штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC4351, который депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) под учетным номером DSM22586, и мутантного штамма полученного из него, где мутантный штамм получен путем использования одного из депонированных штаммов в качестве исходного материала и где у мутанта сохранено или дополнительно улучшено свойство ферментирования глюкозы указанного депонированного штамма.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* и другие молочнокислые бактерии обычно используют в качестве заквасочных культур, служащих технологической цели, например в молочной промышленности, в производстве различных пищевых продуктов, например для ферментированных молочных продуктов. Таким образом, в другом предпочтительном воплощении композиции является подходящей в качестве заквасочной культуры.

Заквасочные культуры могут быть предложены в виде замороженных или сухих заквасочных культур в дополнение к жидким заквасочным культурам. Таким образом, в еще одном предпочтительном воплощении композиции находится в замороженной, лиофилизированной или жидкой форме.

Как раскрыто в WO 2005/003327, выгодно добавлять некоторые криозащитные агенты в заквасочные культуры. Таким образом, композиция заквасочной культуры согласно настоящему изобретению может содержать один или более криозащитных 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 любых таких соединений.

Способ получения ферментированного молочного продукта

Настоящее изобретение также относится к способу получения ферментированного молочного про-

дукта, включающему инокулирование и ферментирование молочного субстрата композицией по изобретению.

Ниже в качестве неограничивающих примеров описаны воплощения настоящего изобретения.

Примеры

Вещества и способы

Агаровая среда для подсчета клеток штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

КОЕ определяли по росту (образованию колонии) на планшете с агаром MRS, инкубированном в анаэробных условиях при 37°C в течение 3 суток. Агар MRS имеет следующий состав (г/л):

протеозопептон Васто № 3: 10,0;
 мясной экстракт Васто: 10,0;
 дрожжевой экстракт Васто: 5,0;
 декстроза: 20,0;
 комплекс сорбитан моноолеат: 1,0;
 цитрат аммония: 2,0;
 ацетат натрия: 5,0;
 сульфат магния: 0,1;
 сульфат марганца: 0,05;
 двузамещенный фосфат калия: 2,0;
 агар Васто: 15,0;
 вода качества Milli-Q: 1000 мл.
 pH доводили до 5,4.

Агаровая среда для подсчета клеток штаммов *Streptococcus thermophilus*

Для *Streptococcus thermophilus* используемая среда представляет собой среду M17, известную специалисту в данной области техники. Бактерии выращивали в аэробных условиях при 37°C в течение 3 суток.

Среда с агаром M17 имеет следующий состав (г/л):

триптон: 2,5 г;
 пептический гидролизат мяса: 2,5 г;
 папаиновый гидролизат соевого шрота: 5,0 г;
 дрожжевой экстракт: 2,5 г;
 мясной экстракт: 5,0 г;
 лактоза: 5,0 г;
 глицерофосфат натрия: 19,0 г;
 сульфат магния, 7 H₂O: 0,25 г;
 аскорбиновая кислота: 0,5 г;
 агар: 15,0 г;
 вода качества Milli-Q: 1000 мл.
 pH доводили до конечного pH 7,1±0,2 (25°C).

Пример 1. Влияние глюкозо-дефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* на рост штаммов *Lactobacillus* в ходе ферментации молока.

В общей сложности 4 различных смеси бактериальных штаммов, где каждая состоит из нескольких штаммов *Streptococcus thermophilus* и одного штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, тестировали в процессе получения йогурта из молочного субстрата для того, чтобы определить влияние глюкозо-дефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* на рост штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Две смеси согласно применению по изобретению состояли из смеси глюкозо-дефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* в комбинации либо с глюкозо-дефицитным штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, либо с глюкозо-положительным штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Для сравнения 2 смеси состояли из смеси глюкозо-положительных штаммов *Streptococcus thermophilus* в комбинации либо с глюкозо-дефицитным штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, либо с глюкозо-положительным штаммом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Компоненты и составы 4 смесей видны из табл. 1.

Таблица 1. Состав и рост смесей *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и глюкозо-положительного или глюкозо-дефицитного *Streptococcus thermophilus*

Компоненты смеси в % масс. (г/г)	Смесь 1: Glu(-) St Glu(-) Lb	Смесь 2: Glu(-) St Glu(+) Lb	Смесь 3: Glu(+) St Glu(-) Lb	Смесь 4: Glu(+) St Glu(+) Lb
Glu(-) St	90,91	94,44		
Glu(-) Lb	9,09		9,09	
Glu(+) St			90,91	94,44
Glu(+) Lb		5,56		5,56
Отношение St к Lb	95,18	88,47	95,18	88,47
Подсчет клеток для Lb в конце ферментации (КОЕ/г)	5,69E07	6,75E08	1,20E06	1,57E06

Glu(-): глюкозо-дефицитный

Glu(+): глюкозо-положительный

St: *Streptococcus thermophilus*

Lb: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Уровень суммарной инокуляции культуры составлял 0,018 мас.% (г/мл). Используемый молочный субстрат представлял собой смесь свежего обезжиренного молока (жир 0,1%), свежего полуобезжиренного молока (жир 1,5%), обезжиренного сухого молока от Lactalis и ProMilk 802 от Ingredia (изолят растворимого молочного белка). Конечный молочный субстрат содержал 4,7% белка, и 1,0% жира, и 0,05% сахарозы. Ферментацию молока выполняли в 200 мл контейнерах при температуре 43°C до достижения конечного pH 4,55.

В табл. 1 также указано для каждой из смесей 1-4 отношение суммы количества клеток для *Streptococcus thermophilus* к количеству клеток для *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в начале ферментации, а также количество клеток (КОЕ/г) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в конце ферментации. Результаты, указанные в табл. 1, представляют собой среднее значение определения в повторностях.

Две ферментации с использованием глюкозо-положительных штаммов *Streptococcus thermophilus* имели результатом количества клеток 1,20E06 и 1,57E06 для глюкозо-дефицитного и глюкозо-положительного *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* соответственно. Использование глюкозо-дефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* повышало уровень до 5,69E07 и 6,75E08 для глюкозо-дефицитного *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и глюкозо-положительного *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* соответственно. Таким образом, использование глюкозо-дефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* оказывало значительно усиленное влияние на рост как глюкозо-дефицитного, так и глюкозо-положительного, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Пример 2. Влияние глюкозо-дефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* на рост штаммов *Lactobacillus* в ходе ферментации молока с использованием низких начальных уровней клеток *Lactobacillus*.

Смеси бактериальных штаммов с разными соотношениями смеси глюкозо-дефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* к глюкозо-положительному штамму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* тестировали в процессе получения йогурта из молочного субстрата для того, чтобы определить влияние глюкозо-дефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* на рост штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Состав указанных смесей и указанные разные соотношения видны из табл. 2.

Используемый молочный субстрат представлял собой смесь свежего обезжиренного молока (жир 0,1%), свежего полуобезжиренного молока (жир 1,5%), обезжиренного сухого молока от Lactalis и ProMilk 802 от Ingredia (изолят растворимого молочного белка). Конечный молочный субстрат содержал 4,7% белка, и 1,0% жира, и 0,05% сахарозы. Ферментацию молока выполняли в 200 мл контейнерах при температуре 43°C до достижения конечного pH 4,55.

Таблица 2. Рост *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в присутствия глюкозо-дефицитного *Streptococcus thermophilus* в разных соотношениях

	Состав культуры		Со отношение St к Lb	Подсчет клеток Lb после ферментации	
	Glu(-) St % (г/г)	Glu(+) Lb % (г/г)		Тест А: Количество клеток Lb (КОЕ/г)	Тест В: Количество клеток Lb (КОЕ/г)
1	94,0	6,0	119,32	1,9E08 1,9E08	2,0E08 2,0E08
2	94,5	5,5	130,86	1,9E08 2,0E08	1,9E08 1,9E08
3	95,0	5,0	144,71	1,9E08 1,9E08	1,8E08 1,9E08
4	95,5	4,5	161,64	1,7E08 1,7E08	1,7E08 1,8E08
5	96,0	4,0	182,79	1,5E08 1,6E08	1,7E08 1,6E08
6	96,5	3,5	210,00	1,7E08 1,7E08	1,6E08 1,6E08
7	97,0	3,0	246,26	1,8E08 1,7E08	1,7E08 1,8E08
8	97,5	2,5	297,04	1,4E08 1,4E08	1,7E08 1,7E08
9	98,0	2,0	373,20	2,1E08 1,9E08	1,7E08 1,6E08
10	98,5	1,5	500,14	1,3E08 1,1E08	1,6E08 1,5E08
11	99,0	1,0	754,02	1,0E08 8,9E07	1,5E08 1,5E08
12	99,5	0,5	1515,66	7,0E07 6,7E07	1,3E08 1,2E08

Glu(-): глюкозо-дефицитный

Glu(+): глюкозо-положительный

St: *Streptococcus thermophilus*

Lb: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Выполняли два тестирования А и В для получения двойного независимого определения. В каждом тестировании А и В выполняли определения в повторностях для каждой смеси, и количество клеток (КОЕ/г) определяли в конце ферментации. Результаты видны из табл. 2. Как видно из результатов, количество клеток *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в конце ферментации было на очень высоком уровне, то есть от 6,7E07 до 2,1E08 для всех смесей. Кроме того, снижение уровня *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* по отношению к сумме глюкозо-дефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* в смесях, используемых для инокуляции, имело очень незначительное влияние на количество клеток *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в конце ферментации для большинства смесей. Таким образом, при соотношении *Streptococcus thermophilus* к *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* от 119,32 до 373,20 количество клеток Lb после ферментации было на более высоком уровне от 1,4E08 до 2,1E08. При соотношениях St к Lb от 500,14 до 1515,66 количество клеток Lb после ферментации было на незначительно более низком уровне от 6,7E07 до 1,6E08, что представляет собой неожиданно высокий уровень, принимая во внимание чрезвычайно низкий уровень Lb в смеси для инокуляции. Также указанный уровень количества клеток Lb, полученных после ферментации, составляющий от 6,7E07 до 1,6E08, значительно выше уровня, полученного с глюкозо-положительными штаммами по сравнению со сравнительным примером 3.

Таким образом, данный эксперимент показал, что глюкозо-дефицитные штаммы *Streptococcus thermophilus* повышают рост *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* до высокой степени и независимо от начального уровня *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Сравнительный пример 3. Влияние глюкозо-положительных штаммов *Streptococcus thermophilus* на рост штаммов *Lactobacillus* в процессе ферментации молока с использованием низких количеств клеток *Lactobacillus*.

Для цели сравнения с результатами примера 2 смеси бактериальных штаммов с разными соотношениями смеси глюкозо-положительных штаммов *Streptococcus thermophilus* к глюкозо-положительному штамму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* тестировали в процессе получения йогурта из молочного субстрата для того, чтобы определить влияние глюкозо-дефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* на рост штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Состав указанных смесей и указанные разные соотношения видны из табл. 3.

Ферментации выполняли, используя тот же самый процесс и условия, как определено в примере 2.

Таблица 3. Рост *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в присутствии глюкозо-положительных *Streptococcus thermophilus* при разных соотношениях

Состав культуры				Количество клеток Lb после ферментации	
	Glu(+) St % (г/г)	Glu(+) Lb % (г/г)	Отношение St к Lb	Испытание A: количество клеток Lb (KOE/г)	Испытание B: количество клеток Lb (KOE/г)
1	94,0	6,0	97,85	1,6E07 1,6E07	1,5E07 1,5E07
2	94,5	5,5	107,31	1,0E07 9,5E06	1,2E07 1,1E07
3	95,0	5,0	118,67	9,4E06 9,0E06	1,0E07 1,1E07
4	95,5	4,5	132,55	8,4E06 8,4E06	9,0E06 8,7E06
5	96,0	4,0	149,90	6,9E06 7,2E06	7,5E06 7,4E06
6	96,5	3,5	172,20	7,0E06 7,4E06	7,3E06 7,6E06
7	97,0	3,0	201,94	6,5E06 6,8E06	6,1E06 6,5E06
8	97,5	2,5	243,58	5,8E06 5,8E06	6,4E06 6,4E06
9	98,0	2,0	306,04	4,4E06 4,7E06	5,2E06 4,9E06
10	98,5	1,5	410,13	2,8E06 3,2E06	4,2E06 4,6E06
11	99,0	1,0	618,32	2,4E06 2,8E06	3,1E06 3,3E06
12	99,5	0,5	1242,89	2,1E06 2,3E06	2,8E06 2,7E06

Glu(-): глюкозо-дефицитный

Glu(+): глюкозо-положительный

St: *Streptococcus thermophilus*

Lb: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Два тестирования А и В выполняли для получения двойного независимого определения. В каждом тестировании А и В выполняли определения в повторностях для каждой смеси и количество клеток (КОЕ/г) определяли в конце ферментации. Результаты видны из табл. 3. Как видно из результатов, количество клеток *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в конце ферментации было на среднем уровне от $2,1 \times 10^6$ до $1,6 \times 10^7$. Кроме того, низкие уровни *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* относительно суммы глюкозо-положительных штаммов *Streptococcus thermophilus* в смесях, используемых для инокуляции, явно вызывают значительно более сильное снижение количества клеток *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, полученных в конце ферментации, чем в случае глюкозо-дефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* согласно примеру 2. Таким образом, результаты данных экспериментов подтверждают, что глюкозо-дефицитные штаммы *Streptococcus thermophilus* значительно повышают рост *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* по сравнению с глюкозо-положительными штаммами *Streptococcus thermophilus*.

Пример 4. Влияние глюкозо-дефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* на рост штаммов *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus paracasei* в процессе ферментации молока.

Состав культур для инокуляции

Таблица 4. Состав эталонных смесей культур

	La % (г/г)	Lc % (г/г)	Glu(+) St % (г/г)	Glu(+) Lb % (г/г)
Эталон 1: La высокий+Lb+St Смесь 1	32,0		64,0	4,0
Эталон 2: Lc высокий+Lb+St Смесь 1		32,0	64,0	4,0
Эталон 3: La высокий+Lb+St Смесь 2	31,6		61,3	7,1
Эталон 4: Lc высокий+Lb+St Смесь 2		31,6	61,3	7,1
Эталон 5: La низкий+Lb+St Смесь 1	8,2		86,8	5,0
Эталон 6: Lc низкий +Lb+St Смесь 1		8,2	86,8	5,0
Эталон 7: La low+Lb+St Смесь 2	8,5		82,0	9,5
Эталон 8: Lc низкий +Lb+St Смесь 2		8,5	82,0	9,5

La: *Lactobacillus acidophilus*, LA-5, CHCC2169

Lc: *Lactobacillus paracasei*, LC-01, CHCC2115

Glu(+): Глюкозо-положительный

St: *Streptococcus thermophilus*

Lb: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

St смесь 1 содержит два глюкозо-положительных штамма St

St смесь 2 содержит три глюкозо-положительных штамма St

Таблица 5. Состав смесей культур согласно настоящему изобретению

	La % (г/г)	Lc % (г/г)	Glu(-) St % (г/г)	Glu(-) Lb % (г/г)
1: La высокий +Lb+St Смесь 3	31,7		62,7	5,6
2: Lc высокий +Lb+St Смесь 3		31,7	62,7	5,6
3: La низкий +Lb+St Смесь 3	8,5		84,0	7,5
4: Lc низкий +Lb+St Смесь 3		8,5	84,0	7,5

La: *Lactobacillus acidophilus*, LA-5, CHCC2169

Lc: *Lactobacillus paracasei*, LC-01, CHCC2115

Glu(-): глюкозо-дефицитный

St: *Streptococcus thermophilus*

Lb: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

St смесь 3 содержит три глюкозо-дефицитных штамма St

0,05% сахаразы добавляли во все ферментации с использованием глюкозо-дефицитного St.

Анализ.

1. Кривые подкисления во время ферментации (не показаны).
2. Количество клеток в конце ферментации.
3. Сутки 1: pH и количество клеток. Хранение при 6°C.

4. Сутки 14: pH и количество клеток. Хранение при 6°C.

5. Сутки 28: pH и количество клеток. Хранение при 6°C.

6. Сутки 42: pH и количество клеток. Хранение при 6°C.

Кривые подкисления измеряли посредством Cinac system (от Alliance Instruments, AMS Company Brand).

Все ферментации выполняли в двух повторностях.

Ферментации выполняли в 9,5% В-молоке (молочный субстрат).

Подсчеты клеток выполняли посредством посева на чашки Петри, используя стандартизированную агаровую среду, адаптированную для выращивания штамма *Lactobacillus acidophilus* и штамма *Lactobacillus paracasei*. Использовали способ, описанный выше под заголовком "Вещества и способы", для штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Результаты после подкисления

Таблица 6. pH для эталонных смесей культур

рН	Сутки 1	Сутки 14	Сутки 28
Эталон 1: La высокий +Lb+St Смесь 1	4,50	4,35	4,35
Эталон 2: Lc высокий +Lb+St Смесь 1	4,49	4,35	4,35
Эталон 3: La высокий +Lb+St Смесь 2	4,49	4,34	4,33
Эталон 4: Lc высокий +Lb+St Смесь 2	4,50	4,34	4,34
Эталон 5: La низкий +lb+St Смесь 1	4,48	4,35	4,35
Эталон 6: Lc низкий +lb+St Смесь 1	4,49	4,35	4,36
Эталон 7: La низкий +Lb+St Смесь 2	4,49	4,36	4,33
Эталон 8: Lc низкий +Lb+St Смесь 2	4,48	4,35	4,33

Таблица 7. pH смесей культур согласно настоящему изобретению

рН	Сутки 1	Сутки 14	Сутки 28
1: La высокий +Lb+St Смесь 3	4,51	4,35	4,37
2: Lc высокий +Lb+St Смесь 3	4,49	4,35	4,35
3: La низкий +Lb+St Смесь 3	4,48	4,35	4,35
4: Lc низкий +Lb+St Смесь 3	4,49	4,35	4,36

Результаты подсчета клеток

Таблица 8. Подсчеты клеток для эталонных смесей культур

КОЕ/г	Сутки 1		Сутки 14		Сутки 42	
Количество La для эталона 1: La высокий +Lb+St Смесь 1	5,8E06	4,9E06	7,6E06	6,6E06	1,7E06	2,8E06
Количество Lc для эталона 2: Lc высокий +Lb+St Смесь 1	1,2E06	2,8E06	8,4E05	7,7E05	7,0E05	1,7E06
Количество La для эталона 3: La высокий +Lb+St Смесь 2	6,4E06	5,2E06	8,2E06	6,4E06	3,4E06	1,05E06
Количество Lc для эталона 4: Lc высокий +Lb+St Смесь 2	3,0E06	1,6E06	2,1E06	2,1E06	2,1E06	1,8E06
Количество La для эталона 5: La низкий +Lb+St Смесь 1	2,5E06	2,1E06	2,57E06	2,6E06	1,5E06	1,5E06
Количество Lc для эталона 6: Lc низкий +Lb+St Смесь 1	1,0E06	8,0E05	6,7E05	2,8E05	5,0E05	2,5E05
Количество La для эталона 7: La низкий +Lb+St Смесь 2	9,2E05	2,7E06	1,05E06	1,6E06	3,5E05	2,1E05
Количество Lc для эталона 8: Lc низкий +Lb+St Смесь 2	1,4E06	1,3E05	5,4E05	4,0E04	НД	1,8E04

НД: нет данных

Таблица 9. Подсчеты клеток для смесей культур согласно настоящему изобретению

КОЕ/г	Сутки 3		Сутки 14	
Количество La для 1: La высокий+Lb+St Смесь 3	1,6E07	3,2E07	6,6E06	1,7E07
Количество Lc для 2: Lc высокий+Lb+St Смесь 3	2,3E07	6,3E07	3,8E07	3,4E07
Количество La для 3: La низкий +Lb+St Смесь 3	8,0E06	8,3E06	6,5E05	НД
Количество Lc для 4: Lc низкий +Lb+St Смесь 3	1,2E07	1,5E07	9,5E06	1,0E07

НД: нет данных

Обсуждение результатов.

Смесь культур 1 по изобретению сравнима с эталонами 1 и 3.

Смесь культур 2 по изобретению сравнима с эталонами 2 и 4.

Смесь культур 3 по изобретению сравнима с эталонами 5 и 7.

Смесь культур 4 по изобретению сравнима с эталонами 6 и 8.

Как видно из табл. 8 и 9, смесь глюкозо-дефицитных *Streptococcus thermophilus* (St смесь 3 из табл. 8 и 9) повышала количество клеток (см. сутки 3) как штамма *Lactobacillus acidophilus*, так и штамма *Lactobacillus paracasei* (см. сутки 1). Количество клеток повышалось как для низкого, так и для высокого уровня штамма *Lactobacillus acidophilus* или штамма *Lactobacillus paracasei*, в смеси культур, инокулированных в молочный субстрат. Повышение количества клеток имело порядок величины от примерно половины до примерно полутора логарифмических порядков.

Депонирование и разрешения для экспертов

Заявитель требует, чтобы образец депонированных микроорганизмов, заявленных ниже, мог быть предоставлен только эксперту, вплоть до истечения срока, на который выдан патент.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC19216 был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 8 декабря 2015 под учетным номером DSM 32227.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC16731 был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 4 июня 2014 под учетным номером DSM 28889.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 3 апреля 2012 под учетным номером DSM 25850

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15887 был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 3 апреля 2012 под учетным номером DSM 25851

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 12 декабря 2012 под учетным номером DSM 26722.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC14994 был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124

Braunschweig, Germany, 3 апреля 2012 под учетным номером DSM 25838.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 8 сентября 2009 под учетным номером DSM 22934.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759 был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 6 сентября 2012 под учетным номером DSM 26419.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC10019 был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 3 апреля 2007 под учетным номером DSM 19252.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 6 сентября 2012 под учетным номером DSM 26420.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 6 сентября 2012 под учетным номером DSM 26421.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC4351 был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 19 мая 2009 под учетным номером DSM 22586.

Штамм *Lactobacillus acidophilus* La-5, CHCC2169, был депонирован в виде DSM13241 от 2003-09-30 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig.

Штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC2115, LC-01 депонировали в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 27 июня 2007 под учетным номером DSM 19465.

Депонирования были сделаны в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Ссылки.

WO 2011/026863

Pool et al. (2006) Metabolic Engineering 8(5); 456-464.

Cochu et al. (2003). Appl. and Environ Microbiol., 69(9), 5423-5432.

Høier et al. (2010) in The Technology of Cheesemaking, 2nd Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения ферментированного молочного продукта, включающий инокулирование и ферментирование молочного субстрата композицией, содержащей штамм *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы и штамм *Lactobacillus*, где штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Lactobacillus paracasei*, и где соотношение КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus* к КОЕ/г штамма *Lactobacillus* составляет по меньшей мере 80.

2. Способ по п.1, где штамм *Streptococcus thermophilus* является ферментирующим галактозу и несет мутацию в ДНК-последовательности гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где мутация инактивирует белок глюкокиназу или оказывает негативное действие на экспрессию указанного гена.

3. Способ по п.1 или 2, где штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию в гене, кодирующем белок, вовлеченный в транспорт глюкозы, которая приводит к накоплению глюкозы в окружающей среде клетки.

4. Способ по п.3, где штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию в гене, кодирующем компонент переносчика глюкозы, где мутация инактивирует переносчик глюкозы или оказывает негативное действие на экспрессию указанного гена.

5. Способ по п.4, где штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию в ДНК-последовательности гена *manM*, кодирующего белок ИС^{Man} системы глюкозо/маннозо-фосфотрансферазы, где мутация инак-

тивирует белок ПС^{Man} или оказывает негативное действие на экспрессию гена.

6. Способ по любому из пп.1-5, где штамм *Streptococcus thermophilus* повышает количество глюкозы в 9,5% В-молоке по меньшей мере до 5 мг/мл при инокуляции в 9,5% В-молоко в концентрации 1,0E06-1,0E07 КОЕ (колониеобразующих единиц)/мл и выращивании при 40°C в течение 20 ч, где 9,5% В-молоко представляет собой обработанное нагреванием молоко, изготовленное с использованием сухого обезжиренного молока с низкой жирностью, восстановленного до сухой массы 9,5%, и пастеризованное при 99°C в течение 30 мин с последующим охлаждением до 40°C.

7. Способ по любому из пп.1-6, где штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) под учетным номером DSM 25850, штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC15887, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 25851, штамма *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 26722, *Streptococcus thermophilus* CHCC16731, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 28889, *Streptococcus thermophilus* CHCC19216, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 32227, и мутантного штамма, полученного из них, где мутантный штамм получен путем использования одного из указанных депонированных штаммов в качестве исходного материала и где у мутанта сохранено или дополнительно улучшено свойство ферментирования лактозы и/или свойство секретирования глюкозы указанного депонированного штамма.

8. Способ по п.1, где штамм *Lactobacillus* представляет собой штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

9. Способ по любому из пп.1-8, где штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 26420, штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160, который был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen под учетным номером DSM 26421, и мутантного штамма, полученного из них, где мутантный штамм получен путем использования одного из указанных депонированных штаммов в качестве исходного материала и где у мутанта сохранено или дополнительно улучшено свойство ферментирования лактозы и/или свойство секретирования глюкозы указанного депонированного штамма.

10. Способ по любому из пп.1-9, где штамм *Streptococcus thermophilus* повышает количество штамма *Lactobacillus* по меньшей мере до 5,0E06 КОЕ/г в ферментированном молочном продукте в конце ферментации при инокуляции в молочный субстрат в концентрации 1,0E07-1,0E08 КОЕ/г в молочном субстрате и выращивании при 43°C вплоть до достижения pH 4,55, где молочный субстрат представляет собой смесь свежего обезжиренного молока с содержанием жира 0,1%, свежего полуобезжиренного молока с содержанием жира 1,5% и сухого обезжиренного молока и где молочный субстрат содержит 4,7% белка, и 1,0% жира, и 0,05% сахарозы.

11. Способ по любому из пп.1-10, где в ферментированном молочном продукте получают повышенный уровень клеток штамма *Lactobacillus*.

12. Композиция для получения ферментированного молочного продукта, содержащая штамм *Streptococcus thermophilus* с недостаточностью метаболизма глюкозы и штамм *Lactobacillus*, где соотношение КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus* к КОЕ/г штамма *Lactobacillus* составляет по меньшей мере 80 и где штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Lactobacillus paracasei*.

13. Композиция по п.12, содержащая от 1,0E04 до 1,0E12 КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus*.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
