

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042276**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.30

(51) Int. Cl. *A23C 9/123* (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)

(21) Номер заявки
201991967

(22) Дата подачи заявки
2018.03.21

(54) **КОМПОЗИЦИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ С УЛУЧШЕННОЙ ПРИРОДНОЙ
СЛАДОСТЬЮ И ВКУСОМ**

(31) **17163311.8**

(32) **2017.03.28**

(33) **EP**

(43) **2020.03.02**

(86) **PCT/EP2018/057153**

(87) **WO 2018/177835 2018.10.04**

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

(72) Изобретатель:
**Блок Соня, Бухгорн Гелле Леттир
(DK)**

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

(56) **US-A-2015086675**

**KIM I. SØRENSEN ET AL: "ABSTRACT",
APPLIED AND ENVIRONMENTAL
MICROBIOLOGY, vol. 82, no. 12, 15 June 2016
(2016-06-15) , pages 3683-3692, XP055337824,
ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.00462-16
abstract page 3687, column 1, paragraph 3 page
3687, column 2, paragraph 2 - page 3691, column 1,
paragraph 1**

WO-A1-2015193449

US-A1-2005196388

**ROBERT W HUTKINS ET AL: "Use of
Galactose-Fermenting Streptococcus thermophilus in
the Manufacture of Swiss, Mozzarella, and Short-
Method Cheddar Cheese", JOURNAL OF DAIRY
SCIENCE., vol. 69, no. 1, 1986, pages 1-8,
XP055385723, US ISSN: 0022-0302 page 2, column
2, paragraph 2**

WO-A1-2015193459

(57) Настоящее изобретение относится к композиции для получения ферментированного молочного продукта, содержащей (1) по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus* (St), где данный штамм St является галактозоферментирующим, где данный штамм несет мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где данная мутация инактивирует белок глюкокиназу или имеет отрицательное влияние на экспрессию этого гена, и (2) по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* (Lb), где данный штамм Lb является лактозодефицитным и способен метаболизировать нелактозный углевод.

B1

042276

042276 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции для получения ферментированного молочного продукта, содержащей (1) по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus* (St), где данный штамм St является галактозоферментирующим, где данный штамм несет мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где данная мутация инактивирует белок глюкокиназу или имеет отрицательное влияние на экспрессию этого гена, и (2) по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* (Lb). Такую композицию используют для получения ферментированных молочных продуктов с улучшенным сладким вкусом.

Предшествующий уровень техники

Чистые ферментированные молочные продукты распознают по терпкому или кислому вкусу в результате превращения лактозы до молочной кислоты молочнокислыми бактериями во время ферментации. Их, следовательно, часто подслащивают добавлением фруктов, меда, сахара или искусственных подсластителей для удовлетворения желания потребителей в отношении продукта с более сладким вкусом.

Пищевая промышленность имеет все более и более высокую потребность в низкокалорийных пищевых продуктах со сладким вкусом для того, чтобы помочь преодолеть проблемы лишнего веса и ожирения, которые стали такими распространенными за последние 20 лет. Сладкий вкус, обычно рассматриваемый как приятное ощущение, вызывается присутствием Сахаров и некоторых других веществ. Восприятие вкуса Сахаров является очень разным. Используя сахарозу в качестве эталона как 100, сладость лактозы составляет 16, галактозы - 32 и глюкозы - 74 (Godshall (1988). *Food Technology* 42(11): 71-78). Глюкоза, таким образом, воспринимается более чем в 4 раза слаще, чем лактоза, все еще имея приблизительно такой же уровень калорий.

Сахар в ферментированных пищевых продуктах чаще заменяют подсластителями, такими как аспартам, ацесульфам К, сукралоза и сахарин, которые могут давать сладкий вкус с меньшим потреблением калорий. Однако, применение искусственных подсластителей может приводить к постороннему привкусу, и несколько исследований, показывающих то, что потребление искусственных подсластителей связано с недостатками, такими как усиленное чувство голода, аллергии, рак и т.д., способствовало предпочтению потребителей в отношении ферментированных молочных продуктов, которые содержат только природные подсластители или, предпочтительно, не содержат добавленного подсластителя.

Таким образом, особая задача состоит в разработке ферментированных молочных продуктов, у которых имеется сильный природный (собственный) сладкий вкус.

Кислотность ферментированных молочных продуктов в значительной степени зависит от присутствующих молочнокислых бактерий и параметров способа, используемого для приготовления ферментированного молочного продукта.

Ферментация дисахарида лактозы очень хорошо исследована у молочнокислых бактерий, так как она является главным источником углерода в молоке. У многих видов лактоза расщепляется после потребления β -галактозидазой на глюкозу и галактозу. Глюкоза фосфорилируется глюкокиназой до глюкозо-6-фосфата и ферментируется посредством пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (гликолиз) большинством молочнокислых бактерий (см. чертеж).

Streptococcus thermophilus представляет собой одну из чаще всего используемых молочнокислых бактерий для промышленной термофильной ферментации молока, где данный организм обычно используют как часть смешанной заквасочной культуры, причем другим компонентом являются виды *Lactobacillus*, например *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* для йогурта или *Lactobacillus helveticus* для сыра швейцарского типа.

Стандартизованное определение йогурта во многих странах требует присутствия *Streptococcus thermophilus* наряду с *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*. Оба вида генерируют желательные количества ацетальдегида, который является важным вкусовым компонентом в йогурте.

Лактоза и сахароза легче ферментируются *Streptococcus thermophilus*, чем их составные моносахариды. В присутствии избытка галактозы ферментируется только глюкозная часть молекулы лактозы, и при использовании *Streptococcus thermophilus* в ферментированных молочных продуктах накапливается галактоза. В йогурте, где высокие концентрации кислоты ограничивают ферментацию, остается свободная галактоза, тогда как свободная галактоза, продуцируемая на ранних стадиях изготовления швейцарского сыра, позднее ферментируется *Lactobacillus helveticus*.

Однако несколькими исследователями были описаны галактозоферментирующие штаммы и *Streptococcus thermophilus*, и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* (Hutkins et al. (1986) *J. Dairy Sci.* 69(1): 1-8; Vaillancourt et al. (2002) *J. Bacteriol.* 184(3): 785-793), и в WO 2011/026863 (Chr. Hansen) описан способ получения штаммов *Streptococcus thermophilus*, которые являются галактозоферментирующими.

Для того чтобы удовлетворять требованиям пищевой промышленности, стало подходящим предлагать новые штаммы, в частности штаммы *Streptococcus thermophilus* и штаммы *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, которые дают более натуральный сладкий вкус без дополнительных калорий непосредственно в ферментированном продукте (собственный сладкий вкус) посредством выделения глюкозы.

Pool et al. (2006. *Metabolic Engineering* 8(5); 456-464) раскрывают штамм *Lactococcus lactis*, в котором метаболизм глюкозы полностью нарушен посредством делеции генов, кодирующих глюкокиназу, ЕП(man/glc) и недавно открытую глюкозо-PTS ЕП(cel). Способом конструирования является генетическая рекомбинация для получения всех мутаций, и полученный в результате штамм, следовательно, является генетически модифицированным организмом (ГМО), который в настоящее время не может быть использован в пищевых продуктах.

Thompson et al. (1985. *J Bacteriol.* 162(1); 217-223) исследовали метаболизм лактозы у *Streptococcus lactis* (в настоящее время переименован в *Lactococcus lactis*). В данной работе использовали 2-дезоксиглюкозу для получения мутанта в системе маннозо-PTS. Затем данный мутант был подвергнут мутагенезу ультрафиолетовым облучением (УФ) с последующим скринингом на глюкозоотрицательные колонии методом отпечатков. Этим методом был выделен двойной мутант (маннозо-PTS и глюкокиназа). Данный двойной мутант использовали для исследования механизмов, участвующих в регуляции ферментации лактозы "заквасочными" организмами. Данные мутанты имеют несколько недостатков по сравнению с их родительским штаммом, которые делают их неподходящими для включения в имеющуюся в продаже заквасочную культуру. Выход клеток мутантов составлял половину от выхода родительского штамма на моль ферментированной лактозы, и у мутантов было значительно увеличено время удвоения при выращивании на лактозе. Подобным образом, выход молочной кислоты составлял половину от выхода родительского штамма на моль ферментированной лактозы. Поведение данных штаммов в молоке не анализировали, но предполагается, что скорость подкисления была бы значительно снижена.

Кроме того, *Lactococcus lactis* обычно не выбирают для продуцирования ацетальдегида, и он не способствует выполнению требований для стандартизованного определения йогурта.

Chervaux et al. (2000. *Appl. And Environ. Microbiol.*, 66, 5306-5311) исследовали физиологию штаммов *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* в новой химически определенной среде и выделили мутантов, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе, которые были дефицитными по ферментации глюкозы. Наблюдали несколько разных фенотипов, и были описаны специфичные для штаммов эффекты.

В WO2013/160413 раскрыты штаммы *Streptococcus thermophilus* и штаммы *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* с улучшенными свойствами в отношении природного подслащивания пищевых продуктов и уменьшения содержания лактозы ферментированного молока, и способ скрининга и выделения таких штаммов.

В WO2015/193449 раскрыт способ получения ферментированного молочного продукта с очень низкой концентрацией лактозы с использованием комбинации лактазы и молочнокислых бактерий с недостаточностью в метаболизме глюкозы.

В WO2015/193459 раскрыт способ получения ферментированного молочного продукта с пониженным уровнем последующего закисления, в котором в одном воплощении используют смесь четырех штаммов молочнокислых бактерий с недостаточностью в метаболизме глюкозы, и в котором в другом воплощении используется смесь дефицитных по лактозе штаммов молочнокислых бактерий.

Задача настоящего изобретения заключается в предложении композиции для получения ферментированного молочного продукта, содержащей по меньшей мере один глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, где данная композиция дает ферментированный молочный продукт с улучшенным вкусом.

Краткое изложение сущности изобретения

Данная задача достигается с использованием настоящего изобретения, которое направлено на композицию для получения ферментированного молочного продукта, содержащую (1) по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus* (St), где данный штамм St является галактозоферментирующим, где данный штамм несет мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующей белок глюкокиназу, где данная мутация инактивирует белок глюкокиназу или имеет отрицательное влияние на экспрессию этого гена, и (2) по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* (Lb), где данный штамм Lb является лактозодефицитным и способен метаболизировать нелактозный углевод.

Хорошо известно, что для традиционных заквасочных культур для получения ферментированных молочных продуктов, содержащих штамм *Streptococcus thermophilus* и штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, имеется риск формирования нежелательных привкусов, например от свободных аминокислот, например глутаминовой кислоты. Кроме того, хорошо известно, что привкусы формируются штаммом *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, и что уровень сформировавшихся привкусов зависит от уровня роста указанного штамма, который варьирует в зависимости от целого ряда факторов, таких как уровень инокуляции штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, тип ростовой среды и ростовые условия ферментации, а также специфический штамм *Streptococcus thermophilus* и штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, используемые в заквасочной культуре. Теперь обнаружили, что для заквасочных культур для получения ферментированного молочного продукта с усиленным сладким вкусом, содержащего по меньшей мере один глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, формирование нежелательных привкусов находится на особенно высоком уровне. Это согласуется с тем фактом, что в таких заквасочных культурах штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* вырастает до особенно большого числа клеток.

Неожиданно обнаружили, что проблема привкусов при использовании заквасочных культур с глюкозодефицитным штаммом *Streptococcus thermophilus* может быть решена посредством применения лактозодефицитного штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, например лактозодефицитного глюкозоположительного штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*. Также обнаружили, что лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, используемый в композиции по изобретению, не приводит к какому-либо последующему закислению. Наконец, обнаружили, что лактозодефицитная *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* в комбинации с глюкозодефицитными штаммами *Streptococcus thermophilus* дают очень большое число клеток по сравнению с традиционными, т.е. лактозоположительными глюкозоположительными штаммами *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

Весьма неожиданно то, что можно избежать формирования привкусов, например от лактозодефицитного глюкозоположительного штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, и избежать последующего закисления в виду того факта, что *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* является глюкозоположительным и присутствует в ферментированном молочном продукте, содержащем глюкозу, где в теории данный штамм имел бы способность продолжать расти во время хранения ферментированного молочного продукта.

Кроме того, даже более неожиданным является то, что можно избежать формирования привкусов от штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* и избежать последующего закисления, получая в то же время большое число клеток штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, так как обычно ожидалось, что и привкусы, и последующее закисление возникают из-за роста штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

Не будучи связанными теорией полагают, что неожиданные эффекты по настоящему изобретению обусловлены различиями в метаболизме лактозодефицитной *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* по изобретению по сравнению с традиционной лактозоположительной *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

Краткое описание графических материалов

На чертеже представлено схематическое изображение катаболизма лактозы у *Streptococcus thermophilus*. GlcK - глюкокиназа; LacS - транспортер лактозы; LacZ - β -галактозидаза; GalM - мутаротаза; GalK - галактокиназа; GalT - галактозо-1-фосфатуридилтрансфераза; GalE - УДФ-глюкозо-4-эпимераза; GalP - галактозо-1-фосфат.

Подробное описание изобретения

Определения.

Термин "молочнокислая бактерия" в том виде, в котором он здесь используется, означает грамположительную микроаэрофильную или анаэробную бактерию, которая ферментирует сахара с образованием кислот, включая молочную кислоту в качестве преимущественно продуцируемой кислоты, уксусную кислоту и пропионовую кислоту. Самые полезные с промышленной точки зрения молочнокислые бактерии находятся в пределах порядка "Lactobacillales", который включает *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. и *Propionibacterium* spp. Молочнокислые бактерии, включающие бактерии вида *Lactobacillus* sp. и *Streptococcus thermophilus*, обычно поставляют для молочной промышленности либо в виде замороженных или лиофилизированных культур для объемного размножения закваски, либо в виде так называемых культур "для прямого внесения" (DVS), предназначенных для прямой инокуляции в ферментационный сосуд или чан для получения молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт. Такие культуры, в общем, называют "заквасочные культуры" или "закваски".

Применение терминов в единственном числе в контексте описания данного изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее термины и в единственном, и во множественном числе, если здесь не указано иное, или это явно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "вмещающий" следует истолковывать как открытые термины (т.е. означающие "включающий, но не ограничивающийся"), если не отмечено иное. Перечисление интервалов значений здесь просто предназначено для того, чтобы служить в качестве краткого способа индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в данный интервал, если здесь не указано иное, и каждое отдельное значение включено в данное описание изобретения, как если бы оно было здесь индивидуально перечислено. Все описанные здесь способы можно осуществлять в любом подходящем порядке, если здесь не указано иное, или иначе явно не противоречит контексту. Применение приведенных здесь любого и всех примеров или описывающих примеры формулировок (например, "такой как") предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании изобретения не следует истолковывать как указывающие на какой-либо незаъявленный элемент, существенный для практического выполнения данного изобретения.

Применительно к настоящему изобретению, выражение "усиление сладкого вкуса" означает усиление сладкого вкуса по сравнению со сладким вкусом, вызываемым материнским штаммом, не несущим мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где данная мутация инактивирует белок глюкокиназу или имеет отрицательный эффект на экспрессию данного гена.

Выражение "КОЕ" означает колониеобразующие единицы.

Штаммы *Streptococcus thermophilus* композиции по изобретению.

В некоторых странах стандартизованное определение йогурта требует присутствия как *Streptococcus thermophilus*, так и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*. Оба вида генерируют желательные количества ацетальдегида, являющегося важным вкусовым компонентом в йогурте.

Сыр, такой как моцарелла и сыр для пиццы, как и фета, также могут быть приготовлены посредством ферментации с использованием и *Streptococcus thermophilus*, и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* (Høier et al. (2010) in *The Technology of Cheese making*, 2nd Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192).

Для того чтобы удовлетворять требованиям пищевой промышленности, становится желательной разработка новых штаммов, в частности, штаммов *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* и штаммов *Streptococcus thermophilus*, которые дают более натуральный сладкий вкус непосредственно в ферментированном продукте (собственный сладкий вкус), не давая дополнительных калорий.

Streptococcus thermophilus является одной из чаще всего используемых молочнокислых бактерий для коммерческой ферментации молока, где данный организм обычно используют как часть смешанной заквасочной культуры, причем другим компонентом является вид *Lactobacillus*, например, *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* для йогурта и *Lactobacillus helveticus* для сыра швейцарского типа.

Только глюкозная часть молекулы лактозы ферментируется *Streptococcus thermophilus*, а галактоза накапливается в ферментированных молочных продуктах при использовании *Streptococcus thermophilus*. В йогурте, в котором высокие концентрации кислоты лимитируют ферментацию, свободная галактоза сохраняется, тогда как свободная галактоза, продуцируемая на ранних стадиях изготовления швейцарского сыра, позднее ферментируется *Lactobacillus helveticus*. *Lactobacillus lactis*, находящаяся во многих заквасочных культурах, используемых для изготовления сыра, также способна потреблять галактозу, продуцируемую *Streptococcus thermophilus*.

Для обеспечения штаммов *Streptococcus thermophilus* с такой оптимальной эффективностью роста, какая только возможна, авторы настоящего изобретения подвергли галактозоферментирующие штаммы *Streptococcus thermophilus* воздействию селективного агента 2-дезоксиглюкозы. Типично мутанты, устойчивые к 2-дезоксиглюкозе, имеют мутации в гене, кодирующем глюкокиназу, и в генах, кодирующих белки транспорта глюкозы. Выделенный мутант CHCC16731, который является устойчивым к 2-дезоксиглюкозе, имеет мутацию в его гене глюкокиназы (*glcK*). Помимо мутации в гене глюкокиназы, и CHCC16731, и CHCC19216 имеют мутацию, которая означает, что секретированная глюкоза не транспортируется снова обратно в клетки.

Неожиданным является то, что одни такие мутанты все еще полностью способны подкислять молоко, хотя время подкисления до pH 5 и задерживается на 2-5 часов. Следовательно, они, как таковые, являются полезными в применениях, связанных с ферментированным молоком, и они сохранили способность материнских штаммов к подкислению молока, что характерно для йогурта. Дополнительно обнаружили, что мутанты выделяли глюкозу с высоким уровнем при инокулировании мутантами 9,5%-ного В-молока с 0,05% сахарозы и ферментации при 40°C в течение по меньшей мере 20 часов. В то же время в ферментированном молоке сохраняются очень низкие уровни лактозы. Следовательно, применение таких штаммов для получения ферментированных молочных продуктов может быть важным для людей с непереносимостью лактозы.

Следовательно, конечное ферментированное молоко имеет повышенный индекс собственного сладкого вкуса, рассчитанный как описано Godshall (1988. *Food Technology* 42(11): 71-78).

В одном аспекте настоящего изобретения штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой галактозоферментирующий мутантный штамм *Streptococcus thermophilus*, где данный мутантный штамм несет мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где данная мутация инактивирует кодируемый белок глюкокиназу или имеет отрицательный эффект на экспрессию данного гена. Способы измерения уровня глюкокиназной активности или уровня экспрессии гена глюкокиназы хорошо известны (Porter et al. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 709; 178-186) и включают ферментативные анализы с имеющимися в продаже наборами и транскриптомику или количественную ПЦР (полимеразная цепная реакция) с использованием материалов, которые легко доступны.

В предпочтительном воплощении изобретения штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению является устойчивым к 2-дезоксиглюкозе.

Бактериальный "штамм" в том виде, как он здесь используется, относится к бактерии, которая остается генетически неизменной при росте и размножении. Множество идентичных бактерий включено.

Термин "галактозоферментирующие штаммы *Streptococcus thermophilus*" в том виде, как он здесь используется, относится к штаммам *Streptococcus thermophilus*, которые способны расти на/в среде M17 плюс 2% галактозы. Галактозоферментирующие штаммы *Streptococcus thermophilus* определены здесь как штаммы *Streptococcus thermophilus*, которые снижают pH бульона M17, содержащего 2% галактозы в качестве единственного углевода, до 5,5 или ниже при инокулировании из культуры, выращенной в течение ночи, в концентрации 1% и инкубировании в течение 24 часов при 37°C.

Термин "мутация инактивирует белок глюкокиназу" в том виде, как он здесь используется, отно-

сится к мутации, которая приводит к "инактивированному белку глюкокиназе", белку глюкокиназе, который, в случае присутствия в клетке, не способен выполнять его нормальную функцию, а также к мутациям, которые предотвращают образование белка глюкокиназы или приводят к деградации белка глюкокиназы.

В частности, инактивированный белок глюкокиназа представляет собой белок, который по сравнению с функциональным белком глюкокиназой не способен облегчать фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата или облегчает фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата со значительно сниженной скоростью. Ген, кодирующий такой инактивированный белок глюкокиназу, по сравнению с геном, кодирующим функциональный белок глюкокиназу, содержит мутацию в открытой рамке считывания (ORF) данного гена, где указанная мутация может включать делецию, мутацию, приводящую к сдвигу рамки считывания, введение стоп-кодона или мутацию, которая приводит к замене аминокислоты, которая изменяет функциональные свойства белка, или мутацию промотора, которая уменьшает или отменяет транскрипцию или трансляцию данного гена, но не ограничена ими.

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

Активность глюкокиназы можно определять посредством ферментативных анализов глюкокиназы, как описано Pool et al. (2006. *Metabolic Engineering* 8; 456-464).

Термин "функциональный белок глюкокиназа" в том виде, как он здесь используется, относится к белку глюкокиназе, который, в случае присутствия в клетке, облегчает фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата. В частности, функциональный белок глюкокиназа может кодироваться геном, содержащим ORF, которая имеет последовательность, соответствующую положению 1-966 в SEQ ID NO: 1, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%-ную идентичность, например по меньшей мере 90%-ную идентичность, например по меньшей мере 95%-ную идентичность, например по меньшей мере 98%-ную идентичность, например по меньшей мере 99%-ную идентичность по отношению к последовательности, соответствующей положению 1-966 в SEQ ID NO: 1.

Процент идентичности двух последовательностей может быть определен с использованием математических алгоритмов, таких как алгоритм Karlin и Altschul (1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87; 2264), модифицированный алгоритм, описанный Karlin и Altschul (1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90; 5873-5877); алгоритм Myers и Miller (1988. *CABIOS* 4; 11-17); алгоритм Needleman и Wunsch (1970. *J. Mol. Biol.* 48; 443-453) и алгоритм Pearson и Lipman (1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85; 2444-2448). Также доступна компьютерная программа для определения идентичности последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей на основе данных математических алгоритмов. Например, сравнение нуклеотидных последовательностей может быть проведено с использованием программы BLASTN, балл - 100, длина слова -12. Сравнение аминокислотных последовательностей может быть проведено с использованием программы BLASTX, балл - 50, длина слова - 3. В том, что касается остальных параметров программ BLAST, можно использовать параметры по умолчанию.

Во многих странах неприемлемо применение генетически модифицированных организмов (ГМО) для ферментированных молочных продуктов. Вместо этого в настоящем изобретении предложены встречающиеся в природе или индуцированные мутантные штаммы, которые могут обеспечивать желательное накопление глюкозы в ферментированном молочном продукте.

Таким образом, в еще более предпочтительном воплощении настоящего изобретения мутантный штамм представляет собой встречающегося в природе мутанта или индуцированного мутанта.

Термины "мутантная бактерия" или "мутантный штамм" в том виде, как они здесь используются, относятся к природной (спонтанной, встречающейся в природе) мутантной бактерии или к индуцированной мутантной бактерии, содержащей в ее геноме (ДНК) одну или более чем одну мутацию, которая отсутствует в ДНК дикого типа. "Индукцированный мутант" представляет собой бактерию, где мутация была индуцирована обработкой человеком, такой как обработка химическими мутагенами, УФ- или гамма-излучением и т.д. В отличие от этого, "спонтанный мутант" или "встречающийся в природе мутант" не был мутагенизирован человеком. Мутантные бактерии здесь не являются ГМО (генетически модифицированный организм), т.е. они не модифицированы посредством технологии рекомбинантной ДНК.

Термин "штамм дикого типа" относится к немутировавшей форме бактерии в том виде, в котором она находится в природе.

Такие термины, как "штаммы со свойством усиления сладкого вкуса", "штаммы, которые могут обеспечивать желательное накопление глюкозы в ферментированном молочном продукте" и "штаммы с улучшенными свойствами в отношении природного усиления сладкого вкуса пищевых продуктов", используют здесь взаимозаменяемо для характеристики полезного аспекта применения штаммов по настоящему изобретению в ферментации молочных продуктов.

В предпочтительном воплощении мутантный штамм *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению увеличивает количество глюкозы в 9,5%-ном В-молоке до по меньшей мере 5 мг/мл при инокулировании в 9,5%-ное В-молоко в концентрации 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и выращивании при 40°C в течение по мень-

шей мере 20 часов.

В другом предпочтительном воплощении мутантный штамм *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению увеличивает количество глюкозы в 9,5%-ном В-молоке с 0,05% сахарозы до по меньшей мере 5 мг/мл при инокулировании в 9,5%-ное В-молоко с 0,05% сахарозы в концентрации 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и выращивании при 40°C в течение по меньшей мере 20 часов.

В настоящем контексте 9,5%-ное В-молоко представляет собой кипяченое молоко, полученное с использованием восстановленного обезжиренного сухого молока с низким содержанием жира, до уровня сухого вещества 9,5% и пастеризованное при 99°C в течение 30 мин с последующим охлаждением до 40°C.

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

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

Термин "устойчивый к 2-дезоксиглюкозе" определен здесь тем, что конкретный мутантный бактериальный штамм имеет способность расти до колонии при посеве штрихами на чашку среды M17, содержащую 20 мМ 2-дезоксиглюкозу, после инкубирования при 40°C в течение 20 часов. Присутствие 2-дезоксиглюкозы в культуральной среде будет предотвращать рост немутировавших штаммов, тогда как рост мутировавших штаммов не подвергается влиянию или не подвергается значительному влиянию. Немутировавшие штаммы, которые можно использовать в качестве чувствительных контрольных штаммов при оценке устойчивости, предпочтительно включают штаммы CHCC14994 и CHCC11976.

Мутантные штаммы *Streptococcus thermophilus* по изобретению выделяют глюкозу в молоко при инокулировании 9,5%-ного В-молока 10^6 - 10^7 КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению и ферментации штаммами *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению при 40°C в течение по меньшей мере 20 часов. Предпочтительно, одни такие мутантные штаммы будут выделять по меньшей мере 5 мг/мл глюкозы в В-молоко при инокулировании 9,5%-ного В-молока 10^6 - 10^7 КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению и ферментации штаммами *Streptococcus thermophilus* при 40°C в течение по меньшей мере 20 часов. Данные штаммы все еще полностью способны подкислять молоко, хотя время подкисления до pH 5 задерживается на 2-5 часов. Конечное ферментированное молоко содержит менее чем 15 мг/мл лактозы в ферментированном молоке. Конечное ферментированное молоко, следовательно, имеет более высокий индекс собственного сладкого вкуса, увеличенный приблизительно в 2 раза или более.

В еще одном воплощении мутантный штамм согласно изобретению может отличаться его картиной роста. Это иллюстрируется обнаружением того, что скорость роста мутантного штамма выше в среде M17 плюс 2% галактозы, чем в среде M17 плюс 2% глюкозы. Скорость роста измеряется как развитие оптической плотности экспоненциально растущей культуры при 600 нанометрах (ОП₆₀₀) с течением времени.

В предпочтительном воплощении скорость роста по меньшей мере на 5% выше, например по меньшей мере на 10% выше, например по меньшей мере на 15% выше, например по меньшей мере на 20% выше в среде M17 плюс 2% галактозы, чем в среде M17 плюс 2% глюкозы.

Мутация в гене *glcK*.

В одном предпочтительном воплощении мутация приводит к замене кодона, кодирующего глицин, кодоном, кодирующим аргинин, в положении 249 в SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, мутация в гене *glcK* приводит к замене G на A в положении 745 в SEQ ID NO: 1. Штамм CHCC16731 имеет такую мутацию.

В предпочтительном воплощении данная мутация приводит к замене кодона, кодирующего серин, кодоном, кодирующим пролин, в положении 72 в SEQ ID NO: 2 (не показано). Предпочтительно, мутация в гене *glcK* приводит к замене T на C в положении 214 в SEQ ID NO: 1 (не показано).

В другом предпочтительном воплощении данная мутация приводит к замене кодона, кодирующего треонин, кодоном, кодирующим изолейцин, в положении 141 в SEQ ID NO: 2 (не показано).

Предпочтительно, мутация в гене *glcK* приводит к замене C на T в положении 422 в SEQ ID NO: 1 (не показано).

Следует подчеркнуть то, что ген *glcK* *Streptococcus thermophilus* может быть инактивирован другими типами мутаций в других сайтах гена *glcK*.

Мутация, уменьшающая транспорт глюкозы в клетку.

В предпочтительном воплощении штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию, которая уменьшает транспорт глюкозы в клетку.

Термин "мутация, которая уменьшает транспорт глюкозы в клетку" в том виде, как он здесь исполь-

зается, относится к мутации в гене, кодирующем белок, участвующий в транспорте глюкозы, которая приводит к накоплению глюкозы в среде клетки.

Уровень глюкозы в культуральной среде штамма *Streptococcus thermophilus* может быть легко измерен способами, известными специалисту в данной области техники, также когда культуральная среда представляет собой молочный субстрат.

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

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

Предпочтительно, штамм *Streptococcus thermophilus* несет мутацию в гене, кодирующем компонент глюкозного транспортера, где данная мутация инактивирует белок глюкозного транспортера или имеет отрицательный эффект на экспрессию данного гена.

Данным компонентом может быть любой компонент белка глюкозного транспортера, который является критически важным для транспорта глюкозы. Например, предусмотрено, что инактивация любого компонента глюкозной/маннозной PTS в *Streptococcus thermophilus* будет приводить к инактивации функции глюкозного транспортера.

Термин "мутация инактивирует глюкозный транспортер" в том виде, как он здесь используется, относится к мутации, которая приводит к "инактивированному глюкозному транспортеру" - белку глюкозного транспортера, который, в случае присутствия в клетке, не способен выполнять его нормальную функцию, а также к мутациям, которые предотвращают образование белка глюкозного транспортера или приводят к деградации белка глюкозного транспортера.

В частности, инактивированный белок глюкозного транспортера представляет собой белок, который по сравнению с функциональным белком глюкозного транспортера не способен облегчать транспорт глюкозы через плазматическую мембрану или облегчает транспорт глюкозы через плазматическую мембрану со значительно сниженной скоростью. Ген, кодирующий такой инактивированный белок глюкозного транспортера, по сравнению с геном, кодирующим функциональный белок глюкозного транспортера, содержит мутацию в открытой рамке считывания (ORF) данного гена, где указанная мутация может включать делецию, мутацию, приводящую к сдвигу рамки считывания, введение стоп-кодона или мутацию, которая приводит к аминокислотной замене, которая изменяет функциональные свойства белка, или мутацию промотора, которая уменьшает или отменяет транскрипцию или трансляцию гена, но не ограничен ими.

В предпочтительных воплощениях данная мутация уменьшает активность (скорость транспорта глюкозы) белка глюкозного транспортера по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 80%, например по меньшей мере на 90%.

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

Термин "функциональный белок глюкозного транспортера" в том виде, как он здесь используется, относится к белку глюкозного транспортера, который, в случае его присутствия в клетке, облегчает транспорт глюкозы через плазматическую мембрану.

В предпочтительном воплощении изобретения штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в последовательности ДНК гена *manN*, кодирующего белок IID^{Man} системы глюкозо/маннозофосфотрансферазы, где данная мутация инактивирует белок IID^{Man} или имеет отрицательный эффект на экспрессию данного гена.

CHCC16731 имеет замену треонина на пролин в положении 79 в гене *manN*, кодирующем белок IID^{Man} системы глюкозо/маннозофосфотрансферазы. Предпочтительно, данная мутация в гене *manN* приводит к замене А на С в положении 235 в SEQ ID NO:3.

Таким образом, в предпочтительном воплощении штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в последовательности ДНК гена *manN*, кодирующего белок IID^{Man} системы глюкозо/маннозофосфотрансферазы, где данная мутация приводит к замене треонина на пролин в положении 79 SEQ ID NO: 4.

В другом предпочтительном воплощении изобретения штамм *Streptococcus thermophilus* по изобретению несет мутацию в последовательности ДНК гена *tapM*, кодирующего белок IIC^{Man} системы глюкозо/маннозофосфотрансферазы, где данная мутация инактивирует белок IIC^{Man} или имеет отрицательный эффект на экспрессию данного гена.

В особом предпочтительном воплощении данная мутация приводит к замене кодона, кодирующего глутаминовую кислоту, на стоп-кодон в положении 209 SEQ ID NO: 6 белка IIC^{Man} системы глюкозо/маннозофосфотрансферазы (не показано). Предпочтительно данная мутация приводит к замене G на T в положении 625 SEQ ID NO: 5 (не показано).

Предпочтительные штаммы *Streptococcus thermophilus* по изобретению.

В предпочтительном воплощении композиции по изобретению штамм *Streptococcus thermophilus*

выбран из группы, состоящей из штамма CHCC19216 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 32227, штамма CHCC16731 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 4 июня 2014 г. под № доступа DSM 28889, штамма CHCC15757 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 25850, штамма CHCC15887 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 25851, штамма CHCC16404 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 26722, и мутантного штамма, происходящего из них, где данный мутантный штамм получен с использованием одного из депонированных штаммов в качестве исходного материала, и где данный мутант имеет сохраненную или дополнительно улучшенную текстурирующую способность и способность указанного депонированного штамма секретируют глюкозу.

В настоящем контексте термин "мутантный штамм" следует понимать как штаммы, полученные, или штаммы, которые могут быть получены из штамма (или их материнского штамма) по изобретению посредством, например, генной инженерии, обработки облучением и/или химической обработки. "Штаммы, полученные из них" также могут быть спонтанно возникающими мутантами. Предпочтительным является то, что "штаммы, полученные из них" являются функционально эквивалентными мутантами, например, мутантами, которые имеют по существу одинаковые или улучшенные свойства по отношению к их материнскому штамму. Термин "мутантные штаммы" в особенности относится к штаммам, полученным посредством подвергания штамма по изобретению любой традиционно используемой мутагенизирующей обработке, включающей обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ светом, или к спонтанно возникающему мутанту. Мутант возможно был подвергнут нескольким мутагенизирующим обработкам (одну обработку следует понимать как одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/отбора), но в настоящее время предпочтительно, чтобы проводилось не более чем 20, или не более чем 10, или не более чем 5 обработок (или стадий скрининга/отбора). В предпочтительном в настоящем изобретении мутанте менее 1%, менее 0,1%, менее 0,01%, менее 0,001% или даже менее 0,0001% нуклеотидов в бактериальном геноме было заменено другим нуклеотидом или подвергнуто делеции по сравнению с материнским штаммом.

Способ получения штамма *Streptococcus thermophilus*, усиливающего сладкий вкус.

В предпочтительном воплощении изобретения исходным штаммом, используемым для разработки штамма *Streptococcus thermophilus*, усиливающего сладкий вкус, является текстурирующий штамм *Streptococcus thermophilus*, который может быть получен, как описано в данном описании изобретения.

В предпочтительном воплощении такой текстурирующий штамм выбран из группы, состоящей из штамма CHCC11342 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 22932, штамма CHCC11976 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 22934, штамма CHCC12339 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 24090, и штаммов, полученных из них.

В качестве альтернативы, исходным штаммом, используемым для разработки штамма *Streptococcus thermophilus*, усиливающего сладкий вкус, является не текстурирующий штамм *Streptococcus thermophilus*, причем в данном случае текстурирующую способность вводят в штамм *Streptococcus thermophilus*, усиливающий сладкий вкус, как только он получен, т.е. штамм, усиливающий сладкий вкус, используется в качестве исходного штамма в способе получения текстурирующего штамма, описанного в данном описании изобретения.

Первой стадией способа получения штамма *Streptococcus thermophilus*, усиливающего сладкий вкус, является предоставление галактозоположительного штамма, т.е. штамма, который способен использовать галактозу в качестве источника углеводов. Галактозоположительные штаммы могут быть получены способом, включающим стадию посева штрихом бактерий, подлежащих тестированию, на чашки с агаром, такие как чашки с агаром M17, содержащие определенную концентрацию, например 2%, галактозы (единственный источник углеводов), и идентификацию колоний, способных расти на данных чашках.

Для селекции бактерий, имеющих мутацию в гене глюкокиназы (*glcK*), используют 2-дезоксиглюкозу и определение картины роста бактерий в среде M17 плюс 2% галактозы по сравнению со средой M17 плюс 2% глюкозы.

Один способ скрининга и выделения штамма *Streptococcus thermophilus* с мутировавшим геном *glcK* включает следующие стадии:

- а) предоставление галактозоферментирующего материнского штамма *Streptococcus thermophilus*;
- б) селекция и выделение из пула мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus*, полученных из материнского штамма, пула мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus*, которые являются устойчивыми к 2-дезоксиглюкозе; и

в) селекция и выделение из пула мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus*, которые являются устойчивыми к 2-дезоксиглюкозе, мутантного штамма *Streptococcus thermophilus*, если скорость роста данного мутантного штамма *Streptococcus thermophilus* выше в среде M17 плюс 2% галактозы, чем в среде M17 плюс 2% глюкозы.

Термин "устойчивый к 2-дезоксиглюкозе" определен здесь тем, что конкретный мутировавший бактериальный штамм имеет способность вырастать до колонии при посеве штрихом на чашке со средой M17, содержащей 2% лактозы или 2% галактозы и содержащей 20 мМ 2-дезоксиглюкозы, после инкубации при 40°C в течение 20 часов. Присутствие 2-дезоксиглюкозы в культуральной среде будет предотвращать рост немутировавших штаммов, тогда как рост мутировавших штаммов не подвергается влиянию или не подвергается значимому влиянию. Немутировавшие штаммы, которые можно использовать в качестве чувствительных контрольных штаммов при оценке устойчивости, включают штамм CHCC11976.

В одном воплощении данный способ дополнительно включает стадию a1) подвергания материнского штамма мутагенезу, например, подвергания материнского штамма воздействию химического и/или физического мутагена.

В другом воплощении данный способ дополнительно включает стадию г) селекции и выделения штамма *Streptococcus thermophilus* из пула штаммов *Streptococcus thermophilus*, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе, происходящих из штамма *Streptococcus thermophilus*, отобранного на стадии в), если скорость роста штамма *Streptococcus thermophilus* является высокой в среде M17 плюс 2% сахарозы, но равна нулю или по меньшей мере на 0-50% снижена по сравнению со скоростью роста материнского штамма в среде M17 плюс 2% глюкозы.

Галактозоферментирующие материнские штаммы *Streptococcus thermophilus* способны расти на/в среде M17 плюс 2% галактозы и определены здесь тем, что они имеют способность снижать pH в бульоне M17, содержащем 2% галактозы в качестве единственного углевода, до 5,5 или ниже при инокуляции из культуры, выращенной в течение ночи при 1%, и инкубировании в течение 24 часов при 37°C. Такие галактозоположительные штаммы были описаны в WO2011/026863 (Chr. Hansen A/S) и WO2011/092300 (Chr. Hansen A/S).

В контексте настоящего изобретения термин "штаммы, происходящие из" следует понимать как штаммы, происходящие, или штаммы, которые могут быть получены из текстурирующих или галактозоферментирующих материнских штаммов *Streptococcus thermophilus*, посредством, например, генной инженерии, обработки облучением и/или химической обработки. "Штаммы, происходящие из них" также могут представлять собой спонтанно возникающие мутанты. Предпочтительным является то, что "штаммы, происходящие из них" представляют собой функционально эквивалентных мутантов, например, мутантов, которые имеют по существу такие же или улучшенные свойства (например, в отношении текстуры или ферментации галактозы), что и их материнский штамм. В особенности, термин "штаммы, происходящие из них" относится к штаммам, полученным посредством подвергания штамма по изобретению любой традиционно используемой мутагенизирующей обработке, включающей обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ-свет, или к спонтанно возникающему мутанту. Мутант возможно был подвергнут нескольким мутагенизирующим обработкам (одну обработку следует понимать как одну стадию мутагенеза, с последующей стадией скрининга/селекции), но в настоящем изобретении предпочтительно, когда проводят не более 20, или не более 10, или не более 5 обработок (или стадий скрининга/селекции). В настоящем изобретении в предпочтительном мутанте менее 1%, менее 0,1%, менее 0,01%, менее 0,001% или даже менее 0,0001% нуклеотидов в бактериальном геноме было заменено другим нуклеотидом или подвергнуто делеции по сравнению с материнским штаммом.

В настоящем изобретении выражение "ген *glcK*, кодирующий глюкокиназу" означает любую последовательность ДНК *Streptococcus thermophilus*, кодирующую белок, имеющий глюкокиназную активность, включая специфическую глюкокиназу, кодируемую последовательностью ДНК SEQ ID NO: 1. Глюкокиназа катализирует реакцию, превращающую глюкозу до глюкозо-6-фосфата, см. чертеж.

Штаммы *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* композиции по изобретению.

Термины "недостаточность в метаболизме лактозы" и "лактозодефицитные" используют в контексте настоящего изобретения для характеристики LAB, которые либо частично, либо полностью теряют способность использовать лактозу в качестве источника для роста клеток или поддержания жизнеспособности клеток. Соответствующие LAB способны метаболизировать один или несколько углеводов, выбранных из сахарозы, галактозы и/или глюкозы, или другого ферментируемого углевода. Поскольку данные углеводы не присутствуют в природе в молоке в достаточных количествах для поддержки ферментации лактозодефицитными мутантами, данные углеводы необходимо добавлять в молоко. Лактозодефицитные и частично дефицитные LAB можно охарактеризовать как белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

В контексте настоящего изобретения термин "X-Gal" означает 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид, который представляет собой хромогенный субстрат для бета-галактозидазы, которая

гидролизует X-Gal до бесцветной галактозы и 5-бром-4-хлор-индоксила, который спонтанно димеризуется с образованием синего пигмента.

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

В конкретном воплощении композиции по изобретению штамм Lb выбран из группы, состоящей из штамма, депонированного в DSMZ - немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, 12.06.2014 г. под № доступа DSM 28910, и мутантного штамма, полученного из DSM 28910, где данный мутантный штамм дополнительно характеризуется наличием способности образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

Лактозодефицитные штаммы могут быть получены из подходящего лактозоположительного материнского штамма посредством мутации. Лактозодефицитные штаммы были отобраны после УФ-мутагенеза в виде белых колоний (указывающих на лактозодефицитный фенотип) на подходящей среде, например, на чашках с MRS агаром с 1% лактозы и 200 мг/мл X-Gal. Лактозоположительные штаммы обладают β-галактозидазной активностью, и колонии лактозоположительного штамма оказываются голубыми из-за активности β-галактозидазы. В качестве лактозоположительного материнского штамма для получения лактозодефицитного штамма можно использовать *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* штамма CHCC10019, депонированного для WO2011/000879 в DSMZ - немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг 03.04.2007 г. под № доступа DSM 19252.

Композиция.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции, содержащей от 10^4 до 10^{12} КОЕ (колониобразующая единица)/г штамма *Streptococcus thermophilus*, например от 10^5 до 10^{11} КОЕ/г, например от 10^6 до 10^{10} КОЕ/г, или например от 10^7 до 10^9 КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus*.

В предпочтительном воплощении штамм *Streptococcus thermophilus* данной композиции не способен подкислять 9,5%-ное В-молоко, определенное как приводящее к снижению pH менее чем на 1,0 при инокулировании 9,5%-ного В-молока 10^6 - 10^7 КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* и инкубировании в течение 14 часов при 40°C, и данная композиция дополнительно содержит количество соединения, которое может запускать подкисление 9,5%-ного В-молока штаммом CHCC16404 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 26722, определенное как приводящее к снижению pH на 1,0 или более при инокулировании 9,5%-ного В-молока с 10^6 - 10^7 КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* и инкубировании в течение 14 часов при 40°C.

Предпочтительно данное соединение представляет собой сахарозу.

Предпочтительно количество сахарозы составляет от 0,000001 до 2%, например от 0,00001 до 0,2%, например от 0,0001 до 0,1%, например от 0,001 до 0,05%.

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

В конкретном воплощении данного изобретения композиция содержит по меньшей мере два штамма St, предпочтительно по меньшей мере три штамма St, и более предпочтительно три штамма St. В конкретном воплощении данного изобретения композиция содержит не более чем три штамма Lb, предпочтительно не более чем два штамма Lb, и более предпочтительно один штамм Lb.

В конкретном воплощении данного изобретения композиция содержит по меньшей мере один штамм St, выбранный из группы, состоящей из штамма CHCC16731 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 4 июня 2014 г. под № доступа DSM 28889, штамма CHCC15757 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 25850, и штамма CHCC16404 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 26722, и штамма Lb, депонированного в DSMZ - немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, 12.06.2014 г. под № доступа DSM 28910. *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* и другие молочнокислые бактерии обычно используют в качестве заквасочных культур, служащих для технологических целей при производстве разных пищевых продуктов, например в молочной промышленности, например для ферментированных молочных продуктов. Таким образом, в другом предпочтительном воплощении данная композиция подходит в качестве заквасочной культуры.

Заквасочные культуры могут быть предоставлены в виде замороженных или высушенных заквасочных культур, помимо жидких заквасочных культур. Таким образом, в еще одном предпочтительном

воплощении композиция находится в замороженной, лиофилизированной или жидкой форме.

Как раскрыто в WO 2005/003327, полезно добавлять в заквасочную культуру определенные криопротекторы. Таким образом, композиция заквасочной культуры согласно настоящему изобретению может содержать один или более чем один криопротектор, выбранный из группы, состоящей из инозин-5'-монофосфата (IMP), аденозин-5'-монофосфата (AMP), гуанозин-5'-монофосфата (GMP), уранозин-5'-монофосфата (UMP), цитидин-5'-монофосфата (CMP), аденина, гуанина, урацила, цитозина, аденозина, гуанозина, уридина, цитидина, гипоксантина, ксантина, гипоксантина, оротидина, тимидина, инозина и производного любого такого соединения.

Способ получения ферментированного молочного продукта.

Данное изобретение дополнительно направлено на способ получения ферментированного молочного продукта, включающий инокулирование и ферментирование молочного субстрата композицией согласно настоящему изобретению.

Термин "молоко" следует понимать как секрет молочных желез, полученный доением любого животного, такого как корова, овца, коза, буйволица или верблюдица. В предпочтительном воплощении молоко представляет собой коровье молоко.

Термин "молочный субстрат" может относиться к любому сырому и/или переработанному молочному материалу, который может быть подвергнут ферментации согласно способу по изобретению. Таким образом, полезные молочные субстраты включают растворы/суспензии любого молока или молокоподобных продуктов, содержащие белок, такие как цельное молоко или молоко пониженной жирности, обезжиренное молоко, пахта, восстановленный молочный порошок, сгущенное молоко, сухое молоко, сыворотку, пермеат сыворотки, лактозу, маточную жидкость от кристаллизации лактозы, концентрат белка сыворотки или сливки, но не ограничиваются ими. Очевидно то, что молочный субстрат может происходить от любого млекопитающего, например, представлять собой по существу чистое молоко млекопитающего или разведенный молочный порошок.

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

До ферментации молочный субстрат может быть гомогенизирован и пастеризован согласно способам, известным в данной области техники.

Термин "гомогенизация" в том виде, как он здесь используется, означает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. При проведении гомогенизации до ферментации она может быть проведена таким образом, чтобы разбивать молочный жир до меньших размеров, так чтобы он больше не отделялся от молока. Это может быть осуществлено посредством пропускания молока через маленькие отверстия при высоком давлении.

Термин "пастеризация" в том виде, как он здесь используется, означает обработку молочного субстрата для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно, пастеризация достигается поддержанием конкретной температуры в течение конкретного периода времени. Данная конкретная температура обычно достигается нагреванием. Температура и продолжительность времени могут быть выбраны для того, чтобы умерщвлять или инактивировать определенные бактерии, такие как вредные бактерии. Далее может следовать стадия быстрого охлаждения.

"Ферментация" в способах по настоящему изобретению означает превращение углеводов в спирты или кислоты посредством действия микроорганизма.

Предпочтительно ферментация в способах по изобретению включает превращение лактозы до молочной кислоты.

Способы ферментации, предназначенные для использования в получении ферментированных молочных продуктов, являются хорошо известными, и специалист в данной области техники знает как выбирать подходящие условия процесса, такие как температура, содержание кислорода, количество и характеристики микроорганизма(ов) и время проведения процесса. Очевидно то, что условия ферментации выбирают таким образом, чтобы обеспечить выполнение настоящего изобретения, т.е. для получения молочного продукта в твердом или в жидком виде (ферментированного молочного продукта).

Термин "ферментированный молочный продукт" в том виде, как он здесь используется, относится к пищевому или кормовому продукту, где приготовление пищевого или кормового продукта включает ферментацию молочного субстрата молочнокислой бактерией. Термин "ферментированный молочный продукт" в том виде, как он здесь используется, включает продукты, такие как термофильно ферментированные молочные продукты, например йогурт, мезофильно ферментированные молочные продукты, например сметана и пахта, а также ферментированную сыворотку, но не ограничивается ими.

Термин "термофил" здесь относится к микроорганизмам, которые лучше всего живут при температурах выше 35°C. Самые полезные с промышленной точки зрения термофильные бактерии включают виды *Streptococcus* и виды *Lactobacillus*. Термин "термофильная ферментация" здесь относится к ферментации при температуре выше чем примерно 35°C, например от примерно 35 до примерно 45°C. Термин "термофильно ферментированный молочный продукт" относится к ферментированным молочным

продуктам, полученным термофильной ферментацией термофильной заквасочной культуры, и он включает такие ферментированные молочные продукты, как йогурт термостатного способа производства, йогурт с нарушенным сгустком и питьевой йогурт, например японский био-йогурт Yakult.

Термин "мезофил" здесь относится к микроорганизмам, которые лучше всего живут при умеренных температурах (15-35°C). Самые полезные с промышленной точки зрения мезофильные бактерии включают виды *Lactococcus* и виды *Leuconostoc*. Термин "мезофильная ферментация" здесь относится к ферментации при температуре от примерно 22 до примерно 35°C. Термин "мезофильно ферментированный молочный продукт" относится к ферментированным молочным продуктам, полученным мезофильной ферментацией мезофильной заквасочной культуры, и они включают такие ферментированные молочные продукты, как пахта, простокваша, сквашенное молоко, сметана, кефир и молодой сыр, такой как творог и сливочный сыр.

В предпочтительном воплощении концентрация инокулированных клеток *Streptococcus thermophilus* составляет от 10^4 до 10^9 КОЕ клеток *Streptococcus thermophilus* на мл молочного субстрата, например от 10^4 до 10^8 КОЕ клеток *Streptococcus thermophilus* на мл молочного субстрата.

В другом предпочтительном воплощении способа по изобретению штамм *Streptococcus thermophilus* не способен подкислять 9,5%-ное В-молоко, что определяется как приведение к снижению pH менее чем на 1,0 при инокуляции 9,5%-ного В-молока 10^6 - 10^7 КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* и инкубации в течение 14 часов при 40°C, и данный молочный субстрат добавляет эффективное количество соединения для запуска подкисления 9,5%-ного В-молока штаммом *Streptococcus thermophilus*, определяемого как приведение к снижению pH на 1,0 или более при инокуляции 9,5%-ного В-молока 10^6 - 10^7 КОЕ/мл штамма *Streptococcus thermophilus* и инкубации в течение 14 часов при 40°C.

Предпочтительно данное соединение представляет собой сахарозу.

Предпочтительно количество сахарозы составляет от 0,000001 до 2%, например от 0,00001 до 0,2%, например от 0,0001 до 0,1%, например от 0,001 до 0,05%.

В другом предпочтительном воплощении ферментированный молочный продукт представляет собой йогурт или сыр.

Примеры сыров, которые получают ферментацией с использованием *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, включают моцареллу и сыр для пиццы (Høier et al. (2010) в *The Technology of Cheesemaking*, 2nd Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192).

Предпочтительно, ферментированный молочный продукт представляет собой йогурт.

В контексте настоящего изобретения заквасочная культура йогурта представляет собой бактериальную культуру, которая содержит по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* и по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*. В соответствии с этим, термин "йогурт" относится к ферментированному молочному продукту, получаемому инокулированием и ферментированием молока композицией, содержащей штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* и штамм *Streptococcus thermophilus*.

Ферментированный молочный продукт.

Настоящее изобретение дополнительно относится к ферментированному молочному продукту, содержащему композицию согласно данному изобретению.

В другом предпочтительном воплощении ферментированный молочный продукт может представлять собой йогурт, сыр, сметану и пахту, а также ферментированную сыворотку. Предпочтительно, ферментированный молочный продукт представляет собой йогурт.

Применение композиции по изобретению

Другой аспект данного изобретения относится к применению композиции согласно изобретению для приготовления ферментированного молочного продукта.

Воплощения настоящего изобретения описаны ниже посредством неограничивающих примеров.

Перечень последовательностей.

SEQ ID NO: 1 показывает последовательность ДНК мутировавшего гена глюкокиназы штамма CHCC16731.

SEQ ID NO: 2 показывает аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 показывает последовательность ДНК мутировавшего гена ManN штамма CHCC16731.

SEQ ID NO: 4 показывает аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 5 показывает последовательность ДНК гена ManM (немутировавшего) штамма CHCC16731.

SEQ ID NO: 6 показывает аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 5.

Примеры

Материалы и методы.

Среда.

Для *Streptococcus thermophilus* используемая среда представляет собой среду М17, известную специалистам в данной области техники.

Агаризованная среда М17 имеет следующий состав на литр H₂O:

агар – 12, 75 г
 аскорбиновая кислота – 0,5 г
 казеиновый пептон (триптический) – 2,5 г
 динатрия β-глицерофосфата пентагидрат – 19 г
 магния сульфата гидрат – 0,25 г
 мясной экстракт – 5 г
 мясной пептон (пептический) – 2,5 г
 соевый пептон (папаиновый) – 5 г
 дрожжевой экстракт – 2,5 г
 конечный pH 7,1 плюс/минус 0,2 (25°C);
 и бульон М17 имеет следующий состав на литр H₂O:

аскорбиновая кислота – 0,5 г
 магния сульфат – 0,25 г
 мясной экстракт – 5 г
 мясной пептон (пептический) – 2,5 г
 натрия глицерофосфат – 19 г
 соевый пептон (папаиновый) – 5 г
 триптон – 2,5 г
 дрожжевой экстракт – 2,5 г
 конечный pH 7,0 плюс/минус 0,2 (25°C).

Добавленные источники углерода представляют собой стерильную лактозу 20 г/л, глюкозу 20 г/л или галактозу 20 г/л.

Как известно специалисту в данной области техники, среда М17 представляет собой среду, которая считается подходящей для роста *Streptococcus thermophilus*. Кроме того, как понятно специалисту в данной области техники, в контексте настоящего изобретения концентрат М17 может поставляться от разных поставщиков и, независимо от конкретного поставщика (в пределах стандартного разброса измерений), здесь будет получаться тот же самый релевантный результат устойчивости к 2-дезоксиглюкозе для релевантной здесь интересующей клетки.

Среда, использованная для культивирования *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, представляла собой среду MRS-IM. MRS-IM использовали либо в виде чашек с агаром, либо бульона.

Агаризованная среда MRS-IM имела следующий состав на литр H₂O:

Триптон	Oxoid L 42	10,0 г
Дрожжевой экстракт	Oxoid L 21	5,0 г
Tween 80	Merck, № 8.22187	1,0 г
K ₂ HPO ₄	Merck, № 105104	2,6 г
Na-ацетат	Merck, № 106267	5,0 г
Диаммония гидроцитрат	Merck, № 101154	2,0 г
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	Merck, № 105882	0,2 г
MnSO ₄ ·H ₂ O	Merck, № 105941	0,05 г
Агар	SO-BI-GEL	13,0 г

После автоклавирования pH довели до 6,9 плюс/минус 0,1 при 25°C.

Бульон MRS-IM, использованный для жидких культур в примерах, приведенных ниже, имел следующий состав на литр H₂O:

Триптон	Oxoid L 42	10,0 г
Дрожжевой экстракт	Oxoid L 21	5,0 г
Tween 80	Merck, № 8.22187	1,0 г
K ₂ HPO ₄	Merck, № 105104	2,6 г
Na-ацетат	Merck, № 106267	5,0 г
Диаммония гидроцитрат	Merck, № 101154	2,0 г
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	Merck, № 105882	0,2 г
MnSO ₄ ·H ₂ O	Merck, № 105941	0,05 г

После автоклавирования pH доводят до 6,9 плюс/минус 0,1 при 25°C. Источники углерода - 20 г/л лактозы или 20 г/л глюкозы, сначала подвергали стерилизующей фильтрации и затем добавляли в автоклавированный бульон.

Приведенные выше среды MRS-IM могут быть в некоторой степени изменены без влияния на способность данных сред поддерживать рост *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*. Кроме того, как будет понятно специалисту, концентрат MRS-IM или разные описанные выше компоненты могут быть приобретены у разных поставщиков и использованы для приготовления среды MRS-IM. Данные среды, подобным образом, будут использованы в примерах, приведенных ниже, в частности, в селекционном анализе устойчивости к 2-дезоксиглюкозе.

Материнские штаммы.

Streptococcus thermophilus CHCC11976 (галактозоферментирующий штамм с мутацией в гене GalK, как описано в WO 2011/026863).

Streptococcus thermophilus CHCC12339 (фагоустойчивый и текстурирующий, как описано в WO2011/092300).

Streptococcus thermophilus CHCC18948 (галактозоферментирующий мутант CGCC12339 с мутацией в гене GalK).

Штаммы, устойчивые к 2-дезоксиглюкозе.

Streptococcus thermophilus CHCC16165 (мутант CHCC11976, устойчивый к 2-дезоксиглюкозе).

Streptococcus thermophilus CHCC16731 (усиливающий сладкий вкус и текстурирующий мутант CHCC16165).

Streptococcus thermophilus CHCC19216 (усиливающий сладкий вкус и текстурирующий мутант CHCC18948).

Пример 1. Применение 2-дезоксиглюкозы для выделения мутанта по глюкокиназе *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 с усиленным выделением глюкозы.

Для того чтобы выделить мутантов штамма CHCC11976 *Streptococcus thermophilus*, клетки, полученные в результате роста одной колонии, инокулировали в 10 мл бульона M17, содержащего 2% лактозы, и выращивали в течение ночи при 40°C.

На следующие сутки штаммы высевали в серийных разведениях на чашки с агаризованной M17, содержащей 2% галактозы и 20 мМ концентрацию 2-дезоксиглюкозы (CHCC11976), и инкубировали в течение 20 часов при 40°C. Устойчивые колонии сначала повторно высевали штрихом на тот же самый тип чашек с агаром, на котором они были подвергнуты селекции. Выживших использовали для инокуляции свежего бульона M17, содержащего одно из следующих: 2% лактозы, 2% галактозы или 2% глюкозы, и измеряли рост.

На основе этого идентифицировали целый ряд мутантов, которые могли расти на галактозе быстрее, чем на глюкозе, как описано в примере 2. Одним таким мутантом был CHCC16165.

Пример 2. Картина роста мутанта, устойчивого к 2-дезоксиглюкозе.

Для обеспечения отбора мутантов, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе, которые могут расти на галактозе, использовали два штамма, которые были отобраны из набора галактозоферментирующих штаммов. В то время как данные галактозоферментирующие штаммы все еще растут по меньшей мере на 10% быстрее в экспоненциальной фазе в бульоне M17 плюс 2% глюкозы, чем в бульоне M17 плюс 2% галактозы, устойчивый к 2-дезоксиглюкозе мутант - производное CHCC11976, т.е. CHCC16165, с другой стороны, отличается более быстрым ростом в экспоненциальной фазе в бульоне M17 плюс 2% галактозы, чем в бульоне M17 плюс 2% глюкозы.

Рост в экспоненциальной фазе измеряют здесь как развитие оптической плотности экспоненциально растущей культуры при 600 нанометрах (ОП₆₀₀) с течением времени при 40°C.

Как известно специалисту в данной области техники, он может варьировать от вида к виду, когда культура находится в экспоненциальном росте. Специалисту в данной области техники известно как определять рост в экспоненциальной фазе, например в интервале ОП₆₀₀ 0,1-1,0.

Оптическую плотность (ОП) культуры измеряют на спектрофотометре.

Закключение.

На основании картины роста мутанта, устойчивого к 2-дезоксиглюкозе, данного примера 2 - для конкретного интересующего штамма (например, штамма из релевантного имеющегося в продаже продукта) - специалист в данной области техники может протестировать согласно устоявшейся практике, имеет ли данный конкретный интересующий штамм подходящую картину роста, которая является свойством отобранных мутантов.

Пример 3. Отбор гиперферментирующего лактозу и секретирующего глюкозу мутанта *Streptococcus thermophilus* CHCC16165.

Для того чтобы выделить гиперферментирующего лактозу и секретирующего глюкозу мутанта штамма CHCC16165 *Streptococcus thermophilus*, клетки, полученные в результате роста одной колонии, инокулировали в 10 мл бульона M17, содержащего 2% галактозы, и выращивали в течение ночи при 40°C.

На следующие сутки данный штамм высевали в серийных разведениях на чашки с агаризованной M17, содержащей 2% сахарозы и 40 мМ концентрацию 2-дезоксиглюкозы, и инкубировали в течение 20 часов при 40°C. Отбирали с чашки 10 случайных колоний и использовали для инокулирования свежего бульона M17, содержащего 2% сахарозы, и инкубировали в течение ночи при 40°C. Мутантов CHCC16165 переносили на свежие среды M17, содержащие 2% сахарозы.

Пример 4. Анализ углеводов ферментированного молока.

Мутантов, полученных в Примере 3, и штамм CHCC16165 выращивали в 9,6%-ном В-молоке, содержащем 0,01% сахарозы. После скисания молоко, подкисленное CHCC16165, имело концентрацию лактозы 14,9, концентрацию галактозы 8,4 и концентрацию глюкозы 5,7. По сравнению с этим, молоко, подкисленное лучше всего работающим мутантом CHCC16165, имело концентрацию лактозы 9,3, концентрацию галактозы 10,5 и концентрацию глюкозы 9,9. Указанный лучший мутант CHCC16165 был обозначен CHCC16731 и был подвергнут дальнейшему тестированию в ферментации молока при использовании в комбинации со штаммами CHCC16159 и CHCC16160 *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* (описанными в WO2013/160413).

Выращенные в течение ночи культуры CHCC16165 и CHCC16731 в комбинации с каждым из CHCC16159 и CHCC16160 добавляли в 200 мл образцов В-молока и вызывали скисание при 40°C.

Результаты показаны в табл. 1.

Таблица 1

Смесь штаммов	Лактоза мг/мл	Галактоза мг/мл	Глюкоза мг/мл
CHCC16165 + CHCC16159	14,0	10,9	6,5
CHCC16165 + CHCC16160	13,5	11,0	6,9
CHCC16731 + CHCC16159	1,0	22,0	16,2
CHCC16731 + CHCC16160	1,0	22,5	16,0
В-молоко	48,9	Не выявляется	Не выявляется

Как видно из результатов табл. 1, CHCC16731 способен удалять почти всю лактозу из молока. Также CHCC16731 продуцирует и секретирует в молоко высокие уровни и галактозы, и глюкозы. Принимая во внимание то, что сахароза представляет собой контроль - 100, а сладость лактозы составляет 16, сладость галактозы составляет 32, и сладость глюкозы - 74,3, ферментированный молочный продукт, полученный с использованием CHCC16731, имеет значительно усиленный сладкий вкус.

Пример 5. Получение галактозоположительного мутанта *Streptococcus thermophilus* CHCC 12339.

Streptococcus thermophilus CHCC12339 выращивали в течение ночи в M17, содержащей 2% лактозы, при 40°C. Выращенную в течение ночи культуру высевали (100 мкл) на чашку M17, содержащую 2% галактозы, и анаэробно инкубировали при 40°C. На чашках с M17, содержащей 2% галактозы, появились 22 колонии. 16 из них повторно высевали штрихом на тот же самый тип чашек, и 8 из них переносили в жидкую M17, содержащую 2% галактозы, что в целом привело к росту, и 4 из данных культур замораживали. 2 из замороженных культур распределяли на чашки с M17, содержащей 2% галактозы и 40 мМ 2-дезоксиглюкозу, и для каждой культуры отбирали 8 образующихся колоний. 16 мутантов, отобранных с 2-дезоксиглюкозой, переносили в жидкую M17, содержащую 2% лактозы и 2% галактозы, и выращивали в течение ночи при 40°C, после чего данных мутантов выращивали в жидкой M17, содержащей 2% галактозы, в течение 3 ночей, и продуцирование галактозы и глюкозы измеряли и отслеживали на протяжении роста. На основании продуцирования галактозы и глюкозы отбирали 7 культур для тестирования подкисления молока посредством добавления 2 мл культуры в 200 мл 9,5%-ного В-молока, содержащего 0,05% сахарозы. 3 мутанта имели профили подкисления, имеющие сходство с профилем подкисления материнского штамма CHCC12339, и данные 3 мутанта высевали штрихом для получения одиночных колоний и инкубировали в течение 48 часов. Затем данные колонии переносили в жидкую M17, содер-

жашую 2% галактозы, и рост данных 3 мутантов тестировали относительно СН12339. Отбирали мутанта, имеющего самый сильный рост, и очищали еще раз посредством посева одиночной колонии штрихом 3 раза с получением очищенного галактозоположительного штамма, названного СНСС18948 (галактозоположительный вариант СНСС12339).

Пример 6. Получение устойчивого к 2-дезоксиглюкозе мутанта *Streptococcus thermophilus* СНСС18948 с повышенным выделением глюкозы.

100 мкл культуры СНСС18949 распределяли на чашки с М17, содержащей 2% галактозы и 20 мМ или 40 мМ 2-дезоксиглюкозу, и инкубировали в течение ночи при 40°C. Отбирали 8 колоний с чашек с 20 мМ и 8 колоний с чашек с 40 мМ и выращивали в жидкой М17, содержащей 2% галактозы и 20 мМ 2-оксиглюкозу. Образованные в результате культуры замораживали и повторно высевали штрихом, и 12 из образованных колоний включали в среду М17 и использовали для подкисления В-молока. 1% выращенной в течение ночи культуры мутанта, устойчивого к 2-дезоксиглюкозе, инокулировали в 200 мл 9,5%-ного В-молока, содержащего 0,05% сахарозы, и вызывали скисание при 40°C. Все 12 мутантов СНСС18948, устойчивых к 2-дезоксиглюкозе, продуцировали ферментированные молочные продукты с низкими концентрациями лактозы и высокими концентрациями галактозы и глюкозы. 7 мутантов отбирали для повторного тестирования по отдельности и для тестирования совместно со штаммами СНСС16159 *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* (описанными в WO2013/160413). Вновь 1% выращенной в течение ночи культуры мутанта, устойчивого к 2-дезоксиглюкозе, инокулировали в 200 мл 9,5%-ного В-молока, содержащего 0,05% сахарозы, и вызывали скисание при 40°C.

Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Штамм / смесь штаммов	Лактоза мг/мл	Галактоза мг/мл	Глюкоза мг/мл
СНСН18948-Мутант1	Не выявляется	17,9	20,8
СНСН18948- Мутант2	Не выявляется	18,9	23,8
СНСН18948- Мутант3	9,5	13,6	14,5
СНСН18948- Мутант7	Не выявляется	19,1	24,2
СНСН18948- Мутант10	1,7	16,0	21,1
СНСН18948- Мутант11	Не выявляется	17,5	22,9
СНСН18948- Мутант12	3,6	16,9	18,7
СНСН18948- Мутант1 + СНСС16159	7,9	16,7	9,6
СНСН18948- Мутант2 + СНСС16159	9,1	18,4	10,3
СНСН18948- Мутант3 + СНСС16159	3,5	18,6	11,9
СНСН18948- Мутант7 + СНСС16159	10,7	15,1	7,7
СНСН18948- Мутант10 + СНСС16159	10,2	16,2	8,5
СНСН18948- Мутант11 + СНСС16159	10,5	15,9	8,4
СНСН18948- Мутант12 + СНСС16159	3,3	19,0	10,9
В-молоко	47,1	Не выявляется	Не выявляется

Тремя наилучшими мутантами являются мутанты 2, 3 и 12, и их повторно тестировали в В-молоке, содержащем 0,05% сахарозы, по отдельности и в комбинации со штаммами СНСС16159, СНСС16160 и СНСС16161 *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* (описанными в WO2013/160413).

Результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Штамм / смесь штаммов	Лактоза мг/мл	Галактоза мг/мл	Глюкоза мг/мл
CHCH16159	9,9	14,8	8,7
CHCH16160	1,6	18,5	17,5
CHCH16161	12,8	13,7	8,6
CHCH18948-Мутант2 + CHCH16159	6,8	19,4	12,0
CHCH18948-Мутант2 + CHCH16160	Не выявляется	21,3	17,6
CHCH18948-Мутант2 + CHCH16161	Не выявляется	20,5	17,1
CHCH18948-Мутант12 + CHCH16159	5,0	19,3	12,1
CHCH18948-Мутант12 + CHCC16160	1,4	21,8	16,5
CHCH18948-Мутант12 + CHCC16161	4,2	20,2	14,6
CHCH18948-Мутант3 + CHCC16159	1,6	19,8	13,2
CHCH18948-Мутант3 + CHCC16160	Не выявляется	20,2	16,5
CHCH18948-Мутант3 + CHCC16161	3,0	19,5	16,5
CHCH18948-Мутант2	Не выявляется	19,7	27,3
CHCH18948-Мутант3	Не выявляется	19,9	27,1
CHCH18948-Мутант12	4,7	15,1	17,0
В-молоко	42,8	Не выявляется	Не выявляется

На основании приведенных выше данных, CHCH18948-Мутант3 был отобран как лучший мутант, и он был обозначен CHCC19216. Как видно из приведенных выше данных, CHCC19216 способен удалять почти всю лактозу из молока. CHCC19216 также продуцирует и секретирует в молоко высокие уровни и галактозы, и глюкозы. Принимая во внимание то, что сахара представляют собой контроль - 100, а сладость лактозы составляет 16, сладость галактозы составляет 32, и сладость глюкозы - 74,3, ферментированный молочный продукт, полученный с использованием CHCC19216, имеет значительно усиленный сладкий вкус.

Пример 7. Текстурирующая способность CHCC16731 и CHCC19216.

Текстурирующую способность штаммов CHCC16731 и CHCC19216 тестировали путем измерения напряжения сдвига с использованием следующего анализа.

Через семь суток после инкубации ферментированное молоко доводили до 13°C и легко помешивали посредством палочки, оснащенной диском с отверстиями, до достижения гомогенности образца. Реологические свойства образца оценивали на реометре (реометр Anton Paar Physica ASC/DSR301 (автосэмплер), Anton Paar® GmbH, Австрия) с использованием следующих установок.

Время ожидания (для восстановления в некоторой степени исходной структуры):

5 минут без качания или вращения,

качание (для измерения G' и G'' для расчета G*),

у равно 0,3%, частота (f) равна [0,5... 8] Гц,

6 точек измерения за 60 с (одно измерение каждые 10 с),

вращение (для измерения напряжения сдвига при 300 1/с и т.д.),

$\dot{\gamma} = [0,2707-300]$ 1/с, и $\dot{\gamma} = [275-0,2707]$ 1/с

21 точка измерения за 210 с (одно каждые 10 с), идущего вплоть до 300 1/с, и

21 точка измерения за 210 с (одно каждые 10 с), идущего вплоть до 0,2707 1/с.

Для дальнейшего анализа было выбрано напряжение сдвига при 300 1/с. Штаммы CHCC16731 и CHCC19216 в смесях, перечисленных в табл. 4, использовали для подкисления образцов 200 мл 9,5%-ного В-молока с использованием инокулюма 0,024% до достижения pH 4,55. Результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4

№ смеси	Содержание St по изобретению	Содержание по St CHCC16404	Содержание St CHCC15757	Содержание Lb CHCC-16159	Напряжение сдвига, Па
1	72,73% CHCC16731	13,64%	4,54%	9,09%	41,3
2	72,73% CHCC19216	13,64%	4,54%	9,09%	51,5
3	36,36% CHCC16731 + 33,36% CHCC19216	13,64%	4,54%	9,09%	43,3

Lb: штамм CHCC16159 *L. delbrueckii* подвид *bulgaricus*,
St: *Streptococcus thermophilus*.

Как видно из данных результатов, штаммы CHCC16731 и CHCC19216 при использовании в культуральной смеси в качестве единственного *S. thermophilus*, производят ферментированный молочный продукт с напряжением сдвига 41,3 и 51,5 Па, соответственно. При использовании в комбинации штаммы CHCC16731 и CHCC19216 производят ферментированный молочный продукт с напряжением сдвига 43,3 Па.

Данный уровень напряжения сдвига является высоким по сравнению с традиционными штаммами, усиливающими сладкий вкус, как раскрыто, например, в WO2013/160413.

Пример 8. Вкус и рост *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* (Lb) для композиции культуры по изобретению по сравнению с культурой с лактозоположительной глюкозоположительной Lb.

План эксперимента.

Таблица 5. Композиция протестированных культур

	CHCC16404 (St) г	CHCC16731 (St) г	CHCC15757 (St) г	CHCC18944 (Lb) г	CHCC12813 (Lb) г
1: культура по изобретению	10,5	10,5	6	1,5	0
2: культура с традиционной Lb	10,5	10,5	6	0	1,5

Культура по изобретению состоит из трех глюкозодефицитных *Streptococcus thermophilus* (St) и одной лактозодефицитной Lb. Культура 2 (сравнительная культура) состоит из трех глюкозодефицитных St и одной лактозоположительной глюкозоположительной (традиционной) Lb.

Две культуры с композицией, указанной в табл. 5, получали и использовали в качестве заквасочной культуры при ферментации с получением йогурта при 43 °С, пока не достигался целевой pH 4,55. Две данные культуры сравнивали в отношении вкуса, роста Lb, последующего закисления, углеводов и реологии.

Молочная основа.

Молочная основа содержала 4,5% белка, 1,0% жира и 0,1% сахарозы.

Смешивали молоко с жирностью 0,5% и молоко с жирностью 1,5% для достижения содержания жира 1% в конечной молочной основе, и добавляли 0,1% сахарозы. Уровни белка доводили до 4,5% с использованием обезжиренного сухого молока (SMP). Гидратирование происходило при 6°С в течение 2 часов. Затем молоко гомогенизировали при 20000/5000 кПа при 65°С и пастеризовали при 95°С в течение 5 минут.

Параметры получения йогурта.

pH во время ферментации измеряли онлайн с использованием Intar. При достижении йогуртами pH 4,55 гель разрушали с использованием палочки с диском с отверстиями. Гель затем обрабатывали в блоке для последующей обработки (PTU) при 200 кПа при 25°С, заполняли им 120 мл чашки для йогурта и хранили при 6°С в течение 28 суток.

Измерение напряжения сдвига.

Использовали способ, описанный в примере 7, за исключением того, что образцы не перемешивали палочкой, оснащенной диском с отверстиями, так как гель уже был разрушен во время обработки PTU с получением гомогенности образцов.

Измерение колониеобразующих единиц.

M17 использовали в качестве селективной среды для St. MRSIac (MRS плюс 8% лактозы) использовали в качестве селективной среды для Lb. Делали 10× серии разведения йогуртов. Каждое разведение высевали на чашки с агаром M17 и MRSIac, соответственно, и анаэробно инкубировали при 37°C в течение 2 суток. Затем подсчитывали колониеобразующие единицы.

Закисление.

Для достижения pH 4,55 культурой 1 требовалось 10,8 часов. Для достижения pH 4,55 культурой 2 требовалось 12,1 часов.

Последующее закисление.

Таблица 6. Последующее закисление

pH	Сутки 0	Сутки 1	Сутки 7	Сутки 14	Сутки 21	Сутки 28
Культура 1	4,55	4,53	4,51	4,54	4,50	4,54
Культура 2	4,55	4,51	4,50	4,51	4,50	4,54

Рост Lb.

Таблица 7. Рост культуры (колониеобразующие единицы (КОЕ)) в конце ферментации

	Lb (КОЕ)	St (КОЕ)
Культура 1	3E+07	9E+08
Культура 2	9E+05	8E+08

Как видно из табл. 7, число клеток Lb культуры по изобретению было значительно более высоким, чем число Lb сравнительной культуры с традиционной Lb, т.е. лактозоположительной глюкозоположительной Lb. Таким образом, комбинация глюкозодефицитного St и лактозодефицитной Lb дает более высокий уровень Lb в конце ферментации.

Реология.

Культура 1 имеет напряжение сдвига 41,1 Па в конце ферментации при 300 1/с.

Культура 2 имеет напряжение сдвига 27,3 Па в конце ферментации при 300 1/с.

Углеводы.

Таблица 8. Уровень углеводов в конце ферментации

	Глюкоза (мг/г)	Галактоза (мг/г)	Лактоза (мг/г)
Культура 1	15,3	13,8	31,1
Культура 2	15,3	13,6	13,3

Вкус.

Вкус анализировали посредством оценки группой дегустаторов. Культура 1 не имела каких-либо привкусов.

Пример 9. Вкус и рост *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* (Lb) для композиции культуры по изобретению по сравнению с культурой с глюкозодефицитной Lb.

План эксперимента.

Таблица 9. Композиция протестированных культур

	CHCC1640 4 (St) г	CHCC1673 1 (St) г	CHCC1575 7 (St) г	CHCC18944 (Lb) г	CHCC1615 9 (Lb) г
1: культура по изобретению	10,5	10,5	6	1,5	0
2: культура с глюкозодефицитной Lb	10,5	10,5	6	0	1,5

Культура по изобретению состоит из трех глюкозодефицитных St и одной лактозодефицитной Lb. Культура 2 (сравнительная культура) состоит из трех глюкозодефицитных St и одной лактозоположительной глюкозодефицитной Lb.

Две культуры с композицией, указанной в табл. 9, получали и использовали в качестве заквасочной

культуры при ферментации с получением йогурта при 43°C, пока не достигался целевой pH 4,55. Две данные культуры сравнивали в отношении вкуса (уровень аминокислот), летучих органических компонентов, углеводов и реологии.

Молочная основа.

Использовали две молочные основы с корректировкой либо обезжиренным сухим молоком (SMP), либо белком сыворотки (WP), и они содержали 4,5% белка, 1% жиров и 0,1% сахарозы.

Смешивали молоко с жирностью 0,5% и молоко с жирностью 1,5% для достижения содержания 1% жира в конечной молочной основе, и добавляли 0,1% сахарозы. Уровни белка доводили до 4,5% с использованием SMP или WP. Гидратирование происходило при 6°C в течение 2 часов. Затем молоко гомогенизировали при 20000/5000 кПа при 65°C и пастеризовали при 95°C в течение 5 минут.

Параметры получения йогурта.

pH во время ферментации измеряли онлайн в миникультуральных флаконах с использованием CI-NAC. При достижении йогуртами pH 4,55 гель разрушали и гомогенизировали с использованием палочки с диском с отверстиями. Затем йогурт хранили в миникультуральных флаконах.

Измерение напряжения сдвига.

Использовали способ, описанный в примере 7.

Реология.

Культура 1 в молочной основе SMP имеет напряжение сдвига 46,2 Па в конце ферментации при 300 1/с.

Культура 1 в молочной основе WP имеет напряжение сдвига 39,6 Па в конце ферментации при 300 1/с.

Культура 2 в молочной основе SMP имеет напряжение сдвига 42,0 Па в конце ферментации при 300 1/с.

Культура 2 в молочной основе WP имеет напряжение сдвига 38,4 Па в конце ферментации при 300 1/с.

Как видно из результатов, культура 1 имеет более высокое напряжение сдвига по сравнению с культурой 2.

Последующее закисление.

Таблица 10. Последующее закисление

pH	Сутки 0	Сутки 7	Сутки 14	Сутки 21	Сутки 28
Культура 1 в молочной основе SMP	4,55	4,51	4,56	4,39	4,49
Культура 1 в молочной основе WP	4,55	4,52	4,55	4,39	4,48
Культура 2 в молочной основе SMP	4,55	4,45	4,50	4,32	4,43
Культура 2 в молочной основе WP	4,55	4,42	4,47	4,30	4,40

Рост Lb.

Таблица 11. Рост культуры (колониобразующие единицы (КОЕ)) в конце ферментации

	LB (КОЕ)	ST (КОЕ)
Культура 1 в молочной основе SMP	1E+07	2E+08
Культура 1 в молочной основе WP	2E+07	5E+07
Культура 2 в молочной основе SMP	2E+08	9E+07
Культура 2 в молочной основе WP	2E+08	1E+08

Как видно из табл. 11, число клеток Lb культуры по изобретению было меньше, чем число Lb сравнительной культуры с лактозоположительной глюкозодефицитной Lb. Углеводы табл. 12: уровень углеводов в конце ферментации.

Таблица 12

	Глюкоза (мг/г)	Галактоза (мг/г)	Лактоза (мг/г)
Культура 1 в молочной основе SMP	14,4	13,2	15,4
Культура 1 в молочной основе WP	12,0	10,2	9,2
Культура 2 в молочной основе SMP	16,4	16,3	11,7
Культура 2 в молочной основе WP	14,6	14,1	6,1

Аминокислоты.

Таблица 13. Уровень аминокислот

	Глутаминовая кислота (млн ⁻¹)	Валин (млн ⁻¹)	Среднее значение общих свободных аминокислот (мМ)
Культура 1 в молочной основе SMP	77	9	5,5
Культура 1 в молочной основе WP	62	23	4,4
Культура 2 в молочной основе SMP	137	22	7,1
Культура 2 в молочной основе WP	85	45	5,4

Образцы, содержащие глюкозоотрицательную Lb (культуры 2), имеют более высокое количество TFFA (общие свободные аминокислоты), что указывает на более высокую протеолитическую активность, что, в свою очередь, может приводить к неприятным вкусам.

Кроме того, йогурты, содержащие глюкозоотрицательную Lb, содержат более высокое количество глутаминовой кислоты, которая известна за придание привкусов, описанных как "бульонистые".

Валин, являющийся горькой аминокислотой, также присутствует в более высоких количествах в йогуртах, содержащих глюкозоотрицательную Lb.

Летучие органические соединения (VOC).

Профиль VOC может служить указанием профиля вкуса образца.

Измеряли 51 разных летучих органических соединений. Для культуры 1 в молочной основе WP количество летучих органических соединений было ниже для 44 из 51 соединения (86%) по сравнению с культурой 2 в молочной основе WP. Для культуры 1 в молочной основе WP количество летучих органических соединений было ниже для 34 из 51 соединения (67%) по сравнению с культурой 2 в молочной основе WP. В заключение, культуры по изобретению имели значительно меньшее содержание летучих органических соединений (рассматриваемых как группа соединений) против сравнительных культур.

Пример 10. Рост и последующее закисление *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* (Lb) для композиции культуры по изобретению.

План эксперимента.

Таблица 14. Композиция протестированной культуры

	CHCC16404 (St) %	CHCC16731 (St) %	CHCC15757 (St) %	CHCC18944 (Lb) %
1: культура по изобретению	36,8	36,8	21,1	5,2

Культуру с композицией, указанной в табл. 14, получали и использовали в качестве заквасочной культуры при ферментации с получением йогурта при 43 °С, пока не достигался целевой pH 4,55. Данную культуру инокулировали при уровне 0,01, 0,02 и 0,03%. Полученный йогурт хранили при 5, 13 и 25°С. Культуру тестировали в отношении роста St и Lb и последующего закисления.

Молочные основы.

Таблица 15. Композиция молочных основ 1 и 2

	Количество	Белок	Углеводы	Жиры
Обезжиренное молоко	884,2 г			
1,5%-ное молоко	1767,1 г			
Промолоко 802FB	10,9 г			
SMP	73,9 г			
Сахароза	2,8 г			
Вода	261,0 г			
Молочная основа	3000 г	4,57%	5,61%	0,92%

Таблица 16. Состав молочной основы 3

	Количество	Белок	Углеводы	Жиры
Обезжиренное молоко	884,2 г			
1,5%-ное молоко	1767,1 г			
Промолоко 802FB	10,9 г			
SMP	73,9 г			
Сахароза	6,0 г			
Вода	257,8 г			
Молочная основа	3000 г	4,57%	5,71%	0,92%

Последующее закисление.

Таблица 17. Последующее закисление

Молочная основа	1	1	1	3	3	3
Инокуляция	0,01%	0,02%	0,03%	0,01%	0,02%	0,03%
5°C Сутки 1	4,54	4,54	4,53	4,53	4,53	4,52
5°C Сутки 7	4,50	4,50	4,49	4,51	4,51	4,51
5°C Сутки 21	4,48	4,48	4,49	4,50	4,50	4,50
5°C Сутки 42	4,43	4,42	4,45	4,43	4,45	4,42
13°C Сутки 1	4,50	4,49	4,50	4,51	4,50	4,50
13°C Сутки 7	4,46	4,46	4,45	4,50	4,49	4,50
13°C Сутки 21	4,38	4,38	4,38	4,42	4,45	4,42
25°C Сутки 1	4,43	4,43	4,43	4,45	4,46	4,45
25°C Сутки 7	4,40	4,40	4,40	4,43	4,44	4,43

Как видно из табл. 17, уровень последующего закисления является очень низким для всех протестированных уровней инокуляции и температур хранения, включая более высокие температуры хранения 13 и 25°C, где уровень роста Lb и, следовательно, последующего закисления является высоким для большинства традиционных заквасочных культур.

Рост Lb и St.

Таблица 18. Рост Lb и St

Молочная основа	1	1	1	2	2	2
Инокуляция	0,01%	0,02%	0,03%	0,01%	0,02%	0,03%
Lb КОЕ/г	5,8E05	6,5E05	7,2E05	3,7E05	4,7E05	8,8E05
St КОЕ/г	4,2E07	6,5E07	7,4E07	3,8E07	5,6E07	7,0E07

Как видно из табл. 18, для всех уровней инокуляции число клеток Lb в конце ферментации находилось на высоком уровне.

Пример 11. Рост, последующее закисление и анализ углеводов *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* (Lb) для композиции культуры по изобретению по сравнению с традиционными заквасочными культурами.

План эксперимента.

Таблица 19. Композиция протестированных культур

Образец	CHCC16404 (St) %	CHCC16731 (St) %	CHCC15757 (St) %	CHCC18944 (Lb) %	Добавление сахарозы после ферментации
1 YoFlex Premium 1.0					6,0%
2 Yoflex YF-L901					6,0%
3 Культура по изобретению	36,8	36,8	21,1	5,2	5,0%
4 Культура по изобретению	36,8	36,8	21,1	5,2	4,5%
5 Культура по изобретению	36,8	36,8	21,1	5,2	5,5%
6 Культура по изобретению	36,8	36,8	21,1	5,2	4,8%

Культуры с композицией, указанной в табл. 19, получали и использовали в качестве заквасочной культуры при ферментации с получением йогурта при 43 °С, пока не достигался целевой pH 4,55. Данную культуру инокулировали при уровне 0,02%. Полученный йогурт хранили при 5 и 13°С. Культуры тестировали в отношении роста St и Lb, последующего закисления и анализа углеводов.

YoFlex Premium 1.0 и Yoflex YF-L901 представляют собой имеющиеся в продаже традиционные культуры, содержащие лактозоположительные и глюкозоположительные St и Lb.

Молочная основа.

Таблица 20. Композиция молочной основы 1

	Количество	Белок	Углеводы	Жиры
1,5% молоко	3000 г			
SMP	85 г			
Молочная основа	3085 г	4,20%	6,06%	1,49%

Последующее закисление.

Таблица 21. Последующее закисление

Образец	1	2	3	4	5	6
6°С Сутки 1	4,49	4,48	4,54	4,54	4,53	4,54
6°С Сутки 7	4,45	4,43	4,52	4,52	4,52	4,53
6°С Сутки 21	4,44	4,37	4,47	4,47	4,46	4,46

Как видно из табл. 21, культуры по изобретению имеют низкий уровень последующего закисления, который находится на том же самом уровне, что и у традиционных заквасочных культур.

Рост Lb и St.

Таблица 22. Рост Lb и St

Образец	1	2	3	4	5	6
Lb КОЕ/г	6,1E04	1,7E05	3,1E06	2,8E06	3,1E06	2,8E06
St КОЕ/г	3,0E08	4,1E08	3,2E08	3,1E08	3,0E08	3,1E08

Как видно из табл. 22, число клеток Lb для культур по изобретению находилось на более высоком уровне в конце ферментации, чем у традиционных культур. Анализ углеводов табл. 23: анализ углеводов.

Таблица 23

	Образец	Галактоза мг/г	Глюкоза мг/г	Лактоза мг/г	Сахароза мг/г
1	YoFlex Premium 1.0	6,35	<LOD	34,35	46,55
2	Yoflex YF-L901	8,05	1,00	33,05	46,60
3	Культура по изобретению	8,95	8,70	19,90	41,55
4	Культура по изобретению	8,90	8,75	19,70	37,50
5	Культура по изобретению	8,60	8,40	19,15	43,10
6	Культура по изобретению	8,80	8,65	19,40	39,65

LOD: предел выявления.

Все определения углеводов делали в двойных повторностях, и в табл. 23 перечислены средние значения двух определений. Определения проводили после 7 суток хранения йогурта.

Как видно из табл. 23, культуры по изобретению продуцировали глюкозу на высоком уровне, и после 7 суток хранения глюкоза присутствовала на уровне приблизительно 8 мг/г.

Депонирования и экспертные решения.

Заявитель спрашивает, чтобы образец депонированных микроорганизмов, указанных ниже, мог быть сделан доступным только для эксперта до даты выдачи патента.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC11342 был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 8 сентября 2009 г. под № доступа DSM 22932.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC12339 был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 14 октября 2010 г. под № доступа DSM 24090.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 8 сентября 2009 г. под № доступа DSM 22934.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC16731 был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 4 июня 2014 г. под № доступа DSM 28889.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC19216 был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 8 декабря 2015 г. под № доступа DSM 32227.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 03.04.2012 г. под № доступа DSM 25850.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC15887 был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 03.04.2012 г. под № доступа DSM 25851.

Штамм *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 12.12.2012 г. под № доступа DSM 26722.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* CHCC18944 был депонирован в DSMZ - немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, 12.06.2014 г. под № доступа DSM 28910.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* CHCC10019 был депонирован в DSMZ - немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, 03.04.2007 г. под № доступа DSM 19252.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* CHCC16159 был депонирован в DSMZ - немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, 06.09.2012 г. под № доступа DSM 26420.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* CHCC16160 был депонирован в DSMZ - немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, 06.09.2012 г. под № доступа DSM 26421.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* CHCC12813 был депонирован в DSMZ - немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, 29.09.2010 г. под № доступа DSM 24074.

Данные депонирования были сделаны согласно Будапештскому договору по международному признанию депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Ссылки

- WO2011/026863;
 WO2011/092300;
 WO2013/160413;
 Pool et al. (2006) *Metabolic Engineering* 8(5); 456-464;
 Thompson et al. (1985) *J. Bacteriol.* 162(1); 217-223;
 Chervaux et al. (2000). *Appl and Environ Microbiol.* 66, 5306-5311;
 Cochu et al. (2003). *Appl and Environ Microbiol.* 69(9), 5423-5432;
 Høier et al. (2010) in *The Technology of Cheesemaking*, 2nd Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для получения ферментированного молочного продукта, содержащая: (1) по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus* (St), где данный штамм St является галактозоферментирующим, где данный штамм несет мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназу, где данная мутация инактивирует белок глюкокиназу или имеет отрицательное влияние на экспрессию этого гена, где галактозоферментирующую активность определяют как указано в описании изобретения, и где данная мутация уменьшает активность белка глюкокиназы по меньшей мере на 50%, и где активность глюкокиназы определяют как указано в описании изобретения, и (2) по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* подв. *bulgaricus* (Lb), где данный штамм Lb является лактозодефицитным и способен метаболизировать глюкозу, где лактозодефицитность определяют по способности штамма Lb образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид (X-Gal).

2. Композиция по п.1, где штамм St является устойчивым к 2-дезоксиглюкозе.

3. Композиция по п.1 или 2, где штамм St несет мутацию, которая уменьшает транспорт глюкозы в клетку.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где штамм St увеличивает количество глюкозы в 9,5%-ном В-молоке до по меньшей мере 5 мг/мл при инокуляции в 9,5%-ное В-молоко в концентрации 10^6 - 10^7 колониобразующих единиц (КОЕ)/мл и выращивании при 40°C в течение 20 ч.

5. Композиция по любому из пп.1-4, где штамм St увеличивает количество глюкозы в 9,5%-ном В-молоке с 0,05% сахарозы до по меньшей мере 5 мг/мл при инокуляции в 9,5%-ное В-молоко с 0,05% сахарозы в концентрации 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и выращивании при 40°C в течение 20 ч.

6. Композиция по любому из пп.1-5, где штамм Lb выбран из группы, состоящей из штамма, депонированного в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур DSMZ, GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, 12.06.2014 г. под № доступа DSM 28910, и функционально эквивалентного мутантного штамма, происходящего из DSM 28910, в котором менее 1% нуклеотидов в бактериальном геноме было заменено другим нуклеотидом или подвергнуто делеции по сравнению с материнским штаммом.

7. Композиция по любому из пп.1-6, где штамм St выбран из группы, состоящей из штамма CHCC19216 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 32227, штамма CHCC16731 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия, 4 июня 2014 г. под № доступа DSM 28889, штамма CHCC15757 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 25850, штамма CHCC15887 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 25851, штамма CHCC16404 *Streptococcus thermophilus*, который был депонирован в немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур под № доступа DSM 26722, и мутантного штамма, происходящего из них, где данный мутантный штамм представляет собой функционально эквивалентный штамм указанных депонированных штаммов и в котором менее 1% нуклеотидов в бактериальном геноме было заменено другим нуклеотидом или подвергнуто делеции по сравнению с материнским штаммом.

8. Способ получения ферментированного молочного продукта, включающий инокулирование и ферментирование молочного субстрата композицией по любому из пп.1-7.

9. Ферментированный молочный продукт, содержащий композицию по любому из пп.1-7.

10. Применение композиции по любому из пп.1-7 для получения ферментированного молочного продукта.

