

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292784** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.27

(22) Дата подачи заявки
2021.06.11

(51) Int. Cl. *A23C 9/12* (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23C 9/13 (2006.01)
A23L 33/21 (2016.01)

(54) ПОДКИСЛЕННЫЕ МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ С ДОБАВКОЙ ВОЛОКОН И СПОСОБЫ ИХ ОБЕСПЕЧЕНИЯ

(31) **20179461.7**

(32) **2020.06.11**

(33) **EP**

(86) **PCT/NL2021/050371**

(87) **WO 2021/251828 2021.12.16**

(71) Заявитель:
**КООПЕРАТИ КОНИНКЛЕЙКЕ
АВЕБЕ У.А. (NL)**

(72) Изобретатель:
**Удхуис Алида Анна Катарина Мария,
Лимхуис Рейндер Йоханнес, Бувальда
Питер Ликле (NL)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к области подкисленных молочных продуктов, в частности к применению медленно усваиваемых или не усваиваемых пищевых и/или пребиотических волокон для улучшения вязкости подкисленных молочных продуктов, которые можно есть ложкой. Предложен способ обеспечения подкисленного молочного продукта, который можно есть ложкой, включающий следующие стадии: а) обеспечение альфа-глюкановой композиции, содержащей по существу линейные изомальто/мальто-полисахариды (ИММР), в которых содержание $\alpha(1 \rightarrow 6)$ гликозидных связей составляет по меньшей мере 70%; б) добавление указанной альфа-глюкановой композиции к молочному продукту и с) подкисление указанного молочного продукта, содержащего указанную добавку, до pH ниже 5, предпочтительно до pH около 4,6. Также предложены продукты, которые можно получить с помощью данного способа. Также предложено применение ИММР с содержанием $\alpha(1 \rightarrow 6)$ гликозидных связей по меньшей мере 70% для улучшения стабильности и/или органолептических свойств подкисленных молочных продуктов.

A1

202292784

202292784

A1

ПОДКИСЛЕННЫЕ МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ С ДОБАВКОЙ ВОЛОКОН И СПОСОБЫ ИХ ОБЕСПЕЧЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области подкисленных молочных продуктов. В частности, оно относится к применению медленно усваиваемых или
5 не усваиваемых пищевых пребиотических полисахаридных волокон для улучшения вязкости подкисленных молочных продуктов. Также представлены способы обеспечения подкисленного молочного продукта, который можно есть ложкой, содержащего такие волокна, и продуктов, получаемых таким образом.

Термин «пищевое волокно» был первоначально введен Хипсли (Hipsley)
10 (British. Medical. J., 1953, Vol. 2, p. 420-422) для описания компонентов пищи, входящих в стенки растительных клеток. В существующих стандартах Codex Alimentarius «пищевые волокна» определены как «съедобные растительные и животные материалы, не гидролизуемые эндогенными ферментами
15 пищеварительного тракта человека, как определено в соответствии с общепринятым способом». Как правило, пищевые волокна классифицируют на растворимые или нерастворимые. Примеры растворимых волокон включают инулин, олигосахариды, пектины, β -глюканы и полидекстрозу. Целлюлоза, гемицеллюлоза, лигнины, пшеничные отруби и устойчивые крахмалы с другой стороны являются примерами нерастворимых волокон.

20 Существуют убедительные доказательства, что диета с высоким содержанием волокон приносит значительную пользу для здоровья, снижая риск ишемической болезни сердца, инсульта, гипертонии, диабета, ожирения, различных онкологических заболеваний и некоторых желудочно-кишечных расстройств. Существуют различные процессы, обеспечивающие такую пользу.
25 Например, пищевые волокна обеспечивают наполнение и расслабление мускулатуры, что способствует здоровой перистальтике кишечника. Более того, пищевые волокна замедляют скорость абсорбции из тонкой кишки, особенно глюкозы.

В частности, к соответствующему классу пищевых волокон относятся
30 пребиотические волокна. Пребиотические волокна подвергаются ферментативному расщеплению сахаролитическими (расщепляющими углеводы)

микроорганизмами в толстой кишке. Эти микроорганизмы считают полезными для здоровья человека. В результате ферментативного расщепления пребиотических волокон этими микроорганизмами образуются короткоцепочечные жирные кислоты, которые поглощаются из кишечника, и они имеют различное физиологическое значение. Примеры пребиотических волокон включают фрукто-олигосахариды (FOS), галакто-олигосахариды (GOS), лактулозу, инулин, которые можно найти, например, в корне цикория, чесноке, луке-порее, репчатом луке, спарже и пшенице.

Диета, богатая пребиотическими волокнами, способствует росту этих полезных расщепляющих углеводы микроорганизмов. Это увеличивает соотношение полезных расщепляющих углеводов микроорганизмов к потенциально вредным расщепляющим белки микроорганизмов, что приводит к более здоровому микробиому кишечника.

Значение пищевых волокон и, в частности, пребиотических волокон, для здоровья человека в настоящее время широко признано. ВОЗ рекомендует ежедневное их потребление в количестве 30-40 г для взрослых мужчин и 20-30 г для взрослых женщин. Однако, особенно во многих западных обществах, большинство взрослых людей недополучают эти волокна. Например, большинство американцев потребляют только примерно половинное количество волокон от этой рекомендуемой ежедневной дозы.

Многообещающий путь для увеличения потребления пищевых волокон состоит в добавлении таких волокон в популярные подвергшиеся технологической обработке продукты. Потребителей можно стимулировать покупать продукты с такой добавкой, которые могут быть распознаны по их маркировке. Например, в соответствии с принципами Европейской комиссии, подвергшийся технологической обработке пищевой продукт может быть маркирован как «источник волокон», если концентрация волокон составляет по меньшей мере 3 % масс. Если концентрация волокон составляет по меньшей мере 6 % масс., то продукт может быть маркирован как продукт с «высоким содержанием волокон».

Пребиотические волокна для применения в качестве добавки в подвергшихся технологической обработке продуктах могут быть выделены из

растительных источников. Например, инулин может быть извлечен из корня цикория, а β -глюканы могут быть извлечены из овса. Также возможно синтезировать пребиотические волокна. Полидекстроза, например, может быть синтезирована из глюкозы.

5 Получение пребиотических волокон из крахмала может быть привлекательной альтернативой. Крахмал - это полисахарид, используемый зелеными растениями в качестве средства хранения энергии, и он обычно присутствует в высоких концентрациях в этих растениях. Это делает его относительно доступным исходным продуктом. Рис, пшеница, кукуруза и картофель
10 являются хорошими источниками крахмала, при этом примерно 76 % сухих веществ картофеля состоят из крахмала.

Природный необработанный крахмал как таковой, то есть гранулы крахмала, не расщепляется в тонкой кишке, и его обычно называют устойчивым крахмалом второго типа. Однако, при использовании крахмала в пищевых целях, при его
15 растворении, также называемом желатинизацией, для обеспечения полезного эффекта за счет его текстурных и загущающих свойств, крахмал становится легко усваиваемым благодаря ферментам, высвобождаемым во рту, желудке и тонкой кишке. Крахмал может быть модифицирован химически или ферментативно для
20 получения волокон с пребиотическими характеристиками. Например, в WO2010/128859 описано, что медленно усваиваемая или не усваиваемая композиция волокон может быть получена путем обработки крахмала с помощью фермента α -глюканотрансферазы GTFB-типа, и полученный в результате альфа-глюкан можно применять в качестве пищевой добавки для обеспечения пребиотических волокон.

25 Подкисленные молочные продукты, которые можно есть ложкой, являются примером популярной категории подвергшихся технологической обработке пищевых продуктов, которые часто называют кандидатом на добавление к ним пребиотических волокон. Подкисленные молочные продукты, которые можно есть ложкой, имеют гладкую текстуру и они достаточно твердые или вязкие, чтобы их
30 можно было употреблять с применением ложки. Примеры подкисленных молочных продуктов, которые можно есть ложкой, включают йогурт, йогурт в греческом стиле, творог (англ. quark), скир (англ. skyr), сырное зерно (англ. curd) и свежий сыр. Эти

продукты ценятся за их тонкий баланс между свежим и сливочным вкусом и гладкой текстурой.

Подкисленные молочные продукты также обычно воспринимаются как полезные. Они являются хорошим источником белка, витаминов и кальция. Более того, если подкисленный молочный продукт является молочным продуктом, полученным с применением культуры микроорганизмов (англ. cultured), он может содержать живые культуры полезных расщепляющих углеводы микроорганизмов. Потребление продуктов, содержащих эти так называемые пробиотики, может помочь улучшить баланс между полезными и вредными бактериями в кишечнике.

10 Хотя при этом могут присутствовать некоторые неусваиваемые полисахариды (экзо-полисахариды), количество волокон в подкисленных молочных продуктах, как правило, слишком низкое, чтобы их классифицировали как источник волокон. Поэтому желательно увеличить потенциальные полезные для здоровья эффекты этих продуктов путем добавления в них пребиотических волокон.

15 При введении добавок в подкисленный молочный продукт, такой как йогурт, важно поддерживать желаемый сливочный вкус и гладкую текстуру. Восприятие сливочного вкуса и гладкой текстуры подкисленных молочных продуктов являются ключевыми аспектами для оценки этих продуктов потребителями. Реологические свойства и вязкость лежат в основе этих наблюдаемых характеристик, и более вязкие йогурты, как правило, выше оцениваются потребителями.

25 Добавление к йогурту пребиотических волокон в соответствии с WO2010/128859 не оказывает положительного влияния на вязкость йогурта. Следовательно, авторы изобретения признали необходимость в способе увеличения количества пребиотического волокна в подкисленных молочных продуктах, не жертвуя реологическими свойствами этих продуктов.

Неожиданно было обнаружено, что добавление к молочному продукту альфа-глюкановой композиции, полученной путем обработки крахмала с помощью как пуллулаказы, так и α -(4,6)-глюканотрансферазы GTFB-типа перед подкислением, привело к получению йогурта как с высоким содержанием медленно усваиваемых или не усваиваемых волокон, так и с желаемыми реологическими свойствами. α -Глюкановая композиция содержит по существу линейные

изомальто/мальто-полисахариды (IMMP), характеризующиеся содержанием $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей, составляющим по меньшей мере 70 %. Добавление таких IMMP к молочному продукту перед ферментацией привело к получению продуктов со значительно более высокой вязкостью.

5 Соответственно, в одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу обеспечения подкисленного молочного продукта, который можно есть ложкой, включающему следующие стадии:

 а) обеспечение α -глюкановой композиции, содержащей по существу линейные изомальто/мальто-полисахариды (IMMP), в которых содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей составляет по меньшей мере 70 %;

10

 b) добавление указанной α -глюкановой композиции в молочный продукт;

 c) подкисление указанного молочного продукта с указанной добавкой до pH ниже 5.

 Изобретение также относится к подкисленному молочному продукту, который можно есть ложкой, получаемому с помощью способа в соответствии с настоящим изобретением. В дополнительном аспекте изобретение относится к подкисленному молочному продукту, который можно есть ложкой, содержащему по меньшей мере 1,5 % масс., предпочтительно по меньшей мере 3 % масс., более предпочтительно по меньшей мере 6 % масс. по существу линейных изомальто/мальто-полисахаридов (IMMP), в которых содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей составляет по меньшей мере 70 %.

15

20

 Хотя целесообразность добавления к подкисленным молочным продуктам медленно усваиваемых или не усваиваемых и/или пребиотических волокон широко признана, способ по изобретению и продукты, относящиеся к нему, не известны или не предложены в данной области техники.

25

 В настоящее время на рынке представлены несколько йогуртов с добавленным пребиотиком - инулином. Тем не менее, инулин не увеличивает вязкость таких йогуртов, и его применение преимущественно ограничено продуктами с низкой вязкостью, такими как йогурт с нарушенным сгустком и питьевой йогурт.

30

Добавление полидекстрозы действительно увеличивает вязкость йогуртов в соответствии с Альгейер (Allgeyer) и др. (2010), но полученный продукт воспринимается как мучнистый.

В WO2008/000913 указывают на то, что комбинация растворимого льняного
5 волокна и трансглутаминазы может быть добавлена перед ферментацией, чтобы увеличить вязкость подкисленных молочных продуктов. Однако одного пребиотического волокна недостаточно для получения желаемого увеличения вязкости.

Альтернативно, для повышения вязкости подкисленных молочных продуктов
10 можно использовать глюканы с высокой молекулярной массой. Например, декстран с молекулярной массой 500 кДа (Mende *et al.* 2013 [1]) или 2000 кДа (Pachekreparol *et al.* (2015) [2]), как было показано, увеличивают вязкость кислых молочных гелей. Кроме того, в WO2005/048735 раскрыто, что фракция, включающая по меньшей мере 20 % β -глюкана с молекулярной массой более 400 кДа, извлеченная из овса
15 и ячменя, может быть добавлена в йогурт для увеличения вязкости. Следует отметить, что такие высокомолекулярные добавки, как правило, вызывают разделение фаз в молочных продуктах из-за эффектов истощения. Кроме того, обогащенная β -глюканом фракция, используемая в WO2005/048735, также включает белки и масла. Неизвестно, как они могут способствовать наблюдаемому
20 увеличению вязкости, и их присутствие нежелательно с органолептической точки зрения.

Кроме того, применение изомальто-олигосахаридов в качестве добавок в ферментированные молочные продукты известно в данной области техники.

Йогурты, которые можно есть ложкой, содержащие изомальто-
25 олигосахариды, продавались компаниями Samyang Foods и Taiwan Bifidoferment Co. См. XP055745938 и XP055745940.

В CN109769937 раскрыты йогурт с добавкой мальто-олигосахарида и способы его получения. Данный содержащий мальто-олигосахариды йогурт получают из, по массе, 6-15 частей крахмала, 0,01-1 части альфа-амилазы, 3-10
30 частей молочного белка, 0,07-0,1 части разрыхлителя и составляющего остальное количество молока, где общее количество компонентов частей по массе составляет

1000. В указанном способе расщепление ферментами и ферментацию выполняют одновременно. Путем выбора подходящего крахмала в качестве базового стабилизатора и субстрата для расщепления ферментами и путем добавления альфа-амилазы, крахмал может быть расщеплен на мальто-олигосахарид, декстрин и тому подобное, и пробиотические полезные для здоровья
5 характеристики йогурта могут быть дополнительно улучшены.

US2007/0082087 относится к молочным продуктам, полученным в результате ферментации *Bifidobacterium Longum*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, и *Streptococcus thermophilus*, и добавления изомальто-олигосахарид, действующего
10 как пребиотик для увеличения популяции *Bifidobacterium Longum* в указанных ферментированных молочных продуктах.

В CN104041583 раскрыт содержащий изомальто-олигосахарид йогурт, включающий 2-15 % масс. изомальто-олигосахарид, ферментированное молоко и 37 % масс. ксилита. Предпочтительно, изомальто-олигосахарид представляет
15 собой IMO-90.

Тем не менее, важно отметить, что IMMP для применения в настоящем изобретении структурно отличаются от изомальто-олигосахаридов (IMO). IMO - это разветвленный, неферментируемый олигосахарид, также известный как разветвленный олигосахарид или олигоглюкоза. В то время как степень
20 полимеризации (DP) IMO, как правило, находится в диапазоне от 2 до примерно 6, для IMMP она значительно больше (были идентифицированы IMMP с DP до 35).

IMMP волокна для применения в настоящем изобретении известны. Leemhuis *et al.* (2014) [3] описывают получение IMMP путем обработки крахмала пуллуланазой и α -(4,6)-глюканотрансферазой GTFB типа. Однако Leemhuis *et al.* не сообщают о возможном применении таких IMMP в подкисленных молочных
25 продуктах. Более того, Leemhuis *et al.* не предоставляют никакой информации или предположений, касающихся того, как эти IMMP могут повлиять на вязкость таких продуктов.

Следовательно, в данной области техники не изучено и не предложено
30 применение IMMP волокон, содержащих по меньшей мере 70 % $\alpha(1\rightarrow6)$ -

гликозидных связей, для повышения вязкости подкисленных молочных продуктов, как это раскрыто в данном документе.

IMMP для применения в настоящем изобретении включают линейные α -
 5 глюкозаны с одним или более мономерами глюкозы, связанными с помощью $\alpha(1\rightarrow4)$ -
 связей на восстанавливающем конце, и с одним или более звеньями глюкозы,
 связанными с помощью $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидных связей на невосстанавливающем
 конце. Чтобы быть доступными для микробной ферментации в толстой кишке, такие
 содержащие IMMP волокна должны быть устойчивыми к расщеплению
 ферментами человека. Ферменты человека способны разлагать лишь небольшое
 10 количество гликозидных связей, присутствующих в полисахаридах. Особое
 значение для расщепления IMMP имеют амилазы поджелудочной железы и слюны.
 Амилазы гидролизуют $\alpha(1\rightarrow4)$ гликозидные связи в полисахаридах и расщепляют
 их природные субстраты, например, крахмал и гликоген, с образованием мальтозы
 и глюкозы. Основной формой амилазы у млекопитающих является α -амилаза. Этот
 15 фермент может действовать только на $\alpha(1\rightarrow4)$ связи на протяжении по меньшей
 мере трех последовательных $\alpha(1\rightarrow4)$ гликозидных связей.

У людей расщепление углеводов в основном обеспечивается за счет
 фермента амилазы. Этот фермент не способен гидролизовать $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидные
 связи. Следовательно, полисахариды с повышенным содержанием $\alpha(1\rightarrow6)$
 20 гликозидных связей менее чувствительны к расщеплению в тонкой кишке и могут
 рассматриваться как медленно усваиваемые или не усваиваемые растворимые
 волокна. В настоящем документе содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ связей определяется как
 (количество $\alpha(1\rightarrow6)$ связей)/((количество $\alpha(1\rightarrow6)$ связей)+(количество $\alpha(1\rightarrow4)$
 связей)).

25 В IMMP для применения по настоящему изобретению содержание $\alpha(1\rightarrow6)$
 связей составляет по меньшей мере 70 %. Предпочтительно, содержание $\alpha(1\rightarrow6)$
 гликозидных связей в IMMP составляет по меньшей мере 72 %, более
 предпочтительно по меньшей мере 74 %. В другом предпочтительном варианте
 реализации содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей в IMMP составляет 75-99 %,
 30 например, 76 %, 78 %, 79 %, 82 %, 85 %, 87 %, 90 %, 91 %, 93 %, 94 %, 96 %, 97 %
 или 98 %.

Хорошие результаты с точки зрения увеличения вязкости подкисленного молочного продукта с указанной добавкой были получены с помощью IMMP, в которых содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей составляет около 70 %, 77 % или 87 %. Соответственно, в особенно предпочтительном варианте реализации

5 содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей находится в диапазоне 70-90 %, например, 70-75 %, 74-77 %, 75-85 %, 80-90 %.

IMMP, содержащие около 96 % $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей, также показали желаемое влияние на вязкость подкисленного молочного продукта. Следовательно, в другом варианте реализации содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных

10 связей находится в диапазоне 90-98 %, предпочтительно около 95-97 %.

В особенно предпочтительном варианте реализации в IMMP для применения в настоящем изобретении содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей составляет 80-100 %, предпочтительно 82-99 %, наиболее предпочтительно 85-98 %, например, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 % или 97 %.

15 Указанные IMMP могут варьироваться по длине своей цепи. В одном варианте реализации IMMP имеют молекулярную массу $1,0 \times 10^3$ - $1,0 \times 10^6$ Да, определенную с помощью гель-фильтрационной хроматографии с детекторами показателя преломления и многоугольного рассеяния света (GPC-RI-MALLS). Это соответствует определенной степени полимеризации (DP) всего

20 глюкоолигосахарида (фрагмента), состоящего по меньшей мере из 6 остатков глюкозы и по большей мере приблизительно из 6200 остатков глюкозы. Предпочтительно, глюкоолигосахарид (фрагмент) имеет DP по меньшей мере 20, более предпочтительно по меньшей мере 30 остатков глюкозы. В особенно предпочтительном варианте реализации DP глюкоолигосахарида (фрагмента)

25 составляет от 25 до 6200, предпочтительно от 30 до 700, более предпочтительно от 35 до 400.

IMMP для применения в настоящем изобретении являются по существу линейными. Другими словами, IMMP имеют низкую степень разветвления, при этом степень разветвления определяют как $((\text{количество точек разветвления } \alpha(1\rightarrow4,6))/(\text{количество остатков глюкозы})) \times 100$ %. В одном варианте реализации

30 степень разветвления составляет меньше 5 %. Предпочтительно, степень

разветвления IMMP составляет меньше 4 %, более предпочтительно меньше 3 % и еще более предпочтительно меньше 2 %. В особенно предпочтительном варианте реализации степень разветвления IMMP составляет меньше 1 %.

В конкретном варианте реализации изомальто/мальто-полисахариды (IMMP) для применения в настоящем изобретении включают линейные (то есть неразветвленные) глюкоолигосахариды общей формулы A-B, глюканы, содержащие такой линейный фрагмент, или смесь, содержащую различные глюкоолигосахариды/фрагменты общей формулы A-B, характеризующиеся тем, что (i) связь между фрагментом A и фрагментом B является $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидной связью; (ii) фрагмент A содержит по меньшей мере две последовательные $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидные связи; (iii) B содержит по меньшей мере два последовательных остатка глюкозы, связанных $\alpha(1\rightarrow4)$ гликозидной связью; и (iv) при этом содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей составляет по меньшей мере 70 %. Линейные глюкоолигосахариды общей формулы A-B являются особенно предпочтительными.

Следовательно, настоящее изобретение также относится к способу обеспечения подкисленного молочного продукта, который можно есть ложкой, включающему следующие стадии:

а) обеспечение альфа-глюкановой композиции, содержащей IMMP, содержащие линейные (то есть неразветвленные) глюко-олигосахариды общей формулы A-B, глюканы, содержащие такой линейный фрагмент, или смесь, содержащую различные глюко-олигосахариды/фрагменты общей формулы A-B, характеризующиеся тем, что (i) связь между фрагментом A и фрагментом B является $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидной связью; (ii) фрагмент A содержит по меньшей мере две последовательные $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидные связи; (iii) B содержит по меньшей мере два последовательных остатка глюкозы, связанных $\alpha(1\rightarrow4)$ связью; и (iv) при этом содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей составляет по меньшей мере 70 %;

b) добавление указанной альфа-глюкановой композиции к молочному продукту; и

c) подкисление указанного молочного продукта с указанной добавкой до pH ниже 5, предпочтительно до pH около 4,6.

Предпочтительно, фрагмент А содержит изомальто-олигосахарид с DP по меньшей мере четыре остатка глюкозы. Например, фрагмент А является изомальто-олигосахаридом, состоящим из четырех остатков глюкозы. Фрагменты А с более высоким значением DP являются предпочтительными, так как считается, что они обеспечивают IMMP меньшую склонность к расщеплению ферментами человека. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации фрагмент А имеет DP по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 25, более предпочтительно по меньшей мере 35, наиболее предпочтительно по меньшей мере 50 остатков глюкозы.

10 Фрагмент В состоит из ряда последовательных остатков глюкозы, связанных $\alpha(1\rightarrow4)$ связью. Например, фрагмент В состоит из двух, трех, четырех или пяти последовательных фрагментов глюкозы, связанных $\alpha(1\rightarrow4)$ связью.

IMMP для применения в настоящем изобретении могут быть получены путем обработки крахмального субстрата деветвящим ферментом и обработки ферментом 4,6- α -глюканотрансферазой GTFB-типа.

Ферменты 4,6- α -глюканотрансферазы GTFB-типа, подходящие для применения в изобретении, включают ферменты, которые раскрыты в WO2010/128859. Ферменты 4,6- α -глюканотрансферазы GTFB-типа расщепляют невосстанавливающий глюкозный фрагмент $(1\rightarrow4)$ - α -D-глюко-олигосахарида и присоединяет этот глюкозный фрагмент к невосстанавливающему концу другой цепи $\alpha(1\rightarrow4)$ -глюкана посредством $\alpha(1\rightarrow6)$ связи без формирования ветвей. Этот цикл повторяется, что приводит к линейному α -глюкану с последовательными $\alpha(1\rightarrow6)$ связями, которые присоединяются к $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-глюко-олигосахариду.

Фермент 4,6- α -глюканотрансфераза GTFB-типа останавливается, когда она достигает точки разветвления в субстрате-доноре глюкозы. Следовательно, существует отрицательная корреляция между степенью разветвления в крахмальном субстрате и долей $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей в IMMP продукте. Чтобы получить высокую долю $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей, полезных для настоящего изобретения, в крахмальном субстрате, возможно, потребуется устранять разветвление.

Соответственно, в одном варианте реализации IMMP с содержанием $\alpha(1 \rightarrow 6)$ связей, равным по меньшей мере 70 %, обеспечиваются (i) обеспечением крахмального субстрата; (ii) обработкой крахмального субстрата деветвящим ферментом; и (iii) обработкой крахмального субстрата с (частично) удаленными ветвями ферментом 4,6- α -глюканотрансферазой GTFB-типа. В ходе ферментативного превращения процентное содержание $\alpha(1 \rightarrow 6)$ связей постепенно увеличивается за счет $\alpha(1 \rightarrow 4)$ связей. При этом можно получать продукты с содержанием $\alpha(1 \rightarrow 6)$ связей, составляющим более 90 %, а продукты с более низким процентным содержанием $\alpha(1 \rightarrow 6)$ связей можно получать за счет сокращения времени реакции.

Следовательно, также представлен способ обеспечения подкисленного молочного продукта, который можно есть ложкой, включающий следующие стадии: а) обработка крахмального субстрата деветвящим ферментом; и обработка крахмального субстрата с (частично) удаленными ветвями ферментом 4,6- α -глюканотрансферазой GTFB-типа с обеспечением альфа-глюкановой композиции, содержащей IMMP, характеризующиеся содержанием $\alpha(1 \rightarrow 6)$ гликозидных связей по меньшей мере 70 %; б) добавление указанной альфа-глюкановой композиции к молочному продукту; и

с) подкисление указанного молочного продукта с указанной добавкой до pH ниже 5, предпочтительно до pH около 4,6.

В одном варианте реализации стадии обработки ферментами выполняют последовательно. То есть обработка крахмального субстрата с помощью деветвящего фермента может предшествовать обработке ферментом 4,6- α -глюканотрансферазой GTFB типа. Однако с промышленной точки зрения, как правило, желательно выполнять обработки ферментами одновременно. Кроме того, более высокая доля $\alpha(1 \rightarrow 6)$ связей наблюдалась, если крахмальный субстрат обрабатывали одновременно как с помощью деветвящего фермента пуллулаза, так и фермента 4,6- α -глюканотрансфераза GTFB-типа. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации IMMP получают, подвергая крахмальный субстрат одновременной обработке как деветвящим ферментом, так и ферментом 4,6- α -глюканотрансфераза GTFB-типа.

Подходящие деветвящие ферменты включают пуллуланазу (ЕС 3.2.1.41), изоамилазу (ЕС 3.2.1.68) или предельную декстриназу (3.2.1.142). В предпочтительном варианте реализации деветвящий фермент является пуллуланазой или изоамилазой, предпочтительно пуллуланазой.

5 Первые известные ферменты 4,6- α -глюканотрансферазы GTFB-типа были идентифицированы в *Lactobacillus reuteri* 121. Однако гомологи GTFB присутствуют у нескольких штаммов *Lactobacillus*. Следовательно, в одном варианте реализации 4,6- α -глюканотрансфераза GTFB-типа для применения в настоящем изобретении выбрана из группы, состоящей из GTFB из *Lactobacillus reuteri* 121, GTFB106B из
 10 *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106, GTML4 из *Lactobacillus reuteri* ML1, GTFDSM из *Lactobacillus reuteri* DSM 20016^A и GTF из *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931 или их гомологов, у которых идентичность последовательности составляет по меньшей мере 55 %, предпочтительно по меньшей мере 65 %, более предпочтительно по меньшей мере 75 %, наиболее предпочтительно по меньшей мере 85 %. В
 15 предпочтительном варианте реализации фермент 4,6- α -глюканотрансфераза GTFB-типа для применения в настоящем изобретении представляет собой GTFB из *Lactobacillus reuteri* 121.

Хотя ни деветвящие ферменты, ни ферменты 4,6- α -глюканотрансферазы GTFB-типа не вводят $\alpha(1\rightarrow4,6)$ точки разветвления, IMMP, получаемые с помощью
 20 этих ферментов, все еще могут иметь некоторое остаточное разветвление от субстрата. Однако степень разветвления IMMP всегда ниже, чем степень разветвления крахмального субстрата.

Любой природный или немодифицированный крахмал можно использовать в качестве исходного материала для получения IMMP для применения в настоящем
 25 изобретении. Например, IMMP могут быть получены из крахмалов злаков, таких как крахмалы кукурузы, пшеницы, риса, ячменя и ржи. Альтернативно, в качестве исходного материала можно использовать крахмал корнеплодных или клубневых культур, таких как крахмал тапиоки, картофеля и батата, или крахмалы бобовых культур, таких как крахмал гороха, чечевицы и бобов. В этих крахмалах
 30 соотношения амилозы к амилопектину находятся в диапазоне от 1:3 до 1:7. Однако крахмалы восковых культур с более высоким содержанием амилопектина также являются подходящими субстратами в способе согласно изобретению. Примеры

включают крахмал восковой тапиоки, восковой кукурузы, воскового картофеля, воскового риса и воскового ячменя. Кроме того, другие источники крахмала, которые можно использовать, такие как крахмалы бобов мунг, мозгового гороха и кукурузы с высоким содержанием амилозы, содержат большое количество амилозы.

Этот список ни в коем случае не является исчерпывающим, но следует понимать, что крахмалы, крахмалы с высоким содержанием амилопектина (восковые) и крахмалы с высоким содержанием амилозы из любого источника могут быть использованы в качестве исходного материала для получения IMMP для применения в настоящем изобретении. Крахмалы, используемые в качестве исходного материала, могут быть получены из вариантов растений не ГМО, а также ГМО.

Помимо природных крахмалов также можно использовать модифицированные или дериватизированные крахмалы. Многие способы дериватизации известны специалисту в данной области техники (O.B. Wurzburg, Modified starches - properties and uses, CRC Press Inc, Boca Raton US, 1986 ISBN: 0-8493-5964-3). Эти способы дериватизации включают сшивание, ферментативное расщепление, кислотное расщепление, окисление, этерификацию с образованием простых эфиров, этерификацию с образованием сложных эфиров, сухое обжаривание, декстринизацию и т. д. Кроме того, определенная физическая обработка может изменить функциональные характеристики крахмала. Например, в результате барабанной сушки, распылительной тепловой обработки и экструзии крахмал становится растворимым в холодной воде. В предпочтительном варианте реализации в качестве исходного материала для получения IMMP для применения в настоящем изобретении используют картофельный крахмал пищевого качества.

Чтобы получить подкисленный молочный продукт, который можно есть ложкой, в соответствии с настоящим изобретением, в молочный продукт добавляют IMMP. По сравнению с другими пребиотическими волокнами добавление IMMP приводит к желаемому увеличению вязкости конечного подкисленного молочного продукта. Добавка IMMP-87 в количестве 1,5 % масс. приводит к увеличению вязкости по Брукфилду йогурта термостатного способа производства почти на 10 %. Соответственно, в одном варианте реализации молочный продукт с указанной

добавкой содержит по меньшей мере около 1 % масс. IMMP. Предпочтительно, молочный продукт с указанной добавкой содержит по меньшей мере 1,5 % масс., более предпочтительно по меньшей мере 2 % масс. и наиболее предпочтительно по меньшей мере 2,5 % масс. IMMP.

- 5 Вязкость по Брукфилду полученных йогуртов или кислых молочных гелей увеличивается примерно линейно с содержанием IMMP в тестируемом диапазоне. Несмотря на то, что, конечно, возможно, более высокое содержание IMMP, на практике предполагается, что верхний предел составляет около 20 % масс., чтобы обеспечить вязкость в пределах желаемого диапазона вязкости в конечном
- 10 подкисленном молочном продукте. Для йогурта с нарушенным сгустком (англ. stirred yoghurt) вязкость, как правило, составляет в диапазоне от 5000 мПа·с до 70000 мПа·с, при этом ее измеряют с помощью прибора DV2 Brookfield, оснащенного шпинделем, вращающимся по спиральной траектории, при 10 об/мин и температуре от 4 до 6 °С. Таким образом, в одном варианте реализации к
- 15 молочному продукту добавляют от 1 % масс. до 20 % масс., предпочтительно от 1,5 % масс. до 15 % масс., более предпочтительно от 2 % масс. до 12 % масс. IMMP.

Желаемое увеличение вязкости может быть обеспечено, когда в молочный продукт добавляют от 3 % масс. до 12 % масс. IMMP. Следовательно, в особенно предпочтительном варианте реализации в молочный продукт добавляют от 3 %

20 масс. до 12 % масс., например, 3 % масс., 3,5 % масс., 4 % масс., 4,5 % масс., 5 % масс., 5,5 % масс., 6 % масс., 7 % масс., 8 % масс., 9 % масс., 10 % масс., 11 % масс. или 12 % масс. IMMP.

В качестве исходного материала для получения подкисленных молочных продуктов с добавкой IMMP, которые можно есть ложкой, в соответствии со

25 способом по изобретению можно использовать широкий спектр молочных продуктов. Например, молочный продукт может быть сырым или обработанным. Цельное (не обезжиренное), снятое (обезжиренное) или полуобезжиренное молоко подходят в качестве исходного материала. Оно может использоваться свежим или восстановленным, например, из сухого, порошкообразного молока. Сгущенное

30 молоко также можно использовать в качестве исходного материала. Молочный продукт также может быть смесью вышеперечисленных продуктов. Например,

молочный продукт включает как цельное, так и полуобезжиренное молоко, или он включает как свежее, так и восстановленное и/или сгущенное молоко.

Традиционно подкисленные молочные продукты изготавливают из молока, производимого млекопитающими. Наиболее распространенным примером такого
5 молока является коровье молоко. Другие примеры включают козье молоко, овечье молоко, буйволиное молоко и верблюжье молоко.

Совсем недавно популярность приобрели заменители молока на растительной основе. Заменители молока на растительной основе, обычно называемые растительными напитками (англ. plant drinks) или напитками на основе
10 растений (англ. plant beverages), могут быть изготовлены из зерна (например, ячменя, кукурузы, проса, овса, риса, спельты и пшеницы), псевдозлаков (например, гречихи и киноа), бобовых (например, гороха, арахиса и сои), орехов (например, миндаля, бразильского ореха, кешью, фундука, макадамии, пекана и грецкого ореха), семян (например, семян чиа, семян льна, семян конопли и семян тыквы),
15 фруктов (например, кокоса) и клубней (например, картофеля и земляного миндаля). Обычные заменители молока на растительной основе, представленные в настоящее время на рынке, включают напитки из миндаля, напитки из кокоса, напитки из овса и напитки из сои. Заменители молока на растительной основе имеют ряд преимуществ перед молоком животных. Помимо того, что они подходят
20 для вегетарианцев, заменители молока на растительной основе безопасны для употребления индивидуумами с непереносимостью лактозы, поскольку они не содержат лактозу. Более того, их воздействие на окружающую среду обычно ниже, чем у молока животных.

Хотя этот список ни в коем случае не ограничен, должно быть ясно, что
25 молочный продукт, в который будут добавлять добавку, может быть животного или растительного происхождения. Смеси из молока из разных источников также могут быть использованы в настоящем изобретении. Необязательно, в молочный продукт может быть добавлен сахар, такой как сахароза или глюкоза. В предпочтительном варианте реализации молочный продукт представляет собой животное молоко.
30 Использование коровьего молока является особенно предпочтительным.

В частности, в производстве подкисленных молочных продуктов в коммерческом масштабе продукт из (свежего) молока пастеризуют, гомогенизируют и охлаждают до начала подкисления. Соответственно, в одном варианте реализации молочный продукт для применения в настоящем изобретении
5 гомогенизируют, пастеризуют и охлаждают перед добавлением IMMP. В предпочтительном варианте реализации молочный продукт гомогенизируют, пастеризуют и охлаждают после того, как в него добавляют IMMP, но перед подкислением.

Подкисление необходимо для получения свежего вкуса и характерной
10 текстуры подкисленных молочных продуктов. Снижение pH до ниже 5, обычно до 4,6, вызывает разворачивание и агрегирование белков в молочном продукте. Например, в животном молоке мицеллы казеина будут агрегировать при подкислении, формируя жиро-казеиновую сетчатую структуру.

Таким образом, способ по изобретению включает стадию подкисления
15 молочного продукта с указанной добавкой до pH ниже 5. Эта стадия включает добавление подкисляющего агента в молочный продукт. Подкисляющим агентом может быть химический подкисляющий агент или микробный подкисляющий агент.

Химический подкисляющий агент является химическим соединением, способным постепенно или мгновенно понижать pH молочного продукта с
20 указанной добавкой. Химические подкисляющие агенты, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают подходящие пищевые кислоты и/или лактоны. Карбоновые кислоты, такие как лимонная кислота, винная кислота, уксусная кислота и молочная кислота, являются примерами подходящих пищевых кислот. Примером подходящего лактона является глюконо-дельта-лактон (GDL).

25 Следовательно, в одном варианте реализации подкисление молочного продукта с указанной добавкой включает добавление химического подкисляющего агента. Предпочтительно, химический подкисляющий агент включает подходящие пищевые кислоту и/или лактон. Например, химический подкисляющий агент включает одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из
30 уксусной кислоты, лимонной кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты, винной кислоты и глюконо-дельта-лактона. Предпочтительными

кислотами для подкисления молочного продукта с указанной добавкой являются молочная кислота и лимонная кислота.

В определенном аспекте глюконо-дельта-лактон используют для подкисления молочного продукта с указанной добавкой. Глюконо-дельта-лактон (GDL), также известный как глюконолактон, представляет собой пищевую добавку с Е номером E575, обычно используемую в качестве секвестранта, подкислителя или отверждающего, травильного или разрыхляющего агента. Он представляет собой лактон d-глюконовой кислоты. Чистый GDL - белый кристаллический порошок без запаха. GDL представлен на рынке для использования в сыре фета. GDL является нейтральным, но гидролизуется в воде до глюконовой кислоты, которая является кислой.

Фактическая концентрация химического подкисляющего агента зависит от свойств этого агента и конкретного состава молочного продукта с добавкой. Химический подкисляющий агент добавляют в достаточном количестве, чтобы уменьшить pH молочного продукта с добавкой до pH ниже 5, предпочтительно примерно до pH 4,6.

Альтернативно, для подкисления молочного продукта с указанной добавкой может быть использован микробный подкисляющий агент. Микробный подкисляющий агент является бактериальной культурой, обычно называемой стартовой культурой или инокулятом. В этом случае стадия подкисления по существу представляет собой инокулирование молочного продукта с указанной добавкой для получения инокулированного молочного продукта с указанной добавкой.

Стартовые культуры, используемые при производстве подкисленных молочных продуктов, таких как йогурт, обычно включают один или более штаммов молочнокислых бактерий. Эти молочнокислые бактерии ферментируют сахара, присутствующие в молоке, вырабатывая молочную кислоту. Существует два различных типа молочнокислых бактерий: *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Такие роды бактерий, как *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* и *Enterococcus*, принадлежат к типу *Firmicutes*, тогда как виды *Bifidobacterium* относятся к типу *Actinobacteria*. Молочнокислые бактерии, используемые для производства

подкисленных молочных продуктов, включают *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactococcus sp.*, *Streptococcus sp.* и *Pediococcus sp.* Например, йогурт обычно получают путем инокуляции молочного продукта *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Streptococcus thermophiles*.

5 В принципе, любой тип стартовой культуры, традиционно используемой при изготовлении йогурта и других полученных с применением культуры микроорганизмов подкисленных продуктов, можно использовать в настоящем изобретении. Стартовые культуры, используемые в молочной промышленности, обычно представляют собой смеси бактериальных штаммов, продуцирующих
10 молочную кислоту. Тем не менее, также можно использовать стартовые культуры одного штамма. В качестве подкисляющих агентов в способе по настоящему изобретению можно использовать стартовые культуры, в том числе коммерческие стартовые культуры, включающие один или более штаммов видов молочнокислых бактерий, выбранных из группы, состоящей из *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.*,
15 *Lactococcus sp.*, *Streptococcus sp.* и *Pediococcus sp.*

Соответственно, в одном варианте реализации подкисление молочного продукта с добавкой IMMP в способе по настоящему изобретению включает инокулирование молочного продукта по меньшей мере одним штаммом микроорганизма, продуцирующего молочную кислоту, и обеспечение
20 ферментации. Предпочтительно, микроорганизм, продуцирующий молочную кислоту, выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactococcus sp.*, *Streptococcus sp.* и *Pediococcus sp.* Более предпочтительно, он выбран из группы, состоящей из *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*.

25 Для приготовления творога для инокуляции продукта с добавкой IMMP можно использовать различные микроорганизмы. Обычно используют продуцирующие молочную кислоту микроорганизмы видов *Streptococcus lactis* и *Streptococcus cremoris*. Кроме того, *Leuconostoc mesenteroides spp cremoris* и/или *Streptococcus diacetylactis* используют для индукции вкуса. Также некоторое количество йогурта
30 или йогуртовых культур могут быть добавлены при инокуляции.

Соответственно, в другом варианте реализации продуцирующий кислоту микроорганизм выбран из группы, состоящей из *Streptococcus lactis* и *Streptococcus cremoris*, необязательно в сочетании с *Leuconostoc mesenteroides spp cremoris* и/или *Streptococcus diacetylactis*.

- 5 Часто для индукции подкисления молочного продукта используют инокуляты или стартовые культуры, содержащие несколько видов продуцирующих молочную кислоту микроорганизмов. Следовательно, в другом варианте реализации молочный продукт с добавкой IMMP инокулирован стартовой культурой, содержащей по меньшей мере два разных штамма молочнокислых бактерий.
- 10 Например, инокулят содержит *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* и *Streptococcus thermophiles*.

- После инокуляции молочный продукт с указанной добавкой выдерживают в условиях, способствующих оптимальным условиям роста для различных микроорганизмов. Это означает, что указанный продукт оставляют для
- 15 ферментации без существенного перемешивания. Типичные температуры ферментации находятся в диапазоне от примерно 30 до примерно 45 °C в течение времени от 2 до 20 часов. Начавшаяся ферментация может быть прекращена, как правило, путем охлаждения, когда смесь достигает pH приблизительно 4,6. Для творога добавляют некоторое количество сычужного фермента после инокуляции
- 20 молочного продукта микроорганизмами и перед инкубацией. Как правило, ферментация творога происходит при 20 °C в течение примерно 24 часов.

- Пробиотические свойства подкисленного молочного продукта по изобретению могут быть усилены добавлением одного или более пробиотических организмов, например, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus*
- 25 *plantarum*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* и *Streptococcus salivarius* или дрожжи *Saccharomyces boulardii*. Пробиотические микроорганизмы можно добавлять до, во время или после ферментации или
- 30 химического подкисления.

Полученный подкисленный молочный продукт может быть подвергнут дополнительной обработке. Например, его можно перемешать или отфильтровать, чтобы удалить сыворотку. Огромное разнообразие подкисленных молочных продуктов может быть получено при разном ведении процесса подкисления, включая процесс инокулирования и ферментации, а также при последующей обработке. Примеры включают йогурт, йогурт в греческом стиле, творог, скир, сырное зерно или сыр.

Предпочтительно, подкисленный молочный продукт, который можно есть ложкой, по изобретению представляет собой йогурт, йогурт в греческом стиле, йогурт с нарушенным сгустком, творог, скир, сырное зерно или зерненный творог (англ. cottage cheese). Подкисленный молочный продукт, который можно есть ложкой, с высокой вязкостью, такой как йогурт в греческом стиле или скир, особенно предпочтителен. Более предпочтительно, молочный продукт по изобретению представляет собой йогурт, такой как йогурт термостатного способа производства или йогурт с нарушенным сгустком. Наиболее предпочтительно молочный продукт по изобретению представляет собой йогурт с нарушенным сгустком.

Такой продукт далее может быть дополнен обычными пищевыми добавками, такими как натуральные или искусственные подсластители, антиоксиданты, красители, ароматизаторы, консерванты или другие функциональные ингредиенты. Добавки для использования в подкисленных молочных продуктах хорошо известны в данной области техники и, например, описаны в Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th edition, vol., 11, "Food additives", page 805-833.

Подкисленные молочные продукты обычно хранят при температурах около 2-7 °C в течение периодов от нескольких дней до нескольких недель. Хранение может негативно повлиять на текстуру и органолептические свойства. Например, считают, что синерезис, при котором сыворотка отделяется от геля молочного белка, снижает органолептическую привлекательность подкисленных молочных продуктов. Считают, что повышенная вязкость стабилизирует текстуру подкисленных молочных продуктов, тем самым подавляя или замедляя такие процессы, как синерезис.

Таким образом, в одном из вариантов реализации изобретение относится к применению по существу линейных изомальто/мальто-полисахаридов (IMMP), в которых содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей составляет по меньшей мере 70 %, при этом предпочтительно IMMP содержат линейные (т.е. неразветвленные) глюкоолигосахариды общей формулы A-B, глюкан, содержащий такой линейный фрагмент, или смесь, содержащую различные глюкоолигосахариды/фрагменты общей формулы A-B, характеризующиеся тем, что (i) связь между фрагментом A и фрагментом B представляет собой $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидную связь; (ii) фрагмент A содержит две или более последовательных $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей, при этом предпочтительно A включает изомальто-олигосахарид со степенью полимеризации, составляющей по меньшей мере 4 остатка глюкозы; (iii) B содержит по меньшей мере два последовательных остатка глюкозы, связанных $\alpha(1\rightarrow4)$ связью; для повышения вязкости подкисленного молочного продукта.

Также предложено применение таких IMMP для улучшения стабильности и/или органолептических свойств подкисленного молочного продукта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пример 1: Получение волокон IMMP

Волокна IMMP, подходящие для использования в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены путем ферментативной обработки крахмала пуллулазой (ЕС 3.2.1.41) и 4,6- α -глюканотрансферазой GTFB-типа. В этом примере было проведено сравнение между IMMP, полученными только с помощью 4,6- α -глюканотрансферазы GTFB-типа, и IMMP, полученными как с помощью пуллулазы, так и с помощью 4,6- α -глюканотрансферазы GTFB-типа. Кроме того, было проведено сравнение между IMMP, полученными либо последовательной, либо одновременной обработкой пуллулазой и 4,6- α -глюканотрансферазой GTFB-типа.

Таким образом, было проведено сравнение трех различных путей синтеза. Каждый путь начинали с желатинизации крахмала и затем следовала одна из трех обработок: (i) только ферментом 4,6- α -глюканотрансферазой GTFB-типа (GTFB); (ii) сначала расщепление разветвленной структуры (англ. debranching) с последующей

обработкой ферментом GTFB или (iii) одновременно расщепление разветвленной структуры и обработка GTFB.

Promozyme D6 (Novozymes, Партия ATN60003), коммерчески доступную пуллуланазу, использовали в качестве деветвящего фермента. Используемый фермент GTFB представлял собой усеченную версию фермента 4,6- α -глюканотрансферазы GTFB *Lactobacillus reuteri* 121, обозначенную как GTFBdNdC. Она была произведена компанией Avebe, как описано в Bai *et al.* 2015 и 2017 [4] [5].

Перед ферментативной обработкой картофельный крахмал (Avebe, партия G3771649) желатинизировали струйной варкой в водопроводной воде при массовом соотношении от 1:4 до 1:7 и температуре 160 °C в лабораторном струйном варочном аппарате Henan. Желатинизированный крахмал (5 или 10 л) выливали в предварительно нагретый стальной реакционный сосуд RVS. Добавляли CaCl₂ (Merck, партия A609182) до конечной концентрации 1 mM, температуру устанавливали равной указанной температуре и добавляли 3 M уксусную кислоту (VWR, партия 16D254124) для установления определенного pH. На этом этапе ферментативную обработку проводили одним из следующих способов:

i) установили температуру до 40 °C, доводили pH до 4,7, добавили фермент GTFB до конечной концентрации 30 тыс. единиц на кг крахмала и инкубировали в течение 43 часов. Через 43 часа реакцию останавливали путем нагревания до более 90 °C в течение 30 минут. Реакционную смесь охладили до 50-60 °C;

ii) установили температуру до 58,5 °C, доводили pH до 4,7, добавили 0,2 % масс. жидкого Promozyme D6 на кг крахмала с последующей инкубацией в течение ночи. Эту реакцию останавливали нагреванием до 80 °C (внутренняя температура) в течение 30 мин. После охлаждения до 40 °C и, при необходимости, повторного доведения pH до 4,7 добавляли 30 тыс. единиц фермента GTFB на кг крахмала. Через 26 часов инкубации реакцию останавливали нагреванием до 90 °C. Реакционную смесь охлаждали до 50-55°C;

iii) установили температуру до 40 °C, доводили pH до 4,7, добавили 23,7 тыс. единиц фермента GTFB на кг крахмала и через 15 минут добавили 0,05 % масс жидкого Promozyme D6 на кг крахмала. После инкубации в течение ночи добавили

еще 0,05 % масс. жидкого Promozyme D6 на кг крахмала. После общего времени инкубации 36 часов (или меньше для получения продуктов с более низким процентным содержанием $\alpha(1\rightarrow6)$ связей) реакцию останавливали нагреванием до температуры выше 90 °С в течение по меньшей мере 15 минут. После того как
 5 реакцию смесь охладили до 50-60 °С, ее необязательно отфильтровали, используя воронку Бюхнера с фильтровальной бумагой Whatmann.

Затем белок и соль удаляли с помощью ионного обмена, включающего добавление либо (i и ii) примерно 10 % (об./об.) смолы Amberlite MB 20 (Dow, тщательно промытой деминерализованной водой перед использованием), либо (iii)
 10 примерно 10 % (об./об.) смолы Amberlite FPA40-Cl (Dow, партия A075EAG043) и смолы Amberlite 252 (Dow, партия A075DBH033), и инкубировали в течение 45-60 мин. Смолы готовили в соответствии с инструкциями производителя. Смесь пропускали через сито с размером ячеек 45 мкм, а в случае iii также фильтровали, используя воронку Бюхнера с фильтровальной бумагой Whatmann. Добавляли
 15 раствор 4 %-ного NaOH (Merck, партия 1.06482.500) для доведения pH примерно до 6. Продукт подвергали распылительной сушке с использованием распылительной сушилки Anhydro Denmark с насадкой (Твнутр = 250 °С, Твых = 110 °С) или с колесом (Твнутр = 270 °С, Твых = 140 °С).

Количественное определение декстрозного эквивалента (DE) продукта
 20 проводили с использованием процедуры Luff-Schoorl. Содержание связей $\alpha(1\rightarrow6)$ количественно определяли с помощью ЯМР-спектроскопии. Спектры ЯМР ^1H регистрировали в D_2O при 340 К на приборе Bruker с частотой 600 МГц. Доля $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей рассчитывали путем деления аномерного сигнала $\alpha(1\rightarrow6)$ на сумму аномерных сигналов $\alpha(1\rightarrow4)$ и $\alpha(1\rightarrow6)$. Молекулярно-массовое
 25 распределение продукта анализировали с помощью GPC-RI-MALLS. Вкратце, углеводные продукты растворяли в 50 mM NaNO_3 . Образцы перед введением фильтровали (0,5 мкм). Система состояла из ВЭЖХ - Dionex Ultimate 3000, оснащенной колонкой для ГПХ (Shodex-OHpak SB-803 HQ, 8,0 x 300 мм), детектором показателя преломления (Wyatt - Optilab T-rEx 658 нм) и многоугловым
 30 детектором рассеяния лазерного излучения (Wyatt - Dawn Heleos II (18 углов). Молекулярные свойства продуктов приведены в таблице 1. ЯМР-анализ показал, что продукт, полученный путем i, имеет только 25 % $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей, в то время как продукты, полученные путями ii и iii, имеют соответственно 76 % и 87

% $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей. Кроме того, продукт, полученный по пути i, имеет гораздо более высокую молекулярную массу, чем продукты, полученные путями ii или iii.

5 Таблица 1. Влияние способа получения на молекулярные свойства IMMP-продукта.

Способ получения	Содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ связей	DE (г/100г)	Молекулярная масса (кДа)	Сокращенное название
i) только GTFB	25 %	0,7	6000 и 300 ¹	IMMP-25
ii) Пуллуланаза + GTFB, последовательно	76 %	5,8	15 ²	IMMP-76
iii) Пуллуланаза + GTFB, одновременно	87 %	9,2	10,3	IMMP-87

¹ Около 75% продукта имели молекулярную массу 6000 кДа, а около 25 % имели молекулярную массу около 300 кДа.

10 ² Большая часть продукта имела молекулярную массу 15 кДа, но присутствовала небольшая фракция со значительно более высокой молекулярной массой.

15 Как показано в таблице 1, IMMP, полученные при обработке только ферментом GTFB-типа, имеют значительно более низкое содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ связей, чем IMMP, полученные с использованием как пуллуланы, так и фермента GTFB-типа. Это указывает на то, что расщепление разветвленной структуры необходимо для получения высокого (> 70 %) содержания $\alpha(1\rightarrow6)$ связей.

IMMP, полученные последовательной и одновременной обработкой обоими ферментами, имели очень близкие свойства. Таким образом, IMMP, пригодные для использования в способе по настоящему изобретению, могут быть получены либо

одновременной, либо последовательной обработкой крахмала деветвящим ферментом и ферментом 4,6- α -глюканотрансферазой GTFB-типа.

Пример 2: Влияние содержания $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей в IMMP на вязкость йогурта

5 В этом примере оценивали влияние содержания $\alpha(1\rightarrow6)$ связей в волокнах IMMP на вязкость йогурта.

Йогурты, содержащие 3 % масс. полученных в Примере 1 различных IMMP, и в соответствии с рецептурами, приведенными в Таблице 2, готовили следующим образом. Сначала готовили 10 % исходный раствор стартовой культуры путем
10 нагревания 90 г молока до 40-50 °C в стерильном стакане и растворения 10 г культуры Delvo (DSM, партия FVV-221). Для йогуртовой смеси на 800 г перед ферментацией необходимо добавить 1,6 мл стартовой культуры.

Молоко и воду взвешивали и добавляли в стакан Thermomix, температура в котором была установлена на 40 °C, и перемешивали. Добавляли сухое
15 обезжиренное молоко (SMP) и IMMP (углевод) и гидратировали в течение 10 минут при 40 °C. Затем смесь предварительно нагревали до 65 °C в течение 30 секунд и гомогенизировали при 150/50 бар. Затем ее пастеризовали в течение 5 минут при 85 °C и охлаждали до 40 °C. Добавляли исходный раствор стартовой культуры (1,6 мл на 800 г молочной смеси) и смесь инкубировали в том же стакане на водяной
20 бане при 32 °C для проведения ферментации. После ферментации йогурты охлаждали до 8-10 °C, гомогенизировали с помощью IKA magic при 3000 об/мин, расфасовывали в стерильные пластиковые контейнеры и помещали в холодильник при 4-6 °C.

Таблица 2. Рецептуры йогурта

	Без волокон	IMMP-87	IMMP-25
Ингредиент	г	г	г
Обезжиренное молоко	500	500	500

40% сливки	75	75	75
SMP (Elk, Campina)	60	60	60
IMMP волокна	0	30	30
Питьевая вода	365	335	335
Всего	1000	1000	1000

Вязкость указанных йогуртов измеряли с использованием модульного компактного реометра Anton PAAR, MCR302 SN81328338 и SN81464746, чашечного шпинделя CC27 SN23477 и SN32606. Температура была установлена 10 °С. После помещения образца в реометр его оставляли на период ожидания 300 с для обеспечения восстановления пространственной структуры. Затем приложили постоянную скорость сдвига 10 с⁻¹ в течение двух минут. Вязкость в начале и в конце 2-минутного измерения представлена в таблице 3.

Таблица 3. Вязкость йогуртов с течением времени

	3 дня при 4°C, мПа·с		5 дней при 4°C, мПа·с		14 дней при 4°C, мПа·с	
Образец	начало	конец	начало	конец	начало	конец
Без IMMP	1993	1394	2093	1480	2237	1547
IMMP-25	1882	1577	1981	1631	2124	1830
IMMP-87	2626	1959	2825	1974	3156	2168

Как видно из таблицы 3, добавление IMMP-25, характеризующегося содержанием $\alpha(1\rightarrow6)$ связей 25 %, оказывало лишь незначительное влияние на вязкость йогурта, несмотря на его высокую молекулярную массу. Напротив, при

добавлении IMMP-87, содержащего 87 % $\alpha(1\rightarrow6)$ связей, получили йогурт со значительно повышенной вязкостью.

Таким образом, этот пример показывает, что высокое содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ связей имеет важное значение для получения желаемого увеличения вязкости. См. ниже также пример 7, демонстрирующий, что добавление IMMP, в котором содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ связей составляет 70 % или более, оказывает желаемый эффект на йогурт.

Пример 3: Сравнение между IMMP и другими медленно усваиваемыми и/или пребиотическими волокнами

В этом примере волокна IMMP, содержащие 87 % или 96 % $\alpha(1\rightarrow6)$ связей, сравнивали с типичными пребиотическими или медленно усваиваемыми волокнами Frutafit® TEX! и VitaFiber™ в отношении их влияния на вязкость йогурта. Frutafit® TEX! – это растворимое пребиотическое волокно инулинового типа с питательными и функциональными свойствами. Оно представляет собой порошкообразный пищевой ингредиент на основе инулина, полученного из цикория, очень высокой степени чистоты, разработанный для улучшения текстуры и вкусовых ощущений в различных пищевых применениях. Инулин, полученный из цикория, представляет собой полидисперсную смесь линейных полимеров фруктозы, в основном с концевым звеном глюкозы, связанных посредством $\beta(2\rightarrow1)$ связей. Количество звеньев (степень полимеризации) может варьироваться от 2 до 60. Frutafit® TEX! состоит более чем на 99,5 % из олигофруктозы/инулина. VitaFiber™ — это изомальтоолигосахарид, полученный из крахмального источника, не являющегося ГМО и не содержащего кукурузу. VitaFiber™ представляет собой смесь разветвленных олигосахаридов, содержащих 50/50 $\alpha(1\rightarrow4)$ и $\alpha(1\rightarrow6)$ связи, он хорошо растворяется и его применяют в качестве низкокалорийного подсластителя, и он считается неусваиваемым в тонком кишечнике.

Таблица 4. Рецепт йогурта

Тип волокна:	Без волокна	IMMP-87	IMMP-96	Frutafit®TEX!	VitaFiber™

Влажность волокна			6,5%		8,7%		5,7%		4,4%	
Ингредиенты	%	г	%	г	%	г	%	г	%	г
Цельное молоко	87	870	87	870	87	635	87	870	87	870
Сухое обезжиренное молоко	3	30	3	30	3	22	3	30	3	30
Волокно	0	0	3	32,1	3	24,0	3	31,8	3	31,4
Вода	10	100	7	67,9	7	45,6	7	68,2	7	68,6
Всего	100	1000	100	1000	100	730	100	1000	100	1000

Йогурты были приготовлены в соответствии с рецептурами, приведенными в Таблице 4. Все рецептуры содержат около 3 % масс. жира и 4 % масс. белка. Йогурты готовили в соответствии с процедурой, описанной в Примере 2. Следует
5 обратить внимание, что измеренное содержание влаги в углеводах использовали для корректировки количества углеводов таким образом, чтобы каждый йогурт (за исключением отрицательного контроля) содержал 3 % углеводов в пересчете на сухое вещество. Все рецептуры были приготовлены в двух повторностях, за исключением йогурта с IMMP-96, в котором содержание $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -связей составляет
10 96 % и который был получен по способу (iii) примера 1.

Вязкость йогуртов измеряли после ферментации на 7-й день с использованием модульного компактного реометра Anton Paar, MCR302 SN81328338 и SN81464746, чашечного шпинделя CC27 SN23477 и SN32606. Температура была установлена на 10 °C. После помещения образца в реометр
15 измерения начинали с 300-секундным периодом ожидания, чтобы обеспечить восстановление пространственной структуры. Скорость сдвига была установлена на линейное увеличение от 0,01 до 100 с⁻¹ при частоте 1 Гц, а затем на линейное уменьшение от скорости сдвига 100 до 0,01 с⁻¹ при частоте 1 Гц. Измерение заняло 1 час на образец. Для определения вязкости использовали 2 точки измерения.
20 Точка 3 при 6,26 Гц при увеличении скорости сдвига от 0,01 до 100 с⁻¹ (вверх) и

точка 31 при 6,26 Гц при уменьшении скорости сдвига от 100 до 0,01 с⁻¹ (вниз).
Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Вязкость йогурта (мПа·с) после 7 дней ферментации

	ВВЕРХ	ВНИЗ
Без волокна	2600	1300
VitaFiber	2800	1400
Frutafit TEX!	2700	1400
IMMP-87	4450	2700
IMMP-96	4200	2500

- 5 Вязкость йогурта, содержащего 3 % масс. волокна IMMP, была примерно в 2
раза выше, чем вязкость йогурта, не содержащего какого-либо волокна. Этот
эффект был несколько более выражен для IMMP-87, чем для IMMP-96. Напротив,
добавление 3 % масс. волокон VitaFiber или Frutafit TEX! не оказывало
значительного влияния на вязкость йогурта по сравнению с йогуртом, не
10 содержащим растворимых волокон.

Пример 4: Влияние концентрации IMMP на вязкость йогурта

- В этом примере оценивали влияние добавления IMMP, в котором
содержание $\alpha(1 \rightarrow 6)$ связей составляло около 87 %, на вязкость йогурта в диапазоне
15 концентраций IMMP.

- Йогурты были подготовлены следующим образом. Свежее молоко
взвешивали и добавляли в Thermomix. Сухие ингредиенты добавляли аккуратно,
чтобы предотвратить образование комков и разбрызгивания. Смесь нагревали до
40 °C и перемешивали со скоростью 3 в течение 10 минут для гидратации. После
20 гидратации смесь нагревали до 85 °C в течение 5 минут, а затем охладили до 40 °C
в стакане из нержавеющей стали. Исходный раствор стартовой культуры

добавляли аналогично, как в примере 2, и смесь перенесли в контейнеры и оставили ферментироваться в термостате при 30 °С в течение 1 ночи. После ферментации рН был ниже 4,6. Чтобы получить йогурты с нарушенным сгустком, йогурт гомогенизировали с помощью IKA Magic при 3000 об/мин, расфасовали в
 5 контейнеры и хранили в холодильнике. Йогурты термостатного способа производства хранили в холодильнике после ферментации без гомогенизации. Количества и источники ингредиентов указаны в таблице 6. Использовали стартовую культуру Delvo (DSM, партия FVV-221).

Таблица 6. Ингредиенты, используемые для приготовления йогурта с
 10 различными количествами IMMP-87

	Концентрация IMMP-87 (масс./масс.) (Содержание влаги 6,5 %)			
Ингредиенты (г)	0	1,5 %	3 %	6 %
Цельное молоко (супермаркет Jumbo)	870	870	870	870
Сухое обезжиренное молоко (Friesland Campina, партия L112758)	30	30	30	30
GTFB-87% (Avebe, партия HL190510)	0	15,8	31,6	63,3
Вода	100,0	84,2	68,4	36,7
Всего	1000	1000	1000	1000

Вязкость по Брукфилду измеряли через 1, 7 и 14 дней при температуре в холодильнике от 4 до 6 °С с использованием DV2 Brookfield со шпинделем, вращающимся по спиральной траектории, при 10 об/мин. Результаты суммированы
 15 в таблицах 7а и 7b для йогуртов термостатного способа производства и с нарушенным сгустком, соответственно.

Таблица 7а. Зависимость вязкости по Брукфилду (мПа·с) йогуртов термостатного способа производства от концентрации IMMP-87

IMMP-87	0 %	1,5 %	3 %	6 %
время				
24 ч	84300	89200	92200	100600
7 дней	83400	91600	96400	100200
14 дней	74200	90800	96200	108400

Таблица 7б. Зависимость вязкости по Брукфилду (мПа·с) йогуртов с 5 нарушенным сгустком от концентрации IMMP-87

IMMP-87	0 %	1,50 %	3 %	6 %
время				
24 ч	12300	13800	15900	18800
7 дней	17400	-	-	25600
14 дней	16400	21300	19900	24500

Из таблиц 7а и 7б можно сделать вывод, что в указанном диапазоне концентраций добавка IMMP-87 увеличивала вязкость как йогуртов термостатного способа, так и йогуртов с нарушенным сгустком. Для йогуртов термостатного 10 способа этот эффект был особенно заметен при хранении в течение 7 или 14 дней. Увеличение вязкости йогурта зависело от концентрации IMMP, причем более высокие концентрации обеспечивают более высокую вязкость.

Пример 5: Сравнение между IMMP и другими медленно усваиваемыми и/или пребиотическими волокнами

В этом примере волокна IMMP, содержащие 96 % $\alpha(1\rightarrow6)$ связей, сравнивали с типичными волокнами Frutafit® Tex!, Frutafit® HD, Orafit® P95 и Vitafiber™ в отношении их влияния на вязкость по Брукфилду и на динамический модуль упругости G' химически подкисленных молочных гелей.

Кислые молочные гели готовили следующим образом. Исходный раствор из сухого обезжиренного молока готовили путем растворения 290 г сухого обезжиренного молока (Elk, Friesland Campina) в 710 мл деминерализованной воды.

10 Растворы модельного ультрафильтрата молока SMUF и SMUF* готовили по рецептурам, приведенным в таблице 8а. Готовили исходный раствор, содержащий 30 % масс. волокна, в растворе SMUF*, содержащий либо IMMP-96, Frutafit® TEX!, Frutafit® HD, Orafit® P95 или VitaFiber™ с учетом содержания влаги в этих волокнах.

15 100 мл растворов кислого молочного геля готовили путем смешивания трех исходных растворов при температуре 30 °C и добавления глюконо-дельта-лактона в соответствии с рецептурой, приведенной в таблице 8b. После 17 часов инкубации кислые молочные гели разлили в пластиковые 50-граммовые емкости и хранили при 4 °C в течение 7 дней.

Таблица 8а. Рецептуры растворов модельного ультрафильтрата молока (SMUF и SMUF*)

	SMUF	SMUF*
Дигидрофосфат калия	3,16 г	3,16 г
Цитрат калия трехосновный	2,40 г	2,40г
Цитрат натрия дегидрат	3,58 г	3,58 г
Сульфат калия	0,36 г	0,36 г
Карбонат калия	0,60 г	0,60 г
Хлорид калия	1,2 г	1,2 г
Хлорид кальция дигидрат	2,64 г	
Хлорид магния гексагидрат	1,30 г	
Деминерализованная вода	2 л	1,96 л

Таблица 8b. Рецептатура кислых молочных гелей, содержащих 6 % масс. волокон

Исходный раствор из сухого обезжиренного молока (г)	25,57
Исходный раствор волокон (г)	20
SMUF (г)	53,33
Глюконо-дельта-лактон (г)	1,1

Через 7 дней измеряли вязкость по Брукфилду и динамический модуль упругости полученных кислых молочных гелей.

Измерения вязкости по Брукфилду выполняли с помощью измерителя вязкости LVDVI+ и LVDV II+ от компании Brookfield. Измерения выполняли с помощью шпинделей LV 2 и 3 (S62/S63) при 6 об/мин в течение 30 секунд. Среднее значение, полученное в течение этих 30 секунд, считается вязкостью в мПа·с.

Динамический модуль упругости G' измеряли с использованием модульных компактных реометров MCR 302 SN81328338 и SN81464746 с чашечным шпинделем CC27 SN23477 и SN32606 от компании Anton Paar. Перед измерением раствор перемешивали в течение 60 секунд со скоростью 300 с^{-1} . Затем были проведены измерения с контролируемым напряжением во времени (одно измерение каждую минуту) при частоте 1 Гц с использованием деформации 1 % в течение 17 часов. Температура была установлена на 30°C на протяжении всего эксперимента. Перед началом измерений образцы покрывали парафиновым маслом для предотвращения испарения. Результаты этих измерений представлены в таблице 9.

Таблица 9. Вязкость по Брукфилду (мПа·с) и динамический модуль упругости G' кислых молочных гелей, содержащих 6 % масс. волокон.

	Вязкость по Брукфилду (мПа·с)	Динамический модуль упругости
Без волокон	2300	110
Frutafit® HD	3800	170

Vitafiber™	2450	135
Orafti® P95	2950	135
Frutafit® TEX!	3850	175
IMMP-96	5500	320

И вязкость по Брукфилду, и динамический модуль упругости кислого молочного геля с добавкой 6 % IMMP-96 были значительно повышены (соответственно с коэффициентами 2,4 и 2,9). Добавление 6 % масс. любых других волокон не привело к значительному увеличению ни вязкости по Брукфилду, ни динамического модуля упругости.

Пример 6: Влияние концентрации IMMP на вязкость кислых молочных гелей

В этом примере оценивали влияние концентрации волокон IMMP, содержащих примерно 96 % $\alpha(1 \rightarrow 6)$ связей, на вязкость химически подкисленных кислых молочных гелей.

Кислые молочные гели готовили, как описано в Примере 5, следуя рецептурам, приведенным в Таблице 10.

Таблица 10. Рецептуры кислых молочных гелей с различными концентрациями IMMP-96

IMMP-96	0 %	1,5 %	3 %	6 %	12 %
Исходный раствор из сухого обезжиренного молока (г)	25,57	25,57	25,57	25,57	25,57
Исходный раствор IMMP-96 (г)	0	5	10	20	40

SMUF (г)	73,33	68,33	63,33	53,33	33,33
Глюконо- дельта-лактон	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1

После хранения в течение 7 дней при 4 °С измеряли вязкость по Брукфилду и динамический модуль упругости G' полученных кислых молочных гелей, как описано в примере 5. Результаты приведены в таблице 11.

- 5 Таблица 11. Зависимость вязкости по Брукфилду (мПа·с) и динамического модуля упругости G' кислых молочных гелей от концентрации IMMP-96

IMMP-96	0 %	1.5 %	3 %	6 %	12 %
Вязкость по Брукфилду (мПа·с)	2300	3100	3800	5500	9150
Динамический модуль упругости	110	130	220	320	430

- 10 Эти результаты показывают, что добавление IMMP-96 к кислым молочным гелям приводит к более высокому динамическому модулю упругости и более высокой вязкости в диапазоне концентраций. Оба этих свойства, по-видимому, имеют примерно линейную зависимость от концентрации IMMP-96 в измеренном диапазоне.

Пример 7: Влияние содержания $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей в IMMP на вязкость йогурта

- 15 IMMP с различным содержанием $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей были получены в соответствии с процедурой, описанной в примере 1 (iii). После завершения реакции через 36 часов были получены IMMP с содержанием $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей 87 % (IMMP-87). Отбирая образцы раньше по времени, были получены IMMP с содержанием $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей 70 % или 77 % (IMMP-70 и IMMP-77,
20 соответственно).

Чтобы оценить влияние IMMP на вязкость йогурта, были приготовлены йогурты с нарушенным сгустком, как это описано в примере 4. Количество волокон IMMP было скорректировано с учетом их влажности (сод.вл.). Вязкость по Брукфилду измеряли после 7 и 14 дней хранения при такой же температуре, как и при хранении в холодильнике, от 4 до 6 °C с использованием DV2 Brookfield со шпинделем Helipath при 10 об/мин.

Результаты в таблице 12 показывают, что добавление IMMP, имеющих по меньшей мере 70 % $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей, увеличивает вязкость йогурта с нарушенным сгустком. Увеличение вязкости прямо пропорционально содержанию $\alpha(1\rightarrow6)$ и концентрации IMMP.

Таблица 12: Рецептуры йогурта (A) и вязкость по Брукфилду (B), полученная с использованием IMMP, содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей в которых составляет 87, 77 или 69 %

		IMMP-87		IMMP-77		IMMP-70	
		конц. масс./масс.		конц. масс./масс.		конц. масс./масс.	
Ингредиенты (г)	0 %	3 %	6 %	3 %	6 %	3 %	6 %
Цельное молоко (супермаркет Jumbo)	870	870	870	870	870	870	870
Сухое обезжиренное молоко (Friesland Campina)	30	30	30	30	30	30	30

IMMP-87 (Avebe, 6,7 % влажность)	0	32,2	35,7				
IMMP-77 (Avebe, 8,1 % влажность)	0			32,6	65,3		
IMMP-70 (Avebe, 3,7 % влажность)	0					31,3	62,3
Вода	100	67,8	35,7	67,4	34,7	68,7	37,7
Всего	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

В		IMMP-87		IMMP-77		IMMP-70	
Время хранения	0 %	3 %	6 %	3 %	6 %	3 %	6 %
7 дней	17000	21300	24100	18100	20100	17400	18600
14 дней	17400	21900	27500	20100	23600	19400	20900

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] S. e. a. Mende, „Concentration dependent effects of dextran on the physical properties of acid milk gels”, *Carb. Pol.*, vol. 98, pp. 1389-1396, 2013.

[2] D. H. S. a. L. J. Pachekrepapol, „Effect of dextran and dextran sulfate on the structural and rheological properties of model acid milk gels,” *J. Dairy Sci.*, Vols. %1 van % 2843-2852, p. 98, 2015.

[3] H. Leemhuis, J. Dobruchowska, M. Ebbelaar, F. Faber, P. Buwalda, M. van der Maarel, J. Kamerling en L. Dijkhuizen, „Isomalto/malto-polysaccharide, a novel soluble dietary fiber made via enzymatic conversion of starch,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, pp. 12034-12044, 2014.

[4] Y. Bai, R. van der Kraaij, A. Woortman, Z. Jin en L. Dijkhuizen, „Characterization of the 4,6- α -glucanotransferase GTFB enzyme of *Lactobacillus reuteri* 121 isolated from inclusion bodies,” *BMC Biotechnology*, p. 15:49, 2015.

[5] Y. Bai, J. Gangoiti, B. Dijkstra, L. Dijkhuizen en T. Pijning, „Crystal structure of 4,6- α -glucanotransferase supports diet-driven evolution of GH70 enzymes from α -amylases in oral bacteria”, *Structure*, vol. 25, pp. 231-242, 2017.

Формула изобретения

1. Способ обеспечения подкисленного молочного продукта, который можно есть ложкой, включающий следующие стадии:

5 а) обеспечение альфа-глюкановой композиции, содержащей по существу линейные изомальто/мальто-полисахариды (IMMP), характеризующиеся содержанием $\alpha(1 \rightarrow 6)$ гликозидных связей по меньшей мере 70 %;

 б) добавление указанной альфа-глюкановой композиции к молочному продукту; и

10 с) подкисление указанного молочного продукта с указанной добавкой до pH ниже 5, предпочтительно до pH около 4,6.

2. Способ по п. 1, в котором указанный молочный продукт выбран из группы, состоящей из свежего молока, обезжиренного молока, восстановленного сухого молока млекопитающих.

15 3. Способ по любому из п.п. 1 или 2, в котором указанный молочный продукт с указанной добавкой содержит по меньшей мере 1,5 % масс., предпочтительно по меньшей мере 3 % масс. IMMP, более предпочтительно содержание IMMP находится в диапазоне от 3 до 12 % масс.

20 4. Способ по любому из п.п. 1-3, в котором стадия с) включает следующие стадии:

 (с1) инокуляцию указанного молочного продукта с добавкой по меньшей мере одним микроорганизмом, продуцирующим молочную кислоту, предпочтительно выбранным из группы, состоящей из *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactococcus sp.*, *Streptococcus sp.* и *Pediococcus sp.*, более предпочтительно выбранным из
25 группы, состоящей из *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*; и

 (с2) обеспечение ферментации.

5. Способ по любому из п.п.1-3, в котором стадия с) включает добавление определенного количества химического подкисляющего агента к указанному молочному продукту с указанной добавкой для получения конечного рН ниже 5, при этом предпочтительно химический подкисляющий агент представляет собой агент, включающий одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из уксусной кислоты, лимонной кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты, винной кислоты и глюконо-дельта-лактона, при этом более предпочтительно химический подкисляющий агент представляет собой глюконо-дельта-лактон.

6. Применение альфа-глюкановой композиции, содержащей по существу линейные изомальто/мальто-полисахариды (IMMP), характеризующиеся содержанием $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей по меньшей мере 70 %, для повышения вязкости, стабильности и/или органолептических свойств подкисленного молочного продукта.

7. Способ по любому из п.п.1-5 или применение по п.6, в которых альфа-глюкановая композиция содержит IMMP с содержанием $\alpha(1\rightarrow6)$ связей по меньшей мере 70 %, при этом IMMP являются линейными (т.е. неразветвленными) глюко-олигосахаридами общей формулы А-В, глюканами, содержащими такой линейный фрагмент, или смесью, содержащей различные глюко-олигосахариды/фрагменты общей формулы А-В, где

(i) связь между фрагментом А и фрагментом В является $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидной связью;

(ii) фрагмент А содержит по меньшей мере две последовательные $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидные связи, при этом предпочтительно фрагмент А содержит изомальтоолигосахарид со степенью полимеризации, составляющей по меньшей мере четыре остатка глюкозы;

(iii) фрагмент В содержит по меньшей мере две последовательные $\alpha(1\rightarrow4)$ гликозидные связи.

8. Способ или применение по любому из п.п.1-7, в которых указанную альфа-глюкановую композицию получают путем обработки крахмального субстрата

деветвящим ферментом и путем обработки 4,6- α -глюканотрансферазой GTFB-типа, при этом предпочтительно указанные обработки выполняют одновременно.

9. Способ или применение по п.8, в которых деветвящий фермент представляет собой изо-амилазу (ЕС 3.2.1.68) или пуллулазу (ЕС 3.2.1.41), при этом предпочтительно деветвящий фермент представляет собой пуллулазу.

10. Способ или применение по п.8 или 9, в которых 4,6- α -глюканотрансфераза GTFB-типа представляет собой GTFB из *Lactobacillus reuteri* 121.

11. Способ или применение по любому из п.п.8-10, в которых указанный крахмальный субстрат выбран из группы, состоящей из крахмалов злаков, таких как крахмалы кукурузы, пшеницы, риса, ячменя или ржи, крахмалов корнеплодных или клубневых культур, таких как крахмал тапиоки, сладкого картофеля, маранта и картофеля, и крахмалов бобовых, таких как крахмалы гороха и бобов.

12. Способ или применение по любому из п.п.1-11, в которых вязкость по Брукфилду подкисленного молочного продукта находится в диапазоне от 5000 мПа·с до 70000 мПа·с.

13. Способ или применение по любому из п.п.1-12, в которых указанный подкисленный молочный продукт представляет собой йогурт, йогурт в греческом стиле, творог, скир, сырное зерно или сыр, предпочтительно йогурт.

14. Способ или применение по любому из п.п.1-13, в которых указанный подкисленный молочный продукт содержит по меньшей мере 1,5 % масс., предпочтительно по меньшей мере 3 % масс. IMMP, при этом предпочтительно содержание IMMP находится в диапазоне от 3 до 12 % масс.

15. Подкисленный молочный продукт, который можно есть ложкой, получаемый способом по любому из п.п.1-5 или 7-14.

16. Подкисленный молочный продукт, который можно есть ложкой, содержащий по меньшей мере 1,5 % масс., предпочтительно по меньшей мере 3 % масс. по существу линейных изомальто/мальто-полисахаридов (IMMP), в которых содержание $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей составляет по меньшей мере 70 %.

17. Подкисленный молочный продукт, который можно есть ложкой, по п.16, в котором IMMP содержат линейные (т.е. неразветвленные) глюко-олигосахариды общей формулы А-В, глюканы, содержащие такой линейный фрагмент, или смесь, содержащую различные глюко-олигосахариды/фрагменты общей формулы А-В, в которой

(i) связь между фрагментом А и фрагментом В представляет собой $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидную связь;

(ii) фрагмент А содержит две или более последовательных $\alpha(1\rightarrow6)$ гликозидных связей, при этом А предпочтительно содержит изомальтоолигосахарид со степенью полимеризации, составляющей по меньшей мере 4 остатка глюкозы;

(iii) В содержит по меньшей мере два последовательных остатка глюкозы, связанных $\alpha(1\rightarrow4)$ связью.

18. Подкисленный молочный продукт, который можно есть ложкой, по п.16 или 17, имеющий вязкость по Брукфилду в диапазоне от 5000 мПа·с до 70000 мПа·с.

19. Подкисленный молочный продукт, который можно есть ложкой, по любому из п.п.16-18, представляющий собой йогурт, йогурт в греческом стиле, творог, скир, сырное зерно или сыр, предпочтительно йогурт.