

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043270**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.04

(51) Int. Cl. *A23L 33/135* (2016.01)
A23C 9/12 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892306

(22) Дата подачи заявки
2017.05.11

(54) **МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ ДЛЯ ТЕРМИЧЕСКИ ОБРАБОТАННОГО ПИЩЕВОГО ПРОДУКТА, ХРАНЯЩЕГОСЯ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

(31) **16169215.7; 16197223.7**

(56) US-A1-2010009034

(32) **2016.05.11; 2016.11.04**

US-A1-2015079057

(33) **EP**

US-A1-2013195917

(43) **2019.04.30**

US-A1-2011150852

(86) **PCT/EP2017/061270**

WO-A1-2015193459

(87) **WO 2017/194650 2017.11.16**

WO-A1-2017037052

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

Jose Manuel Barroso:
"DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) Nr. 451/2012 DER KOMMISSION", Amtsblatt der Europäischen Union, 30 May 2012 (2012-05-30), pages 55-63, XP055310236, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.feedcheck.de/Verordnungen/Verordnungen2012/Texte/Menuepunkte/451-2012.pdf> [retrieved on 2016-10-13] page L 140/60, line 1

(72) Изобретатель:
Гиллеладен Кристиан, Трихос Йёргос, Янсен Томас, Эрстрём Рунге Метте (DK)

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

(57) Способ получения пищевого продукта, хранящегося в условиях окружающей среды, включающий предоставление пищевого продукта, имеющего pH от 3,4 до 4,4, термическую обработку этого пищевого продукта с получением термически обработанного пищевого продукта, асептическое добавление к термически обработанному пищевому продукту одного или более штаммов молочнокислых бактерий, хранящихся в условиях окружающей среды, с получением пищевого продукта, хранящегося в условиях окружающей среды, и хранение пищевого продукта, хранящегося в условиях окружающей среды, при температуре окружающей среды в течение некоторого периода времени, где штамм молочнокислых бактерий, хранящийся при температуре окружающей среды, выбран из группы, состоящей из штаммов, (1) где штамм способен сохранять жизнеспособность в конце 150 суток при температуре 25°C, и (2) где pH снижается не более чем на 0,8 единиц во время периода хранения, и (3) где штамм выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, и их мутантов и вариантов.

B1

043270

**043270
B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к молочнокислым бактериям, которые пригодны для добавления к термически обрабатываемому пищевому продукту, имеющему рН от 3,4 до 4,4, предназначенному для хранения при температуре окружающей среды.

Предшествующий уровень техники

В последние годы широко используются ферментированные молочные продукты, такие как йогурты, которые можно хранить, транспортировать, обрабатывать и употреблять в неохлажденном состоянии, то есть при температуре окружающей среды, в течение нескольких месяцев. Такие йогурты позволяют потребителю носить йогурт с собой в течение некоторого периода времени, без необходимости в охлаждении, так же, как это возможно для целого ряда напитков, и, следовательно, такие йогурты являются очень удобными для потребителя. Чтобы обеспечить такой продолжительный срок хранения при температуре окружающей среды, йогурт подвергают термической обработке после окончания процесса ферментации, чтобы убить или по меньшей мере ингибировать дальнейшее увеличение массы молочнокислых бактерий, используемых в процессе ферментации. Термическая обработка может, например, представлять собой процесс пастеризации или ультравысокотемпературный процесс (УНТ). Такие йогурты иногда называют пастеризованными йогуртами или йогуртами, пригодными для хранения в условиях окружающей среды.

Пастеризованные йогуртные продукты не содержат или содержат незначительное количество жизнеспособных молочнокислых бактерий. Однако желательно, чтобы пастеризованные йогуртные продукты содержали молочнокислые бактерии и/или пробиотические бактерии, чтобы обеспечить потребителей различными полезными воздействиями таких бактерий, например полезными воздействиями биологически активных пищевых добавок. Конечно, добавление живых бактерий к пастеризованным йогуртным продуктам, предназначенным для хранения при температуре окружающей среды, создает техническую проблему, связанную с тем, что бактерии будут размножаться до такой степени, что йогурт испортится, например из-за снижения рН. В предшествующем уровне техники эту техническую задачу решали несколькими разными путями. Например, бактериальные культуры добавляли в пастеризованные йогуртные продукты в виде спор. Кроме того, культуры бактерий в пастеризованные йогуртные продукты добавляли в виде порошкообразных, сухих, лиофилизированных, покрытых оболочкой или инкапсулированных культур. Кроме того, культуры бактерий для добавления к пастеризованным йогуртным продуктам инактивировали, например при помощи облучения, микроволновой обработки, антибиотиков, мягкой пастеризации, химических агентов (ингибирующих) или корректировки рН, активности воды или температуры.

В WO 2009/116864 раскрыт молочный продукт, содержащий споры пробиотических бактерий, который можно хранить без охлаждения в течение длительного периода времени.

В WO 2004/069156 раскрыты пищевые продукты, содержащие пробиотические бактерии, которые инактивированы при помощи облучения, микроволновой обработки, антибиотиков, мягкой пастеризации и химических агентов (ингибиторов).

В EP-B1-1289380 раскрыты пищевые продукты, такие как молочные продукты, содержащие нежизнеспособные бактерии *Lactobacillus*. Бактерии *Lactobacillus* можно сделать нежизнеспособными, например, посредством мягкой термической обработки, корректировки рН или активности воды.

В EP-B1-1514553 раскрыт порошок молочнокислых бактерий с двойной оболочкой с высоким уровнем выживаемости в организме человека, где молочнокислые бактерии покрыты двойной оболочкой из белка и полисахарида.

В CN101323850 раскрыт способ получения микрокапсул *Lactobacillus helveticus* в микроинкапсулированной форме, имеющих большую устойчивость к воздействию тепла.

В EP-B1-0 555 618 раскрыт диетический продукт, содержащий лиофилизированные молочнокислые бактерии.

В CN102492643 раскрыт штамм *Lactobacillus rhamnosus* GRX19 и его применение в заквасочной культуре для получения ферментированного молочного продукта, содержащего живые бактерии *Lactobacillus*. Ферментированный молочный продукт подвергают термической обработке, например при 70-75°C в течение 15-20 с, и штамм *Lactobacillus* является устойчивым к указанной термической обработке, так что часть бактерий, например 10exp7 КОЕ/мл, выживает при этой термической обработке. После термической обработки термически обработанный продукт асептически помещают в контейнер и хранят при комнатной температуре в течение, например, 30 суток.

В WO 2015/169928 раскрыта жидкая молочная композиция, подходящая для изготовления вспененного молочного продукта, где композиция является пригодной для длительного хранения в условиях окружающей среды, имеет рН от 3,8 до 4,4 и содержит ферментированное молоко, вплоть до 0,12% гидролизованного сывороточного белка, вплоть до 5% жира и вплоть до 1% в высокой степени метилэтерифицированного пектина.

В US 20100009034 раскрыт способ приготовления ферментированного молочного напитка, сохраняющего высокий уровень жизнеспособных клеток при температуре окружающей среды, включающий ферментацию молока с использованием обычной заквасочной культуры молочнокислых бактерий, раз-

бавление, смешивание и стерилизацию, и добавление *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 к смешанному молочному напитку в асептических условиях.

В US 20100015285 раскрыт способ получения непосредственно подкисленного молочного напитка с сохранением большого количества жизнеспособных клеток при температуре окружающей среды, включающий осуществление непосредственного подкисления путем доведения pH до 4,0-4,5 с получением подкисленного молочного напитка, стерилизацию и добавление *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 вместе с 0,01-0,3% стимуляторов роста, например углевода, к смешанному молочному напитку в асептических условиях.

Существует необходимость в разработке улучшенных пастеризованных йогуртных продуктов, содержащих жизнеспособные молочнокислые бактерии.

Краткое изложение сущности изобретения

Один аспект настоящего изобретения относится к способу получения пищевого продукта, хранящегося в условиях окружающей среды, включающему предоставление пищевого продукта, имеющего pH от 3,4 до 4,4, осуществление термической обработки пищевого продукта так, чтобы снизить количество бактерий до не более чем 1×10^2 КОЕ/г, с получением термически обработанного пищевого продукта, асептическое добавление к термически обработанному пищевому продукту одного или более штаммов молочнокислых бактерий, хранящихся в условиях окружающей среды, в общем количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г с получением пищевого продукта, хранящегося в условиях окружающей среды, и хранение этого пищевого продукта в условиях окружающей среды в течение некоторого периода времени, где штамм молочнокислых бактерий, хранящийся в условиях окружающей среды, выбран из группы, состоящей из штаммов, (1) где штамм при добавлении в количестве $2,5 \times 10^7$ КОЕ/г к ферментированному молочному тестируемому продукту в виде йогурта, полученному посредством ферментации с заквасочной культурой, содержащей *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, при температуре 43°C до pH 4,3, который был подвергнут термической обработке при 75°C в течение 30 секунд, способен сохранять жизнеспособность в количестве, составляющем по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г в конце периода хранения тестируемого продукта 150 суток при температуре 25°C, и (2) где pH тестируемого продукта снижается не более чем на 0,8 единиц в течение периода хранения, и (3) где штамм выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и их мутантов и вариантов.

Настоящее изобретение основано на неожиданном экспериментальном обнаружении того, что бактериальные штаммы *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus rhamnosus* при добавлении к йогуртному продукту, хранимому в условиях окружающей среды, способны сохранять жизнеспособность на определенном уровне без снижения уровня pH в какой-либо значительной степени в течение периода по меньшей мере 150 суток. Это является неожиданным результатом, так как в молочном субстрате молочнокислые бактерии будут расти на доступном источнике углеводов со снижением pH до уровня, при котором бактерии не могут жить, так что, в общем случае, молочнокислые бактерии в молочном субстрате либо будут находиться в растущем pH-понижающем состоянии, либо будут мертвыми.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к штамму молочнокислых бактерий для применения в пищевом продукте, хранящимся в условиях окружающей среды, где продукт имеет pH от 3,4 до 4,4 и содержит по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г штамма, где пищевой продукт, хранящийся в условиях окружающей среды, хранят при температуре окружающей среды в течение некоторого периода времени, и где штамм молочнокислых бактерий выбран из группы, состоящей из штаммов, (1) где штамм при добавлении в количестве $2,5 \times 10^7$ КОЕ/г к ферментированному молочному тестируемому продукту в виде йогурта, полученному посредством ферментации с заквасочной культурой, содержащей *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, при температуре 43°C до pH 4,3, который был подвергнут термической обработке при 75°C в течение 30 секунд, способен сохранять жизнеспособность в количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г в конце периода хранения тестируемого продукта, составляющего 150 суток, при температуре 25°C, и (2) где pH тестируемого продукта снижается не более чем на 0,8 единиц в течение периода хранения, и (3) где штамм выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и их мутантов и вариантов.

Подробное описание изобретения

Способ получения пищевого продукта, хранящегося в условиях окружающей среды.

Настоящее изобретение относится к способу получения пищевого продукта, хранящегося в условиях окружающей среды, включающему предоставление пищевого продукта, имеющего pH от 3,4 до 4,4, термическую обработку этого пищевого продукта с целью снижения уровня бактерий до не более чем 1×10^2 КОЕ/г с получением термически обработанного пищевого продукта, добавление в асептических условиях к термически обработанному пищевому продукту одного или более штаммов молочнокислых бактерий, хранящихся в условиях окружающей среды, в общем количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г с получением пищевого продукта, хранящегося в условиях окружающей среды, и хранение этого пищевого продукта при температуре окружающей среды в течение некоторого периода

времени, где штамм молочнокислых бактерий, хранящийся при температуре окружающей среды, выбран из группы, состоящей из штаммов, (1) где штамм при добавлении в количестве $2,5 \times 10^7$ КОЕ/г к ферментированному молочному тестируемому продукту в виде йогурта, полученному посредством ферментации с заквасочной культурой, содержащей *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, при температуре 43°C до pH 4,3, который был подвергнут термической обработке при 75°C в течение 30 с, способен сохранять жизнеспособность в количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г в конце периода хранения тестируемого продукта, составляющего 150 суток, при температуре 25°C , и (2) где pH тестируемого продукта снижается не более чем на 0,8 единиц в течение периода хранения, и (3) где штамм выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, и их мутантов и вариантов.

В предпочтительном воплощении штамм для хранения в условиях окружающей среды способен сохранять жизнеспособность в количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г, предпочтительно по меньшей мере $5,0 \times 10^3$ КОЕ/г, более предпочтительно по меньшей мере $1,0 \times 10^4$ КОЕ/г, более предпочтительно по меньшей мере $5,0 \times 10^4$ КОЕ/г и наиболее предпочтительно по меньшей мере $1,0 \times 10^5$ КОЕ/г в конце периода хранения.

Предпочтительно pH снижается не более чем на 0,7, предпочтительно на 0,6, предпочтительно на 0,5, предпочтительно на 0,4, предпочтительно на 0,3 и наиболее предпочтительно на 0,2 во время хранения.

В предпочтительном воплощении изобретения, количество штамма $2,5 \times 10^7$ КОЕ/г при добавлении к исследуемому продукту увеличивается до по меньшей мере $5,0 \times 10^7$ КОЕ/г, предпочтительно до $7,5 \times 10^7$ КОЕ/г и наиболее предпочтительно до $1,0 \times 10^8$ КОЕ/г.

Предпочтительно увеличение количества клеток происходит в пределах 45 суток после добавления штамма к тестируемому продукту, предпочтительно в пределах 40 суток, предпочтительно в пределах 35 суток, предпочтительно в пределах 30 суток, предпочтительно в пределах 25 суток, предпочтительно в пределах 20 суток и наиболее предпочтительно в пределах 15 суток. Предпочтительно, количество клеток достигает максимума в пределах 45 суток после добавления штамма к тестируемому продукту, предпочтительно в пределах 40 суток, предпочтительно в пределах 35 суток, предпочтительно в пределах 30 суток, предпочтительно в пределах 25 суток, предпочтительно в пределах 20 суток и наиболее предпочтительно в пределах 15 суток.

В конкретном воплощении изобретения пищевой продукт, хранящийся в условиях окружающей среды хранят при температуре окружающей среды в течение периода по меньшей мере одних суток, предпочтительно по меньшей мере 2 суток, более 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, более предпочтительно по меньшей мере 7 суток, более предпочтительно по меньшей мере 8 суток, более предпочтительно по меньшей мере 9 суток, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 10 суток.

В предпочтительном воплощении изобретения штамм *Lactobacillus rhamnosus* представляет собой штамм, сбраживающий лактозу. Термин "сбраживающий лактозу" используют в контексте настоящего изобретения для характеристики штамма, который обладает способностью использовать лактозу, частично или полностью, в качестве источника для роста клеток или поддержания жизнеспособности клеток.

В предпочтительном воплощении изобретения штамм *Lactobacillus paracasei* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированного как DSM16572, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированного как ATCC 55544 и штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированного как DSM32389.

В предпочтительном воплощении изобретения штамм *Lactobacillus rhamnosus* выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, депонированного как DSM23035 и *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированного как ATCC53103. Предпочтительно, штамм *Lactobacillus rhamnosus* представляет собой штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, депонированный как DSM23035.

В предпочтительном воплощении изобретения штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* представляет собой штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CHCC18944, депонированный как DSM28910. В предпочтительном воплощении изобретения *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* представляет собой лактозодефицитный штамм.

В предпочтительном воплощении изобретения штамм *Lactobacillus fermentum* представляет собой штамм *Lactobacillus fermentum* CHCC14591, депонированный как DSM32086.

В конкретном воплощении изобретения штамм выбран из одной из следующих групп: группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus fermentum*; группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*; группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*; группы, состоящей из *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

В конкретном воплощении изобретения штамм выбран из одной из следующих групп: группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus rhamnosus*; группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus fermentum*; группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; группы, состоящей из *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus fermentum*, группы, состоящей из *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; группы, состоящей из *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Конкретный аспект изобретения относится к штамму молочнокислых бактерий, где штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированного как DSM16572, штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, депонированного как DSM23035, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированного как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированного как DSM32389, *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированного как ATCC53103, *Lactobacillus fermentum* CHCC14591, депонированного как DSM32086, и штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944, депонированного как DSM28910, и их мутантов и вариантов. В частности, штамм выбран из группы, состоящей из любого подмножества семи членов группы, указанных в предыдущем предложении.

Конкретный аспект изобретения относится к штамму молочнокислых бактерий, где штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированного как DSM16572, штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, депонированного как DSM23035, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированного как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированного как DSM32389, *Lactobacillus fermentum* CHCC14591, депонированного как DSM32086, и штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944, депонированного как DSM28910 и их мутантов и вариантов. Эта группа не включает *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированный как ATCC53103, который является лактозодефицитным (неспособным сбраживать лактозу).

Конкретный аспект изобретения относится к штамму молочнокислых бактерий, где штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированного как DSM16572, штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, депонированного как DSM23035, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированного как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированного как DSM32389, и *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированного как ATCC53103, и их мутантов и вариантов.

Конкретный аспект изобретения относится к штамму молочнокислых бактерий, где штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированного как DSM16572, штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, депонированного как DSM23035, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированного как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированного как DSM32389, и штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944, депонированного как DSM28910, и их мутантов и вариантов.

Конкретный аспект изобретения относится к штамму молочнокислых бактерий, где штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированного как DSM16572, штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, депонированного как DSM23035, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированного как ATCC 55544, и штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированного как DSM32389, и их мутантов и вариантов.

Конкретный аспект изобретения относится к штамму молочнокислых бактерий, где штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированного как DSM16572, штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, депонированного как DSM23035, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированного как ATCC 55544, и штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированного как DSM32389, и их мутантов и вариантов. Пять штаммов из этого аспекта изобретения являются лактозоположительными.

Конкретный аспект изобретения относится к штамму молочнокислых бактерий, где штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-01, CHCC2115, депонированного как DSM19465, штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, депонированного как DSM24616, и штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC7155, депонированного как DSM18875.

В конкретном воплощении способа по изобретению штамм, хранящийся в условиях окружающей среды, представляет собой штамм, сбраживающий лактозу, то есть способный сбраживать лактозу с образованием молочной кислоты и, следовательно, снижать pH пищевого продукта. Неожиданно, сбраживающие лактозу штаммы по настоящему изобретению пригодны в качестве штаммов для добавления к пищевым продуктам для хранения в условиях окружающей среды, так как следовало ожидать, что такие штаммы при длительном хранении пищевого продукта при температуре окружающей среды будут вызывать нежелательное снижение pH пищевого продукта.

В конкретном воплощении способа по изобретению пищевой продукт, имеющий pH от 3,4 до 4,4, представляет собой ферментированный заквасочной культурой молочный продукт, полученный посредством ферментации молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий с получением ферментированного заквасочной культурой молочного продукта.

В конкретном воплощении способа по изобретению ферментированный заквасочной культурой молочный продукт имеет содержание белка более 5,1% (мас./мас).

В конкретном воплощении способа по изобретению ферментированный заквасочной культурой молочный продукт не подвергается разбавлению.

Неожиданно, сбраживающие лактозу штаммы по настоящему изобретению являются пригодными в качестве штаммов для добавления к пищевому продукту, хранящемуся в условиях окружающей среды, в виде неразбавленного ферментированного заквасочной культурой молочного продукта, так как такой неразбавленный продукт имеет более высокую концентрации лактозы, чем разбавленный продукт.

Ниже способ по изобретению будет описан более подробно в отношении способа получения ферментированного молочного продукта, хранящегося в условиях окружающей среды.

Заквасочная культура может представлять собой любую обычную заквасочную культуру молочнокислых бактерий, включая одноштаммовую культуру и смесь культур, используемую для получения определенного типа ферментированного молочного продукта. В предпочтительном воплощении вышеуказанного способа по изобретению ферментацию выполняют так, чтобы получить pH от 3,0 до 5,0, предпочтительно от 3,9 до 4,8, более предпочтительно от 4,0 до 4,6 и наиболее предпочтительно от 4,1 до 4,4.

Термическую обработку для уменьшения уровня бактерий заквасочной культуры до не более чем $1,0 \times 10^2$ КОЕ/г ферментированного молока предпочтительно осуществляют путем воздействия на ферментированный заквасочной культурой молочный продукт температуры от 50°C до 90°C, предпочтительно от 60°C до 85°C, более предпочтительно от 65°C до 82°C, и наиболее предпочтительно от 70°C до 80°C. Термическую обработку предпочтительно выполняют в течение периода от 10 до 180 с, предпочтительно от 12 до 120 с, более предпочтительно от 14 до 90 с, более предпочтительно от 16 до 60 с, более предпочтительно от 18 до 50 с и наиболее предпочтительно от 20 до 40 с. Предпочтительно уровень бактерий заквасочной культуры снижают до не более чем $1,0 \times 10^1$ КОЕ/г ферментированного молока, более предпочтительно до 0 КОЕ/г.

Штамм молочнокислых бактерий для применения в пищевом продукте, хранящемся в условиях окружающей среды.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к штамму молочнокислых бактерий для применения в пищевом продукте, хранящимся в условиях окружающей среды, где продукт имеет pH от 3,4 до 4,4 и содержит по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г штамма, где пищевой продукт, хранящийся в условиях окружающей среды, хранят при температуре окружающей среды в течение некоторого периода времени, и где штамм молочнокислых бактерий выбран из группы, состоящей из штаммов, (1) где штамм при добавлении в количестве $2,5 \times 10^7$ КОЕ/г к ферментированному молочному тестируемому продукту в виде йогурта, полученному посредством ферментации с заквасочной культурой, содержащей *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, при температуре 43°C до pH 4,3, который подвергнут термической обработке при 75°C в течение 30 с, способен сохранять жизнеспособность в количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г в конце периода хранения тестируемого продукта, составляющего 150 суток, при температуре 25°C, и (2) где pH тестируемого продукта снижается не более чем на 0,8 единиц в течение периода хранения, и (3) где штамм выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и их мутантов и вариантов.

В конкретном воплощении штамма по настоящему изобретению продукт представляет собой химически подкисленный продукт.

В конкретном воплощении штамма по настоящему изобретению продукт представляет собой ферментированный молочный продукт, полученный посредством ферментации молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий, где продукт содержит не более 1×10^2 КОЕ заквасочной культуры/г и по меньшей мере 1×10^3 КОЕ/г штамма молочнокислых бактерий, хранящегося в условиях окружающей среды.

В конкретном воплощении штамма по настоящему изобретению, продукт представляет собой ферментированный молочный продукт, полученный посредством ферментации молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий, где ферментированный молочный продукт после ферментации был подвергнут термической обработке, чтобы снизить уровень бактерий заквасочной культуры до не более чем 1×10^2 КОЕ/г, и где после термической обработки к термически обработанному продукту был асептически добавлен штамм, хранящийся в условиях окружающей среды, согласно аспекту 1 в количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г. Предпочтительно, штамм по изобретению, хранящийся в условиях окружающей среды, добавляли асептически к термически обработанному продукту в количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^4$ КОЕ/г, более предпочтительно по меньшей мере $1,0 \times 10^5$ КОЕ/г, более предпочтительно по меньшей мере $1,0 \times 10^6$ КОЕ/г, более предпочтительно по меньшей мере $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г и наиболее предпочтительно по меньшей мере $1,0 \times 10^8$ КОЕ/г.

В конкретном воплощении штамма по настоящему изобретению этот штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированного как DSM16572, штамма

Lactobacillus rhamnosus CHCC5366, депонированного как DSM23035, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированного как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированного как DSM32389, *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированного как ATCC53103, *Lactobacillus fermentum* CHCC14591, депонированного как DSM32086, и штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944, депонированного как DSM28910, и их мутантов и вариантов.

В конкретном воплощении штамма по настоящему изобретению штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированного как DSM16572, штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, депонированного как DSM23035, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированного как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированного как DSM32389, *Lactobacillus fermentum* CHCC14591, депонированного как DSM32086, и штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944, депонированного как DSM28910, и их мутантов и вариантов.

Штамм по изобретению может быть приготовлен в виде композиции, содержащей один или более штаммов по изобретению. Таким образом, в одном воплощении штамм по изобретению приготовлен в виде композиции, содержащей один штамм по изобретению. В другом воплощении штамм приготовлен в виде композиции, содержащей два или более штаммов по изобретению. Композиция может находиться в форме лиофилизированных или замороженных гранул.

Пищевой продукт, хранящийся в условиях окружающей среды.

В предпочтительном воплощении изобретения пищевой продукт, хранящийся в условиях окружающей среды, выбран из группы, состоящей из ферментированных молочных продуктов, химически подкисленных молочных продуктов, фруктовых напитков, 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% по массе. Ферментированный молочный продукт может также представлять собой низкобелковый продукт с уровнем белка от 1,0 до 2,0% по массе. Альтернативно, ферментированный молочный продукт может представлять собой высокобелковый продукт с уровнем белка выше 3,5% по массе, предпочтительно выше 5,1% по массе. В конкретном воплощении ферментированного молочного продукта по изобретению этот продукт представляет собой смесь ферментированного молочного продукта и зернового продукта, например овсяного продукта, где зерновой продукт может представлять собой ферментированный зерновой продукт, например ферментированный овсяный продукт.

В конкретном воплощении изобретения пищевой продукт, хранящийся в условиях окружающей среды, представляет собой ферментированный зерновой продукт. Ферментированный зерновой продукт может быть получен путем измельчения зерен исходного биологического зернового материала с получением муки из зерновых культур, которую затем подвергают ферментации. Ферментацию зерновой муки можно проводить с использованием тех же самых молочнокислых бактерий (заквасочная культура), которые используются для ферментации молочного субстрата, как описано в других разделах настоящей заявки.

В конкретном воплощении изобретения пищевой продукт, хранящийся в условиях окружающей среды, представляет собой фруктовый напиток. Фруктовые напитки могут дополнительно содержать, например, овес, сою, миндаль, сыворотку и/или неферментированное молоко, например в виде сухого молока. В конкретном воплощении фруктовые напитки по изобретению не содержат молочных компонентов, таких как молоко. В другом конкретном воплощении фруктового напитка по изобретению фруктовый напиток дополнительно содержит ферментированный молочный продукт.

В другом воплощении изобретения пищевой продукт, хранящийся в условиях окружающей среды, представляет собой химически подкисленный продукт. Подкисление может быть проведено с использованием любого подкисляющего агента, подходящего для добавления в пищевые продукты, такого как молочная кислота, лимонная кислота, фруктовый сок, плодовая мякоть и фруктовая смесь. В конкретном воплощении пищевой продукт, хранящийся в условиях окружающей среды, представляет собой молоко, подкисленное фруктовым соком.

В конкретном воплощении изобретения пищевой продукт, хранящийся в условиях окружающей среды, представляет собой химически подкисленный зерновой продукт. Химически подкисленный зерновой продукт может быть получен путем измельчения зерен исходного биологического зернового материала с получением муки из зерновых культур, которую затем используют для получения водной суспензии, и pH указанной суспензии затем доводят до нужного уровня. В конкретном воплощении пищевой продукт, хранящийся в условиях окружающей среды, представляет собой зерновой пищевой продукт, подкисленный фруктовым напитком.

Изобретение охватывает любую комбинацию вышеуказанных элементов, аспектов и воплощений во всех возможных их вариантах, если в данном описании изобретения не указано иное или это явно не противоречит контексту.

Определения

В контексте настоящего изобретения термины и выражения, приведенные ниже, имеют следующее значение:

Выражение "термическая обработка" означает любую обработку любой температурой в течение любого периода времени и при помощи любых средств или оборудования, при которой инактивируется по меньшей мере часть бактерий заквасочной культуры. В связи с этим термин "инактивировать" означает любое прекращение, уменьшение или ингибирование роста бактерий, например лизис клеток.

Выражение "хранение в условиях окружающей среды" означает хранение при температуре окружающей среды. Выражение "температура окружающей среды" означает температуру окружающего воздуха, например комнатную температуру. Например, температура окружающей среды может быть от 5 до 40°C, более конкретно от 10 до 35°C, более конкретно от 15 до 30°C, и наиболее конкретно от 18 до 27°C. Температура окружающей среды может быть контролируемой, то есть температура остается одинаковой в течение одних целых суток (24 ч), или она может быть неконтролируемой, т.е. она изменяется в течение одних целых суток (24 ч).

Выражение "жизнеспособность" означает, что бактерии способны демонстрировать рост (образование колоний) на чашке с MRS-агаром (агар Мана, Рогозы и Шарпа), инкубируемом в анаэробных условиях при 37°C в течение 3 суток. MRS-агар имеет следующий состав (г/л): пептон - 10,0; экстракт говядины - 10,0; дрожжевой экстракт - 5,0; декстроза - 20,0; полисорбат 80: 1,0; цитрат аммония: 2,0; ацетат натрия: 5,0; сульфат магния - 0,1; сульфат марганца - 0,05; дикалийфосфат - 2,0; агар - 15,0.

Выражение "штамм молочнокислых бактерий, хранящийся в условиях окружающей среды" означает штамм молочнокислых бактерий, который при добавлении к ферментированному молочному продукту пригоден для хранения в условиях окружающей среды в течение некоторого периода времени.

Выражение "молочный продукт, ферментированный заквасочной культурой" означает ферментированный молочный продукт, который содержит заквасочную культуру, используемую для ферментации молока.

Выражение "термически обработанный ферментированный молочный продукт" означает ферментированный молочный продукт, который был подвергнут термической обработке.

Выражение "ферментированный молочный продукт, хранящийся в условиях окружающей среды" означает ферментированный молочный продукт, который пригоден для хранения в условиях окружающей среды в течение некоторого периода времени.

Выражение "молочнокислые бактерии" означает грамположительные, микроаэрофильные или анаэробные бактерии, которые сбраживают сахара с получением кислот, включающих молочную кислоту в качестве преимущественно продуцируемой кислоты, уксусную и пропионовую кислоту. Промышленно наиболее полезные молочнокислые бактерии относятся к отряду "Lactobacillales", 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 отдельно или в комбинации с другими молочнокислыми бактериями.

Молочнокислые бактерии, включая бактерии видов *Lactobacillus* sp. и *Lactococcus* sp., обычно поставляют для молочной промышленности в виде замороженных или лиофилизированных культур для размножения производственной заквасочной культуры или в виде так называемых культур "для прямого внесения в чан" (Direct Vat Set - DVS), предназначенных для непосредственной инокуляции в ферментационный сосуд или чан для получения молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт или сыр. Такие культуры молочнокислых бактерий в общем случае называют "заквасочными культурами" или "заквасками".

Термин "молоко" следует понимать, как молочную секрецию, получаемую путем доения любого млекопитающего, такого как коровы, овца, козы, буйволы или верблюды. В предпочтительном воплощении молоко представляет собой коровье молоко. Термин молоко также включает растворы белка/жира, изготовленные из растительных веществ, например соевое молоко.

Термин "молочный субстрат" может представлять собой любой сырой и/или обработанный молочный материал, который может быть подвергнут ферментации в соответствии со способом по изобретению. Таким, полезные молочные субстраты включают, без ограничения ими, растворы/суспензии любых молочных или молокоподобных продуктов, содержащих белок, таких как цельное молоко или молоко с низким содержанием жира, обезжиренное молоко, пахта, восстановленное молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, сыворотка, сывороточный пермеат, лактоза, маточная жидкость от кристаллизации лактозы, концентрат сывороточного белка или сливки. Очевидно, что молочный субстрат может происходить от любого млекопитающего, например представлять собой по существу чистое молоко млекопитающего или восстановленное сухое молоко.

До ферментации молочный субстрат может быть гомогенизирован и пастеризован в соответствии со способами, известными в данной области.

"Гомогенизация", при использовании в данном описании изобретения, означает интенсивное перемешивание с получением растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию осуществляют до

ферментации, ее можно выполнить так, чтобы раздробить молочный жир до маленьких размеров, чтобы он больше не отделялся от молока. Это можно выполнить путем пропускания молока при высоком давлении через небольшие отверстия.

"Пастеризация", при использовании в данном описании изобретения, означает обработку молочного субстрата для уменьшения или ликвидации присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно, пастеризации добиваются путем поддержания заданной температуры в течение некоторого периода времени. Заданной температуры обычно достигают посредством нагрева. Температуру и продолжительность можно выбрать так, чтобы убить или инактивировать определенные бактерии, такие как опасные бактерии. Затем может следовать стадия быстрого охлаждения.

"Ферментация" в способах по настоящему изобретению означает превращение углеводов в спирты или кислоты под действием микроорганизма. Предпочтительно ферментация в способах по изобретению включает превращение лактозы в молочную кислоту.

Способы ферментации для использования в производстве молочных продуктов хорошо известны, и специалист в данной области знает, как выбрать подходящие условия способа, такие как температура, кислород, количество и характеристики микроорганизма(ов), и длительность процесса. Очевидно, что условия ферментации выбирают так, чтобы обеспечить выполнение настоящего изобретения, то есть получить молочный продукт в твердом (таком как сыр) или в жидком виде (таком как ферментированный молочный продукт).

В данном контексте термин "мутант" следует понимать как штамм, полученный из штамма по изобретению при помощи, например, генной инженерии, облучения и/или химического воздействия, и/или селекции, адаптации, отбора и т.д. Предпочтительно мутант является функционально эквивалентным мутантом, например мутантом, который обладает по существу теми же, или улучшенными, свойствами в отношении пригодности для хранения в условиях окружающей среды, что и родительский штамм. Такой мутант является частью настоящего изобретения. В частности, термин "мутант" относится к штамму, полученному посредством любой обычно используемой мутагенной обработки штамма по изобретению, включающей обработку химическим мутагеном, таким как этанметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), ультрафиолетовый свет, или к спонтанно возникающему мутанту. Мутант может быть подвергнут нескольким мутагенным обработкам (под одной обработкой следует понимать одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/отбора), но в настоящее время предпочтительно, чтобы проводилось не более 20, не более 10 или не более 5 обработок. В предпочтительном в настоящее время мутанте изменено менее 1%, или менее 0,1%, менее 0,01%, менее 0,001% или даже менее 0,0001% нуклеотидов бактериального генома (например путем замены, вставки, делеции или их комбинации) по сравнению с родительским штаммом.

В данном контексте термин "вариант" следует понимать, как штамм, который является функционально эквивалентным штамму по изобретению, например имеет по существу одинаковые или улучшенные свойства в отношении пригодности для хранения в условиях окружающей среды, что и родительский штамм. Такие варианты, которые можно идентифицировать с использованием подходящих методов скрининга, являются частью настоящего изобретения.

Предпочтительно, свойством "мутанта" и "варианта" штамма по настоящему изобретению является то, что при добавлении в количестве $2,5 \times 10^7$ КОЕ/г к ферментированному молочному тестируемому продукту в виде йогурта, полученному посредством ферментации с заквасочной культурой, содержащей *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, при температуре 43°C до pH 4,3, который термически обработан при 75°C в течение 30 с, этот штамм способен сохранять жизнеспособность в количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г в конце периода хранения тестируемого продукта, составляющего 150 суток, при температуре 25°C, и где pH снижается не более чем на 0,8 единиц во время периода хранения.

Предпочтительно "мутант" и "вариант" штамма по настоящему изобретению имеет менее 25, более предпочтительно менее 10, более предпочтительно менее 9, более предпочтительно менее 8, более предпочтительно менее 7, более предпочтительно менее 6, более предпочтительно менее 5, более предпочтительно менее 4, более предпочтительно менее 3, более предпочтительно менее 2 мутаций в аминокислотной последовательности одного или более белков этого штамма. В данном контексте термин "мутация" означает мутацию, выбранную из группы, состоящей из замены, удаления и вставки.

Использование слов "a", "an" и "the" и аналогичных обозначений в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей ниже формулы изобретения) следует понимать как охватывающее и единственное, и множественное число, если в данном описании изобретения не указано иное или это явно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "содержащий в себе" следует истолковывать как неограничивающие термины (т.е. в значении "включающий, но без ограничения ими"), если не указано иное. Указание диапазонов значений в данном описании изобретения предназначено для сокращенного способа отсылки индивидуально к каждому отдельному значению, попадающему в этот диапазон, если в данном описании изобретения не указано иное, и каждое отдельное значение включено в данное описание изобретения, как если бы оно было индивидуально указано в дан-

ном описании изобретения. Все описанные в данном описании изобретения способы могут быть осуществлены в любом подходящем порядке, если в данном описании изобретения не указано иное или это явно не противоречит контексту. Использование любого или всех примеров, или языка примеров (например выражения "такой как"), представленных в данном описании изобретения, предназначено только для того, чтобы лучше осветить настоящее изобретение и не является ограничением объема изобретения, если не заявлено иное. Никакое выражение в описании изобретения не следует истолковывать как указание на какой-либо незаявленный элемент как существенный для практического осуществления изобретения.

Выражение "ферментированный молочный продукт" означает пищевой или кормовой продукт, приготовление которого включает ферментацию молочного субстрата с помощью молочнокислых бактерий. "Ферментированный молочный продукт", при использовании в данном описании изобретения, включает, без ограничения ими, такие продукты, как термофильный ферментированный молочный продукт, например йогурт, мезофильные ферментированные молочные продукты, например сметану и пахту, сыр, а также ферментированную сыворотку.

Термин "термофильный" в данном описании изобретения относится к микроорганизмам, которые лучше всего развиваются при температуре выше 43°C. Промышленно наиболее полезные термофильные бактерии включают *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. Термин "термофильная ферментация" в данном описании изобретения относится к ферментации при температуре выше чем примерно 35°C, например от примерно 35°C до примерно 45°C. Термин "термофильный ферментированный молочный продукт" относится к ферментированным молочным продуктам, полученным посредством термофильной ферментации термофильной заквасочной культурой, и включает такие ферментированные молочные продукты, как перемешиваемый йогурт, йогурт с нарушенным сгустком и питьевой йогурт, например Yakult.

Термин "мезофильный" в данном описании изобретения относится к микроорганизмам, которые лучше всего развиваются при умеренных температурах (15-40°C). Промышленно наиболее полезные мезофильные бактерии включают *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp. Термин "мезофильная ферментация" в данном описании изобретения относится к ферментации при температуре от примерно 22°C до примерно 35°C. Термин "мезофильный ферментированный молочный продукт" относится к ферментированным молочным продуктам, полученным посредством мезофильной ферментации мезофильной заквасочной культурой, и включает такие ферментированные молочные продукты как пахта, кисломолочный напиток, сквашенное молоко, сметана, сквашенные сливки, кефир и молодой сыр, такой как творог кварк, творог и сливочный сыр.

Следует понимать, что термин "сыр" охватывает любой сыр, в том числе твердые, полутвердые и мягкие сыры, такие как сыры следующих типов: Коттедж, Фета, Чеддер, Пармезан, Моцарелла, Эмменталь, Данбо, Гауда, Эдам, сыры типа Фета, сыры с голубой плесенью, рассольные сыры, Камамбер и Бри. Специалист в данной области знает, как превратить коагулят в сыр, способы можно найти в литературе, см., например, Kosikowski, F. V., and V. V. Mistry, "Cheese and Fermented Milk Foods", 1997, 3rd Ed. F. V. Kosikowski, L. L. C. Westport, CT. При использовании в данном описании изобретения, сыр, который имеет концентрацию NaCl ниже 1,7% (масс/масс), упоминается как "сыр с низким содержанием соли".

В настоящем контексте термин "фруктовый сок" относится к жидкости, естественно содержащейся во фруктах, полученной посредством механического отжима или измельчения свежих фруктов без нагрева и растворителей. "Фруктовый сок" может состоять из сока одного типа фруктов или смеси из более чем одного типа фруктов.

Термин "фруктовый напиток" в данном контексте относится к напитку с содержанием фруктового сока от 0 до 29%.

Термин "нектар" в данном контексте относится к напитку с содержанием фруктового сока от 30 до 99%.

В данном контексте термин "пюре" относится к фруктам, приготовленным посредством измельчения, прессования и/или процеживания с получением консистенции вязкой жидкости или мягкой пасты без термической обработки и растворителей. "Пюре" изготавливают из 100% фруктов, в отличие от изготовления из чистого сока фруктов.

В данном контексте термин "фруктовый напиток" относится к напитку, содержащему фруктовый сок, фруктовый концентрат и/или фруктовое пюре. Термин "фруктовый напиток" охватывает "фруктовый сок", "фруктовый напиток" и "нектар", как определено в данном описании изобретения. "Фруктовый напиток" может представлять собой напиток, содержащий мякоть, или напиток, из которого мякоть удалена с помощью такой операции, как центрифугирование.

Термин "асептическое добавление" означает отсутствие введения или минимальное введение каких-либо микроорганизмов, отличных от молочнокислых бактерий, хранящихся в условиях окружающей среды.

Термин "зерновой продукт" означает любой продукт, полученный из злакового или зернового биологического источника, включающего овес, кукурузу, ячмень, рожь, гречку, пшеницу и рис.

Термин "лактозодефицитный" используют в контексте настоящего изобретения для характеристики

LAB (молочнокислые бактерии), которые либо частично, либо полностью утратили способность использовать лактозу в качестве источника клеточного роста или для поддержания жизнеспособности клеток. Такие LAB способны метаболизировать один или несколько углеводов, выбранных из сахарозы, галактозы и/или глюкозы, или другого сбраживаемого углевода. Поскольку эти углеводы естественным образом не присутствуют в молоке в количествах, достаточных для поддержания ферментации лактозодефицитными мутантами, будет необходимо добавлять эти углеводы в молоко. Лактозодефицитные и частично дефицитные LAB могут быть охарактеризованы как белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

Оба выражения "X.X×10expYY" и "X.XEYY" означают X.X×10^{YY}, и эти два указанных выражения используются взаимозаменяемо.

Термин "КОЕ" означает колониобразующие единицы.

Конкретные аспекты изобретения

1. Штамм молочнокислых бактерий, хранящийся в условиях окружающей среды, который, при добавлении в количестве 2,5×10exp07 КОЕ/г к ферментированному молочному тестируемому продукту в виде йогурта, полученному посредством ферментации с заквасочной культурой, содержащей *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, при температуре 43°C до pH 4,3, который термически обработан при 75°C в течение 30 секунд, способен сохранять жизнеспособность в количестве по меньшей мере 1,0×10exp03 КОЕ/г в конце периода хранения тестируемого продукта, составляющего 150 суток, при температуре 25°C, и где pH снижается не более чем на 0,8 единиц во время периода хранения, и где штамм выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, и их мутантов и вариантов.

2. Штамм согласно аспекту 1, который способен сохранять жизнеспособность в количестве по меньшей мере 1,0×10exp03 КОЕ/г, предпочтительно по меньшей мере 5,0×10exp03 КОЕ/г, более предпочтительно по меньшей мере 1,0×10exp04 КОЕ/г, более предпочтительно по меньшей мере 5,0×10exp04 КОЕ/г и наиболее предпочтительно по меньшей мере 1,0×10exp05 КОЕ/г в конце периода хранения.

3. Штамм согласно аспекту 1 или 2, где pH снижается не более чем на 0,7, предпочтительно на 0,6, предпочтительно на 0,5, предпочтительно на 0,4, предпочтительно на 0,3 и наиболее предпочтительно на 0,2 во время периода хранения.

4. Штамм по любому из аспектов 1-3, который при добавлении в количестве 2,5×10exp07 КОЕ/г к тестируемому продукту размножается до количества по меньшей мере 5,0×10exp07 КОЕ/г, предпочтительно 7,5×10exp07 КОЕ/г, и наиболее предпочтительно 1,0×10exp08 КОЕ/г.

5. Штамм согласно аспекту 4, где увеличение количества клеток происходит в пределах 45 суток после добавления штамма к исследуемому продукту, предпочтительно в пределах 40 суток, предпочтительно в пределах 35 суток, предпочтительно в пределах

30 суток, предпочтительно в пределах 25 суток, предпочтительно в пределах 20 суток, и наиболее предпочтительно в пределах 15 суток.

6. Штамм согласно аспекту 4 или 5, где количество клеток достигает максимума в пределах 45 суток после добавления штамма к исследуемому продукту, предпочтительно в пределах 40 суток, предпочтительно в пределах 35 суток, предпочтительно в пределах 30 суток, предпочтительно в пределах 25 суток, предпочтительно в пределах 20 суток, и наиболее предпочтительно в пределах 15 суток.

7. Композиция, содержащая один или более штаммов молочнокислых бактерий, хранящихся в условиях окружающей среды, по любому из аспектов 1-6.

8. Пищевой продукт, хранящийся в условиях окружающей среды, имеющий pH от 3,4 до 4,4, который содержит по меньшей мере 1,0×10exp03 КОЕ/г штамма, хранящегося в условиях окружающей среды, согласно аспекту 1.

9. Пищевой продукт согласно аспекту 8, представляющий собой химически подкисленный продукт.

10. Пищевой продукт согласно аспекту 8, представляющий собой ферментированный молочный продукт, полученный посредством ферментации молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий, где продукт содержит не более 1×10exp02 КОЕ заквасочной культуры/г и по меньшей мере 1×10exp03 КОЕ/г штаммов, хранящихся в условиях окружающей среды, согласно аспекту 1.

11. Пищевой продукт согласно аспекту 8, который представляет собой ферментированный молочный продукт, полученный посредством ферментации молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий, где ферментированный молочный продукт после ферментации термически обработан, чтобы уменьшить уровень бактерий заквасочной культуры до не более чем 1×10exp02 КОЕ/г, и где после тепловой обработки штамм, хранящийся в условиях окружающей среды, согласно аспекту 1 был асептически добавлен к термически обработанному продукту в количестве по меньшей мере 1,0×10exp03 КОЕ/г.

12. Способ получения пищевого продукта, хранящегося в условиях окружающей среды, включающий предоставление пищевого продукта, имеющего pH от 3,4 до 4,4, термическую обработку этого пи-

шевого продукта, чтобы уменьшить уровень бактерий до не более чем 1×10^2 КОЕ/г с получением термически обработанного пищевого продукта, и асептическое добавление к термически обработанному пищевому продукту одного или более штаммов молочнокислых бактерий, хранящихся в условиях окружающей среды, согласно аспекту 1 в общем количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г с получением пищевого продукта, хранящегося в условиях окружающей среды.

13. Способ получения ферментированного молочного продукта, хранящегося в условиях окружающей среды, включающий ферментацию молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий с получением ферментированного заквасочной культурой молочного продукта, термическую обработку ферментированного заквасочной культурой молочного продукта для уменьшения уровня бактерий заквасочной культуры до не более чем 1×10^2 КОЕ/г с получения термически обработанного ферментированного молочного продукта, и асептическое добавление к термически обработанному ферментированному молочному продукту одного или более штаммов молочнокислых бактерий, хранящихся в условиях окружающей среды, согласно аспекту 1 в общем количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г с получением ферментированного молочного продукта, хранящегося в условиях окружающей среды.

14. Применение штамма молочнокислых бактерий, хранящегося в условиях окружающей среды, согласно аспекту 1 для асептического добавления к термически обработанному пищевому продукту в общем количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г, где термически обработанный пищевой продукт имеет pH от 3,4 до 4,4 и термически обработан для уменьшения уровня бактерий заквасочной культуры до не более чем 1×10^2 КОЕ/г.

15. Штамм молочнокислых бактерий, который выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированного как DSM16572, штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, депонированного как DSM23035, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированного как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированного как DSM32389, *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированного как ATCC53103*, *Lactobacillus fermentum* CHCC14591, депонированного как DSM32086 и штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944, депонированного как DSM28910, и их мутантов и вариантов. ПРИМЕРЫ

Пример 1. Тестирование пригодности *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus rhamnosus* для хранения в условиях окружающей среды.

Молочный субстрат
 уровень жира 2,8%*
 уровень белка 2,8%*
 лактоза 3,0%
 сахароза 5,0% (добавленная)
 модифицированный крахмал E1442 Cargill типа 75720 1,50%
 пектина типа LMA CPKelco тип LM 106 AS-YA 0,25%
 желлановая камедь типа Kelcogel YSS 0,05%

* Уровень в конечном продукте, то есть после термической обработки, добавления штамма, хранящегося в условиях окружающей среды, и хранения в течение 150 суток.

Заквасочная культура.

Заквасочная культура YoFlex® типа YF-L904, содержащая два штамма *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*.

Тестируемые штаммы, хранящиеся в условиях окружающей среды.

Штамм *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированный как DSM16572.

Штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, депонированный как DSM23035.

Штамм *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированный как ATCC 55544.

Lactobacillus acidophilus La-5, CHCC2169, депонированный как DSM13241.

Bifidobacterium animalis BB-12, CHCC5445, депонированный как DSM15954.

Lactobacillus helveticus, (смесь 4 штаммов).

Lactococcus lactis DN-224, CHCC3955, депонированный как DSM11037.

Способ получения тестируемого продукта.

1. Диспергирование сухих ингредиентов в молоке.
2. Отдых в течение 3 ч с легким перемешиванием.
3. Нагревание молока вплоть до достижения температуры 65°C.
4. Гомогенизация при 150 бар ($1,5 \times 10^4$ кПа).
5. Термическая обработка до 95°C в течение 5 мин.
6. Охлаждение до температуры ферментации 43°C.
7. Закачивание молока в чан для ферментации.
8. Инокуляция культуры YoFlex типа YF-L904.
9. Ферментация вплоть до достижения pH 4,3.
10. Разбивка сгустка и перемешивание до получения гладкой структуры.

11. Термическая обработка при 75°C в течение 30 с.

12. Охлаждение до 25°C.

Процедура тестирования штаммов, хранящихся в условиях окружающей среды.

13. Асептическое внесение в 100 мл стерильные контейнеры.

14. Инокуляция штаммов и культур.

15. Хранение в течение 6 месяцев при комнатной температуре 25°C Метод подсчета клеток.

1. *L. paracasei* (LC-02, CHCC6272), *L. rhamnosus* (CHCC5366), *L. paracasei* (CRL 431, CHCC23026), *L. acidophilus* (La-5, CHCC2169), и *L. helveticus*.

Образцы тестируемого продукта растили на планшетах с MRS-агаром, инкубированных в анаэробных условиях при 37°C в течение 3 суток.

2. *B. animalis*, BB-12 (CHCC5445).

Образцы тестируемого продукта растили на планшетах с MRS-агаром, содержащим 10% цистеина гидрохлорида, инкубированных в анаэробных условиях при 37°C в течение 3 суток.

3. *Lactococcus lactis*, DN-224 (CHCC3955).

Образцы тестируемого продукта растили на планшетах с M-17 агаром, инкубированных в анаэробных условиях при 30°C в течение 3 суток.

Результаты.

Таблица 1

Количество клеток (КОЕ/г) для хранения при 5°C

Исследуемый штамм	Сутки 4/5	Сутки 14	Сутки 35	Сутки 56
<i>L. paracasei</i> , LC-02, CHCC6272	5,4E07	2,9E07	1,7E07	2,5E07
<i>L. rhamnosus</i> CHCC5366	1,0E07	9,3E06	1,3E07	1,8E07
<i>L. paracasei</i> , CRL 431, CHCC23026	1,6E07	1,6E07	1,3E07	1,5E07
<i>L. acidophilus</i> , La-5, CHCC2169	7,2E06	5,0E04	1,4E04	1,4E03
<i>B. animalis</i> , BB-12, CHCC5445	1,4E07	8,3E06	4,6E06	1,5E06
<i>L. helveticus</i> , смесь 4 штаммов	ND	7,9E06	6,4E05	<1,0E03
<i>Lactococcus lactis</i> , DN-224, CHCC3955	ND	1,0E06	1,1E05	1,0E03

ND: нет данных.

Таблица 2

Количество клеток (КОЕ/г) для хранения при 25°C

Исследуемый штамм	Сутки						
	0	1	14	35	56	90	150
<i>L. paracasei</i> LC-02, CHCC6272	7,2E06	1,4E07	3,7E08	3,4E08	2,1E08	5,0E06	5,9E04
<i>L. rhamnosus</i> CHCC5366	2,5E07	4,9E07	9,0E07	1,6E08	4,2E07	2,2E06	5,0E03
<i>L. paracasei</i> , CRL 431, CHCC23026	1,1E07	1,9E07	1,3E08	1,5E08	7,9E07	2,1E07	1,2E05
<i>L. acidophilus</i> La-5, CHCC2169	ND	ND	<1,0E02	<1,0E01	ND	ND	ND
<i>B. animalis</i> BB-12, CHCC5445	ND	ND	4,0E05	<1,0E03	ND	ND	ND
<i>L. helveticus</i> Смесь 4 штаммов	ND	ND	3,6E07	9,4E07	1,5E06	<1,0E01	ND
<i>L. lactis</i> , DN-224 CHCC3955	ND	ND	<1,0E03	ND	ND	ND	ND

ND: нет данных.

Таблица 3

Количество клеток (КОЕ/г) для хранения при 25°C

Исследуемая йогуртная заквасочная культура *	Сутки 14	Сутки 35	Сутки 56	Сутки 90
ТС-X11	Lb: 4,0E02 St: 5,7E04	ND ND	ND ND	ND ND
СН-1	Lb: 2,3E04 St: <1,0E03	Lb: 2,5E02 St: 4,0E01	Lb: 2,5E02 St: 4,0E01	Lb: <10E01 St: <10E01
Acidifix	Lb: 5,0E01 St: <1,0E03	ND ND	ND ND	ND ND
Yoflex Advance 1.2	Lb: 1,6E04 St: 5,0E04	Lb: <1,0E02 St: <1,0E02	ND ND	ND ND
Yoflex Premium 1.0	Lb: 8,0E02 St: 1,0E05	ND ND	ND ND	ND ND
Yoflex Mild 2.0	Lb: 2,0E02 St: <1,0E03	ND ND	ND ND	ND ND

ND: нет данных.

Все йогуртные заквасочные культуры являются коммерческими продуктами от Chr. Hansen A/S в виде смесей *Streptococcus thermophilus* (St) и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb).

Для всех трех штаммов, хранящихся при 25°C, и затем вплоть до 150 суток, то есть для *L. paracasei*, LC-02, CHCC6272, *L. rhamnosus* CHCC5366 и *L. paracasei*, CRL 431, CHCC23026, значение pH составляло 3,55.

Как видно из результатов, показанных в табл. 1, через 56 суток при стандартной эталонной температуре охлаждения 5°C три штамма *L. paracasei*, LC-02, CHCC6272, *L. rhamnosus* CHCC5366 и *L. paracasei*, CRL 431, CHCC23026 сохраняли количество клеток выше 1×10^7 , и *B. animalis*, BB-12, CHCC5445 также сохранял высокий показатель количества клеток, составляющий более 1×10^6 (КОЕ/г), в то время как три штамма *L. acidophilus*, La-5, CHCC2169, *L. helveticus* (смесь 4 штаммов) и *Lactococcus lactis*, DN-224, CHCC3955 сохраняли количество клеток лишь $1,4 \times 10^3$ (КОЕ/г) или ниже.

Как видно из результатов, показанных в табл. 2, через 150 суток при температуре 25°C (температура окружающей среды) три штамма *L. paracasei*, LC-02, CHCC6272, *L. rhamnosus* CHCC5366 и *L. paracasei*, CRL 431, CHCC23026 сохраняли количество клеток 5×10^3 КОЕ/г или выше. Для сравнения, у 4 других тестируемых штаммов количество клеток при температуре окружающей среды быстро падало до уровня ниже $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г. Таким образом, три штамма - *L. paracasei*, LC-02, CHCC6272, *L. rhamnosus* CHCC5366 и *L. paracasei*, CRL 431, CHCC23026, обладают превосходными свойствами в отношении длительного хранения при температуре окружающей среды и в то же время поддерживают pH 3,55. Уровень pH 3,55 подходит для целого ряда ферментированных молочных продуктов. Кроме того, как видно из табл. 2, количество клеток имеет характерный временной профиль, где оно сначала увеличивается до достижения максимума к 14 суткам, после чего количество клеток начинает медленно снижаться вплоть до 56 суток, после чего количество клеток начинает увеличиваться вплоть до 150 суток. Что касается профиля подкисления образцов, то неожиданно было возможным поддерживать уровень pH 3,55, учитывая, что все указанные 3 штамма сбраживают лактозу и что образцы содержат лактозу.

Как видно из табл. 3, количество клеток для всех штаммов *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* разных йогуртных заквасочных культур быстро падало до низких уровней.

Пример 2. Тестирование пригодности *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* к хранению в условиях окружающей среды.

Молочный субстрат

уровень жира 2,7%*

уровень белка 2,9%*

лактоза 3,0%

сахароза 7,0% (добавленная)

модифицированный крахмал E1442 Cargill тип 75720 1,50%

пектин типа LMA CPKelco тип LM 106 AS-YA 0,30%

геллановая камедь типа Kelcogel YSS 0,05%

* уровень в конечном продукте, то есть после термической обработки, добавления штамма, хранящегося в условиях окружающей среды, и хранения в течение 150 суток.

Заквасочная культура.

Заквасочная культура YoFlex® типа YF-L904, содержащая два штамма *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*.

Тестируемые штаммы, хранящиеся в условиях окружающей среды.

Штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированный как DSM32389. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*

CHCC18944 депонированный как DSM28910.

20 других штаммов, выбранных из следующих видов: *Lactobacillus helveticus* *Lactobacillus plantarum* *Streptococcus thermophilus* *Lactococcus lactis* *Pediococcus acidilactici*.

Способ получения тестируемого продукта.

16. Диспергирование сухих ингредиентов в молоке.
 17. Отдых в течение 3 часов с легким перемешиванием.
 18. Нагревание молока до достижения температуры 65°C.
 19. Гомогенизация при 150 бар ($1,5 \times 10^4$ кПа).
 20. Термическая обработка до 95°C в течение 5 мин.
 21. Охлаждение до температуры ферментации 43°C.
 22. Закачивание молока в чан для ферментации.
 23. Инокуляция культуры YoFlex типа YF-L904.
 24. Ферментация вплоть до достижения pH 4,3.
 25. Разрушение сгустка и перемешивание до получения гладкой структуры.
 26. Термическая обработка при 75°C в течение 20 с.
 27. Охлаждение до 25°C.
- Процедура тестирования штаммов, хранящихся в условиях окружающей среды.
28. Асептическое внесение в 100 мл стерильные контейнеры.
 29. Инокуляция штаммов и культур.
 30. Хранение в течение 6 месяцев при комнатной температуре 25°C.

Метод подсчета клеток.

Подсчет клеток проводили с использованием автоматизированного процесса обработки жидкостей на аппарате Гамильтон. Процесс включает нанесение анализируемого образца на слой подходящего агаризованного субстрата в серии последовательных разведений и подсчет количества колоний для первого разведения этой последовательности, при котором наблюдается рост по меньшей мере одной колонии.

Результаты.

Среди 22 тестируемых штаммов только 5 штаммов имели количество клеток более $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г через 6 месяцев. Среди указанных 5 штаммов с числом клеток более $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г через 6 месяцев только два образца имели pH выше 3,5:

штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированный как DSM32389.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CHCC18944, депонированный как DSM28910.

Таблица 4

Количество клеток (КОЕ/г) для хранения при 25°C

Исследуемый штамм	0 месяцев	2 месяца	4 месяца	6 месяцев
<i>L. paracasei</i> CHCC5584	1,00E06	1,00E06	8,00E02	1,00E04
pH	4,23	3,54	3,60	3,51
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CHCC18944	3,70E05	7,00E05	1,00E06	5,50E05
pH	4,19	3,97	3,70	3,51

Пример 3. Тестирование пригодности трех видов *Lactobacillus* к хранению в условиях окружающей среды.

План эксперимента.

Целью настоящего эксперимента является проверка влияния на выживаемость четырех штаммов *Lactobacillus* следующих параметров:

pH термически обработанной йогуртной основы: тестировали pH 4,0 и 4,3;

уровень дозировки КОЕ: тестировали 10000 КОЕ и 100000 КОЕ;

уровень сахарозы в молочной основе: тестировали 0, 3 и 7% сахарозы.

Заквасочная культура

Заквасочная культура YoFlex® типа YF-L904, содержащая два штамма *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*. Молочный субстрат.

Таблица 5

Состав молочного субстрата

	%	г
Молоко с 3,5% жира	74,3	89160,0
Вода	23,45	28140,0
Модифицированный крахмал - Roquette	1,5	1800
Пектин	0,12	144,0
Геллановая камедь	0,03	36,0
Концентрат сывороточного белка (WPC) 80 – Nutrilac YO-7830	0,60	720,0
	100,0	120000

Способ получения тестируемого продукта.

1. Деаэрация молочной основы при 350-400 мбар ($3,5-4 \times 10^4$ Па).
2. Гомогенизация при 60°C при 150 бар ($1,5 \times 10^4$ кПа).
3. Термическая обработка при 95°C в течение 5 мин в пластинчатом пастеризаторе. Охлаждение до 5°C.
4. Инокуляция культурой
5. Температура ферментации: 43°C.
6. Окончательная термическая обработка: 74°C в течение 20 с в трубчатом выдерживателе.
7. Упаковка в ламинарном боксе в стерильные чашки. Тестируемые штаммы, хранящиеся в условиях окружающей среды Штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC6272, депонированный как DSM16572. Штамм *Lactobacillus fermentum* CHCC14591, депонированный как DSM32084. Штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированный как ATCC53103.

Анализ.

КОЕ на чашках с помощью RAPID-CFU: изменение (каждые 2 месяца).

Углеводы и небольшое содержание кислот с помощью ВЭЖХ: каждые 2 месяца.

Измерение pH по изменению цветового индикатора (оттенок): изменение (каждый 1 месяц).

Определение КОЕ.

КОЕ определяют посредством процедуры, включающей автоматический посев с использованием робота Гамильтон.

Измерение pH.

pH измеряли путем определения изменения цвета. В качестве цветового индикатора использовали бромкрезоловый пурпурный/зеленый в смеси 50/50. Раствор цветового индикатора готовили следующим образом: 1000 мл мерную колбу частично заполняли водой качества Milli-Q и в колбу переносили 1,00 г бромкрезолового зеленого и 1,0 г бромкрезолового пурпурного. В колбу добавляли 2 мл 4N NaOH, затем ее перемешивали и заполняли до 1000 мл водой качества Milli-Q.

Интенсивность цвета образцов считывали планшетным сканером. Изменение оттенка на 1 единицу приблизительно соответствует изменению pH на 0,05 единицы.

Результаты.

Таблица 6

Значения КОЕ и изменение pH в течение 4 месяцев хранения термически обработанного йогуртного продукта, хранящегося в условиях окружающей среды (тестируемый продукт), с начальным значением pH 4,0 и дозой КОЕ 10000

Тестируемый штамм	0 месяцев			2 месяца			4 месяца		
	0	3	7	0	3	7	0	3	7
Сахароза (%)	0	3	7	0	3	7	0	3	7
Без добавления тестируемого штамма	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH	138,9	138,9	138,9	140,9	140,7	140,1	139,0	141,6	140,5
<i>L. paracasei</i> CHCC6272	7,0	4,5	6,5	1,0	1,0	1,0	1,4	3,5	4,0
	E05	E05	E05	E06	E06	E06	E07	E06	E06
pH	139,4	139,0	138,8	134,9	134,4	134,9	140,6	140,0	138,9
<i>L. fermentum</i> CHCC14591	1,75	1,65	1,2	5,5	1,0	5,5	7,0	7,0	1,5
	E07	E07	E07	E05	E06	E05	E05	E05	E05
pH	139,5	138,8	138,8	139,7	141,3	140,2	140,7	138,2	140,2
<i>L. rhamnosus</i> LGG®	2,55	2,5	8,0	1,0	ND	1,0	1,6	1,6	6,5
	E06	E06	E05	E06		E06	E07	E07	E06
pH	139,3	138,8	138,7	131,6	ND	134,9	130,9	121,6	131,6

Таблица 7

Значения КОЕ и изменение рН в течение 4 месяцев хранения термически обработанного йогуртного продукта, хранящегося в условиях окружающей среды (тестируемый продукт), с начальным значением рН 4,3 и дозой КОЕ 10000

Тестируемый штамм	0 месяцев			2 месяца			4 месяца		
	0	3	7	0	3	7	0	3	7
Сахароза (%)	0	3	7	0	3	7	0	3	7
Без добавления тестируемого штамма	0	0	0	0	0	0	0	0	0
рН	145,7	145,3	144,7	146,4	147,1	146,6	142,6	145,0	145,3
<i>L. paracasei</i> CHCC6272	1,0	7,0	7,5	1,0	1,0	1,0	1,05	1,45	1,0
	E05	E04	E04	E06	E06	E06	E07	E07	E07
рН	146,3	145,6	145,3	137,7	136,6	136,9	147,3	148,1	146,4
<i>L. fermentum</i> CHCC14591	1,55	3,15	4,5	5,05	5,5	1,0	9,5	1,95	3,7
	E06	E06	E05	E05	E05	E06	E04	E05	E05
рН	146,3	145,7	145,3	147,3	147,5	147,1	147,2	150,1	149,3
<i>L. rhamnosus</i> LGG®	1,5	3,0	4,5	1,0	1,0	1,0	1,2	1,45	1,0
	E04	E04	E04	E06	E06	E06	E07	E07	E07
рН	146,3	145,7	145,1	137,5	136,9	137,5	134,7	133,4	136,2

Таблица 8

Значения КОЕ и изменение рН в течение 4 месяцев хранения термически обработанного йогуртного продукта, хранящегося в условиях окружающей среды (тестируемый продукт), с начальным значением рН 4,0 и дозой КОЕ 10000

Тестируемый штамм	0 месяцев			2 месяца			4 месяца		
	0	3	7	0	3	7	0	3	7
Сахароза (%)	0	3	7	0	3	7	0	3	7
Без добавления тестируемого штамма	0	0	0	0	0	0	0	0	0
рН	140,3	139,3	139,3	139,9	140,2	141,0	136,6	138,6	138,5
<i>L. paracasei</i> CHCC6272	5,0	2,0	3,5	1,0	1,0	1,0	1,4	9,0	7,0
	E06	E06	E06	E06	E06	E06	E07	E06	E06
рН	140,0	139,8	139,7	134,4	134,1	135,0	136,6	138,6	138,5
<i>L. fermentum</i> CHCC14591	1,5	1,25	8,5	5,5	5,5	5,5	7,0	6,0	6,1
	E07	E07	E06	E05	E06	E05	E05	E06	E06
рН	140,7	139,9	139,8	136,8	140,6	140,5	139,7	140,5	140,4
<i>L. rhamnosus</i> LGG®	4,5	2,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,3	1,35	4,0
	E06	E06	E06	E06	E06	E06	E07	E07	E06
рН	139,9	139,7	139,5	134,8	135,8	136,8	134,9	135,7	142,6

Таблица 9

Значения КОЕ и изменение рН в течение 4 месяцев хранения термически обработанного йогуртного продукта, хранящегося в условиях окружающей среды (тестируемый продукт), с начальным значением рН 4,3 и дозой КОЕ 100000

Тестируемый штамм	0 месяцев			2 месяца			4 месяца		
	0	3	7	0	3	7	0	3	7
Сахароза (%)	0	3	7	0	3	7	0	3	7
Без добавления тестируемого штамма	0	0	0	0	0	0	0	0	0
рН	144,4	144,3	143,9	143,9	143,0	143,0	141,7	141,5	140,0

<i>L. paracasei</i> CHCC6272	8,0 E05	7,5 E05	5,5 E05	1,0 E06	1,0 E06	1,0 E06	1,1 E07	1,1 E07	8,0 E06
pH	144,5	144,1	143,5	135,7	135,2	136,0	141,7	141,5	140,0
<i>L. fermentum</i> CHCC14591	1,0 E06	6,5 E06	1,0 E06	1,0 E06	1,0 E05	1,0 E06	2,5 E04	1,1 E06	3,5 E04
pH	144,4	144,4	143,9	143,3	144,4	143,9	139,5	143,7	145,3
<i>L. rhamnosus</i> LGG®	4,5 E05	6,0 E05	6,5 E05	1,0 E06	1,0 E06	1,0 E06	1,0 E06	2,0 E06	8,0 E05
pH	144,8	144,1	144,1	135,9	136,4	137,5	135,1	135,1	138,0

Как видно из табл. 6-9, для всех комбинаций образцов 1) тестируемого штамма *Lactobacillus*, 2) pH термически обработанной йогуртовой основы, 3) уровня дозы КОЕ и 4) уровня сахарозы в термически обработанном йогурте, уровень КОЕ/г находился между 2,5Е04 и 1,6Е07 через 4 месяца хранения.

Сравнение исходного pH йогуртовой основы: для обеих уровней дозы КОЕ и без добавления сахарозы йогуртовая основа с исходным pH 4,0 достигла более высоких значений КОЕ через 4 месяца, чем йогуртовая основа с исходным pH 4,3, для всех тестируемых штаммов. Для обеих уровней дозы КОЕ и добавлении 3% сахарозы, йогуртовая основа с исходным pH 4,0 достигла более высоких значений КОЕ через 4 месяца, чем йогуртовая основа с исходным pH 4,3, для штаммов *L. rhamnosus* и *L. fermentum*. Для дозы КОЕ, составляющей 10000 КОЕ/г, и уровня 7% добавленной сахарозы, йогуртовая основа с исходным pH 4,3 достигала более высоких значений КОЕ через 4 месяца, чем йогуртовая основа с исходным pH 4,0, для всех тестируемых штаммов.

Сравнение уровней дозы КОЕ: Для штамма *L. rhamnosus* уровень дозы КОЕ, составляющий 10000 КОЕ/г, для обеих исходных значений pH йогуртовой основы, приводит к более высоким значениям КОЕ через 4 месяца, чем уровень дозы КОЕ, составляющий 100000 КОЕ/г, для всех уровней добавленной сахарозы. Для уровня добавленной сахарозы 7% и йогуртовой основы с исходным pH 4,3, уровень дозы КОЕ, составляющий 10000 КОЕ/г, приводит к более высоким значениям КОЕ через 4 месяца, чем уровень дозы КОЕ, составляющий 100000 КОЕ/г, для всех тестируемых штаммов.

Сравнение уровней добавленной сахарозы: Для дозы КОЕ, составляющей 10000 КОЕ/г, и йогуртовой основы с исходным pH 4,0, уровень сахарозы 0% приводит к более высоким значениям КОЕ через 4 месяца, чем уровни 3 и 7% сахарозы (однако для штаммов *L. rhamnosus* и *L. fermentum* и уровня сахарозы 3% показатели КОЕ являются такими же, что и в случае 0%). Для дозы КОЕ, составляющей 100000 КОЕ/г, и йогуртовой основы с исходным pH 4,3, уровень сахарозы 3% приводит к более высоким значениям КОЕ через 4 месяца, чем уровни сахарозы 0 и 7%.

Для достижения высокой жизнеспособности бактерий *Lactobacillus* при длительном хранении при температуре окружающей среды термически обработанного йогурта считается необходимым добиться умеренного сбалансированного роста бактерий. Так, если у бактерий, инокулированных в йогуртовую основу, ограничены условия роста, эта культура бактерий не сможет поддерживать себя, и количество клеток будет уменьшаться в неприемлемой степени. В этом случае снижение pH йогурта будет незначительным только из-за ограниченного роста бактерий. С другой стороны, если бактерии, инокулированные в йогуртовую основу, находятся в условиях стимулирования роста, бактериальная культура войдет в фазу интенсивного роста, что приведет к сильному падению pH, которое в итоге остановит рост бактерий и возможно инактивирует или лизирует бактериальные клетки. Кроме того, такое сильное падение pH нежелательно, так как оно может сделать вкус йогурта слишком кислым.

В заключение, полагают, что необходимо достижение умеренного, сбалансированного роста бактерий. Целый ряд факторов является важным для достижения такого умеренного, сбалансированного роста бактерий. В число этих факторов входят параметры, протестированные в этом примере, как указано выше. В частности, важным является исходное значение pH йогуртовой основы, поскольку оно влияет как на уровень роста бактерий, так и на конечный pH, достигаемый во время хранения. Уровень дозы КОЕ является важным, так как он определяет пиковый уровень бактерий, достигаемый во время хранения и, следовательно, уровень падения pH. Наконец, общепринятой практикой является добавление сахарозы к термически обработанному йогурту, хранящемуся в условиях окружающей среды, в качестве подсластителя. Уровень сахарозы важен для выживаемости бактерий во время длительного хранения, так как полагают, что сахароза будет разрушаться во время хранения с образованием глюкозы и фруктозы, следовательно, образуя источник углеводов для роста бактерий и вызывая повышенный рост бактерий.

Как видно из результатов настоящего примера, оба исходных уровня pH йогуртовой основы, равные 4,0 и 4,3, приводят к высоким значениям КОЕ от 2,5Е04 до 1,6Е07 через 4 месяца хранения. Приводит ли исходный уровень pH 4,0 или 4,3 йогуртовой основы к более высокому количеству клеток через 4 месяца, зависит от других факторов, проанализированных, как подробно описано выше.

Как видно из результатов настоящего примера, оба уровня дозы КОЕ - 10000 и 100000 КОЕ/г, приводят к высоким значениям КОЕ от 2,5Е04 до 1,6Е07 через 4 месяца хранения. Приводит ли уровень до-

зы КОЕ 10000 или 100000 КОЕ/г к более высокому количеству клеток через 4 месяца, зависит от других факторов, проанализированных, как подробно описано выше.

Как видно из результатов настоящего примера, все уровни добавленной сахарозы 0, 3 и 7%, приводят к высоким значениям КОЕ от 2,5Е04 до 1,6Е07 через 4 месяца хранения. Приводит ли уровень добавленной сахарозы 0, 3 и 7%, к более высокому количеству клеток через 4 месяца, зависит от других факторов, проанализированных, как подробно описано выше.

Пример 4. Тестирование пригодности к хранению в условиях окружающей среды двух видов *Lactobacillus* в ферментированном молочном продукте с низким рН (Yakult).

Основа ферментированного молочного продукта.

В этом примере использовали коммерческий продукт Yakult с низким рН (рН 3,8) в качестве основы для добавления штаммов, хранящихся в условиях окружающей среды, для тестирования их выживаемости, пост-подкисления и роста во время длительного хранения при температуре окружающей среды.

Ингредиенты: вода, сахар, сироп, сухое обезжиренное молоко, глюкоза, *Lactobacillusparacasei* (живые молочнокислые бактерии > 30Е08 КОЕ/г) и ароматизатор.

Пищевая ценность: коммерческий продукт в 100 мл содержал 1,2 г белка, 0 г жира и 15,4 г углеводов.

Тестируемые штаммы, хранящиеся в условиях окружающей среды Штамм *Lactobacillus fermentum* CHCC14591, депонированный как DSM32084. Штамм *Lactobacillus rhamnosus* LGG®, депонированный как ATCC53103.

Способ получения тестируемого продукта.

Образцы коммерческого продукта Yakult на первом этапе пастеризовали при 74°C в течение 20 секунд в мини-установке для термизации (MTU). Пастеризованные образцы затем помещали в стерильные 100 мл чашечки в ламинарном боксе (LAF). Чашечки затем инокулировали тестируемыми штаммами, хранящимися в условиях окружающей среды, в количестве 1,0Е06/мл и хранили при 25°C в течение 3 месяцев.

Результаты.

Таблица 10

	Месяц	КОЕ/мл	рН
Штамм <i>L. rhamnosus</i> LGG®	0	3,70Е07	3,55
	1,5	1,08Е07	
	3	1,30Е06	3,15
Штамм <i>L. fermentum</i> CHCC14591	0	1,05Е07	3,5
	1,5	3,70Е07	
	3	9,80Е07	3,4

Как видно из табл. 10, количество клеток было очень высоким после 3 месяцев хранения при 25°C для обоих протестированных штаммов, то есть оно было выше, чем уровень инокуляции. Для штамма *L. fermentum* CHCC14591 рН снизился только на 0,1 единицы за 3 месяца хранения при 25°C, что должно считаться очень низким уровнем пост-подкисления при 25°C, в частности в свете того, что за этот период количество клеток увеличилось. Для штамма *L. rhamnosus* LGG® снижение рН за 3 месяца хранения при 25°C было несколько выше, то есть 0,4 единицы, что является приемлемым для некоторых ферментированных молочных продуктов.

Депонирование и экспертное решение

Штаммы по изобретению были ранее депонированы и имеют следующие номера доступа:

Штамм *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированный как DSM16572, 2016-05-10 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig.

Штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC5366, депонированный как DSM23035, 2012-02-02 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig.

Штамм *Lactobacillus acidophilus* La-5, CHCC2169, депонированный как DSM 13241, 2003-09-30 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig.

Bifidobacterium animalis BB-12, CHCC5445, депонированный как DSM15954, 2003-09-30 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig.

Lactococcus lactis DN-224, CHCC3955, депонированный как DSM11037, 1996-06-26 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Maschroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig.

Штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированный как DSM32389, 2016-11-02 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig.

Штамм *Lactobacillus fermentum* CHCC14591, депонированный как DSM32086, 2015-07-16 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig.

Штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944, депонированный как DSM28910, 2014-06-12 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig.

Штамм *Lactobacillus paracasei* LC-01, CHCC2115, депонированный как DSM19465, 2007-06-27 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig.

Штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, депонированный как DSM24616, 2011-03-01 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig.

Штамм *Lactobacillus paracasei* CHCC7155, депонированный как DSM18875, 2006-12-19 в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig.

Депонирование было осуществлено в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Образец депонированного микроорганизма может быть доступен только с согласия патентообладателя.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения ферментированного молочного пищевого продукта, который может храниться при температуре окружающей среды от 10 до 35°C и содержит жизнеспособные молочнокислые бактерии, включающий:

предоставление молочного пищевого продукта, имеющего pH от 3,4 до 4,4;

термическую обработку этого пищевого продукта, чтобы уменьшить уровень бактерий до не более чем 1×10^2 КОЕ/г, с получением термически обработанного пищевого продукта;

асептическое добавление к термически обработанному пищевому продукту одного или более штаммов молочнокислых бактерий, сохраняющий жизнеспособность при температуре окружающей среды от 10 до 35°C, в общем количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г с получением пищевого продукта, который может храниться при температуре окружающей среды от 10 до 35°C;

где штамм молочнокислых бактерий, сохраняющий свою жизнеспособность при температуре окружающей среды от 10 до 35°C, выбран из группы, состоящей из штаммов:

(1) где штамм при добавлении в количестве $2,5 \times 10^7$ КОЕ/г к ферментированному молочному тестируемому продукту в виде йогурта, полученного посредством ферментации с помощью заквасочной культуры, содержащей *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, при температуре 43°C до pH 4,3, который термически обработан при 75°C в течение 30 с, способен сохранять жизнеспособность в количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г в конце периода хранения тестируемого продукта, составляющего 150 суток, при температуре 25°C, и

(2) где pH тестируемого продукта понижается не более чем на 0,8 единиц в течение периода хранения, и

(3) где штамм выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

2. Способ по п.1, где штамм молочнокислых бактерий, сохраняющий свою жизнеспособность при температуре окружающей среды от 10 до 35°C, способен сохранять жизнеспособность в количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г,

предпочтительно по меньшей мере $5,0 \times 10^3$ КОЕ/г, более предпочтительно по меньшей мере $1,0 \times 10^4$ КОЕ/г, более предпочтительно по меньшей мере $5,0 \times 10^4$ КОЕ/г и наиболее предпочтительно по меньшей мере $1,0 \times 10^5$ КОЕ/г в конце периода хранения тестируемого продукта, составляющего 150 суток.

3. Способ по п.1 или 2, где pH тестируемого продукта понижается не более чем на 0,7, предпочтительно на 0,6, предпочтительно на 0,5, предпочтительно на 0,4, предпочтительно на 0,3, и наиболее предпочтительно на 0,2 во время периода хранения тестируемого продукта, составляющего 150 суток.

4. Способ по любому из пп.1-3, где штамм, при добавлении в количестве $2,5 \times 10^7$ КОЕ/г к тестируемому продукту, размножается до количества по меньшей мере $5,0 \times 10^7$ КОЕ/г, предпочтительно до $7,5 \times 10^7$ КОЕ/г, и наиболее предпочтительно до $1,0 \times 10^8$ КОЕ/г.

5. Способ по п.4, где количество клеток достигает максимума в пределах 45 суток после добавления штамма к тестируемому продукту, предпочтительно в пределах 40 суток, предпочтительно в пределах 35 суток, предпочтительно в пределах 30 суток, предпочтительно в пределах 25 суток, предпочтительно в пределах 20 суток, и наиболее предпочтительно в пределах 15 суток.

6. Способ по любому из пп.1-5, где пищевой продукт, который может храниться при температуре окружающей среды от 10 до 35°C, можно хранить при указанной температуре окружающей среды в течение периода по меньшей мере 1 суток, предпочтительно по меньшей мере 2 суток, более 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, более предпочтительно по меньшей мере 7 суток, более предпочтительно по меньшей мере 8 суток, более предпочти-

тельно по меньшей мере 9 суток, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 10 суток.

7. Способ по любому из пп.1-6, где штамм молочнокислых бактерий, сохраняющий свою жизнеспособность при температуре окружающей среды от 10 до 35°C, выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированного в DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) как DSM16572, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированного в ATCC (Американской коллекции типовых культур) как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированного в DSM как DSM32389, *Lactobacillus fermentum* CHCC14591, депонированного в DSM как DSM32086, и штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944, депонированного в DSM как DSM28910, и их функционально эквивалентных мутантов и вариантов, которые обладают по существу теми же свойствами в отношении пригодности для хранения при температуре окружающей среды от 10 до 35°C, что и родительский штамм.

8. Способ по любому из пп.1-7, где пищевой продукт, имеющий pH от 3,4 до 4,4, представляет собой ферментированный с помощью заквасочной культуры молочный продукт, полученный посредством ферментации молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий с получением ферментированного с помощью заквасочной культуры молочного продукта.

9. Способ по любому из пп.1-8, где ферментированный с помощью заквасочной культуры молочный продукт имеет содержание белка более 5,1% (мас./мас.).

10. Способ по любому из пп.1-9, где ферментированный с помощью заквасочной культуры молочный продукт не подвергают разбавлению.

11. Применение штамма молочнокислых бактерий для получения ферментированного молочного пищевого продукта, который может храниться при температуре окружающей среды от 10 до 35°C и содержит жизнеспособные молочнокислые бактерии, где продукт имеет pH от 3,4 до 4,4 и содержит по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г штамма, и где штамм молочнокислых бактерий выбран из группы, состоящей из штаммов:

(1) где штамм при добавлении в количестве $2,5 \times 10^7$ КОЕ/г к ферментированному молочному тестируемому продукту в виде йогурта, полученному посредством ферментации с помощью заквасочной культуры, содержащей *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, при температуре 43°C до pH 4,3, который термически обработан при 75°C в течение 30 с, способен сохранять жизнеспособность в количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г в конце периода хранения тестируемого продукта, составляющего 150 суток, при температуре 25°C, и

(2) где pH тестируемого продукта снижается не более чем на 0,8 единиц в течение периода хранения, и

(3) где штамм выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

12. Применение по п.11, где продукт представляет собой ферментированный молочный продукт, полученный посредством ферментации молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий, где продукт содержит не более 1×10^2 КОЕ заквасочной культуры/г и по меньшей мере 1×10^3 КОЕ/г штамма молочнокислых бактерий, сохраняющего свою жизнеспособность при температуре окружающей среды от 10 до 35°C.

13. Применение по п.11, где продукт представляет собой ферментированный молочный продукт, полученный посредством ферментации молочного субстрата с использованием заквасочной культуры молочнокислых бактерий, где ферментированный молочный продукт после ферментации был подвергнут термической обработке для уменьшения уровня бактерий заквасочной культуры до не более чем 1×10^2 КОЕ/г, и где после термической обработки штамм по п.1, сохраняющий свою жизнеспособность при температуре окружающей среды от 10 до 35°C, был асептически добавлен к термически обработанному продукту в количестве по меньшей мере $1,0 \times 10^3$ КОЕ/г.

14. Применение по любому из пп.11-13, где штамм выбран из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus paracasei* LC-02, CHCC6272, депонированного в DSM как DSM16572, штамма *Lactobacillus paracasei* CRL 431, CHCC23026, депонированного в ATCC как ATCC 55544, штамма *Lactobacillus paracasei* CHCC5584, депонированного в DSM как DSM32389, *Lactobacillus fermentum* CHCC14591, депонированного в DSM как DSM32086, и штамма *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC18944, депонированного в DSM как DSM28910, и их функционально эквивалентных мутантов и вариантов, которые обладают по существу теми же свойствами в отношении пригодности для хранения при температуре окружающей среды от 10 до 35°C, что и родительский штамм.

