

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202193114** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки  
2022.03.18(51) Int. Cl. *A23C 9/123* (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2020.05.26(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННОГО МОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ ПРОБИОТИКОВ**

(31) 19177015.5

(72) Изобретатель:

(32) 2019.05.28

**Курик-Бавден Мирьяна, Николсон  
Мэтт (US)**

(33) EP

(86) PCT/EP2020/064567

(74) Представитель:

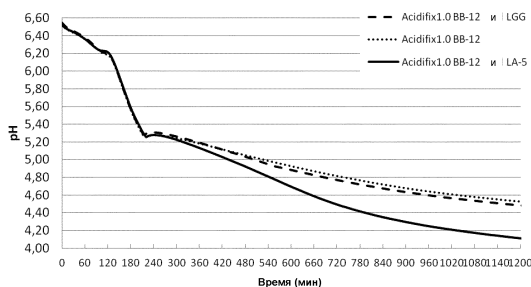
(87) WO 2020/239761 2020.12.03

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

(71) Заявитель:

**КХР. ХАНСЕН А/С (DK)**

(57) Изобретение относится к композициям и способам получения ферментированных молочных продуктов с повышенным количеством пробиотических бактерий. В частности, данное изобретение относится к способу получения ферментированного молока, который включает добавление в молочную основу (1) заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод; (2) одного или более чем одного нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, в количестве, отмеренном таким образом, что он истощается при pH ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, и (3) пробиотического штамма, выбранного из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*. Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям и к ферментированным молочным пищевым или кормовым продуктам, полученным способом по данному изобретению.

**A1****202193114****202193114****A1**

## СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННОГО МОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ ПРОБИОТИКОВ

### ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к композициям и способам получения ферментированных молочных продуктов с повышенным количеством пробиотических бактерий.

### ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Пробиотические штаммы, такие как *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* и *Bifidobacterium infantis* широко используются в ферментированных молочных продуктах.

Данные пробиотические штаммы, при инокуляции в молоко в качестве единичных штаммов, растут очень медленно. Кроме того, некоторые штаммы не способны подкислять до pH меньше 6,0 за 24 ч, см., напр., Фиг. 1, на которой показано то, что BB-12<sup>®</sup> и LGG<sup>®</sup> (BB-12<sup>®</sup> и LGG<sup>®</sup> представляют собой зарегистрированные товарные знаки Chr. Hansen A/S), соответственно, не растут/подкисляют должным образом при их инокуляции без йогуртовой культуры. В комбинации с йогуртовой культурой пробиотический(кие) штамм(ы) может(гут) расти немного лучше, чем одиночный штамм, но редко вырастает больше, чем на 1 log. Из-за желательных для потребителей вкуса и аромата типичная ферментация йогурта прекращается при pH 4,60-4,55. Кроме того, по причинам безопасности важно достигать низкого pH, например, pH меньше приблизительно 5,5, например, pH 4,60-4,55. В данной точке (pH 4,60-4,55) йогуртовые виды - *Streptococcus thermophilus* (ST) и *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* (LB) доминируют над пробиотическим(и) штаммом(ами). В общем, конечный пробиотический йогурт содержит примерно от 5 E+08 до 1 E+09 КОЕ(колониеобразующая единица)/мл ST и LB, и от 2-3 E+07 до 1 E+08 КОЕ/мл пробиотического штамма.

Кроме того, на протяжении срока хранения (т.е. хранения на протяжении 50-60 суток, что является типичным сроком хранения свежих ферментированных продуктов в Северной Америке и некоторых других регионах мира) в типичном пробиотическом йогурте уменьшается число клеток пробиотиков. Например, на протяжении срока

хранения число клеток *Bifidobacterium* - BB-12® обычно уменьшается от 0,5-1 log за 50-60 суток, в зависимости от йогуртовой культуры, молочной основы, культивирования и условий хранения. Число клеток LA-5® (**LA-5® представляет собой зарегистрированный товарный знак Chr. Hansen A/S**) типично уменьшается от 1-2 log на протяжении 50-60 суток срока хранения.

На определенных рынках или в определенных типах продуктов предъявляются требования к более высокому содержанию пробиотиков, чем это возможно при использовании смесей традиционной йогуртовой культуры и пробиотического(ких) штамма(мов) (2-3 E+07 – 1 E+08 КОЕ (колониеобразующие единицы)/мл), в частности, где количество клеток поддерживается на протяжении срока хранения продуктов. Примерами данных продуктов являются следующие:

1) ферментированные пробиотические порционные напитки, в которых должен присутствовать документально подтвержденный уровень пробиотиков (1E+09 КОЕ/порцию) в 65 мл продукта после 60 суток хранения;

2) пробиотический йогурт, в котором документально подтвержденный уровень пробиотиков (1E+09 КОЕ/порцию) присутствует в течение больше, чем 50-60 суток;

3) пробиотический йогурт с очень большим числом клеток (10-20E+09 КОЕ/порцию); и

4) лиофилизированные йогуртовые «жемчужины» (пеллеты) и капли (облатки). Пробиотический йогурт, который предназначен для данного применения, должен содержать очень большое число клеток пробиотического штамма (5E+08 КОЕ/г) для обеспечения эффективной дозы (1E+09 КОЕ/порцию в конце срока хранения) после переработки, замораживания и лиофилизации.

Специально разработанная культура и комбинация штаммов может поддерживать рост, например, *Bifidobacterium* - BB-12® вплоть до 1-2E+08 КОЕ/мл (см., например, WO 2008/148561). Более высокого количества некоторых пробиотических штаммов также можно достичь посредством повышенных скоростей инокуляции (в 5-10 раз больших – 0,05%-0,1%), но этот путь является дорогим и почти никогда не используется.

В WO 2017/125600 показано, что совместное культивирование лактоза(-)сахароза(+) *S. thermophilus* (ST) в комбинации с *L. paracasei* CRL 431 при конкретных условиях приводило к большему числу клеток *L. paracasei* CRL 431 по

сравнению с совместным культивированием лактоза (+) *S. thermophilus* (ST) в комбинации с *L. paracasei* CRL 431.

Имеется потребность в других композициях и способах получения ферментированных молочных продуктов с большим числом жизнеспособных пробиотических клеток, таких как *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* - BB-12<sup>®</sup>, *Lactobacillus acidophilus* - LA-5<sup>®</sup> или *Lactobacillus rhamnosus* - LGG<sup>®</sup>, в частности, где количество жизнеспособных клеток увеличивается в течение срока хранения ферментированного молочного продукта, который типично составляет 60 суток, предпочтительно при 4°C.

### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано на неожиданных экспериментальных данных о том, что при применении:

а) заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*; и

б) одного или более чем одного нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где нелактозный(е) углевод(ы) присутствует(ют) в данной композиции в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощаются при pH ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например, от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3 (например, примерно 0,41% сахарозы, где % представляет собой массу на объем общего количества молочной основы (% масс./об.)), и когда молочная основа содержит примерно 2 % по массе (масс.) жира и примерно 4,1% (масс.) белка, заквасочную культуру в (а) предпочтительно добавляют в виде замороженной концентрированной культуры в количестве примерно 0,01% массы на объем от общего количества молочной основы (% масс./об.), и температура ферментации составляет примерно 38°C) при ферментации молочной основы в присутствии пробиотического штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, количество пробиотических бактерий, присутствующее в данном ферментированном

молочном продукте, увеличивается по сравнению с количеством пробиотических бактерий в ферментированном молочном продукте, ферментированном:

- только пробиотическими бактериями (как утверждается выше, пробиотические штаммы, при инокуляции в молоко в виде одиночных штаммов, растут очень медленно, см. также Фиг. 1) или

- заквасочной культурой, содержащей по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*, который не является лактозодефицитным, и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus*, который не является лактозодефицитным, например, штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* (традиционная лактоза (+) йогуртовая культура), или

- заквасочной культурой, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, такой как лактозодефицитный *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, в присутствии сахарозы в количестве, отмеренном таким образом, что она истощается при pH ферментированного молока меньше, чем 4,9, например, примерно 4,55 (например, 0,9% сахарозы, где % представляет собой процент по массе на объем (% масс./об.) на основе молочной основы, когда молочная основа содержит примерно 2 % (масс.) жира и примерно 4,1% (масс.) белка, заквасочную культуру предпочтительно добавляют в виде замороженной концентрированной культуры в количестве 0,01% (масс./об.) от общего количества молочной основы, и температура ферментации составляет 38°C).

Кроме того, имеется улучшенное или повышенное выживание пробиотических клеток с течением времени, например, на протяжении срока хранения по меньшей мере 60 суток (хранение) при примерно 4°C. Увеличение количества жизнеспособных пробиотических бактерий, присутствующих в ферментированном молочном продукте, поддерживается с течением времени, например, сразу после завершения ферментации, предпочтительно на протяжении более чем 1 суток после завершения ферментации, например, более чем 15 суток или более чем 45 суток, даже на протяжении более чем 60 суток после завершения ферментации. Соответственно, общее число клеток жизнеспособных пробиотических штаммов в присутствии заквасочной культуры по изобретению, как определено в (а) выше, увеличивается по сравнению с общим числом клеток жизнеспособных пробиотических штаммов в отсутствие заквасочной культуры

по изобретению, как определено в (а) выше, и данное увеличение поддерживается с течением времени, например, после 60 суток хранения (срок хранения), предпочтительно при примерно 4°C.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложен способ получения ферментированного молочного продукта, включающий следующие стадии:

1) добавления в молочную основу:

а) заквасочной культуры молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*;

б) одного или более чем одного нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(ые) нелактозный(ые) углевод(ы) добавляют в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; и

с) пробиотического штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*;

2) и ферментирование данной молочной основы в течение некоторого периода времени до достижения целевого рН (предпочтительно от примерно 4,8 до примерно 4,0, более предпочтительно от примерно 4,6 до примерно 4,3, даже более предпочтительно примерно 4,55), с получением ферментированного молочного продукта.

Кроме того, согласно настоящему изобретению, предложен ферментированный молочный продукт, полученный способом по изобретению, и пищевой или кормовой продукт, содержащий по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, и пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, предпочтительно, где пробиотический штамм *Lactobacillus* не является штаммом *Lactobacillus paracasei*, даже более предпочтительно, где пробиотический штамм

*Lactobacillus* не является штаммом *L. paracasei* CRL 431, депонированным как ATCC 55544, или штаммом CHCC 2115 *L. paracasei*, депонированным как DSM 19465, где данный пищевой или кормовой продукт содержит более чем  $1,3E+08$  КОЕ пробиотических бактерий/г ферментированного молочного продукта (КОЕ/г), предпочтительно более чем  $2E+08$  КОЕ/г, даже более предпочтительно более чем  $5E+08$  КОЕ/г пробиотического штамма после ферментации, предпочтительно после по меньшей мере 1 суток хранения при примерно  $4^{\circ}\text{C}$ .

Кроме того, согласно настоящему изобретению, предложены композиции для получения ферментированного молочного продукта, содержащие:

а) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, такой как лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*; и

б) один или более чем один нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где нелактозный(ые) углевод(ы) присутствует(ют) в композиции количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3.

Кроме того, согласно настоящему изобретению, предложено применение композиции по настоящему изобретению для увеличения количества жизнеспособных пробиотических клеток в ферментированном молочном продукте или для улучшения выживания пробиотических клеток с течением времени, предпочтительно в течение 60 суток, предпочтительно при  $4^{\circ}\text{C}$  по сравнению с ферментированным молочным продуктом, ферментированным с использованием композиции, содержащей

а) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*, который не является лактозодефицитным, и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus*, который не является лактозодефицитным, предпочтительно штамм *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который не является лактозодефицитным; и/или

б) 1) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный

штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, и

2) один или более чем один нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (1), где данный(ые) нелактозный(ые) углевод(ы) присутствует(ют) в композиции в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Профиль закисления *Bifidobacterium* - BB-12<sup>®</sup> (штамм *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* - BB-12<sup>®</sup> - депонированный как DSM 15954) (BB-12<sup>®</sup>, А, сплошная линия) и *L. rhamnosus* - LGG<sup>®</sup> (штамм *Lactobacillus rhamnosus* - LGG<sup>®</sup> - депонированный как ATCC 53103) (LGG<sup>®</sup>, А, пунктирная линия), инокулированных в молочную основу при 0,01% и инкубированных при 38°C.

Фиг. 2. Профиль закисления комбинации Acidifix<sup>®</sup> 1.0 (**Acidifix<sup>®</sup> представляет собой зарегистрированный товарный знак Chr. Hansen A/S**) и бифидобактерии - BB-12<sup>®</sup> (штамм *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* - BB-12<sup>®</sup> - депонированный как DSM 15954) (“Acidifix<sup>®</sup> 1.0, BB-12<sup>®</sup>”, пунктирная линия), Acidifix<sup>®</sup> 1.0, BB-12<sup>®</sup> и LA-5<sup>®</sup> (штамм *Lactobacillus acidophilus* - LA-5<sup>®</sup> - депонированный как DSM 13241) (“Acidifix<sup>®</sup> 1.0, BB-12<sup>®</sup> и LA-5<sup>®</sup>”, сплошная линия) или Acidifix<sup>®</sup> 1.0, BB-12<sup>®</sup> и *L. rhamnosus* - LGG<sup>®</sup> (штамм *Lactobacillus rhamnosus* - LGG<sup>®</sup> - депонированный как ATCC 53103) (“Acidifix<sup>®</sup> 1.0, BB-12<sup>®</sup> и LGG<sup>®</sup>”, пунктирная линия), инокулированных в молочную основу и инкубированных при 38°C.

Фиг. 3 Профили закисления Acidifix<sup>®</sup> 1.0 плюс 0,01% BB-12<sup>®</sup> в молоке с 0,41 % (B) и 0,90 % сахарозы (D). YoFlex<sup>®</sup> Mild<sup>®</sup> 1.0 плюс 0,01% BB-12<sup>®</sup> (E) использовали в качестве контроля (**YoFlex<sup>®</sup> Mild<sup>®</sup> представляет собой зарегистрированный товарный знак Chr. Hansen A/S**). % Сахарозы выражен в масс./об. на основе молочной основы.

### ПОДРОБНОЕ РАСКРЫТИЕ ДАННОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

#### Способ получения ферментированного молочного продукта

Настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему следующие стадии:



1) добавление в молочную основу:

a) заквасочной культуры молочнокислых бактерий (LAB), содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*;

b) одного или более чем одного нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (a), где нелактозный(ые) углевод(ы) добавляются в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются) при pH ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; и

c) пробиотического штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*;

2) ферментирование данной молочной основы в течение некоторого периода времени до достижения целевого или желательного pH, с получением ферментированного молочного продукта.

В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений выражение **«ферментированный молочный продукт»** означает пищевой или кормовой продукт, где получение данного пищевого или кормового продукта включает ферментацию молочной основы молочнокислой бактерией. Термин «ферментированный молочный продукт» в том виде, в котором он здесь используется, включает такие продукты, как термофильно ферментированные молочные продукты, например, йогурт, питьевой йогурт, йогурт с нарушенным сгустком, йогурт термостатного способа производства или йогуртоподобный напиток, но не ограничивается ими. Например, йогурт может быть отфильтрован для удаления большей части сыворотки, приводя к более густой консистенции, чем неотфильтрованный йогурт («фильтрованный» йогурт или йогурт с «высоким сухим остатком»).

В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений термин **«молоко»** следует понимать в контексте настоящего изобретения как секрет молочных желез, полученный дойкой любого животного, такого как коровы, овцы, козы, буйволы или верблюды. В предпочтительном воплощении молоко представляет собой коровье молоко. Согласно настоящему изобретению молоко возможно было переработано, и

термин «молоко» включает цельное молоко, сепарированное молоко, обезжиренное молоко, молоко пониженной жирности, молоко с полным содержанием жира, молоко с пониженным содержанием лактозы (например, ультрафильтрованное (UF) молоко, при условии, что лактоза не расщепляется ферментом лактазой на глюкозу и галактозу) или сгущенное молоко. Обезжиренное молоко представляет собой нежирный или сепарированный молочный продукт. Молоко пониженной жирности типично определяется как молоко, которое содержит от примерно 1% до примерно 2% жира. Молоко с полным содержанием жира часто содержит 2% жира или больше. Подразумевается то, что термин «молоко» охватывает молоко из разных источников. Млекопитающие-источники молока включают корову, овцу, козу, буйвола, верблюда, ламу, кобылу и оленя, но не ограничиваются ими.

Термин «**молочная основа**» может относиться к любому молочному веществу, которое может быть подвергнуто ферментации согласно настоящему изобретению. Таким образом, полезные молочные основы включают фракции и растворы/суспензии любого молока или молокоподобных продуктов, содержащие белок, такие как цельное молоко или молоко с низким содержанием жира, сепарированное молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, сыворотка, пермеат сыворотки, лактоза, маточная жидкость от кристаллизации лактозы, концентрат белка сыворотки или сливки, но не ограничиваются ими. Очевидно молочная основа может происходить от любого млекопитающего, например, представляя собой по существу чистое молоко млекопитающего или восстановленное сухое молоко.

В предпочтительном воплощении изобретения молочная основа, в которую добавляют заквасочную культуру (1a), нелактозный углевод (1b) и пробиотический(е) штамм(ы) (1c) на стадии (1) способа по настоящему изобретению, имеет содержание лактозы от 30,0 мг/мл до 70 мг/мл, предпочтительно от 35 мг/мл до 65 мг/мл, более предпочтительно от 40 мг/мл до 60 мг/мл и наиболее предпочтительно от 50 мг/мл до 60 мг/мл. Уровень лактозы не является существенным. Лактоза может быть добавлена в молочную основу, но только часть будет ферментирована пробиотиками.

Предпочтительно молочная основа содержит по меньшей мере примерно 2,5% по массе белка, предпочтительно от примерно 2,9 до примерно 4,5% по массе белка, даже более предпочтительно от примерно 4 до примерно 4,5% по массе белка, например, примерно 4,1% по массе белка. Данные количества белка в молочной основе приводят к хорошему йогурту с нарушенным сгустком или питьевому йогурту.

Предпочтительно данная молочная основа содержит от примерно 0 до примерно 3,8% по массе жира, например, от примерно 0,5 до примерно 3,25% по массе жира. Более предпочтительно данная молочная основа содержит примерно 2% по массе жира. В предпочтительном воплощении данная молочная основа содержит примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка.

Перед ферментацией молочная основа может быть гомогенизирована и пастеризована согласно способам, известным в данной области.

Термин «**гомогенизация**» в том виде, в котором он используется в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений, означает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. При проведении гомогенизации до ферментации она может проводиться таким образом, чтобы разбивать молочный жир до меньших размеров таким образом, что он больше не отделяется от молока. Это может осуществляться посредством пропускания молока через маленькие отверстия при высоком давлении.

Термин «**пастеризация**» в том виде, в котором он используется в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений, означает обработку молочной основы для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно пастеризация достигается поддержанием точно установленной температуры в течение точно установленного периода времени. Данная точно установленная температура обычно достигается нагреванием. Температура и продолжительность времени могут быть выбраны для того, чтобы умерщвлять или инактивировать определенные бактерии, такие как вредные бактерии. Далее может следовать стадия быстрого охлаждения. Например, молочную основу можно обрабатывать нагреванием при 92°C в течение 3 мин, охлаждать до 38°C и затем инокулировать, как описано на стадии (1) способа по настоящему изобретению.

**Стадия 1** способа по настоящему изобретению включает добавление в молочную основу:

а) заквасочной культуры молочнокислых бактерий (LAB), содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, такой как лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*.

Предпочтительно данная заквасочная культура содержит два лактозодефицитных штамма *Streptococcus thermophilus*, которые способны метаболизировать нелактозный углевод, и один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*.

Добавление штаммов в молочную основу также может называться в контексте настоящего изобретения «инокуляцией».

В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений выражение «**молочнокислые бактерии**» («LAB») означает бактерии пищевого уровня качества, продуцирующие молочную кислоту в качестве главного метаболического конечного продукта ферментации углеводов. Данные бактерии являются родственными по их общим метаболическим и физиологическим характеристикам, и обычно являются грамположительными, с низким содержанием GC, кислототолерантными, необразующими споры, недышащими палочковидными бациллами или кокками. Во время стадии ферментации потребление углевода данными бактериями вызывает образование молочной кислоты, снижая pH и приводя к образованию белкового сгустка. Данные бактерии, таким образом, являются ответственными за скисание молока и за консистенцию молочного продукта. Самые полезные с промышленной точки зрения молочнокислые бактерии находятся в пределах порядка «Lactobacillales», который включает виды *Lactococcus*, виды *Streptococcus*, виды *Lactobacillus*, виды *Leuconostoc*, виды *Pediococcus* и виды *Propionibacterium*. Они часто используются в качестве пищевых культур одни или в комбинации с другими молочнокислыми бактериями.

Молочнокислые бактерии, включая бактерии видов *Lactobacillus* и *Streptococcus*, обычно поставляются молочной промышленности в виде либо замороженных (F-DVS), либо лиофилизированных (FD-DVS) культур для размножения основного объема закваски, или в виде так называемых культур «для прямого внесения» (DVS), предназначенных для прямой инокуляции в ферментационный сосуд или резервуар для производства молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт. Такие культуры молочнокислых бактерий обычно называются «**заквасочные культуры**» или «**закваски**». Типично заквасочная культура для йогурта содержит *Streptococcus thermophilus* (также именуемый здесь “ST” или “St”) и *Lactobacillus*

*delbrueckii* подв. *bulgaricus* (также именуемый здесь “LB” или “Lb”), и в большинстве стран йогурт определяется законом как ферментированный молочный продукт, произведенный с использованием заквасочной культуры, содержащей два указанных штамма.

**Заквасочная культура** молочнокислых бактерий (LAB) согласно настоящему изобретению в любом из его воплощений содержит или, в качестве альтернативы, состоит из по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно лактозодефицитного штамма *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*. Заквасочные культуры отвечают за закисление молочной основы. Заквасочные культуры могут быть свежими, замороженными или лиофилизированными.

Для производства ферментированного молочного продукта заквасочную культуру можно добавлять в любом количестве. Типично заквасочную культуру добавляют в количестве для достижения концентрации от 0,001 до 3%, например, 0,05%, 0,01%, 0,015%, 0,02%, 1%, 2%, 3%, предпочтительно от 0,001 до 0,025%, где % представляет собой массу на объем общего количества молочной основы (% масс./об.), например от 0,0015 до 0,15% масс./об., например от 0,01 до 0,015% масс./об. или от 0,01 до 0,02% масс./об., или от 0,01 до 0,025% масс./об. общего количества молочной основы. Предпочтительно данную заквасочную культуру добавляют в виде замороженной концентрированной культуры в количестве от 0,01% масс./об. до 0,04% масс./об. общего количества молочной основы, например от 0,01% масс./об. до 0,02% масс./об. Замороженные концентрированные культуры типично содержат от  $6E+10$  до  $1,5E+11$  КОЕ/г. В качестве альтернативы, данную заквасочную культуру добавляют в виде лиофилизированной культуры в количестве от 0,001% до 0,0025% масс./об. общего количества молочной основы. Более предпочтительно данную заквасочную культуру добавляют в виде замороженной концентрированной культуры в количестве для достижения концентрации примерно 0,01% масса на объем (% масс./об.) общего количества молока, предпочтительно где молоко имеет содержание жира примерно 2% по массе и содержание белка примерно 4,1% по массе.

В предпочтительном воплощении заквасочную культуру добавляют в молочную основу в количестве от примерно  $1E+06$  до примерно  $1E+08$  КОЕ/мл молочной основы

(общее количество бактерий, т.е. по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод), предпочтительно в количестве от примерно  $5E+06$  до примерно  $1E+07$  КОЕ/мл молочной основы, например от примерно  $6E+06$  КОЕ/мл до примерно  $1,5E+07$  КОЕ/мл, даже более предпочтительно в количестве от примерно 1,2 до примерно  $1,3E+07$  КОЕ/мл, предпочтительно когда молочная основа имеет содержание жира примерно 2% по массе и примерно 4,1% по массе белка.

Как раскрыто в WO 2005/003327, полезно добавлять в заквасочную культуру определенные криопротекторы. Таким образом, заквасочная культура стадии (1a) способа по настоящему изобретению может содержать один или более чем один криопротектор, выбранный 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, оротидина, тимидина, инозина и производного любых таких соединений.

Термины **«недостаточность в метаболизме лактозы»** и **«лактозодефицитный»** используются в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений для характеристики LAB, которые либо частично, либо полностью теряют способность использовать лактозу в качестве источника для роста клеток или поддержания жизнеспособности клеток. Соответствующие LAB способны метаболизировать один или несколько углеводов, выбранных из сахарозы, галактозы и/или глюкозы, или любого другого ферментируемого углевода. Поскольку данные углеводы не присутствуют в природе в молоке в достаточных количествах для поддержки ферментации лактозодефицитными мутантами, необходимо добавлять данные углеводы в молоко. Лактозодефицитные и частично лактозодефицитные LAB могут отличаться белыми колониями на среде, содержащей лактозу и X-Gal. Лактозодефицитные LAB и способы их получения были в общем описаны, проиллюстрированы примерами и депонированы в предыдущих опубликованных патентных заявках, включая WO 2013/160413, PCT/EP2015/063767 и PCT/EP2015/063742, в которых описаны способы получения LAB с недостаточностью метаболизма лактозы и конкретные штаммы, полученные данными способами.

Термин «**способный метаболизировать один или несколько углеводов, отличных от лактозы, присутствующей в молоке**» используется в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений для описания метаболической активности лактозодефицитной LAB, которая вызывает продукцию молочной кислоты в качестве главного метаболического конечного продукта ферментации углеводов с использованием углевода, отличного от лактозы.

В конкретном воплощении данного изобретения лактозодефицитный(е) штамм(ы) способен(ны) метаболизировать один или более чем один нелактозный углевод, выбранный из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы, предпочтительно сахарозы. В конкретном воплощении данного изобретения лактозодефицитный(е) штамм(ы) способен(ны) метаболизировать галактозу.

В предпочтительном воплощении по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который содержится в заквасочной культуре, которую добавляют в молочную основу на стадии а настоящего изобретения, способны метаболизировать **тот же самый нелактозный углевод**, который предпочтительно представляет собой сахарозу. В других воплощениях по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, которые содержатся в заквасочной культуре, которую добавляют в молочную основу на стадии а настоящего изобретения, способны метаболизировать разные нелактозные углеводы, предпочтительно где данные нелактозные углеводы не представляют собой глюкозу. Например, по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* способен метаболизировать сахарозу, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus* способен метаболизировать галактозу или наоборот.

Предпочтительно лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из следующих:

(a) (1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под номером доступа DSM 28952;

(2) штамм, происходящий от DSM 28952, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(b) (1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под номером доступа DSM 28953;

(2) штамм, происходящий от DSM 28953, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(c) (1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 22.08.2017 г. под номером доступа DSM 32599;

(2) штамм, происходящий от DSM 32599, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal; и

(d) (1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 22.08.2017 г. под номером доступа DSM 32600; и

(2) штамм, происходящий от DSM 32600, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

Предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, присутствующий в заквасочной культуре, представляет собой лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*. Более предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *Bulgaricus* выбран из группы, состоящей из следующих:

(1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под номером доступа DSM 28910; и



(2) штамм, происходящий от DSM 28910, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений фраза «штамм, происходящий от» или «штамм, который может происходить от» («штаммы, происходящие от них») или «мутант» означает штаммы, которые были получены от других штаммов (например, вышеуказанных депонированных штаммов), например, посредством генной инженерии, радиации и/или химической обработки. «Штаммы, происходящие от них» или «мутанты» также могут представлять собой спонтанно встречающиеся мутанты. Предпочтительным является то, что «штаммы, происходящие от них» или «мутанты» представляют собой функционально эквивалентных мутантов, например, мутантов, которые имеют по существу такие же или улучшенные свойства, по сравнению с их материнским штаммом. Например, производный штамм или мутант дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal. В особенности, фразы «штаммы, происходящие от них» или «мутанты» относятся к штаммам, полученным подверганием штамма по изобретению (например, вышеуказанных депонированных штаммов) любой традиционно используемой мутагенной обработке, включающей обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрогуанидин (NTG), УФ (ультрафиолетовый) светом, или к спонтанно встречающемуся мутанту. Мутант возможно был подвергнут нескольким мутагенным обработкам (одну обработку следует понимать как одну стадию мутагенеза, с последующей стадией скрининга/отбора), но в настоящее время предпочтительным является то, что проводят не больше, чем 20 или не больше, чем 10 или не больше, чем 5 обработок (или стадий скрининга/отбора). В предпочтительном в настоящее время мутанте меньше, чем 1%, меньше, чем 0,1%, меньше, чем 0,01%, меньше, чем 0,001% или даже меньше, чем 0,0001% нуклеотидов в бактериальном геноме было заменено другим нуклеотидом или подвергнуто делеции по сравнению с материнским штаммом.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и/или по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, представляет(ют)

собой протеолитический(е) штамм(ы), предпочтительно высокопротеолитический(е) штамм(ы).

В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений LAB представляет собой «**протеолитическую LAB**», если она содержит активную протеиназу клеточной стенки. Протеиназа клеточной стенки гидролизует белки молока, такие как казеин и, таким образом, улучшает качество молока в виде среды для быстрого роста LAB, имеющей ауксотрофии по аминокислотам. Протеиназы клеточной стенки были идентифицированы и подробно охарактеризованы у многочисленных LAB, включая PrtP *L. lactis*, PrtS *S. thermophilus* и PrtB *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*). Протеолитические LAB, таким образом, могут быть идентифицированы по присутствию гена, кодирующего протеиназу клеточной стенки. Дополнительно протеолитические LAB могут быть идентифицированы посредством анализа казеина, меченного флуоресцентным субстратом флуоресцеина изотиоцианатом, или FITC казеина, где определяется увеличение флуоресценции, вызванное ростом данного штамма в течение 6 часов в среде, содержащей флуоресцентно меченый казеин, по сравнению с контрольными образцами без клеток данного штамма. Полные подробности данного анализа приводятся, например, в Примере 1 WO 2017/125600.

Предпочтительно по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, добавляют в молочную основу на стадии (1a) способа по настоящему изобретению в количестве от  $1E+04$  до  $1E+10$  КОЕ (колониеобразующая единица)/мл молочной основы, предпочтительно от  $1E+05$  до  $1E+10$  КОЕ/мл или от  $1E+06$  до  $1E+10$  КОЕ/мл, или от  $1E+07$  до  $1E+09$  КОЕ/мл, предпочтительно, когда молочная основа имеет содержание жира примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка. Более предпочтительно, по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно сахарозу, добавляют в молочную основу на стадии (1a) способа по настоящему изобретению в количестве от  $1E+06$  -  $1E+08$  КОЕ/мл молочной основы, предпочтительно, когда молочная основа имеет содержание жира примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка.

Предпочтительно по меньшей мере один штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно *L. delbrueckii* подв.

*bulgaricus*, добавляют в молочную основу на стадии (1a) способа по настоящему изобретению в количестве от  $1E+04$  до  $1E+10$  КОЕ/мл молочной основы, предпочтительно от  $1E+05$  до  $1E+10$  КОЕ/мл или от  $1E+06$  до  $1E+10$  КОЕ/мл, или от  $1E+07$  до  $1E+09$  КОЕ/мл, предпочтительно, когда молочная основа имеет содержание жира примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка. Более предпочтительно по меньшей мере один штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, добавляют в молочную основу на стадии (1a) способа по настоящему изобретению в количестве от  $1E+06$  –  $1E+08$  КОЕ/мл молочной основы, предпочтительно когда молочная основа имеет содержание жира примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка.

Как описано выше, в предпочтительном воплощении настоящего изобретения по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, добавляют в молочную основу («доза инокуляции»), которая предпочтительно имеет содержание жира примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка в общем количестве от примерно  $1E+06$  до примерно  $1E+08$  КОЕ/мл молочной основы, предпочтительно в общем количестве от примерно  $5E+06$  до примерно  $1E+07$  КОЕ/мл молочной основы, например, от примерно  $6E+06$  КОЕ/мл до примерно  $1,5E+07$  КОЕ/мл, даже более предпочтительно в общем количестве от примерно  $1,2E+07$  КОЕ/мл до примерно  $1,3E+07$  КОЕ/мл.

Отношение числа бактериальных клеток по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод (ST), и по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus* (LB) (ST:LB) в заквасочной культуре или в молочной основе в начале ферментации может быть легко определено обычным специалистом. В конкретном воплощении данное отношение находится в интервале от 99:1 до 1:99, например, от 95:5 до 5:95, от 80:20 до 20:80 или от 70:30 до 30:70, или от 60:40 до 40:60, или 50:50 (ST:LB). Предпочтительное отношение находится в интервале от 90:10 до 99:1 (ST:LB).

b) нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а).

В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений термин «**нелактозный углевод**» означает любой углевод, который не является лактозой, и который способна метаболизировать лактозодефицитная LAB по изобретению. В конкретном воплощении данного изобретения нелактозный углевод выбран из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы. Предпочтительно нелактозный углевод не является глюкозой. Даже более предпочтительно нелактозный углевод представляет собой сахарозу.

Данный(е) нелактозный(е) углевод(ы) добавляют в молочную основу в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются) при pH ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например, от 5,0 до 5,4, предпочтительно при pH ферментированного молочного продукта примерно 5,3. Профиль закисления молочной основы можно отслеживать стандартными средствами, известными специалисту, такими как например оборудование измерения pH в реальном времени.

В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений термин «истощение» в связи с нелактозным(и) углеводом(дами) означает то, что концентрация данного(ных) нелактозного(ных) углевода(дов) равна нулю или так низка, что заквасочная культура, как определено на стадии (1a), больше не способна расти, или так низка, что заквасочная культура, как определено на стадии (1a), больше не способна закислять молочную основу далее. Примечательно, что скорость/профиль роста и закисления прямо коррелируют. Указание отсутствия роста йогуртовой заквасочной культуры показано на профиле закисления. Как только ферментируемый(е) углевод(ы) (например, сахароза) истощается(ются), имеется остановка на кривой закисления. С данной точки и далее наклон/форма кривой изменяется, указывая то, что растет только другая часть (пробиотик) культуральной смеси. Отсутствие роста заквасочной культуры стадии (а) способа по изобретению также может быть определено, например, посредством высаживания на чашку штаммов ST (*Streptococcus thermophilus*). В конкретном воплощении данного изобретения при завершении ферментации концентрация нелактозного углевода, при которой он «истощается», может находиться в интервале менее чем 100 мг/г, например менее чем 30 мг/г, включая интервал от 25 мг/г до 0,01 мг/г или интервал от 5 мг/г до 0,01 мг/г.

В данном контексте при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно при рН ферментированного молочного продукта примерно 5,3, ферментация из-за метаболизма заквасочной культуры прекращается. Согласно настоящему изобретению ферментация заквасочной культуры, таким образом, завершается посредством истощения одного или более чем одного нелактозного углевода. Однако, поскольку молочная основа дополнительно содержит пробиотические штаммы, которые способны метаболизировать углеводы, присутствующие в композиции, такие как лактоза, ферментация, обусловленная метаболизмом пробиотических штаммов продолжилась бы. На самом деле, в контексте настоящего изобретения ферментация молочной основы, обусловленная метаболизмом пробиотических штаммов, предпочтительно пробиотического штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, см. ниже, является желательной, и будет предпочтительно происходить согласно стадии (2) способа по настоящему изобретению.

Соответственно, ферментация молочной основы из-за метаболизма заквасочной культуры (катаболизм нелактозного(ных) углевода(ов)) будет прекращаться при рН от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно при примерно 5,3, так как данный(е) нелактозный(е) углевод(ы) истощился(щились), и заквасочная культура по существу больше не способна расти/закислять молочную основу. Однако, поскольку молочная основа содержит другие штаммы, т.е. пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, который(е) способен(способны) метаболизировать один или более чем один углевод все еще присутствующий в молочной основе, такой как лактозу, ферментация молочной основы будет продолжаться, см. ниже.

Количество нелактозного(ых) углевода(ов), подлежащее добавлению в молочную основу, зависит от целого ряда параметров, включая штаммы молочнокислых бактерий, используемые в заквасочной культуре, композицию молочной основы, температуру ферментации и желательный целевой рН, который в настоящем случае составляет от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3. Количество нелактозного(ных) углевода(ов), подлежащее добавлению в молочную основу, может определяться посредством экспериментирования, и проведение такого экспериментирования находится в пределах квалификации специалиста. Соответственно, специалист способен рассчитать количество

нелактозного(ных) углевода(ов), предпочтительно сахарозы, которое следует добавлять в молочную основу на стадии (1b) способа по настоящему изобретению, таким образом, что заквасочная культура, добавленная на стадии (1a) прекращает расти, так как нелактозный(ные) углевод(ы) был(и) истощен(ы) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно при рН ферментированного молочного продукта примерно 5,3.

Количество нелактозного(ных) углевода(ов), таким образом, может быть легко определено на основе использованной LAB и желательного закисления (целевой рН от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3), главным образом, вызванного заквасочной культурой, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*. В большинстве случаев в молоко добавляют сахарозу, галактозу и/или глюкозу, предпочтительно сахарозу, в количестве, приводящем к концентрации в интервале от 0,4 г/л до 10 г/л или в интервале от 1 г/л до 8 г/л, или в интервале от 2 г/л до 6 г/л.

В предпочтительном воплощении нелактозный углевод, который предпочтительно представляет собой сахарозу, добавляют в молочную основу на стадии (1b) способа по настоящему изобретению в количестве менее чем 0,9%, где % представляет собой массу на объем общего количества молочной основы (% масс./об.), предпочтительно в количестве менее чем 0,7%, даже более предпочтительно в количестве менее чем 0,5%, например 0,41%, предпочтительно, где молочная основа содержит примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка, заквасочную культуру на стадии (1a) предпочтительно добавляют в виде замороженной концентрированной культуры в количестве 0,01% масс./об. (например, примерно  $1,2-1,3E+07$  КОЕ/мл) от общего количества молока, и температура ферментации составляет примерно 38°C.

Например, когда количество заквасочной культуры, добавленной на стадии (1a), составляет 0,01% масс./об. (например, примерно  $1,2-1,3E+07$  КОЕ/мл), нелактозный(ные) углевод(ы), добавленный(е) на стадии (1b), предпочтительно сахарозу, добавляют в количестве менее чем 0,9%, предпочтительно в количестве менее чем 0,7%, даже более предпочтительно в количестве менее чем 0,5%,

предпочтительно от 0,5% до 0,41%, наиболее предпочтительно примерно 0,41%, где % представляет собой массу на объем (масс./об.) на основе молочной основы (% масс./об.), предпочтительно где молочная основа содержит примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка, и температура ферментации составляет примерно 38°C.

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

В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений термин «**пробиотические бактерии**» или «**пробиотический штамм**» относится к жизнеспособным бактериям, которые вводятся потребителю в адекватных количествах с целью достижения у потребителя эффекта, укрепляющего здоровье. Пробиотические бактерии способны выживать в условиях желудочно-кишечного тракта после приема внутрь и заселять кишечник потребителя.

В конкретном воплощении данного изобретения пробиотический штамм согласно настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из бактерий рода *Lactobacillus*, таких как *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* и *Lactobacillus johnsonii*, рода *Bifidobacterium*, таких как *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* и *Bifidobacterium infantis*, и тому подобных.

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

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

В предпочтительном воплощении данного изобретения пробиотический штамм представляет собой штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированный как ATCC 53103. В другом предпочтительном воплощении данного изобретения пробиотический штамм представляет собой штамм *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированный как DSM 13241. В конкретном воплощении данного изобретения

пробиотический штамм представляет собой штамм *Lactobacillus paracasei* CRL 431, депонированный как ATCC 55544, который имеется в продаже. В предпочтительном воплощении пробиотический штамм *Lactobacillus* не является штаммом *L. paracasei* CRL 431, депонированным как ATCC 55544, или штаммом *L. paracasei* CHCC 2115, депонированным в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 27.06.2007 г. под номером доступа DSM 19465.

В конкретном воплощении данного изобретения пробиотический штамм *Bifidobacterium* выбран из группы, состоящей из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* и *Bifidobacterium infantis*.

В конкретном воплощении данного изобретения пробиотический штамм *Bifidobacterium* представляет собой *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, также именуемый BB-12<sup>®</sup>, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg. 1b, D-38124 Braunschweig, 30.09.2003 г. под номером доступа DSM 15954. Данная *Bifidobacterium* BB-12<sup>®</sup> представляет собой хорошо известную пробиотическую бактерию, доступную от Chr. Hansen A/S, Horsholm, DK. В случае BB-12<sup>®</sup> доступное клиническое доказательство показывает то, что требуется ежесуточная доза жизнеспособных пробиотических бактерий по меньшей мере 1E+09 – 1E+10 КОЕ. Соответственно, желательно иметь высокий уровень, например, 1E+08 КОЕ или больше пробиотических бактерий на грамм ферментированного молочного продукта (например, ферментированного молочного йогуртового продукта).

В предпочтительном воплощении стадия (1c) включает добавление в молочную основу штамма *Bifidobacterium*, предпочтительно штамма *Bifidobacterium*, выбранного из группы, состоящей из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* и *Bifidobacterium infantis*, даже более предпочтительно, добавление в молочную основу *Bifidobacterium animalis* подв. *Lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированного в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg. 1b, D-38124 Braunschweig, 30.09.2003 г. под номером доступа DSM 15954.

Например, стадия (1c) может включать добавление в молочную основу пробиотического штамма, принадлежащего к роду *Bifidobacterium*, предпочтительно



принадлежащего к виду *Bifidobacterium animalis*, даже более предпочтительно *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, как описано выше, и пробиотического штамма, принадлежащего к роду *Lactobacillus*, например, *Lactobacillus rhamnosus* и/или *Lactobacillus acidophilus*, предпочтительно где пробиотический штамм, принадлежащий к роду *Lactobacillus*, не является штаммом *L. paracasei*, даже более предпочтительно где пробиотический штамм *Lactobacillus* не является штаммом *L. paracasei* CRL 431, депонированным как ATCC 55544, или штаммом *L. paracasei* CHCC 2115, депонированным как DSM 19465.

Даже более предпочтительно, композиция по изобретению содержит пробиотический штамм, принадлежащий к виду *Bifidobacterium animalis*, предпочтительно штамм *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированный как DSM 15954, и пробиотический штамм, принадлежащий к виду *Lactobacillus rhamnosus*, предпочтительно штамм LGG<sup>®</sup>, депонированный как ATCC53103, и/или пробиотический штамм, принадлежащий к виду *Lactobacillus acidophilus*, предпочтительно штамм LA-5<sup>®</sup>, депонированный как DSM 13241.

Предпочтительно пробиотический штамм *Bifidobacterium* добавляют в молочную основу на стадии (1с) способа по настоящему изобретению в количестве от 1E+06 до 1E+08 КОЕ/мл молочной основы, предпочтительно от 5E+06 до 5E+07 КОЕ/мл, более предпочтительно примерно 1,2E+07 КОЕ/мл молочной основы.

Предпочтительно данный пробиотический штамм добавляют в молочную основу на стадии (1с) способа по настоящему изобретению в количестве от 0,001 до 2%, где % представляет собой массу на объем общего количества молочной основы (% масс./об.), например 0,005%, 0,01%, 0,015%, 0,02%, предпочтительно от 0,001 до 0,025% массы на объем общего количества молочной основы, например от 0,0015 до 0,15%, например от 0,01 до 0,015% или от 0,01 до 0,02%, или от 0,01 до 0,025% массы на объем общего количества молочной основы. Предпочтительно данный пробиотический штамм добавляют в молочную основу в количестве для достижения концентрации примерно 0,01% массы на объем общего количества молочной основы, предпочтительно где данный пробиотический штамм добавляют в виде замороженной концентрированной культуры, предпочтительно где молочная основа имеет содержание жира примерно 2% по массе и содержание белка примерно 4,1% по массе. Если пробиотический штамм добавляют в молочную основу на стадии (1с) способа по настоящему изобретению в количестве примерно 0,001% массы на объем общего

количества молочной основы, данный пробиотический штамм предпочтительно добавляют в виде лиофилизированной концентрированной культуры.

В предпочтительном воплощении число клеток BB-12<sup>®</sup> в молоке при инокуляции при 0,01% F-DVS составляет примерно  $1,2E+07$  КОЕ/мл. В предпочтительном воплощении число клеток LA-5<sup>®</sup> в молоке при инокуляции при 0,01% F-DVS составляет примерно  $7E+06$  КОЕ/мл. В предпочтительном воплощении число клеток LGG<sup>®</sup> в молоке при инокуляции при 0,001% FD-DVS составляет примерно  $7E+06$  КОЕ/мл.

Соответственно, в предпочтительном воплощении стадия (1) способа по настоящему изобретению включает добавление в молочную основу:

а) по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, предпочтительно в количестве примерно  $1,2-1,3+07$  КОЕ/мл;

б) одного или более чем одного нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(е) нелактозный(е) углевод(ы) добавляют в количестве, отмеренном таким образом, чтобы он(и) истощался(лись) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; и

с) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированную как DSM 15954, предпочтительно в количестве примерно  $1,2E+07$  КОЕ/мл;

Или:

а) по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, предпочтительно в количестве примерно  $1,2-1,3+07$  КОЕ/мл;

б) одного или более чем одного нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(е) нелактозный(е) углевод(ы) добавляют в количестве, отмеренном таким образом, чтобы

он(и) истощался(лись) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; и

с) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированную как DSM 15954, предпочтительно в количестве примерно  $1,2E+07$  КОЕ/мл и штамма *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированного как ATCC 53103, предпочтительно в количестве примерно  $7E+06$  КОЕ/мл;

Или:

а) по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, предпочтительно в количестве примерно  $1,2-1,3+07$  КОЕ/мл;

б) одного или более чем одного нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(е) нелактозный(е) углевод(ы) добавляют в количестве, отмеренном таким образом, чтобы он(и) истощался(лись) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; и

с) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированного как DSM 15954, и штамма *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированного как DSM 13241, предпочтительно где BB-12<sup>®</sup> добавляют в количестве примерно  $1,2E+07$  КОЕ/мл, и LA-5<sup>®</sup> добавляют в количестве примерно  $7E+06$  КОЕ/мл.

В данных предпочтительных воплощениях, описанных выше, по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно выбран из группы, состоящей из следующих:

(а) (1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под номером доступа DSM 28952;

(2) штамм, происходящий от DSM 28952, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(b) (1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под номером доступа DSM 28953;

(2) штамм, происходящий от DSM 28953, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(c) (1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 22.08.2017 г. под номером доступа DSM 32599;

(2) штамм, происходящий от DSM 32599, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal; и

(d) (1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 22.08.2017 г. под номером доступа DSM 32600; и

(2) штамм, происходящий от DSM 32600, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

Предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, присутствующий в заквасочной культуре, представляет собой лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*. Предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* выбран из группы, состоящей из следующих:

(1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под номером доступа DSM 28910; и

(2) штамм, происходящий от DSM 28910, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

Как будет понятно специалисту, стадия (1) способа по настоящему изобретению включает добавление в молочную основу (1a) (заквасочная культура), (1b) (нелактозный(е) углевод(ы)) и (1c) (пробиотический штамм). Порядок добавления данных трех элементов не является релевантным; например, можно сначала добавлять в молочную основу заквасочную культуру и затем нелактозный(е) углевод(ы), и затем

пробиотический штамм. Или заквасочную культуру и пробиотический штамм можно смешивать друг с другом и затем в то же самое время добавлять в молочную основу, которая содержит нелактозный(е) углевод(ы). Наиболее предпочтительно (1) сначала в молочную основу добавляют нелактозный(е) углевод(ы) (предпочтительно сахарозу) и затем (2) в молочную основу добавляют заквасочную культуру и пробиотический штамм, например, заквасочную культуру и пробиотический штамм добавляют в то же самое время и в момент времени после добавления в молочную основу нелактозного(ых) углевода(ов). Предпочтительно нелактозный(е) углевод(ы) (который предпочтительно представляет собой сахарозу), при его(их) наличии, добавляют в молочную основу перед тепловой обработкой (например, пастеризацией) для обеспечения отсутствия примесей. Типично замороженные концентрированные йогуртовые культуры и культуры пробиотиков (F-DVS) содержат  $6E+10$  –  $1,5E+11$  КОЕ/г. При инокуляции при 0,01% масс./об. число клеток в молоке перед инкубацией (перед ферментацией) предпочтительно составляет от примерно  $6E+06$  КОЕ/мл до примерно  $1,5E+07$  КОЕ/мл. При инокуляции при 0,02% масс./об. число клеток в молоке перед инкубацией (перед ферментацией) предпочтительно составляет от примерно  $1,2E+07$  КОЕ/мл до примерно  $3E+07$  КОЕ/мл.

**Стадия 2** способа по настоящему изобретению включает осуществление ферментации молочного основания в течение некоторого периода времени до достижения целевого (или желательный) pH, с получением ферментированного молочного продукта.

Термин «**ферментация**» в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений означает превращение углеводов в спирты или кислоты посредством действия микроорганизма. Например, ферментация в контексте заквасочной культуры по данному изобретению включает превращение нелактозного углевода, например, сахарозы, до молочной кислоты.

В контексте стадии (2) способа по настоящему изобретению ферментация включает:

- первую стадию, где ферментация, главным образом, обусловлена превращением нелактозного углевода, добавленного в молочную основу на стадии (1b), например, сахарозы, до молочной кислоты посредством заквасочной культуры LAB, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей

мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, предпочтительно штамм *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, добавленный на стадии (1a);

- вторую стадию, где ферментация, главным образом, обусловлена пробиотическим штаммом, как определено в контексте настоящего изобретения, добавленным в молочную основу на стадии (1c), которая включает превращение лактозы до молочной кислоты посредством пробиотического штамма.

В способе по настоящему изобретению в течение первой стадии ферментации лактозодефицитные штаммы метаболизировали бы нелактозный(е) углевод(ы) до истощения нелактозного(ых) углевода(ов). Как указано выше, в комбинации с йогуртовой культурой пробиотический(е) штамм(ы) может(гут) расти немного лучше, чем одиночный штамм, но все еще растет(тут) значительно медленнее, чем йогуртовые виды *Streptococcus thermophilus* (ST) и *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* (LB), которые на данной стадии доминировали бы над пробиотическим(и) штаммом(ами).

Поскольку нелактозный(ные) углевод(ды) добавляют в количестве, отмеренном таким образом, чтобы он(и) истощился(зились) при pH ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3, первая стадия ферментации будет заканчиваться при pH молока от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3. На данной стадии лактозодефицитные штаммы, которые доминируют над пробиотическим(и) штаммом(ами), не способны к дальнейшему росту, поскольку они по существу не способны метаболизировать лактозу.

Однако пробиотический(е) штамм(ы), выбранный(е) из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, добавленный(е) в молочную основу на стадии (1c) способа по настоящему изобретению, которая содержит пробиотические штаммы, способные метаболизировать лактозу, будет(дут) продолжать закисление молочной основы. Соответственно, на второй стадии ферментация будет, главным образом, обусловлена метаболической активностью пробиотического(ких) штамма(мов). Данные пробиотические штаммы будут потреблять лактозу, присутствующую в молочной основе, и будут продолжать закисление до достижения целевого (желательного) pH. Целевой (желательный) pH может составлять примерно от 3,2 до 4,9, предпочтительно от примерно 3,6 до примерно 4,8, более предпочтительно от примерно 4,0 до примерно 4,6, например примерно 4,0 или примерно 4,3, или

примерно 4,4, или примерно 4,5, предпочтительно от примерно 4,6 до примерно 4,5, даже более предпочтительно примерно 4,55. В предпочтительном воплощении целевой (желательный) рН составляет примерно 4,55.

Эта вторая стадия ферментации (и, таким образом, стадия ферментации (2) по настоящему изобретению) может завершаться любыми способами, известными специалисту, такими как обработка охлаждением, или из-за того, что молоко достигает рН, который делает данный(е) пробиотический(е) штамм(ы) не способным(и) расти, или из-за того, что лактоза в молоке истощается, и пробиотические штаммы не способны расти далее, и т.д. Например, стадию ферментации (2) по настоящему изобретению можно завершать охлаждением (например, примерно 4°C), и ферментированный молочный продукт хранится охлажденным (например, при примерно 4°C). Охлаждение обычно используют в качестве способа замедления метаболической активности и сохранения культур и пробиотиков живыми.

Способы ферментации, подлежащие применению при производстве молочных продуктов, являются хорошо известными, и специалист в данной области будет знать, как выбирать подходящие условия способа, такие как температура, кислород, количество и характеристики микроорганизма(мов) и время процесса. Очевидно условия ферментации выбирают таким образом, чтобы поддерживать достижение настоящего изобретения, например, чтобы получать молочный продукт в твердой (например, фильтрованный йогурт или йогурт с высоким сухим остатком) или в жидкой форме (такой как йогурт, питьевой йогурт, йогурт с нарушенным сгустком, йогурт термостатного способа производства и йогуртоподобный напиток). В контексте настоящего изобретения ферментация проводится при температуре от примерно 34°C до примерно 43°C, например, примерно 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, предпочтительно при примерно 38°C, примерно 40°C или примерно 43°C.

В предпочтительном воплощении ферментированный молочный продукт, полученный способом по настоящему изобретению, содержит  $1,3E+08$  КОЕ пробиотических клеток/г ферментированного молочного продукта (КОЕ/г) или больше, предпочтительно  $2E+08$  КОЕ/г или больше, или  $3E+08$  КОЕ/г или больше, или  $4E+08$  КОЕ/г или больше, даже более предпочтительно  $5E+08$  КОЕ/г или больше, например,  $6E+08$  КОЕ/г или больше по меньшей мере одного пробиотического штамма, например, немедленно после ферментации, предпочтительно в момент времени по меньшей мере через 1 сутки после завершения ферментации (т.е. завершения стадии ферментации (2))

по настоящему изобретению), например через 15 суток или 30 суток, или 45 суток, более предпочтительно 60 суток после завершения ферментации, где предпочтительно пищевой или кормовой продукт хранили при примерно 4°C после завершения (окончания) ферментации согласно стадии (2) способа по настоящему изобретению, предпочтительно где молочная основа содержит примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка, предпочтительно, где ферментация происходит при примерно 38°C, и предпочтительно пока не достигается рН примерно 4,55.

#### **Ферментированный молочный продукт**

Кроме того, согласно настоящему изобретению предложен ферментированный молочный продукт, произведенный, полученный или прямо полученный способом по настоящему изобретению.

Преимущественно ферментированный молочный продукт по настоящему изобретению будет содержать большие количества жизнеспособных пробиотических бактерий (большее число жизнеспособных пробиотических клеток) по сравнению с количеством жизнеспособных пробиотических бактерий, присутствующих в ферментированном молочном продукте, инкубированном только с пробиотическими бактериями или ферментированным с заквасочной культурой, содержащей по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*, который не является лактозодефицитным, и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus*, предпочтительно *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который не является лактозодефицитным (например, традиционная лактоза (+) йогуртовая культура), или с заквасочной культурой, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, предпочтительно по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод в присутствии нелактозного углевода, предпочтительно сахарозы, в количестве, отмеренном таким образом, чтобы он истощался при рН ферментированного молочного продукта менее чем 4,9, например 4,55 (например, примерно 0,9% сахарозы). Кроме того, преимущественно ферментированный молочный продукт по настоящему изобретению будет иметь более высокую стабильность количества пробиотиков с течением времени, например, в течение по меньшей мере 60 суток срока годности, предпочтительно при примерно 4°C (хранение при примерно 4°C).



Следовательно, согласно настоящему изобретению, предложен пищевой или кормовой продукт (ферментированный молочный продукт), содержащий по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, предпочтительно по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, где данный пищевой или кормовой продукт содержит  $1,3E+08$  КОЕ или больше пробиотических клеток/г ферментированного молочного продукта (КОЕ/г), предпочтительно  $2E+08$  КОЕ/г или больше, или  $3E+08$  КОЕ/г или больше, или  $4E+08$  КОЕ/г или больше, даже более предпочтительно  $5E+08$  КОЕ/г или больше, например,  $6E+08$  КОЕ/г или больше по меньшей мере одного пробиотического штамма, присутствующего в пищевом или кормовом продукте, сразу после ферментации (т.е. стадии ферментации (2) по настоящему изобретению), предпочтительно в момент времени по меньшей мере через 1 сутки после завершения ферментации, например через 15 суток или 30 суток, или 45 суток, или 60 суток после завершения ферментации, где пищевой или кормовой продукт хранили при примерно  $4^{\circ}\text{C}$  после завершения (окончания) ферментации согласно стадии (2) способа по настоящему изобретению, предпочтительно где молочная основа содержит примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка, предпочтительно, где ферментация происходит при примерно  $38^{\circ}\text{C}$ , предпочтительно пока не достигается рН примерно 4,55. Пищевой или кормовой продукт по настоящему изобретению, таким образом, имеет очень большое количество пробиотиков (больше, чем  $1,3E+08$  КОЕ/г, как описано выше). Добавление таких больших количеств пробиотиков в уже ферментированный молочный продукт влияло бы на такие свойства, как вкус и аромат данного ферментированного молочного продукта. Кроме того, это было бы очень дорого, так как это включало бы добавление пробиотиков в 30-50 раз большем количестве, чем показатель инокуляции молочной основы перед ферментацией согласно настоящему изобретению. Соответственно, пищевой или кормовой продукт по настоящему изобретению также демонстрирует данные преимущества по сравнению с пищевым или кормовым продуктом, содержащим по существу такое же количество пробиотиков, но где данные пробиотики были добавлены после ферментации молочной основы.

Как указано выше, в контексте способа по настоящему изобретению предпочтительно по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, которые содержатся в данном пищевом или кормовом продукте (ферментированном молочном продукте) по настоящему изобретению, способны метаболизировать **тот же самый нелактозный углевод**, который предпочтительно представляет собой сахарозу.

Пищевой или кормовой продукт (ферментированный молочный продукт) по настоящему изобретению может содержать любое число других компонентов, включая ферментированное молоко, пищевые добавки, стабилизаторы, криопротекторы, корригенты, искусственные подсластители и тому подобное. Пищевой или кормовой продукт по настоящему изобретению может представлять собой любой ферментированный молочный продукт, включая йогурт, такой как фруктовый йогурт, йогуртовый напиток, йогурт с нарушенным сгустком, йогурт термостатного способа производства, йогуртоподобный напиток, фильтрованный йогурт и т.д. Предпочтительно пищевой или кормовой продукт по настоящему изобретению представляет собой йогурт.

В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений термин «**йогурт**» относится к продуктам, содержащим *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, и возможно другие микроорганизмы, такие как *Lactobacillus delbrueckii* подв. *lactis*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus paracasei*, или любой микроорганизм, происходящий от них. Штаммы молочнокислых бактерий, отличных от *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, включаются для придания конечному продукту разных свойств, таких как свойство стимуляции равновесия микрофлоры. Термин «йогурт» в том виде, в котором он здесь используется, охватывает йогурт термостатного способа производства, йогурт с нарушенным сгустком, питьевой йогурт, творожный сырок, термостатированный йогурт, фильтрованный йогурт или греческий йогурт, отличающийся высоким уровнем белка, и йогуртоподобные продукты. В частности, термин «йогурт» охватывает йогурт, как определено французскими и европейскими нормативами, например, створоженные

молочные продукты, полученные молочнокислой ферментацией посредством только конкретных термофильных молочнокислых бактерий (т.е. *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*), которые культивируются одновременно и находятся в конечном продукте живыми в количестве по меньшей мере 10 миллионов КОЕ (колониеобразующие единицы)/г, но не ограничивается им. Йогурты возможно могут содержать добавленное молочное сырье (например, сливки) или другие ингредиенты, такие как сахар или подсластители, один или более чем один корригент, фрукты, злаки или питательные вещества, особенно витамины, минералы и волокна, а также стабилизаторы и загустители. В одном альтернативном варианте йогурт удовлетворяет спецификациям ферментированных молочных продуктов и йогуртов стандарта AFNOR NF 04-600 и/или стандарта кодекса StanA-IIa-1975. Для того чтобы соответствовать стандарту AFNOR NF 04-600, продукт не должен подвергаться нагреванию после ферментации, и молочное сырье должно составлять минимум 70% (масс./масс.) конечного продукта.

Ферментированное молоко, получаемое способом по настоящему изобретению, содержащее  $1,3E+08$  КОЕ пробиотических клеток/г ферментированного молока (КОЕ/г) или больше, предпочтительно  $2E+08$  КОЕ/г или больше, или  $3E+08$  КОЕ/г или больше, или  $4E+08$  КОЕ/г или больше, даже более предпочтительно  $5E+08$  КОЕ/г или больше, например,  $6E+08$  КОЕ/г или больше по меньшей мере одного пробиотического штамма, присутствующего в ферментированном молоке, как здесь описано, также может использоваться в качестве продукта-добавки, например, который кладут в другие съедобные пищевые продукты, такие как творог, шоколад, соки, мясные продукты и продукты на основе сухого молока для младенцев первых месяцев жизни.

Предпочтительные лактозодефицитные штаммы *Streptococcus thermophilus* уже были определены в контексте способа по настоящему изобретению и равным образом применимы к данному воплощению.

Предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus* представляет собой лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*. Предпочтительный лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* уже был определен в контексте способа по настоящему изобретению и равным образом применим к данному воплощению.

Предпочтительные пробиотические штаммы уже были описаны в контексте способа по данному изобретению и равным образом применимы к данному

воплощению. Соответственно, предпочтительно пробиотический штамм, присутствующий в пищевом или кормовом продукте по настоящему изобретению, представляет собой один или более чем один из следующих пробиотических штаммов:

- *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg, 1b, D-38124 Braunschweig, 30.09.2003 г. под номером доступа DSM 15954; и/или
- штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированный как ATCC53103; и/или
- штамм *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированный как DSM 13241.

Соответственно, в предпочтительном воплощении пищевой или кормовой продукт (ферментированный молочный продукт) по настоящему изобретению содержит  $1,3E+08$  КОЕ или больше пробиотических бактерий/г ферментированного молочного продукта (КОЕ/г), предпочтительно  $2E+08$  КОЕ/г или больше, или  $3E+08$  КОЕ/г или больше, или  $4E+08$  КОЕ/г или больше, даже более предпочтительно  $5E+08$  КОЕ/г или больше, например,  $6E+08$  КОЕ/г или больше по меньшей мере одного из приведенных выше пробиотических штаммов, предпочтительно *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, DSM 15954, сразу после ферментации, предпочтительно в момент времени по меньшей мере через 1 сутки после завершения ферментации согласно стадии (2) настоящего изобретения, например через 15 суток или через 30 суток, или через 45 суток, или через 60 суток после завершения ферментации, где пищевой или кормовой продукт хранили при примерно  $4^{\circ}\text{C}$  после завершения ферментации согласно стадии (2) способа по настоящему изобретению, предпочтительно, где молочная основа содержит примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка, предпочтительно, где ферментация происходила при примерно  $38^{\circ}\text{C}$ , и предпочтительно пока не достигался pH примерно 4,55.

Примечательно, что пищевой или кормовой продукт (ферментированный молочный продукт) по настоящему изобретению содержит  $1,3E+08$  КОЕ/г или больше, предпочтительно  $2E+08$  КОЕ/г или больше, или  $3E+08$  КОЕ/г или больше, или  $4E+08$  КОЕ/г или больше, даже более предпочтительно  $5E+08$  КОЕ/г или больше, например,  $5,7E+08$  КОЕ/г или больше по меньшей мере одного пробиотического штамма, присутствующего в данном продукте в 60 суток после завершения ферментации (60 суток хранения), где данный пищевой или кормовой продукт хранили при примерно

4°C после завершения ферментации согласно стадии (2) способа по настоящему изобретению, и предпочтительно где молочная основа содержит примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка, предпочтительно где ферментация происходила при примерно 38°C, и предпочтительно пока не достигался рН примерно 4,55. Соответственно пищевой или кормовой продукт по настоящему изобретению (ферментированный молочный продукт) демонстрирует более высокую стабильность (повышенное количество жизнеспособных пробиотических бактерий поддерживается с течением времени) на протяжении 60 суток хранения (при примерно 4°C), чем пищевой или кормовой продукт, который ферментировали с использованием такой же молочной основы, при таких же условиях ферментации, с таким же исходным количеством пробиотических бактерий, но с одним из следующего:

- нет заквасочной культуры, т.е. молочной основы, инкубированной только с пробиотическими бактериями;

- заквасочная культура, содержащая по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*, который не является лактозодефицитным (lac+), и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus*, который не является лактозодефицитным, предпочтительно (lac+) *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus* (например, традиционная лактоза (+) йогуртовая культура);

- заквасочная культура, содержащая по меньшей мере один лактозодефицитный (lac-) штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный (lac-) штамм *Lactobacillus*, предпочтительно по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, в присутствии нелактозного(ых) углевода(ов), предпочтительно сахарозы, в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются), когда рН данного ферментированного молока менее чем 4,9, например 4,55.

### **Композиция**

Согласно настоящему изобретению, предложена композиция (далее «композиция по изобретению») для получения ферментированного молочного продукта, содержащая

- а) заквасочную культуру молочнокислых бактерий (LAB), содержащую или, в качестве альтернативы, состоящую из по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный

углевод, и по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Lactobacillus*, предпочтительно штамма *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод; и

b) один или более чем один нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данные(е) нелактозный(е) углевод(ы) присутствует(ют) в композиции в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются) при pH ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3.

Как указано выше, в контексте способа по настоящему изобретению предпочтительно по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, которые содержатся в пищевом или кормовом продукте (ферментированном молочном продукте) по настоящему изобретению, способны метаболизировать **тот же самый нелактозный углевод**, который предпочтительно представляет собой сахарозу. В других воплощениях по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, которые содержатся в заквасочной культуры, которую добавляют в молочную основу на стадии а по настоящему изобретению, способны метаболизировать разные нелактозные углеводы, предпочтительно где данный нелактозный углевод не является глюкозой. Например, по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* способен метаболизировать сахарозу, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus* способен метаболизировать галактозу или наоборот.

В конкретном воплощении данная композиция содержит два или более чем два лактозодефицитных штамма *Streptococcus thermophilus* и один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, предпочтительно один лактозодефицитный штамм *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*.

Заквасочная культура композиции по настоящему изобретению была подробно описана ранее при описании заквасочной культуры, добавленной на стадии (1a) способа по настоящему изобретению. Соответственно, заквасочная культура (a), содержащаяся в композиции по настоящему изобретению, соответствует заквасочной культуре, добавленной в молочную основу на стадии (1a) способа по настоящему изобретению, которая была подробно описана выше, и равным образом применима к композиции по настоящему изобретению.

Кроме того, нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями заквасочной культуры, содержащийся в композиции по настоящему изобретению (b), был подробно описан в контексте способа по настоящему изобретению (стадия 1b).

Предпочтительные лактозодефицитные штаммы *Streptococcus thermophilus* уже были определены в контексте способа по настоящему изобретению и равным образом применимы к данному воплощению.

Предпочтительно лактозодефицитный штамм *Lactobacillus* представляет собой лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*. Предпочтительные лактозодефицитные штаммы *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* уже были определены в контексте способа по настоящему изобретению и равным образом применимы к данному воплощению.

В предпочтительном воплощении композиция по данному изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*.

Пробиотический штамм, предпочтительно содержащийся в композиции по настоящему изобретению, был подробно описан в контексте способа по настоящему изобретению (стадия 1c). Соответственно, пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, предпочтительно содержащийся в композиции по настоящему изобретению, соответствует пробиотическому штамму, выбранному из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, добавленного в молочную основу стадии (1c) способа по настоящему изобретению, который был подробно описан выше, и равным образом применим к композиции по настоящему изобретению.

Соответственно, в предпочтительном воплощении настоящего изобретения данная композиция содержит:

a) по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод;

b) один или более чем один нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(е) нелактозный(е) углевод(ы) присутствует(ют) в композиции в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; и

c) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированный как DSM 15954.

Или данная композиция содержит:

a) по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод;

b) один или более чем один нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(е) нелактозный(е) углевод(ы) присутствует(ют) в композиции в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3;

c) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированный как DSM 15954;

и

d) штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированный как ATCC 53103.

Или данная композиция содержит:

a) по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод;

b) один или более чем один нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(е) нелактозный(е) углевод(ы) присутствует(ют) в композиции в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3;



с) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированный как DSM 15954;

и

d) штамм *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированный как DSM 13241.

Количества штаммов, присутствующих в заквасочной культуре, и/или количества пробиотического(ких) штамма(мов) были описаны выше в контексте способа по настоящему изобретению и равным образом применимы к композиции по настоящему изобретению.

В предпочтительном воплощении композиция по данному изобретению содержит от 1E+04 до 1E+09 КОЕ штамма *Streptococcus thermophilus*/г композиции или больше, предпочтительно от 1E+05 до 1E+07 КОЕ/г или от 1E+06 до 1E+07 КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus*. Более предпочтительно композиция по данному изобретению содержит примерно 6-7E+08 КОЕ/г или меньше штамма *Streptococcus thermophilus*.

В предпочтительном воплощении композиция по данному изобретению содержит от 1E+04 до 1E+09 КОЕ штамма *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*/г композиции, предпочтительно от 1E+05 до 1E+07 КОЕ/г или от 1E+06 до 1E+07 КОЕ/г штамма *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*. Более предпочтительно композиция по данному изобретению содержит примерно 1E+07 КОЕ штамма *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*/г композиции.

В предпочтительном воплощении композиция по данному изобретению содержит общее количество КОЕ по меньшей мере 1E+10 КОЕ/г (т.е., рассматривая количество *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* и пробиотических штаммов, при их наличии).

Как раскрыто в WO 2005/003327, полезным является добавление в заквасочную культуру определенных криопротекторов. Таким образом, заквасочная культура, содержащаяся в композиции по настоящему изобретению (а), может содержать один или более чем один криопротектор, выбранный 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.

Кроме того, заквасочные культуры могут быть предоставлены в виде замороженных или высушенных заквасочных культур, помимо жидких заквасочных

культур. Таким образом, композиция по настоящему изобретению может находиться в замороженной, лиофилизированной или жидкой форме.

### **Применение настоящего изобретения**

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено применение композиции по настоящему изобретению для увеличения числа жизнеспособных пробиотических клеток по меньшей мере одного из пробиотических штаммов, присутствующих в ферментированном молочном продукте, по сравнению с ферментированным молочным продуктом, ферментированным с использованием композиции, содержащей:

а) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*, который не является лактозодефицитным, и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus*, предпочтительно *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который не является лактозодефицитным; или

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

2) один или более чем один нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (1), где нелактозный(е) углевод(ы) присутствует(ют) в композиции в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; или

с) молочную основу, инкубируемую с по меньшей мере одной пробиотической бактерией (т.е. в отсутствие «заквасочной культуры», как описано выше).

Соответственно, композицию по настоящему изобретению можно использовать для увеличения числа жизнеспособных клеток по меньшей мере одного из пробиотических штаммов, присутствующих в ферментированном молочном продукте, где данный пищевой или кормовой продукт содержит  $1,3E+08$  КОЕ или больше пробиотических бактерий/г ферментированного молочного продукта (КОЕ/г), предпочтительно  $2E+08$  КОЕ/г или больше, или  $3E+08$  КОЕ/г или больше, или  $4E+08$  КОЕ/г или больше, даже более предпочтительно  $5E+08$  КОЕ/г или больше, например,  $6E+08$  КОЕ/г или больше по меньшей мере одного пробиотического штамма,

присутствующего в пищевом или кормовом продукте, сразу после ферментации, предпочтительно в момент времени, который составляет по меньшей мере 1 сутки после завершения ферментации согласно стадии (2) способа по настоящему изобретению, например 15 суток или 30 суток, или 45 суток, или 60 суток после завершения ферментации, где данный пищевой или кормовой продукт хранили при примерно 4°C после прекращения ферментации согласно стадии (2) способа по настоящему изобретению, предпочтительно, где молочная основа содержит примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка, предпочтительно где ферментация происходила при примерно 38°C, и предпочтительно пока не достигался рН примерно 4,55.

Предпочтительно композицию по настоящему изобретению используют для увеличения числа жизнеспособных клеток (увеличения или улучшения выживания) по меньшей мере одного пробиотического штамма, выбранного из следующих:

- *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg. 1b, D-38124 Braunschweig, 30.09.2003 под номером доступа DSM 15954; и/или

- штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированный как ATCC 53103; и/или

- штамм *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированный как DSM 13241.

Соответственно, в предпочтительном воплощении композиция по настоящему изобретению используется для увеличения числа жизнеспособных клеток (увеличения или улучшения выживания) по меньшей мере одного из описанных выше пробиотических штаммов, присутствующих в ферментированном молочном продукте, как описано выше, где данный ферментированный молочный продукт содержит 1,3E+08 КОЕ или больше жизнеспособных клеток пробиотических бактерий/г ферментированного молочного продукта (КОЕ/г), предпочтительно 2E+08 КОЕ/г или больше, или 3E+08 КОЕ/г или больше, или 4E+08 КОЕ/г или больше, даже более предпочтительно 5E+08 КОЕ/г или больше, например, 6E+08 КОЕ/г или больше по меньшей мере одного из описанных выше пробиотических штаммов, предпочтительно *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, DSM 15954 - сразу после ферментации, предпочтительно в момент времени, который составляет по меньшей мере 1 сутки после завершения ферментации согласно стадии (2) способа по настоящему изобретению, например 15 суток или 30 суток, или 45 суток, или 60 суток после завершения ферментации, где данный пищевой или кормовой продукт хранили при

примерно 4°C после прекращения ферментации согласно стадии (2) способа по настоящему изобретению, предпочтительно, где молочная основа содержит примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка, предпочтительно где ферментация происходила при примерно 38°C, и предпочтительно пока не достигался рН примерно 4,55.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложен способ увеличения числа жизнеспособных пробиотических клеток по меньшей мере одного из пробиотических штаммов, присутствующих в ферментированном молочном продукте, с использованием композиции по настоящему изобретению, как подробно описано выше.

Термин «для увеличения или улучшения выживания жизнеспособных пробиотических клеток с течением времени» в том виде, в котором он здесь используется, означает то, что число жизнеспособных пробиотических клеток в продукте, ферментированном заквасочной культурой по настоящему изобретению, поддерживается на более высоком уровне с течением времени, чем число пробиотических клеток в ферментированном продукте, который был ферментирован с использованием такой же молочной основы, при таких же условиях ферментации, с таким же исходным количеством пробиотических клеток, но с одним из следующего:

- нет заквасочной культуры, т.е. молочной основы, инкубированной только с пробиотическими бактериями (как показано на Фиг. 1, пробиотики не растут легко в молоке или растут очень медленно);

- заквасочная культура, содержащая по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*, который не является лактозодефицитным (lac<sup>+</sup>), и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus*, который не является лактозодефицитным, предпочтительно (lac<sup>+</sup>) *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus* (например, традиционная лактозо (+) йогуртовая культура);

- заквасочная культура, содержащая по меньшей мере один лактозодефицитный (lac<sup>-</sup>) штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный (lac<sup>-</sup>) штамм *Lactobacillus*, предпочтительно по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, в присутствии нелактозного углевода, предпочтительно сахарозы, в количестве,

отмеренном таким образом, чтобы он истощился, когда рН данного ферментированного молока меньше, чем 4,9, например 4,55.

В данном контексте фраза «с течением времени» означает в течение по меньшей мере 1 суток после завершения ферментации согласно стадии (2) способа по настоящему изобретению, например 15 суток или 30 суток, или 45 суток, или 60 суток после завершения ферментации, где данный пищевой или кормовой продукт хранили при примерно 4°C после прекращения ферментации согласно стадии (2) способа по настоящему изобретению, предпочтительно, где молочная основа содержит примерно 2% по массе жира и примерно 4,1% по массе белка.

Термин «примерно» (или «около») в том виде, в котором он здесь используется, означает указанное значение плюс/минус 1% от его значения, или термин «примерно» означает указанное значение плюс/минус 2% от его значения, или термин «примерно» означает указанное значение плюс/минус 5% от его значения, термин «примерно» означает указанное значение плюс/минус 10% от его значения, или термин «примерно» означает указанное значение плюс/минус 20% от его значения, или термин «примерно» означает указанное значение плюс/минус 30% от его значения; предпочтительно термин «примерно» означает точно указанное значение (плюс/минус 0%).

Если не определено иначе, все используемые здесь технические и научные термины имеют такое же значение, которое обычно понятно обычному специалисту в области, к которой принадлежит данное изобретение. В воплощении настоящего изобретения на практике можно использовать способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь способам и материалам. Дополнительные объекты, преимущества и характеристики изобретения станут очевидными специалистам в данной области при проверке данного описания или могут быть изучены посредством воплощения данного изобретения на практике. Следующие примеры и графические материалы приводятся в качестве иллюстрации, и они не предназначены для того, чтобы ограничивать настоящее изобретение.

Во всем данном описании и формуле изобретения слово «содержать» и вариации данного слова (например, «содержащий», «имеющий», «включающий», «содержащий») типично не являются ограничивающими и, таким образом, не исключают другие характеристики, которые, например, могут быть техническими характеристиками, добавками, компонентами или стадиями. Однако всякий раз, когда слово «содержать» используется здесь, это *также* включает специальное воплощение,

в котором данное слово *следует понимать* как ограничивающее; в данном конкретном воплощении слово «содержать» имеет значение термина «состоит из».

Применение терминов и аналогичных объектов ссылки в контексте описания данного изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует истолковывать как включающее и единственное, и множественное число, если здесь не указано иное, или это явно не противоречит контексту. Перечисление здесь интервалов значений просто предназначено для того, чтобы служить в качестве краткого способа индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в пределы данного интервала, если здесь не указано иное, и каждое отдельное значение включается в данное описание изобретения как если бы оно было здесь индивидуально перечислено. Все описанные здесь способы могут осуществляться в любом подходящем порядке, если здесь не указано иное, или, в противном случае, это явно не противоречит контексту. Подразумевается то, что применение приведенных здесь любого и всех примеров или типичной формулировки (например, «**такой как**») предназначено просто для лучшего освещения данного изобретения и не накладывает ограничения на объем данного изобретения, если не заявляется иное. Ни одна формулировка в данном описании изобретения не должна истолковываться как указывающая на любой незаявленный элемент как существенный для воплощения данного изобретения на практике.

### **ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЕ ВОПЛОЩЕНИЯ**

1. Способ получения ферментированного молочного продукта, включающий следующие стадии:

1) Добавление в молочную основу:

А) заквасочной культуры молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, предпочтительно *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно где данную заквасочную культуру добавляют в количестве  $1,2-1,3E+07$  КОЕ штамма *Streptococcus thermophilus* и штамма *Lactobacillus*/мл молочной основы, предпочтительно где отношение по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus* (ST) к по меньшей мере одному лактозодефицитному штамму *Lactobacillus*, предпочтительно *L.*

*delbrueckii* подв. *bulgaricus* (LB) в заквасочной культуре составляет от 1:99 до 99:1 (ST:LB), например, 50:50, более предпочтительно от 90:10 до 99:1 (ST:LB);

b) одного или более чем одного нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(е) нелактозный(е) углевод(ы) добавляют в количестве, отмеренном таким образом, что он(они) истощается(ются) при pH ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; и

с). пробиотического штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*;

2) ферментирование данной молочной основы в течение некоторого периода времени до достижения целевого pH, с получением ферментированного молочного продукта.

2. Способ по п. 1, в котором по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, предпочтительно *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, способны метаболизировать тот же самый нелактозный углевод.

3. Способ по любому из пп. 1-2, в котором нелактозный(ные) углевод(ды) выбран(ны) из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы, предпочтительно, где нелактозный углевод не является глюкозой, даже более предпочтительно, где нелактозный углевод представляет собой сахарозу.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где целевой pH стадии (2) составляет от примерно 4,8 до примерно 4,0, предпочтительно от примерно 4,6 до примерно 4,55, даже более предпочтительно примерно 4,55.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из следующих:

(а) (1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под номером доступа DSM 28952;

(2) штамм, происходящий от DSM 28952, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(b) (1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под номером доступа DSM 28953;

(2) штамм, происходящий от DSM 28953, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(c) (1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 22.08.2017 г. под номером доступа DSM 32599;

(2) штамм, происходящий от DSM 32599, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal; и

(d) (1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 22.08.2017 г. под номером доступа DSM 32600; и

(2) штамм, происходящий от DSM 32600, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где лактозодефицитный штамм *Lactobacillus* представляет собой штамм *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, выбранный в группе, состоящей из следующих:

(1) штамм, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под номером доступа DSM 28910; и

(2) штамм, происходящий от DSM 28910, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором пробиотический штамм не является штаммом *Lactobacillus paracasei*, даже более предпочтительно, где пробиотический штамм *Lactobacillus* не является штаммом CRL 431 *L. paracasei*, депонированным как ATCC 55544, или штаммом CHCC 2115 *L. paracasei*, депонированным как DSM 19465.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором пробиотический штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus*, штамма *Lactobacillus*



*paracasei* и штамма *Lactobacillus acidophilus*, и/или в котором пробиотический штамм *Bifidobacterium* выбран из группы, состоящей из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* и *Bifidobacterium infantis*.

9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором пробиотический штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированного как ATCC 53103, штамма CRL 431 *Lactobacillus paracasei*, депонированного как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированного как DSM 13241, и *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированного как DSM 15954.

10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором пробиотический штамм, добавленный в молочную основу на стадии (1с), содержит штамм *Bifidobacterium*, предпочтительно пробиотический штамм *Bifidobacterium*, выбранный из группы, состоящей из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* и *Bifidobacterium infantis*, даже более предпочтительно *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированного как DSM 15954.

11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором стадия (1) включает добавление в молочную основу:

а) по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно где по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, добавляют в количестве  $1,2-1,3E+07$  КОЕ;

б) одного или более чем одного нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(ные) нелактозный(ные) углевод(ды) добавляют в количестве, отмеренном таким образом, что он(они) истощаются при pH ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; и

с) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депнированного как DSM 15954, предпочтительно в количестве примерно 1,2E+07 КОЕ/мл молочной основы.

12. Способ по любому из пп. 1-10, в котором стадия (1) включает добавление в молочную основу:

а) по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно где по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, добавляют в количестве 1,2-1,3E+07 КОЕ;

б) одного или более чем одного нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(ные) нелактозный(ные) углевод(ды) добавляют в количестве, отмеренном таким образом, что он(они) истощаются при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например, от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; и

с) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированного как DSM 15954, и штамма *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированного как ATCC 53103, предпочтительно где *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup> добавляют в количестве примерно 1,2E+07 КОЕ/мл, и штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup> добавляют в количестве примерно 7E+06 КОЕ/мл.

13. Способ по любому из пп. 1-10, в котором стадия (1) включает добавление в молочную основу:

а) по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, предпочтительно где по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, добавляют в количестве 1,2-1,3E+07 КОЕ;

b) одного или более чем одного нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(ные) нелактозный(ные) углевод(ды) добавляют в количестве, отмеренном таким образом, что он(они) истощается(ются) при pH ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например, от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; и

с) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* - BB-12<sup>®</sup> - депонированного как DSM 15954, и штамма *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированного как DSM 13241, предпочтительно где *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup> добавляют в количестве примерно  $1,2E+07$  КОЕ/мл, и штамм *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup> добавляют в количестве примерно  $7E+06$  КОЕ/мл.

14. Способ по любому из пп. 11-13, в котором по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, определен так же, как в п. 5, и в котором по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, определен так же, как в п. 6.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором в молочную основу на стадии (1а) добавляют от  $1E+04$  до  $1E+10$  КОЕ (колониеобразующие единицы)/мл молочной основы штамма *Streptococcus thermophilus*, предпочтительно от  $1E+05$  до  $1E+10$  КОЕ/мл или от  $1E+06$  до  $1E+10$  КОЕ/мл, или от  $1E+07$  до  $1E+09$  КОЕ/мл, предпочтительно от примерно  $1E+06$  до примерно  $1E+08$  КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus*.

16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором в молочную основу на стадии (1а) добавляют от  $1E+04$  до  $1E+10$  КОЕ/мл молочной основы штамма *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, предпочтительно от  $1E+05$  до  $1E+10$  КОЕ/мл или от  $1E+06$  до  $1E+10$  КОЕ/мл, или от  $1E+07$  до  $1E+09$  КОЕ/мл, предпочтительно от примерно  $1E+06$  до примерно  $1E+08$  КОЕ/мл штамма *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором в молочную основу на стадии (1с) добавляют от примерно  $1E+06$  до примерно  $1E+08$  КОЕ/мл молочной основы пробиотического штамма, предпочтительно от примерно  $5E+06$  до примерно  $5E+07$  КОЕ/мл, более предпочтительно от примерно 1 до  $1,5E+07$  КОЕ/мл, например, примерно  $1,2E+07$  КОЕ/мл, или примерно  $7E+06$  КОЕ/мл пробиотического штамма.

18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором нелактозный углевод, предпочтительно сахарозу, добавляют в молочную основу на стадии (1b) в количестве меньше, чем 0,9%, предпочтительно в количестве меньше, чем 0,7%, даже более предпочтительно в количестве меньше, чем 0,5%, например, 0,41%, где % представляет собой массу на объем (% масс./об.) молочной основы.

19. Ферментированный молочный продукт, полученный способом по пп. 1-18.

20. Пищевой или кормовой продукт, содержащий по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, предпочтительно где штамм *Lactobacillus* не является штаммом *Lactobacillus paracasei*, даже более предпочтительно где штамм *Lactobacillus* не является штаммом *L. paracasei* CRL431, депонированным как ATCC 55544, или штаммом *L. paracasei* CHCC 2115, депонированным как DSM 19465, где данный пищевой или кормовой продукт содержит 1,3E+08 КОЕ жизнеспособных клеток пробиотических бактерий/г ферментированного молочного продукта (КОЕ/г) или больше, предпочтительно 2E+08 КОЕ/г или больше, даже более предпочтительно 5E+08 КОЕ/г или больше, например, 6E+08 КОЕ/г по меньшей мере одного из пробиотических штаммов, присутствующих в пищевом или кормовом продукте немедленно после ферментации, предпочтительно в момент времени, который составляет по меньшей мере 1 сутки после завершения ферментации, например, 15 суток или 30 суток, или 45 суток, или 60 суток после завершения ферментации, где данный пищевой или кормовой продукт хранили при примерно 4°C после завершения ферментации.

21. Пищевой или кормовой продукт по п. 20, в котором пробиотический штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus*, штамма *Lactobacillus paracasei* и штамма *Lactobacillus acidophilus*, и в котором пробиотический штамм *Bifidobacterium* выбран из группы, состоящей из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* и *Bifidobacterium infantis*.

22. Пищевой или кормовой продукт по любому из пп. 20-21, где данный пищевой или кормовой продукт представляет собой ферментированный молочный

продукт, предпочтительно ферментированный молочный напиток, более предпочтительно йогурт.

23. Пищевой или кормовой продукт по любому из пп. 20-22, в котором лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой штамм, как определено в п. 5; и/или в котором лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* представляет собой штамм, как определено в п. 6; и/или в котором пробиотический штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированного как ATCC 53103, штамма CRL 431 *Lactobacillus paracasei*, депонированного как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированного как DSM 13241, и *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированного как DSM 15954.

24. Композиция для получения ферментированного молочного продукта, содержащая:

а) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, предпочтительно *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод; и

б) один или более чем один нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(ные) нелактозный(ные) углевод(ды) присутствует(ют) в композиции в количестве, отмеренном таким образом, что он(они) истощается(ются) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например, от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3.

25. Композиция по п. 24, в которой по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, предпочтительно *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, способен метаболизировать тот же самый нелактозный углевод.

26. Композиция по любому из пп. 24-25, в которой нелактозный углевод выбран из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы, предпочтительно в которой нелактозный углевод не является глюкозой, даже более предпочтительно в которой нелактозный углевод представляет собой сахарозу.

27. Композиция по любому из пп. 24-26, в которой лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой штамм, как определено в п. 5; и/или в которой лактозодефицитный штамм *Lactobacillus* представляет собой *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, как определено в п. 6.

28. Композиция по любому из пп. 24-27, где данная композиция дополнительно содержит пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, предпочтительно где штамм *Lactobacillus* не является штаммом *Lactobacillus paracasei*, даже более предпочтительно, где штамм *Lactobacillus* не является штаммом CRL 431 *L. paracasei*, депонированным как ATCC 55544, или штаммом CHCC 2115 *L. paracasei*, депонированным как DSM 19465.

29. Композиция по любому из пп. 24-28, в которой пробиотический штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus*, штамма *Lactobacillus paracasei* и штамма *Lactobacillus acidophilus*, и в которой пробиотический штамм *Bifidobacterium* выбран из группы, состоящей из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* и *Bifidobacterium infantis*.

30. Композиция по любому из пп. 28-29, в которой пробиотический штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированного как ATCC 53103, штамма CRL 431 *Lactobacillus paracasei*, депонированного как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированного как DSM 13241, и *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированного как DSM 15954.

31. Композиция по любому из пп. 28-30, где данная композиция содержит:

a) по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод; и

b) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированный как DSM 15954.

32. Композиция по любому из пп. 28-30, где данная композиция содержит:

a) по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод;

b) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированный как DSM 15954;

и

с) штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированный как ATCC 53103.

33. Композиция по любому из пп. 28-30, где данная композиция содержит:

а) по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод;

b) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированный как DSM 15954;

и

с) штамм *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированный как DSM 13241.

34. Композиция по любому из пп. 31-33, в которой по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, определяется как в п. 5, и в которой по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, определяется как в п. 6.

35. Композиция по любому из пп. 24-34, где данная композиция содержит от примерно  $6 \cdot 10^8$  КОЕ (колониеобразующие единицы)/г штамма *Streptococcus thermophilus* или меньше.

36. Композиция по любому из пп. 24-35, где данная композиция содержит примерно  $1 \cdot 10^7$  КОЕ/г штамма *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*.

37. Композиция по любому из пп. 24-36, где данная композиция содержит от  $1 \cdot 10^6$  до  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/г пробиотического штамма, предпочтительно от  $5 \cdot 10^6$  до  $5 \cdot 10^7$  КОЕ/г, более предпочтительно примерно  $1,2 \cdot 10^7$  КОЕ/г пробиотического штамма.

38. Композиция по любому из пп. 24-37, в которой нелактозный углевод присутствует в данной композиции в количестве меньше, чем 0,9%, предпочтительно в количестве меньше, чем 0,7%, даже более предпочтительно в количестве меньше, чем 0,5%, например, примерно 0,41%, где % представляет собой массу на объем (% масс./об.) молочной основы.

39. Применение композиции, как определено по любому из пп. 24-38, для увеличения числа пробиотических клеток в ферментированном молочном продукте по

сравнению с ферментированным молочным продуктом, ферментированным композицией, содержащей

а) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*, который не является лактозодефицитным, и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который не является лактозодефицитным; и/или

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

2) один или более чем один нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (1), где данный(ные) нелактозный(ные) углевод(ды) присутствует(ют) в композиции в количестве, отмеренном таким образом, что он(они) истощается(ются) при рН ферментированного молочного продукта меньше 4,9,

предпочтительно где данный ферментированный молочный продукт содержит по меньшей мере  $2E+08$  КОЕ жизнеспособных пробиотических клеток/г ферментированного молочного продукта, предпочтительно по меньшей мере  $4E+08$  КОЕ жизнеспособных пробиотических клеток/г ферментированного молочного продукта, даже более предпочтительно по меньшей мере  $5,5E+08$  КОЕ, например,  $5,7E+08$  КОЕ жизнеспособных пробиотических клеток/г ферментированного молочного продукта после 60-суточного срока годности (хранения) при  $4^{\circ}C$ .

#### **ДЕПОНИРОВАНИЯ И ЭКСПЕРТНОЕ РЕШЕНИЕ**

Заявитель испрашивает, чтобы доступность депонированного микроорганизма, на которую дается ссылка в Правиле 33 ЕРС, осуществлялась только посредством выдачи образца независимому эксперту, назначенному подателем запроса (Правило 32(1) ЕРС).

Штамм *Streptococcus thermophilus*, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под № доступа DSM 28952.



Штамм *Streptococcus thermophilus*, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под № доступа DSM 28953.

Штамм *Streptococcus thermophilus*, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 22.08.2017 г. под № доступа DSM 32599.

Штамм *Streptococcus thermophilus*, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 22.08.2017 г. под № доступа DSM 32600.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под № доступа DSM 28910;

Штамм *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg. 1b, D-38124 Braunschweig, 30.09.2003 г. под № доступа DSM 15954;

Штамм *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированный в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg. 1b, D-38124 Braunschweig, 30.09.2003 г. под № доступа DSM 13241.

Данные депонирования были сделаны заявителем CHR. HANSEN A/S согласно Будапештскому соглашению по международному признанию депонирования микроорганизмов в целях патентной процедуры.

### **ТОВАРНЫЕ ЗНАКИ**

BB-12<sup>®</sup> представляет собой зарегистрированный товарный знак Chr. Hansen.

LGG<sup>®</sup> представляет собой зарегистрированный товарный знак Chr. Hansen.

LA-5<sup>®</sup> представляет собой зарегистрированный товарный знак Chr. Hansen.

YoFlex<sup>®</sup> представляет собой зарегистрированный товарный знак Chr. Hansen.

Acidifix<sup>®</sup> представляет собой зарегистрированный товарный знак Chr. Hansen.

### **ПРИМЕРЫ**

#### **ПРИМЕР 1**

Целью данного примера является сравнение эффекта заквасочной культуры молочнокислых бактерий на число клеток пробиотических культур BB-12<sup>®</sup>, LGG<sup>®</sup> и/или LA-5<sup>®</sup>, где данная заквасочная культура содержит по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен

метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями заквасочной культуры, как определено выше, где данный нелактозный углевод присутствует в композиции в количестве, отмеренном таким образом, что он истощается при pH ферментированного молочного продукта около 5,3.

#### **Заквасочные культуры**

**Acidifix<sup>®</sup>**: лактозодефицитная культура, содержащая по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (ST) и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* (LB), который имеется в продаже как “F-DVS YoFlex<sup>®</sup> Acidifix<sup>®</sup> 1.0” от Chr. Hansen A/S. Данные штаммы выделяли, как описано, например, в Примере 1 EP 2957180.

**YoFlex<sup>®</sup> Mild 1.0**: имеющаяся в продаже лактозопозитивная йогуртовая культура, содержащая лактозопозитивные штаммы *Streptococcus thermophilus* и лактозопозитивные штаммы *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*. Имеющийся в продаже штамм F-DVS (замороженный для прямого внесения (DVS), концентрированная замороженная культура) YoFlex<sup>®</sup> Mild 1.0 от Chr. Hansen A/S. F-DVS YoFlex<sup>®</sup> Mild 1.0 имеется в продаже у Chr. Hansen A/S, GIN 702897.

#### **Пробиотические культуры**

**LGG<sup>®</sup>**: штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированный как ATCC 53103.

**BB-12<sup>®</sup>**: штамм *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированный как DSM 15954.

**LA-5<sup>®</sup>**: *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированный как DSM 13241.

#### **Культуральные композиции**

Для проведения анализа использовали приведенные выше пробиотические штаммы: *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup> и *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>. Их объединяли с F-DVS YoFlex<sup>®</sup> Acidifix<sup>®</sup> 1.0, которая состоит из штаммов Lac(-) ST и Lac (-) LB, как указано выше. В качестве контролей использовали лактоза (+) йогуртовую культуру F-DVS YoFlex<sup>®</sup> Mild<sup>®</sup> 1.0, как описано выше, плюс BB-12<sup>®</sup> и одну F-DVS BB-12<sup>®</sup> без йогуртовой культуры.

Инокуляционная матрица («комбинация культуры») показана в Таблице 1 ниже.

	Молочная основа	F-DVS Acidifix <sup>®</sup> 1.0	F-DVS YF Mild 1.0	F-DVS BB-12 <sup>®</sup>	F-DVS LA-5 <sup>®</sup>	FD-DVS LGG <sup>®</sup>	примечание
A	Молоко +0,41% сахарозы	0,01%		0,01%		0,001%	
B	Молоко +0,41% сахарозы	0,01%		0,01%			
C	Молоко +0,41% сахарозы	0,01%		0,01%	0,01%		
D	Молоко +0,90% сахарозы	0,01%		0,01%			
E	Молоко +0,41% сахарозы		0,01%	0,01%			контроль
F	Молоко +0,41% сахарозы			0,02%			контроль

**Таблица 1.** Инокуляционная матрица. % Инокуляции относится к массе на объем (масс./об.) общего количества молочной основы. % Количества сахарозы приводится в виде (масс./об.) на основе молочной основы.

При инокуляции F-DVS Acidifix<sup>®</sup> 1.0 (F-DVS YoFlex<sup>®</sup> Acidifix<sup>®</sup> 1.0) или F-DVS YF Mild 1.0 (F-DVS YoFlex<sup>®</sup> Mild 1.0) при содержании 0,01% число клеток ST и LB при инокуляции (перед ферментацией) составляло 1,2-1,3E+07 КОЕ/мл. Число клеток BB-12<sup>®</sup> при инокуляции при содержании 0,01% F-DVS составляло 1,2E+07 КОЕ/мл. Число клеток LA-5<sup>®</sup> при инокуляции при содержании 0,01% F-DVS составляло 7E+06 КОЕ/мл. Число клеток LGG<sup>®</sup> при инокуляции при содержании 0,001% (FD-DVS) составляло 7E+06 КОЕ/мл.

Культуры анализировали в молоке с 2% по массе жира и добавленным сухим сепарированным молоком для стандартизации до 4,1% по массе белка (молочная основа). Сахарозу добавляли до содержания 0,41% или 0,90% (где % представляет собой (масс./об.) на основе молочной основы) для обеспечения закисления до примерно pH 5,3 и 4,55 соответственно. Молочную основу обрабатывали нагреванием при 92°C в течение 3 мин, охлаждали до 38°C и инокулировали, как описано. Молоко инкубировали при 38°C. Профиль закисления отслеживали посредством оборудования для измерения pH в реальном времени (CINAC) в течение 20-24 ч.

Ферментацию прекращали при pH 4,55, пробиотические йогурты охлаждали до 4°C и выдерживали при 4°C на протяжении срока годности (хранение). Число клеток определяли посредством подсчета на чашке в сутки 1, 15, 30, 45 и 60.

Теоретически наибольшее число клеток достигается посредством культивирования одного штамма. Однако пробиотические штаммы отбирают на основе

способности выживать в человеческом желудочно-кишечном тракте, способности прикрепляться к кишечной слизистой и специфичному полезному влиянию на здоровье. Они имеют другую метаболическую активность, чем молочнокислые бактерии, которые используются для закисления молока и производства йогурта и других ферментированных молочных продуктов. Поскольку это не является их первичной функцией, пробиотические штаммы, например BB-12<sup>®</sup> и LGG<sup>®</sup>, не являются хорошо адаптированными для роста в молоке, таким образом, не способны его эффективно закислять. Они не способны расти и закислять молоко до pH меньше 6,1 и 5,8, соответственно, за 24 ч, см. Фиг. 1.

Значительно большее число пробиотических клеток достигается при использовании комбинации пробиотиков с F-DVS YoFlex<sup>®</sup> Acidifix<sup>®</sup> 1.0, т.е. Lac(-) штаммов ST и LB, см. Фиг. 2. Комбинации культуры инокулировали в молоко, дополненное как раз достаточным количеством сахарозы для обеспечения закисления до pH примерно 5,30.

Как показано на Фиг. 2, имеются две фазы закисления. Первая фаза соответствует закислению до pH около 5,30. Это обусловлено ростом Lac(-) штаммов ST и LB (F-DVS YoFlex<sup>®</sup> Acidifix<sup>®</sup> 1.0). Вторая фаза закисления от 5,30 до 4,55 или меньше обусловлена только ростом пробиотических штаммов, например, *Bifidobacterium* BB-12<sup>®</sup> с или без LA-5<sup>®</sup> или LGG<sup>®</sup>. Данные пробиотические штаммы способны метаболизировать лактозу, присутствующую в молоке, и продолжать ферментацию (закисление), пока не достигается желательный pH, например, 4,55. В данный момент молоко охлаждают для прекращения дальнейшего закисления.

В Таблице 2 показано время, требующееся каждой из проанализированных культур, для достижения pH 4,55. На Фиг. 3 показаны профили закисления Acidifix<sup>®</sup> 1.0 плюс 0,01% BB-12<sup>®</sup> в молоке с 0,41% (B) и 0,90% сахарозы (D). % Количества сахарозы приводится как (масс./об.) на основе молочной основы, как описано выше.

	Комбинация культуры	минуты	часы
A	Acidifix <sup>®</sup> 1.0 (сахароза добавлена для закисления до pH 5,30) плюс BB-12 <sup>®</sup> плюс LGG <sup>®</sup>	1000	16,7
B	Acidifix <sup>®</sup> 1.0 (сахароза добавлена для закисления до pH 5,30) плюс BB-12 <sup>®</sup>	1138	19
C	Acidifix <sup>®</sup> 1.0 (сахароза добавлена для закисления до pH 5,30) плюс BB-12 <sup>®</sup> плюс LA-5 <sup>®</sup>	668	11,1

D	Acidifix® 1.0 (сахароза добавлена для закисления до pH 4,55) плюс BB-12®	528	8,8
E	Mild 1.0 (Лас (+) йогуртовая культура) плюс BB-12®	450	7,5
F	BB-12®	н/д (не-доступно)	н/д

**Таблица 2: время до pH 4,55**

Комбинация F-DVS YoFlex® Acidifix® 1.0 (т.е. лактозодефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* (ST) и лактозодефицитного штамма *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* (LB)), которая была разработана для остановки закисления при pH около 5,30, с пробиотиками приводила к большему числу пробиотических клеток, например, 1,4-9,6E+08 КОЕ жизнеспособных клеток пробиотических бактерий/г ферментированного молочного продукта (КОЕ/г) *Bifidobacterium* BB-12®, 2,4-4,6E+08 КОЕ/г *L. acidophilus* LA-5® и 2,7-4,3E+08 КОЕ/г *L. rhamnosus* LGG®. Число клеток всех пробиотиков было выше, чем типично наблюдаемое в пробиотическом ферментированном молоке, и данное число было более стабильным на протяжении срока годности 60 суток.

При ферментации с использованием Acidifix® 1.0 в молоке с ограниченными уровнями сахарозы (0,41%, т.е. задуманными для остановки закисления при pH около 5,30) (комбинация культуры А, В и С) число клеток BB-12® было почти на 1 log больше, чем то, которое типично достигается с комбинации с йогуртовой культурой (лас+), см. Таблицу 3 ниже.

A	Acidifix® 1.0+ BB-12® +LGG®	C1 (сутки 1)	C15	C30	C45	C60
	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12®	6,00E+08	8,90E+08	9,60E+08	6,1E+08	5,70E+08
	<i>L. rhamnosus</i> LGG®	4,30E+08	3,10E+08	2,80E+08	2,7E+08	2,80E+08
B	Acidifix® 1.0+BB-12®					
	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12®	5,20E+08	4,30E+08	3,80E+08	3,60E+08	4,40E+08
C	Acidifix® 1.0 + BB-12® + LA-5®					
	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12®	2,20E+08	2,10E+08	1,40E+08	2,20E+08	2,20E+08
	<i>L. acidophilus</i> LA-5®	2,70E+08	2,40E+08	4,60E+08	2,80E+08	3,10E+08
D	Acidifix® 1.0+BB-12® pH 4,55					
	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12®	1,30E+08	9,90E+07	9,20E+07	1,10E+08	7,40E+07

E	Mild 1.0 +BB-12 <sup>®</sup>					
	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12 <sup>®</sup>	1,20E+08	9,20E+07	8,90E+07	7,10E+07	6,60E+07
F	BB-12 <sup>®</sup>					
	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12 <sup>®</sup>	1,20E+07				

**Таблица 3:** число клеток (КОЕ/г ферментированного молочного продукта) на протяжении срока годности 60 суток, определенное селективным подсчетом на чашках с агаром.

При дополнении молочной основы 0,9% сахарозы, которая, как подсчитано, обеспечивает закисление до pH 4,55 (переменная D), Acidifix<sup>®</sup> 1.0 плюс BB-12<sup>®</sup> работала аналогично лактоза (+) йогуртовой культуре YoFlex<sup>®</sup> Mild 1.0 плюс BB-12<sup>®</sup> (переменная E). Число клеток BB-12<sup>®</sup> при обеих переменных, при которых лактозодефицитному *Streptococcus thermophilus* (ST) и лактозодефицитной *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* (LB) давали закислять до 4,55, было сравнимым и варьировало около 1,2-1,3+08 КОЕ/г. Число клеток BB-12<sup>®</sup> при инокуляции без йогуртовой культуры (переменная F) не возрастало, оно составляло около 1,2E+07 КОЕ/г, что по существу соответствует числу клеток в инокуляте.

#### **Улучшенное выживание на протяжении срока годности**

Также анализировали число клеток на протяжении 60 суток, что является типичным сроком годности свежих ферментированных молочных продуктов в Северной Америке и некоторых других регионах в мире. На протяжении срока годности в типичном пробиотическом йогурте число клеток *Bifidobacterium* BB-12<sup>®</sup> обычно снижается от 0,5-1 log за 60 суток, в зависимости от йогуртовой культуры, молочной основы, культивирования и условий хранения. Число клеток LA-5<sup>®</sup> типично снижается от 1-2 log за 60 суток срока годности. При совместном культивировании с Acidifix<sup>®</sup> 1.0 (рост ограничен pH около 5,30) число клеток пробиотиков BB-12<sup>®</sup>, LA-5<sup>®</sup> и LGG<sup>®</sup> было на 0,5-1 log выше, чем типично наблюдаемое и также демонстрировало превосходную стабильность на протяжении срока годности (60 суток).

PCT

(Оригинал в электронной форме)

0-1	<b>Форма PCT/RO/134</b> Указания, относящиеся к депонированному(ным) микроорганизму(мам) или к другому биологическому материалу (Правило PCT 13бис)	
0-1-1	Получены с использованием	Заполнение онлайн PCT Версия 3.51.000.266e MT/FOR 20141031/0.20.5.20
0-2	Международная заявка №	
0-3	Ссылка на файл заявителя или агента	P6473PC00
1	Указания, сделанные ниже, относятся к депонированному(ным) микроорганизму(мам) или к другому биологическому материалу, на который дается ссылка в описании на:	
1-1	странице	53
1-2	строке	27
1-3	<b>Идентификация депозита</b>	
1-3-1	Название депозитного института	DSM Leibniz Institute DSMZ – Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур
1-3-2	Адрес депозитного института	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Дата депонирования	12 июня 2014 г. (12.06.2014)
1-3-4	Номер доступа	DSM 28952
1-4	Дополнительные указания	Образец подлежит выдаче только эксперту
1-5	Указанные страны, для которых делаются указания	Все указанные
2	Указания, сделанные ниже, относятся к депонированному(ным) микроорганизму(мам) или к другому биологическому материалу, на который дается	

<b>2-1</b>	<b>ссылка в описании на:</b>	
<b>2-1</b>	<b>странице</b>	<b>54</b>
<b>2-2</b>	<b>строке</b>	<b>1</b>
<b>2-3</b>	<b>Идентификация депозита</b>	
2-3-1	Название депозиторного института	<b>DSM Leibniz Institute DSMZ – Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур</b>
2-3-2	Адрес депозиторного института	<b>Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany</b>
2-3-3	Дата депонирования	<b>12 июня 2014 г. (12.06.2014)</b>
2-3-4	Номер доступа	<b>DSM 28953</b>
<b>2-4</b>	<b>Дополнительные указания</b>	<b>Образец подлежит выдаче только эксперту</b>
<b>2-5</b>	<b>Указанные страны, для которых делаются указания</b>	<b>Все указанные</b>
<b>3</b>	<b>Указания, сделанные ниже, относятся к депонированному(ным) микроорганизму(мам) или к другому биологическому материалу, на который дается ссылка в описании на:</b>	
<b>3-1</b>	<b>странице</b>	<b>54</b>
<b>3-2</b>	<b>строке</b>	<b>5</b>
<b>3-3</b>	<b>Идентификация депозита</b>	
3-3-1	Название депозиторного института	<b>DSM Leibniz Institute DSMZ – Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур</b>
3-3-2	Адрес депозиторного института	<b>Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany</b>
3-3-3	Дата депонирования	<b>22 августа 2017 г. (22.08.2017)</b>
3-3-4	Номер доступа	<b>DSM 32599</b>
<b>3-4</b>	<b>Дополнительные указания</b>	<b>Образец подлежит выдаче только эксперту</b>
<b>3-5</b>	<b>Указанные страны, для которых делаются указания</b>	<b>Все указанные</b>
<b>4</b>	<b>Указания, сделанные ниже, относятся к депонированному(ным) микроорганизму(мам) или к другому биологическому материалу, на который дается ссылка в описании на:</b>	
<b>4-1</b>	<b>странице</b>	<b>54</b>
<b>4-2</b>	<b>строке</b>	<b>10</b>



<b>4-3</b>	<b>Идентификация депозита</b>	
4-3-1	Название депозиторного института	<b>DSM Leibniz Institute DSMZ – Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур</b>
4-3-2	Адрес депозиторного института	<b>Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany</b>
4-3-3	Дата депонирования	<b>22 августа 2017 г. (22.08.2017)</b>
4-3-4	Номер доступа	<b>DSM 32600</b>
<b>4-4</b>	<b>Дополнительные указания</b>	<b>Образец подлежит выдаче только эксперту</b>
<b>4-5</b>	<b>Указанные страны, для которых делаются указания</b>	<b>Все указанные</b>
<b>5</b>	<b>Указания, сделанные ниже, относятся к депонированному(ным) микроорганизму(мам) или к другому биологическому материалу, на который дается ссылка в описании на:</b>	
<b>5-1</b>	<b>странице</b>	<b>54</b>
<b>5-2</b>	<b>строке</b>	<b>15</b>
<b>5-3</b>	<b>Идентификация депозита</b>	
5-3-1	Название депозиторного института	<b>DSM Leibniz Institute DSMZ – Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур</b>
5-3-2	Адрес депозиторного института	<b>Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany</b>
5-3-3	Дата депонирования	<b>12 июня 2014 г. (12.06.2014)</b>
5-3-4	Номер доступа	<b>DSM 28910</b>
<b>5-4</b>	<b>Дополнительные указания</b>	<b>Образец подлежит выдаче только эксперту</b>
<b>5-5</b>	<b>Указанные страны, для которых делаются указания</b>	<b>Все указанные</b>
<b>6</b>	<b>Указания, сделанные ниже, относятся к депонированному(ным) микроорганизму(мам) или к другому биологическому материалу, на который дается ссылка в описании на:</b>	
<b>6-1</b>	<b>странице</b>	<b>54</b>
<b>6-2</b>	<b>строке</b>	<b>19</b>
<b>6-3</b>	<b>Идентификация депозита</b>	
6-3-1	Название депозиторного института	<b>DSM Leibniz Institute DSMZ – Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур</b>

6-3-2	Адрес депозиторного института	культур Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany
6-3-3	Дата депонирования	30 сентября 2003 г. (30.09.2003)
6-3-4	Номер доступа	DSM 15954
6-4	Дополнительные указания	Образец подлежит выдаче только эксперту
6-5	Указанные страны, для которых делаются указания	Все указанные
7	Указания, сделанные ниже, относятся к депонированному(ным) микроорганизму(мам) или к другому биологическому материалу, на который дается ссылка в описании на:	
7-1	странице	54
7-2	строке	21
7-3	Идентификация депозита	
7-3-1	Название депозиторного института	DSM Leibniz Institute DSMZ – Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур
7-3-2	Адрес депозиторного института	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany
7-3-3	Дата депонирования	30 сентября 2003 г. (30.09.2003)
7-3-4	Номер доступа	DSM 13241
7-4	Дополнительные указания	Образец подлежит выдаче только эксперту
7-5	Указанные страны, для которых делаются указания	Все указанные

**ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ТОЛЬКО ПОЛУЧАЮЩИМ ОФИСОМ**

0-4	Данная форма была получена с международной заявкой: (да или нет)	
0-4-1	Уполномоченное должностное лицо	

**ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ТОЛЬКО МЕЖДУНАРОДНЫМ БЮРО**

0-5	Данная форма была получена международным бюро:	
0-5-1	Уполномоченное должностное лицо	

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения ферментированного молочного продукта, включающий следующие стадии:

1) добавление в молочную основу:

а) заквасочной культуры молочнокислых бактерий, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, предпочтительно *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод;

б) одного или более чем одного нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(ые) нелактозный(ые) углевод(ы) добавляются в количестве, отмеренном таким образом, чтобы он(и) истощался(лись) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; и

с) пробиотического штамма, выбранного из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*;

2) ферментирование данной молочной основы в течение некоторого периода времени до достижения целевого рН, с получением ферментированного молочного продукта.

2. Способ по п. 1, где нелактозный(е) углевод(ы) выбран(ы) из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы.

3. Способ по любому из пп. 1-2, где целевой рН на стадии (2) составляет от примерно 4,8 до примерно 4,0, предпочтительно от примерно 4,6 до примерно 4,55, более предпочтительно примерно 4,55.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из:

(а) (1) штамма, депонированного в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под номером доступа DSM 28952;

(2) штамма, происходящего от DSM 28952, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(b) (1) штамма, депонированного в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под номером доступа DSM 28953;

(2) штамма, происходящего от DSM 28953, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(c) (1) штамма, депонированного в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 22.08.2017 г. под номером доступа DSM 32599;

(2) штамма, происходящего от DSM 32599, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal; и

(d) (1) штамма, депонированного в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 22.08.2017 г. под номером доступа DSM 32600; и

(2) штамма, происходящего от DSM 32600, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

**5.** Способ по любому из пп. 1-4, где лактозодефицитный штамм *Lactobacillus* представляет собой штамм *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, выбранный из группы, состоящей из:

(1) штамма, депонированного в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 12.06.2014 г. под номером доступа DSM 28910; и

(2) штамма, происходящего от DSM 28910, где данный производный штамм дополнительно отличается наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

**6.** Способ по любому из пп. 1-5, где пробиотический штамм *Lactobacillus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus*, штамма *Lactobacillus paracasei* и штамма *Lactobacillus acidophilus*, и/или где пробиотический штамм *Bifidobacterium* выбран из группы, состоящей из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* и *Bifidobacterium infantis*.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где пробиотический штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированного как ATCC 53103, штамма *Lactobacillus paracasei* L. casei 431<sup>®</sup>, депонированного как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированного как DSM 13241, и *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированного как DSM 15954.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где пробиотический штамм, добавленный в молочную основу на стадии (1с), содержит штамм *Bifidobacterium*, предпочтительно пробиотический штамм *Bifidobacterium*, выбранный из группы, состоящей из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* и *Bifidobacterium infantis*, более предпочтительно *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированный как DSM 15954.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где стадия (1) включает добавление в молочную основу:

а) по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере одного лактозодефицитного штамма *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод;

б) нелактозного углевода, способного метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный нелактозный углевод добавляют в количестве, отмеренном таким образом, что он истощается при pH ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3; и

с) (1) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированного как DSM 15954;

или

(2) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированного как DSM 15954, и штамма *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированного как ATCC 53103; или

(3) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированного как DSM 15954, и штамма *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированного как DSM 13241.

**10.** Способ по п. 9, где по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, определен как в п. 4, и где по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, определен как в п. 5.

**11.** Ферментированный молочный продукт, полученный способом по пп. 1-10.

**12.** Пищевой или кормовой продукт, содержащий по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*, где данный пищевой или кормовой продукт содержит  $1,3E+08$  КОЕ(колониеобразующая единица) жизнеспособных клеток пробиотических бактерий/г ферментированного молочного продукта (КОЕ/г) или более, предпочтительно  $2E+08$  КОЕ/г или более, более предпочтительно  $5E+08$  КОЕ/г или более по меньшей мере одного из пробиотических штаммов, присутствующих в пищевом или кормовом продукте, в момент времени, который составляет по меньшей мере 1 сутки после завершения ферментации, как определено в подпункте (2) п. 1, где данный пищевой или кормовой продукт хранили при примерно  $4^{\circ}\text{C}$  после завершения ферментации.

**13.** Пищевой или кормовой продукт по п. 12, который представляет собой ферментированный молочный продукт, предпочтительно ферментированный молочный напиток, более предпочтительно йогурт.

**14.** Пищевой или кормовой продукт по любому из пп. 12-13, где лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой штамм, как определено в п. 4; и/или где лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* представляет собой штамм, как определено в п. 5; и/или где пробиотический штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus* LGG<sup>®</sup>, депонированного как ATCC 53103, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, депонированного как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup>, депонированного как DSM 13241, и *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, депонированного как DSM 15954.

**15.** Композиция для получения ферментированного молочного продукта, содержащая:

а) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus*, предпочтительно *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод; и

б) один или более чем один нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (а), где данный(е) нелактозный(е) углевод(ы) присутствует(ют) в композиции в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются) при рН ферментированного молочного продукта от 4,9 до 5,5, например от 5,0 до 5,4, предпочтительно примерно 5,3.

**16.** Композиция по п. 15, где лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой штамм, как определено в п. 4; и/или где лактозодефицитный штамм *Lactobacillus* представляет собой штамм *L. delbrueckii* подв. *bulgaricus*, как определено в п. 5.

**17.** Композиция по любому из пп. 15-16, дополнительно содержащая пробиотический штамм, выбранный из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus* и штамма *Bifidobacterium*.

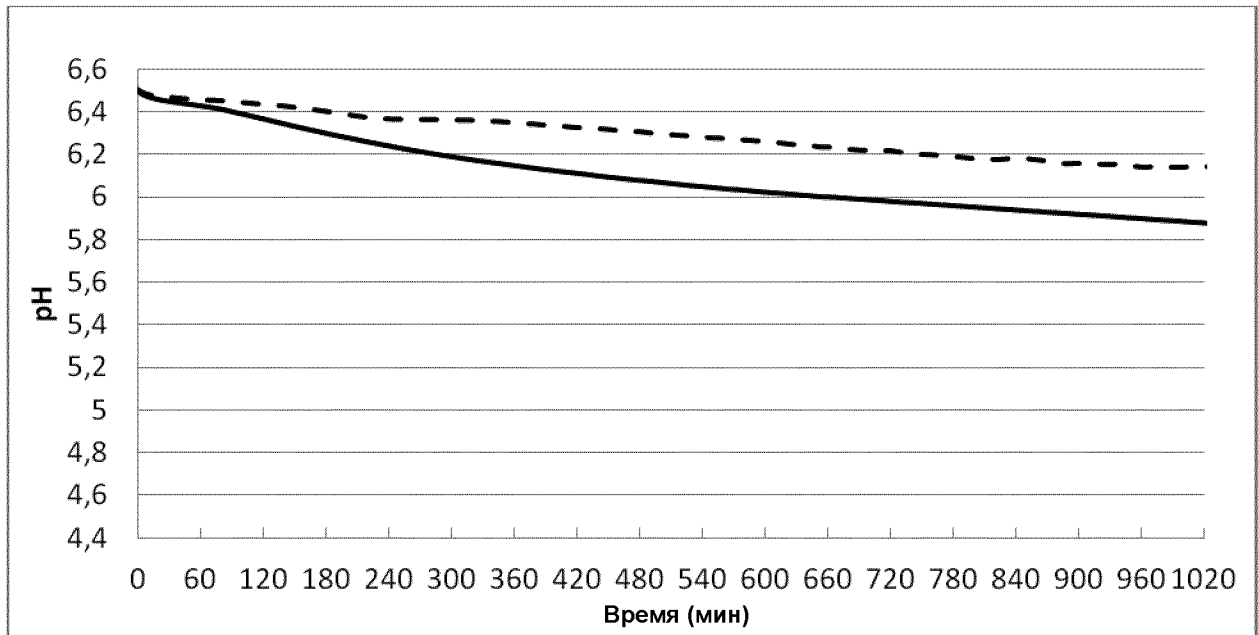
**18.** Применение композиции, как определено в любом из пп. 15-17, для увеличения числа жизнеспособных пробиотических клеток в ферментированном молочном продукте по сравнению с ферментированным молочным продуктом, ферментированным композицией, содержащей

а) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*, который не является лактозодефицитным, и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который не является лактозодефицитным; и/или

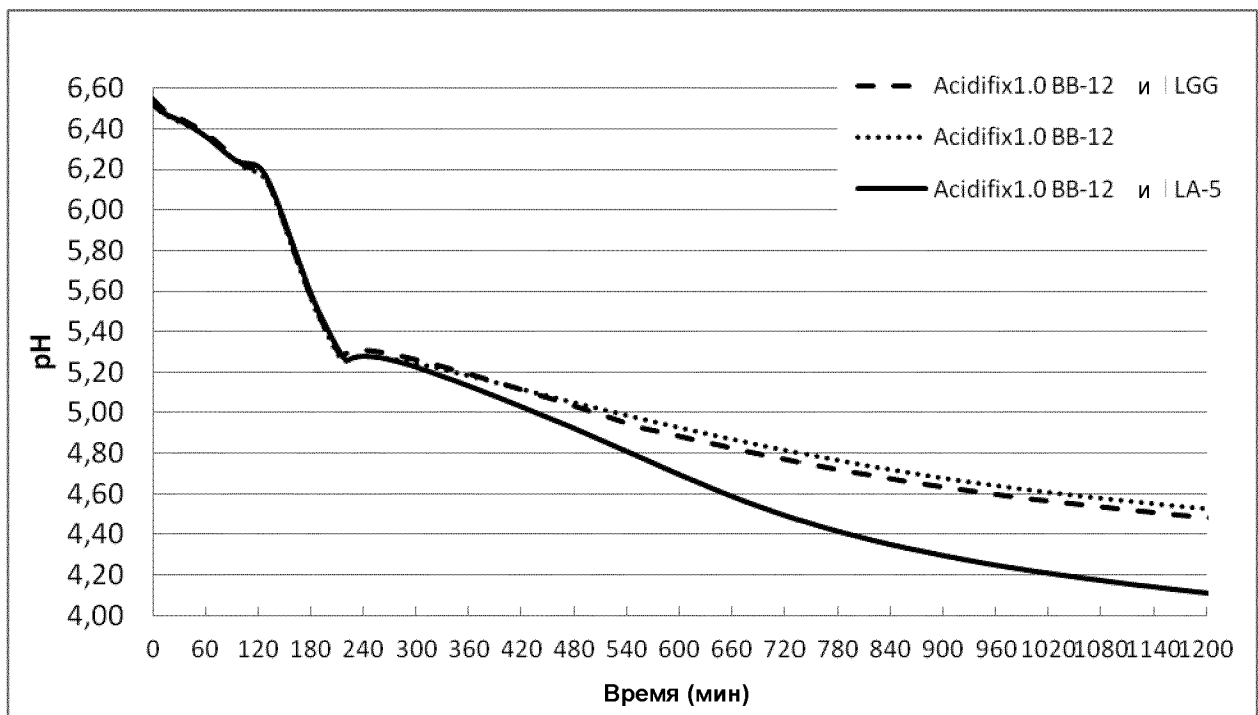
б) 1) заквасочную культуру молочнокислых бактерий, содержащую по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, который способен метаболизировать нелактозный углевод, и по меньшей мере один лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus*, который способен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

2) один или более чем один нелактозный углевод, способный метаболизироваться молочнокислыми бактериями, как определено в (1), где данный(е) нелактозный(е) углевод(ы) присутствует(ют) в композиции в количестве, отмеренном таким образом, что он(и) истощается(ются) при рН ферментированного молочного продукта менее 4,9.

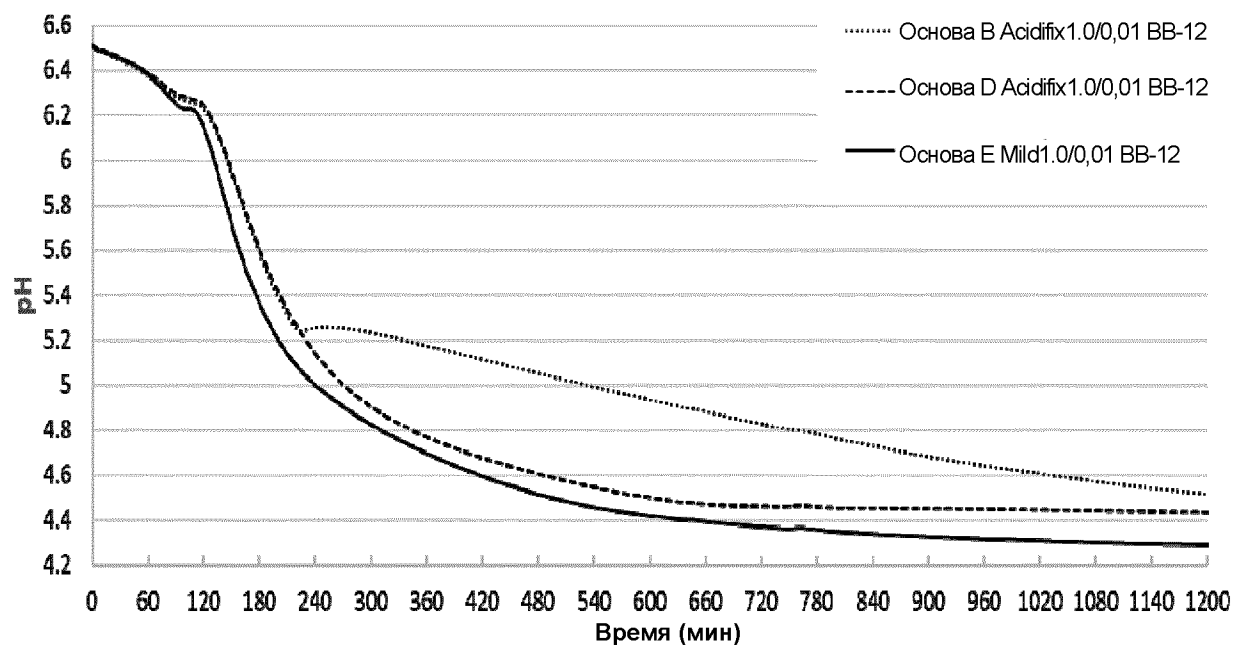




ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3