

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009148016/10, 06.06.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.06.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
06.06.2007 EP EP07109708

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2011 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 20.11.2013 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: EP 111392 A3, 15.05.1985. JP 3047035 A,
28.02.1991. JP 60256341 A, 18.12.1985. US
5116737 A, 26.05.1992. RU 2290435 C1,
27.12.2006.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 11.01.2010(86) Заявка РСТ:
EP 2008/004528 (06.06.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/148561 (11.12.2008)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры", пат.пов. С.А.Дорофееву,
рег.№ 146

(72) Автор(ы):

**БЕЗЕНЖЕ Мари-Клод (FR),
ОДИНО Жан-Мари (FR),
СЕМАНДИ Сесиль (FR)**

(73) Патентообладатель(и):

КР. ХАНСЕН А/С (DK)(54) УЛУЧШЕНИЕ РОСТА БИФИДОБАКТЕРИЙ В ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ
ПРОДУКТАХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к получению ферментированного молочного продукта. Способ получения ферментированного продукта включает инокулирование молока бактериями, ферментацию молока и упаковывание готового продукта. Инокуляцию осуществляют штаммом *Bifidobacterium animalis lactis* BB-12[©] DSM 15954, бактериями *Lactobacillus bulgaricus* и штаммом *Streptococcus thermophilus* ST6008 DSM

18111. Предложена заквасочная культура, содержащая от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г штамма *Bifidobacterium animalis lactis* BB-12[©] DSM 15954, от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus* ST6008 DSM 18111 и бактерии *Lactobacillus bulgaricus*. Использование штамма *Streptococcus thermophilus* ST6008 DSM 18111 позволяет улучшить рост бифидобактерий во время ферментации при получении ферментированного молочного продукта. 4 н.

RU 2 4 9 9 0 4 1 C 2

RU 2 4 9 9 0 4 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)*A23C 9/123* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009148016/10, 06.06.2008**(24) Effective date for property rights:
06.06.2008

Priority:

(30) Convention priority:
06.06.2007 EP EP07109708(43) Application published: **20.07.2011 Bull. 20**(45) Date of publication: **20.11.2013 Bull. 32**(85) Commencement of national phase: **11.01.2010**(86) PCT application:
EP 2008/004528 (06.06.2008)(87) PCT publication:
WO 2008/148561 (11.12.2008)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. S.A.Dorofeevu, reg.№ 146**

(72) Inventor(s):

**BEZENZhE Mari-Klod (FR),
ODINO Zhan-Mari (FR),
SEMANDI Sesil' (FR)**

(73) Proprietor(s):

KR. KhANSEN A/S (DK)**(54) IMPROVEMENT OF GROWTH OF BIFIDUS BACTERIA IN FERMENTED DAIRY PRODUCTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: production method of a fermented product involves inoculation of milk with bacteria, milk fermentation and packaging of the ready product. Inoculation is performed using *Bifidobacterium animalis lactis* BB-12© DSM 15954 strain, *Lactobacillus bulgaricus* bacteria and *Streptococcus thermophilus* ST6008 DSM 18111 strain. The invention proposes a starter culture

containing 10^5 to 10^{12} CFU/g of *Bifidobacterium animalis lactis* BB-12© DSM 15954 strain, 10^5 to 10^{12} CFU/g of *Streptococcus thermophilus* ST6008 DSM 18111 strain and *Lactobacillus bulgaricus* bacteria.

EFFECT: use of *Streptococcus thermophilus* ST6008 DSM 18111 strain allows improving growth of bifidus bacteria during fermentation at production of a fermented dairy product.

13 cl, 2 tbl, 1 ex

Настоящее изобретение относится к улучшению роста бифидобактерий в ферментированных молочных продуктах за счет выбора бактериальных штаммов.

Молочные продукты и, в частности продукты, подобные йогурту, несомненно, образуют наибольший сегмент рынка пробиотических продуктов. Молочные продукты представляют собой превосходные продукты для доставки пробиотических бактерий, таких как бифидобактерии, и введения их в желудочно-кишечный тракт.

Bifidobacterium BB-12[®] является хорошо известной пробиотической бактерией. В случае BB-12[®] доступные клинические данные указывают, что требуется, по меньшей мере, 10⁸ КОЕ живых пробиотических бактерий на грамм ферментированного молочного продукта (например, ферментированного молочного йогуртного продукта).

В EP111392B1 описывается выбор штамма дикого типа *Streptococcus thermophilus* с относительно высоким уровнем потребления кислорода, что позволяет, таким образом, улучшить выживаемость собственно анаэробных видов бифидобактерий при комбинировании их со штаммом *Streptococcus* в процессе ферментации молока.

Проблема, решаемая настоящим изобретением, относится к способу улучшения роста популяции бифидобактерий в молоке в процессе ферментации для получения ферментированных молочных продуктов (например, йогурта) с получением большого количества клеток бифидобактерий в готовом продукте.

Решение основывается на неожиданном открытии авторами настоящего изобретения того, что конкретный штамм *Streptococcus thermophilus* ST6008 (DSM 18111) значительно улучшает рост бифидобактерий в процессе ферментации молока. Использование этого штамма позволяет получить ферментированный молочный продукт, содержащий более чем 10⁸ КОЕ/г бифидобактерий (непосредственно после ферментации). Следовательно, отсутствует необходимость в добавлении дополнительных бифидобактерий по окончании ферментации для получения продукта с 10⁸ КОЕ/г бифидобактерий.

Авторы настоящего изобретения протестировали ряд различных *S. thermophilus* (всего 16) и обнаружили, что только штамм *Streptococcus thermophilus* (ST6008), депонированный как DSM18111, значительно улучшает рост бифидобактерий в процессе ферментации молока. При этом некоторые другие штаммы *Streptococcus thermophilus* оказывают негативное воздействие на рост бифидобактерий.

Дополнительно, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что ST6008 имеет уникальную характеристику, заключающуюся в том, что он может быть введен в молоко в очень большом количестве КОЕ/г (и размножается с большим количеством клеток) без изменения характеристик ферментированного молока, таких как pH, и не вызывает нарастания кислотности. Другие тестированные штаммы ST не обладают таким дополнительным преимуществом.

Следовательно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, который включает, по меньшей мере, 10⁸ КОЕ бифидобактерий на грамм ферментированного молочного продукта, включающий:

i) инокулирование молока культурой (такой как йогуртная культура), включающей, по меньшей мере, один штамм *Streptococcus thermophilus*, по меньшей мере, один штамм бифидобактерий и возможно, по меньшей мере, один штамм *Lactobacillus bulgaricus*, где один указанный штамм *Streptococcus thermophilus* выбирают из группы, состоящей из: штамма *Streptococcus thermophilus* ST6008 с депозитарным номером DSM18111, мутанта ST6008 и варианта ST6008;

ii) ферментацию молока в подходящих условиях; и

iii) возможно, расфасовку подходящего количества ферментированного молочного продукта в подходящую упаковку. В предпочтительном варианте воплощения настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного
 5 молочного продукта, включающего, по меньшей мере, 10^8 КОЕ бифидобактерий на грамм ферментированного молочного продукта, включающий:

i) инокулирование молока йогуртной культурой, включающей, по меньшей мере, один штамм *Lactobacillus bulgaricus*, по меньшей мере, один штамм *Streptococcus thermophilus* и, по меньшей мере, один штамм бифидобактерий, где один указанный штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой штамм *Streptococcus thermophilus* ST6008 с депозитарным номером DSM 18111;

ii) ферментацию молока в подходящих условиях с получением ферментированного
 15 молочного продукта, содержащего, по меньшей мере, 10^8 КОЕ бифидобактерий на грамм ферментированного молока; и

iii) расфасовку подходящего количества ферментированного молочного продукта в подходящую упаковку.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к штамму ST6008 и его
 20 мутантам/вариантам, и к культуре (такой как заквасочная культура), включающей штамм по настоящему изобретению, возможно, вместе с другим штаммом, таким как штамм *Bifidobacterium* (например, BB-12). Предпочтительная композиция включает i) BB-12 от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г и ii) ST6008 от 10^{10} до 10^{12} КОЕ/г.

Настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного
 25 молочного продукта, включающему:

i) инокулирование молока штаммом *Bifidobacterium* и штаммом *Streptococcus thermophilus*, выбранным из группы, состоящей из: штамма *Streptococcus thermophilus* ST6008 с депозитарным номером DSM 18111, мутанта ST6008 и варианта ST6008
 30 (такого как мутант/вариант штамма, который имеет одну или более (предпочтительно все) характеристик штамма *S. thermophilus* ST6008, например, мутант и/или вариант штамма, способный промотировать рост штамма *Bifidobacterium*);

ii) ферментацию молока в подходящих условиях; и

iii) возможно, добавление дополнительных микроорганизмов и/или добавок в
 35 ферментированное молоко; и

iv) возможно, расфасовку ферментированного молочного продукта. В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения стадия i) дополнительно включает инокуляцию молока штаммом *Lactobacillus bulgaricus*.

В другом варианте воплощения настоящее изобретение относится к способу
 40 получения ферментированного молочного продукта, который включает, по меньшей мере, 10^8 КОЕ бифидобактерий на грамм ферментированного молочного продукта, включающий:

i) инокулирование молока культурой (такой как йогуртная культура), включающей,
 45 по меньшей мере, один штамм *Streptococcus thermophilus*, по меньшей мере, один штамм *Bifidobacterium* и возможно, по меньшей мере, один штамм *Lactobacillus bulgaricus*, где один указанный штамм *Streptococcus thermophilus* выбирают из группы, состоящей из: штамма *Streptococcus thermophilus* ST6008 с депозитарным номером DSM
 50 18111, мутанта ST6008 и варианта ST6008;

ii) ферментацию молока в подходящих условиях; и

iii) возможно, расфасовку подходящего количества ферментированного молочного продукта в подходящую упаковку.

В другом варианте воплощения настоящее изобретение относится к способу получения ферментированного молочного продукта, включающего, по меньшей мере, 10^8 КОЕ бифидобактерий на грамм ферментированного молочного продукта, включающий:

i) инокулирование молока йогуртной культурой, включающей, по меньшей мере, один штамм *Lactobacillus bulgaricus*, по меньшей мере, один штамм *Streptococcus thermophilus* и, по меньшей мере, один штамм *Bifidobacterium*, где один указанный штамм *Streptococcus thermophilus* представляет собой штамм *Streptococcus thermophilus* ST6008 с депозитарным номером DSM 18111;

ii) ферментацию молока в подходящих условиях с получением ферментированного молочного продукта, содержащего, по меньшей мере, 10^8 КОЕ бифидобактерий на грамм ферментированного молока; и

iii) расфасовку подходящего количества ферментированного молочного продукта в подходящую упаковку.

Штамм *Bifidobacterium* предпочтительно принадлежит к видам, выбранным из группы, состоящей из *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* и *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, и предпочтительным штаммом *Bifidobacterium* является штамм подвида *lactis* *Bifidobacterium animalis*. Примерами штаммов являются штаммы, выбранные из группы, состоящей из CHCC5445 (BB-12) с депозитарным номером DSM 15954, CHCC 7158 (HN019 депонированный под номером DSM 17280), штамма *Bifidobacterium* с депозитарным номером ATCC 27536, штамма *Bifidobacterium infantis* Bbi99 (DSM 13692), BB-420, BI-04, CHCC2037, LAFTI B-94, DN 173 010, STB- 2938, R0071, R0175, и BB-46, и мутанта любого из этих штаммов.

В предложенном варианте воплощения настоящего изобретения полученный ферментированный молочный продукт содержит, по меньшей мере, 10^8 КОЕ бифидобактерий на грамм ферментированного молочного продукта по окончании ферментации и/или ферментированный молочный продукт содержит, по меньшей мере, 10^8 КОЕ/г бифидобактерий после 28 дней хранения при температуре $+6^{\circ}\text{C}$.

Согласно предпочтительному варианту воплощения способа по настоящему изобретению молоко на стадии i) инокулируют от 10^5 до 3×10^7 КОЕ/г *Bifidobacterium* и/или от 10^4 до $3,5 \times 10^6$ КОЕ/г *Streptococcus thermophilus*. Молоко может быть одновременно инокулировано этими видами бактерий.

Предпочтительно инокулировать молоко заквасочной культурой, включающей оба вида бактерий.

В другом варианте воплощения настоящего изобретения молоко дополнительно инокулируют, по меньшей мере, одним штаммом, таким как штамм *Lactococcus lactis* subs, *lactis* (например, выбранный из группы, состоящей из *Lactococcus lactis* subs, *lactis* DN224; *Lactococcus lactis* subs, *lactis* DN223; и мутантом или вариантом штамма любого из них). Предпочтительно, чтобы этот дополнительный организм-помощник представлял собой штамм *Lactococcus lactis* subs, *lactis*, выбранный из группы, состоящей из *Lactococcus lactis* subs, *lactis* DN224, *Lactococcus lactis* subs, *lactis* DN223.

Продукт, полученный способом по настоящему изобретению, может быть определен, как «йогурт», то есть, когда молоко инокулировано обоими штаммами: и штаммом *Lactobacillus bulgaricus*, и штаммом *Streptococcus thermophilus*.

Ферментированный молочный продукт (такой как йогурт) предпочтительно расфасован в укупоренную упаковку, содержащую от 25 до 3000 мл продукта, такую

как от 50 до 1000 мл.

Также настоящее изобретение относится к культуре (такой как заквасочная культура), включающей BB-12 от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г и ST6008 от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г.

Дополнительно культура может включать DN224 или DN223 от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к ферментированному молочному продукту, получаемому способом по настоящему изобретению, и ферментированному молочному продукту, включающему штамм *Streptococcus thermophilus*, выбранный из группы, состоящей из ST6008 (DSM18111); мутанта ST6008; и варианта ST6008. Предпочтительно ферментированный молочный продукт по настоящему изобретению включает от 10^3 до 10^{10} КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus*. Ферментированный молочный продукт по настоящему изобретению дополнительно может включать от 10^3 до 10^{10} КОЕ/г бифидобактерий и/или от 10^3 до 10^{10} КОЕ/г штамма *Lactococcus lactis* subs. *lactis* (такого как DN224 или DN223).

В последнем аспекте настоящее изобретение относится к штамму *Streptococcus thermophilus*, выбранному из группы, состоящей из ST6008 (DSM18111), мутанта ST6008 и варианта ST6008 (такого как мутант/вариант штамма, который имеет одну или более (предпочтительно все) характеристик штамма *S. thermophilus* ST6008, например, мутант/вариант штамма способен промотировать рост штамма *Bifidobacterium* (в частности, BB-12). Штамм может быть выделен, например, по существу свободен от других штаммов бактерий.

Бифидобактерии

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения бифидобактерии представляют собой, по меньшей мере, одну бифидобактерию, выбранную из группы, состоящей из *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* и *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. Также может быть использована смесь, включающая два или более указанных выше штаммов.

В предпочтительном варианте способа по изобретению штамм *Bifidobacterium* представляет собой штамм *Bifidobacterium animalis* подвида *lactis*. В частности, штамм *Bifidobacterium animalis* подвида *lactis* BB-12 (CHCC5445), депонированный под номером DSM 15954.

Другой предпочтительный штамм *Bifidobacterium animalis* подвида *lactis* представляет собой штамм HN019 (также известный как DR-10TM или HOWARUTM). Штамм выделен из коммерчески доступной смеси для детского питания под торговой маркой Fernleaf DR-10 bifidus, продававшейся в Тайване в 2000 году. Он имеет депозитарный номер CHCC7158 в коллекции культур Hansen и депонирован в DSMZ под номером DSM 17280.

Измерение КОЕ/г бифидобактерий

Измерение количества клеток бифидобактерий КОЕ/г проводят, подсчитывая количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в сериях разведений ферментированного продукта, колонии подсчитывают на агаровых пластинах, согласно стандартным способам, известным из предшествующего уровня техники. Подходящая среда и условия инкубирования приведены ниже:

Среда: MRS (de Man et al. 1960. J. Appl. Bacteriol. 23: 130) без кислоты + 1% диклоксациллин (SIGMA D-9016) + 1% цистеин (MERCK n° 2839); и

Инкубирование: 3 дня при температуре 37°C в анаэробных условиях.

Как указано выше, применение ST6008 обеспечивает возможность получения

более чем 10^8 КОЕ/г бифидобактерий непосредственно за счет роста бифидобактерий в процессе ферментации. Следовательно, по меньшей мере, 10^8 КОЕ/г бифидобактерий стадии ii) первого аспекта относятся к КОЕ/г бифидобактерий, полученных непосредственно после ферментации.

Как показано в демонстрационных примерах, *Bifidobacterium* BB-12 имеет хороший показатель выживаемости при совместном росте с ST6008.

Следовательно, в предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения ферментированный молочный продукт содержит, по меньшей мере, 10^8 КОЕ/г бифидобактерий после 1 дня хранения при температуре $+6^\circ\text{C}$, более предпочтительно, по меньшей мере, 10^8 КОЕ/г бифидобактерий после 7 дней хранения при температуре $+6^\circ\text{C}$, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 10^8 КОЕ/г бифидобактерий после 14 дней хранения при температуре $+6^\circ\text{C}$, даже еще более предпочтительно, по меньшей мере, 10^8 КОЕ/г бифидобактерий после 21 дня хранения при температуре $+6^\circ\text{C}$, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 10^8 КОЕ/г бифидобактерий после 28 дней хранения при температуре $+6^\circ\text{C}$.

Подходящие условия ферментации

Специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение, известны подходящие условия для ферментации молока соответствующими бактериями.

Подходящие условия включают, например, такие, при которых молоко инокулируют бактериями и ферментируют при температуре от 38°C до 43°C , оптимально при температуре 40°C , до достижения pH от 4,4 до 4,6 (после около 8 часов).

Охлаждение молока до температуры $+6^\circ\text{C}$ останавливает ферментацию и рост соответствующих бактерий, таких как бифидобактерии.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения улучшенный рост достигается инокулированием от 10^5 до 3×10^7 КОЕ/г *Bifidobacterium*; и одновременным инокулированием ST6008 в концентрации от 10^4 до $3,5 \times 10^6$ КОЕ/г.

Если требуется, могут быть добавлены дополнительные бактерии (например, дополнительные *Bifidobacterium*) в некоторых случаях (например, по окончании ферментации).

Ферментированный молочный продукт

Как известно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение, при ферментации молока может быть получено множество различных ферментированных молочных продуктов.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения ферментированный молочный продукт представляет собой продукт, выбранный из группы, состоящей из йогурта, питьевого йогурта, йогурта с нарушенным сгустком, не перемешенного натурального йогурта и йогурта, аналогичного питьевому, простокваши, кефира, сметаны, свежего сыра и сыра. Ферментированное молоко включает, по меньшей мере, 10^8 КОЕ/г бифидобактерий, как указано выше, а также может быть использовано в качестве пищевой добавки, например, в другие пищевые продукты, такие как творожный сыр, шоколад, соки, мясные продукты и сухие молочные смеси для детского питания.

Lactobacillus bulgaricus

В контексте настоящего изобретения *Lactobacillus bulgaricus* может быть любым подходящим (например, коммерчески доступным) штаммом *Lactobacillus bulgaricus*.

Как известно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение, он может быть инокулирован в адекватных количествах с получением адекватного количества *Lactobacillus bulgaricus* в готовом ферментированном молочном продукте.

Добавление других видов бактерий, таких как штаммы-помощники.

В способе по настоящему изобретению могут быть добавлены интересные бактерии. Такие бактерии могут быть добавлены во время ферментации или по ее окончании.

Примеры таких дополнительных бактерий включают бактерии, выбранные из группы, состоящей из *Lactococcus* и *Lactobacillus*.

Предпочтительным *Lactobacillus* является штамм *Lactobacillus acidophilus*, такой как LA-5[®] (коммерчески доступный от Chr. Hansen A/S, Дания).

Как описано в WO98/54337 (Chr. Hansen, запатентовано как EP0985043 B1), организм-помощник, представляющий молочнокислую бактерию, дефектную по пируватному метаболизму, может быть добавлен во время ферментации, что позволяет получить множество преимуществ, включая увеличение срока хранения бактерии.

Штаммы DN224 (депонированный как DSM 11037) и DN223 (депонированный как DSM 11036), дефектные по пируватному метаболизму, как описано, являются примерами подходящих бактериальных организмов-помощников.

Следовательно, в предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения молочнокислый бактериальный организм-помощник, дефектный по пируватному метаболизму, также добавлен в молоко для ферментации, как описано здесь.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения молочнокислый бактериальный организм-помощник представляет собой бактерию, выбранную из группы, состоящей из штамма *Lactococcus lactis* подвида *lactis* DN223, депонированного под номером DSM 11036 и штамма *Lactococcus lactis* подвида *lactis* DN224 (депонированный как DSM 11037). Наиболее предпочтительно молочнокислый организм-помощник представляет собой DN224.

Вариант воплощения настоящего изобретения относится к культуре, включающей:

i) BB-12 от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г и

ii) ST6008 от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г

iii) DN224 от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г

Депонированные микроорганизмы

Штамм *Streptococcus thermophilus* ST6008

Образец штамма (ST) *Streptococcus thermophilus* (ST) штамм ST6008, депонированного в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и культур клеток, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Германия) под номером DSM 18111 29 марта 2006. Депонирование осуществлено согласно условиям Будапештского Договора о признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

Заявитель указывает, чтобы образец депонированных организмов мог быть доступен только для выдачи образца эксперту, уполномоченному заявителем и/или патентным ведомством.

Определения

В контексте настоящего изобретения йогуртная заквасочная культура представляет собой бактериальную культуру, включающую, по меньшей мере, один штамм *Lactobacillus bulgaricus* и, по меньшей мере, один штамм *Streptococcus thermophilus*. В соответствии с терминологией описания настоящего изобретения

йогурт представляет собой ферментированный молочный продукт, получаемый инокулированием и ферментацией молока штаммом *Lactobacillus bulgaricus* и штаммом *Streptococcus thermophilus*.

В контексте настоящего изобретения термин «расфасовка» (подходящее количество) ферментированного молока в подходящую упаковку относится к готовому расфасованному ферментированному молоку с получением продукта, который может быть потреблен, например, потребителем. В этом случае ферментированный молочный продукт представляет собой питьевой йогурт, расфасованный, например, в маленький контейнер, например, 100 мл.

В контексте настоящего изобретения термин «мутант» относится к штамму, полученному из штамма по настоящему изобретению, например, генной инженерией, облучением и/или обработкой химическими реагентами. Предпочтительно мутант представляет собой функциональный эквивалент штамма, например, мутант по существу обладает теми же свойствами промотировать рост *Bifidobacterium*, что и материнский штамм. Такой мутант является частью настоящего изобретения. В частности, термин «мутант» относится к штамму, полученному обработкой штамма ST6008 по настоящему изобретению любой традиционной обработкой, вызывающей мутацию, включающей обработку химическим мутагеном, таким как этан-метан-сульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ-светом или спонтанно происходящая мутация.

В контексте настоящего изобретения термин «вариант» относится к штамму, который представляет собой функциональный эквивалент материнского штамма. Например, под вариантом ST6008 можно понимать штамм *Streptococcus thermophilus*, являющийся функциональным эквивалентом ST6008, например, обладающий теми же свойствами или по существу теми же свойствами промотировать рост *Bifidobacterium*, как и материнский штамм. Такой вариант является частью настоящего изобретения.

В настоящем документе и формуле изобретения глагол «включать» и его формы следует интерпретировать в открытом, а не закрытом значении, если ясно не указано иное. И использованные здесь и в приложенной формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если в контексте ясно не просматривается иное. Кроме того, единственное число подразумевает, по меньшей мере, один. Указанные здесь пределы показателей включают каждый из них отдельно, если ясно не указано иное, и каждый из них входит в объем притязаний по настоящему изобретению. Все способы, описанные здесь, могут быть осуществлены любым подходящим образом, если ясно не указано иное или это не противоречит контексту. Все приведенные здесь примеры, в том числе введенные словами, например, «такой как», используются здесь только для иллюстрации и не ограничивают объем притязаний настоящего изобретения. Любые элементы, приведенные в описании настоящего изобретения или заявленные в приложенной формуле изобретения, не ограничивают объем притязаний настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Улучшение роста при использовании *Streptococcus thermophilus* ST6008

Материалы и методы

Количество бактерий на 100л молока:

В 100 (10^5 мл) литров молока добавляют 10 г BB-12[®] 10^{11} КОЕ/г. Это дает, в результате, в молоке 10^7 КОЕ/г BB-12[®]. Для ST6008 используется та же процедура, 2 г ST6008 содержат от 10^9 до 10^{10} КОЕ/г в тех же 100 литрах молока, достигая, таким образом, конечной концентрации от 2×10^4 до 2×10^5 КОЕ/г ST6008. Для DN224, 10^{11}

КОЕ/г добавляют 3 грамма (или мл) в 100 литров (10^5 мл), таким образом, 3×10^6 КОЕ/г.

Ферментируют при температуре 40°C до достижения pH 4,55 в течение около 8 часов. Затем продукт перемешивают и расфасовывают в стаканчики, хранят при

температуре +6°C для исследования лежкоспособности (вплоть до 45 дней).

Эксперименты проводят с образцами йогурта объемом 200 мл и 3 литра.

Таблица 1

Йогуртные культуры, используемые в экспериментах

Название эксперимента	Уровень инокуляции йогуртной культуры	Название йогуртной культуры	ST6008, 2 г/100 л молока	DN224, 3 г/100 л молока	Bifidobacterium BB-12®, 10 г/100 л молока конечная
CH YT1	20 г/100 л молока	F-DVS YFL-702			x
CH YT1+DN224	20 г/100 л молока	F-DVS YFL-702		x	x
Special YT, включая DN224 и ST6008	20 г/100 л молока	Special YT			x
CH YT1+ST6008	20 г/100 л молока	F-DVS YFL-702	x		x
CH YT2	20 г/100 л молока	F-DVS Y-051054			x
CH YT2+DN224	20 г/100 л молока	F-DVS Y-051054		x	x
CH YT2+ST6008	20 г/100 л молока	F-DVS Y-051054	x		x

F-DVS YFL-702 представляет собой коммерческую йогуртную культуру, доступную от Chr. Hansen A/S, Дания, содержащую *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*.

Special YT: экспериментальная йогуртная культура, содержащая *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* ST6008, *Lactococcus lactis* DN224.

F-DVS Y-051054 представляет собой коммерческую йогуртную культуру, доступную от Chr. Hansen A/S, Дания, содержащую *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*.

Подсчет количества клеток BB-12 проводят, разводя образцы йогурта в триптоновом разбавителе, с последующим посевом соответствующих титров на не кислый MRS агар с добавлением 1% диклоксациллина (Sigma D-9016) и 1% цистеина HCl. Агаровые пластинки инкубируют в течение 3 дней при температуре 37°C в анаэробных условиях.

Результаты

Результаты приведены в Таблице 2

Таблица 2

Улучшенный рост BB-12® и стабильность в ферментированном молочном продукте

		D+	D+	D+	D+	D+	D+
Объем 200 мл	CH YT1	4,30E+07	4,30E+07	4,30E+07	3,45E+07	7,50E+06	5,55E+06
	CH YT1+DN224	1,31E+08	8,80E+07	6,70E+07	7,55E+07	3,50E+07	2,69E+07
	Special YT, включая DN224/ST6008	2,73E+08	2,88E+08	1,37E+08	1,22E+08	1,30E+08	8,00E+07
Объем 3 л	CH YT1	8,50E+07	7,40E+07	5,90E+07	6,00E+07	3,70E+07	3,20E+07
	CH YT1+DN224	7,80E+07	9,20E+07	8,00E+07	7,20E+07	5,30E+07	2,40E+07
	CH YT1+ST6008	1,37E+08	1,28E+08	1,20E+08	1,10E+08	1,04E+08	8,00E+07
	CH YT2	5,60E+07	1,55E+07	1,90E+07	1,30E+07	2,45E+07	2,40E+07
	CH YT2+DN224	1,11E+08	1,08E+08	9,20E+07	6,30E+07	5,50E+07	4,80E+07
	CH YT2+ST6008	1,14E+08	1,17E+08	1,23E+08	9,60E+07	1,16E+08	5,90E+07
	Special YT, включая DN224/ST6008	1,19E+08	1,22E+08	1,58E+08	1,25E+08	1,38E+08	1,02E+08

Результаты показывают, что ST6008 значительно улучшает рост BB-12. D+1, D+7, ..., D+45 показывает количество бифидобактерий (КОЕ/г) после 1, 7, ..., 45 дней хранения при температуре +6 градусов Цельсия. Результаты показали улучшенный

рост и стабильность BB-12 в ферментированном молочном продукте, полученном при использовании заквасочной культуры, включающей ST6008 по настоящему изобретению, по сравнению с коммерчески доступными заквасочными культурами без ST6008. Как видно из Таблицы 2, при использовании ST6008 может быть получено

более 10^8 КОЕ/г *Bifidobacterium* (здесь BB-12).

Улучшение роста BB-12 добавлением ST6008

Из Таблицы 2 ясно видно, что ST6008 оказывает улучшающее воздействие на рост при получении йогурта СНУТ1.

Объем 3 л:

Как указано для СНУТ1, сразу после дня D+1, уровни BB-12 значительно возросли при использовании ST6008 ($1,37 \times 10^8$ КОЕ/г с ST6008) по сравнению с $7,8 \times 10^7$ КОЕ/г без ST6008. Кроме того, этот уровень 10^8 КОЕ/г продержался затем вплоть до 28 дней хранения.

Аналогичное воздействие отмечено для СНУТ2

Заключение:

ST6008 улучшает рост *Bifidobacterium* BB-12[®] во время ферментации, по меньшей мере, до 10^8 КОЕ/г в ферментированных молочных продуктах.

Указанные здесь предпочтительные варианты воплощения настоящего изобретения включают наилучшие способы их воплощения, известные авторам настоящего изобретения. Варианты этих предпочтительных выполнений по настоящему изобретению будут ясны для специалиста в области, к которой относится настоящее изобретение, при чтении указанного выше описания. Специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение, может использовать такие варианты как подходящие, то есть настоящее изобретение может быть осуществлено иными способами, чем указано выше. Следовательно, в объем настоящего изобретения входят все модификации и эквиваленты приведенных вариантов воплощения настоящего изобретения в рамках, позволенных законом. Дополнительно, любые комбинации указанных выше элементов во всех возможных вариантах входят в объем притязаний настоящего изобретения, если ясно не указано иное или это не противоречит контексту.

ССЫЛКИ:

1. EP111392B1

2. WO98/54337 (Chr. Hansen) 3. Saxelin M. et al.: The technology of probiotics. Trends in food science and technology, vol. 10, 1991, pages 387-392

4. Martin-Diana A. B. et al.: Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. Int. Dairy J., vol. 13, 2003, pages 827-833 5. US 4588595 A (Okonogi Shigeo (JP) et al)

6. US 2005/031735 A1 (Serata Masaki (JP) et al)

7. US 4187321 A (Mada Mitsuo (JP) et al)

8. US 5230912 A (Yajima Masako (JP) et al)

Все ссылки, приведенные в настоящем патентном документе, приведены здесь в полном объеме.

Формула изобретения

1. Способ получения ферментированного молочного продукта, включающий:

- i) инокулирование молока штаммом *Bifidobacterium animalis lactis* BB-12© с регистрационным номером DSM 15954, бактериями *Lactobacillus bulgaricus* и штаммом *Streptococcus thermophilus*, ST6008 с регистрационным номером DSM 18111;
- ii) ферментацию молока; и

iii) упаковывание ферментированного молочного продукта.

2. Способ по п.1, в котором ферментированный молочный продукт содержит по меньшей мере 10^8 КОЕ/г бифидобактерий.

3. Способ по п.1, в котором ферментированный молочный продукт содержит по меньшей мере 10^8 КОЕ/г бифидобактерий после 28 дней хранения при температуре + 6°C.

4. Способ по п.1, в котором на стадии i) молоко инокулируют от 10^5 до $3 \cdot 10^7$ КОЕ/г *Bifidobacterium*, и инокулируют от 10^4 до $3,5 \cdot 10^6$ КОЕ/г штаммом *Streptococcus thermophilus* ST6008.

5. Способ по п.1, в котором на стадии i) молоко дополнительно инокулируют по меньшей мере штаммом *Lactococcus lactis* подвид *lactis* DN224.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором ферментированный молочный продукт упаковывают в герметичную упаковку, содержащую от 25 до 3000 мл продукта.

7. Заквасочная культура, содержащая:

i) от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г штамма *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis* BB-12© с регистрационным номером DSM 15954,

ii) от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г штамма *Streptococcus thermophilus*, ST6008 с регистрационным номером DSM 18111, и

iii) бактерии *Lactobacillus bulgaricus*.

8. Заквасочная культура по п.7, дополнительно содержащая:

iii) от 10^5 до 10^{12} КОЕ/г штамма *Lactococcus lactis* подвид *lactis* DN224.

9. Ферментированный молочный продукт, содержащий штамм *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis* BB-120 с регистрационным номером DSM 15954, бактерии *Lactobacillus bulgaricus* и штамм *Streptococcus thermophilus* ST6008 с регистрационным номером DSM 18111.

10. Ферментированный молочный продукт по п.9, содержащий от 10^3 до 10^{10} КОЕ/г указанного штамма *Streptococcus thermophilus*.

11. Ферментированный молочный продукт по п.9 или 10, дополнительно содержащий от 10^3 до 10^{10} КОЕ/г бифидобактерий и/или от 10^3 до 10^{10} КОЕ/г штамма *Lactococcus lactis* подвид *lactis* DN224.

12. Штамм *Streptococcus thermophilus* ST6008, депонированный в коллекции DSMZ с регистрационным номером DSM 18111 для получения закваски для приготовления ферментированного молочного продукта.

13. Штамм по п.12 в выделенной форме.