

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292961 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.03(22) Дата подачи заявки
2021.05.31(51) Int. Cl. A23C 9/123 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)(54) КОМПОЗИЦИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

(31) 20177299.3

(32) 2020.05.29

(33) EP

(86) PCT/EP2021/064542

(87) WO 2021/240015 2021.12.02

(71) Заявитель:

КР. ХАНСЕН А/С (DK); КОМПАНИ
ЖЕРВЭ ДАНОН (FR)

(72) Изобретатель:

Колсон Бенуа (FR), Блох Соня,
Бухгорн Гелле Леттир, Кристенсен
Нанна (DK), Сусе Мари-Агнес,
Маршал Лоран, Деспьерри Анна,
Ларрер Фанни (FR)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к композиции для получения ферментированного молочного продукта, содержащей (i) заквасочную культуру, содержащую глюкозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus* (St) и глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb); и (ii) глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (St), причём указанный штамм St является галактозоферментирующим и содержит мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназы, причём указанная мутация инактивирует белок глюкокиназы или оказывает негативное влияние на экспрессию указанного гена.

A1

202292961

202292961

A1

КОМПОЗИЦИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

- 5 Настоящее изобретение относится к композиции и способам получения ферментированного молочного продукта, такого как, например, йогурт. В частности, изобретение относится к композиции и способам для уменьшения последующего закисления.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

- 10 Большинство современных способов получения ферментированных молочных продуктов можно охарактеризовать следующими этапами:

(а) молочный субстрат ферментируют путем добавления заквасочной культуры, содержащей молочнокислые бактерии (lactic acid bacteria, LAB), способные метаболизировать глюкозу, полученную из лактозы, присутствующей в молоке;

- 15 (b) во время ферментации LAB метаболизировать глюкозу и продуцируют молочную кислоту (закисление), что вызывает снижение pH от первоначального диапазона от 6,4 до 6,8 (для коровьего молока) до диапазона pH между 3,8 и 4,7;

- (с) как только указанный ферментированный продукт достиг желаемого значения pH, ферментацию прекращают путем быстрого охлаждения ферментированного молочного
20 продукта.

Указанный способ применяют, например, для получения йогурта и йогуртовых напитков.

Без охлаждения молочного продукта для прекращения ферментации процесс продолжался бы и вызывал дальнейшее закисление продукта после достижения целевого значения pH, т.е. последующее закисление.

- 25 Одним из недостатков быстрого охлаждения является то, что оно приводит к потере текстуры продукта. Поэтому желательно исключить стадию быстрого охлаждения, что, кроме того, позволит обойтись без данной отдельной операции и, таким образом, снизит производственные затраты.

- Тем не менее, несмотря на наличие стадии быстрого охлаждения в способах получения
30 ферментированных молочных продуктов, всё же наблюдается последующее закисление,

т.е. продукция молочной кислоты бактериями LAB после прекращения ферментации при желаемом pH. Считается, что последующее закисление представляет собой одну из наиболее важных проблем при осуществлении способов получения ферментированных молочных продуктов. Дальнейшее снижение значения pH при хранении (включая
5 обработку, упаковку, транспортировку и хранение) ферментированного молочного продукта приводит к проблемам с повышенной кислотностью и уменьшенным сроком хранения.

Таким образом, последующее закисление также оказывает негативное влияние на срок хранения йогурта. Срок хранения йогурта варьирует от 30 до 50 дней в зависимости от
10 страны. В течение этого времени последующее закисление изменяет качество йогурта, вызывая прокисание продукта (изменение вкуса) и высокое отделение сыворотки (изменение текстуры). Обычно качество йогурта сохраняют настолько, насколько это возможно, поддерживая при хранении продукта температуру от 4° С до 8° С. При такой температуре бактерии будут обладать лишь низкой активностью. Однако во многих странах
15 трудно поддерживать холодовую цепь при хранении.

Как следствие, производство йогурта с увеличенным сроком хранения (ESL-йогурт, ESL - Extended Shelf Life) представляет большой интерес, особенно в странах, где трудно поддерживать холодовую цепь. Известные в данной области техники способы получения
20 ESL-йогурта включают стадию тепловой обработки (обычно 65°С в течение 30 с) после ферментации. Обработка вызывает значительное снижение количества бактерий, используемых для ферментации, а также количества дрожжей и плесневых грибов. Стадия нагревания также ингибирует активность ферментов, присутствующих в йогурте. Как следствие, продукт может получать увеличенный вплоть до 9 месяцев срок хранения, при этом не наблюдается или наблюдается незначительное последующее закисление и
25 изменения в послевкусии.

Однако термическая обработка оказывает негативное влияние на качество йогурта и приводит к изменению вкуса и текстуры. Еще одним негативным эффектом термической обработки является то, что польза для здоровья, получаемая от присутствия живых бактерий, таких как пробиотики, уменьшается или теряется.

Один из подходов к контролю последующего закисления заключается в производстве молочных продуктов с относительно кислым pH. В этих способах дальнейший рост LAB и продуцирование молочной кислоты ингибируется кислым pH. Однако дальнейшее
30 продуцирование молочной кислоты только ингибируется, а не прекращается полностью, и

способ, очевидно, не подходит для получения ферментированных молочных продуктов с мягким вкусом.

Предполагалось, что последующее закисление контролируется метаболической активностью *L. bulgaricus* и вызвано поглощением пептидов, для контроля последующего закисления были получены штаммы с дефицитом в метаболизме аминокислот (US2010/0021586 и W02006/042862A1). Другие подходы к контролю последующего закисления были описаны в предшествующем уровне техники и включают процессы, основанные на применении специфических штаммов LAB, характеризующихся слабой активностью последующего закисления (WO2010/139765).

Альтернативный подход к минимизации последующего закисления основан на контроле соотношения белка к лактозе, контроле буферной ёмкости и поддержании буферной ёмкости и pH в заданном диапазоне значений в процессе ферментации (WO2013/169205). Однако указанный подход требует определения ряда технологических параметров в процессе ферментации и может потребоваться добавление белков или лактозы, или буфера к ферментационной среде, чтобы обеспечить поддержание заданных диапазонов значений в процессе ферментации.

В WO2013/160413 описаны штаммы *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, обладающие улучшенными свойствами для естественного подслащивания пищевых продуктов и для снижения содержания лактозы в ферментированном молоке, и способ скрининга и выделения таких штаммов.

В WO2015/193459 описан способ получения ферментированного молочного продукта с пониженным уровнем последующего закисления, полученного путём истощения лактозы, содержащейся в молочной основе, в процессе ферментации, что приводит к отсутствию роста или к очень незначительному росту заквасочной культуры в процессе последующего хранения. В одном из вариантов осуществления применяют смесь четырех штаммов молочнокислых бактерий с дефицитом в метаболизме глюкозы, а в другом варианте осуществления применяют смесь штаммов лактозодефицитных молочнокислых бактерий.

Целью настоящего изобретения является обеспечение композиции для получения ферментированного молочного продукта со сниженным последующим закислением.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Указанная цель достигается с помощью настоящего изобретения, которое относится к композиции для получения ферментированного молочного продукта, содержащей:

(i) заквасочную культуру, содержащую глюкозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus* (St) и глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Lb); и

(ii) глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (St), при этом указанный штамм St является галактозоферментирующим и содержит мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназы, причём указанная мутация инактивирует белок глюкокиназы или оказывает негативное влияние на экспрессию гена.

Хорошо известно, что для традиционных заквасочных культур для получения ферментированных молочных продуктов, содержащих традиционный штамм *Streptococcus thermophilus* и традиционный штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, существует риск последующего закисления в процессе хранения, т.е. с момента окончания ферментации молока молочнокислыми бактериями до момента потребления, даже при температуре холодильника. Такое последующее закисление вызвано продолжающимся ростом молочнокислых бактерий в процессе хранения, что приводит к дальнейшему закислению ферментированного молочного продукта, а также образованию посторонних привкусов, свойственных, например, свободным аминокислотам, таким как глутаминовая кислота.

Неожиданным образом было обнаружено, что последующее закисление традиционной заквасочной культурой в ферментированном молочном продукте может быть значительно снижено добавлением к традиционной заквасочной культуре глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*. Это очень удивительное открытие, поскольку глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* был разработан с совершенно другой целью, а именно, для повышения уровня естественной сладости в ферментированном молочном продукте, в то время как какое-либо влияние на последующее закисление ранее не было обнаружено и является неожиданным. Более того, глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* не только сам по себе не вызывает последующего закисления, но, очевидно, также снижает последующее закисление штаммов традиционной заквасочной культуры, при этом указанный эффект ранее не был обнаружен и является неожиданным. В частности, механизм, лежащий в основе снижения последующего закисления штаммов традиционной заквасочной культуры, не является явным и очевидным.

Дополнительным преимуществом настоящего изобретения является то, что глюкозонегативный штамм *Streptococcus thermophilus* будет превращать часть лактозы молочной основы в глюкозу, чтобы наделить ферментированный молочный продукт

натуральной сладостью, тем самым уменьшая необходимость добавления сахара в продукт и снижая содержание лактозы в молочной основе в интересах потребителей с непереносимостью лактозы.

5 Во втором аспекте изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему инокулирование и ферментирование молочной основы с помощью композиции согласно изобретению.

В третьем аспекте изобретение относится к ферментированному молочному продукту, полученному с помощью способа согласно изобретению.

10 В четвертом аспекте изобретение относится к применению композиции в соответствии с изобретением для получения ферментированного молочного продукта.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 Определения

Используемый в настоящем документе термин "молочнокислая бактерия", сокращенно "LAB", обозначает грамположительную, микроаэрофильную или анаэробную бактерию, которая ферментирует сахара с продуцированием кислот, включая молочную кислоту в качестве преимущественно продуцируемой кислоты, уксусную кислоту и пропионовую кислоту. Наиболее широкоупотребительные в промышленности молочнокислые бактерии находятся в отряде "*Lactobacillales*", который включает *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Enterococcus spp.* и *Propionibacterium spp.* Молочнокислые бактерии, включая бактерии вида *Lactobacillus sp.* и *Streptococcus thermophilus*, обычно поставляются для молочной промышленности либо в виде замороженных или лиофилизированных культур для культивирования производственной закваски, либо в виде так называемых культур прямого внесения (Direct Vat Set, DVS), предназначенных для прямой инокуляции в ферментационный резервуар или чан для производства молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт. Такие культуры в общем называются "заквасочными культурами" или

20

25

30 "заквасками".

Использование выражений в единственном числе и сходных определений в контексте описания изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения)

должно толковаться в качестве охватывающего как единственное, так и множественное число, если иное здесь не указано или явно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "состоящий из" следует рассматривать как открытые термины (т.е. означающие "включая, но не ограничиваясь"), а не закрытые, если не указано иное. Приведенные здесь диапазоны значений предназначены, собственно, для того, чтобы служить сокращенным способом индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в пределы диапазона, если здесь не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно приведено в данном документе. Все способы, описанные в настоящем документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное здесь не указано или иным образом явно не противоречит контексту. Использование всех без исключения примеров или иллюстративных формулировок (например, "такой как"), представленных в настоящем документе, предназначено, собственно, для лучшего освещения изобретения и не налагает ограничения на объём изобретения, если не заявлено иное. Никакая формулировка в описании не должна быть истолкована как указание на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического осуществления настоящего изобретения.

В отношении настоящего изобретения выражение "повышение сладости" означает увеличение сладости по сравнению со сладостью, продуцируемой материнским штаммом, не несущим мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназы, причём указанная мутация инактивирует белок глюкокиназы или оказывает негативное влияние на экспрессию гена.

Выражение "КОЕ" означает колониеобразующие единицы.

В отношении настоящего изобретения выражение "традиционный" в отношении штамма молочнокислых бактерий означает глюкозоферментирующий штамм.

Глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* композиции согласно изобретению

В некоторых странах юридическое определение йогурта требует наличия штаммов как *Streptococcus thermophilus*, так и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Оба вида выделяют желаемое количество ацетальдегида, важного вкусоароматического компонента йогурта.

Для удовлетворения потребностей пищевой промышленности желательной становится разработка новых штаммов, в частности штаммов *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus*

delbruckii subsp. *bulgaricus*, которые продуцируют больше естественной сладости непосредственно в ферментированном продукте (собственная сладость) без внесения дополнительных калорий.

5 *Streptococcus thermophilus* является одной из наиболее широко используемых молочнокислых бактерий для коммерческой ферментации молока, причем указанный микроорганизм обычно используют как часть смешанной заквасочной культуры, а другой компонент представляет собой *Lactobacillus* sp. например, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* для йогурта.

10 Только глюкозный остаток молекулы лактозы ферментируется *Streptococcus thermophilus*, а галактоза накапливается в ферментированных молочных продуктах при использовании *Streptococcus thermophilus*. Когда высокие концентрации кислоты ограничивают ферментацию, свободная галактоза остается в йогурте.

15 Чтобы обеспечить штаммам *Streptococcus thermophilus* максимально оптимальные показатели роста, галактозоферментирующие штаммы *Streptococcus thermophilus* подвергали воздействию селективного агента 2-дезоксиглюкозы. Как правило, мутанты, резистентные к 2-дезоксиглюкозе, имеют мутации в гене, кодирующем глюкокиназу (*glcK*), и в генах, кодирующих перенос глюкозы. Выделенные мутантные штаммы DSM 28889 и DSM 32227, резистентные к 2-дезоксиглюкозе, имеют мутацию в гене глюкокиназы. В дополнение к мутации в гене глюкокиназы оба штамма DSM 28889 и DSM 32227 имеют
20 мутацию, которая приводит к тому, что секретируемая глюкоза больше не переносится обратно в клетки.

Термин «резистентный к 2-дезоксиглюкозе» в настоящем документе означает, что конкретный мутированный бактериальный штамм обладает способностью разрастаться в колонию при высеве штрихом на чашку среды M17, содержащей 20 mM 2-дезоксиглюкозы, после инкубации при 40°C в течение 20 часов. Присутствие 2-дезоксиглюкозы в питательной среде будет препятствовать росту немутантных штаммов, в то время как на
25 рост мутантных штаммов это не повлияет или повлияет незначительно. Немутантные штаммы, которые можно использовать в качестве чувствительных контрольных штаммов при оценке резистентности, предпочтительно включают штаммы DSM 25838 и DSM 22934.

30 Неожиданным образом оказалось, что резистентные к 2-дезоксиглюкозе мутанты сами по себе всё ещё полностью способны закислять молоко, хотя время закисления увеличивается. Поэтому они как таковые полезны в области ферментированных молочных продуктов, и они сохранили способность материнских штаммов закислять молоко, что характерно для

йогурта. Кроме того, было обнаружено, что мутанты выделяют высокий уровень глюкозы при инокулировании мутантами 9,5%-ного В-молока, содержащего 0,05% сахарозы, и ферментировании при 40°C в течение по меньшей мере 20 часов. В то же время в ферментированном молоке остаётся очень низкий уровень лактозы. Поэтому применение

5 таких штаммов для получения ферментированных молочных продуктов может иметь значение для людей с непереносимостью лактозы.

Как следствие, готовое ферментированное молоко имеет повышенный индекс собственной сладости, рассчитанный как описано Godshall (1988. Food Technology 42(11):71-78).

В одном аспекте настоящего изобретения штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой галактозоферментирующий мутантный штамм *Streptococcus thermophilus*, при этом

10 указанный мутантный штамм содержит мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназы, при этом указанная мутация инактивирует кодируемый белок глюкокиназы или оказывает негативное влияние на экспрессию гена. Методы измерения уровня активности глюкокиназы или уровня экспрессии гена глюкокиназы

15 хорошо известны (Porter et al. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 709:178-186) и включают методы определения активности ферментов с помощью имеющихся в продаже наборов и транскриптомику или количественную ПЦР с использованием общедоступных материалов.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению является резистентным к 2-

20 дезоксиглюкозе. В предпочтительном варианте осуществления изобретения резистентным к 2-дезоксиглюкозе штаммом *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению является штамм DSM 28889 или штамм DSM 32227.

Бактериальный «штамм» в данном контексте относится к бактерии, которая остается генетически неизменной при росте или размножении. Насчитывается множество

25 идентичных бактерий.

Термин «галактозоферментирующие штаммы *Streptococcus thermophilus*,», используемый в настоящем документе, относится к штаммам *Streptococcus thermophilus*, которые способны к росту на/в среде M17 с добавлением 2% галактозы. Галактозоферментирующие штаммы *Streptococcus thermophilus* определены в настоящем документе как штаммы *Streptococcus*

30 *thermophilus*, которые снижают pH бульона M17, содержащего 2% галактозы в качестве единственного углевода, до 5,5 или ниже при инокулировании из ночной культуры в количестве 1% и инкубировании в течение 24 часов при 37°C.

Термин «мутация инактивирует белок глюкокиназы», используемый в настоящем документе, относится к мутации, которая приводит к образованию «инактивированного белка глюкокиназы», т.е. такого белка глюкокиназы, который, присутствуя в клетке, не способен выполнять свою нормальную функцию, а также к мутациям, которые
5 препятствуют образованию белка глюкокиназы или приводят к деградации белка глюкокиназы.

В частности, инактивированный белок глюкокиназы представляет собой белок, который, по сравнению с функциональным белком глюкокиназы, не способен обеспечить фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата или обеспечивает фосфорилирование
10 глюкозы до глюкозо-6-фосфата со значительно сниженной скоростью. Ген, кодирующий такой инактивированный белок глюкокиназы, по сравнению с геном, кодирующим функциональный белок глюкокиназы, содержит мутацию в открытой рамке считывания (open reading frame, ORF) данного гена, при этом указанная мутация может включать, но не ограничивается ими, такие типы мутаций, как делеция, мутация со сдвигом рамки
15 считывания, введение стоп-кодона, или мутация, которая приводит к замене аминокислоты, которая изменяет функциональные свойства белка, или мутация промотора, которая снижает или прекращает транскрипцию или трансляцию данного гена,.

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

Активность глюкокиназы может быть определена с использованием методов определения активности фермента глюкокиназы как описано Pool et al. (2006. Metabolic Engineering 8; 456-464).

Термин «функциональный белок глюкокиназы», используемый в настоящем документе, относится к белку глюкокиназы, который, присутствуя в клетке, обеспечивает фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата. В частности, функциональный белок
25 глюкокиназы может кодироваться геном, содержащим ORF, которая имеет последовательность, соответствующую позициям 1-966 в SEQ ID NO: 1, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%-ную идентичность, как,
30 например, по меньшей мере 90%-ную идентичность, например, по меньшей мере 95%-ную идентичность, например, по меньшей мере 98%-ную идентичность, например, по меньшей мере 99%-ную идентичность, относительно последовательности, соответствующей позициям 1-966 SEQ ID NO: 1.

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

Во многих странах применение генетически модифицированных организмов (ГМО) для ферментированных молочных продуктов неприемлемо. В настоящем изобретении вместо этого предложены встречающиеся в природе или индуцированные мутантные штаммы, которые могут обеспечивать желательное накопление глюкозы в ферментированном молочном продукте. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения мутантный штамм является встречающимся в природе мутантом или индуцированным мутантом.

Термины «мутантная бактерия» или «мутантный штамм», используемые в настоящем документе, относятся к природной (спонтанной, встречающейся в природе) мутантной бактерии или к индуцированной мутантной бактерии, содержащей в своём геноме (ДНК) одну или более чем одну мутацию, которая отсутствует в ДНК дикого типа. «Индукцированный мутант» представляет собой бактерию, где мутация была индуцирована обработкой человеком, такой как обработка химическими мутагенами, УФ- или гамма-излучением и т.д. В отличие от этого, «спонтанный мутант» или «встречающийся в природе мутант» не подвергался мутагенезу со стороны человека. Мутантные бактерии в настоящем документе не являются ГМО (генетически модифицированный организм), т.е. они не модифицированы посредством технологии рекомбинантной ДНК.

Термин «штамм дикого типа» относится к немутированной форме бактерии, такой как встречающаяся в природе.

Такие термины, как «штаммы со способностью к усилению сладкого вкуса», «штаммы, которые могут обеспечивать желательное накопление глюкозы в ферментированном

молочном продукте» и «штаммы с улучшенными свойствами в отношении естественного подслащивания пищевых продуктов», используются в настоящем документе взаимозаменяемо для характеристики полезного аспекта применения штаммов согласно настоящему изобретению в ферментации молочных продуктов.

5 В предпочтительном варианте осуществления мутантный штамм *Streptococcus thermophilus*, описанный в настоящем изобретении, увеличивает количество глюкозы в 9,5%-ном В-молоке по меньшей мере до 5 мг/мл при инокулировании 9,5%-ного В-молока в концентрации 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и выращивании при 40° С в течение по меньшей мере 20 ч.

10 В другом предпочтительном варианте осуществления мутантный штамм *Streptococcus thermophilus*, описанный в настоящем изобретении, увеличивает количество глюкозы в 9,5%-ном В-молоке, содержащем 0,05% сахарозы, по меньшей мере до 5 мг/мл при инокулировании 9,5%-ного В-молока, содержащего 0,05% сахарозы, в концентрации 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и выращивании при 40° С в течение по меньшей мере 20 ч.

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

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

25 Мутантные штаммы *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению выделяют глюкозу в молоко при инокулировании 9,5%-ного В-молока штаммом *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению в количестве 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и ферментировании штаммами *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению при 40°С в течение по меньшей мере 20 часов. Предпочтительно такие мутантные штаммы сами по себе будут выделять глюкозу в 30 В-молоко в количестве по меньшей мере 5 мг/мл при инокулировании 9,5%-ного В-молока штаммом *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению в количестве 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и ферментировании штаммом *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению при 40°С в течение по меньшей мере 20 часов. Данные штаммы все еще полностью способны закислять

молоко, хотя время закисления до pH 5 откладывается на 2-5 часов. Готовое ферментированное молоко содержит лактозы менее 15 мг/мл ферментированного молока. Как следствие, готовое ферментированное молоко имеет индекс собственной сладости выше примерно в 2 раза или более. В одном варианте осуществления изобретения

5 глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* может быть лактозоположительным или лактозодефицитным, однако предпочтительно указанный штамм является лактозоположительным.

В еще одном варианте осуществления мутантный штамм согласно изобретению может характеризоваться его динамикой роста. Это иллюстрируется данными о том, что скорость

10 роста мутантного штамма выше в среде M17 с добавлением 2% галактозы, чем в среде M17 с добавлением 2% глюкозы. Скорость роста измеряется как нарастание с течением времени оптической плотности экспоненциально растущей культуры при 600 нанометрах (OD₆₀₀).

В предпочтительном варианте осуществления скорость роста по меньшей мере на 5% выше, например, по меньшей мере на 10% выше, например, по меньшей мере на 15% выше,

15 например, по меньшей мере на 20% выше, в среде M17 с добавлением 2% галактозы, чем в среде M17 с добавлением 2% глюкозы.

Мутация в гене glcK

В одном предпочтительном варианте осуществления данная мутация приводит к замене

20 кодона, кодирующего глицин, кодоном, кодирующим аргинин, в позиции 249 в SEQ ID NO.2. Предпочтительно мутация в гене *glcK* приводит к замене G на A в позиции 745 в SEQ ID NO. 1. Такую мутацию имеет штамм DSM 28889.

В предпочтительном варианте осуществления данная мутация приводит к замене кодона, кодирующего серин, кодоном, кодирующим пролин, в позиции 72 в SEQ ID NO. 2 (не

25 показано). Предпочтительно мутация в гене *glcK* приводит к замене T на C в позиции 214 в SEQ ID NO. 1 (не показано).

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

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

30

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

Выражение "ген *glcK*, кодирующий глюкокиназу", используемое в настоящем документе, относится к любой последовательности ДНК, кодирующей белок, обладающий
5 глюкокиназной активностью, включая специфическую глюкокиназу, кодируемую последовательностью ДНК SEQ ID NO. 1. Глюкокиназа катализирует реакцию превращения глюкозы в глюкозо-6-фосфат.

Мутация, снижающая перенос глюкозы в клетку

10 В предпочтительном варианте осуществления глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* содержит мутацию, которая снижает перенос глюкозы в клетку.

Термин «мутация, которая снижает перенос глюкозы в клетку», используемый в настоящем документе, относится к мутации в гене, кодирующем белок, вовлеченный в перенос глюкозы, что приводит к накоплению глюкозы в окружающей клетку среде.

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

В предпочтительных вариантах осуществления мутация снижает перенос глюкозы в клетку по меньшей мере на 50%, например, по меньшей мере на 60%, например, по меньшей мере
20 на 70%, например, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%.

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

Предпочтительно штамм *Streptococcus thermophilus* содержит мутацию в гене, кодирующем компонент переносчика глюкозы, при этом указанная мутация инактивирует белок-
25 переносчик глюкозы или оказывает негативное влияние на экспрессию указанного гена.

Данным компонентом может быть любой компонент белка-переносчика глюкозы, который является критически важным для переноса глюкозы. Например, предполагается, что инактивация любого компонента системы фосфотрансферазы (PTS) глюкозы/маннозы в *Streptococcus thermophilus* будет приводить к инаktivации функции переносчика глюкозы.

30 Термин «мутация инактивирует переносчик глюкозы», используемый в настоящем документе, относится к мутации, которая приводит к «инактивированному переносчику глюкозы», представляющему собой белок-переносчик глюкозы, который, присутствуя в

клетке, не способен выполнять свою нормальную функцию, а также к мутациям, которые препятствуют образованию белка-переносчика глюкозы или приводят к деградации белка-переносчика глюкозы.

5 В частности, инактивированный белок-переносчик глюкозы представляет собой белок, который, по сравнению с функциональным белком-переносчиком глюкозы, не способен обеспечивать перенос глюкозы через плазматическую мембрану или обеспечивает перенос глюкозы через плазматическую мембрану со значительно сниженной скоростью. Ген, кодирующий такой инактивированный белок-переносчик глюкозы, по сравнению с геном, кодирующим функциональный белок-переносчик глюкозы, содержит мутацию в открытой
10 рамке считывания (ORF) данного гена, при этом указанная мутация может включать, но не ограничивается ими, такие типы мутаций как делеция, мутация со сдвигом рамки считывания, введение стоп-кодона, или мутация, которая приводит к замене аминокислоты, которая изменяет функциональные свойства белка, или мутация промотора, которая снижает или прекращает транскрипцию или трансляцию данного гена.

15 В предпочтительных вариантах осуществления мутация снижает активность (скорость переноса глюкозы) белка-переносчика глюкозы по меньшей мере на 50%, например, по меньшей мере на 60%, например, по меньшей мере на 70%, например, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%.

Активность переносчика глюкозы может быть определена методом поглощения глюкозы
20 как описано в Cochu et al (2003. Appl Environ Microbiol 69 (9); 5423-5432).

Термин «функциональный белок-переносчик глюкозы», используемый в настоящем документе, относится к белку-переносчику глюкозы, который, присутствуя в клетке, обеспечивает перенос глюкозы через плазматическую мембрану.

В предпочтительном варианте осуществления глюкозодефицитный штамм *Streptococcus*
25 *thermophilus* согласно изобретению содержит мутацию в последовательности ДНК гена *manN*, кодирующего белок IID^{Man} системы фосфотрансферазы глюкозы/маннозы, при этом указанная мутация инактивирует белок IID^{Man} или оказывает негативное влияние на экспрессию гена. DSM 28889 имеет замену треонина на пролин в позиции 79 в гене *manN*, кодирующем белок IID^{Man} системы фосфотрансферазы глюкозы/маннозы.
30 Предпочтительно данная мутация в гене *manN* приводит к замене А на С в позиции 235 в SEQ ID NO. 3. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления штамм *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению содержит мутацию в последовательности ДНК гена *manN*, кодирующего белок IID^{Man} системы фосфотрансферазы глюкозы/маннозы,

при этом указанная мутация приводит к замене треонина на пролин в позиции 79 SEQ ID NO. 4.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения штамм *Streptococcus thermophilus* согласно изобретению содержит мутацию в последовательности ДНК гена *manM*, кодирующего белок IID^{Man} системы фосфотрансферазы глюкозы/маннозы, при этом указанная мутация инактивирует белок IID^{Man} или оказывает негативное влияние на экспрессию гена. В конкретном предпочтительном варианте осуществления данная мутация приводит к замене кодона, кодирующего глутаминовую кислоту, на стоп-кодон в позиции 209 последовательности SEQ ID NO. 6 белка IIC^{Man} системы фосфотрансферазы глюкозы/маннозы (не показано). Предпочтительно мутация приводит к замене G на T в позиции 625 последовательности SEQ ID NO. 5.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из: DSM 32227; DSM 28889; DSM 25850; DSM 25851; DSM 26722 и производных от них мутантных штаммов, полученных с использованием одного из депонированных штаммов в качестве материнского штамма, при этом указанные мутанты сохранили или дополнительно улучшили способность своего материнского штамма к секретированию глюкозы.

В настоящем контексте термин "производные от них штаммы" следует понимать как штаммы, полученные, или штаммы, которые могут быть получены, из исходного штамма или материнского штамма посредством, например, генной инженерии, радиационной и/или химической обработки. «Производные от них штаммы» также могут быть спонтанно возникающими мутантами. Предпочтительно, чтобы «производные от них штаммы» были функционально эквивалентными мутантами, например, мутантами, которые обладают по существу теми же или улучшенными свойствами (например, в отношении текстуры или ферментации галактозы), что и их материнский штамм. В частности, термин «производные от них штаммы» относится либо к штаммам, полученным путём подвергания штамма согласно изобретению обработке любым традиционно используемым методом мутагенеза, включая обработку химическим мутагеном, таким как этилметансульфонат (ethane methane sulphonate, EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidine, NTG), ультрафиолетовым светом, либо к спонтанно возникающему мутанту. Мутант может быть подвергнут нескольким этапам мутагенеза (один этап следует понимать как одну стадию мутагенеза с последующей стадией скрининга/отбора), но в данном случае предпочтительно, чтобы проводилось не более чем 20, или не более чем 10, или не более чем 5 стадий мутагенеза (или стадий скрининга/отбора). В предпочтительном варианте

осуществления менее чем 1%, менее чем 0,1%, менее чем 0,01%, менее чем 0,001%, или даже менее чем 0,0001%, нуклеотидов в бактериальном геноме мутанта было заменено другим нуклеотидом, deletировано или вставлено по сравнению с материнским штаммом.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения глюкозодефицитный
5 штамм *Streptococcus thermophilus* является лактозоферментирующим. Таким образом, преимущество настоящего изобретения заключается в том, что глюкозонегативный штамм *Streptococcus thermophilus* преобразует часть лактозы молочного субстрата в глюкозу для придания ферментированному молочному продукту естественной сладости, следовательно,
10 уменьшая потребность в добавлении сахара в продукт и снижая содержание лактозы в молочной основе в интересах потребителей с непереносимостью лактозы.

Способ получения глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*

Способ получения глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus* включает стадию получения галактозоферментирующего штамма, т.е. штамма, который способен
15 использовать галактозу в качестве источника углеводов.

Галактозоферментирующие штаммы могут быть получены способом, включающим стадию посева подлежащих тестированию бактерий на чашках с агаром, таких как чашки с агаром М17, содержащих заданную концентрацию галактозы в качестве единственного источника углеводов, например, 2%, и идентификацию колоний, способных расти на этих чашках.

20 Галактозоферментирующие штаммы *Streptococcus thermophilus* способны к росту в среде М17 с добавлением 2% галактозы и определяются в настоящем документе тем, что они обладают способностью снижать pH бульона М17, содержащего 2% галактозы в качестве единственного источника углеводов, до 5,5 или ниже при инокулировании из ночной культуры в количестве 1% и инкубировании в течение 24 ч при 37° С. Такие
25 галактозоположительные штаммы были описаны в WO2011/026863 (Chr. Hansen A/S) и WO2011/092300 (Chr. Hansen A/S).

Галактозоферментирующие штаммы, которые резистентны к 2-дезоксиглюкозе, могут быть идентифицированы путем сопоставления характера роста штамма в среде М17 с добавлением 2% галактозы с характером роста в среде М17 с добавлением 2% глюкозы.

30 Способ скрининга и выделения глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus* включает следующие стадии:

- a) получение галактозоферментирующего материнского штамма *Streptococcus thermophilus*;
- b) отбор и выделение из пула мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus*, полученных из материнского штамма, пула мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus*, резистентных к 2-дезоксиглюкозе; и
- 5 c) отбор и выделение из пула мутантных штаммов *Streptococcus thermophilus*, резистентных к 2-дезоксиглюкозе, мутантного штамма *Streptococcus thermophilus*, при условии, что скорость роста мутантного штамма *Streptococcus thermophilus* выше в среде M17 с добавлением 2% галактозы, чем в среде M17 с добавлением 2% глюкозы.
- 10 В одном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию a1) подвергание материнского штамма мутагенезу, например, подвергание материнского штамма воздействию химического и/или физического мутагена.
- В другом варианте осуществления способ дополнительно включает стадию d) отбор и выделение из пула 2-дезоксиглюкозорезистентных штаммов *Streptococcus thermophilus*,
- 15 полученных на этапе c), штамма *Streptococcus thermophilus*, при условии, что скорость роста штамма *Streptococcus thermophilus* высока в среде M17 с добавлением 2% сахарозы и снижена в среде M17 с добавлением 2% глюкозы по сравнению со скоростью роста материнского штамма. Предпочтительно скорость роста штамма *Streptococcus thermophilus* равна нулю или, по меньшей мере, снижена до уровня ниже 5%, ниже 10%, ниже 15%, ниже
- 20 20%, ниже 25%, ниже 30%, ниже 35%, ниже 40%, ниже 45%, ниже 50%, по сравнению со скоростью роста материнского штамма.
- Глюкозодефицитность штамма *Streptococcus thermophilus* может быть вызвана изменением нуклеотидной последовательности в гене *glcK*, который кодирует белок глюкокиназы. Изменение может быть мутацией, инсерцией и/или делецией.
- 25 В одном варианте осуществления изобретения глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* содержит мутацию, инсерцию и/или делецию, в нуклеотидной последовательности гена *glcK*.

Глюкозоферментирующие штаммы композиции согласно изобретению

- 30 Глюкозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus* композиции согласно настоящему изобретению может быть любым традиционным штаммом *Streptococcus thermophilus*, подходящим для получения ферментированного молочного продукта.

В одном варианте осуществления изобретения глюкозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой лактозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus* или лактозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*.

- 5 В одном варианте осуществления изобретения глюкозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus* является штаммом, депонированным в Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под инвентарным номером DSM 19242, или глюкозоферментирующим мутантным штаммом, производным от него.

- 10 Глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* композиции согласно настоящему изобретению может быть любым традиционным штаммом *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, подходящим для получения ферментированного молочного продукта.

В одном варианте осуществления изобретения глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* представляет собой лактозодефицитный штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

- 15 В одном варианте осуществления изобретения глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* выбран из группы штаммов, депонированных в DSMZ под инвентарным номером DSM 28910; DSM 22586; и глюкозоферментирующих мутантных штаммов, производных от него.

- 20 Термины "с дефицитом метаболизма лактозы", "лактозодефицитный" используются в контексте настоящего изобретения для характеристики LAB, которые либо частично, либо полностью утратили способность использовать лактозу в качестве источника для роста клеток или поддержания жизнеспособности клеток. Соответствующие LAB способны метаболизировать один или более не являющихся лактозой углеводов, выбранных из сахарозы, галактозы, глюкозы, фруктозы и/или другого ферментируемого углевода.

- 25 Поскольку эти углеводы естественным образом не присутствуют в молоке в достаточных количествах, чтобы поддерживать ферментацию лактозодефицитными мутантами, необходимо добавлять эти углеводы в молоко. Лактозодефицитные и частично лактозодефицитные LAB можно охарактеризовать как белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

- 30 В контексте настоящего изобретения термин "X-Gal" означает 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галакто-пиранозид, который является хромогенным субстратом для бета-галактозидазы, которая гидролизует X-Gal в бесцветную галактозу и 5-бром-4-хлор-3-гидроксииндол, который самопроизвольно димеризуется с образованием синего пигмента.

В конкретном варианте осуществления изобретения лактозодефицитный штамм представляет собой штамм *Streptococcus thermophilus* и/или *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, способный метаболизировать не являющийся лактозой углевод, выбранный из группы, включающей сахарозу, галактозу, глюкозу и фруктозу, предпочтительно сахарозу.

- 5 В конкретном варианте осуществления изобретения лактозодефицитный штамм представляет собой штамм *Streptococcus thermophilus* и/или штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, способный метаболизировать галактозу.

- В конкретном варианте осуществления композиции согласно изобретению штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* выбран из группы, включающей штамм, депонированный в DSMZ под инвентарным номером DSM 28910; и производные от него мутантные штаммы, дополнительно характеризующиеся способностью продуцировать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.
- 10

- Лактозодефицитные штаммы могут быть получены из подходящего лактозоферментирующего материнского штамма путём мутации. Лактозодефицитные штаммы отбирали после УФ-мутагенеза как белые колонии (что указывает на лактозодефицитный фенотип) на подходящей среде, например, на чашках с агаром MRS с добавлением 1% лактозы и X-Gal в количестве 200 мг/мл. Лактозоферментирующие штаммы обладают β-галактозидазной активностью, а колонии лактозоположительного штамма кажутся синими из-за активности β-галактозидазы. В качестве
- 15
- 20 лактозоферментирующего материнского штамма для получения лактозодефицитного штамма может быть использован штамм *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, депонированный в DSMZ под инвентарным номером DSM 19252.

Композиция

- 25 Настоящее изобретение относится к композиции для получения ферментированного молочного продукта, включающей:

- (i) заквасочную культуру, содержащую глюкозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus* (St) и глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb); и
- 30 (ii) глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (St), при этом указанный штамм St является галактозоферментирующим и содержит мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназы, причём указанная мутация инактивирует белок глюкокиназы или имеет негативное влияние на экспрессию гена.

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает композицию для получения ферментированного молочного продукта, при этом последующее закисление полученного ферментированного молочного продукта снижено по сравнению с ферментированным молочным продуктом, полученным с использованием композиции, не содержащей глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (St) из (ii).

В одном варианте осуществления последующее закисление полученного ферментированного молочного продукта снижается более чем на 5%, более чем на 10%, более чем на 15%, более чем на 20%, более чем на 25%, более чем на 30%, более чем на 35%, более чем на 40%, более чем на 45%, или более чем на 50%, по сравнению с ферментированным молочным продуктом, полученным с использованием композиции без глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus* (St) из (ii).

Композиция согласно изобретению содержит от 10^4 до 10^{12} КОЕ (колониеобразующие единицы)/г глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*, например, от 10^5 до 10^{11} КОЕ/г, например, от 10^6 до 10^{10} КОЕ/г либо, например, от 10^7 до 10^9 КОЕ/г глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*.

В одном варианте осуществления изобретения глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* является лактозоферментирующим.

В одном варианте осуществления глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* является неспособным закислять 9,5%-ное В-молоко, что определяется как вызываемое снижение pH менее чем на 1,0 при инокулировании 9,5%-ного В-молока глюкозодефицитным штаммом *Streptococcus thermophilus* в количестве 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и инкубировании в течение 14 часов при 40°C, и данная композиция дополнительно содержит количество соединения, которое может запускать закисление 9,5%-ного В-молока глюкозодефицитным штаммом *Streptococcus thermophilus* DSM 32227; DSM 28889; DSM 25850; DSM 25851; или DSM 26722, что определяется как вызываемое снижение pH на 1,0 или более при инокулировании 9,5%-ного В-молока глюкозодефицитным штаммом *Streptococcus thermophilus* в количестве 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и инкубировании в течение 14 часов при 40°C. В одном из вариантов осуществления данное соединение представляет собой сахарозу. Предпочтительно количество сахарозы составляет от 0,000001% до 2%, например, от 0,00001% до 0,2%, например, от 0,0001% до 0,1%, например, от 0,001% до 0,05%.

В одном варианте осуществления композиция дополнительно содержит традиционный штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в количестве от 10^4 до 10^{12} КОЕ/г,

например, от 10^5 до 10^{11} КОЕ/г, например, от 10^6 до 10^{10} КОЕ/г либо, например, от 10^7 до 10^9 КОЕ/г штамма *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

В одном варианте осуществления композиция содержит по меньшей мере два штамма *Streptococcus thermophilus* (St), по меньшей мере три штамма St или по меньшей мере четыре штамма St. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит два штамма St, три штамма St или четыре штамма St. В конкретном варианте осуществления изобретения композиция содержит не более чем три штамма *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Lb), предпочтительно не более чем два штамма Lb или, более предпочтительно, один штамм Lb.

В конкретном варианте осуществления изобретения композиция содержит по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*, выбранный из: DSM 32227; ДСМ 28889; ДСМ 25850; и DSM 26722, а также штамм *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, DSM 28910.

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, *Streptococcus thermophilus* и другие молочнокислые бактерии обычно используются в качестве заквасочных культур, служащих

для технологических целей при производстве различных пищевых продуктов. В молочной промышленности такие заквасочные культуры используются при производстве ферментированных молочных продуктов, таких как, например, йогурт. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения композиция является заквасочной культурой.

В одном варианте осуществления изобретения композицию используют в качестве заквасочной культуры. В одном варианте осуществления изобретения композицию используют в качестве заквасочной культуры для получения йогурта. В одном варианте осуществления изобретения композицию используют в качестве заквасочной культуры для получения йогурта с пониженным или низким последующим закислением. Уровень последующего закисления определяют в сравнении с йогуртом, приготовленным с аналогичной композицией или заквасочной культурой без глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus*.

Композиция согласно настоящему изобретению может быть представлена в нескольких формах. Это может быть замороженная форма, высушенная форма, лиофилизированная форма или жидкая форма. Таким образом, в одном варианте осуществления композиция находится в замороженной, высушенной, лиофилизированной или жидкой форме.

Композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать криопротекторы, лиопротекторы, антиоксиданты, нутриенты, наполнители, ароматизаторы или смеси вышеуказанного. Композиция предпочтительно содержит один или более

криопротекторов, лиопротекторов, антиоксидантов и/или нутриентов, более предпочтительно криопротекторы, лиопротекторы и/или антиоксиданты, и наиболее предпочтительно криопротекторы или лиопротекторы, или и то, и другое. Применение веществ-протекторов, таких как криопротекторы и лиопротекторы, известно специалистам в данной области. Подходящие криопротекторы или лиопротекторы включают моно-, ди-, три- и полисахариды (такие как глюкоза, манноза, ксилоза, лактоза, сахароза, трегалоза, раффиноза, мальтодекстрин, крахмал и гуммиарабик (аравийская камедь) и т.п.), полиолы (такие как эритрит, глицерин, инозит, маннит, сорбит, треит, ксилит и т.п.), аминокислоты (такие как пролин, глутаминовая кислота), сложные вещества (такие как обезжиренное молоко, пептоны, желатин, дрожжевой экстракт) и неорганические соединения (такие как трифосфат натрия). В одном варианте осуществления композиция согласно настоящему изобретению может содержать одно или более чем одно вещество-криопротектор, выбранное из группы, включающей инозин-5'-монофосфат (ИМФ), аденозин-5'-монофосфат (АМФ), гуанозин-5'-монофосфат (ГМФ), уранозин-5'-монофосфат (УМФ), цитидин-5'-монофосфат (ЦМФ), аденин, гуанин, урацил, цитозин, аденозин, гуанозин, уридин, цитидин, гипоксантин, ксантин, гипоксантин, оротидин, тимидин, инозин и производные любых таких соединений. Подходящие антиоксиданты включают аскорбиновую кислоту, лимонную кислоту и их соли, галлаты, цистеин, сорбит, маннит, мальтозу. Подходящие нутриенты включают сахара, аминокислоты, жирные кислоты, минералы, микроэлементы, витамины (такие как витамины группы В, витамин С). Композиция может при необходимости содержать дополнительные вещества, в том числе наполнители (такие как лактоза, мальтодекстрин) и/или ароматизаторы.

Способ получения ферментированного молочного продукта

Данное изобретение дополнительно относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему инокулирование и ферментирование молочного субстрата композицией согласно настоящему изобретению. Данная композиция подробно описана выше в разделе «Композиция».

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему инокулирование и ферментирование молочной основы при помощи

(i) заквасочной культуры, содержащей глюкозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus* (St) и глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb); и

(ii) глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (St), при этом указанный штамм

5 St является галактозоферментирующим и содержит мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназы, причём указанная мутация инактивирует белок глюкокиназы или имеет негативное влияние на экспрессию гена.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, при этом последующее закисление указанного ферментированного молочного продукта снижается по сравнению с ферментированным молочным продуктом, полученным с использованием композиции без глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus* (St) из (ii).

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающему инокулирование и ферментирование молочной основы при помощи

(i) заквасочной культуры, содержащей глюкозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus* (St) и глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb); и

(ii) глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (St), при этом указанный штамм 20 St является галактозоферментирующим и содержит мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназы, причём указанная мутация инактивирует белок глюкокиназы или имеет негативное влияние на экспрессию указанного гена,

при этом последующее закисление указанного ферментированного молочного продукта снижается по сравнению с ферментированным молочным продуктом, полученным без глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus* (St) из (ii).

Термин «молоко» следует понимать как секрецию молока, полученного при доении любого млекопитающего, такого как корова, овца, коза, буйвол или верблюд. В предпочтительном варианте осуществления молоко представляет собой коровье молоко.

Термин «молочный субстрат» может относиться к любому сырому и/или обработанному молочному сырью, которое может быть подвергнуто ферментации по способу изобретения. Таким образом, используемые молочные субстраты включают, но не ограничиваются ими, растворы/суспензии любого молока или молокоподобных продуктов, содержащих белок, таких как цельное молоко или молоко с пониженным содержанием жира, обезжиренное

молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, сыворотка, сывороточный фильтрат, лактоза, маточный раствор от кристаллизации лактозы, концентрат сывороточного белка или сливки. Очевидно, что молочный субстрат может полностью или частично происходить от любого млекопитающего, например, являясь в основном чистым молоком млекопитающих или восстановленным сухим молоком.

Предпочтительно по меньшей мере часть белка в молочном субстрате представляет собой белки, естественным образом присутствующие в молоке, такие как казеин или сывороточный белок. Однако часть белка может быть белками, которые не присутствуют в молоке естественным образом.

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

Термин «гомогенизация», использованный здесь, означает интенсивное перемешивание для получения растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизация проводится перед ферментацией, её можно проводить для того, чтобы разбить молочный жир на более мелкие части, чтобы он больше не отделялся от молока. Этого можно добиться, пропуская молоко под высоким давлением через небольшие отверстия.

"Пастеризация" в контексте данного документа означает обработку молочного субстрата для уменьшения или устранения присутствия живых организмов, например, микроорганизмов. Предпочтительно пастеризация достигается путем поддержания определенной температуры в течение определенного периода времени. Указанная температура обычно достигается путём нагревания. Температура и продолжительность могут быть выбраны с целью уничтожения или инактивации определенных бактерий, например, вредных бактерий. Допускается последующий этап быстрого охлаждения.

«Ферментация» в способах согласно настоящему изобретению означает превращение углеводов в спирты или кислоты под действием микроорганизма. Предпочтительно ферментация в способах согласно настоящему изобретению включает превращение лактозы в молочную кислоту. Процессы ферментации для использования в производстве ферментированных молочных продуктов хорошо известны, и специалист в данной области знает, как выбрать подходящие условия процесса, такие как температура, концентрация кислорода, количество и характеристики микроорганизма(ов) и время процесса. Очевидно, условия ферментации выбирают таким образом, чтобы способствовать достижению цели

настоящего изобретения, т.е. получить молочный продукт в твердой или жидкой форме (ферментированный молочный продукт).

5 Термин «ферментированный молочный продукт», используемый в настоящем документе, относится к пищевому или кормовому продукту, при этом получение пищевого или
кормового продукта включает ферментацию молочного субстрата молочнокислыми
10 бактериями. Термин «ферментированный молочный продукт», используемый здесь, включает, но не ограничивается ими, такие продукты, как термофильные ферментированные молочные продукты, например, йогурт, мезофильные ферментированные молочные продукты, например, сметана и пахта, а также ферментированная сыворотка.

Термин «термофил» в настоящем документе относится к микроорганизмам, которые развиваются лучше всего при температурах выше 35°C. Наиболее промышленно используемые термофильные бактерии включают *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. Термин «термофильная ферментация» в настоящем документе относится к ферментации
15 при температуре выше примерно 35°C, например, между примерно 35°C и примерно 45°C. Термин "термофильный ферментированный молочный продукт" относится к ферментированным молочным продуктам, полученным путём термофильной ферментации термофильной заквасочной культурой, и включает такие ферментированные молочные продукты, как термостатный йогурт, перемешиваемый йогурт и питьевой йогурт,
20 например, Якульт.

Термин «мезофил» в настоящем документе относится к микроорганизмам, которые развиваются лучше всего при умеренных температурах (15°C-35°C). Наиболее промышленно используемые мезофильные бактерии включают *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp. Термин «мезофильная ферментация» в настоящем документе относится к
25 ферментации при температуре между примерно 22°C и примерно 35°C. Термин «мезофильный ферментированный молочный продукт» относится к ферментированным молочным продуктам, полученным путём мезофильной ферментации мезофильной заквасочной культурой, и включает такие ферментированные молочные продукты, как пахта, простокваша, кисломолочный продукт, сметана, сквашенные сливки, кефир и
30 творожный сыр, например, кварк, творог и сливочный сыр.

В предпочтительном варианте концентрация инокулированных клеток *Streptococcus thermophilus* составляет от 10^4 до 10^9 КОЕ клеток *Streptococcus thermophilus* на 1 мл молочного субстрата, например, от 10^4 КОЕ до 10^8 КОЕ клеток *Streptococcus thermophilus* на 1 мл молочного субстрата.

В другом предпочтительном варианте осуществления способа согласно изобретению штамм *Streptococcus thermophilus* является не способным закислять 9,5%-ное В-молоко, что определяется как вызываемое снижение pH менее чем на 1,0 при инокулировании 9,5%-ного В-молока штаммом *Streptococcus thermophilus* в количестве 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и инкубировании в течение 14 часов при 40°C, и в молочный субстрат добавляют соединение в количестве, эффективном для инициирования закисления 9,5%-ного В-молока штаммом *Streptococcus thermophilus*, что определяется как достижение снижения pH на 1,0 или более при инокулировании 9,5%-ного В-молока штаммом *Streptococcus thermophilus* в количестве 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и инкубировании в течение 14 часов при 40°C. Предпочтительно данное соединение представляет собой сахарозу. Предпочтительно количество сахарозы составляет от 0,000001% до 2%, например, от 0,00001% до 0,2%, например, от 0,0001% до 0,1%, например, от 0,001% до 0,05%.

В данном контексте заквасочная культура для йогурта представляет собой бактериальную культуру, содержащую по меньшей мере один штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и по меньшей мере один штамм *Streptococcus thermophilus*. В соответствии с настоящим документом термин «йогурт» относится к ферментированному молочному продукту, могущему быть полученным путём инокулирования и ферментирования молока композицией, содержащей штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и штамм *Streptococcus thermophilus*.

В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к способу снижения последующего закисления в ферментированном молочном продукте, полученном с использованием заквасочной культуры, содержащей глюкозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus* (St) и глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb), путём добавления к молочной основе глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus* (St), при этом указанный штамм St является галактозоферментирующим и содержит мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназы, причём указанная мутация инактивирует белок глюкокиназы или оказывает негативное влияние на экспрессию указанного гена. В одном варианте осуществления глюкозодефицитный штамм St может быть лактозоферментирующим.

В любом варианте осуществления изобретения заквасочная культура и глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (St) могут добавляться в виде смеси или по отдельности в виде набора компонентов.

Ферментированный молочный продукт

Настоящее изобретение дополнительно относится к ферментированному молочному продукту, содержащему композицию согласно изобретению. В предпочтительном варианте ферментированный молочный продукт может представлять собой йогурт, сыр, сметану и пахту, а также ферментированную сыворотку. Предпочтительно ферментированный молочный продукт представляет собой йогурт.

В одном варианте осуществления изобретение относится к ферментированному молочному продукту, при этом последующее закисление ферментированного молочного продукта снижено по сравнению с ферментированным молочным продуктом, полученным с использованием композиции, не содержащей глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (St) из (ii).

В одном варианте осуществления ферментированный молочный продукт получают согласно способу получения ферментированного молочного продукта, включающему инокулирование и ферментирование молочного субстрата с использованием композиции согласно изобретению. В одном варианте осуществления композиция согласно изобретению содержит один или более глюкозодефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus*, один или более глюкозоферментирующих штаммов *Streptococcus thermophilus*, и один или более глюкозоферментирующих штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

В одном варианте осуществления один или более глюкозодефицитных штаммов *Streptococcus thermophilus* данной композиции выбраны из группы, состоящей из: DSM 32227; ДСМ 28889; ДСМ 25850; ДСМ 25851; ДСМ 26722; и производных от них глюкозодефицитных мутантных штаммов.

В одном варианте осуществления один или более глюкозоферментирующих штаммов *Streptococcus thermophilus* данной композиции выбраны из группы, состоящей из: DSM 19242; ДСМ 22935; и производных от них глюкозоферментирующих мутантных штаммов.

В одном варианте осуществления один или более глюкозоферментирующих штаммов *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* данной композиции выбраны из группы, состоящей из: DSM 28910; ДСМ 22586; и производных от них глюкозоферментирующих мутантных штаммов.

В одном варианте осуществления ферментированный молочный продукт содержит один или более штаммов, выбранных из DSM 28889, и один или более штаммов, выбранных из DSM 19242 и DSM 22586.

В одном варианте осуществления ферментированный молочный продукт содержит штаммы DSM 28889, DSM 19242 и DSM 22586.

В одном варианте осуществления ферментированный молочный продукт содержит штаммы DSM 28889 и DSM 22935.

5

Применение композиции согласно изобретению

Изобретение относится к применению композиции согласно изобретению для получения ферментированного молочного продукта.

10 В одном варианте осуществления изобретение относится к применению композиции согласно изобретению, при этом последующее закисление ферментированного молочного продукта снижено по сравнению с ферментированным молочным продуктом, полученным с использованием композиции, не содержащей глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (St).

В одном варианте осуществления изобретение относится к применению

15 (i) заквасочной культуры, содержащей глюкозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus* (St), и глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb); и

(ii) глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (St), при этом указанный штамм St является галактозоферментирующим и содержит мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназы, причём указанная мутация инактивирует белок глюкокиназы или имеет негативное влияние на экспрессию указанного гена, для снижения последующего закисления ферментированного молочного продукта по сравнению с ферментированным молочным продуктом, полученным без глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus* (St) из (ii).

20

25 В одном варианте осуществления изобретение относится к применению глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus* (St), при этом указанный штамм St является галактозоферментирующим и содержит мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназы, причём указанная мутация инактивирует белок глюкокиназы или имеет негативное влияние на экспрессию гена, для снижения последующего закисления ферментированного молочного продукта по сравнению с ферментированным молочным продуктом, полученным без глюкозодефицитного штамма

30

Streptococcus thermophilus (St). Глюкозодефицитный штамм St может быть лактозоферментирующим.

Варианты осуществления настоящего изобретения описаны ниже посредством неограничительных примеров.

5

Перечень последовательностей

В SEQ ID NO. 1 представлена последовательность ДНК мутированного гена глюкокиназы штамма DSM 28889.

10 В SEQ ID NO. 2 представлена аминокислотная последовательность, кодируемая SEQ ID NO. 1.S

В SEQ ID NO. 3 представлена последовательность ДНК мутированного гена *ManN* штамма DSM 28889.

В SEQ ID NO. 4 представлена аминокислотная последовательность, кодируемая SEQ ID NO. 3.

15 В SEQ ID NO. 5 представлена последовательность ДНК гена *ManN* (не мутированного) штамма DSM 28889.

В SEQ ID NO. 6 представлена аминокислотная последовательность, кодируемая SEQ ID NO. 5.

20 ПРИМЕРЫ

Материалы и методы

Среда:

Используемая для *Streptococcus thermophilus* среда представляет собой среду M17, известную специалистам в данной области техники.

25

Таблица 1: Среда агар M17 имеет следующий состав на литр H₂O с конечным значением pH 7,1 ± 0,2 (25° C):

агар	12,75 г
аскорбиновая кислота	0,5 г

казеиновый пептон (триптический)	2,5 г
пентагидрат β -глицерофосфата динатрия	19 г
гидрат сульфата магния	0,25 г
мясной экстракт	5 г
мясной пептон (пептический)	2,5 г
соевый пептон (папаиновый)	5 г
дрожжевой экстракт	2,5 г

Таблица 2: Среда бульон М17 имеет следующий состав на литр H_2O и конечное значение $pH\ 7,0 \pm 0,2$ ($25^\circ C$):

аскорбиновая кислота	0,5 г
сульфат магния	0,25 г
мясной экстракт	5 г
мясной пептон (пептический)	2,5 г
глицерофосфат натрия	19 г
соевый пептон (папаиновый)	5 г
триптон	2,5 г
дрожжевой экстракт	2,5 г

- 5 Добавляемыми источниками углерода являются стерильная лактоза 20 г/л, глюкоза 20 г/л или галактоза 20 г/л.

Как известно специалисту в данной области техники, среда М17 представляет собой среду, которая считается подходящей для роста *Streptococcus thermophilus*. Кроме того, как понятно специалисту в данной области техники, в настоящем контексте концентрат М17 может быть поставлен разными поставщиками и, независимо от конкретного поставщика (в пределах стандартной неопределенности измерений), здесь будет достигаться тот же самый значимый результат резистентности к 2-дезоксиглюкозе для рассматриваемой здесь клетки, представляющей интерес.

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

- 5 **Таблица 3:** Среда агар MRS-IM имела следующий состав на литр H₂O. После автоклавирования pH доводили до 6,9±0,1 при 25°C.

Триптон	Oxoid L 42	10,0 г
Дрожжевой экстракт	Oxoid L 21	5,0 г
Tween 80	Merck nr 8.22187	1,0 г
K ₂ HPO ₄	Merck nr 105104	2,6 г
Na-ацетат	Merck nr 106267	5,0 г
Диаммоний-гидроцитрат	Merck nr 101154	2,0 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Merck nr 105882	0,2 г
MnSO ₄ ·H ₂ O	Merck nr 105941	0,05 г
Агар	SO-BI-GEL	13,0 г

- 10 **Таблица 4:** Бульон MRS-IM, используемый для жидких культур в приведенных ниже примерах, имел следующий состав на литр H₂O. pH доводят после автоклавирования до 6,9±0,1 при 25°C. Источники углерода, лактозу 20 г/л или глюкозу 20 г/л, сначала стерильно фильтровали, а затем добавляли к автоклавируемому бульону.

Триптон	Oxoid L 42	10,0 г
Дрожжевой экстракт	Oxoid L 21	5,0 г
Tween 80	Merck nr 8.22187	1,0 г
K ₂ HPO ₄	Merck nr 105104	2,6 г
Na-ацетат	Merck nr 106267	5,0 г
Диаммоний-гидроцитрат	Merck nr 101154	2,0 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Merck nr 105882	0,2 г

MnSO ₄ ·H ₂ O	Merck nr 105941	0,05 г
Агар	SO-BI-GEL	13,0 г

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

10 ПРИМЕР 1: Последующее закисление в случае коммерческой йогуртовой культуры без и с добавлением глюкозодефицитного штамма *Streptococcus thermophilus* DSM 28889.

Культуры

Культура 1: Премиум 4

Культура 2: Премиум 4 + DSM 28889

15 DSM 28889 представляет собой глюкозодефицитный, галактозо- и лактозо- ферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus*.

Премиум 4 — это коммерческая йогуртовая заквасочная культура, продаваемая Chr. Hansen A/S, включающая два глюкозоферментирующих штамма *Streptococcus thermophilus* и один глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Все три штамма являются лактозоферментирующими.

Таблица 5: Параметры процесса получения йогурта

Молочная основа	белок 4%; жир 3%; сахароза 5%
Термическая обработка молочной основы	95°C/5 мин. (Пастеризатор)
Температура ферментации	38°C
Целевое значение pH	4,60
Доза инокуляции: Стандартная культура	0,02%

Доза инокуляции: Стандартная культура + лактозодефицитный штамм	0,01% + 0,04%
Тип йогурта	термостатный йогурт

Йогуртовая заквасочная культура была протестирована с добавлением и без добавления глюкозодефицитного штамма DSM 28889 (5 раз по 2 образца) для получения йогурта в лабораторном масштабе. Молочную основу нагревали до 38°C, затем инокулировали культурами, предварительно размороженными и разведёнными в молоке перед добавлением в 3-литровые ёмкости. Инокулированную молочную основу разливали в 100-граммовые стаканчики для йогурта (в двух экземплярах) и выдерживали при 38°C в инкубаторе, а затем перемещали в холодильную камеру при достижении pH 4,6 (способ получения термостатного йогурта). В 1-й день набор стаканчиков для йогурта с тестируемыми образцами помещали в инкубатор при 13°C и хранили до 29 дней, в то время как идентичный набор стаканчиков хранили при 5°C в холодильной камере до 29 дней.

Полученные результаты

15 *Закисление*

Для культуры 1 время достижения значения pH 4,6 составило 468 минут. Для культуры 2 время достижения значения pH 4,6 составило 752 минуты.

20 *Последующее закисление*

Таблица 6: Последующее закисление (pH)

	День 0	День 9	День 15	День 23	День 29
Культура 1 (5°C)	4,64	4,46	4,45	4,45	4,4
Культура 1 (13°C)	4,64	4,32	4,25	4,24	н.д.
Культура 2 (5°C)	4,69	4,63	4,64	4,65	4,62

Культура 2 (13°C)	4,69	4,65	4,59	4,6	4,58
-------------------	------	------	------	-----	------

Последующее закисление снижалось в случае обеих тестируемых температур в присутствии DSM 28889.

5 Углеводы

Таблица 7: Углеводный профиль йогурта после хранения в течение 21 дня при 5°C (мг/грамм)

	Сахароза	Лактоза	Глюкоза	Галактоза	Фруктоза
Культура 1 (5°C)	41,9	40,8	1,6	5,7	0,0
Культура 2 (5°C)	38,4	26,8	9,7	8,5	1,0

10

РАЗРЕШЕНИЯ НА ДЕПОНИРОВАНИЕ И ЭКСПЕРТИЗУ

Заявитель требует, чтобы образец депонированных микроорганизмов, указанных ниже, мог быть предоставлен только эксперту до даты выдачи патента.

- 15 **Таблица 8:** Депозиты были сделаны в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ) GmbH, Инхоффенштрассе 7Б, D-38124 Брауншвейг, Германия.

Штамм	Инвентарный номер	Дата депонирования
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 19242	29.03.2007
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 22934	08.09.2009
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 22935	08.09.2009

<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 25838	03.04.2012
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 25850	03.04.2012
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 25851	03.04.2012
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 26722	12.12.2012
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 28889	04.06.2014
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSM 32227	08.12.2015
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	DSM 19252	03.04.2007
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	DSM 22586	19.05.2009
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	DSM 28910	12.06.2014

ССЫЛКИ

WO2006/042862

US2010/0021586

5 WO2010/139765

WO2011/026863

WO2011/092300

WO2013/160413

WO2013/169205

10 WO2015/193459

WO2017/167660

Porter et al. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 709:178-186

Godshall (1988) Food Technology 42(11):71-78

Cochu et al. (2003) Appl and Environ Microbial, 69(9):5423-5432

15 Pool et al. (2006) Metabolic Engineering 8(5):456-464

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для получения ферментированного молочного продукта, содержащая:

(i) заквасочную культуру, содержащую глюкозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus* (St) и глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb); и

(ii) глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (St), при этом указанный штамм St является галактозоферментирующим и содержит мутацию в последовательности ДНК гена *glcK*, кодирующего белок глюкокиназы, причём указанная мутация инактивирует белок глюкокиназы или оказывает негативное влияние на экспрессию указанного гена.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что последующее закисление ферментированного молочного продукта снижено по сравнению с ферментированным молочным продуктом, полученным с использованием композиции, не содержащей глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* (St) из (ii).

3. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что глюкозодефицитный штамм St является резистентным к 2-дезоксиглюкозе.

4. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что глюкозодефицитный штамм St содержит мутацию, которая снижает транспорт глюкозы в клетку.

5. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что глюкозодефицитный штамм St увеличивает количество глюкозы в 9,5% В-молоке по меньшей мере до 5 мг/мл при инокулировании в 9,5% В-молоко в концентрации 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и выращивании при 40°C в течение 20 часов.

6. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что глюкозодефицитный штамм St увеличивает количество глюкозы в 9,5% В-молоке, содержащем 0,05% сахарозы, по меньшей мере до 5 мг/мл при инокулировании в 9,5% В-

молоко, содержащее 0,05% сахарозы, в концентрации 10^6 - 10^7 КОЕ/мл и выращивании при 40°C в течение 20 часов.

5 7. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что глюкозоферментирующий и/или глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus*, является лактозоположительным.

8. Композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что глюкозоферментирующий штамм *Streptococcus thermophilus*, является лактозодефицитным.

10

9. Композиция по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что глюкозодефицитный штамм *Streptococcus thermophilus* выбран из группы, состоящей из: DSM 32227; DSM 28889; DSM 25850; DSM 25851; DSM 26722; и производных от них мутантных штаммов, причём указанные штаммы получены с использованием одного из депонированных штаммов в качестве материнского штамма, и при этом указанный мутант сохранил или дополнительно улучшил способность своего материнского штамма секретировать глюкозу.

15

10. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что глюкозоферментирующий штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* выбран из группы, состоящей из: DSM 28910; DSM 22586; и производных от них мутантных штаммов, которые дополнительно характеризуются как обладающие способностью образовывать белые колонии на среде, содержащей лактозу и X-Gal.

20

11. Способ получения ферментированного молочного продукта, включающий инокулирование и ферментирование молочного субстрата композицией по любому из пп.1-10.

25

12. Ферментированный молочный продукт, содержащий композицию по любому из пп.1-10.

30

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