

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290472** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.02

(22) Дата подачи заявки
2020.08.21

(51) Int. Cl. **C07K 14/195** (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)

(54) ТЕКСТУРИРУЮЩИЕ L. LACTIS C NIZO B40-ПОДОБНЫМИ КЛАСТЕРАМИ ГЕНОВ EPS

(31) 19193319.1; 19193321.7; 19193323.3;
19193335.7; 19193336.5; 19193318.3

(32) 2019.08.23

(33) EP

(86) PCT/EP2020/073535

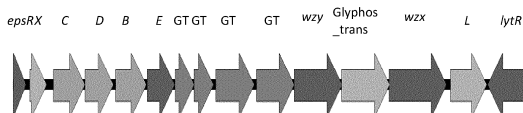
(87) WO 2021/037747 2021.03.04

(71) Заявитель:
КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:
**Польсен Вера Кузина, Оэрегорд
Гуннар, Могхадам Элахе Гханей (DK)**

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

(57) В настоящем изобретении предложены новые штаммы молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, обладающие улучшенными текстурирующими свойствами, и способы применения указанных штаммов для получения пищевых продуктов.



202290472

A1

A1

202290472

PCT/EP2020/073535

МПК: C07K 14/195 (2006.01) C12N 9/14 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01) C12R 1/46 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

ТЕКСТУРИРУЮЩИЕ *L. LACTIS* С NIZO В40-ПОДОБНЫМИ КЛАСТЕРАМИ ГЕНОВ EPS

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым штаммам молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, обладающих улучшенными текстурирующими свойствами. Настоящее изобретение также относится к способам применения штаммов для получения пищевых продуктов и к пищевым продуктам, содержащим штаммы.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Молочнокислые бактерии (LAB) широко применяются в пищевой промышленности для ферментации пищевых продуктов. Превращение свежего молока в ферментированное молоко при помощи LAB позволяет увеличить сроки хранения молока, а также создать новый вкус и текстуру.

Таким образом, важные характеристики штаммов, используемых для ферментации молока, включают быстрое закисление, стабильное (отсутствующее/низкое) пост-закисление, обеспечение длительного срока годности и хорошей текстуры. Хорошая текстура обычно представляет собой выраженную густоту в полости рта и вязкость (измеряемую при помощи реометра как высокое напряжение сдвига) и высокую плотность геля.

Некоторые штаммы LAB значительно способствуют улучшению текстуры благодаря их способности производить экзо- (или внеклеточные) полисахариды (EPS), которые могут быть капсульными (оставаться присоединенными к клетке в форме капсулы) или секретироваться в среду. EPS состоят либо из сахаров одного типа (гомо-экзополисахариды), либо из повторяющихся звеньев, построенных из различных сахаров (гетеро-экзополисахариды). EPS-производящие LAB представляют интерес, поскольку EPS действуют как естественные загустители и улучшители текстуры ферментированных продуктов. Более того, обладающие определенными реологическими свойствами EPS, образованные пригодными для применения в пищевой промышленности LAB, представляют потенциальный интерес для разработки и

применения в качестве пищевых добавок. Известно, что EPS улучшают реологические свойства ферментированных LAB продуктов, влияя на вязкость, синерезис, плотность и органолептические свойства. Основные структурные характеристики (тип и конфигурация моносахарида, гликозидная связь, несахарные элементы, заряд), конформация и молекулярная масса, количество полисахарида и взаимодействие полисахарида с другими компонентами системы - все это факторы, которые могут способствовать и влиять на указанные техно-функциональные свойства (Zeidan *et al.*, 2017).

Ферментированное молоко можно производить с применением мезофильных LAB, например, *Lactococcus* sp. для получения, например, простокваши, или термофильных LAB, например, *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* для йогурта. Такие молочные продукты, как молодой сыр, пахта, простокваша и сметана, полученные с применением мезофильных стартерных культур, таких как *Lactococcus lactis*, пользуются высокой популярностью у потребителей. Кроме того, растет рынок продуктов, являющихся альтернативой молочным, где могут играть роль *L. lactis*, осуществляющие ферментацию исходных продуктов растительного происхождения. Растет спрос со стороны потребителей с непереносимостью лактозы и аллергией на молоко, а также потребителей, беспокоящихся о наличии гормонов и холестерина в коровьем молоке, заботящихся о благополучии животных и влиянии продуктов животного происхождения на окружающую среду. Кроме того, вегетарианская диета считается более здоровой, чем диета, основанная на потреблении мяса (Tangyu *et al.*, 2019).

WO 2017/108679 относится к новому штамму *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 29291, обладавшему наибольшим напряжением сдвига из восьми различных протестированных штаммов *L. lactis* subsp. *lactis*, как по результатам полного мониторинга аспирации и дозирования (TADM), так и по показаниям реометра (см. Пример 1 и Фиг. 1 из WO 2017/108679).

Поскольку для ферментированных молочных продуктов применяются мезофильные культуры, и текстура является важным показателем, существует потребность в дополнительных текстурирующих мезофильных штаммах, в частности, в улучшенных текстурирующих мезофильных штаммах, например, текстурирующих штаммах *Lactococcus lactis*.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение относится к штамму молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, содержащему активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* выбран из:

- (i) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1;
- (ii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2;
- (iii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3;
- (iv) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, и
- (v) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 5 нуклеотидов от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5,

где штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, охарактеризованный в SEQ ID NO: 1, принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76, где анализ MLST осуществляют, как описано в Примере 4 настоящего описания, то есть по схеме MLST с 12 генами, разработанной в компании Chr. Hansen. Указанная схема основана на двенадцати генах *dnaK*, *fusA*, *groEL*, *gyrA*, *gyrB*, *ileS*, *lepA*, *pheS*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* и *rpoC*, выбранных из корового генома *Lactobacillaceae* (Salveti *et al.*, 2018). Всего в схеме используется 22493 п.н., которые представляют почти 1% от среднего генома *Lactococcus*. MLST-типирование полных геномных последовательностей на платформе Illumina осуществляют при помощи модуля CLC Microbial Genomics, встроенного в CLC Genomics Workbench v10. MLST в рамках CLC входит в специально разработанный в Chr. Hansen процесс стандартного анализа геномных последовательностей. Его осуществляют как на контигах *de novo*, так и на эталонных сборках.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий по настоящему изобретению, описанный выше.

Предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий по настоящему изобретению, описанный выше, и по меньшей мере один дополнительный штамм молочнокислых бактерий (также обозначаемый «вспомогательным штаммом», или «содействующим закислению штаммом»), содержащим активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где дополнительный штамм молочнокислых бактерий («вспомогательный штамм», или «содействующий закислению штамм»), способен (i) генерировать ферментированное молоко с рН приблизительно 4,55 приблизительно за 15 часов или меньше, предпочтительно приблизительно за 12 часов или меньше, и способен (ii) генерировать ферментированное молоко, имеющее напряжение сдвига 40 Па или более, измеренное при скорости сдвига 300 с^{-1} , измеренное в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения рН 4,55 ((i) время достижения рН 4,55) с дальнейшим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} ((ii) напряжение сдвига), где температура инокуляции составляет 30°C .

Более предпочтительно композиция по второму аспекту настоящего изобретения содержит по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* по первому аспекту в комбинации с (а) штаммом молочнокислых бактерий, содержащим активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* содержит нуклеотидные последовательности (а), (b) и (с), (с1 - с4) как определено в (vi), или (б) штаммом молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащим активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* является таким, как определено в (vii):

(vi) (а): нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий полимеразной активностью и имеющий по меньшей мере 95% идентичности

аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 6955-8145 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе *wzy*);

(b): нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий активностью переносчика полисахаридов и имеющий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 9309-10727 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе *wzx*); и

(c): нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий гликозилтрансферазной (GT) активностью, содержащая:

(c1): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 4008-4478 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе GT1);

(c2): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 4478-4960 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе GT2);

(c3): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 5015-5965 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе GT3); и

(c4): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 6026-6955 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе GT4);

(vii) нуклеотидная последовательность, определенная в SEQ ID NO: 5.

Композиция по настоящему изобретению может содержать дополнительные компоненты, такие как криопротекторы, лиопротекторы, антиокислители, нутриенты, наполнители, корригенты или их смеси, как подробно описано ниже.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к применению штаммов молочнокислых бактерий по настоящему изобретению и/или композиции по настоящему изобретению для повышения вязкости (измеряемой как напряжение сдвига при скорости сдвига 300 c^{-1} , как описано в данном изобретении) ферментированного молочного продукта. Третий аспект дополнительно относится к применению штамма *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 25485 и/или штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 33192 для повышения вязкости (измеряемой как напряжение сдвига при скорости сдвига 300 c^{-1} , как описано в данном изобретении) ферментированного молочного продукта.

Ферментированный молочный продукт может представлять собой ферментированный молочный продукт на основе молока млекопитающих (т.е. ферментируемая молочная основа происходит от млекопитающих) или ферментированный молочный продукт на растительной основе (т.е. ферментируемая молочная основа имеет растительное происхождение, как соевое молоко).

В четвертом аспекте изобретение относится к способу получения пищевого продукта, включающего по меньшей мере одну стадию на которой применяют по меньшей мере один бактериальный штамм, описанный в первом аспекте настоящего изобретения, и/или композицию, описанную во втором аспекте настоящего изобретения. Настоящее изобретение дополнительно относится к пищевому продукту, содержащему по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий, описанный в первом аспекте настоящего изобретения, и/или композицию, описанную во втором аспекте настоящего изобретения. Пищевой продукт может содержать дополнительные компоненты, такие как загустители или стабилизаторы или их смеси, как подробно описано ниже.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения штамма молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* (LAB), включающему следующие стадии:

(a) предоставление штамма молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащего активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* выбран из:

- (i) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1;
- (ii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2;
- (iii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3;
- (iv) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, и
- (v) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 5 нуклеотидов от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5;

(b) скрининг в отношении штамма молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, который:

(i) способен генерировать ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига 40 Па или более, предпочтительно 50 Па или более, более предпочтительно 55 Па или более, еще более предпочтительно более чем 56 Па, например 60 Па, 61 Па, 62 Па, 63 Па, 64 Па, 65 Па, 66 Па, 67 Па, 68 Па, 69 Па, 70 Па, 75 Па, 80 Па, 85 Па, 86 Па, 87 Па, 88 Па, 89 Па, 90 Па, 95 Па, 98 Па, 100 Па, 105 Па, 110 Па, 115 Па, 120 Па или 121 Па или более, измеренным при скорости сдвига 300 с^{-1} , измеренным в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C ; и/или

(ii) способен генерировать ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига более 24 Па, таким как приблизительно 35 Па, 36 Па, 45 Па, 47 Па, 54 Па, 56 Па, 57 Па, 60 Па, 62 Па, 63 Па, 64 Па, 71 Па, 74 Па, 75 Па, 79 Па, 86 Па, 88 Па, 93 Па, 96 Па, 99 Па, 102 Па, 106 Па или более, измеренным при скорости сдвига 300 с^{-1} , измеренным в следующих условиях:

200 мл соевого молока с добавлением 2% глюкозы (как описано в Примере 2) инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH приблизительно 4,55 (такого как pH 4,49, 4,53, 4,54, 4,55 или 4,66) с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C . Напряжение сдвига измеряют, используя способ, указанный в Примере 2.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Кластер генов *eps* штамма *L. lactis cremoris* B40 (pNZ4000, GenBank AF036485). Использована номенклатура, предложенная Zeidan *et al.* (2017).

Фиг. 2. Показаны различия между штаммами. Для анализа использовали веб-приложение для визуализации многомерных данных ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) со стандартными параметрами. Для построения графиков использовали данные по закислению молока (минимальные значения pH, Vmax), способность штаммов расти на разных источниках углерода, текстурирующую способность, резистентность к фагам и данные по чувствительности к низину. (А) для расчета главных компонент использовали метод анализа главных компонент (РСА) «разложение по сингулярным значениям с подстановкой недостающих данных». К рядам применяли масштабирование до единичной дисперсии. По осям X и Y представлены главный компонент 1 и главный компонент 2, объясняющие 43,2% и 21,3% общей дисперсии, соответственно. N = 21 точек данных, представляющих штаммы. (В) Для построения тепловой карты ряды центрировали; к рядам применяли масштабирование до единичной дисперсии. Кластеризацию рядов и столбцов осуществляли с применением интервала корреляции и метода средней связи. 25 строк представляют различные эксперименты, 21 столбец представляет штаммы.

Фиг. 3. Схема эксперимента для характеристики штаммов по их текстурирующим, закисляющим молоко свойствам и предпочтениям к среде (например, источнику С) в формате 96-луночных планшетов для микротитрования. Молоко с добавлением индикатора pH ферментировали в планшетах для микротитрования, которые инкубировали в сканерах плоскостного типа при 30°C; дно планшетов сканировали каждые 6 мин и сопоставляли развитие окрашивания с изменениями pH молока (подробно описано Poulsen *et al.*, 2019). Текстурирующие свойства штаммов оценивали при помощи утилиты TADM (полного мониторинга аспирации и дозирования) автоматического устройства для работы с жидкостями Hamilton, при этом для оценки относительного напряжения сдвига образцов использовали кривые зависимости давления от времени, полученные при пипетировании образцов. Образцы с наиболее высоким относительным напряжением сдвига были представлены кривыми аспирации с наиболее низкими значениями давления (Па) или наибольшей площадью кривых (подробно описано Poulsen *et al.*, 2019). В отдельных образцах исследовали закисление молока до достижения pH 4,55 и измеряли напряжение сдвига в масштабе 200 мл. Измерение pH молока осуществляли при помощи электрода, а напряжение сдвига ферментированного молока измеряли при помощи реометра.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 представляет полную последовательность кластера генов *eps* штаммов *Lactococcus lactis* DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192.

SEQ ID NO:2 представляет полную последовательность кластера генов *eps* штаммов *Lactococcus lactis* DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203.

SEQ ID NO:3 представляет полную последовательность кластера генов *eps* штамма *Lactococcus lactis* DSM 33222.

SEQ ID NO:4 представляет полную последовательность кластера генов *eps* штамма *Lactococcus lactis* DSM 33225.

SEQ ID NO:5 представляет полную последовательность кластера генов *eps* штамма *Lactococcus lactis* DSM 33133.

SEQ ID NO:6 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsR* DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 1-318 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:7 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsX* DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 407-826 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:8 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsC* DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 993-1772 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:9 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsD* DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 1782-2477 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:10 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsB* DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219,

DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 2532-3296 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:11 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsE* DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 3318-3998 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:12 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT1) DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 4008-4478 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:13 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT2) DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 4478-4960 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:14 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT3) DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 5015-5965 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:15 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT4) DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 6026-6955 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:16 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *wzy* DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 6955-8145 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:17 представляет аминокислотную последовательность предполагаемого белка семейства глицерофосфотрансферазы (глифостранс) DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 8132-9322 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:18 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *wzx* DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 9309-10727 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:19 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsL* DSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 10825-11724 SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:20 представляет аминокислотную последовательность белка *lytR* DDSM 33204, DSM 33205, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193 и DSM 33192 (нуклеотиды 11749-12651 цепи, комплементарной SEQ ID NO: 1);

SEQ ID NO:21 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsR* DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 1-318 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:22 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsX* DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 407-826 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:23 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsC* DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 993-1772 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:24 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsD* DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 1782-2477 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:25 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsB* DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 2532-3296 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:26 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsE* DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 3318-3998 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:27 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT1) DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 4008-4478 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:28 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT2) DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 4478-4960 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:29 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT3) DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 5015-5965 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:30 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT4) DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 6026-6955 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:31 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *wzy* DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 6955-8145 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:32 представляет аминокислотную последовательность предполагаемого белка семейства глицерофосфотрансферазы (глифос_транс) DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 8132-9322 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:33 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *wzx* DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 9309-10727 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:34 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsL* DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 10825-11724 SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:35 представляет аминокислотную последовательность белка *lytR* DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202 и DSM 33203 (нуклеотиды 11749-12651 цепи, комплементарной SEQ ID NO: 2);

SEQ ID NO:36 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsR* DSM 33222 (нуклеотиды 1-318 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:37 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsX* DSM 33222 (нуклеотиды 407-826 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:38 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsC* DSM 33222 (нуклеотиды 993-1772 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:39 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsD* DSM 33222 (нуклеотиды 1782-2477 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:40 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsB* DSM 33222 (нуклеотиды 2532-3296 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:41 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsE* DSM 33222 (нуклеотиды 3318-3998 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:42 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT1) DSM 33222 (нуклеотиды 4008-4478 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:43 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT2) DSM 33222 (нуклеотиды 4478-4960 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:44 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT3) DSM 33222 (нуклеотиды 5015-5965 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:45 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT4) DSM 33222 (нуклеотиды 6026-6955 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:46 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *wzy* DSM 33222 (нуклеотиды 6955-8145 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:47 представляет аминокислотную последовательность предполагаемого белка семейства глицерофосфотрансферазы (глифос_транс) DSM 33222 (нуклеотиды 8132-9322 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:48 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *wzx* DSM 33222 (нуклеотиды 9309-10727 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:49 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsL* DSM 33222 (нуклеотиды 10825-11724 SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:50 представляет аминокислотную последовательность белка *lytR* DSM 33222 (нуклеотиды 11749-12651 цепи, комплементарной SEQ ID NO: 3);

SEQ ID NO:51 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsR* DSM 33225 (нуклеотиды 1-318 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:52 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsX* DSM 33225 (нуклеотиды 407-826 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:53 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsC* DSM 33225 (нуклеотиды 993-1772 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:54 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsD* DSM 33225 (нуклеотиды 1782-2477 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:55 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsB* DSM 33225 (нуклеотиды 2532-3296 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:56 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsE* DSM 33225 (нуклеотиды 3318-3998 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:57 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT1) DSM 33225 (нуклеотиды 4008-4478 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:58 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT2) DSM 33225 (нуклеотиды 4478-4960 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:59 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT3) DSM 33225 (нуклеотиды 5015-5965 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:60 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT4) DSM 33225 (нуклеотиды 6026-6955 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:61 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *wzy* DSM 33225 (нуклеотиды 6955-8145 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:62 представляет аминокислотную последовательность предполагаемого белка семейства глицерофосфотрансферазы (глифос_транс) DSM 33225 (нуклеотиды 8132-9322 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:63 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *wzx* DSM 33225 (нуклеотиды 9309-10727 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:64 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsL* DSM 33225 (нуклеотиды 10825-11724 SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:65 представляет аминокислотную последовательность белка *lytR* DSM 33225 (нуклеотиды 11749-12651 цепи, комплементарной SEQ ID NO: 4);

SEQ ID NO:66 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsR* DSM 33133 (нуклеотиды 1-318 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:67 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsX* DSM 33133 (нуклеотиды 407-826 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:68 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsC* DSM 33133 (нуклеотиды 993-1772 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:69 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsD* DSM 33133 (нуклеотиды 1782-2477 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:70 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsB* DSM 33133 (нуклеотиды 2532-3296 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:71 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsE* DSM 33133 (нуклеотиды 3318-3998 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:72 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT1) DSM 33133 (нуклеотиды 4008-4478 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:73 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT2) DSM 33133 (нуклеотиды 4478-4960 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:74 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT3) DSM 33133 (нуклеотиды 5015-5965 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:75 представляет аминокислотную последовательность предполагаемой гликозилтрансферазы (GT4) DSM 33133 (нуклеотиды 6026-6955 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:76 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *wzy* DSM 33133 (нуклеотиды 6955-8145 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:77 представляет аминокислотную последовательность предполагаемого белка семейства глицерофосфотрансферазы (глифос_транс) DSM 33133 (нуклеотиды 8132-9322 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:78 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *wzx* DSM 33133 (нуклеотиды 9309-10727 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:79 представляет аминокислотную последовательность, кодируемую геном *epsL* DSM 33133 (нуклеотиды 10825-11724 SEQ ID NO: 5);

SEQ ID NO:80 представляет аминокислотную последовательность белка *lytR* DSM 33133 (нуклеотиды 11749-12651 цепи, комплементарной SEQ ID NO: 5).

СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Все определения терминов, используемых в настоящем документе, имеют общепринятое значение, известное специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

В контексте настоящего изобретения в любом его воплощении выражение «молочнокислые бактерии» («LAB») обозначает бактерии, пригодные для применения в пищевой промышленности, продуцирующие молочную кислоту как основной конечный метаболический продукт ферментации углеводов. Эти бактерии объединяют их общие метаболические и физиологические характеристики и обычно они являются грам-положительными, с низким содержанием GC, кислотоустойчивыми, неспорообразующими, анаэробными палочковидными бациллами или кокками. На стадии ферментации потребление углеводов данными бактериями вызывает образование молочной кислоты, снижение pH и приводит к образованию белкового коагулята. Таким образом, эти бактерии, отвечают за закисление молока и текстуру молочного продукта. Наиболее широко используемые в промышленности молочнокислые бактерии относятся к порядку *Lactobacillales*, включающему *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. и *Propionibacterium* spp. Их часто применяют в качестве пищевых культур по отдельности или в комбинации с другими молочнокислыми бактериями.

Под «текстурирующим штаммом» в настоящей заявке и формуле изобретения понимают штамм, который предпочтительно приводит к образованию

ферментированного молока млекопитающих, имеющего в описанных ниже условиях и в Примере 1 напряжение сдвига предпочтительно выше 40 Па при измерении при скорости сдвига 300 с^{-1} . Штамм *Lactococcus lactis* можно охарактеризовать как обладающий выраженными текстурирующими свойствами, поскольку он образует ферментированное молоко, имеющее в таких же условиях напряжение сдвига выше 50 Па при скорости сдвига 300 с^{-1} . 200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин, после чего охлаждают до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до pH 4,55 после чего хранят при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, после чего осторожно перемешивают и измеряют напряжение сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C .

Также под «текстурирующим штаммом» в настоящей заявке и формуле изобретения понимают штамм, который предпочтительно приводит к образованию ферментированного молока млекопитающих, имеющего в описанных ниже условиях и в Примере 2 напряжение сдвига 24 Па или выше, предпочтительно 30 Па или выше, или более предпочтительно 42 Па или выше, при измерении при скорости сдвига 300 с^{-1} . Штамм *Lactococcus lactis* можно охарактеризовать как штамм с выраженными текстурирующими свойствами, поскольку он производит ферментированное молоко, имеющее в таких же условиях напряжение сдвига 30 Па или более при измерении при скорости сдвига 300 с^{-1} . 1% по объему ночной культуры микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) инокулируют соевое молоко с глюкозой, например с 0,5-5% глюкозы, предпочтительно с 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно с 2% глюкозы, как описано в Примере 2. Инокуляцию осуществляют при 30°C в 200 мл масштабе до достижения целевого pH, например, pH от 4 до 5, предпочтительно pH от 4,3 до 4,7, более предпочтительно pH от 4,4 до 4,6, и еще более предпочтительно pH 4,45, pH 4,50 или pH 4,55 после чего охлаждают до 4°C и хранят при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, после чего осторожно перемешивают и измеряют напряжение сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C .

Текстурирующий штамм молочнокислых бактерий по изобретению может представлять собой выделенный штамм, например, выделенный из природного источника, или может быть штаммом искусственного происхождения, например, рекомбинантным. Рекомбинантные штаммы будут отличаться от штаммов естественного происхождения по меньшей мере наличием нуклеиновокислотной(ых) конструкции(й), применяющейся(щихся) для трансформации или трансфекции материнского штамма.

Термин «идентичность последовательностей» относится к степени родства между двумя нуклеотидными последовательностями или между двумя аминокислотными последовательностями. Для целей настоящего изобретения степень идентичности последовательностей между двумя нуклеотидными последовательностями или двумя аминокислотными последовательностями определяется с применением инструмента для множественного выравнивания Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; Sievers, F. *et al.*, 2011, “Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega”, *Mol. Syst. Biol.*, 7:539) со стандартными параметрами.

В данном контексте термины «штамм, происходящий от», «производный штамм» или «мутант» следует понимать как штамм, происходящий от штамма по изобретению вследствие, например, генной инженерии, радиационного и/или химического воздействия и/или отбора, адаптации, скрининга и т.д. Предпочтительно чтобы производный штамм был функционально эквивалентным мутантом, например, мутантом, который обладает по существу такими же или улучшенными свойствами, применительно к текстурирующей способности, как и материнский штамм. Такой производный штамм является частью настоящего изобретения. В частности, термин «производный штамм» или «мутант» относится к штамму, полученному в результате воздействия на штамм по изобретению любого стандартно применяемого мутагенного воздействия, включая воздействие химического мутагена, такого как этанметансульфонат (EMS) или N-метил-N-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ излучения, или к спонтанно возникшему мутанту. Мутант может быть подвергнут нескольким мутагенным воздействиям (одно воздействие следует понимать как одна стадия мутагенеза с последующей стадией скрининга/отбора), но в данном случае предпочтительно осуществление не более 20, не более 10 или не более 5 воздействий. В предпочтительном мутанте изменено менее 1% или менее 0,1%, менее 0,01%, менее

0,001% или даже менее 0,0001% нуклеотидов бактериального генома (посредством замены, вставки, делеции или их комбинаций) по сравнению с материнским штаммом.

Термин «термофильный» в настоящем документе относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при температурах выше 35°C. Наиболее полезные с промышленной точки зрения термофильные бактерии включают *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. Термин «термофильная ферментация» в настоящем документе относится к ферментации при температуре выше приблизительно 35°C, такой как от приблизительно 35°C до приблизительно 45°C. Термин «термофильный ферментированный молочный продукт» относится к ферментированным молочным продуктам, полученным посредством термофильной ферментации термофильных заквасочных культур и включает такие ферментированные молочные продукты как йогурт термостатного способа производства, йогурт с нарушенным сгустком и питьевой йогурт, например, якульт. Кроме того, термин «термофильный ферментированный молочный продукт» относится к ферментированным молочным продуктам, полученным посредством термофильной ферментации термофильной стартерной культуры молока на растительной основе, такого как соевое молоко или соевое молоко с добавлением сахара, например, такого как фруктоза, сахароза, кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы (HFCS), мед, глюкоза, инвертированный сахар, мальтоза, галактоза, лактоза или любая их комбинация. Концентрация сахара может составлять от 0,5% до 5%, от 0,5 до 2%, 0,5%, 1%, 1,5% или 2%, например, 0,5-5% глюкозы, предпочтительно 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно 2% глюкозы.

Термин «мезофильный» в настоящем документе относится к микроорганизмам, которые лучше размножаются при умеренных температурах (15°C-35°C). Наиболее широко применяющиеся в промышленности мезофильные бактерии включают *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp. Термин «мезофильная ферментация» в настоящем документе относится к ферментации при температуре от приблизительно 22°C до приблизительно 35°C. Термин «мезофильные пищевые продукты» относится к пищевым продуктам, полученным посредством мезофильной ферментации мезофильными стартерными культурами. Термин «мезофильный ферментированный молочный продукт» относится к ферментированным молочным продуктам, полученным путем мезофильной ферментации мезофильными стартерными культурами и включает такие ферментированные молочные продукты, как пахта, простоквашу, сквашенное молоко,

сметана, сквашенные сливки, кефир и молодой сыр, такой как варг, творог и сливочный сыр. Кроме того, термин «мезофильный ферментированный молочный продукт» относится к ферментированным молочным продуктам, полученным посредством мезофильной ферментации мезофильной стартерной культуры молока на растительной основе, такого как соевое молоко или соевое молоко с добавлением сахара, например, такого как фруктоза, сахароза, кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы (HFCS), мед, глюкоза, инвертированный сахар, мальтоза, галактоза, лактоза или любая их комбинация. Концентрация сахара может составлять от 0,5% до 5%, от 0,5 до 2%, 0,5%, 1%, 1,5% или 2%, например, 0,5-5% глюкозы, предпочтительно 0,5-2%, более предпочтительно приблизительно 2% глюкозы.

Термин «мезофильная стартерная культура» в настоящем документе относится к любым заквасочным культурам, содержащим по меньшей мере один штамм мезофильных бактерий. Мезофильные заквасочные культуры, такие как комбинации штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* применяются для получения ферментированных молочных продуктов, таких как молодой сыр, пахта, простокваша и сквашенные сливки.

Термины «ферментированное молоко» и «молочный продукт» в настоящем документе используются взаимозаменяемо. В контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений выражение «ферментированный молочный продукт» означает пищевой или кормовой продукт, где получение пищевого или кормового продукта включает ферментацию молочной основы молочнокислыми бактериями. «Ферментированный молочный продукт» в настоящем документе включает такие продукты, как термофильные ферментированные молочные продукты или мезофильные ферментированные молочные продукты, как описано выше. Кроме того, как описано выше, «ферментированный молочный продукт» в настоящем документе включает продукты, полученные посредством ферментации молока на растительной основе, такого как соевое молоко или соевое молоко с добавлением сахара, например, такого как фруктоза, сахароза, кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы (HFCS), мед, глюкоза, инвертированный сахар, мальтоза, галактоза, лактоза или любая их комбинация. Концентрация сахара может составлять от 0,5% до 5%, от 0,5 до 2%, 0,5%, 1%, 1,5% или 2%, например, 0,5-5% глюкозы, предпочтительно 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно 2% глюкозы. Так, «ферментированный молочный

продукт» согласно настоящему изобретению охватывает ферментированные молочные продукты из молока млекопитающих (т.е. молочная основа происходит от млекопитающих) и ферментированные продукты из растительного молока (т.е. молочная основа представляет собой молочную основу растительного происхождения, такую как на основе соевого молока).

В контексте настоящей заявки термин «молоко» широко применяется в его общепринятом значении и относится к жидкостям, произведенным молочными железами млекопитающих (например, коров, овец, коз, буйволов, верблюдов и т.д.) или происходящим из растений. Термин «молочная основа» или «молочный субстрат» может представлять собой любой молочный материал, который может подвергаться ферментации согласно настоящему изобретению. Так, полезные молочные основы включают растворы/суспензии любого молока или молокоподобного продукта, содержащего белок, такие как цельное молоко или молоко с низким содержанием жира, обезжиренное молоко, пахта, восстановленное порошковое молоко, концентрированное молоко, сухое молоко, сыворотка, сывороточный пермеат, лактоза, маточная жидкость после кристаллизации лактозы, концентрат сывороточного белка, сливки или растительное молоко, без ограничения. Очевидно, молочная основа может происходить от любых млекопитающих, например, быть по существу чистым молоком млекопитающих или восстановленным порошковым молоком. Источники растительного молока включают молоко, экстрагированное из соевых бобов, но не ограничиваются им. Предпочтительно молоко на растительной основе представляет собой соевое молоко, в которое предпочтительно добавляют сахар, например, такой как фруктоза, сахароза, кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы (HFCS), мед, глюкоза, инвертированный сахар, мальтоза, галактоза, лактоза или любая их комбинация. Концентрация сахара может составлять от 0,5% до 5%, от 0,5 до 2%, 0,5%, 1%, 1,5% или 2%, например, 0,5-5% глюкозы, предпочтительно 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно 2% глюкозы.

Перед ферментацией молочная основа может быть гомогенизирована и пастеризована согласно способам, известным в области техники. «Гомогенизирование» в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений означает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию осуществляют до ферментации, ее можно осуществлять таким образом,

чтобы разбить молочный жир на более мелкие капли, чтобы он больше не отделялся от молока. Это может достигаться путем пропускания молока под высоким давлением через мелкие отверстия.

«Пастеризация» в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений означает обработку молочной основы для сокращения или устранения наличия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно пастеризация достигается путем поддержания определенной температуры в течение определенного периода времени. Указанная температура обычно достигается путем нагревания. Температуру и длительность можно выбирать для уничтожения или инактивации определенных бактерий, таких как вредные бактерии. После этого может следовать стадия быстрого охлаждения. Например, молочную основу можно нагревать при 92°C в течение 3 мин, охлаждать до 38°C и затем инокулировать, как описано на стадии i. способа по настоящему изобретению.

В настоящем описании термин «приблизительно» (или «примерно») означает указанное значение $\pm 1\%$ от этого значения, или термин «приблизительно» означает указанное значение $\pm 2\%$ от этого значения, или термин «приблизительно» означает указанное значение $\pm 5\%$ от этого значения, или термин «приблизительно» означает указанное значение $\pm 10\%$ от этого значения, или термин «приблизительно» означает указанное значение $\pm 20\%$ от этого значения, или термин «приблизительно» означает указанное значение $\pm 30\%$ от этого значения; предпочтительно термин «приблизительно» означает точно указанное значение ($\pm 0\%$).

В описании и формуле изобретения слово «содержит» и его варианты (например, «содержащий», «имеющий», «включающий», «имеющий в своем составе») обычно не является ограничивающим и поэтому не исключает другие признаки, которые, например, могут быть техническими признаками, добавками, компонентами или стадиями. Однако, когда в настоящем документе используется слово «содержит», оно *также* включает определенное воплощение, в котором данное слово понимают как ограничивающее; в данном конкретном воплощении слово «содержит» имеет значение термина «состоит из».

Использование терминов в единственном числе и аналогичных объектов в контексте описания изобретения (в частности, в контексте приведенной ниже формулы изобретения) следует трактовать как охватывающие единственное и множественное

число, если не указано противоположное или явным образом не противоречит контексту. Указание диапазонов значений в настоящем документе представляет лишь краткий способ независимого упоминания каждого отдельного значения, входящего в диапазон, если не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было независимо упомянуто в настоящем документе. Все описанные способы можно осуществлять в любом подходящем порядке, если не указано иное или если это явным образом не противоречит контексту. Использование любых примеров или вводных слов перед примером (например, «такой как») в настоящем документе предназначено лишь для лучшего освещения изобретения и не ограничивает объем изобретения, если в формуле изобретения не заявлено иное. Ни один термин в описании не следует рассматривать как указание на то, что какой-либо отсутствующий в формуле изобретения элемент является существенным для осуществления изобретения.

Текстура является важным показателем качества для ферментированных молочных продуктов, таких как йогурт, и принятие потребителями зачастую тесно связано с характеристиками текстуры. Текстура ферментированного молока зависит как от бактерий, применяемых для ферментации, так и от параметров процесса. Бактерии, продуцирующие полисахариды, могут положительно влиять на характеристики продукта, такие как текстура и органолептические свойства. Органолептические свойства текстуры зачастую коррелируют с результатами инструментальных измерений, например, напряжение сдвига коррелирует с вязкостью и ощущением густоты во рту (Poulsen *et al.*, 2019). В контексте настоящего изобретения реологические свойства (текстура) ферментированного молочного продукта, такие как вязкость, могут определяться как функция напряжения сдвига ферментированного молочного продукта как описано ниже.

В свете настоящего изобретения напряжение сдвига можно измерять следующим способом: Когда pH ферментированного молока (например, млекопитающих или молока на растительной основе) достигал pH приблизительно 4,55, ферментированный молочный продукт доводили до 4°C и вручную осторожно перемешивали при помощи палочки, снабженной перфорированным диском, до гомогенности образца. Реологические свойства образца оценивали при помощи реометра (Anton Paar Physica Rheometer with ASC, Automatic Sample Changer, Anton Paar® GmbH, Austria) с

использованием боба-цилиндра. Реометр устанавливали на постоянную температуру 13°C во время измерения. Настройки были следующими:

- Время задержки (для восстановления в некоторой степени исходной структуры)
- 5 минут без какого-либо физического воздействия (колебания или вращения) на образец.
- Стадия колебаний (для измерения показателя упругости и вязкости, G' и G'' , соответственно, для расчета комплексного показателя G^*)

Постоянная деформация = 0,3%, частота (f) = [0,5...8] Гц

6 точек измерения в течение 60 с (по одной каждые 10 с)

- Стадия вращений (для измерения напряжения сдвига при 300 1/с)
- Были запланированы две стадии:
- Скорость сдвига = [0,3-300] 1/с и 2) Скорость сдвига = [275-0,3] 1/с.

Каждая стадия включала 21 точку измерения в течение 210 с (каждые 10 с). Для дальнейшего анализа было выбрано напряжение сдвига 300 1/с (300 с^{-1}), поскольку оно коррелирует с ощущением густоты во рту при проглатывании ферментированного молочного продукта.

Предпочтительно напряжение сдвига можно измерять следующим способом: данные по напряжению сдвига получали путем инокуляции тех же микробных культур в молоко средней жирности (1,5% жира); молоко нагревали при 90°C в течение 20 мин и охлаждали до температуры инокуляции (30°C) перед инокуляцией 1% ночной микробной культурой. Инокуляцию осуществляли в течение 8-22 ч при 30°C в 200 мл масштабе до достижения pH приблизительно 4,55 с последующим охлаждением до 4°C и хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток. После хранения ферментированное молоко осторожно перемешивали при помощи палочки, снабженной перфорированным диском, до гомогенности образца. Напряжение сдвига образцов оценивали при помощи реометра (Anton Paar Physica Rheometer with ASC, Automatic Sample Changer, Anton Paar® GmbH, Austria) со следующими настройками:

- Время ожидания (для восстановления в некоторой степени исходной структуры)
- 5 минут без колебания или вращения
- Вращение (для измерения напряжения сдвига при 300 с^{-1} и так далее)
- $\dot{\gamma} = [0,2707-300] \text{ с}^{-1}$ и $\dot{\gamma} = [275-0,2707] \text{ с}^{-1}$

21 точка измерения в течение 210 с (каждые 10 с) с повышением 300 с^{-1} и 21 точка измерения за 210 с (по одной каждые 10 с) со снижением до $0,2707 \text{ с}^{-1}$. Для анализа данных выбирали напряжение сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} .

В альтернативном варианте напряжение сдвига измеряют следующим способом: 1% по объему ночной культуры микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) инокулируют соевое молоко с глюкозой, например, с 0,5-5% глюкозы, предпочтительно с 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно с приблизительно 2% глюкозы. Инокуляцию осуществляют при 30°C в 200 мл масштабе до достижения целевого pH с последующим охлаждением до 4°C и хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток. Целевым значением pH может быть, например, pH от 4 до 5, предпочтительно от pH 4,3 до 4,7, более предпочтительно от pH 4,4 до 4,6 и еще более предпочтительно pH 4,45, pH 4,50 или pH 4,55. После хранения ферментированное молоко осторожно перемешивают при помощи палочки, снабженной перфорированным диском, до гомогенности образца. Напряжение сдвига оценивают при помощи реометра (Anton Paar Physica Rheometer with ASC, Automatic Sample Changer, Anton Paar® GmbH, Austria) со следующими настройками:

- Время ожидания (для восстановления в некоторой степени исходной структуры)
- 5 минут без колебания или вращения
- Вращение (для измерения напряжения сдвига при 300 с^{-1} и так далее)
- $\dot{\gamma} = [0,2707-300] \text{ с}^{-1}$ и $\dot{\gamma} = [275-0,2707] \text{ с}^{-1}$

21 точка измерения в течение 210 с (каждые 10 с) с повышением до 300 с^{-1} и 21 точка измерения за 210 с (по одной каждые 10 с) со снижением до $0,2707 \text{ с}^{-1}$. Для анализа данных можно выбирать напряжение сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} .

Штаммы молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*

Задачей настоящего изобретения является предоставление текстурирующих штаммов LAB, подходящих для применения в изготовлении пищевых продуктов. В частности, задачей настоящего изобретения является предоставление текстурирующих штаммов *Lactococcus lactis*, подходящих для применения в изготовлении мезофильных пищевых продуктов. Эта задача была решена с помощью описанных здесь штаммов *Lactococcus lactis*. Как обсуждается в Примерах (см., например, Таблицы 1, 2 и 3 и Примеры 1 и 2) изложенные штаммы *Lactococcus lactis* DSM 33204, DSM 33205, DSM

33220, DSM 33221, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33224, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33195, DSM 33194, DSM 33226, DSM 33193, DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202, DSM 33203, DSM 33222, DSM 33225, DSM 33133, DSM 33223 и DSM 33192 обладают превосходными текстурирующими свойствами.

Авторы настоящего изобретения проанализировали кластер генов *eps* вышеупомянутых штаммов и идентифицировали последовательности новых генов, которые предположительно задействованы в продуцировании экзополисахарида (EPS), и поэтому задействованы в создании превосходных текстурирующих свойств вышеупомянутых штаммов *Lactococcus lactis* для ферментирования молока.

У LAB Wzy-зависимый путь является предпочтительным путем для синтеза гетерополимерного EPS. Генетические локусы биосинтеза полисахаридов по Wzy-зависимому механизму сходны у всех бактерий и хорошо изучены у *Streptococcus pneumoniae*. Следует отметить, что *S. pneumoniae* продуцирует только капсулярные внеклеточные полисахариды (часто используется аббревиатура CPS), тогда как LAB способны производить как CPS, так и EPS (EPS обозначает «внеклеточный полисахарид», который секретируется в среду/молоко). Один и тот же кластер генов отвечает за производство CPS и EPS. Генетический анализ локуса CPS у 90 серотипов пневмококка продемонстрировал поразительную особенность полисахаридного оперона: наличие множества сильно отличающихся форм каждого из ключевых классов ферментов. Так, для полисахаридполимераз было обнаружено 40 групп гомологии, для липаз - 13 групп и большое разнообразие гликозилтрансфераз. Наличие множественных негомологичных или высоко дивергентных форм этих ферментов вместе с часто различным содержанием G+C в области, в которой они кодируются, подтверждает точку зрения, что эти гены неоднократно импортировались из разных и неизвестных источников. Многие кластеры генов *eps* прошли перестройку, опосредованную элементами инсерционной последовательности (IS) и получили гены других организмов в результате горизонтального переноса генов. Типичным для организации оперона *eps* является наличие IS-элементов, фланкирующих оперон, или находящихся внутри него. Множество гликозилтрансфераз, обнаруженных в локусах продукции полисахаридов, обеспечивает возможность постоянно генерировать новые штаммы, продуцирующие уникальные EPS, путем перетасовки генов. Поскольку EPS демонстрирует огромное разнообразие моносахаридных строительных блоков, аномальной конфигурации,

конформации и стереохимии, результирующее разнообразие структур EPS является поразительным: например, два остатка глюкозы могут быть соединены друг с другом 30 различными способами. Согласно базе данных Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) database (cazy.org), в настоящее время гликозилтрансферазы подразделяются на 107 семейств (июнь 2019 г., <http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.html>), что может помочь в прогнозировании их механизма действия. Тем не менее, это не означает, что все ферменты семейства распознают одного и того же донора и акцептора, поскольку полиспецифичность распространена среди семейств гликозилтрансфераз, и, таким образом, следует быть осторожным с чрезмерной интерпретацией предсказаний, основанных исключительно на этой классификации.

Гены, кодирующие Wzy-зависимые белки биосинтеза внеклеточных полисахаридов у LAB обычно организованы в виде кластера со структурой оперона и обычно являются хромосомными у *Streptococcus thermophilus*, но могут располагаться на плазмиде или хромосоме у *L. lactis* и *Lactobacillus* sp. Как правило, кластеры генов *eps* очень разнообразны, а их нуклеотидные последовательности являются одними из самых переменных последовательностей в геномах LAB. Однако модульная организация генов в кластерах генов *eps* сохраняется (Zeidan *et al.*, 2017). Консервативные гены, находящиеся в начале кластера генов *eps*, которые участвуют в механизме модуляции и сборки биосинтеза полисахаридов, были названы *epsRXCDB* в соответствии с номенклатурой Zeidan *et al.* (2017) и Poulsen *et al.* (2019), а находящиеся в конце — *epsL* и *lytR*, при этом полимеразу получила название *wzy*, а флиппазу — *wzx*. Гены переменной части включают полимеразу *wzy*, переносчик полисахарида, также называемый флиппазой *wzx*, и гликозилтрансферазы (GT) или другие ферменты, модифицирующие полимеры. Общей чертой для текстурирующих штаммов является то, что все они содержат гены, необходимые для производства полисахаридов, например, *epsCDBE-wzy-wzx* и GT (Zeidan *et al.*, 2017). Никакие предполагаемые функции пока не могут быть приписаны *epsX* и *epsL*. NIZO B40 *epsL* может быть разрушен путем однократного кроссовера с использованием фрагмента внутреннего гена или сверхпродуцироваться без какого-либо влияния на продукцию EPS (van Kranenburg, 1999). Однако может случиться так, что если одна копия из кластера *eps* будет нефункциональна, ее заменит вторая копия *epsL*.

Считается, что *EpsR* отвечает за регуляцию биосинтеза EPS, и поэтому определенные мутации могут влиять на продукцию EPS. Считается, что *EpsCDB* и АТФ образуют стабильный комплекс, действующий как тирозинкиназно-фосфатазная система, которая контролирует синтез EPS, вероятно, посредством фосфорилирования *epsE*, гликозилфосфотрансферазы, которая катализирует первую стадию сборки повторяющегося звена EPS и определяет тип сахара, добавляемого к липидному носителю для образования EPS. Все три гена, ответственные за фосфорилирование тирозина, необходимы для полной инкапсуляции пневмококка, при этом *epsC* (соответствующий EpsC у *L. lactis*) является основным фактором вирулентности, решающим благодаря его роли в регуляции биосинтеза CPS (Whittall *et al.*, 2015). Было обнаружено, что у *L. lactis* *epsC* и *epsD* необходимы для продуцирования EPS, в то время как *epsB* не является строго обязательным, поскольку эффект его делеции заключался в снижении количества продуцируемого EPS (Nierop Groot and Kleerebezem, 2007). Было показано, что ген *epsE*, кодирующий начальную глюкозофосфаттрансферазу, которая не катализирует гликозидную связь, но участвует в присоединении первого сахара повторяющегося звена к липидному носителю, необходим для биосинтеза полисахаридов у *L. lactis*, а его разрушение прекращает продукцию EPS (Dabour and LaPointe 2005, van Kranenburg *et al.*, 1997).

Соответственно, следующие гены кластера *eps*, обычно кодирующие гликозилтрансферазы, полимеразы и транспортеры, располагаются в вариабельной части кластера и часто имеют низкую степень сходства с уже охарактеризованными генами, что затрудняет предсказание их предполагаемых функций. При сравнении оперонов синтеза полисахаридов у 90 серотипов пневмококков, у которых биосинтез полисахаридов хорошо изучен, выявлено, что центральные гены, ответственные за синтез и полимеризацию повторяющихся звеньев, очень вариабельны и часто негомологичны между серотипами (Bentley *et al.*, 2006). Wzy-зависимый биосинтез CPS у *S. pneumoniae* напоминает синтез пептидогликана, при котором повторяющиеся звенья строятся на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны, транспортируются к внешней поверхности мембраны переносчиком Wzx, также называемым флиппазой, и полимеризуются полимеразой Wzy. Полимераза полисахаридов Wzy связывает отдельные повторяющиеся звенья с образованием CPS, связанных с липидами. У *S. pneumoniae* обнаружено 40 групп гомологии полимераз полисахаридов. Начальный сахар

повторяющегося олигосахаридного звена также является донорным сахаром при полимеризации повторяющихся звеньев, а специфичность полимеразы Wzy определяет тип связи. Предсказания для начальных сахаров и последующей полимеризационной связи повторяющихся звеньев хорошо коррелируют с группами гомологии полимераз. У *S. pneumonia* имеется 32 группы гомологии полимеразы, связанные с WchA, пять с WciI, четыре с WcjG и одна с WcjH. Эти ассоциации в основном уникальны, только пять групп гомологии полимераз связаны с двумя начальными трансферазами, что указывает на высокую специфичность начальных трансфераз (Bentley *et al.*, 2006).

Соответственно, как правило, кластеры генов *eps* у штаммов *Lactococcus* sp. имеют высокое сходство в пределах консервативных областей (например, *epsRXCDBE*, *epsL* и *lytR*), но остальная часть генов *eps*, включая *wzy*, *wzx*, гены GT и другие гены, модифицирующие повторяющиеся олигосахаридные звенья, если они присутствуют, как правило, более вариабельны, как с точки зрения последовательности, так и с точки зрения присутствующих генов. В дополнение, не ограничиваясь теорией, в настоящее время полагают, что различия в генах вариабельной области, связанных с биосинтезом EPS (в частности, генах *wzy*, *wzx* и GT, если они присутствуют), вероятно, ответственны за различные структуры EPS, продуцируемые клетками различных штаммов LAB, которые могут влиять на текстурирующей способности различных штаммов LAB.

Как обсуждалось выше, в первом аспекте настоящее изобретение относится к штамму молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, содержащему активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* выбран из:

- (i) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1;
- (ii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2;
- (iii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3;

- (iv) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, и
- (v) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 5 нуклеотидов, предпочтительно не более чем на 4 нуклеотида, более предпочтительно не более чем на 3 нуклеотида, еще более предпочтительно не более чем на 2 нуклеотида, наиболее предпочтительно не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5.

В предпочтительном воплощении кластер генов *eps* штамма молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), по первому аспекту настоящего изобретения выбран из:

- (i) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1;
- (ii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2;
- (iii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3;
- (iv) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, и
- (v) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5.

В предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 1, принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76, где анализ MLST осуществляют, как описано в Примере 4 настоящего описания, то есть по схеме MLST с 12 генами, разработанной в компании Chr. Hansen. Указанная схема основана на двенадцати генах *dnaK*, *fusA*, *groEL*, *gyrA*, *gyrB*, *ileS*, *lepA*, *pheS*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* и *rpoC*, выбранных из корового генома *Lactobacillaceae* (Salveti *et al.*, 2018). Всего в схеме используется 22493 п.н., которые представляют почти 1% от среднего генома *Lactococcus*. MLST-типирование полных геномных последовательностей на платформе Illumina осуществляют при помощи модуля CLC Microbial Genomics, встроенного в CLC Genomics Workbench v10. MLST в рамках CLC входит в специально разработанный в Chr. Hansen процесс стандартного анализа геномных последовательностей. Его осуществляют как на контигах *de novo*, так и на эталонных сборках.

Предпочтительно штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 2, или где кластер генов *eps* охарактеризован нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2, принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76.

Предпочтительно штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 3, или где кластер генов *eps* охарактеризован нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3, принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76.

Предпочтительно штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 4, или где кластер генов *eps* охарактеризован нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76.

Предпочтительно штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 5, или где кластер генов *eps* охарактеризован нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид, предпочтительно не более чем на 4 нуклеотида, более предпочтительно не более чем на 3 нуклеотида, еще более предпочтительно не более чем на 2 нуклеотида, наиболее предпочтительно не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5, принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST140.

Как обсуждалось выше, анализ MLST осуществляют, как описано в Примере 4, то есть по схеме MLST с 12 генами, разработанной в компании Chr. Hansen. Указанная схема основана на двенадцати генах *dnaK*, *fusA*, *groEL*, *gyrA*, *gyrB*, *ileS*, *lepA*, *pheS*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* и *rpoC*, выбранных из корового генома *Lactobacillaceae* (Salveti *et al.*, 2018). Всего в схеме используется 22493 п.н., которые представляют почти 1% от среднего

генома *Lactococcus*. MLST-типирование полных геномных последовательностей на платформе Illumina осуществляют при помощи модуля CLC Microbial Genomics, встроенного в CLC Genomics Workbench v10. MLST в рамках CLC входит в специально разработанный в Chr. Hansen процесс стандартного анализа геномных последовательностей. Его осуществляют как на контигах *de novo*, так и на эталонных сборках.

В предпочтительном воплощении штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 1, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 15 ч или менее («время достижения pH 4,55» 15 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 13 ч или менее («время достижения pH 4,55» 13 ч или менее), более предпочтительно за приблизительно 12 ч или менее («время достижения pH 4,55» 12 ч или менее), еще более предпочтительно за приблизительно 11 ч или менее («время достижения pH 4,55» 11 ч или менее), измеренное в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения значения pH 4,55.

В предпочтительном воплощении штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 1, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 (таким как pH приблизительно 4,49, 4,53 или 4,55) за приблизительно 21 ч или менее («время достижения pH 4,55» 21 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 16 ч или менее («время достижения pH 4,55» 16 ч или менее), более предпочтительно за приблизительно 11 ч или менее («время достижения pH 4,55» 11 ч или менее), еще более предпочтительно за приблизительно 8 ч или менее («время достижения pH 4,55» 8 ч или менее), измеренное в следующих условиях:

1% по объему (2 мл) ночной культуры микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) инокулируют в 200 мл соевого молока с глюкозой, например с 0,5-5% глюкозы,

предпочтительно с 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно с 2% глюкозы, и оставляют при температуре инокуляции (30°C) до достижения pH приблизительно 4,55 (такого как pH приблизительно 4,49, 4,53 или 4,55), как описано выше.

В предпочтительном воплощении штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 2, или где кластер генов *eps* охарактеризован нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 15 ч или менее («время достижения pH 4,55» 15 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 13 ч или менее («время достижения pH 4,55» 13 ч или менее), более предпочтительно за приблизительно 12 ч или менее («время достижения pH 4,55» 12 ч или менее), еще более предпочтительно за приблизительно 9 ч или менее («время достижения pH 4,55» 9 ч или менее), измеренное в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55.

В предпочтительном воплощении штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 2, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 (таким как pH приблизительно 4,54, 4,55 или 4,66) за приблизительно 21 ч или менее («время достижения pH 4,55» 21 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 11 ч или менее («время достижения pH 4,55» 11 ч или менее), более предпочтительно за приблизительно 10,5 ч или менее («время достижения pH 4,55» 10,5 ч или менее), измеренное в следующих условиях:

1% по объему (2 мл) ночной культуры микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) инокулируют в 200 мл соевого молока с глюкозой, например с 0,5-5% глюкозы, предпочтительно с 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно с 2% глюкозы, и оставляют при температуре инокуляции (30°C) до достижения pH

приблизительно 4,55 (такого как pH приблизительно 4,54, 4,55 или 4,66), как описано выше.

В предпочтительном воплощении штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 3, или где кластер генов *eps* охарактеризован нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 14 ч или менее («время достижения pH 4,55» 14 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 12 ч или менее («время достижения pH 4,55» 12 ч или менее), измеренное в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55.

В предпочтительном воплощении штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 3, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 7,5 ч или менее («время достижения pH 4,55» 7,5 ч или менее), измеренное в следующих условиях:

1% по объему (2 мл) ночной культуры микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) инокулируют в 200 мл соевого молока с глюкозой, например с 0,5-5% глюкозы, предпочтительно с 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно с 2% глюкозы, и оставляют при температуре инокуляции (30°C) до достижения pH приблизительно 4,55.

В предпочтительном воплощении штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 4, или нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 13 ч или менее («время достижения pH 4,55» 13

ч или менее), предпочтительно за приблизительно 11 ч или менее («время достижения pH 4,55» 11 ч или менее), измеренное в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55.

В предпочтительном воплощении штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 4, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 10 ч или менее («время достижения pH 4,55» 10 ч или менее), измеренное в следующих условиях:

1% по объему (2 мл) ночной культуры микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) инокулируют в 200 мл соевого молока с глюкозой, например с 0,5-5% глюкозы, предпочтительно с 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно с 2% глюкозы, и оставляют при температуре инокуляции (30°C) до достижения pH приблизительно 4,55.

В предпочтительном воплощении штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 5, или где кластер генов *eps* охарактеризован нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид, предпочтительно не более чем на 4 нуклеотида, более предпочтительно не более чем на 3 нуклеотида, еще более предпочтительно не более чем на 2 нуклеотида, наиболее предпочтительно не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 10 ч или менее («время достижения pH 4,55» 10 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 8 ч или менее («время достижения pH 4,55» 8 ч или менее), измеренное в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55.

В предпочтительном воплощении штамм LAB *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид, где кластер генов *eps* охарактеризован в SEQ ID NO: 5, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 10,5 ч или менее («время достижения pH 4,55» 10,5 ч или менее), измеренное в следующих условиях:

1% по объему (2 мл) ночной культуры микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) инокулируют в 200 мл соевого молока с глюкозой, например с 0,5-5% глюкозы, предпочтительно с 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно с 2% глюкозы, и оставляют при температуре инокуляции (30°C) до достижения pH приблизительно 4,55.

Активный кластер генов *eps*, охарактеризованный в (i) - (v) выше (SEQ ID NO: 1-5) обнаруживается у молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* с превосходными текстурирующими свойствами, как описано в Примерах.

Термин «экзополисахарид (EPS)» хорошо известен, и специалист в области техники может рутинным способом определить, продуцирует ли EPS молочнокислая бактерия, представляющая интерес. Как известно и понятно специалисту в области техники, представляющие интерес молочнокислые бактерии, продуцирующие EPS, будут содержать активный кластер генов *eps*.

Как известно специалисту в области техники, как указано выше, активный кластер генов *eps* содержит гены, вовлеченные в регуляцию и модуляцию биосинтеза EPS, и гены, вовлеченные в биосинтез и экспорт повторяющихся олигосахаридных звеньев, включая гликозилтрансферазу (GT), полимеразу и переносчик. Вкратце, как понятно специалисту в данной области техники, поскольку штаммы молочнокислых бактерий по первому аспекту способны продуцировать и экспортировать экзополисахарид (EPS), они будут содержать активный кластер генов *eps*. Zeidan *et al.* 2017 рассматривает производство EPS в LAB и предоставляет подробную информацию о структуре кластеров генов *eps* у LAB. На Фиг. 1 показан кластер генов *eps* у штамма *L. lactis cremoris* B40 (pNZ4000, GenBank AF036485).

Предпочтительно штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид

(EPS), где кластер генов *eps* имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, выбран из следующих штаммов:

- Штамма DSM 33204 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33205 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33220 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33221 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33218 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33219 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33224 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33197 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33196 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33195 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33194 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33226 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33223 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33193 или его мутанта или варианта; и
- Штамма DSM 33192 или его мутанта или варианта.

Вышеуказанные штаммы относятся к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76. Анализ MLST проводили, как описано ниже в Примере 4.

Предпочтительно штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, выбран из следующих штаммов:

- Штамма DSM 33200 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33201 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33202 или его мутанта или варианта; и
- Штамма DSM 33203 или его мутанта или варианта.

Штаммы DSM 33201 и DSM 33203 принадлежат к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76. Анализ MLST проводили, как описано ниже в Примере 4.

Предпочтительно штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, представляет собой штамм DSM 33222 или его мутант или вариант. Штамм DSM 33222 принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76. Анализ MLST проводили, как описано ниже в Примере 4.

Предпочтительно штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, представляет собой штамм DSM 33225 или его мутант или вариант. Штамм DSM 33225 принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76. Анализ MLST проводили, как описано ниже в Примере 4.

Предпочтительно штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, представляет собой штамм DSM 33133, или его мутант или вариант. Штамм DSM 33133 принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST140. Анализ MLST проводили, как описано ниже в Примере 4.

Как обсуждалось в приведенных здесь рабочих примерах (см., например, Таблицу 1), раскрытые в настоящем документе новые штаммы *Lactococcus lactis* обладают превосходными текстурирующими свойствами в молоке млекопитающих. Кроме того, как показано в Примере 2 в Таблицах 2 и 3, раскрытые здесь новые штаммы *Lactococcus lactis* также обладают превосходными текстурирующими свойствами в молоке на растительной основе, в частности в соевом молоке с добавлением глюкозы, например, 0,5-5% глюкозы, предпочтительно 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно 2% глюкозы.

Предпочтительно текстурирующий штамм молочнокислых бактерий, описанный в настоящем документе, представляет собой штамм LAB, генерирующий ферментированное молоко, имеющее напряжение сдвига более 50 Па, более предпочтительно 55 Па или более, еще более предпочтительно более 56 Па, такое как приблизительно 51 Па, 55 Па, 58 Па, 60 Па, 61 Па, 62 Па, 64 Па, 65 Па, 66 Па, 67 Па, 69 Па, 70 Па, 72 Па, 75 Па, 80 Па, 85 Па, 86 Па, 87 Па, 88 Па, 89 Па, 90 Па, 95 Па, 100 Па,

105 Па, 110 Па, 115 Па, 120 Па, 121 Па или более, измеренное при скорости сдвига 300 с^{-1} , измеренное в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55 с последующим хранением при 4°C в течение 5 суток с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C . Напряжение сдвига измеряют, используя способ, указанный в Примере 1.

Кроме того, текстурирующий штамм молочнокислых бактерий, описанный в настоящем документе, представляет собой штамм LAB, генерирующий ферментированное молоко, имеющее напряжение сдвига более 24 Па, такое как приблизительно 35 Па, 36 Па, 45 Па, 47 Па, 54 Па, 56 Па, 57 Па, 60 Па, 62 Па, 63 Па, 64 Па, 71 Па, 74 Па, 75 Па, 79 Па, 86 Па, 88 Па, 93 Па, 96 Па, 99 Па, 102 Па, 106 Па или более, измеренное при скорости сдвига 300 с^{-1} , измеренное в следующих условиях:

200 мл соевого молока с добавлением 2% глюкозы (как описано в Примере 2) инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH приблизительно 4,55 (такого как pH 4,49, 4,53, 4,54, 4,55 или 4,66) с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C . Напряжение сдвига измеряют, используя способ, указанный в Примере 2.

Предпочтительно штамм LAB производит ферментированное молоко, имеющее напряжение сдвига 55 Па или более, предпочтительно 56 Па, такое как приблизительно 58 Па, 60 Па, 64 Па, 65 Па, 70 Па, 75 Па, 80 Па, 85 Па, 88 Па, 90 Па, 95 Па, 98 Па, предпочтительно в присутствии содействующего закислению или вспомогательного штамма, который предпочтительно представляет собой штамм DSM 25485, измеренное при скорости сдвига 300 с^{-1} , при следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции

до достижения pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с⁻¹, где температура инокуляции составляет 30°C. Напряжение сдвига измеряют, используя способ, указанный в Примере 1.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения предложены следующие штаммы молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, способные генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 13 ч или менее («время достижения pH 4,55» 13 ч или менее), измеренное в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения значения pH 4,55:

- Штамм DSM 33193 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33204 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33205 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33220 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33221 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33218 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33219 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33224 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33197 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33196 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33200 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33201 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33203 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33222 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33225 или его мутант или вариант; и
- Штамм DSM 33133 или его мутант или вариант.

Поскольку вышеупомянутые штаммы способны закислять молоко (то есть достигать целевого значения pH, например, pH 4,55, как описано выше) приблизительно

за 13 часов или менее при измерении, как описано выше, их можно обозначать «быстро закисляющими» штаммами. Целевым значением pH может быть, например, pH от 4 до 5, предпочтительно pH от 4,3 до 4,7, более предпочтительно pH от 4,4 до 4,6 и еще более предпочтительно pH 4,45, pH 4,50 или pH 4,55. Таким образом, эти штаммы могут использоваться в отдельности или в комбинации с другими штаммами для производства ферментированного молока и ферментированных молочных продуктов.

В следующем предпочтительном воплощении настоящего изобретения предложены следующие штаммы молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, не способные генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 13 ч или менее («время достижения pH 4,55» более 13 ч), измеренное в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения значения pH 4,55:

- Штамм DSM 33226 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33194 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33195 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33192 или его мутант или вариант;
- Штамм DSM 33223 или его мутант или вариант; и
- Штамм DSM 33202 или его мутант или вариант.

Поскольку вышеупомянутые штаммы не способны закислять молоко (то есть достигать целевого значения pH, например, pH 4,55, как описано выше) приблизительно за 13 часов или менее при измерении, как описано выше, их можно обозначать «медленно закисляющими» штаммами. Целевым значением pH может быть, например, pH от 4 до 5, предпочтительно pH от 4,3 до 4,7, более предпочтительно pH от 4,4 до 4,6 и еще более предпочтительно pH 4,45, pH 4,50 или pH 4,55. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, для производства ферментированного молока в настоящее время предпочтительно чтобы ферментация молока (закисление) происходила как можно быстрее, например, во избежание роста любых потенциально загрязняющих микроорганизмов. Соответственно, предпочтительно применять вышеупомянутые штаммы в комбинации с дополнительным штаммом молочнокислых бактерий, который

в контексте настоящего изобретения обозначается как «содействующий закислению», или «вспомогательный» штамм. Содействующий закислению, или вспомогательный штамм будет помогать «медленно закисляющим» штаммам закислять молоко за меньшее время.

Не ограничиваясь теорией, в настоящее время полагают, что содействующий закислению, или вспомогательный штамм, среди прочего, будет быстрее метаболизировать белки, присутствующие в молоке (казеин), по сравнению с «медленно закисляющим» штаммом, так что «медленно закисляющий» штамм будет иметь более доступный источник азота для своего роста, который тем самым будет облегчаться. LAB необходим экзогенный источник аминокислот или пептидов, что обеспечивается протеолизом белков молока, например, казеина, который является наиболее распространенным белком в молоке и основным источником аминокислот (Savijoki, K., *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol (2006) 71: 394–406).

Медленно закисляющие штаммы часто связаны с низкой протеолитической активностью. Протеолиз — это расщепление белков на более мелкие полипептиды или аминокислоты. Протеиназа клеточной стенки (Prt) гидролизует белки молока, такие как казеин, обеспечивая источник азота, что делает молоко пригодным для быстрого роста штаммов. Помимо активности *prt* также могут играть роль другие факторы, такие как метаболизм углерода, активность *Idh* и *codY*. Иметь высокую активность *prt* недостаточно, чтобы быстро закислять молоко. Для скорости закисления молока также важны поглощение и дальнейшая деградация пептидов. Кроме того, производство EPS является очень энергозатратным процессом (Zeidan *et al.*, 2017). Текстурирующие штаммы *L. lactis*, как правило, медленнее закисляют молоко, чем нетекстурирующие штаммы (Poulsen *et al.*, 2019).

«Содействующий закислению», или «вспомогательный» штамм по настоящему изобретению может представлять собой любой штамм молочнокислых бактерий, который способен:

i) генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за 15 ч или менее, предпочтительно за 12 ч или менее («время достижения pH 4,55» 15 ч или менее, предпочтительно 12 ч или менее), измеренное в следующих условиях: 200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл

ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH приблизительно 4,55. Таким образом, можно рассчитать «время достижения pH 4,55» для определенного штамма молочнокислых бактерий; и

ii) генерировать ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига 40 Па или более, измеренным при скорости сдвига 300 c^{-1} , измеренное в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до pH 4,55 (время достижения pH 4,55) с дальнейшим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 c^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C .

Как показано в Примерах, например, в Таблице 1, комбинация штаммов DSM 33226, DSM 33194 или DSM 33195 с содействующим закислению, или вспомогательным штаммом, например, штаммом DSM 25485, приводит к более короткому времени закисления и/или ферментированному молоку, обладающему более высокой вязкостью (измеряемой как напряжение сдвига при скорости сдвига 300 c^{-1} , как описано выше).

В предпочтительном воплощении содействующий закислению, или вспомогательный штамм представляет собой штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* содержит нуклеотидные последовательности (a), (b) и (c), ((a) - (c4)) как определено в (vi):

- (vi) (a): нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий полимеразной активностью и имеющий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 6955-8145 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе wzy);
- (b): нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий активностью переносчика полисахаридов и имеющий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 9309-10727 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе wzx); и

(с): нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий гликозилтрансферазной (GT) активностью, содержащая:

(с1): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 4008-4478 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе GT1);

(с2): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 4478-4960 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе GT2);

(с3): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 5015-5965 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе GT3); и

(с4): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 6026-6955 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе GT4).

В следующем предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способный продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* является таким, как определено в (vii):

(vii) нуклеотидная последовательность, определенная в SEQ ID NO: 5.

Квалифицированный специалист сможет найти дополнительные содействующие закислению, или вспомогательные штаммы, подходящие для настоящего изобретения. Например, подходящий содействующий закислению, или вспомогательный штамм может представлять собой штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* является таким, как определено в SEQ ID NO: 1-4, где содействующий закислению, или вспомогательный штамм способен (i) генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 приблизительно за 15 часов или меньше, предпочтительно приблизительно за 12 часов или меньше, и способен (ii) генерировать ферментированное молоко, имеющее напряжение сдвига 40 Па или более, измеренное при скорости сдвига 300 c^{-1} , при измерении, как описано выше.

Например, следующие штаммы также могут применяться в качестве содействующих закислению, или вспомогательных штаммов в контексте настоящего изобретения: штаммы DSM 33193, DSM 33133, DSM 33196, DSM 33197, DSM 33200,

DSM 33201, DSM 33203, DSM 33204, DSM 33205, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33222, DSM 33224, DSM 33225, DSM 33140, DSM 33142 и/или DSM 33137, предпочтительно штаммы DSM 33193, DSM 33196, DSM 33197, DSM 33200, DSM 33201, DSM 33205, DSM 33218, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33222, DSM 33224, DSM 33225 и/или DSM 33137.

Более предпочтительно содействующий закислению, или вспомогательный штамм представляет собой штамм молочнокислых бактерий, выбранный из:

- (i) штамма молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 25485 или его мутанта или варианта и/или
- (ii) штамма молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 33192 или его мутанта или варианта; и/или
- (iii) штамма молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* DSM 33133 или его мутанта или варианта.

Соответственно, в данном изобретении дополнительно предложено применение любого из штаммов DSM 33193, DSM 33133, DSM 33196, DSM 33197, DSM 33200, DSM 33201, DSM 33203, DSM 33204, DSM 33205, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33222, DSM 33224, DSM 33225, DSM 33140, DSM 33142 и/или DSM 33137, предпочтительно применение любого из штаммов DSM 33193, DSM 33196, DSM 33197, DSM 33200, DSM 33201, DSM 33205, DSM 33218, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33222, DSM 33224, DSM 33225, и/или DSM 33137 в качестве содействующего закислению, или вспомогательного штамма.

Композиция, содержащая LAB по изобретению

Во втором аспекте настоящего изобретения предложена композиция, содержащая один или более штаммов *Lactococcus lactis* по изобретению, описанных в первом аспекте настоящего изобретения.

В частности, в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая один или более текстурирующих штаммов *Lactococcus lactis* по изобретению, описанных в первом аспекте настоящего изобретения, и содействующий закислению, или вспомогательный, штамм, как определено в первом аспекте настоящего изобретения. В предпочтительном воплощении композиция по настоящему изобретению содержит один или более штаммов *Lactococcus lactis* по изобретению, описанных в первом аспекте настоящего изобретения, и содействующий закислению, или вспомогательный, штамм,

как описано в первом аспекте настоящего изобретения, в соотношении приблизительно 9:1 (штамм(ы) LAB по настоящему изобретению : содействующий(е) закислению или вспомогательный(ые) штамм(ы)).

Предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* по первому аспекту настоящего изобретения и один или более дополнительных штаммов молочнокислых бактерий, где один или более дополнительных штаммов молочнокислых бактерий способны:

i) генерировать ферментированное молоко с рН приблизительно 4,55 за приблизительно 15 ч или менее, предпочтительно за приблизительно 12 ч или менее, при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения рН приблизительно 4,55. Таким образом, можно рассчитать «время достижения рН 4,55» для определенного штамма молочнокислых бактерий; и

ii) генерировать ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига 40 Па или более, измеренным при скорости сдвига 300 с⁻¹, при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до рН 4,55 (время достижения рН 4,55) с последующим хранением при 4°C в течение 5 суток с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с⁻¹, где температура инокуляции составляет 30°C, где напряжение сдвига измеряют, как описано в настоящем изобретении, например в Примере 1.

Более предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* по первому аспекту настоящего изобретения и (а) штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* содержит нуклеотидные

последовательности (a), (b) и (c), (a - c4) как определено в (vi), или (б) штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* является таким, как определено в (vii):

- (vi) (a): нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий полимеразной активностью и имеющий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 6955-8145 последовательности SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе *wzy*);
- (b): нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий активностью переносчика полисахаридов и имеющий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 9309-10727 последовательности SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе *wzx*); и
- (c): нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий гликозилтрансферазной (GT) активностью, содержащая:
 - (c1): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 4008-4478 последовательности SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе GT1);
 - (c2): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 4478-4960 последовательности SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе GT2);
 - (c3): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 5015-5965 последовательности SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе GT3); и
 - (c4): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 6026-6955 последовательности SEQ ID NO: 1 (обозначаемой в настоящем документе GT4);
- (vii) нуклеотидная последовательность, определенная в SEQ ID NO: 5.

В еще одном предпочтительном воплощении композиция по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* по первому аспекту настоящего изобретения и один или более штаммов молочнокислых бактерий, выбранных из штаммов DSM 33193, DSM 33133, DSM 33196, DSM 33197, DSM 33200, DSM 33201, DSM 33203, DSM 33204, DSM 33205, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33222, DSM 33224, DSM 33225, DSM 33140, DSM 33142, DSM 33137, DSM 33192 и/или DSM 25485, предпочтительно выбранных из штаммов DSM 33193, DSM 33196, DSM 33197, DSM 33200, DSM 33201, DSM 33205, DSM 33218, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33222, DSM 33224, DSM 33225, DSM 33137, DSM 33192 и/или DSM 25485.

Более предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* по первому аспекту настоящего изобретения и

- (i) штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 25485 или его мутант или вариант; и/или
- (ii) штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 33192 или его мутант или вариант; и/или
- (iii) штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* DSM 33133 или его мутант или вариант.

Например, композиция по настоящему изобретению содержит штамм DSM 33195 и штамм DSM 25485. Например, композиция по настоящему изобретению содержит штамм DSM 33226 и штамм DSM 25485. Например, композиция по настоящему изобретению содержит штамм DSM 33194 и штамм DSM 25485. Например, композиция по настоящему изобретению может содержать один или более из штаммов DSM 33202, DSM 33203, DSM 33204, DSM 33219 и/или штамм DSM 33223 и один или более из содействующих закислению, или вспомогательных, штаммов, как определено в первом аспекте настоящего изобретения, предпочтительно один или более из следующих штаммов: DSM 25485, DSM 33192 и/или DSM 33133.

В еще одном воплощении композиция по настоящему изобретению может содержать штамм DSM 33226 и штамм DSM 24649. В еще одном воплощении композиция по настоящему изобретению может содержать штамм DSM 33194 и штамм DSM 24649.

Предпочтительно композиция по настоящему изобретению в любом из ее воплощений содержит по меньшей мере 1×10^6 КОЕ (колониеобразующих единиц)/мл всех штаммов LAB. Может быть предпочтительным, чтобы композиция содержала по меньшей мере 1×10^8 КОЕ/мл всех штаммов LAB.

Как описано выше в контексте первого аспекта настоящего изобретения, LAB по настоящему изобретению, либо в отдельности, либо в комбинации с содействующим закислению, или вспомогательным, штаммом, предпочтительно штаммом LAB *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 25485, способны генерировать ферментированное молоко, обладающее высоким напряжением сдвига и/или закислять молоко (то есть достигать pH приблизительно 4,55) за меньшее время. Соответственно, композиция по настоящему изобретению способна производить по меньшей мере такое же напряжение сдвига, как напряжение сдвига, описанное для LAB по настоящему изобретению, либо в отдельности, либо в присутствии содействующего закислению, или вспомогательного, штамма, как описано в контексте первого аспекта настоящего изобретения.

Молочнокислые бактерии, в том числе бактерии видов *Lactococcus* sp., обычно поставляются в молочную промышленность в виде замороженных (F-DVS) или лиофилизированных (FD-DVS) культур для размножения производственных заквасок или в виде так называемых культур для «прямого внесения» (DVS), предназначенных для непосредственной инокуляции в ферментер или чан для получения молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт. Такие культуры молочнокислых бактерий обычно называют «стартерными культурами» или «заквасками». Соответственно, композиция по настоящему изобретению может быть замороженной или лиофилизированной. Кроме того, композиция по настоящему изобретению может быть представлена в жидкой форме. Так, в одном воплощении композиция находится в замороженной, высушенной, лиофилизированной или жидкой форме.

Композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать криопротекторы, лиопротекторы, антиоксиданты, питательные вещества, наполнители, корригенты или их смеси. Композиция предпочтительно содержит один или более из криопротекторов, лиопротекторов, антиоксидантов и/или питательных веществ, более предпочтительно криопротекторов, лиопротекторов и/или антиоксидантов и наиболее предпочтительно криопротекторов или лиопротекторов, или того и другого. Применение

веществ-протекторов, таких как криопротекторы и лиопротекторы, известно специалистам в данной области техники. Подходящие криопротекторы или лиопротекторы включают моно-, ди-, три- и полисахариды (такие как глюкоза, манноза, ксилоза, лактоза, сахароза, трегалоза, рафиноза, мальтодекстрин, крахмал и гуммиарабик (аравийская камедь) и т.п.), полиолы (такие как эритрит, глицерин, инозит, маннит, сорбит, трейт, ксилит и т.п.), аминокислоты (такие как пролин, глутаминовая кислота), сложные вещества (такие как обезжиренное молоко, пептоны, желатин, дрожжевой экстракт) и неорганические соединения (такие как триполифосфат натрия).

В одном воплощении композиция по настоящему изобретению может содержать один или несколько криозащитных агентов, выбранных из группы, состоящей из инозин-5'-монофосфата (IMP), аденозин-5'-монофосфата (AMP), гуанозин-5'-монофосфата (GMP), уранозин-5'-монофосфата (UMP), цитидин-5'-монофосфата (CMP), аденина, гуанина, урацила, цитозина, аденозина, гуанозина, уридина, цитидина, гипоксантина, ксантина, гипоксантина, оротидина, тимидина, инозина и производного любого из таких соединений. Подходящие антиоксиданты включают аскорбиновую кислоту, лимонную кислоту и их соли, галлаты, цистеин, сорбит, маннит, мальтозу. Подходящие питательные вещества включают сахара, аминокислоты, жирные кислоты, минералы, микроэлементы, витамины (такие как витамины группы В, витамин С). Возможно, композиция может содержать дополнительные вещества, включая наполнители (такие как лактоза, мальтодекстрин) и/или ароматизаторы.

В одном воплощении изобретения криозащитный агент представляет собой агент или смесь агентов, которые помимо своей криозащитной способности обладают бустерным эффектом.

Выражение «бустерный эффект» использовано для описания ситуации, когда криозащитный агент придает повышенную метаболическую активность размороженной или восстановленной культуре (бустерный эффект), когда ее инокулируют в среду для ферментации или преобразования. Жизнеспособность и метаболическая активность не являются синонимичными понятиями. Коммерчески замороженные или лиофилизированные культуры могут сохранять свою жизнеспособность, несмотря на потерю значительной части своей метаболической активности, например культуры могут утратить свою кислотопродуцирующую (закисляющую) активность при хранении даже в течение более коротких периодов времени. Таким образом, жизнеспособность и

бустерный эффект необходимо оценивать с помощью различных анализов. В то время как жизнеспособность оценивают с помощью анализов жизнеспособности, таких как определение колониеобразующих единиц, бустерный эффект оценивают путем количественного исследования соответствующей метаболической активности размороженной или восстановленной культуры по отношению к жизнеспособности культуры. Термин «метаболическая активность» относится к активности культур по утилизации кислорода, их кислотопродуцирующей активности, т. е. продуцированию, например, молочной кислоты, уксусной кислоты, муравьиной кислоты и/или пропионовой кислоты или их активности по продуцированию метаболитов, такой как продуцирование ароматических соединений, таких как ацетальдегид (а-ацетолактат, ацетоин, диацетил и 2,3-бутиленгликоль (бутандиол)).

В одном воплощении композиция по изобретению включает или содержит от 0,2% до 20% криозащитного агента или смеси агентов, измеренных в % масс./масс. материала. Однако предпочтительно добавлять криозащитный агент или смесь агентов в количестве, которое находится в диапазоне от 0,2% до 15%, от 0,2% до 10%, от 0,5% до 7% и от 1% до 6% по массе, в том числе в диапазоне от 2% до 5% криозащитного агента или смеси агентов, измеренных в % масс./масс. замороженного материала по массе. В предпочтительном воплощении культура содержит приблизительно 3% криозащитного агента или смеси агентов, измеренных в % масс./масс. материала по массе. Количество криозащитного вещества приблизительно 3% соответствует концентрациям в диапазоне 100 мМ. Следует признать, что для каждого аспекта воплощения изобретения диапазоны могут быть приращениями описанных диапазонов.

В одном воплощении композиция по изобретению может содержать загуститель и/или стабилизатор, такой как пектин (например, НМ пектин (пектин с высоким содержанием метоксильных групп), ЛМ пектин (пектин с низким содержанием метоксильных групп)), желатин, СМС (карбоксиметилцеллюлоза), соевое волокно/соевый полимер, крахмал, модифицированный крахмал, каррагинан, альгинат и гуаровая камедь.

В одном воплощении, в котором микроорганизм продуцирует полисахарид (такой как EPS), который обуславливает богатую/вязкую текстуру кисломолочного продукта, кисломолочный продукт производится по существу без или полностью без добавления какого-либо загустителя и/или стабилизатора, такого как пектин (например, НМ пектин,

LM пектин), желатин, СМС, соевое волокно/соевый полимер, крахмал, модифицированный крахмал, каррагинан, альгинат и гуаровая камедь. Выражение «по существу без» следует понимать, как то, что продукт содержит от 0% до 20% (масс./масс.) (например, от 0% до 10%, от 0% до 5%, или от 0% до 2%, или от 0% до 1%) загустителя и/или стабилизатора.

Применение штаммов LAB для повышения вязкости ферментированного молочного продукта

В третьем аспекте настоящего изобретения предложено применение штаммов LAB по настоящему изобретению, описанных в первом аспекте, и/или применение композиции по настоящему изобретению, описанной во втором аспекте, для повышения вязкости ферментированного молочного продукта. Так, в третьем аспекте настоящего изобретения предложен способ повышения вязкости (т.е. улучшения текстуры) ферментированного молочного продукта, включающий применение LAB по настоящему изобретению, описанных в первом аспекте и/или применение композиции по настоящему изобретению, описанной во втором аспекте.

Как описано выше, штаммы LAB по настоящему изобретению, описанные в первом аспекте, и композиции по настоящему изобретению, описанные во втором аспекте, способны генерировать ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига более 50 Па, предпочтительно более 55 Па, таким как выше 56 Па, например таким как приблизительно 51 Па, 55 Па, 58 Па, 60 Па, 61 Па, 62 Па, 64 Па, 65 Па, 66 Па, 67 Па, 69 Па, 70 Па, 72 Па, 75 Па, 80 Па, 85 Па, 86 Па, 87 Па, 88 Па, 89 Па, 100 Па, 110 Па, 115 Па, 120 Па, 121 Па или более, измеренное при скорости сдвига 300 c^{-1} , при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 c^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C . Напряжение сдвига измеряют, используя способ, указанный в Примере 1.

Как описано выше, штаммы LAB по настоящему изобретению, описанные в первом аспекте, и композиции по настоящему изобретению, описанные во втором аспекте, способны генерировать ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига более 24 Па, таким как приблизительно 35 Па, 36 Па, 45 Па, 47 Па, 54 Па, 56 Па, 57 Па, 60 Па, 62 Па, 63 Па, 64 Па, 71 Па, 74 Па, 75 Па, 79 Па, 86 Па, 88 Па, 93 Па, 96 Па, 99 Па, 102 Па, 106 Па или более, измеренное при скорости сдвига 300 с^{-1} , при измерении в следующих условиях:

200 мл соевого молока с добавлением 2% глюкозы (как описано в Примере 2), инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH приблизительно 4,55 (или выше/ниже, если штамм перестает закислять при более высоких/низких значениях pH, см. Таблицу 3, таких как pH 4,49, 4,53, 4,54, 4,55 или 4,66) с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C . Напряжение сдвига измеряют, используя способ, указанный в Примере 2.

Штаммы LAB по настоящему изобретению, описанные в первом аспекте, и композиции по настоящему изобретению, описанные во втором аспекте, способны генерировать ферментированные молочные продукты, обладающие напряжением сдвига 55 Па или более, предпочтительно более 56 Па, таким как приблизительно 58 Па, 60 Па, 64 Па, 65 Па, 70 Па, 75 Па, 80 Па, 90 Па, 95 Па или 98 Па, предпочтительно в присутствии содействующего закислению штамма, который предпочтительно выбран из DSM 25485, DSM 33192 и/или DSM 33133, еще более предпочтительно штамма DSM 25485, измеренным при скорости сдвига 300 с^{-1} , в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C . Напряжение сдвига измеряют, используя способ, указанный в Примере 1.

Что касается конкретного напряжения сдвига молока, ферментированного конкретными штаммами LAB по изобретению, в отдельности или в присутствии содействующего закислению, или вспомогательного, штамма, следует обращаться к первому аспекту настоящего изобретения и к Таблицам 1-3 в Примерах.

Как обсуждено в контексте первого аспекта настоящего изобретения, некоторые штаммы LAB по настоящему изобретению способны закислять молоко приблизительно за 13 часов или менее («быстро закисляющие» штаммы) при измерении, как описано выше, то есть 200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55. Таким образом, эти штаммы предпочтительно можно применять в отдельности или в комбинации с другими штаммами для генерирования ферментированного молока, в частности, для их применения в ферментированном молоке с повышенной вязкостью.

Кроме того, существуют некоторые штаммы LAB по настоящему изобретению, которые не способны закислять молоко приблизительно за 13 часов или менее при измерении, как описано выше, то есть 200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55. Их можно назвать «медленно закисляющими» штаммами (например, DSM 33192, DSM 33226, DSM 33194, DSM 33202, DSM 33223 и/или DSM 33195). Указанные штаммы можно успешно использовать в присутствии содействующего закислению, или вспомогательного, штамма, как определено в первом аспекте настоящего изобретения. В частности, эти штаммы можно успешно использовать в присутствии штамма DSM 25485 и/или штамма DSM 33192, и/или штамма DSM 33133, предпочтительно в присутствии штамма DSM 25485. Как описано выше, предпочтительно один или более штаммов *Lactococcus lactis* по изобретению, описанных в первом аспекте настоящего изобретения, и содействующий закислению, или вспомогательный, штамм, определенные в первом аспекте настоящего изобретения, применяют в комбинации в соотношении приблизительно 9:1 (штамм(ы) LAB по настоящему изобретению: содействующий(ие) закислению, или вспомогательный(ые), штамм(ы)).

Как показано в Таблице 1, когда молоко ферментируется штаммами DSM 33226, DSM 33194 и/или DSM 33195 и содействующим закислению штаммом DSM 25485, значения напряжения сдвига молока увеличиваются и/или «время достижения pH 4,55» (измеряемое как описано выше) уменьшается. Не ограничиваясь теорией, полагают, что, как описано выше, протеолитическая природа DSM 25485 позволяет расти и/или облегчает рост LAB по настоящему изобретению. Кроме того, полагают, что комбинация EPS, продуцируемого DSM 25485, и EPS, продуцируемого штаммом по настоящему изобретению, обеспечивает наблюдаемую повышенную вязкость ферментированного молока, измеряемую как напряжение сдвига, как описано выше.

Не ограничиваясь теорией, полагают, что эффект увеличения напряжения сдвига молока, ферментированного одной из LAB по настоящему изобретению и содействующим закислению штаммом DSM 25485 (см. Таблицу 1), будет также достигаться при инкубировании молока с одной из LAB по настоящему изобретению и штаммом DSM 33192. Штамм DSM 33192 также является вспомогательным штаммом и продуцирует EPS со структурой, подобной структуре EPS, продуцируемого штаммом DSM 25485.

Кроме того, не ограничиваясь теорией, полагают, что эффект увеличения напряжения сдвига молока, ферментированного одной из LAB по настоящему изобретению и содействующим закислению штаммом DSM 25485 (см. Таблицу 1), также будет достигаться при инкубировании молока с одной из LAB по настоящему изобретению, как описано выше, и одним или более из следующих штаммов: DSM 33193, DSM 33133, DSM 33196, DSM 33197, DSM 33200, DSM 33201, DSM 33203, DSM 33204, DSM 33205, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33222, DSM 33224, DSM 33225, DSM 33140, DSM 33142, DSM 33137, DSM 33192 и/или DSM 25485, предпочтительно одним или более из следующих штаммов DSM 33193, DSM 33196, DSM 33197, DSM 33200, DSM 33201, DSM 33205, DSM 33218, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33222, DSM 33224, DSM 33225, DSM 33137, DSM 33192 и/или DSM 25485. Указанные штаммы способны:

i) генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 15 ч или менее, предпочтительно за приблизительно 12 ч или менее, при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения значения pH приблизительно 4,55; и

ii) генерировать ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига 40 Па или более при измерении при скорости сдвига 300 с⁻¹ при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до pH 4,55 (время достижения pH 4,55) с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с⁻¹, где температура инокуляции составляет 30°C.

В конкретном воплощении третьего аспекта в настоящем изобретении предложено применение штамма *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 25485 для повышения вязкости ферментированного молочного продукта.

Кроме того, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что штамм DSM 25485 генерирует ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига более 45 Па, предпочтительно более 50 Па, более предпочтительно более 55 Па, таким как 56 Па, см. Таблицу 1, измеренным при скорости сдвига 300 с⁻¹, при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с⁻¹, где температура инокуляции составляет 30°C. Напряжение сдвига измеряют, используя способ, указанный в Примере 1.

В данном воплощении штамм DSM 25485 можно успешно применять в отдельности и/или в комбинации с одной или более LAB по настоящему изобретению,

описанными в первом аспекте настоящего изобретения. Предпочтительно штамм DSM 25485 применяют в комбинации с одной или более LAB по настоящему изобретению, описанными в первом аспекте настоящего изобретения, в соотношении приблизительно 9:1 (штамм(ы) LAB по настоящему изобретению : штамм DSM 25485).

Кроме того, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что штамм DSM 25485 генерирует ферментированное молоко, имеющее напряжение сдвига более 24 Па, предпочтительно более 30 Па, более предпочтительно более 50 Па, такое как 54 Па, см. Таблицу 2, измеренное при скорости сдвига 300 c^{-1} , при измерении в следующих условиях:

200 мл соевого молока с добавлением 2% глюкозы (как описано в Примере 2), инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий и оставляют при температуре инокуляции до pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 c^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C . Напряжение сдвига измеряют, используя способ, указанный в Примере 2.

В еще одном частном воплощении третьего аспекта настоящего изобретения предложено применение штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 33192 для повышения вязкости ферментированного молочного продукта.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что штамм DSM 33192 производит ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига более 40 Па, предпочтительно более 50 Па, более предпочтительно более 80 Па, еще более предпочтительно более 90 Па, таким как 94 Па, см. Таблицу 1, измеренным при скорости сдвига 300 c^{-1} , при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 c^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C . Напряжение сдвига измеряют, используя способ, указанный в Примере 1.

В данном воплощении штамм DSM 33192 можно успешно применять в отдельности и/или в комбинации с одной или более LAB по настоящему изобретению, описанными в первом аспекте настоящего изобретения. Предпочтительно штамм DSM 33192 используют в комбинации с одной или более LAB по настоящему изобретению, описанными в первом аспекте настоящего изобретения, в соотношении приблизительно 9:1 (штамм(ы) LAB по настоящему изобретению : штамм DSM 33192).

Кроме того, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что штамм DSM 33192 генерирует ферментированное молоко, имеющее напряжение сдвига более 24 Па, предпочтительно более 30 Па, более предпочтительно более 40 Па, еще более предпочтительно более 45 Па, такое как 47 Па, см. Таблицу 2, измеренное при скорости сдвига 300 с^{-1} , при измерении в следующих условиях:

200 мл соевого молока с добавлением 2% глюкозы (как описано в Примере 2), инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий и оставляют при температуре инокуляции до pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C . Напряжение сдвига измеряют, используя способ, указанный в Примере 2.

В конкретном воплощении третьего аспекта в настоящем изобретении предложено применение штамма *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 25485 и/или применение штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 33192 в качестве содействующих закислению, или вспомогательных, штаммов, предпочтительно их применение в комбинации с другими текстурирующими штаммами LAB, как описано в первом аспекте настоящего изобретения, для повышения вязкости ферментированного молочного продукта. Предпочтительно штаммы DSM 33192 и/или DSM 25485 применяют в комбинации с одним или более штаммом LAB по настоящему изобретению, описанными в первом аспекте настоящего изобретения, в соотношении приблизительно 9:1 (штамм(ы) LAB по настоящему изобретению : штаммы DSM 33192 и/или DSM 25485).

Способ получения пищевого продукта и пищевой продукт

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения пищевого продукта, включающему по меньшей мере одну стадию, на которой

применяют по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий, определенный в первом аспекте настоящего изобретения, и/или композицию, определенную во втором аспекте настоящего изобретения. Изготовление пищевого продукта осуществляют способами, известными специалисту в данной области.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к способу получения пищевого продукта, включающему по меньшей мере одну стадию, на которой применяют штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 25485 или его мутант или вариант.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к способу получения пищевого продукта, включающему по меньшей мере одну стадию, на которой применяют штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 33192 или его мутант или вариант.

«Ферментация» в контексте настоящего изобретения в любом из его воплощений означает превращение углеводов в спирты или кислоты под действием микроорганизмов (LAB). Процессы ферментации, используемые при получении пищевых продуктов, таких как молочные продукты, хорошо известны, и специалист в данной области знает, как выбрать подходящие условия процесса, такие как температура, кислород, количество микроорганизмов и время процесса. Очевидно, что условия ферментации выбирают таким образом, чтобы способствовать осуществлению настоящего изобретения, например для получения пищевого продукта, предпочтительно пищевого продукта, который имеет улучшенную текстуру по сравнению с пищевым продуктом, полученным способом, который не включает использование по меньшей мере одной из LAB, описанных в первом аспекте настоящего изобретения, или использование композиции, описанной во втором аспекте настоящего изобретения, в любом из его воплощений.

В одном предпочтительном воплощении способ по настоящему изобретению в любом из его воплощений включает ферментирование молочного субстрата, которым может быть субстрат на основе молока млекопитающих или молочный субстрат на растительной основе, такой как соевое молоко, композицией, содержащей по меньшей мере 1×10^6 КОЕ, предпочтительно по меньшей мере 1×10^8 КОЕ/мл всех штаммов LAB.

Например, способ по настоящему изобретению включает ферментирование молочного субстрата композицией, содержащей по меньшей мере 1×10^6 КОЕ, предпочтительно по меньшей мере 1×10^8 КОЕ/мл одного или более штаммов,

выбранных из: DSM 33193, DSM 33133, DSM 33196, DSM 33197, DSM 33200, DSM 33201, DSM 33202, DSM 33195, DSM 33203, DSM 33204, DSM 33205, DSM 33218, DSM 33219, DSM 33220, DSM 33221, DSM 33222, DSM 33223, DSM 33224 и/или DSM 33225.

Например, способ по настоящему изобретению включает ферментирование молочного субстрата композицией, содержащей по меньшей мере 1×10^6 КОЕ, предпочтительно по меньшей мере 1×10^8 КОЕ/мл штаммов DSM 33226 и DSM 25485.

Например, способ по настоящему изобретению включает ферментирование молочного субстрата композицией, содержащей по меньшей мере 1×10^6 КОЕ, предпочтительно по меньшей мере 1×10^8 КОЕ/мл штаммов DSM 33194 и DSM 25485.

Например, способ по настоящему изобретению включает ферментирование молочного субстрата композицией, содержащей по меньшей мере 1×10^6 КОЕ, предпочтительно по меньшей мере 1×10^8 КОЕ/мл штаммов DSM 33195 и DSM 25485.

В другом предпочтительном воплощении способ включает ферментирование молочного субстрата композицией, описанной во втором аспекте настоящего изобретения, в любом из его воплощений.

Предпочтительно пищевой продукт представляет собой молочный продукт, а способ в любом из его воплощений включает ферментирование молочного субстрата (в контексте настоящего изобретения также называемого «молочной основой») по меньшей мере одним штаммом LAB, и/или композицией по изобретению (первый и второй аспекты, соответственно), и/или штаммом DSM 25485, и/или штаммом DSM 33192.

Предпочтительно пищевой продукт представляет собой молочный продукт, а способ в любом из его воплощений включает ферментирование молочного субстрата на растительной основе (в контексте настоящего изобретения также называемого «молочной основой на растительной основе»), такого как соевое молоко, предпочтительно соевое молоко с добавлением глюкозы, например 0,5-5% глюкозы, предпочтительно 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно 2% глюкозы, по меньшей мере одним штаммом LAB и/или композицией по изобретению (первый и второй аспекты, соответственно).

Предпочтительно пищевой продукт по настоящему изобретению может дополнительно содержать загуститель и/или стабилизатор, такой как пектин (например, НМ пектин, ЛМ пектин), желатин, СМС, соевое волокно/соевый полимер, крахмал, модифицированный крахмал, каррагинан, альгинат и гуаровая камедь.

В конкретном воплощении пищевой продукт представляет собой молочный продукт, мясной продукт, овощной продукт, фруктовый продукт или зерновой продукт. В предпочтительном воплощении пищевой продукт представляет собой молочный продукт. В другом предпочтительном воплощении пищевой продукт представляет собой пищевой продукт на растительной основе, такой как ферментированное соевое молоко.

Термин «молочный продукт», используемый в настоящем документе, относится к пищевому продукту, изготавливаемому из молока. Как указано выше, в контексте настоящей заявки термин «молоко» широко применяется в его общепринятом значении и относится к жидкостям, произведенным молочными железами млекопитающих (например, коров, овец, коз, буйволов, верблюдов и т.д.) или растениями. В другом предпочтительном воплощении молоко представляет собой коровье молоко. В соответствии с настоящим изобретением молоко может быть обработанным, и термин «молоко» включает цельное молоко, снятое молоко, обезжиренное молоко, молоко с низким содержанием жира, молоко с полным содержанием жира, молоко с пониженным содержанием лактозы или концентрированное молоко. Обезжиренное молоко представляет собой не содержащий жира или снятый молочный продукт. Молоко с низким содержанием жира обычно характеризуют как молоко, содержащее от приблизительно 1% до приблизительно 2% жира. Молоко с полным содержанием жира часто содержит 2% жира или более. Термин «молоко» предназначен охватывать молоко от различных млекопитающих и из растительных источников. Млекопитающие - источники молока включают, без ограничения, корову, овцу, козу, буйвола, верблюда, ламу, кобылу и оленя. Растительные источники молока включают, без ограничения, молоко, экстрагированное из соевых бобов. В конкретном воплощении молоко представляет собой коровье молоко. В другом конкретном воплощении молоко представляет собой молоко на растительной основе, предпочтительно соевое молоко, в которое может предпочтительно быть добавлен сахар, например, такой как фруктоза, сахароза, кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы (HFCS), мед, глюкоза, инвертированный сахар, мальтоза, галактоза, лактоза или любая их комбинация. Концентрация сахара может составлять от 0,5% до 5%, от 0,5 до 2%, 0,5%, 1%, 1,5% или 2%, например 0,5-5% глюкозы, предпочтительно 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно 2% глюкозы.

Предпочтительными молочными продуктами в соответствии с настоящим изобретением являются ферментированные молочные продукты и сыр. В конкретном воплощении молочный продукт представляет собой мезофильный молочный продукт.

В конкретном воплощении изобретения ферментированный молочный продукт выбран из группы, состоящей из пахты, кислого молока, сквашенного молока, сметаны, кислых сливок, высокожирных сливок, культивированных сливок, юмера, ферментированной молочной сыворотки, кефира, якульта и молодого сыра, такого как кварк, творог и творожный сыр. В частности, ферментированный молочный продукт выбирают из группы, состоящей из кварка, сметаны и кефира. В предпочтительном воплощении изобретения ферментированный молочный продукт содержит дополнительный пищевой продукт, выбранный из группы, состоящей из фруктового напитка, зерновых продуктов, ферментированных зерновых продуктов, химически закисленных зерновых продуктов, продуктов из соевого молока, продуктов из ферментированного соевого молока и любой их смеси. В другом предпочтительном воплощении ферментированный молочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт на растительной основе, такой как ферментированное соевое молоко (например, «плантгурт» от компании «Alpro»).

Ферментированный молочный продукт обычно содержит белок на уровне от 1,0% по массе до 12,0% по массе, предпочтительно от 2,0% по массе до 10,0% по массе. В конкретном воплощении сметана содержит белок на уровне от 1,0% по массе до 5,0% по массе, предпочтительно от 2,0% по массе до 4,0% по массе. В конкретном воплощении кварк содержит белок на уровне от 4,0% по массе до 12,0% по массе, предпочтительно от 5,0% по массе до 10,0% по массе.

Предпочтительно пищевой продукт имеет улучшенную текстуру (улучшенную вязкость, измеренную как напряжение сдвига при 300 с^{-1} , как описано в настоящем изобретении и, например, в Примерах 1 и 2) по сравнению с пищевым продуктом, полученным с помощью сопоставимого способа, который не включает применение по меньшей мере одной LAB, описанной в первом аспекте настоящего изобретения, и/или применение композиции, описанной во втором аспекте настоящего изобретения, в любом из его воплощений, и/или применение содействующего закислению, или вспомогательного, штамма, описанных выше, предпочтительно штамма DSM 25485 и/или штамма DSM 33192.

Изобретение также относится к пищевому продукту, предпочтительно молочному продукту, содержащему по меньшей мере один штамм LAB, описанный в первом аспекте настоящего изобретения, и/или композицию, описанную во втором аспекте настоящего изобретения.

Способ получения штамма молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*

В пятом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения штамма молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* (LAB), включающий следующие стадии:

(a) предоставление штамма молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, содержащего активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* выбран из:

- (i) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1;
- (ii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2;
- (iii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3;
- (iv) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, и
- (v) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 5 нуклеотидов, предпочтительно не более чем на 4 нуклеотида, более предпочтительно не более чем на 3 нуклеотида, еще более предпочтительно не более чем на 2 нуклеотида, наиболее предпочтительно не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5,

(b) скрининг в отношении штамма молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, который:

- (i) способен генерировать ферментированное молоко, имеющее напряжение сдвига 40 Па или более, предпочтительно 50 Па или более, такое как более 56 Па, более предпочтительно 60 Па или более, еще более предпочтительно более 65 Па или более, такое как 70 Па или более, 75 Па или более, 80 Па или более, 85 Па или более, 90 Па или

более, 95 Па или более, 100 Па или более или 120 Па или более, измеренное при скорости сдвига 300 с^{-1} , при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C ; и/или

(ii) способен генерировать ферментированное молоко, имеющее напряжение сдвига более 24 Па, такое как приблизительно 35 Па, 36 Па, 45 Па, 47 Па, 54 Па, 56 Па, 57 Па, 60 Па, 62 Па, 63 Па, 64 Па, 71 Па, 74 Па, 75 Па, 79 Па, 86 Па, 88 Па, 93 Па, 96 Па, 99 Па, 102 Па, 106 Па или более, измеренное при скорости сдвига 300 с^{-1} , при измерении в следующих условиях:

200 мл соевого молока с добавлением 2% глюкозы (как описано в Примере 2) инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH приблизительно 4,55 (такого как pH 4,49, 4,53, 4,54, 4,55 или 4,66), с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C . Напряжение сдвига измеряют, используя способ, указанный в Примере 2.

В предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (a), представляет собой штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* выбран из:

- (i) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1;
- (ii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2;
- (iii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3;
- (iv) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, и
- (v) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5.

В предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (а), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 1, принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76, где анализ MLST осуществляют, как описано в Примере 4 настоящего описания, то есть по схеме MLST с 12 генами, разработанной в компании Chr. Hansen. Указанная схема основана на двенадцати генах *dnaK*, *fusA*, *groEL*, *gyrA*, *gyrB*, *ileS*, *lepA*, *pheS*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* и *rpoC*, выбранных из корового генома *Lactobacillaceae* (Salveti *et al.*, 2018). Всего в схеме используется 22493 п.н., которые представляют почти 1% от среднего генома *Lactococcus*. MLST-типирование полных геномных последовательностей на платформе Illumina осуществляют при помощи модуля CLC Microbial Genomics, встроенного в CLC Genomics Workbench v10. MLST в рамках CLC входит в специально разработанный в Chr. Hansen процесс стандартного анализа геномных последовательностей. Его осуществляют как на контигах *de novo*, так и на эталонных сборках.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (а), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 2, или содержащий кластер генов *eps*, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2, принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (а), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 3, или содержащий кластер генов *eps*, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3, принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (а), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 4, или содержащий кластер генов *eps*, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (а), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 5, или содержащий кластер генов *eps*, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 5 нуклеотидов, предпочтительно не более чем на 4 нуклеотида, более предпочтительно не более чем на 3 нуклеотида, еще более предпочтительно не более чем на 2 нуклеотида, наиболее предпочтительно не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5, принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST140.

Как обсуждено выше, анализ MLST осуществляют, как описано в Примере 4, то есть по схеме MLST с 12 генами, разработанной в компании Chr. Hansen. Указанная схема основана на двенадцати генах *dnaK*, *fusA*, *groEL*, *gyrA*, *gyrB*, *ileS*, *lepA*, *pheS*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* и *rpoC*, выбранных из корового генома *Lactobacillaceae* (Salveti *et al.*, 2018). Всего в схеме используется 22493 п.н., которые представляют почти 1% от среднего генома *Lactococcus*. MLST-типирование полных геномных последовательностей на платформе Illumina осуществляют при помощи модуля CLC Microbial Genomics, встроенного в CLC Genomics Workbench v10. MLST в рамках CLC входит в специально разработанный в Chr. Hansen процесс стандартного анализа геномных последовательностей. Его осуществляют как на контигах *de novo*, так и на эталонных сборках.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (а), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 1, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 15 ч или менее («время достижения pH 4,55» 15 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 13 ч или менее («время достижения pH 4,55» 13 ч или менее), более предпочтительно за приблизительно 12 ч или менее («время достижения pH 4,55» 12 ч или менее), еще более предпочтительно за приблизительно 11 ч или менее («время достижения pH 4,55» 11 ч или менее), при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл

ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (а), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 1, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 (таким как pH приблизительно 4,49, 4,53 или 4,55) за приблизительно 21 ч или менее («время достижения pH 4,55» 21 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 16 ч или менее («время достижения pH 4,55» 16 ч или менее), более предпочтительно за приблизительно 11 ч или менее («время достижения pH 4,55» 11 ч или менее), еще более предпочтительно за приблизительно 8 ч или менее («время достижения pH 4,55» 8 ч или менее), при измерении в следующих условиях:

200 мл соевого молока с глюкозой, например с 0,5-5% глюкозы, предпочтительно 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно 2% глюкозы, инокулируют ночной культурой микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) в объеме 1% (2 мл) и оставляют при температуре инокуляции (30°C) до достижения pH приблизительно 4,55 (такого как pH приблизительно 4,49, 4,53 или 4,55), как описано выше.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (а), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 2, или содержащий кластер генов *eps*, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 15 ч или менее («время достижения pH 4,55» 15 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 13 ч или менее («время достижения pH 4,55» 13 ч или менее), более предпочтительно за приблизительно 12 ч или менее («время достижения pH 4,55» 12 ч или менее), еще более предпочтительно за приблизительно 9 ч или менее («время достижения pH 4,55» 9 ч или менее), при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл

ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (а), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 2, или содержащий кластер генов *eps*, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 (таким как pH приблизительно 4,54, 4,55 или 4,66) за приблизительно 21 ч или менее («время достижения pH 4,55» 21 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 11 ч или менее («время достижения pH 4,55» 11 ч или менее), более предпочтительно за приблизительно 10,5 ч или менее («время достижения pH 4,55» 10,5 ч или менее), при измерении в следующих условиях:

200 мл соевого молока с глюкозой, например с 0,5-5% глюкозы, предпочтительно с 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно с 2% глюкозы инокулируют ночной культурой микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) в объеме 1% (2 мл) и оставляют при температуре инокуляции (30°C) до достижения pH приблизительно 4,55 (такого как pH приблизительно 4,54, 4,55 или 4,66), как описано выше.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (а), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 3, или содержащий кластер генов *eps*, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 14 ч или менее («время достижения pH 4,55» 14 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 12 ч или менее («время достижения pH 4,55» 12 ч или менее), при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (a), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 3, или содержащий кластер генов *eps*, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 7,5 ч или менее («время достижения pH 4,55» 7,5 ч или менее), при измерении в следующих условиях:

200 мл соевого молока с глюкозой, например с 0,5-5% глюкозы, предпочтительно с 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно с 2% глюкозы инокулируют ночной культурой микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) в объеме 1% (2 мл) и оставляют при температуре инокуляции (30°C) до достижения pH приблизительно 4,55.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (a), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 4, или содержащий кластер генов *eps*, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 13 ч или менее («время достижения pH 4,55» 13 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 11 ч или менее («время достижения pH 4,55» 11 ч или менее), при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (a), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 4, или содержащий кластер генов *eps*, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4,

способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 10 ч или менее («время достижения pH 4,55» 10 ч или менее), при измерении в следующих условиях:

200 мл соевого молока с глюкозой, например с 0,5-5% глюкозы, предпочтительно с 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно с 2% глюкозы инокулируют ночной культурой микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) в объеме 1% (2 мл) и оставляют при температуре инокуляции (30°C) до достижения pH приблизительно 4,55.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (а), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 5, или содержащий кластер генов *eps*, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 5 нуклеотидов, предпочтительно не более чем на 4 нуклеотида, более предпочтительно не более чем на 3 нуклеотида, еще более предпочтительно не более чем на 2 нуклеотида, наиболее предпочтительно не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 10 ч или менее («время достижения pH 4,55» 10 ч или менее), предпочтительно за приблизительно 8 ч или менее («время достижения pH 4,55» 8 ч или менее), при измерении в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции (30°C), и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55.

В еще одном предпочтительном воплощении штамм молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis*, предоставляемый на стадии (а), содержащий активный кластер генов *eps*, определенный в SEQ ID NO: 5, или содержащий кластер генов *eps*, охарактеризованный нуклеотидной последовательностью, отличающейся не более чем на 5 нуклеотидов, предпочтительно не более чем на 4 нуклеотида, более предпочтительно не более чем на 3 нуклеотида, еще более предпочтительно не более чем на 2 нуклеотида, наиболее предпочтительно не более чем на 1 нуклеотид от

нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5, способен генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за приблизительно 10,5 ч или менее («время достижения pH 4,55» 10,5 ч или менее), при измерении в следующих условиях:

200 мл соевого молока с глюкозой, например с 0,5-5% глюкозы, предпочтительно с 0,5-2% глюкозы, более предпочтительно приблизительно с 2% глюкозы инокулируют ночной культурой микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) в объеме 1% (2 мл) и оставляют при температуре инокуляции (30°C) до достижения pH приблизительно 4,55.

Специалисту в области техники известны способы предоставления штамма молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis* согласно стадии (a). Например, штаммы могут быть выделены из различных источников, а кластер генов *eps* может быть секвенирован способами, известными в области техники. Кроме того, могут быть получены мутанты, а кластер генов *eps* мутантов может быть секвенирован способами, известными в области техники. Штаммы молочнокислых бактерий (LAB) *Lactococcus lactis* согласно стадии (a) также могут быть получены при помощи генной инженерии. Для амплификации определенного фрагмента ДНК при помощи ПЦР (полимеразная цепная реакция) можно использовать олигонуклеотиды, несущие желаемый кластер генов *eps*. Фрагмент ПЦР, несущий желаемую последовательность, клонируют в векторную плазмиду и трансформируют другой целевой штамм молочнокислых бактерий (LAB).

Настоящее изобретение охватывает любую комбинацию вышеописанных элементов, аспектов и воплощений во всех их возможных вариациях, если иное не указано в настоящем документе или иным образом явно не противоречит контексту. Воплощения настоящего изобретения, описанные ниже, служат только в качестве примеров.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Высокопроизводительный скрининг текстурирующих штаммов и измерение текстуры молочного геля

L. lactis применяют для получения многочисленных ферментированных молочных продуктов, включая сыр и мезофильное ферментированное молоко, таких как

пахта и сметана. Штаммы, продуцирующие полисахариды, представляют большой интерес для этих применений, поскольку полисахариды, высвобождаемые в среду, могут привести к улучшению текстурных свойств пахты и сметаны, а капсульные полисахариды могут привести к улучшению влагоудерживающей способности и, таким образом, к увеличению выхода, например, сыра.

Молоко (жидкость) обычно превращается в молочный гель (мягкое твердое вещество) при ферментации молочнокислыми бактериями, обычно принадлежащими, например, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus lactis* spp. Для оценки реологических свойств геля ферментированного молока, таких как напряжение сдвига, обычно используют реометр или анализатор текстуры. Измерения напряжения сдвига связаны с ощущением густоты во рту, когда текстуру молочных гелей оценивает комиссия по сенсорному анализу. Высокая степень густоты, ощущаемой в полости рта, считается важным фактором качества кисломолочных гелей, таких как йогурт, и принятие потребителями часто очень тесно связано со свойствами текстуры, такими как степень густоты, ощущаемая в полости рта, которая является функцией напряжения сдвига.

Для скрининга текстурирующих штаммов согласно описанию Poulsen *et al.*, 2019, использовали устройство для работы с жидкостями Hamilton Robotics MicroLab Star, оснащенное датчиками давления, расположенными внутри цилиндров вытеснения воздуха индивидуальных пипеток. Устройство для работы с жидкостями имеет датчики давления, расположенные в головном пространстве канала каждой пипетки. Данные о давлении от каждого датчика собирали с помощью программного обеспечения TADM (полного мониторинга аспирации и дозирования) устройства для работы с жидкостями Hamilton Robotics MicroLab Star (Hamilton Robotics) и использовали для оценки относительного напряжения сдвига образцов молочного геля.

Проводили скрининг текстурирующих свойств *L. lactis* из библиотеки для скрининга высокопроизводительных штаммов с использованием инструмента TADM робота для работы с жидкостями Hamilton, как указано выше, в масштабе 2 мл. Данные зависимости давления от времени (TADM) получали на образцах объемом 2 мл, приготовленных в 96-луночной планшете для микротитрования, куда инокулировали молоко категории В в течение 20 часов при 30°C в присутствии различных штаммов (1% инокулята) если не указано иное, и затем хранили при 4°C в течение 1 суток. Для

измерения давления при аспирации использовали устройство для работы с жидкостями Hamilton, а площадь над кривыми давления, полученными при аспирации, использовали для сравнения текстурирующих способностей штаммов.

Данные о напряжении сдвига получали путем инокуляции тех же микробных культур в молоко средней жирности (1,5% жира); молоко нагревали при 90°C в течение 20 минут и охлаждали до температуры инокуляции перед инокуляцией 1% объема ночной микробной культуры. Инокуляцию проводили в течение 8-22 ч при 30°C в объеме 200 мл до pH приблизительно 4,55 с последующим охлаждением до 4°C и хранением до измерения напряжения сдвига обычно в течение 1-7 суток, например в течение 5 суток при 4°C. После хранения ферментированное молоко осторожно перемешивали при помощи палочки, снабженной перфорированным диском, до гомогенности образца. Напряжение сдвига образцов оценивали при помощи реометра (Anton Paar Physica Rheometer with ASC, Automatic Sample Changer, Anton Paar® GmbH, Austria) со следующими настройками:

- Время ожидания (для восстановления в некоторой степени исходной структуры)
- 5 минут без колебания или вращения
- Вращение (для измерения напряжения сдвига при 300 с⁻¹ и так далее)
- $\dot{\gamma} = [0,2707-300] \text{ с}^{-1}$ и $\dot{\gamma} = [275-0,2707] \text{ с}^{-1}$

21 точка измерения в течение 210 с (каждые 10 с) при повышении до 300 с⁻¹ и 21 точка измерения в течение 210 с (по одной каждые 10 с) при снижении до 0,2707 с⁻¹. Для анализа данных выбирали напряжение сдвига при скорости сдвига 300 с⁻¹.

При помощи реометра подтвердили хорошую текстурирующую способность 22 новых штаммов DSM 33193, 33226, 33194, 33133, 33195, 33196, 33197, 33200, 33201, 33202, 33203, 33204, 33205, 33218, 33219, 33220, 33221, 33222, 33223, 33224, 33225 и 33192, как описано выше. Кроме того, при помощи реометра также подтвердили хорошую текстурирующую способность штамма DSM 25485, как описано выше. Результаты приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Напряжение сдвига и время достижения pH 4,55 для отобранных текстурирующих штаммов (1% инокулята) ± дрожжевой экстракт (0,2%, подробности см. ниже) ± возможный содействующий закислению штамм (DSM 24649 или DSM 25485) инкубировали в прошедшем тепловую обработку молоке средней жирности при

30°C. Некоторые из исследуемых штаммов являются медленно закисляющими, и для закисления молока за приемлемое время, например 13 ч или менее, для достижения pH 4,55 им необходимо либо присутствие дрожжевого экстракта, либо содействующего закислению штамма. Штаммы DSM 24649 и DSM 25485 использовали в отдельности или в комбинации с исследуемыми штаммами и/или в качестве возможных содействующих закислению штаммов (10% инокулята, что соответствует соотношению 9:1 (отобранный текстурирующий штамм : содействующий закислению штамм). Как правило, использовали 1% инокулята штаммов в молоке (т.е. 2 мл инокулята ночной культуры в среде M17, добавленной к 200 мл молока). Когда в качестве инокулята использовали один штамм, 2 мл (100%) этого штамма добавляли к 200 мл молока (1% инокулята в молоке). При использовании штамма вместе с содействующим закислению штаммом использовали 90% исследуемого штамма (1,8 мл) и 10% (0,2 мл) содействующего закислению штамма (10% инокулята для содействующего закислению штамма, соотношение 9:1 (отобранный текстурирующий штамм : содействующий закислению штамм)).

Рег. номер	Напряжение сдвига				Время достижения pH 4,55, ч				MLST
	в отдельности	+	+	+	в отдельности	+	+	+	
		24649	25485	дрож. экстр.		24649	25485	дрож. экстр.	
<i>DSM 24649</i>	20				8				ST45
<i>DSM 25485</i>	56				12				ST76
<i>DSM 33192</i>	94			88	14			12	ST47
<i>DSM 33193</i>	86				11				ST76
<i>DSM 33226</i>		64	98			14			ST76
<i>DSM 33194</i>		58	95	83		15			ST76
<i>DSM 33133</i>	75			69	8			7	ST140
<i>DSM 33195</i>	88	30	80		22	10	19		ST76
<i>DSM 33196</i>	86				11				ST76
<i>DSM 33197</i>	121			90	12			8	ST76
<i>DSM 33200</i>	66				9				ST76
<i>DSM 33201</i>	62				12				ST76
<i>DSM 33202</i>	51				16				ST76
<i>DSM 33203</i>	65				13				ST76
<i>DSM 33204</i>	95				13				ST76
<i>DSM 33205</i>	61				12				ST76
<i>DSM 33218</i>	69				11				ST76
<i>DSM 33219</i>	87				13				ST76
<i>DSM 33220</i>	89				12				ST76

<i>DSM 33221</i>	70	11	ST76
<i>DSM 33222</i>	64	12	ST76
<i>DSM 33223</i>	60	18	ST76
<i>DSM 33224</i>	67	12	ST76
<i>DSM 33225</i>	69	11	ST76

Поскольку улучшенная текстура связана с продуцированием полисахаридов, проводили поиск кластеров генов *eps*. Кластеры генов *eps* обычно находятся на хромосоме у *L. lactis* subsp. *lactis*, но могут располагаться на плазмиде у *L. lactis* subsp. *cremoris* (Poulsen *et al.* 2019). Как правило, кластеры генов *eps* очень разнообразны, а их нуклеотидные последовательности являются одними из наиболее вариабельных последовательностей в геномах LAB. Кроме того, структурная вариабельность молекул полисахаридов огромна. Тип и размер полисахаридов и их взаимодействие с молочными белками является определяющим фактором для развития текстуры.

Все 22 штамма (DSM 33193, 33226, 33194, 33133, 33195, 33196, 33197, 33200, 33201, 33202, 33203, 33204, 33205, 33218, 33219, 33220, 33221, 33222, 33223, 33224, 33225 и 33192) имели кластеры генов *eps*, подобные таковым штамма NIZO B40 (Фиг. 1). Поскольку известно, что у *L. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 кластер генов *eps* расположен на плазмиде, вероятно, что в упомянутых штаммах он также расположен на плазмиде.

Кроме того, полагают, что вышеупомянутые штаммы могут отличаться составом своих геномов и могут отличаться фенотипически, см. Пример 5.

Пример 2. Реологические измерения текстуры соевого молока

Проводили реологические измерения 22 штаммов *L. lactis* в соевом молоке с добавлением 2% глюкозы.

В данном Примере исследовали следующие штаммы: DSM 24649; DSM 25485; DSM 33192; DSM 33193; DSM 33226; DSM 33194; DSM 33133; DSM 33195; DSM 33196; DSM 33197; DSM 33200; DSM 33201; DSM 33202; DSM 33203; DSM 33204; DSM 33205; DSM 33218; DSM 33219; DSM 33220; DSM 33221; DSM 33222; DSM 33223; DSM 33224 и DSM 33225.

В качестве молочной основы использовали соевое молоко с добавлением 2% глюкозы. Соевое молоко было органическим и неподслащенным, полученным от Naturli' Foods, и имело следующий состав на 100 мл:

Жиры: 2,1 г - в том числе насыщенные жиры: 0,4 г

Углеводы: 0,1 г - в том числе сахара: 0,1 г

Волокна: 0,6 г

Белок: 3,7 г

Соль: 0,04 г

Молоко было уже стерилизованным, никакой предварительной обработки перед его применением не проводили. В него добавляли 2% глюкозы.

1% по объему ночной культуры микроорганизмов (полученной путем инокуляции культуры микроорганизмов в среду M17 с добавлением 2% глюкозы при 30°C) инокулировали соевое молоко с 2% глюкозы. Инокуляцию проводили при 30°C в объеме 200 мл до достижения pH приблизительно 4,55 (конкретные значения pH, достигавшиеся в каждой культуре, приведены в Таблице 3) с последующим охлаждением до 4°C и хранением до измерения напряжения сдвига обычно в течение 1-7 суток, например в течение 5 суток. После хранения ферментированное молоко осторожно перемешивали при помощи палочки, снабженной перфорированным диском, до гомогенности образца. Напряжение сдвига в образцах оценивали при помощи реометра (Anton Paar Physica Rheometer with ASC, Automatic Sample Changer, Anton Paar® GmbH, Austria), со следующими настройками:

- Время ожидания (для восстановления в некоторой степени исходной структуры)
- 5 минут без колебания или вращения
- Вращение (для измерения напряжения сдвига при 300 с⁻¹ и так далее)
- $\dot{\gamma} = [0,2707-300] \text{ с}^{-1}$ и $\dot{\gamma} = [275-0,2707] \text{ с}^{-1}$

21 точка измерения в течение 210 с (каждые 10 с) при повышении до 300 с⁻¹ и 21 точка измерения в течение 210 с (по одной каждые 10 с) при снижении до 0,2707 с⁻¹. Для анализа данных выбирали напряжение сдвига при скорости сдвига 300 с⁻¹.

Результаты измерения напряжения сдвига (Па) приведены в Таблице 2 ниже. «Alpro» относится к «Alpro naturell soft & creamy plantgurt», имеющемуся в продаже ферментированному соевому молоку от «Alpro» (<https://www.alpro.com/se/produkter/vaxtbaserad-yoghurt-variant/mild-creamy/mild-creamy-naturell/>), имеющему следующий состав на 100 мл:

Энергетическая ценность	210 кДж / 50 ккал
Жиры	2,3 г

Насыщенные жирные кислоты	0,4 г
Мононенасыщенные	0,5 г
Полиненасыщенные	1,4 г
Углеводы	2,1 г
Сахар	2,1 г
Волокна	1 г
Белок	4 г
Соль	0,3 г
Витамины	
Витамин D	0,75 мкг
Витамин B12	0,38 мкг
Минералы	
Кальций	120 мг

И со следующими ингредиентами: Вода, очищенные соевые бобы (7,9%), сахар, трикальцийцитрат, стабилизатор (**пектин**), регуляторы кислотности (цитрат натрия, лимонная кислота), морская соль, антиоксиданты (богатый токоферолом экстракт, сложные эфиры аскорбиновой кислоты и пищевых жирных кислот), витамины (B12, D2), йогуртовая культура (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*). Следует отметить, что Alpro содержит пектин, который улучшает текстуру ферментированного молока. Однако молочная основа, которую использовали в данном Примере (соевое молоко с добавлением 2% глюкозы), не содержит пектин.

Таблица 2. Напряжение сдвига (Па) при нескольких скоростях сдвига (с^{-1}) для отобранных текстурирующих штаммов (1% инокулята), инкубированных в соевом молоке без 2% глюкозы, как описано выше.

Образец (DSM)	Напряжение сдвига (Па) при скорости сдвига (с ⁻¹)																				
	0,27	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225	240	255	270	285	300
Alpro	17	36	40	42	44	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	56	57	58	60	60
DSM 24649	7	16	18	19	20	20	21	21	21	21	22	22	22	23	23	23	23	24	24	24	24
DSM 33193	7	40	57	69	78	86	92	98	102	105	107	109	110	110	110	110	109	109	108	107	106
DSM 33226	5	25	37	47	55	61	66	71	74	77	79	81	82	83	84	85	85	85	85	85	86
DSM 33194	6	27	43	54	63	70	75	80	84	87	89	91	92	93	93	93	93	93	93	93	93
DSM 33133	5	15	21	27	32	36	39	42	45	47	49	50	51	52	53	54	55	55	56	56	57
DSM 33195	3	19	34	46	55	63	69	73	76	79	80	81	82	82	82	82	81	81	80	80	79
DSM 33196	6	28	45	56	66	74	80	86	90	93	95	97	98	99	99	99	99	99	99	99	99
DSM 33197	5	30	44	55	63	71	77	82	86	89	91	93	95	96	97	97	97	97	97	97	96
DSM 33200	4	15	18	20	23	24	26	27	28	29	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35
DSM 33201	4	15	19	23	26	29	31	33	35	36	37	38	39	40	41	42	43	43	44	45	45
DSM 33202	5	18	21	23	25	27	28	29	30	31	31	32	32	33	33	33	34	34	35	36	36
DSM 33203	5	18	25	33	38	43	46	50	52	54	56	58	59	60	61	62	62	62	63	64	64
DSM 33204	6	24	38	49	58	65	71	75	79	81	84	85	86	87	88	88	88	88	88	88	88
DSM 33205	6	23	35	46	53	58	62	66	69	71	72	73	74	75	75	75	75	75	75	75	74
DSM 33218	4	16	21	26	31	35	39	42	45	47	49	50	51	52	53	54	54	55	56	56	56

DSM 33219	5	16	23	31	38	44	49	54	58	61	64	66	68	70	71	72	73	74	74	75	75
DSM 33220	6	37	56	68	77	84	90	94	98	100	102	103	104	104	104	104	103	103	102	102	102
DSM 33221	5	18	27	35	39	43	47	50	52	54	56	57	58	59	60	60	61	61	61	61	62
DSM 33222	5	16	22	29	35	40	44	47	50	53	55	57	58	59	60	61	62	62	63	63	63
DSM 33223	9	33	41	46	50	54	57	60	62	64	65	67	68	69	70	70	70	71	71	71	71
DSM 33224	5	16	21	27	33	38	43	46	50	52	54	56	57	59	60	60	61	62	62	62	63
DSM 33225	4	16	20	24	29	33	37	40	43	45	47	49	50	51	52	53	54	55	55	56	56
DSM 25485	6	17	25	30	34	38	41	43	45	47	48	49	50	51	52	52	53	53	54	54	54
DSM 33192	5	16	21	25	29	32	35	37	39	40	41	42	43	43	44	45	46	46	46	47	47

Как следует из Таблицы 2, все отобранные текстурирующие штаммы показали более высокое напряжение сдвига при ферментации соевого молока с добавлением 2% глюкозы по сравнению с отрицательным контролем (DSM24649). Кроме того, штаммы DSM 33221, DSM 33224, DSM 33222, DSM 33203, DSM 33223, DSM 33205, DSM 33219, DSM 33195, DSM 33226, DSM 33204, DSM 33194, DSM 33197, DSM 33196, DSM 33220 и DSM 33193 демонстрировали более высокое напряжение сдвига по сравнению с имеющимся в продаже ферментированным соевым продуктом «Alpro», содержащим пектин, как описано выше.

Наконец, в **Таблице 3** показаны значения pH, достигавшиеся каждым из штаммов, и время достижения этого pH (в часах).

Таблица 3. Время достижения pH для отобранных текстурирующих штаммов (1% инокулята), инкубированных в соевом молоке с 2% глюкозы, как описано выше.

Штамм	Достигнутое значение pH	Время достижения pH, ч
Alpro		
DSM 24649	4,55	8
DSM 33193	4,55	14
DSM 33226	4,55	11
DSM 33194	4,55	13,5
DSM 33133	4,55	10,5
DSM 33195	4,55	13,5
DSM 33196	4,55	14
DSM 33197	4,55	15
DSM 33200	4,54	10,5
DSM 33201	4,55	11
DSM 33202	4,66	21
DSM 33203	4,55	10,5
DSM 33204	4,55	14
DSM 33205	4,55	8
DSM 33218	4,49	7,5
DSM 33219	4,55	16
DSM 33220	4,55	14,5
DSM 33221	4,53	10
DSM 33222	4,55	7,5
DSM 33223	4,55	21
DSM 33224	4,55	8
DSM 33225	4,55	10

DSM 25485	4,55	16
DSM 33192	4,55	14

Пример 3. Секвенирование геномов штаммов лактококков и характеристика их кластеров генов *eps*

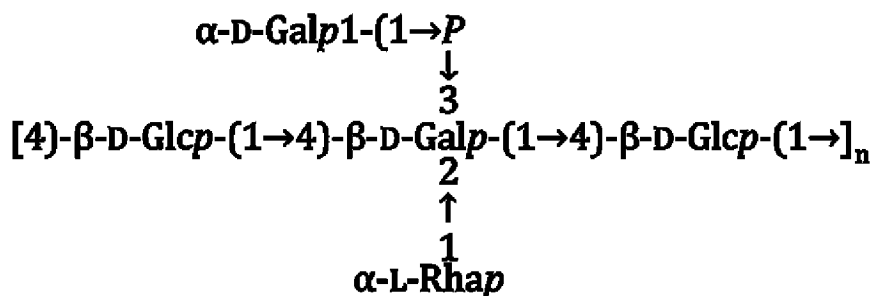
Геном штаммов секвенировали самостоятельно в компании Chr. Hansen, как описано Agersø *et al.* (Agersoe *et al.*, 2018). Кратко, общую ДНК очищали и использовали для получения библиотеки спаренных концевых фрагментов 250 п.н. для секвенирования генома с использованием системы Illumina MiSeq. Отсекали нуклеотиды с низким качеством прочтения (показатель Phred менее 25) и объединяли в контиги, используя алгоритм сборки *de novo* в программе CLC Genomics Workbench версии 10.1.1 (CLC bio, Qiagen Bioinformatics). Осуществляли фильтрацию полученной сборки генома путем удаления контигов с покрытием менее 15X и/или менее 20% от медианного значения покрытия сборки. Консенсусную последовательность оставшихся контигов переводили в формат FASTA, который называется черновой последовательностью генома, и использовали в последующем анализе последовательности.

В **Таблице 4** ниже показана матрица процентов идентичности кластеров генов *eps* вышеуказанных штаммов. Для оценки идентичности последовательностей (на уровне нуклеотидов) кластера генов *eps* штаммов использовали инструмент для множественного выравнивания последовательностей Clustal Omega (Clustal2.1) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) со стандартными параметрами.

Таблица 4. Матрица идентичности Идентичность между двумя штаммами выражали в виде числа (в %), находящегося на пересечении соответствующих штаммов (идентифицируемых по их регистрационному номеру DSM), один из которых находится в строке, а другой в столбце.

	33133	33222	33200, 33201, 33202, 33203	33225	B40	33192, 33193, 33226, 33194, 33195, 33196, 33197, 33204, 33205, 33218, 33219, 33220, 33221, 33223, 33224
33133	100	99,95	99,95	99,95	99,95	99,96
33222	99,95	100	99,98	99,98	99,98	99,99
33200, 33201, 33202, 33203	99,95	99,98	100	99,98	99,98	99,99
33225	99,95	99,98	99,98	100	99,98	99,99
B40	99,95	99,98	99,98	99,98	100	99,99
33192, 33193, 33226, 33194, 33195, 33196, 33197, 33204, 33205, 33218, 33219, 33220, 33221, 33223, 33224	99,96	99,99	99,99	99,99	99,99	100

Штамм NIZO B40 несет плазмиду EPS pNZ4000 размером 42180 п.н. (van Kranenburg *et al.*, 2000), содержащую кластер генов NIZO B40 *eps* размером 12 т.п.н. с 14 скоординированно экспрессирующимися генами. Этот штамм продуцирует полимер из следующих повторяющихся звеньев: $\rightarrow 4)[\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 2)][\alpha\text{-D-Galp-1-PO}_4\text{-3}]\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$ (van Casteren *et al.*, 1998):



Функциональность генов кластера генов *eps* *L. lactis* NIZO B40 рассмотрена в обзорах Kleerebezem *et al.*, 2002 и van Kranenburg *et al.*, 1999. На основании сравнения последовательностей нескольким генам *eps* можно присвоить предполагаемые функции, предсказывая их участие в биосинтезе олигосахаридов из повторяющихся звеньев путем последовательного добавления сахаров к заякоренному в мембране липидному носителю и последующем экспорте (благодаря *wzx*) и полимеризации (благодаря *wzy*) этих связанных с липидом олигосахаридов. EpsE связывает глюкозо-1-фосфат от UDP-глюкозы с липидным носителем, GT1 и GT2 присоединяют глюкозу от UDP-глюкозы к связанной с липидом глюкозе, а GT3 присоединяет галактозу от UDP-галактозы к связанной с липидом целлобиозе. Белок, содержащий домен Glyphos_trans (pfam04464) представляет собой фосфотрансферазу, которая предположительно задействована в биосинтезе EPS в качестве галактозилфосфотрансферазы, или фермента, который отделяет олигосахаридный остов от липидного носителя. GT4 предположительно задействован в присоединении рамнозы к повторяющемуся звену B40-EPS (Kleerebezem *et al.*, 2002; van Kranenburg *et al.* 1999).

Кластер генов *eps* штаммов DSM 33193, 33226, 33194, 33133, 33195, 33196, 33197, 33200, 33201, 33202, 33203, 33204, 33205, 33218, 33219, 33220, 33221, 33222, 33223, 33224, 33225 и 33192 является подобным, но не идентичным кластеру генов *L. lactis* NIZO B40. Он включает в себя 15 открытых рамок считывания (ORF), ориентированных в одном и том же направлении транскрипции, за исключением последнего гена кластера, *lytR* (Фиг. 1). Как показано на матрице идентичности, кластеры генов *eps* являются подобными, но не идентичными кластеру генов *eps* штамма NIZO B-40. В штамме NIZO

В40 обнаруживали по меньшей мере один однонуклеотидный полиморфизм по сравнению со штаммами DSM 33193, 33226, 33194, 33133, 33195, 33196, 33197, 33200, 33201, 33202, 33203, 33204, 33205, 33218, 33219, 33220, 33221, 33222, 33223, 33224, 33225 и 33192. Нуклеотидом в положении 1276 является G у В40 и А у всех штаммов Chr. Hansen. Это приводит к аминокислотной замене в белке EpsC основной аминокислоты аргинина (R, представлен CGA) в NIZO В40 на полярную аминокислоту глутамин (Q, представлен CAA) в штаммах Chr. Hansen. Аминокислотная замена может влиять, например, на количество продуцируемого EPS, что в свою очередь может влиять на текстуру молока, ферментированного этими штаммами.

Гены *eps* с одинаковыми названиями часто имеют разные функции у различных организмов, поскольку зачастую генам дают названия в алфавитном порядке по мере их появления в заданном локусе, а не на основании их функций (см. обзор Zeidan *et al.*, 2017). В штамме NIZO В40 полимеразы EPS обозначена как *epsI*, а ген экспортера – как *epsK* (например, van Kranenburg *et al.*, 2000), тогда как у SMQ-461 гены с соответствующими функциями обозначены как *epsH* и *epsM*. Авторы настоящего изобретения обозначали консервативные гены штаммов в соответствии с номенклатурой, предложенной Zeidan *et al.* (2017) (Фиг. 1). В настоящей заявке на патент гены полимеразы и флиппазы обозначены как *wzu* и *wzx*, соответственно, тогда как гены *epsABCD* у van Kranenburg *et al.* (2000) соответствуют *epsCDBE* у Poulsen *et al.* (2019) и в настоящей заявке на патент.

Пример 4. Анализ MLST (мультилокусного секвенирования-типирования)

Чтобы исследовать, существует ли сходство в остальной части генома у штаммов, содержащих NIZO В40-подобные кластеры генов *eps*, применяли анализ MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) и метод «отпечатков пальцев» (фингерпринтинг).

Штаммы лактококков типировали по схеме MLST с 12 генами, разработанной в компании Chr. Hansen. Указанная схема основана на двенадцати генах *dnaK*, *fusA*, *groEL*, *gyrA*, *gyrB*, *ileS*, *lepA*, *pheS*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* и *rpoC*, выбранных из корового генома *Lactobacillaceae* (Salveti *et al.*, 2018). Всего в схеме используется 22493 п.н., которые представляют собой почти 1% от среднего генома *Lactococcus*. MLST-типирование полных геномных последовательностей на платформе Illumina осуществляли при помощи модуля CLC Microbial Genomics, который встроен в CLC Genomics Workbench v10. В CLC MLST включен в специально разработанный процесс стандартного анализа

геномных последовательностей. Его осуществляют как на контигах *de novo*, так и на эталонных сборках.

Результаты анализа представлены в Таблице 1. Несмотря на то, что штаммы DSM 33193, 33226, 33194, 33195, 33196, 33197, 33201, 33203, 33204, 33205, 33218, 33219, 33220, 33221, 33222, 33223, 33224 и 33225 относятся к той же группе MLST, что и NIZO B40 (ST76), не все из них имеют одинаковый фенотип, если судить по их текстуре (регистрируемой как напряжение сдвига) и скорости закисления («время достижения pH 4,55») (см. Таблицу 1). Кроме того, как показано в Примере 5 ниже, между штаммами существуют дополнительные различия.

Пример 5. Фенотипические характеристики штаммов

Штаммы характеризовали в нескольких различных исследованиях. Схема эксперимента для характеристики штаммов по их текстурирующим, закисляющим молоко свойствам и предпочтениям к среде (например, источнику углерода) в формате 96-луночных планшетов для микротитрования показаны на Фиг. 3. Для сравнения штаммов по способности закислять молоко категории В использовали такие показатели закисления молока, полученные по кривым закисления в объеме 2 мл и 0,2 мл планшетов для микротитрования, как минимальное значение pH и V_{max} . Закисление молока в присутствии дрожжевого экстракта осуществляли путем закисления молока категории В, содержащего 0,2% дрожжевой экстракт. Для оценки толерантности штаммов к соли, что является важной характеристикой, если штаммы предполагается применять для производства сыра, штаммы инкубировали в молоке категории В при 30°C в течение 2 ч, а затем переносили 50 мкл в другой планшет для микротитрования, содержащий 150 мкл молока $\pm$ 4% соли. Способность штаммов использовать различные источники углерода оценивали, выращивая штаммы в среде M17, содержащей 2% различных источников углерода, таких как лактоза, глюкоза, сахароза, фруктоза, галактоза, ксилоза, мальтоза, трегалоза (1%), или используя воду в качестве контроля. Для оценки толерантности штаммов к низину, который является антибактериальным пептидом, продуцируемым некоторыми штаммами *L. lactis* и применяется в качестве пищевого консерванта, измеряли способность штаммов закислять молоко категории В в присутствии и в отсутствие низина (0,2 мг/мл хризина, что соответствует 4,52 мкг/мл низина). Толерантные к низину штаммы определяли как штаммы, у которых добавление низина не влияло на кривые закисления по сравнению со закислением в отсутствие низина. У этих штаммов лаг-период и угол наклона кривой закисления молока одинаковы в присутствии и в отсутствие низина. Для оценки устойчивости или чувствительности

штаммов к фагам в молоко добавляли смесь 50 различных фагов, выделенных из различных штаммов-хозяев, имеющихся в компании Chr. Hansen, производящей штаммы *L. lactis*. Если на кривые закисления молока не влияло присутствие пула фагов, и они были одинаковыми в присутствии и в отсутствие фагов, штаммы считали резистентными к фагам.

На Фиг. 2 показаны различия между новыми текстурирующими штаммами. Для уменьшения размерности большого массива данных использовали анализ главных компонент (РСА), так чтобы каждый штамм (у которого измеряли несколько параметров) был представлен одной точкой. Штаммы, располагающиеся близко друг к другу на графике РСА (Фиг. 2А) являются подобными по своим фенотипическим характеристикам. Данные, использованные для построения графика РСА, визуализированы на Фиг. 2В. Как можно заметить на Фиг. 2А и 2В, штаммы не являются идентичными между собой. Например, обнаружили, что штаммы DSM 33133, 33200 и 33202 резистентны к фагам, тогда как остальные штаммы чувствительны к пулу из 50 фагов, использованных для анализа. Обнаружили, что DSM 33133 является толерантным к низину, тогда как остальные штаммы на Фиг. 2 были чувствительными. Кроме того, DSM 33133 имеет иной фоновый генотип по сравнению с остальными штаммами с Фиг. 2, поскольку он относится к другой группе MLST (Таблица 1).

Депонирование и решение экспертизы

По просьбе заявителя образец депонированных микроорганизмов, указанных ниже, может быть доступен только эксперту до даты выдачи патента. В частности, заявитель требует, чтобы доступ к депонированному микроорганизму, указанному в правиле 33 ЕРС, осуществлялся только путем выдачи образца независимому эксперту, назначенному запрашивающей стороной (правило 32(1) ЕРС).

Таблица 5. Депонирование, осуществленное Заявителем, CHR. HANSEN A/S, в учреждении-депозитарии, получившем статус Международного депозитария в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры: *Институт Лейбница DSMZ-Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур*, Inhoffenstr. 7B, 38124 Брауншвейг, Германия.

Штамм	Рег. номер	Дата депонирования
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	DSM 25485	14 декабря 2011
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	DSM 24649	15 марта 2011

<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM 29291	21 августа 2014
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33137	28 мая 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33139	28 мая 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33140	28 мая 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33192	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33142	28 мая 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33201	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33133	28 мая 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33225	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33222	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33203	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33200	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33193	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33196	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33197	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33204	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33205	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33220	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33221	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33218	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33219	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33224	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33202	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33195	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33194	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33226	3 июля 2019
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM 33223	3 июля 2019

Литература

1. Zeidan *et al.*, 2017, Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiol Rev* 41: 168-200.
2. Bentley S.D. *et al.*, 2006, Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes, *PLoS Genet.* 2:e31.
3. Dabour N., LaPointe G., 2005, Identification and Molecular Characterization of the Chromosomal Exopolysaccharide Biosynthesis Gene Cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461, *Appl Environ Microbiol.*, 71: 7414–7425.
4. Nierop Groot M.N., Kleerebezem M., 2007, Mutational analysis of the *Lactococcus lactis* NIZO B40 exopolysaccharide (EPS) gene cluster: EPS biosynthesis correlates with unphosphorylated EpsB, *J Appl Microbiol.*, 103: 2645-2656.
5. Pan D., Mei X. 2010, Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12, *Carbohydrate Polymers*, 80: 908-914.
6. Savijoki, K., *et al.*, 2006, Proteolytic systems of lactic acid bacteria, *Appl Microbiol Biotechnol*, 71: 394–406
7. Suzuki C. *et al.*, 2013, Novel exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, and the diversity of *epsE* genes in the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 77: 2013-2018.
8. Tangyu *et al.*, 2019, Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:9263–9275.
9. van Kranenburg R. *et al.*, 1999, Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity, *J Bacteriol.*, 181: 6347-6353.
10. Whittall J.J. *et al.*, 2015, Topology of *Streptococcus pneumoniae* CpsC, a Polysaccharide co-polymerase and BY-kinase adaptor protein, *J Bacteriol* 197: 120-127.
11. Kleerebezem *et al.* (2002) Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling. *J. Biotechnol.* 98: 199-213.
12. van Kranenburg *et al.* (1999) Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40: functional analysis of the glycosyltransferase genes involved in synthesis of the polysaccharide backbone, *J Bacteriol.*, 181: 338-340.
13. van Kranenburg *et al.* (2000) Nucleotide sequence analysis of the lactococcal EPS plasmid pNZ4000, *Plasmid*, 43: 130-136.

14. van Casteren *et al.* (1998) Characterisation and modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B40, Carbohydrate Polymers, 37: 123-130.
15. Agersoe Y *et al.* (2018) Antimicrobial susceptibility testing and tentative epidemiological cutoff values for five bacillus species relevant for use as animal feed additives or for plant protection, Appl Environ Microbiol, 84 (19).
16. Salvetti *et al.*, 2018, Comparative genomics of the genus *Lactobacillus* reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification, Appl Environ Microbiol., 84 (17) doi: 10.1128/AEM.00993.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* выбран из:

- (i) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1;
- (ii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2;
- (iii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3;
- (iv) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, и
- (v) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 5 нуклеотидов от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5,

где штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, охарактеризованный в SEQ ID NO.: 1, принадлежит к группе MLST (мультилокусного секвенирования-типирования) ST76, где анализ MLST осуществляют, как описано в Примере 4.

2. Штамм молочнокислых бактерий по п. 1, представляющий собой штамм, который

- (i) генерирует ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига 50 Па или более, измеренным при скорости сдвига 300 c^{-1} , измеренным в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с

последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C ; и/или

- (ii) генерирует ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига 24 Па или более, измеренным при скорости сдвига 300 с^{-1} , измеренным в следующих условиях:

200 мл соевого молока с добавлением 2% глюкозы (как описано в Примере 2) инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH приблизительно 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C .

3. Штамм текстурирующих молочнокислых бактерий по п. 1 (i), где штамм молочнокислых бактерий представляет собой штамм, который генерирует ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига 80 Па или более, измеренным при скорости сдвига 300 с^{-1} , в присутствии штамма молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 25485 или его мутанта или варианта, где напряжение сдвига измеряют в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штаммов молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C .

4. Штамм молочнокислых бактерий по любому из пп. 1-3, выбранный из:

- (i) Штамма DSM 33204 или его мутанта или варианта;
 Штамма DSM 33205 или его мутанта или варианта;
 Штамма DSM 33220 или его мутанта или варианта;
 Штамма DSM 33221 или его мутанта или варианта;
 Штамма DSM 33218 или его мутанта или варианта;
 Штамма DSM 33219 или его мутанта или варианта;
 Штамма DSM 33224 или его мутанта или варианта;

- Штамма DSM 33197 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33196 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33195 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33194 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33226 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33223 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33193 или его мутанта или варианта; и
- Штамма DSM 33192 или его мутанта или варианта;
- (ii) Штамма DSM 33200 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33201 или его мутанта или варианта;
- Штамма DSM 33202 или его мутанта или варианта; и
- Штамма DSM 33203 или его мутанта или варианта;
- (iii) Штамма DSM 33222 или его мутанта или варианта;
- (iv) Штамма DSM 33225 или его мутанта или варианта;
- (v) Штамма DSM 33133 или его мутанта или варианта.

5. Композиция, содержащая по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* по любому из пп. 1-4 и дополнительный штамм молочнокислых бактерий, где дополнительный штамм молочнокислых бактерий способен (i) генерировать ферментированное молоко с pH приблизительно 4,55 за 15 часов или меньше, предпочтительно за 12 часов или меньше, и способен (ii) генерировать ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига 40 Па или более, измеренным при скорости сдвига 300 с^{-1} , измеренным в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55 ((i) время достижения pH 4,55) с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} ((ii) напряжение сдвига), где температура инокуляции составляет 30°C .

6. Композиция по п. 5, содержащая по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* по любому из пп. 1-4 и (a) штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*,

способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* содержит нуклеотидные последовательности (a), (b) и (c), (a-c4) как определено в (vi), или (б) штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащий активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* является таким, как определено в (vii):

(vi) (a): нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий полимеразной активностью и имеющий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 6955-8145 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой здесь как *wzy*);

(b): нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий активностью переносчика полисахаридов и имеющий по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 9309-10727 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой здесь как *wzx*); и

(c): нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, обладающий гликозилтрансферазной (GT) активностью, содержащая:

(c1): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 4008-4478 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой здесь как GT1);

(c2): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 4478-4960 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой здесь как GT2);

(c3): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 5015-5965 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой здесь как GT3); и

(c4): нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности аминокислотной последовательности, кодируемой нуклеотидами 6026-6955 SEQ ID NO: 1 (обозначаемой здесь как GT4);

(vii) нуклеотидная последовательность, определенная в SEQ ID NO: 5.

7. Композиция по любому из пп. 5-6, содержащая штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* по любому из пп. 1-4 и:

(i) штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 25485 или его мутант или вариант; и/или

(ii) штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 33192 или его мутант или вариант; и/или

(iii) штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* DSM 33133 или его мутант или вариант.

8. Применение штамма молочнокислых бактерий, определенного в любом из пп. 1-4, или композиции, определенной в любом из пп. 5-7, для повышения вязкости ферментированного молочного продукта.

9. Способ получения пищевого продукта, включающий по меньшей мере одну стадию, на которой используют по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий, определенный в любом из пп. 1-4, и/или композицию, определенную в любом из пп. 5-7.

10. Способ по п. 9, где пищевой продукт представляет собой молочный продукт и способ включает ферментирование молочного субстрата по меньшей мере одним штаммом молочнокислых бактерий, определенным в любом из пп. 1-4, и/или композицией, определенной в любом из пп. 5-7.

11. Пищевой продукт, содержащий по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий, определенный в любом из пп. 1-4, и/или композицию, определенную в любом из пп. 5-7.

12. Применение штамма *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 25485 и/или штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 33192 для повышения вязкости ферментированного молочного продукта.

13. Применение по п. 12, где ферментированный молочный продукт имеет напряжение сдвига 50 Па или более, предпочтительно 55 Па или более, еще более предпочтительно 80 Па или более, такое как 80 Па, 95 Па или 98 Па, измеренное при скорости сдвига 300 с^{-1} , измеренное в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C .

14. Применение по любому из пп. 12-13, где (i) штамм *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DSM 25485 и/или (ii) штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 33192 используют в комбинации с по меньшей мере одним из штаммов молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, определенных в любом из пп. 1 - 4.

15. Применение по п. 8, где ферментированный молочный продукт обладает напряжением сдвига 24 Па или более, таким как приблизительно 35 Па, 36 Па, 45 Па, 47 Па, 54 Па, 56 Па, 57 Па, 60 Па, 62 Па, 63 Па, 64 Па, 71 Па, 74 Па, 75 Па, 79 Па, 86 Па, 88 Па, 93 Па, 96 Па, 99 Па, 102 Па, 106 Па или более, измеренным при скорости сдвига 300 с^{-1} , измеренным в следующих условиях:

200 мл соевого молока с добавлением 2% глюкозы (как описано в Примере 2) инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH приблизительно 4,55 (такого как pH 4,49, 4,53, 4,54, 4,55 или 4,66) с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 с^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C .

16. Штамм молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 33192.

17. Способ получения штамма молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, включающий следующие стадии:

(a) предоставление штамма молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, содержащего активный кластер генов *eps*, способных продуцировать экзополисахарид (EPS), где кластер генов *eps* выбран из:

- (i) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1;
- (ii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 2;
- (iii) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 3;
- (iv) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 1 нуклеотид от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 4, и

(v) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5, или нуклеотидной последовательности, отличающейся не более чем на 5 нуклеотидов от нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 5;

(b) скрининг в отношении штамма молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, который:

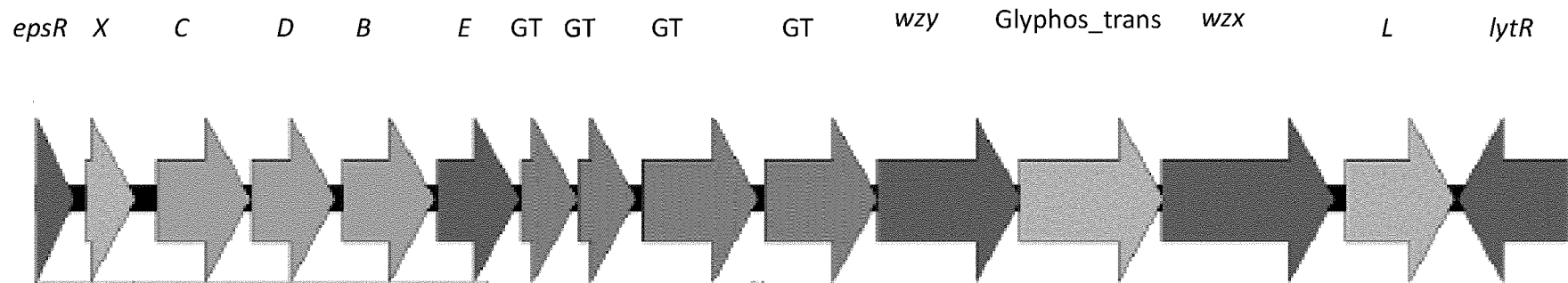
(i) способен генерировать ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига 40 Па или более, предпочтительно 50 Па или более, измеренным при скорости сдвига 300 c^{-1} , измеренным в следующих условиях:

200 мл молока средней жирности (1,5% жира) нагревают до 90°C в течение 20 мин с последующим охлаждением до температуры инокуляции, и инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий, и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH 4,55 с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 c^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C ; и/или

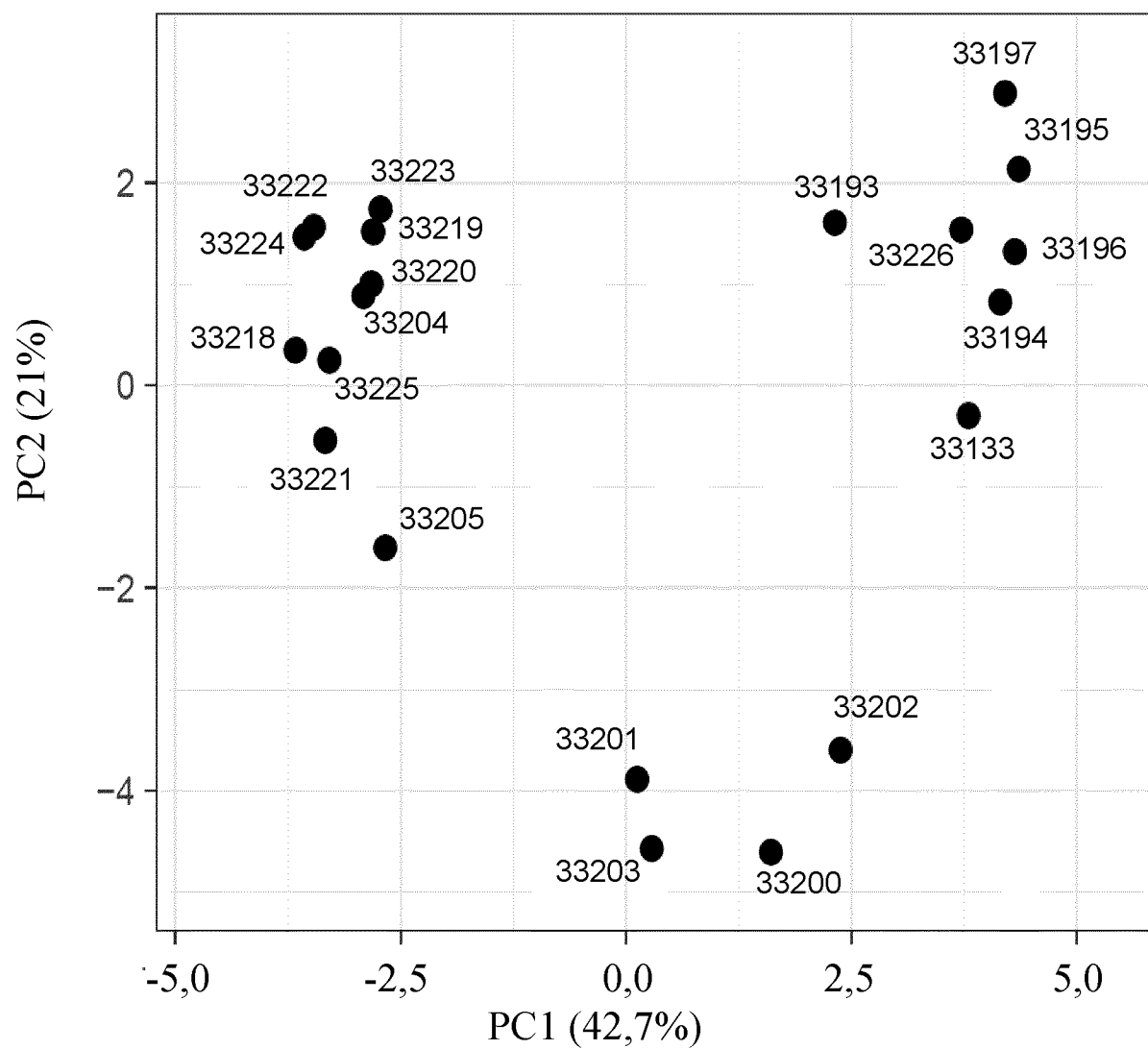
(ii) способен генерировать ферментированное молоко, обладающее напряжением сдвига более 24 Па, таким как приблизительно 35 Па, 36 Па, 45 Па, 47 Па, 54 Па, 56 Па, 57 Па, 60 Па, 62 Па, 63 Па, 64 Па, 71 Па, 74 Па, 75 Па, 79 Па, 86 Па, 88 Па, 93 Па, 96 Па, 99 Па, 102 Па, 106 Па или более, измеренным при скорости сдвига 300 c^{-1} , измеренным в следующих условиях:

200 мл соевого молока с добавлением 2% глюкозы (как описано в Примере 2) инокулируют 2 мл ночной культуры штамма молочнокислых бактерий и оставляют при температуре инокуляции до достижения pH приблизительно 4,55 (такого как pH 4,49, 4,53, 4,54, 4,55 или 4,66) с последующим хранением при 4°C до измерения напряжения сдвига обычно от 1 до 7 суток, например в течение 5 суток, с последующим осторожным перемешиванием и измерением напряжения сдвига при скорости сдвига 300 c^{-1} , где температура инокуляции составляет 30°C .

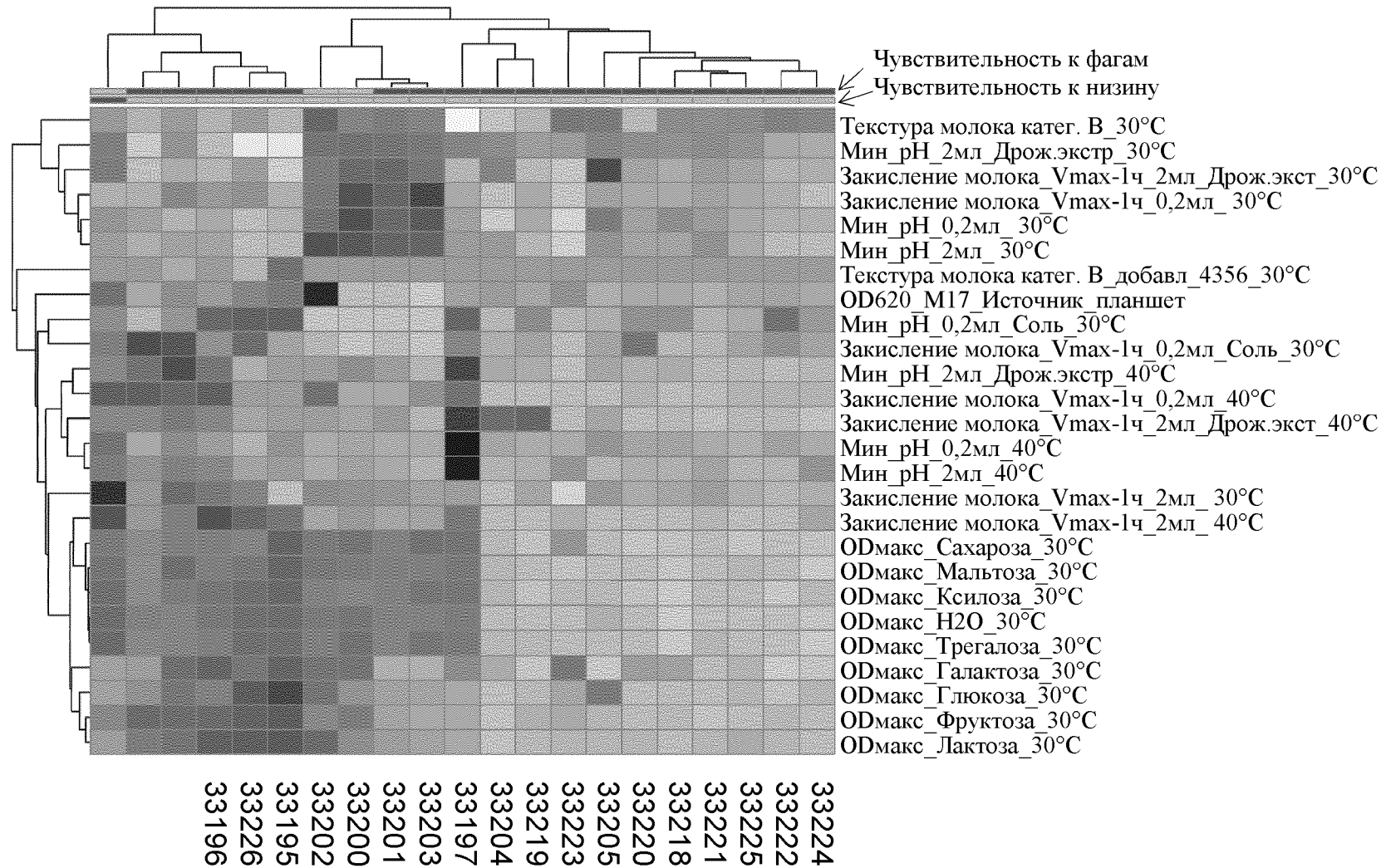
Фиг. 1



Фиг. 2 А



Фиг. 2 В



Фиг. 3

