

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042481**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.02.17**

(21) Номер заявки  
**201991400**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.01.12**

(51) Int. Cl. *A23C 9/12* (2006.01)  
*A23C 9/123* (2006.01)  
*C12R 1/225* (2006.01)  
*C12R 1/46* (2006.01)  
*C12N 9/38* (2006.01)

---

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННОГО МОЛОЧНОГО ПРОДУКТА**

---

(31) **17151378.1**

(32) **2017.01.13**

(33) **EP**

(43) **2020.01.16**

(86) **PCT/EP2018/050708**

(87) **WO 2018/130630 2018.07.19**

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

(72) Изобретатель:  
**Ба Чжаоюн, Бухгорн Гелле Леттир,  
Бульдо Патрициа, Хёгхольм Тина,  
Рунге Метте Орстрём, Шолер Йенпе,  
Войнович Воислав (DK)**

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

(56) WO-A1-2015193459  
US-A1-2009088391  
WO-A1-2015193449  
US-A1-2015086675  
WO-A1-2007021204  
WO-A1-2009071539

(57) Изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему стадии: 1) добавление к молочной основе заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий, 2) ферментация молока в течение периода времени до достижения желаемого рН, 3) использование заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм, который способен метаболизировать углевод, отличающийся от лактозы, и 4) добавление лактазы, стабильной при низком значении рН, к процессу в начале, во время или в конце стадии ферментации, где стабильная при низком значении рН лактаза сохраняет свою активность при рН 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению со своей активностью при оптимальном для лактазы значении рН.

**B1**

**042481**

**042481**

**B1**

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта.

#### Предшествующий уровень техники

В WO 2009/071539 раскрыта лактаза, происходящая из *Bifidobacterium bifidum*, которая обладает способностью к очень эффективному гидролизу в молоке и которая обладает активностью на широком диапазоне pH, включая низкий pH, например pH меньше 5. Лактаза может быть использована в способах получения молока и ферментированных молочных продуктов, таких как сыр, йогурт, масло, пахта, сквашенные сливки и т.п., для уменьшения содержания лактозы.

В WO 2013/160413 раскрыт способ получения ферментированного молочного продукта с использованием комбинации глюкозотрицательных штаммов молочнокислых бактерий и обычной лактазы с целью уменьшить содержание лактозы в ферментированном молочном продукте при увеличении содержания глюкозы.

В EP-A1-2957180 в одном из воплощений раскрыт способ получения ферментированного молочного продукта с использованием комбинации заквасочных культур и обычной лактазы с целью уменьшения содержания лактозы и уровня последующего закисления в ферментированном молочном продукте. В EP-A1-2957180 во втором воплощении раскрыт способ получения ферментированного молочного продукта с использованием лактозодефицитных молочнокислых бактерий.

#### Краткое изложение сущности изобретения

Задача в соответствии с настоящим изобретением заключается в том, чтобы предложить улучшенный способ получения ферментированного молочного продукта.

Задачу в соответствии с настоящим изобретением достигают способом получения ферментированного молочного продукта, включающего стадии:

- 1) добавление заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий, к молочной основе,
- 2) ферментация молока в течение периода времени до достижения желаемого pH,
- 3) где заквасочная культура содержит по меньшей мере один лактозодефицитный штамм, который способен метаболизировать углевод, отличающийся от лактозы, и
- 4) добавление лактазы, стабильной при низком значении pH, к процессу в начале, во время или в конце стадии ферментации, где лактаза, стабильная при низком значении pH, сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению со своей активностью при оптимальном для лактазы pH.

Лактозодефицитные молочнокислые бактерии как правило растут на источнике углевода, отличающегося от лактозы, такого как сахароза, галактоза и глюкоза, добавляемом в молоко в таком количестве, чтобы прекратить процесс ферментации и рост молочнокислых бактерий за счет исчезновения добавляемого источника углевода. Таким образом, последующее закисление во время последующего хранения значительно уменьшается или даже полностью предотвращается. Лактаза, стабильная при низком значении pH, будет активна в течение всего курса процесса ферментации и, следовательно, обеспечивает превращение большей части или всей лактозы, присутствующей в молоке, в глюкозу и галактозу. Таким образом, возможно получать ферментированный молочный продукт с уменьшенным содержанием лактозы или безлактозный продукт. Также возможно получать ферментированный молочный продукт с увеличенной естественной сладостью, так как глюкоза и галактоза обладают гораздо более высокой сладостью чем лактоза.

Настоящее изобретение основано на понимании того, что путем использования комбинации лактазы, стабильной при низком значении pH, и лактозодефицитных молочнокислых бактерий, можно получать ферментированный молочный продукт, который одновременно имеет уменьшенное содержание лактозы, увеличенную сладость и уменьшенное последующее закисление. Кроме того, неожиданно обнаружили, что указанная комбинация приводит в результате к ферментированному молочному продукту, обладающему улучшенной текстурой по сравнению с использованием лактозодефицитных молочнокислых бактерий и без лактазы и по сравнению с использованием лактазы, стабильной при низком значении pH, и лактозоположительных молочнокислых бактерий.

Кроме того, когда лактазу добавляют до стадии ферментации, тогда способ в соответствии с изобретением обеспечивает возможность уменьшить или даже устранить количество добавляемого в молоко углевода, отличающегося от лактозы. Таким образом, глюкоза и галактоза, образуемые за счет ферментативного действия лактазы, будут доступны для роста лактозодефицитных молочнокислых бактерий.

Наконец, когда лактазу добавляют после стадии ферментации, тогда возможно получить полное преимущество от способности лактозодефицитных молочнокислых бактерий избегать последующее закисление.

По всему миру значительное количество потребителей не толерантны или чувствительны к лактозе. Таким образом, в настоящее время существует высокая потребность в молочных продуктах, включающих ферментированные молочные продукты, с уменьшенным содержанием лактозы, или которые по существу не содержат лактозу. Настоящее изобретение предлагает новый подход к получению такого продукта простым и экономически эффективным образом.

## Подробное описание изобретения

### Лактаза

Лактаза ферментированного молочного продукта в соответствии с изобретением может представлять собой любую лактазу, которая сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению со своей активностью при оптимальном для лактазы pH.

В отношении настоящего изобретения активность лактазы в LAU (лактозных единицах) измеряют в соответствии с представленным в разделе "Определения" ниже.

В предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением лактаза сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 10%, предпочтительно по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%, по сравнению со своей активностью при оптимальном для лактазы pH.

В предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением лактаза сохраняет свою активность при pH 4,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5%, предпочтительно по меньшей мере 10%, более предпочтительно по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%, по сравнению со своей активностью при оптимальном для лактазы pH.

В предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением лактаза сохраняет свою активность при pH 3,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5%, предпочтительно по меньшей мере 10%, более предпочтительно по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%, по сравнению со своей активностью при оптимальном для лактазы pH.

В отношении настоящего изобретения оптимальный для лактазы pH определяют путем измерения лактазной активности при pH с использованием способа, указанного в разделе "Определения" ниже, и определения pH с оптимальной активностью.

В предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением лактаза сохраняет свою активность при температуре 10°C и pH 6,0 на уровне по меньшей мере 10% по сравнению со своей активностью при оптимальной для лактазы температуре. Предпочтительно лактаза сохраняет свою активность при температуре 10°C и pH 6,0 на уровне по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%, по сравнению со своей активностью при оптимальной для лактазы температуре.

В отношении настоящего изобретения оптимальную для лактазы температуру определяют путем измерения лактазной активности при различных температурах с использованием способа, указанного в разделе "Определения" ниже, и определения температуры с оптимальной активностью.

В предпочтительном воплощении лактаза, используемая в продукте в соответствии с настоящим изобретением, имеет лактазную активность при 37°C и pH 5, которая составляет по меньшей мере 55%, такую как по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 75% от лактазной активности при 37°C и pH 6.

В еще одном предпочтительном воплощении лактаза, используемая в продукте в соответствии с настоящим изобретением, обладает лактазной активностью при 37°C и pH 4,5, которая составляет по меньшей мере 10%, такую как по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35% или по меньшей мере 40% от лактазной активности при 37°C и pH 6.

В еще одном предпочтительном воплощении лактаза, используемая в продукте в соответствии с настоящим изобретением, обладает pH, оптимальным для лактазной активности при 37°C, который превышает pH 5,5.

В еще одном предпочтительном воплощении лактаза, используемая в продукте в соответствии с настоящим изобретением, обладает лактазной активностью при температуре 52°C и pH 6,5, которая составляет по меньшей мере 50%, такую как по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80% от лактазной активности при температуре 38°C и pH 6,5.

В предпочтительном воплощении в соответствии с настоящим изобретением  $K_m$  лактазы при 5°C составляет меньше 25 мМ, такую как меньше 20 мМ, меньше 15 мМ или меньше 10 мМ. В другом предпочтительном воплощении  $K_m$  лактазы при 37°C составляет меньше 25 мМ, такую как меньше 20 мМ или меньше 15 мМ. Специалист в данной области техники знает то, как определить  $K_m$  для лактазной активности при конкретной температуре.  $K_m$  может быть определена способом, описанным в WO 2009/071539.

В еще одном предпочтительном воплощении фермент, гидролизующий лактозу в молочном продукте, имеет отношение лактазной активности к трансгалактозидазной активности больше чем 1:1, такое как больше чем 2:1 или больше чем 3:1. В еще одном предпочтительном воплощении ферментативную обработку осуществляют в условиях, при которых лактазная активность фермента больше чем трансгалактозидазная активность по меньшей мере в два раза выше или по меньшей мере в три раза выше.

Отношение лактазной активности к трансгалактозидазной активности в молочном продукте может быть определено, например, при помощи анализа путем HPLC (высокоэффективной жидкостной хроматографии). В еще одном предпочтительном воплощении ферментативную обработку осуществляют в условиях, при которых по меньшей мере 50% (мас./мас.%) гидролизованной лактозы превращается в свободную галактозу. В еще одном предпочтительном воплощении ферментативную обработку осуществляют в условиях, при которых гидролизованная лактоза превращается в равные количества свободной глюкозы и свободной галактозы.

Лактаза в контексте настоящего изобретения представляет собой гликозидгидролазу, обладающую способностью гидролизовать дисахарид лактозу на составляющие галактозный и глюкозный мономеры. Группа лактаз, к которым принадлежит лактаза в соответствии с изобретением, содержит ферменты, относящиеся к подклассу ЕС 3.2.1.108, но не ограничивается ими. Ферменты, относящиеся к другим подклассам, таким как, например ЕС 3.2.1.23, также могут представлять собой лактазы в контексте настоящего изобретения. Лактаза в контексте изобретения может обладать активностями, отличающимися от гидролизующей лактозу активности, такими как, например трансгалактозилирующая активность. В контексте изобретения гидролизующая лактозу активность лактазы может быть названа как ее лактазная активность или ее бета-галактозидазная активность.

Ферменты, обладающие лактазной активностью, используемые в способе в соответствии с настоящим изобретением, могут быть животного, растительного или микробного происхождения. Предпочтительные лактазы получают из микробных источников, в частности из нитевидных грибов или дрожжей, или из бактерии.

Фермент, например может происходить из штамма *Agaricus*, например *A. bisporus*; *Ascovaginospora*; *Aspergillus*, например *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. oryzae*; *Candida*; *Chaetomium*; *Chaetotomastia*; *Dictyostelium*, например *D. discoideum*; *Kluveromyces*, например *K. fragilis*, *K. lactis*; *Mucor*, например *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, например *N. crassa*; *Rhizomucor*, например *R. pusillus*; *Rhizopus*, например *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, например *S. libertiana*; *Torula*; *Torulopsis*; *Trichophyton*, например *T. rubrum*; *Whetzelinia*, например *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, например *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. novalis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis*; *Bifidobacterium*, например *B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis*; *Chryseobacterium*; *Citrobacter*, например *C. freundii*; *Clostridium*, например *C. perfringens*; *Diplodia*, например *D. gossypina*; *Enterobacter*, например *E. aerogenes*, *E. cloacae* *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, например *E. herbicola*; *Escherichia*, например *E. coli*; *Klebsiella*, например *K. pneumoniae*; *Miriococcum*; *Myrothetium*; *Mucor*; *Neurospora*, например *N. crassa*; *Proteus*, например *P. vulgaris*; *Providencia*, например *P. stuartii*; *Psynoporus*, например *Psynoporus cinnabarinus*, *Psynoporus sanguineus*; *Ruminococcus*, например *R. torques*; *Salmonella*, например *S. typhimurium*; *Serratia*, например *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, например *S. flexneri*; *Streptomyces*, например *S. antibioticus*, *S. castaneoglobosporus*, *S. violeceoruber*; *Trametes*; *Trichoderma*, например *T. reesei*, *T. viride*; *Yersinia*, например *Y. enterocolitica*.

В предпочтительном воплощении лактаза происходит из бактерии, например из семейства *Bifidobacteriaceae*, такой как из рода *Bifidobacterium*, такой как из штамма *B. bifidum*, *B. animalis* или *B. longum*. В более предпочтительном воплощении лактаза происходит из *Bifidobacterium bifidum*.

В предпочтительном воплощении фермент, обладающий лактазной активностью, используемый в продукте в соответствии с настоящим изобретением, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислот 28-1931 в SEQ ID NO: 1, аминокислот 28-1331 в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, и их фрагментам, обладающим лактазной активностью. В более предпочтительном воплощении фермент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, такую как по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична последовательности, выбранной из группы состоящей из аминокислот 28-1931 в SEQ ID NO: 1, аминокислот 28-1331 в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и их фрагментам, обладающим лактазной активностью.

Предпочтительно фермент представляет собой лактазу, имеющую последовательность, которая по меньшей мере на 50%, такую как по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична аминокислотам 28-1931 в SEQ ID NO: 1 или ее фрагменту, обладающему лактазной активностью. Такой обладающий лактазной активностью фрагмент в SEQ ID NO: 1 может представлять собой любой фрагмент в SEQ ID NO: 1, обладающий лактазной активностью. Обладающий лактазной активностью фрагмент в SEQ ID NO: 1 может представлять собой, например, аминокислоты 28-979, аминокислоты 28-1170, аминокислоты 28-1323, аминокислоты 28-1331 или аминокислоты 28-1600 в SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном воплощении фермент, обладающий лактазной активностью, используемый в продукте в соответствии с настоящим изобретением, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична аминокислотам 28-1331 в SEQ ID NO: 2. В более предпочтительном воплощении фермент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, такую как по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична аминокислотам 28-1331 в SEQ ID NO: 2.

В еще одном воплощении фермент, обладающий лактазной активностью, используемый в продукте в соответствии с настоящим изобретением, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична SEQ ID NO: 3. Предпочтительно фермент имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, такую как по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 3.

В еще одном воплощении фермент, обладающий лактазной активностью, используемый в продукте в соответствии с настоящим изобретением, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична SEQ ID NO: 4. Предпочтительно фермент имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60%, такую как по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 4.

Для задач в соответствии с настоящим изобретением степень идентичности двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453), внедренного в программу Needle программного пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al. (2000) *Trends in Genetics* 16: 276-277), предпочтительно вариант 3.0.0 или более поздний. Возможные используемые параметры представляют собой штраф за внесение пропуска, равный 10, штраф за удлинение пропуска, равный 0,5, и матрицу замещений EBLOSUM62 (EMBOSS вариант BLOSUM62). Выходная информация в программе Needle, отмеченная как "самая длинная идентичность" (полученная с использованием опции не краткая), используется как процентная идентичность и рассчитывается следующим образом:

$(\text{Идентичные остатки} \times 100) / (\text{Длина выравнивания} - \text{Общее количество пропусков в выравнивании})$ .

Конкретная имеющаяся в продаже лактаза, подходящая для применения в настоящем изобретении, представляет собой лактазу F "Amano" 100SD, имеющуюся в продаже от Amano Enzyme Europe.

Лактазы, используемые в способе в соответствии с настоящим изобретением, могут быть внеклеточными. Они могут иметь сигнальную последовательность по своему N-концу, который отщепляется во время секреции.

Лактазы, используемые в способе в соответствии с настоящим изобретением, могут иметь происхождение из любых упомянутых здесь источников. Термин "имеющий происхождение" означает в этом контексте, что фермент может быть выделен из организма, где он представлен нативно, т.е. идентичность аминокислотной последовательности фермента идентична последовательности нативного фермента. Термин "имеющий происхождение" также означает, что ферменты могут быть получены рекомбинантно в организме-хозяине, рекомбинантно полученный фермент обладает идентичностью с нативным ферментом или имеет модифицированную аминокислотную последовательность, например имеет делецию, вставку и/или замену одной или более чем одной аминокислоты, т.е. рекомбинантно полученный фермент, который представляет собой мутант и/или фрагмент нативной аминокислотной последовательности. В понятие нативного фермента включены природные варианты. Кроме того, термин "имеющий происхождение" включает ферменты, продуцируемые синтетически путем, например, пептидного синтеза. Термин "имеющий происхождение" также охватывает ферменты, которые модифицированы, например, путем гликозилирования, фосфорилирования и т.п., как путем *in vivo* так и *in vitro*. В отношении рекомбинантно продуцируемого фермента термин "имеющий происхождение из" относится к идентичности фермента, а не идентичности организма-хозяина, в котором он продуцируется рекомбинантно.

Лактаза может быть получена из микроорганизма путем использования любого подходящего способа. Например препарат фермента лактазы может быть получен путем ферментации подходящего микроорганизма и последующего выделения препарата лактазы из получающегося в результате ферментирования бульона или микроорганизма способами, известными в области техники. Лактаза также может быть получена путем использования способов рекомбинантной ДНК. Такой способ, как правило, включает выращивание клетки-хозяина, трансформированной вектором рекомбинантной ДНК, включающим последовательность ДНК, кодирующую интересующую лактазу, и последовательность ДНК, функционально связанную с подходящим сигналом экспрессии, таким, что он способен экспрессировать лактазу в культуральной среде в условиях, которые обеспечивают экспрессию фермента и выделение фермента из культуры. Последовательность ДНК также может быть включена в геном клетки-хозяина. Последовательность ДНК может представлять собой геномную ДНК, κДНК или последовательность синтетического происхождения, или любую их комбинацию, и может быть выделена или синтезирована в соответствии со способами, известными в области техники.

Лактазы, используемые в способе в соответствии с настоящим изобретением, могут быть очищены.

Используемый здесь термин "очищенный" охватывает белок-фермент лактазу, по существу не содержащий нерастворимые компоненты продуцирующего организма. Термин "очищенный" также охватывает белок-фермент лактазу, по существу не содержащий нерастворимые компоненты нативного организма, из которого его получают. Предпочтительно, он также отделен от некоторых из растворимых компонентов организма и культуральной среды, из которой его получают. Более предпочтительно, его отделяют при помощи одной или более чем одной операции: фильтрации, осаждения или хроматографии.

Соответственно, фермент, обладающий лактазной активностью, может быть очищен, таким образом, что представлены лишь минорные количества других белков. Выражение "другие белки" относится, в частности, к другим ферментам. Используемый здесь термин "очищенный" также относится к удалению других компонентов, в частности других белков, и, в частности, других ферментов, присутствующих в клетке, из которой происходит лактаза. Лактаза может быть "по существу чистой", т.е. не содержащей другие компоненты организма, в котором она продуцируется, т.е., например организма-хозяина для рекомбинантно продуцируемой лактазы. Предпочтительно лактаза представляет собой по меньшей мере на 40% (мас./мас.) чистый препарат белка фермента, более предпочтительно по меньшей мере на 50, 60, 70, 80% или даже по меньшей мере на 90% чистый.

Термин фермент, обладающий лактазной активностью, включает какие-либо вспомогательные соединения, которые могут быть необходимы для каталитической активности фермента, такие как, например подходящий акцептор или кофактор, которые могут быть представлены в реакционной системе в природе или могут не быть представлены.

Фермент может находиться в любой форме, подходящей для желаемого применения, такой как, например в форме сухого порошка или гранулята, непьющего гранулята, жидкости, стабилизированной жидкости или защищенного фермента.

#### **Лактозодефицитные молочнокислые бактерии**

Термины "дефицит метаболизма лактозы" и "дефицит лактозы" используются в контексте настоящего изобретения для того, чтобы охарактеризовать LAB, которые частично или полностью утратили способность использовать лактозу в качестве источника для клеточного роста или поддержания жизнеспособности клетки. Соответствующие LAB способны метаболизировать один или несколько углеводов, выбранных из сахарозы, галактозы и/или глюкозы, или другого ферментируемого углевода. Поскольку эти углеводы не представлены в природе в молоке в достаточных количествах для поддержания ферментации лактозодефицитными мутантами, необходимо добавлять эти углеводы в молоко. Лактозодефицитные и частично дефицитные LAB могут быть охарактеризованы как белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид).

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм способен метаболизировать углевод, отличающийся от лактозы, выбранный из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы, предпочтительно сахарозы. В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм способен метаболизировать галактозу.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм выбран из группы, состоящей из лактозодефицитного *Streptococcus thermophilus* и лактозодефицитного *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактозодефицитный штамм выбран из группы, состоящей из:

(а) штамма *Streptococcus thermophilus*, представляющего собой:

(1) штамм, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12) под номером доступа DSM 28952;

(2) или штамм, имеющий происхождение из DSM 28952, дополнительно характеризующийся как обладающий способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(б) штамма *Streptococcus thermophilus*, представляющего собой:

(1) штамм, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12) под номером доступа DSM 28953;

(2) или штамм, имеющий происхождение из DSM 28953, дополнительно характеризующийся как обладающий способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(в) штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, представляющий собой:

(1) штамм, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12) под номером доступа DSM 28910;

(2) или штамм, имеющий происхождение из DSM 28910, где производный штамм дополнительно характеризуется как обладающий способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением заквасочная культура содержит по меньшей мере один лактозодефицитный *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один лактозоде-

фицитный *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением заквасочная культура содержит по меньшей мере один *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, и где все из штаммов *Streptococcus thermophilus* и все *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* являются лактозодефицитными.

#### **Стадии способа в соответствии с изобретением**

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением стадию ферментации прекращают способом, выбранным из группы, состоящей из:

- 1) закисления ферментированного молока, приводящего к тому, что по меньшей мере один штамм стартовой культуры не способен расти,
- 2) охлаждающей обработки и
- 3) истощения углевода, отличающегося от лактозы.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением углеводов, отличающийся от лактозы, добавляют к молочной основе в начале стадии ферментации.

Предпочтительно углеводов, отличающийся от лактозы, добавляют к молочной основе в таком количестве, чтобы он истощался, и, следовательно, приводил в результате к прекращению роста молочнокислых бактерий и прекращению ферментации. Предпочтительно углеводов, отличающийся от лактозы, добавляют к молочной основе в таком количестве, чтобы он истощался, и, следовательно, приводил в результате к прекращению роста молочнокислых бактерий и прекращению ферментации при выбранном желаемом значении pH.

Количество углеводов, отличающегося от лактозы, добавляемого к молочной основе, зависит от множества параметров, включающих штаммы молочнокислых бактерий, используемых в заквасочной культуре, композиции молочной основы, температуры ферментации и желаемого целевого pH. Кроме того, количество углеводов, отличающегося от лактозы, добавляемого к молочной основе, может зависеть от типа и количества лактазы, используемой в способе. Количество углеводов, отличающегося от лактозы, добавляемого к молочной основе, может быть определено путем проведения экспериментов и находится в пределах знаний специалиста в данной области техники, осуществляющего такой эксперимент.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением добавляемый углевод, отличающийся от лактозы, выбран из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы, предпочтительно сахарозы.

В первом аспекте в соответствии с изобретением стабильную при низком значении pH лактазу добавляют к молочной основе в начале стадии ферментации. В этом аспекте добавляемая лактаза превращает лактозу молочной основы в глюкозу и галактозу, которые способны к метаболизму для заквасочной культуры дополнительно к добавляемому углеводу, отличающемуся от лактозы. В этом случае невозможно прекратить ферментацию путем истощения добавляемого углевода, отличающегося от лактозы. Таким образом, в конкретном воплощении первого аспекта в соответствии с изобретением стадию ферментации прекращают способом, выбранным из группы, состоящей из:

- 1) закисления ферментированного молока, приводящего к тому, что по меньшей мере один штамм заквасочной культуры не способен расти, и
- 2) охлаждающей обработки.

В конкретном воплощении первого аспекта в соответствии с изобретением никакой углеводов, отличающийся от лактозы, не добавляют на стадии ферментации и по меньшей мере один лактозодефицитный молочнокислый штамм заквасочной культуры способен метаболизировать углевод, выбранной из группы, состоящей из глюкозы и галактозы. В этом воплощении лактозодефицитный молочнокислый штамм заквасочной культуры растет исключительно на глюкозе и/или галактозе, образующихся за счет ферментативного действия лактазы, стабильной при низком значении pH. В этом воплощении в соответствии с изобретением ферментацию прекращают при желаемом значении pH способом, выбранным из группы, состоящей из: 1) закисления ферментированного молока, приводящего к тому, что по меньшей мере один штамм заквасочной культуры не способен расти, 2) охлаждающей обработки и 3) истощения глюкозы и/или галактозы, которые образовались под действием лактазы, стабильной при низком значении pH.

Во втором аспекте в соответствии с изобретением стабильную при низком значении pH лактазу добавляют к ферментируемому молоку в конце ферментации. В этом случае содержащий лактазу ферментированный молочный продукт предпочтительно хранят при температуре по меньшей мере 2°C в течение по меньшей мере 1 суток. В конкретном воплощении способа в соответствии с изобретением содержащий лактазу ферментированный молочный продукт хранят в течение по меньшей мере двух суток, предпочтительно по меньшей мере 3 суток, более предпочтительно по меньшей мере 4 суток, более предпочтительно по меньшей мере 5 суток, более предпочтительно по меньшей мере 6 суток и наиболее предпочтительно по меньшей мере 7 суток.

В конкретном воплощении второго аспекта в соответствии с изобретением стадию ферментации прекращают за счет истощения углевода, отличающегося от лактозы.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением желаемый pH составляет от 3,2 до 4,8, более предпочтительно от 3,6 до 4,6, более предпочтительно от 3,8 до 4,5 и наиболее предпочтительно от

4,0 до 4,4.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением температура ферментации составляет от 35 до 45°C, предпочтительно от 37 до 43°C и более предпочтительно от 40 до 43°C.

В еще одном конкретном воплощении в соответствии с изобретением ферментацию осуществляют при температуре от 15 до 35°C, предпочтительно от 25 до 35°C и более предпочтительно от 30 до 33°C.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением ферментированный молочный продукт упаковывают при температуре от 15 до 45°C.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением величину pH ферментированного молочного продукта поддерживают в диапазоне 0,3 единиц pH, предпочтительно в диапазоне 0,2 единиц pH и наиболее предпочтительно в диапазоне 0,1 единиц pH, при хранении после прекращения ферментации при температуре, используемой для ферментации в течение периода 20 ч.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением количество добавляемого углевода, отличающегося от лактозы, составляет от 1 до 30 мг/г, предпочтительно от 2 до 20 мг/г и более предпочтительно от 3 до 10 мг/г молочной основы.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением количество добавляемого углевода, отличающегося от лактозы, составляет от 0,1 до 10%, предпочтительно от 0,2 до 8%, предпочтительно от 0,3 до 2%, предпочтительно от 0,4 до 1,5% и более предпочтительно от 0,5 до 1,2%, где% представляет собой (мас./мас.), основанный на молочной основе.

Заквасочная культура может иметь композицию штамма любой обычной заквасочной культуры молочнокислых бактерий, включающей культуру единичного штамма и смеси культур, используемые для получения конкретного типа ферментированного молочного продукта. Другие полезные бактерии, которые могут быть добавлены в продукт дополнительно к заквасочной культуре, включают пробиотические бактерии *Bifidobacterium* spp.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением ферментированный молочный продукт после ферментации подвергают температурной обработке таким образом, чтобы уменьшить уровень бактерий заквасочной культуры до уровня не больше чем  $1 \times 10^2$  CFU (колониеобразующих единиц) на грамм ферментированного молочного продукта. В этом случае конкретное воплощение характеризуется тем, что лактазу добавляют после температурной обработки. В этом случае содержащий лактазу ферментированный молочный продукт хранят при температуре по меньшей мере 2°C в течение по меньшей мере 1 суток. В конкретном воплощении способа в соответствии с изобретением содержащий лактазу ферментированный молочный продукт хранят в течение по меньшей мере двух суток, предпочтительно по меньшей мере 3 суток, более предпочтительно по меньшей мере 4 суток, более предпочтительно по меньшей мере 5 суток, более предпочтительно по меньшей мере 6 суток и наиболее предпочтительно по меньшей мере 7 суток.

Температурную обработку для уменьшения уровня бактерий заквасочной культуры до уровня не больше чем  $1,0 \times 10^2$  CFU на г ферментированного молока предпочтительно осуществляют путем того, что подвергают заквасочную культуру ферментированного молочного продукта воздействию температуры от 50 до 110°C, предпочтительно от 50 до 100°C, предпочтительно от 50 до 90°C, предпочтительно от 60 до 85°C, более предпочтительно от 65 до 82°C и наиболее предпочтительно от 70 до 80°C. Температурную обработку предпочтительно осуществляют в течение периода от 5 до 180 с, предпочтительно от 5 до 120 с, более предпочтительно от 5 до 90 с, более предпочтительно от 5 до 60 с, более предпочтительно от 8 до 50 с и наиболее предпочтительно от 10 до 40 с. Предпочтительно уровень бактерий заквасочной культуры уменьшают до уровня не больше чем  $1,0 \times 10^1$  CFU на г ферментированного молока, более предпочтительно 0 CFU на г. Ферментированные молочные продукты, которые подвергали температурной обработке для того, чтобы уменьшить уровень бактерий до не больше чем  $1 \times 10^2$  CFU на г, подходят для хранения при температуре окружающей среды, такого как хранение при температуре по меньшей мере 5°C, предпочтительно по меньшей мере 10°C, более предпочтительно по меньшей мере 15°C и наиболее предпочтительно по меньшей мере 20°C.

Стабильную при низком значении pH лактазу добавляют в подходящем количестве для достижения желаемой степени лактозного гидролиза при выбранных условиях реакции. В конкретном воплощении в соответствии с изобретением лактазу добавляют в количестве от 100 до 20000 LAU на литр молочной основы, предпочтительно от 100 до 10000 LAU на литр молочной основы, предпочтительно от 100 до 5000 LAU на литр молочной основы, предпочтительно меньше чем 3000, таком как меньше чем 1500, меньше чем 1000, меньше чем 750 или меньше чем 500 LAU на литр молочной основы.

В предпочтительном воплощении лактазу добавляют в концентрации от 5 до 400 LAU на г лактозы в молочной основе, предпочтительно от 5 до 200 LAU на г лактозы в молочной основе, предпочтительно от 5 и 100 LAU на г лактозы в молочной основе, предпочтительно меньше чем 50, таком как меньше чем 40, меньше чем 30, меньше чем 20 или меньше чем 10 LAU на г лактозы в молочной основе.

В предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением лактазу добавляют к молочной основе в количестве от 2,0 до 50 мг/мл, предпочтительно от 5 до 48 мг/мл, более предпочтительно от 10 до 46 мг/мл и наиболее предпочтительно от 20 до 45 мг/мл.



В предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением остаточный уровень лактозы в конце ферментации составляет меньше чем 40 мг/мл, предпочтительно меньше чем 35 мг/мл, более предпочтительно меньше чем 30 мг/мл, более предпочтительно меньше чем 25 мг/мл, более предпочтительно меньше чем 20 мг/мл, более предпочтительно меньше чем 15 мг/мл, более предпочтительно меньше чем 10 мг/мл, более предпочтительно меньше чем 5 мг/мл, более предпочтительно меньше чем 3 мг/мл и наиболее предпочтительно меньше чем 1,5 мг/мл.

В предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением молочная основа в начале стадии ферментации имеет содержание лактозы от 30,0 до 70 мг/мл, предпочтительно от 35 до 65 мг/мл, более предпочтительно от 40 до 60 мг/мл и наиболее предпочтительно от 50 до 60 мг/мл.

В предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением, когда стабильную при низком значении рН лактазу добавляют в процессе в конце стадии ферментации, тогда ферментированный молочный продукт, к которому добавляют лактазу, имеет вязкость, которая обеспечивает возможность для легкого распределения лактазы в ферментированном молочном продукте, например, путем смешивания.

В предпочтительном воплощении способа в соответствии с изобретением лактаза, добавляемая в процесс, представлена в стерильной композиции. В другом предпочтительном воплощении способа в соответствии с изобретением лактазу добавляют в процессе в асептических условиях, например путем стерильного фильтрования раствора лактазы.

#### **Ферментированный молочный продукт**

Настоящее изобретение дополнительно относится к ферментированному молочному продукту, получаемому способом в соответствии с изобретением.

В конкретном воплощении изобретение относится к ферментированному молочному продукту, получаемому способом в соответствии с изобретением, включающему заквасочную культуру со стадии 3) указанного способа и стабильную при низком значении рН лактазу, добавляемую на стадии 4) указанного способа.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением ферментированный молочный продукт представляет собой продукт, который может быть получен с использованием штамма молочнокислых бактерий, выбранного из группы, состоящей из лактозодефицитного *Streptococcus thermophilus* и лактозодефицитного *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*.

В конкретном воплощении в соответствии с изобретением ферментированный молочный продукт выбран из группы, состоящей из йогурта, творожного сыра, простокваши, сквашенных сливок, пахты, ферментированной молочной сыворотки, сквашенного молока, сметаны, кефира, питьевого йогурта и японского био-йогурта. Предпочтительно, йогурт выбран из группы, состоящей из йогурта термостатного способа производства, перемешанного йогурта и питьевого йогурта.

В предпочтительном воплощении в соответствии с изобретением ферментированный молочный продукт содержит дополнительный пищевой продукт, выбранный из группы, состоящей из плодового напитка, ферментированных зерновых продуктов, химически подкисленных зерновых продуктов, продуктов на основе соевого молока и любой их смеси.

Ферментированный молочный продукт, как правило, содержит белок на уровне от 2,0 до 3,5 мас.%. Ферментированный молочный продукт также может представлять собой продукт с низким содержанием белка, имеющий уровень белка от 1,0 до 2,0 мас.%. Альтернативно, ферментированный молочный продукт может представлять собой продукт с высоким содержанием белка выше 3,5 мас.%.

#### **Применение**

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению в способе получения ферментированного молочного продукта, включающем стадии:

- 1) добавления к молочной основе заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий, и
- 2) ферментации молока в течение периода времени до достижения желаемого рН,
- 3) заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один лактозодефицитный штамм, который способен метаболизировать углевод, отличающийся от лактозы, и
- 4) лактазы, стабильной при низком значении рН, добавляемой в начале, во время или в конце стадии ферментации, где стабильная при низком значении рН лактаза сохраняет свою активность при рН 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению со своей активностью при оптимальном для лактазы значении рН.

#### **Определения**

В отношении настоящего изобретения применяются следующие определения:

"LAU" означает "лактозных единиц" и 1 лактазная единица (1 LAU) представляет собой количество фермента, которое высвобождает 1 мкмоль глюкозы в минуту в М-буфере при рН 6,5 и 37°C при концентрации лактозы 4,75% мас./об. М-буфер готовят путем растворения 3,98 г  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ , 8,31 г лимонной кислоты, 0,9 г  $K_2SO_4$ , 2,6 г  $K_2HPO_4$ , 7,35 г  $KH_2PO_4$ , 5,45 г КОН, 4,15 г  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 3,75 г  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  и 1,4 г  $NaHCO_3$  в 4 л воды, добавляя 12,5 мл 4 н. NaOH, доводя до рН 6,5 с использованием HCl и добавляя воды до общего объема 5 л.

Активность в LAU конкретной лактазы может быть определена путем прямого измерения глюкозы, высвобождаемой из лактозы в условиях, описанных выше. Специалист в данной области техники знает то, как определить такую активность. Альтернативно, активность может быть определена с использованием анализа активности лактазы, описанной в примере 1 настоящей заявки на изобретение. В данной заявке на изобретение активность получают путем сравнения со стандартной кривой, которую строят для известной активности лактазы, и апо ней рассчитывают активность для неизвестного образца. Лактаза с известной активностью может представлять собой, например лактозим, полученный из Novozymes A/S, Denmark.

Выражение "температурная обработка" означает любую обработку с использованием любой температуры в течение любого периода времени и при помощи любых средств или оборудования, которая инактивирует по меньшей мере часть бактерий заквасочной культуры. В этой связи термин "инактивация" означает любое прекращение, уменьшение или подавление роста бактерий, например клеточный лизис.

Выражение "молочнокислые бактерии" ("LAB") обозначают грамположительные, микроаэрофильные или анаэробные бактерии, которые ферментируют сахара с получением кислот, включающих молочную кислоту в качестве преимущественно продуцируемой кислоты, уксусную кислоту и пропионовую кислоту. Наиболее полезные для промышленности молочнокислые бактерии обнаружены в порядке "лактобациллы", который включает *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. и *Propionibacterium* spp. Их часто используют в качестве пищевых культур самих по себе или в комбинации с другими молочнокислыми бактериями.

Молочнокислые бактерии, включающие бактерии видов *Lactobacillus* sp. и *Lactococcus* sp., обычно поставляются в молочную промышленность в виде замороженных или лиофилизированных культур для роста в производственной закваске или так называемых культур "для прямого внесения" (DVS), предназначенных для прямой инокуляции в сосуд ферментера или емкость для продукции молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт или сыр. Такие культуры молочнокислых бактерий в общем называют "заквасочными культурами" или "заквасками". Как правило, заквасочная культура для йогурта содержит *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, и в большинстве стран йогурт законодательно определен как ферментированный молочный продукт, продуцируемый с использованием заквасочной культуры, содержащей два указанных штамма.

Термин "молоко" следует понимать как секрецию молока, полученную путем доения любого млекопитающего, такого как коровы, овцы, козы, буйволы или верблюды. В предпочтительном воплощении молоко представляет собой коровье молоко. Термин молоко также включает белковые/жировые растворы, приготавливаемые из растительных материалов, например соевое молоко.

Термин "молочная основа" может представлять собой любой не обработанный и/или обработанный молочный материал, который может быть подвергнут ферментации в соответствии со способом в соответствии с изобретением. Таким образом, полезные молочные основы включают растворы/суспензии любого молочного продукта или продуктов, похожих на молочные, содержащих белок, таких как цельное молоко или молоко с низким содержанием жира, снятое молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, порошковое молоко, молочная сыворотка, сывороточный пермеат, лактоза, маточная жидкость после кристаллизации лактозы, концентрат белка сыворотки или сливки, но не ограничиваются ими. Очевидно, что молочная основа может происходить от любого млекопитающего, например представлять собой по существу чистое молоко млекопитающего или восстановленное сухое молоко.

Перед ферментацией молочная основа может быть гомогенизирована и пастеризована в соответствии со способами, известными в области техники.

Используемая здесь "гомогенизация" означает интенсивное смешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию осуществляют перед ферментацией, тогда она может быть осуществлена таким образом, чтобы разрушать молочный жир на более мелкие частицы, такие, которые не отделяются от молока. Последнее может быть осуществлено путем продавливания молока при высоком давлении через небольшие отверстия.

Используемая здесь "пастеризация" означает обработку молочной основы для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно, пастеризацию осуществляют путем поддержания конкретной температуры в течение конкретного периода времени. Конкретную температуру обычно достигают путем нагревания. Температура и длительность может быть выбрана для уничтожения или инактивации некоторых бактерий, таких как вредные бактерии. За этим может следовать стадия быстрого охлаждения.

"Ферментация" в способах в соответствии с настоящим изобретением означает превращение углеводов в спирты или кислоты путем действия микроорганизма. Предпочтительно ферментация в способах в соответствии с изобретением включает превращение лактозы в молочную кислоту.

Способы ферментации, используемые при продукции молочных продуктов, являются хорошо известными, и специалист в данной области техники знает то, каким образом выбирать подходящие усло-

вия процесса, такие как температура, кислород, количество и характеристики микроорганизма(ов) и длительность процесса. Очевидно, что условия ферментации выбраны таким образом, чтобы поддерживать успех настоящего изобретения, т.е. получать молочный продукт в твердой (такой как сыр) или жидкой форме (такой как ферментированный молочный продукт).

Использование терминов в единственном числе в контексте описания данного изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует понимать как охватывающее и единственное и множественное число, если здесь не указано иное или это очевидно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "содержащей" следует рассматривать как не ограничивающие термины (т.е. означающие "включающий, но не ограниченный"), если не указано иное. Перечисление диапазонов величин здесь предназначено служить только как сокращенный способ ссылки индивидуально на каждую отдельную величину, попадающую в этот диапазон, если в описании не указано иное, и каждая отдельная величина включена в данное описание как если бы она была отдельно указана в описании. Все способы, раскрытые в описании, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если здесь не указано иное или это очевидно не противоречит контексту. Применение любого или всех примеров или иллюстративного языка (например, "такой как"), предложенных в описании, предназначено только для того, чтобы лучше осветить данное изобретение и не накладывает ограничения на объем данного изобретения, если не заявлено иное. Никакое выражение в данном описании не следует понимать как указывающее на какой-либо не заявленный элемент как существенный для осуществления изобретения.

Выражение "ферментированный молочный продукт" означает пищевой или кормовой продукт, где получение пищевого или кормового продукта включает ферментацию молочной основы с использованием молочнокислых бактерий. Используемый здесь термин "ферментированный молочный продукт" включает продукты, такие как термофильные ферментированные молочные продукты, например йогурт, мезофильные ферментированные молочные продукты, например сквашенные сливки и пахта, а также ферментированная молочная сыворотка, но не ограничивается ими.

Используемый здесь термин "термофильный" относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при температурах выше 35°C. Наиболее полезные для промышленного применения термофильные бактерии включают *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. Используемый здесь термин "термофильная ферментация" относится к ферментации при температуре выше приблизительно 35°C, такой как от приблизительно 35 до приблизительно 45°C. Термин "термофильный ферментированный молочный продукт" относится к ферментированным молочным продуктам, получаемым путем термофильной ферментации термофильной заквасочной культуры, и включают такие ферментированные молочные продукты, как йогурт термостатного способа производства, перемешанный йогурт и питьевой йогурт, например японский био-йогурт.

Используемый здесь термин "мезофильный" относится к микроорганизмам, которые лучше всего растут при умеренных температурах (15-35°C). Наиболее полезные для промышленного применения мезофильные бактерии включают *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp. Используемый здесь термин "мезофильная ферментация" относится к ферментации при температуре от приблизительно 22 до приблизительно 35°C. Термин "мезофильный ферментированный молочный продукт" относится к ферментированным молочным продуктам, полученным путем мезофильной ферментации мезофильной заквасочной культуры, и включают такие ферментированные молочные продукты, как пахта, простокваша, сквашенное молоко, сметана, сквашенные сливки, кефир и молодой сыр, такой как варк, творог и творожный сыр.

В отношении настоящего изобретения "напряжение сдвига" может быть измерено следующим способом:

Через семь суток после получения ферментированный молочный продукт приводили к 13°C и вручную осторожно перемешивали при помощи лопатки (5 раз) до гомогенного состояния образца. Реологические свойства образца оценивали на реометре (Anton Paar Physica Реометр с ASC, автоматическое устройство для смены образцов, Anton Paar® GmbH, Austria) с использованием bob-cup. Реометр устанавливали до постоянной температуры 13°C в течение времени измерения. Установки были следующими:

Время удержания (для восстановления до некоторой степени исходной структуры) 5 мин без какой-либо физической нагрузки (качание или вращение), применяемой в отношении образца.

Стадия качания (для измерения модуля эластичности и вязкости,  $G'$  и  $G''$  соответственно, затем рассчитывается комплексный модуль  $G^*$ )

Постоянное натяжение=0,3%, частота ( $f$ )=[0,5...8] Гц 6 точек измерения в течение 60 с (по одной каждые 10 с)

Стадия вращения (для измерения напряжения сдвига при 300 1/с)

Разработали две стадии:

1) Скорость сдвига = [0,3-300] 1/с и

2) Скорость сдвига = [275-0,3] 1/с.

Каждая стадия содержала 21 точку измерения в течение 210 с (каждые 10 с).

Напряжение сдвига при 300 1/с выбирали для последующего анализа, поскольку оно коррелирует с загущением во рту при глотании ферментированного молочного продукта.

В отношении настоящего изобретения "твердость геля" может быть измерена следующим способом:

Твердость геля измеряют при помощи теста обратной экструзии с использованием анализатора текстуры (TA.XT Plus, Stable Micro System, Surrey, UK), оборудованного параллельным планшетом 35 мм. Путь пробега устанавливали равным 15 мм и скорость пробега равной 2 мм/с. Тест осуществляют через 7 суток после получения. Ферментированный молочный продукт приводили к 13°C и вручную осторожно перемешивали, и измеряли в пластиковом контейнере 250 г. Максимальную силу (Н или g), полученную при помощи кривых зависимости дистанции от силы, используют в качестве параметра "твердости геля", положительная площадь (Н\*мм) как степень деформации, максимальное отрицательное усилие (Н) как вязкость.

Используемый здесь термин "лактаза, стабильная при низком значении pH" относится к лактазе, которая сохраняет свою активность при pH 5,0 и температуре 37°C на уровне по меньшей мере 5% по сравнению со своей активностью при оптимальном для лактазы pH.

Термин "активность при оптимальном pH" означает активность лактазы при таком значении pH, при котором лактаза имеет оптимальную активность.

Термин "углевод, отличающийся от лактозы" означает любой углевод, который не представляет собой лактозу, и который лактозодефицитная молочнокислая бактерия, используемая в способе в соответствии с изобретением, способна метаболизировать.

Выражение "в начале стадии ферментации" означает в течение короткого времени до, в то же самое время или в течение короткого времени после добавления заквасочной культуры к молочной основе. Используемый здесь термин "в течение короткого времени" означает меньше чем 30 мин".

Выражение "во время стадии ферментации" означает любое время во время ферментации после начала и до окончания ферментации.

Выражение "в конце стадии ферментации" означает в течение короткого времени до, в то же самое время или в течение короткого времени после достижения желаемого pH. Здесь термин "в течение короткого времени" означает меньше чем 30 мин".

Термин "желаемый pH" означает pH, при котором завершается стадия ферментации. В зависимости от различных параметров способа стадию ферментации прекращают способом, выбранным из группы, состоящей из: 1) закисления ферментированного молока, приводящего к тому, что по меньшей мере один штамм заквасочной культуры не способен расти, 2) охлаждающей обработки и 3) истощения углевода, отличающегося от лактозы.

#### **Депонирования и экспертное решение**

Заявитель ходатайствует о том, чтобы образец депонированного микроорганизма должен быть доступен только эксперту, одобренному заявителем.

Штамм *Streptococcus thermophilus* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig 2014-06-12) под номером доступа DSM 28952.

Штамм *Streptococcus thermophilus* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig 2014-06-12) под номером доступа DSM 28953.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig 2014-06-12) под номером доступа DSM 28910.

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

#### **Примеры**

Пример 1. Анализ активности лактазы в пробирках Eppendorf при 37°C, pH 6,5.

Принцип:

Лактаза гидролизует лактозу до глюкозы и галактозы. Глюкозу измеряют в соответствии с модифицированным вариантом обычного анализа глюкозооксидазы/пероксидазы (Werner W. et al. (1970) *Z. analyt. Chem.* 252: 224.).

LAU определяют как количество фермента, высвобождающего 1 мкмоль глюкозы в мин при 37°C, pH 6,5 в М-буфере (М-буфер определен в описании настоящей заявки на патент). Альтернативно, активность в LAU для конкретной лактазы может быть определена описанным здесь способом. Полученную величину сравнивают со стандартной кривой, построенной для лактазы с известной активностью, и по ней рассчитывают активность для неизвестного образца. Лактаза с известной активностью может представлять собой, например лактозим, полученный из *Novozymes A/S, Denmark*.

Растворы:

Буфер для анализа: 50 мМ сукцинат, 50 мМ HEPES, 50 мМ CHES, 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Triton X100, pH 6,5

Раствор GOD-Perid: 65 мМ фосфат натрия, pH 7, 0,4 г/л глюкозооксидазы, 0,013 г/л HRP (пероксидаза хрена), 0,65 г/л ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)).

Субстрат:

160 мМ лактоза, 50 мМ сукцинат, 50 мМ HEPES, 50 мМ CHES, 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 6,5.

Стандарт:

Лактозим (полученный из Novozymes A/S, Denmark) с известной активностью в LAU/г использовались в качестве стандарта, разбавленного в буфере для анализа в диапазоне от 0,09 до 0,7 LAU/г.

Образцы:

Образцы фермента разбавляют соответствующим образом в буфере для анализа.

Способ:

1. 375 мкл субстрата инкубируют 5 минут при 37°C.
2. Добавляют 25 мкл фермента, разбавленного в буфере для анализа.
3. Реакцию прекращают через 30 минут путем добавления 60 мкл 1М NaOH
4. 20 мкл переносят в 96-луночный микротитровальный планшет и добавляют 200 мкл раствора GOD-Perid. Через 30 мин при комнатной температуре поглощение измеряют при 420 нм.

Пример 2.

100 мл 15 или 30% (мас./мас.) сывороточного пермеата, содержащего преимущественно лактозу и ионы, готовили путем смешивания 15 или 30 г высушенного путем распыления порошка сывороточного пермеата (Variolac, Arla) в соответственно 85 или 70 мл воды с ионами. Этот раствор выливали в колбу, содержащую якорь магнитной мешалки и помещали в водяную баню при 37°C. Через 15 мин добавляли фермент. Тестируемые ферменты представляли собой лактозим, представляющий собой имеющуюся в продаже лактазу от Novozymes A/S, Denmark, обладающую активностью 3060 LAU/г, и экспериментальную лактазу из *Bifidobacterium bifidum*, имеющую кодируемую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 и активность 295 LAU/г.

Дозы для лактозима составляли 4225 LAU/л молока и для лактазы *Bifidobacterium* 2025 LAU/л молока. Образцы молока отбирали через регулярные интервалы до 5,5 ч и фермент инактивировали путем нагревания до 99°C в течение 10 мин в термомиксере. Образцы разбавляли соответствующим образом и фильтровали через фильтр 0,20 мкм.

Лактозный гидролиз измеряли с использованием Dionex BioLC, оборудованного колонкой Dionex PA1 и импульсным амперометрическим детектором (PAD). Пики идентифицировали и количественно оценивали путем сравнения с известными стандартами лактозы, глюкозы и галактозы.

Результаты приведены ниже.

Таблица 1. Лактоза, глюкоза и галактоза в 15% DS сывороточном пермеате после обработки лактозимом или лактазой *Bifidobacterium*

Время мин	Лактозим			Лактаза <i>Bifidobacterium</i>		
	Лактоза мМ	Глюкоза мМ	Галактоза мМ	Лактоза мМ	Глюкоза мМ	Галактоза мМ
0	499	1	2	499	1	2
30	312	135	106	410	61	63
60	211	224	155	349	119	122
120	110	295	221	220	199	202
180	66	324	249	149	281	290
240	50	346	279	84	336	348
330	37	372	312	31	350	368

Таблица 2. Лактоза, глюкоза и галактоза в 30% DS сывороточном пермеате после обработки лактозимом или лактазой *Bifidobacterium*

Время мин	Лактозим			Лактаза <i>Bifidobacterium</i>		
	Лактоза мМ	Глюкоза мМ	Галактоза мМ	Лактоза мМ	Глюкоза мМ	Галактоза мМ
0	848	1	4	848	1	4
30	824	109	75	819	43	45
60	615	253	150	788	86	83
120	420	370	242	651	159	158
180	291	459	300	625	232	230
240	246	559	373	501	283	273
330	154	544	367	391	333	324
1440	54	649	545	20	727	739

Также при тестировании при более высоких концентрациях лактозы как в 15%, так и 30% сывороточном пермеате галактоолигосахариды не продуцировались или продуцировались очень мало. Кроме того, продуцируемые уровни галактозы и глюкозы эквивалентны и соответствуют количеству гидролизованной лактозы. Для сравнения, лактозим продуцирует меньше галактозы чем глюкозы, ясно демонстрируя то, что продуцируются галактоолигосахариды.

Пример 3.

Профиль pH (при 37°C) и температурный профиль (при pH 6,5) экспериментальной лактазы из *Bifidobacterium bifidum* с использованием лактозы в качестве субстрата.

Принцип:

Лактаза гидролизует лактозу и образуется глюкоза + галактоза. Глюкозу измеряют в соответствии с модифицированным вариантом обычного анализа глюкозооксидазы/пероксидазы (Werner, W. et al. (1970) *Z. analyt. Chem.* 252: 224.)

Профиль pH

Субстрат:

167 мМ лактоза, 50 мМ сукцинат, 50 мМ HEPES, 50 мМ CHES, 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и pH довели до pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 при помощи NaOH.

Образец фермента:

Экспериментальную лактазу из *Bifidobacterium bifidum*, имеющую кодируемую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, разбавляли соответствующим образом в 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Triton X100.

Способ:

10 мкл образца фермента, разбавленного в буфере для разведения фермента, добавляли в пробирки для ГЩР (полимеразной цепной реакции) при комнатной температуре.

90 мкл субстрата добавляли при комнатной температуре и быстро помещали в термочиклер на элементах Пелтье (PCT-200, MJ research) при 37°C и инкубировали в течение 30 мин и затем помещали на лед.

Реакцию прекращали путем добавления 100 мкл 0,25 М NaOH.

20 мкл переносили в 96-луночный микротитровальный планшет, и добавляли 230 мкл 65 мМ фосфата натрия, pH 7, 0,4 г/л глюкозооксидазы, 0,013 г/л HRP, 0,65 г/л раствора ABTS. Через 30 мин при комнатной температуре поглощение измеряли при 420 нм.

Таблица 3

pH	Относительная активность лактазы <i>B. bifidum</i> (% активности при pH6)
3	0
4	4
5	75
6	100
7	85
8	39
9	10
10	4

Температурный профиль

Субстрат:

167 мМ лактоза, 50 мМ сукцинат, 50 мМ HEPES, 50 мМ CHES, 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и pH довели до pH 6,5 при помощи NaOH.

Образец фермента:

Экспериментальную лактазу из *Bifidobacterium bifidum*, имеющую кодируемую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, разбавляли соответствующим образом в 50 мМ сукцинате, 50 мМ HEPES, 50 мМ CHES, 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Triton X100 и pH доводили до pH 6,5.

Способ:

10 мкл образца фермента, разбавленного в буфере для разведения фермента, добавляли в пробирки для ПЦР при комнатной температуре;

добавляли 90 мкл предварительно нагретого (в термоциклере на элементах Пелтье до 30-70°C) субстрата и инкубацию осуществляли с температурным градиентом от 30 до 70°C в течение 30 мин и затем помещали на лед.

Реакцию прекращали путем добавления 100 мкл 0,25 М NaOH.

20 мкл переносили в 96-луночный микротитровальный планшет, и добавляли 230 мкл 65 мМ фосфата натрия, pH 7, 0,4 г/л глюкозооксидазы, 0,013 г/л HRP, 0,65 г/л раствора ABTS. Через 30 мин при комнатной температуре поглощение измеряли при 420 нм.

Таблица 4

Темп. °C	Относительная активность лактазы <i>B. bifidum</i> (% активности при 38,1°C)
20	54
21	63
22	64
24	68
26	73
29	81
31	88
34	94
36	96
38	100
43	96
48	91
52	83
57	76
62	58
66	32
69	20
70	17

Пример 4.

Определение K<sub>m</sub> для фермента лактазы при 5°C.

Принцип:

Лактаза гидролизует лактозу и образуется глюкоза + галактоза. Глюкозу измеряют в соответствии с модифицированным вариантом обычного анализа глюкозооксидазы/пероксидазы (Werner, W. et al. (1970) Z. analyt. Chem. 252: 224.).

Субстрат:

Различные концентрации лактозы в диапазоне от K<sub>m</sub>/5 до 10\*K<sub>m</sub>, 50 мМ сукцинат, 50 мМ HEPES, 50 мМ CHES, 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и pH доводили до pH 6,5 помощи NaOH.

Образец фермента:

Экспериментальную лактазу из *Bifidobacterium bifidum*, имеющую кодируемую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, разбавляли соответствующим образом в 50 мМ сукцинате, 50 мМ HEPES, 50 мМ CHES, 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Triton X100, pH доводили до pH 6,5 при помощи NaOH.

12 г/л лактозима (имеющейся в продаже лактазы от Novozymes A/S, Denmark) разбавляли 6000 раз в том же самом буфере.

Способ:

10 мкл образца фермента (5°C) добавляли в 96-луночный микротитровальный планшет на льду.

Добавляли 90 мкл субстрата (5°C) и инкубировали в течение 2 ч при 5°C.

Реакцию прекращали путем добавления 100 мкл 0,25 М NaOH.

20 мкл переносили в 96-луночный микротитровальный планшет и добавляли 230 мкл 65 мМ фосфата натрия, pH 7, 0,4 г/л глюкозооксидазы, 0,013 г/л HRP, 0,65 г/л раствора ABTS. Через 30 мин при ком-

натной температуре поглощение измеряли при 420 нм.

Определение  $K_m$ :

Использовали компьютерную нелинейную подгонку по методу наименьших квадратов и уравнение Михаэлиса-Ментена:

$$v = (V_{max} * S) / (K_m + S)$$

Определенная  $K_m$  для лактазы *Bifidobacterium* и лактозима составила 8 и 30 мМ соответственно.

В похожем тесте, проводимом при 37°C, определенная  $K_m$  для лактазы *Bifidobacterium* и лактозима составила 13 и 30 мМ соответственно.

Пример 5.

Приготовление йогурта с использованием лактазы *Bifidobacterium bifidum* и лактозодефицитной заквасочной культуры - различные уровни сахарозы и лактазы.

План эксперимента

Для выбранной комбинации лактазы, стабильной при низком значении pH, и лактозодефицитной заквасочной культуры тестировали два уровня добавляемой сахарозы (0,5 и 0,7%) и два уровня добавляемой лактазы (800 LAU/л и 1000 LAU/л). Для сравнения осуществляли ферментации без добавления лактазы и с двумя уровнями сахарозы (1,0 и 1,5%). Лактазу добавляли в начале ферментации вместе с заквасочной культурой.

### Молочная основа

Таблица 5. Композиция молочной основы

	Количество (г)	Содержание белка (%)	Углевод (%)	Жир (%)
Снятое молоко	1000	3,5	4,8	0,1
1,5% молоко	2000	3,4	4,7	1,5
Белковый порошок "Promilk 802FB"	14	80,0		
Белковый порошок "Milex 240"	95	34,0		
Общее содержание молочной основы	3109	4,71	4,57	1,00

### Заквасочная культура

Заквасочная культура состоит из штамма *Streptococcus thermophilus*, депонированного под номером доступа DSM 28952, штамма *Streptococcus thermophilus*, депонированного под номером доступа DSM 28953, и штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, депонированного под номером доступа DSM 28910.

Лактаза:

Лактаза из *Bifidobacterium bifidum*, имеющая кодируемую последовательность SEQ ID NO. 2.

Измерения:

Уровни жира, белка и лактозы определяли с использованием анализа MilkoScan.

Последующее закисление измеряли в течение периода хранения 28 суток при 5°C.

Уровень сахарозы, глюкозы, галактозы, фруктозы и лактозы в ферментированном молоке на 1 сутки и 14 сутки после продукции измеряли при помощи HPLC.

Твердость геля:

Твердость геля измеряют при помощи теста обратной экструзии с использованием анализатора текстуры (TA.XT Plus, Stable Micro System, Surrey, UK), оборудованного параллельным планшетом 35 мм. Путь пробега устанавливали равным 15 мм и скорость пробега равной 2 мм/с. Тест осуществляют через 7 суток после продукции. Ферментированный молочный продукт приводили к 13°C, вручную осторожно перемешивали и измеряли в пластиковом контейнере 250 г. Максимальную силу (g), полученную при помощи кривых зависимости дистанции от силы, используют в качестве параметра "твердости геля".

Напряжение сдвига:

Через семь суток после инкубации ферментированный молочный продукт приводили к 13°C и вручную осторожно перемешивали при помощи лопатки (5 раз) до гомогенного состояния образца. Реологические свойства образца оценивали на реометре (Anton Paar Physica Реометр с ASC, автоматическое устройство для смены образцов, Anton Paar® GmbH, Austria) с использованием bob-cup. Реометр устанавливали до постоянной температуры 13°C в течение времени измерения.

Установки были следующими:

Время удержания (для восстановления до некоторой степени исходной структуры) 5 мин без какой-либо физической нагрузки (качание или вращение), применяемой в отношении образца.

Стадия качания (для измерения модуля эластичности и вязкости,  $G'$  и  $G''$ , соответственно, затем рассчитывается комплексный модуль  $G^*$ )

Постоянное натяжение = 0,3%, частота ( $f$ ) = [0,5...8] Гц 6 точек измерения в течение 60 с (по одной каждые 10 с)



Стадия вращения (для измерения напряжения сдвига при 300 1/с)

Разработали две стадии:

1) Скорость сдвига=[0,3-300] 1/с и

2) Скорость сдвига=[275-0,3] 1/с.

Каждая стадия содержала 21 точку измерения в течение 210 с (каждые 10 с).

Напряжение сдвига при 300 1/с выбирали для последующего анализа, поскольку оно коррелирует с загущением во рту при глотании ферментированного молочного продукта.

#### Способ

Ингредиенты молочной основы смешивали и оставляли регидратироваться в течение 2 ч при 5°C. Молочную основу затем пастеризовали при 90°C в течение 20 мин. Ферментацию осуществляли при 43°C до окончательного pH 4,55 с образованием йогурта. Йогурт охлаждали в РТУ (модуль после обработки) при температуре охлаждения 25°C при 2 бар (200 кПа). Охлажденный йогурт хранили при 6°C.

#### Результаты

##### Последующее закисление

Таблица 6. Последующее закисление

	Контроль 1	Контроль 2	Тестируемый образец 1	Тестируемый образец 2	Тестируемый образец 3	Тестируемый образец 4
Сахароза (%)	1	1,5	0,5	0,5	0,7	0,7
Лактаза (LAU/л)	0	0	800	1000	800	1000
Время фермент. (Часов:Мин.)	7:25	7:05	7:15	7:15	7:00	7:00
Окончательный pH	4,58	4,55	4,55	4,55	4,55	4,55
pH 1 сутки	4,58	4,53	4,54	4,53	4,50	4,51
pH 7 сутки	4,54	4,49	4,50	4,50	4,47	4,49
pH 14 сутки	4,49	4,43	4,49	4,49	4,46	4,47
pH 21 сутки	4,35	4,34	4,45	4,45	4,42	4,43
pH 28 сутки	4,35	4,34	4,45	4,42	4,43	4,42
Снижение pH	0,23	0,19	0,09	0,11	0,07	0,09

Для всех шести образцов, т.е. 2 контрольных образцов и 4 образцов, полученных в соответствии с изобретением (тестируемые образцы), pH приблизительно 4,55 достигалось в течение 7 ч.

Как видно из табл. 6, последующее закисление в течение периода 28 суток значительно уменьшалось для образцов, продуцируемых в соответствии с изобретением по сравнению с контрольными образцами.

#### Углеводный анализ

Таблица 7. Уровни остаточного углевода через 1 сутки после продукции

	Контроль 1	Контроль 2	Тестируемый образец 1	Тестируемый образец 2	Тестируемый образец 3	Тестируемый образец 4
Сахароза (%) начало фермент.	1	1,5	0,5	0,5	0,7	0,7
Лактаза (LAU/л)	0	0	800	1000	800	1000
Фруктоза (мг/г)	1,62	1,91	0,80*	0,74*	1,27	1,18
Галактоза (мг/г)	<0,9	1,78*	29,01	29,87	28,78	29,29
Глюкоза (мг/г)	0,77*	1,73	27,60	27,84	28,08	28,19
Лактоза (мг/г)	54,16	53,37	1,18	0,40	1,20	0,40
Сахароза (мг/г)	<0,3	4,6	<0,3	<0,3	1,3	0,7

\*величина представляет собой предел обнаружения и предел количественного определения.

Все уровни в табл. 7 представляют собой средние величины для двух образцов.

Для 4 тестируемых образцов в конце ферментации уровень лактозы был очень низким и уровень глюкозы и галактозы был очень высоким по сравнению с контрольными образцами, свидетельствуя о высокой активности добавляемой лактазы. Для тестирования образцов с использованием уровня лактазы 1000 LAU/л достигали остаточного уровня лактозы прилб. 0,04% и для тестирования образцов с использованием уровня лактазы 800 LAU/л достигали остаточного уровня лактозы прилб. 0,1%.

Ферментированное молоко, имеющее низкий уровень лактозы и высокий уровень глюкозы и галак-

тозы, обладает гораздо более высоким уровнем кажущейся сладости, чем ферментированное молоко с высоким уровнем лактозы и низким уровнем глюкозы и галактозы, как контрольные образцы. Причина этого заключается в том, что глюкоза и галактоза обладают гораздо более высоким индексом сладости чем лактоза.

### Твердость геля

Таблица 8. Твердость геля

	Контроль 1	Контроль 2	Тестируемый образец 1	Тестируемый образец 2	Тестируемый образец 3	Тестируемый образец 4
Сахароза (%) начало фермент.	1	1,5	0,5	0,5	0,7	0,7
Лактаза (LAU/л)	0	0	800	1000	800	1000
Твердость геля (г)	45,76	47,42	48,19	54,57	50,19	46,60

Все уровни в табл. 8 представляют собой средние величины для двух образцов. Как видно из табл. 8, 3 из 4 тестируемых образцов имели гораздо более высокую твердость геля, чем 2 контрольных образца.

### Напряжение сдвига

Таблица 9. Напряжение сдвига измеряли при 300 с<sup>-1</sup>

	Контроль 1	Контроль 2	Тестируемый образец 1	Тестируемый образец 2	Тестируемый образец 3	Тестируемый образец 4
Сахароза (%) начало фермент.	1	1,5	0,5	0,5	0,7	0,7
Лактаза (LAU/л)	0	0	800	1000	800	1000
Напряжение сдвига (Па)	67,1	65,3	78,2	84,4	84,7	77,6

Все уровни в табл. 9 представляют собой средние величины для двух образцов.

Как видно из табл. 9, 4 тестируемых образца имели гораздо более высокое напряжение сдвига, измеренное при 300 с<sup>-1</sup>, чем 2 контрольных образца. В группе из 4 тестируемых образцов комбинация 1) уровня добавляемой сахарозы 0,5% и уровня лактазы 1000 LAU/л и 2) уровня добавляемой сахарозы 0,7% и уровня лактазы 800 LAU/л, обладают самым высоким напряжением сдвига.

Пример 6. Получение йогурта с использованием лактазы *Bifidobacterium bifidum* и лактозодефицитной заквасочной культуры-добавление избыточного уровня сахарозы до ферментации I

### План эксперимента

Ферментации осуществляли с контрольным образцом, не содержащим лактазу и содержащим 9,5% сахарозу, и 2 тестируемыми образцами, содержащими 800 LAU/л лактазу и 6,5 и 7,0% сахарозу. Лактазу добавляли в начале ферментации вместе с заквасочной культурой.

### Молочная основа

Таблица 10. Композиция исходной молочной основы I

	Количество (г)	Содержание белка (%)	Углевод (%)	Жир (%)
Снятое молоко	984	3,5	4,8	0,1
1,5% молоко	1911	3,4	4,7	1,5
Белковый порошок "Promilk 802FB"	13,3	80,0		
Белковый порошок "Milex 240"	91,5	34,0	54,00	1,00
Общее содержание молочной основы	3000	4,71	4,57	1,02

Таблица 11. Композиция исходной молочной основы 2

	Количество (г)	Содержание белка (%)	Углевод (%)	Жир (%)
Снятое молоко	984	3,5	4,8	0,1
1,5% молоко	1911	3,4	4,7	1,5
Белковый порошок "Promilk 802FB"	17,40	80,0		
Белковый порошок "Milex 240"	109,50	34,0	5400	1,00
Сахароза	180,00		100,0	
Общее содержание молочной основы	3202	4,70	11,75	0,96

Исходную молочную основу 2 использовали для получения окончательных молочных основ для контрольного образца и двух тестируемых образцов путем добавления дополнительной сахарозы.

Заквасочная культура:

Заквасочная культура состоит из штамма *Streptococcus thermophilus*, депонированного под номером доступа DSM 28952, штамма *Streptococcus thermophilus*, депонированного под номером доступа DSM 28953, и штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, депонированного под номером доступа DSM 28910.

Лактаза:

Лактаза *Bifidobacterium bifidum* имела кодируемую последовательность SEQ ID NO: 2.

Измерения:

Все измерения осуществляли с использованием тех же самых способов как в примере 5.

#### Способ

Ингредиенты молочной основы смешивали и оставляли регидратироваться в течение 2 ч при 5°C. Молочную основу затем пастеризовали при 95°C в течение 5 мин. Молочную основу затем гомогенизировали при 65°C при 200 бар (20000 кПа). Ферментацию осуществляли при 43°C до окончательного pH 4,55 с образованием йогурта. Йогурт охлаждали в PTU (модуль после обработки) при температуре охлаждения 25°C при 2 бар (200 кПа). Охлажденный йогурт хранили при 6°C.

#### Результаты

##### Последующее закисление

Таблица 12. Последующее закисление

Образец	1	2	3
Лактаза (LAU/л)	0	800	800
Время ферментации	6 ч 15 мин	6 ч 15 мин	6 ч 15 мин
Окончательный pH	4,55	4,51	4,51
pH 4 сутки	4,54	4,44	4,44
pH 7 сутки	4,51	4,42	4,42
pH 14 сутки	4,40	4,38	4,37
pH 21 сутки	4,38	4,38	4,37
pH 28 сутки	4,36	4,37	4,36
Снижение pH	0,19	0,14	0,15

##### Углеводный анализ

Таблица 13. Углеводный анализ

Образец	1		2		3	
	1 сутки	28 сутки	1 сутки	28 сутки	1 сутки	28 сутки
Лактаза (LAU/л)	0		800		800	
Сахароза (%) начало фермент.	9,5		6,5		7,0	
Фруктоза (мг/г)	2,4	3,07	1,7	2,01	1,9	2,00
Галактоза (мг/г)	<2,0	8,99	26,4	29,03	26,4	28,72
Глюкоза (мг/г)	<1,0	8,84	26,2	27,52	26,2	27,22
Лактоза (мг/г)	51,4	38,04	2,8	<2	2,7	<2
Сахароза (мг/г)	64,3	64,23	41,7	42,38	46,0	46,26

Все уровни в табл. 13 представляют собой средние величины для двух образцов.

Как видно из табл. 13, для 2 тестируемых образцов в конце ферментации уровень лактозы был очень низким и уровень глюкозы и галактозы был очень высоким по сравнению с контрольными образ-

цами, что свидетельствует о высокой активности добавляемой лактазы.

Ферментированное молоко, имеющее низкий уровень лактозы и высокий уровень глюкозы и галактозы, обладало гораздо более высоким уровнем сладости, чем ферментированное молоко с высоким уровнем лактозы и низким уровнем глюкозы и галактозы, как контрольные образцы. Причина этого заключается в том, что глюкоза и галактоза обладают гораздо более высокой сладостью чем лактоза.

#### Твердость геля и напряжение сдвига

Таблица 14. Твердость геля и напряжение сдвига при 300 с<sup>-1</sup>

Образец	1		2		3	
Лактаза (LAU/л)	0		800		800	
Сахароза (%) начало фермент.	9,5		6,5		7,0	
Твердость геля (г)	46,36		46,76		45,75	
Напряжение сдвига при 1 с <sup>-1</sup> (Па)	9,4	9,2	9,3	8,8	10,3	10,2
Напряжение сдвига при 30,2 с <sup>-1</sup> (Па)	39,2	38,8	41,6	39,2	44,7	45,1
Напряжение сдвига при 135 с <sup>-1</sup> (Па)	58,3	58,0	67,2	64,5	72,3	72,2
Напряжение сдвига при 300 с <sup>-1</sup> (Па)	69,4	69,1	80,6	78,2	84,4	84,4

Как видно из табл. 14, напряжение сдвига при 300 с<sup>-1</sup> для двух тестируемых образцов, содержащих лактазу, существенно увеличивалось по сравнению с контрольными образцами без лактазы.

Пример 7. Приготовление йогурта с использованием лактазы *Bifidobacterium bifidum* и лактозодефицитной заквасочной культуры - добавление избыточного уровня сахарозы до ферментации II

#### План эксперимента

Ферментации осуществляли с двумя контрольными образцами, не содержащими лактазу и содержащими 1,5 и 9,5% сахарозу, и 3 тестируемыми образцами, содержащими 1000 LAU/л лактазу и 0,5%, 6,5% и 7,0% сахарозу. Лактазу добавляли в начале ферментации вместе с заквасочной культурой.

#### Молочная основа

Две исходные молочные основы в соответствии с примером 6 использовали для приготовления окончательных молочных основ для контрольных образцов и трех тестируемых образцов путем добавления дополнительной сахарозы.

#### Заквасочная культура

Заквасочная культура состоит из штамма *Streptococcus thermophilus*, депонированного под номером доступа DSM 28952, штамма *Streptococcus thermophilus*, депонированного под номером доступа DSM 28953, и штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, депонированного под номером доступа DSM 28910.

Лактаза:

Лактаза *Bifidobacterium bifidum* имеющая кодируемую последовательность SEQ ID NO: 2.

Измерения:

Все измерения осуществляли с использованием тех же самых способов как в примере 5.

#### Способ

Ингредиенты молочной основы смешивали и оставляли регидратироваться в течение 2 ч при 5°C. Молочную основу затем пастеризовали при 90°C в течение 20 мин. Ферментацию осуществляли при 43°C до окончательного pH 4,55 с образованием йогурта. Йогурт охлаждали в PTU (модуль после обработки) при температуре охлаждения 25°C при 2 бар (200 кПа). Охлажденный йогурт хранили при 6°C.

#### Результаты

##### Последующее закисление

Таблица 15. Последующее закисление

Образец	1	2	3	4	5
Лактаза (LAU/л)	0	1000	0	1000	1000
Время ферментации	6 ч 50 мин	6 ч 55 мин	6 ч 35 мин	6 ч 10 мин	5 ч 40 мин
Окончательный pH	4,55*	4,55*	4,55*	4,55*	4,55*
pH 1 сутки	4,54	4,51	4,52	4,48	4,47
pH 7 сутки	4,45	4,45	4,40	4,34	4,35
pH 14 сутки	4,37	4,44	4,37	4,32	4,34
pH 21 сутки	4,35	4,39	4,35	4,29	4,29
pH 28 сутки	4,34	4,37	4,33	4,27	4,26
Снижение pH	0,21	0,18	0,22	0,28	0,29

\*Ферментацию прекращают путем охлаждения при pH = 4,55.

Как видно из табл. 15, последующее закисление находилось на том же самом уровне для контрольных образцов, не содержащих лактазу, и тестируемых образцов, содержащих лактазу.

## Углеводный анализ

Таблица 16. Углеводный анализ на 1 сутки

Образец	1	2	3	4	5
Лактаза (LAU/л)	0	1000	0	1000	1000
Сахароза (%) начало фермент.	1,5	0,5	9,5	6,5	7,0
Фруктоза (мг/г)	1,96	<1	2,70	1,74	1,88
Галактоза (мг/г)	<2	29,19	<2	27,83	27,89
Глюкоза (мг/г)	<1	27,37	<1	27,29	27,40
Лактоза (мг/г)	56,11	<2	54,56	<2	<2
Сахароза (мг/г)	5,45	<4	63,44	39,79	45,44

Таблица 17. Углеводный анализ на 28 сутки

Образец	1	2	3	4	5
Лактаза (LAU/л)	0	1000	0	1000	1000
Сахароза (%)	1,5	0,5	9,5	6,5	7,0
начало фермент.					
Фруктоза (мг/г)	1,88	<1	4,72	2,95	3,39
Галактоза (мг/г)	3,90	28,83	<2	28,79	29,15
Глюкоза (мг/г)	2,69	26,78	1,66	26,83	27,27
Лактоза (мг/г)	50,71	<2	52,42	<2	<2
Сахароза (мг/г)	4,18	<4	62,07	39,91	46,17

Как видно из табл. 16 и 17, для 3 тестируемых образцов в конце ферментации уровень лактозы был очень низким, а уровень глюкозы и галактозы был очень высоким по сравнению с контрольными образцами, свидетельствуя о высокой активности добавляемой лактазы.

Ферментированное молоко, имеющее низкий уровень лактозы и высокий уровень глюкозы и галактозы, обладало гораздо более высоким уровнем сладости чем ферментированное молоко с высоким уровнем лактозы и низким уровнем глюкозы и галактозы, как контрольные образцы. Причина этого заключается в том, что глюкоза и галактоза обладают гораздо более высокой сладостью, чем лактоза.

## Твердость геля и напряжение сдвига

Таблица 18. Твердость геля и напряжение сдвига

Образец	1		2		3		4		5	
Лактаза (LAU/л)	0		1000		0		1000		1000	
Сахароза (%) начало фермент.	1,5		0,5		9,5		6,5		7,0	
Твердость геля (г)	51,13		49,41		45,04		45,94		47,89	
Напряжение сдвига при 1 с <sup>-1</sup> (Па)	9,4	9,3	8,4	8,5	8,1	8,5	7,7	7,8	8,3	8,5
Напряжение сдвига при 30,2 с <sup>-1</sup> (Па)	39,4	38,5	38,2	37,6	34,3	34,7	37,3	37,1	38,8	38,9
Напряжение сдвига при 135 с <sup>-1</sup> (Па)	61,0	59,5	65,8	65,1	56,8	56,8	72,7	72,3	74,8	74,9
Напряжение сдвига при 300 с <sup>-1</sup> (Па)	72,1	70,5	78,8	77,6	69,1	69,1	86,7	86,6	89,4	89,4

Как видно из табл. 18, напряжение сдвига для трех тестируемых образцов, содержащих лактазу, существенно увеличивалось по сравнению с контрольными образцами без лактазы.

Пример 8. Получение йогурта с использованием лактазы *Bifidobacterium bifidum* и лактозодефицитной заквасочной культуры - добавление лактазы до и после ферментации

#### План эксперимента

Таблица 19. План эксперимента

Образец	Момент добавления лактазы	Молочная основа	Сахароза (%)	Лактаза (LAU/л)
1	Не добавляли	1	0,70	0
2	Вместе с культурой	1	0,70	600
3	Вместе с культурой	1	0,70	800
4	Вместе с культурой	1	0,70	1000
5	Вместе с культурой	1	0,70	1400
6	Не добавляли	2	0,97	0
7	После ферментации	2	0,97	800
8	После ферментации	2	0,97	1600
9	После ферментации	2	0,97	2400
10	После ферментации	2	0,97	3200

Температура ферментации составила 43°C. Окончательный pH составил 4,50. Ингредиенты молочной основы смешивали и оставляли регидратироваться в течение 2 ч при 6°C. Молочную основу затем пастеризовали при 95°C в течение 5 мин и гомогенизировали при 200/50 бар (20000/5000 кПа) при 65°C. Ферментацию осуществляли при 43°C до окончательного pH 4,50 с образованием йогурта. Йогурт охлаждали до 6°C. Охлажденный йогурт хранили при 6°C.

#### Заквасочная культура

Заквасочная культура состоит из штамма *Streptococcus thermophilus*, депонированного под номером доступа DSM 28952, штамма *Streptococcus thermophilus*, депонированного под номером доступа DSM 28953, и штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, депонированного под номером доступа DSM 28910.

Лактаза:

Лактаза *Bifidobacterium bifidum*, имеющая кодируемую последовательность SEQ ID NO: 2.

#### Молочная основа

Таблица 20. Композиция молочной основы 1

	Количество (г)	Содержание белка (%)	Углевод (%)	Жир (%)
Сахароза	22	0,0	100,0	0,0
0,5% молоко	1500	3,8	4,8	0,5
1,5% молоко	1500	3,6	4,7	1,5
Arla сухое обезжиренное молоко	103	34,0	54,0	1,0
Общее содержание молочной основы	3125	4,67	7,05	0,98

Таблица 21. Композиция молочной основы 2

	Количество (г)	Содержание белка (%)	Углевод (%)	Жир (%)
Сахароза	30	0,0	100,0	0,0
0,5% молоко	1500	3,8	4,8	0,5
1,5% молоко	1500	3,6	4,7	1,5
Arla сухое обезжиренное молоко	103	34,0	54,0	1,0
Общее содержание молочной основы	3133	4,66	7,30	1,00

Измерения:

Все измерения осуществляли с использованием тех же самых способов как в примере 5.

Результаты:

### Последующее закисление

Таблица 22. Последующее закисление

Образец	Момент добавления лактазы	Молочная основа	Лактаза (LAU/л)	pH сутки 0	pH сутки 7	pH сутки 28	pH сутки 42	Снижение pH
1	Не добавляли	1	0	4,89*	4,89*	4,87	4,84	0,05
2	Вместе культурой	с 1	600	4,26	4,23	4,23	4,22	0,04
3	Вместе культурой	с 1	800	4,22	4,26	4,24	4,24	-0,02
4	Вместе культурой	с 1	1000	4,32	4,26	4,26	4,26	0,06
5	Вместе культурой	с 1	1400	4,36	4,30	4,28	4,27	0,09
6	Не добавляли	2	0	4,47	4,47	4,47	4,44	0,03
7	После ферментации	2	800	4,43	4,40	4,42	4,38	0,05
8	После ферментации	2	1600	4,44	4,40	4,42	4,39	0,05
9	После ферментации	2	2400	4,41	4,43	4,40	4,40	0,01
10	После ферментации	2	3200	НД	4,43	4,41	4,40	НД

\*Не достаточное количество сахарозы для осуществления ферментации до желаемого pH. Таким образом, этот образец не может использоваться в качестве референсного.

Как видно из табл. 22, последующее закисление в течение периода 42 суток было на низком уровне меньше 0,09 для всех протестированных уровней лактазы, где лактазу добавляли в начале ферментации, и даже более низким уровне меньше 0,05 для всех протестированных уровней лактазы, где лактазу добавляли в конце ферментации. Добавление лактазы в конце ферментации не приводило в результате к статистически отличающемуся последующему закислению по сравнению с контрольными образцами без добавления лактазы. Таким образом, в настоящем эксперименте продемонстрировано, что применение лактазы, стабильной при низком значении pH, в комбинации с лактозодефицитной заквасочной культурой не приводит в результате к неприемлемому увеличению низкого последующего закисления, которое может достигаться с такой заквасочной культурой. Последнее справедливо тогда, когда лактазу добавляют в начале и в конце ферментации.

## Твердость геля и напряжение сдвига

Таблица 23. Твердость геля и напряжение сдвига

Образец	Момент добавления лактазы	Молочная основа	Сахароза (%)	Лактаза (LAU/л)	Твердость геля (г)	Напряжение сдвига (Па)
1	Не добавляли	1	0,70	0	0,187*	46,4*
2	Вместе с культурой	1	0,70	600	0,281	63,9
3	Вместе с культурой	1	0,70	800	0,302	65,3
4	Вместе с культурой	1	0,70	1000	0,318	64,5
5	Вместе с культурой	1	0,70	1400	0,307	63,7
6	Не добавляли	2	0,97	0	0,304	53,1
7	После ферментации	2	0,97	800	0,312	51,4
8	После ферментации	2	0,97	1600	0,322	52,8
9	После ферментации	2	0,97	2400	0,323	52,9
10	После ферментации	2	0,97	3200	0,320	51,7

\*Не достаточное количество сахарозы для осуществления ферментации до желаемого pH. Таким образом, этот образец не может использоваться в качестве контрольного.

Как видно из табл. 23, высокие уровни твердости геля и напряжения сдвига получали для всех протестированных уровней лактазы, где лактазу добавляли в начале ферментации. Для уровней лактазы, протестированных при добавлении лактазы в конце ферментации, уровни твердости геля и напряжения сдвига были в некоторой степени ниже, что являлось следствием смешивания лактазы в йогурте, что частично разрушало текстуру йогурта. Для всех протестированных уровней лактазы, где лактазу добавляли в конце ферментации, твердость геля была несколько выше чем для контрольного образца без добавления лактазы. Для всех протестированных уровней лактазы, где лактазу добавляли в конце ферментации, напряжение сдвига сохранялось на том же самом уровне или было несколько меньшим.

## Углеводный анализ

Таблица 24. Углеводный анализ

Образец	Лактаза (LAU/л)	Галактоза 20 сутки (мг/г)	Глюкоза 20 сутки (мг/г)	Сахароза 20 сутки (мг/г)	Лактоза 20 сутки (мг/г)	Лактоза 24 часа (%)	Лактоза 20 сутки (%)
1	0	2,4	2,3	<1,0	50,7	ND	ND
2	600	29,5	27,7	<1,0	<0,5	>0,1	0,023
3	800	30,2	28,1	<1,0	<0,5	0,028	0,016
4	1000	30,0	27,8	<1,0	<0,5	0,014	0,014
5	1400	29,5	27,4	<1,0	<0,5	0,006	0,013
6	0	4,2	4,2	<1,0	49,2	ND	ND
7	800	31,2	30,7	<1,0	<0,5	>0,2	0,014
8	1600	30,7	30,2	<1,0	<0,5	>0,1	0,012
9	2400	31,2	30,6	<1,0	<0,5	0,029	0,011
10	3200	31,8	31,2	<1,0	<0,5	0,015	0,011

ND – нет данных

Как видно из табл. 24, на 20 сутки высокие концентрации галактозы и глюкозы формировались для всех протестированных уровней лактазы, где лактазу добавляли в начале и в конце ферментации. Кроме того, на 20 сутки уровень глюкозы был меньше обнаруженного уровня, составляющего 0,5 мг/г, который в некоторых странах квалифицируется как безлактозный. Для более высоких уровней лактазы большая часть удаления лактозы достигалась через 24 ч после окончания ферментации.



Пример 9. Получение йогурта с использованием лактазы *Bifidobacterium bifidum* и лактозодефицитной заквасочной культуры - добавление лактазы до ферментации II

#### План эксперимента

Таблица 25. План эксперимента

Образец	Сахароза (%)	Лактаза (LAU/л)
1	0	0
2	0	1000
3	0	1200
4	0	1600
5	0,2	0
6	0,2	1000
7	0,2	1200
8	0,2	1600
9	0,7	0
10	0,7	1000
11	0,7	1200
12	0,7	1600

Температура ферментации составляла 43°C. Окончательный pH составил 4,45. Ингредиенты молочной основы смешивали и оставляли регидратироваться в течение 2 ч при 6°C. Молочную основу затем пастеризовали при 95°C в течение 5 мин и гомогенизировали при 200/50 бар (20000/5000 кПа) при 65°C. Ферментацию осуществляли при 43°C до окончательного pH 4,45 с образованием йогурта. Йогурт охлаждали до 5°C. Охлажденный йогурт хранили при 6°C.

Заквасочная культура:

Заквасочная культура состоит из штамма *Streptococcus thermophilus*, депонированного под номером доступа DSM 28952, штамма *Streptococcus thermophilus*, депонированного под номером доступа DSM 28953, и штамм *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, депонированного под номером доступа DSM 28910.

Лактаза:

Лактаза *Bifidobacterium bifidum*, имеющая кодируемую последовательность SEQ ID NO: 2.

#### Молочная основа

Таблица 26. Композиция молочной основы

	Количество (г)	Содержание белка (%)	Углевод (%)	Жир (%)
0,5% молоко	1500	3,8	4,8	0,5
1,5% молоко	1500	3,6	4,7	1,5
Arla сухое обезжиренное молоко	103	34,0	54,0	1,0
Общее содержание молочной основы	3103	4,70	6,39	0,99

Измерения:

Все измерения осуществляли с использованием тех же самых способов как в примере 5.

#### Результаты

##### Последующее закисление

Таблица 27. Последующее закисление

Образец	Сахароза (%)	Лактаза (LAU/л)	pH сутки 0	pH сутки 1	pH сутки 14	pH сутки 28	pH сутки 42	Снижение pH
1	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0	1000	4,45	4,39	4,36	4,33	4,39	0,06
3	0	1200	4,45	4,39	4,38	4,34	4,39	0,06

4	0	1600	4,46	4,39	4,38	4,34	4,39	0,07
5	0,2	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	0,2	1000	4,50	4,44	4,40	4,40	4,43	0,07
7	0,2	1200	4,53	4,47	4,46	4,42	4,46	0,07
8	0,2	1600	4,53	4,49	4,46	4,44	4,47	0,06
9	0,7	0	4,76	4,73	4,69	4,68	4,70	0,06
10	0,7	1000	4,44	4,40	4,39	4,33	4,38	0,06
11	0,7	1200	4,46	4,40	4,39	4,33	4,39	0,07
12	0,7	1600	4,47	4,41	4,40	4,34	4,41	0,06

ND – нет данных

Как видно из табл. 27, последующее закисление в течение периода 42 суток было на очень низком уровне, составляющем прилб. 0,06 для всех протестированных уровней лактазы и сахарозы. Таким образом, в настоящем эксперименте продемонстрировано, что применение лактазы, стабильной при низком значении рН, в комбинации с лактозодефицитной заквасочной культурой, не приводит в результате к неприемлемому увеличению низкого последующего закисления, которое может быть достигнуто для такой заквасочной культуры.

### Твердость геля и напряжение сдвига

Таблица 28. Твердость геля и напряжение сдвига

Образец	Сахароза (%)	Лактаза (LAU/л)	Твердость геля (г)	Напряжение сдвига (Па)
1	0	0	ND	ND
2	0	1000	0,386	70,3
3	0	1200	0,377	69,8
4	0	1600	0,388	69,5
5	0,20	0	ND	ND
6	0,20	1000	0,380	70,7
7	0,20	1200	0,378	69,5
8	0,20	1600	0,397	70,2
9	0,70	0	ND	ND
10	0,70	1000	0,362	71,2
11	0,70	1200	0,375	72,2
12	0,70	1600	0,362	71,9

ND – нет данных

Как видно из табл. 28, высокие уровни твердости геля и напряжения сдвига достигались для всех протестированных уровней лактазы. Твердость геля и усилие сдвига имели один и тот же порядок для всех трех протестированных уровней лактазы.

### Углеводный анализ

Таблица 29. Углеводный анализ

Образец	Сахароза (%)	Лактаза (LAU/л)	Фруктоза (мг/г)	Галактоза (мг/г)	Глюкоза (мг/г)	Лактоза (мг/г)	Сахароза (мг/г)
1	0	0	<0,5	6,3	<0,5	45,5	<2
2	0	1000	<0,5	30,7	26,0	<0,9	<2
3	0	1200	<0,5	31,5	26,6	<0,9	<2
4	0	1600	<0,5	30,9	25,8	<0,9	<2
5	0,20	0	<0,5	11,7	6,7	36,1	<2
6	0,20	1000	<0,5	30,8	27,8	<0,9	<2
7	0,20	1200	<0,5	31,6	28,3	<0,9	<2
8	0,20	1600	<0,5	31,5	28,0	<0,9	<2
9	0,70	0	1,1	9,1	9,1	43,4	<2
10	0,70	1000	1,1	31,1	29,5	<0,9	<2
11	0,70	1200	1,0	32,1	30,3	<0,9	1,8
12	0,70	1600	0,9	31,8	29,9	<0,9	1,9

Как видно из табл. 29, для тестирования образцов, содержащих лактазу, в конце ферментации уровень лактозы был очень низким и уровень глюкозы и галактозы был очень высоким по сравнению с контрольными образцами, свидетельствуя о высокой активности добавляемой лактазы.

Ферментированное молоко, имеющее низкий уровень лактозы и высокий уровень глюкозы и галактозы, обладает гораздо более высоким уровнем сладости, чем ферментированное молоко с высоким

уровнем лактозы и низким уровнем глюкозы и галактозы, как контрольные образцы. Причина этого заключается в том, что глюкоза и галактоза обладают гораздо более высокой сладостью чем лактоза.

#### Перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1 демонстрирует последовательность мутанта SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 2 демонстрирует последовательность мутанта SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 3 демонстрирует последовательность лактазы *Bifidobacterium bifidum* DSM20215.

SEQ ID NO: 4 демонстрирует последовательность лактазы *Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171, нуклеотидная последовательность которой представлена в NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) под номером доступа DQ448279.

SEQ ID NO: 4 обсуждается в следующих источниках, в которых она названа как bbgIII:

Appl Microbiol Biotechnol (2007) 76:1365-1372, T. K. Goulas et al.

Appl Microbiol Biotechnol (2009) 82:1079-1088, T. Goulas et al.

Appl Microbiol Biotechnol (2009) 84:899-907, T. Goulas et al.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения ферментированного молочного продукта, включающий стадии:

1) добавление к молочной основе заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий с дефицитом метаболизма лактозы, который способен метаболизировать углевод, отличающийся от лактозы,

2) ферментация молочной основы в течение периода времени до достижения желаемого pH,

3) добавление лактазы, стабильной при низком значении pH, к процессу в начале, во время или в конце стадии ферментации, где стабильная при низком значении pH лактаза имеет лактазную активность при pH 5,0 и температуре 37°C, которая составляет по меньшей мере 5% от ее активности при оптимальном для этой лактазы значении pH.

2. Способ по п.1, где стабильная при низком значении pH лактаза имеет активность при температуре 10°C и pH 6,0, которая составляет по меньшей мере 10% от ее активности при оптимальной для этой лактазы температуре.

3. Способ по п.1 или 2, где штамм с дефицитом метаболизма лактозы способен метаболизировать углевод, отличающийся от лактозы, выбранный из группы, состоящей из сахарозы, галактозы и глюкозы.

4. Способ по любому из пп.1-3, где углевод, отличающийся от лактозы, добавляют к молочной основе в начале стадии ферментации.

5. Способ по п.4, где углевод, отличающийся от лактозы, добавляют к молочной основе в таком количестве, чтобы он истощался и, следовательно, приводил в результате к прекращению роста молочнокислых бактерий и прекращению ферментации.

6. Способ по любому из пп.1-5, где стабильную при низком значении pH лактазу добавляют к молочной основе в начале стадии ферментации.

7. Способ по п.6, где углевод, отличающийся от лактозы, не добавляют на стадии ферментации и где по меньшей мере один молочнокислый штамм заквасочной культуры с дефицитом метаболизма лактозы способен метаболизировать углевод, выбранный из группы, состоящей из глюкозы и галактозы.

8. Способ по любому из пп.1-5, где стабильную при низком значении pH лактазу добавляют к молочной основе в конце стадии ферментации.

9. Способ по любому из пп.1-8, где штамм с дефицитом метаболизма лактозы выбран из группы, состоящей из *Streptococcus thermophilus* с дефицитом метаболизма лактозы и *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* с дефицитом метаболизма лактозы.

10. Способ по п.9, где штамм с дефицитом метаболизма лактозы выбран из группы, состоящей из:

(а) штамма *Streptococcus thermophilus*, представляющего собой:

(1) штамм, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12) под номером доступа DSM 28952;

(2) или штамм, имеющий происхождение из DSM 28952, дополнительно характеризующийся как обладающий способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(б) штамма *Streptococcus thermophilus*, представляющего собой:

(1) штамм, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12) под номером доступа DSM 28953;

(2) или штамм, имеющий происхождение из DSM 28953, дополнительно характеризующийся как обладающий способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal;

(в) штамма *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus*, представляющего собой:

(1) штамм, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 2014-06-12) под номером доступа DSM 28910;

(2) или штамм, имеющий происхождение из DSM 28910, дополнительно характеризующийся как обладающий способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

11. Способ по п.9 или 10, где заквасочная культура содержит по меньшей мере один *Streptococcus thermophilus* с дефицитом метаболизма лактозы и по меньшей мере один *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* с дефицитом метаболизма лактозы.

12. Способ по любому из пп.9-11, где заквасочная культура содержит по меньшей мере один *Streptococcus thermophilus* и по меньшей мере один *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* и где все штаммы *Streptococcus thermophilus* и все штаммы *Lactobacillus delbrueckii* подвид *bulgaricus* являются штаммами с дефицитом метаболизма лактозы.

13. Ферментированный молочный продукт, полученный способом по пп.1-12, где остаточный уровень лактозы составляет меньше чем 3 мг/мл.

14. Применение заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий с дефицитом метаболизма лактозы, который способен метаболизировать углевод, отличающийся от лактозы, и лактазы, стабильной при низком значении pH, где стабильная при низком значении pH лактаза имеет лактазную активность при pH 5,0 и температуре 37°C, которая составляет по меньшей мере 5% от ее активности при оптимальном для этой лактазы pH, для получения ферментированного молочного продукта способом, включающим стадии:

1) добавление заквасочной культуры, содержащей по меньшей мере один штамм молочнокислых бактерий с дефицитом метаболизма лактозы, который способен метаболизировать углевод, отличающийся от лактозы, к молочной основе,

2) ферментация молочной основы в течение периода времени до достижения желаемого pH, где лактазу, стабильную при низком значении pH, добавляют к процессу в начале, во время или в конце стадии ферментации.

15. Применение по п.14, где текстура ферментированного молочного продукта улучшена по сравнению с использованием молочнокислых бактерий с дефицитом метаболизма лактозы и без лактазы и по сравнению с использованием лактазы, стабильной при низком значении pH, и лактозоположительных молочнокислых бактерий.

