

ÖZET**ASİTLEŞME SONRASINA YÖNELİK GELİŞMİŞ KONTROLE SAHİP
BİR FERMENTE SÜT ÜRÜNÜNÜN ÜRETİLMESİ İÇİN YÖNTEM**

5

Mevcut buluş, bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik olan, süütün fermente edildiği bir adımı içeren yöntemleri sağlamaktadır, burada: (a) fermentasyon, bir başlatıcı kültürü ile başlatılmaktadır, başlatıcı kültürü, sütte mevcut bir veya birden fazla karbonhidratı metabolize edebilen laktik asit bakterileri içermektedir, (b) fermentasyon sırasında bir veya birden fazla karbonhidratın konsantrasyonunun azalması ile fermentasyon sonlandırılmaktadır ve (c) azalma en azından laktik asit bakterilerinin metabolik aktivitesinden kaynaklanmaktadır.

İSTEMLER

1. Sütün fermente edildiği bir adımı içeren, bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik yöntem olup, burada:

5

(a) fermentasyon, bir başlatıcı kültür ile başlatılmakta olup, başlatıcı kültür, süte eklenen bir veya birçok karbonhidratı metabolize edebilen laktik asit bakterileri içermektedir,

10

(b) fermentasyon sırasında bir veya birçok karbonhidratın konsantrasyonunun bir azalması ile fermentasyon sonlandırılmaktadır, burada fermentasyonun sonlandırılması, fermente edilecek olan sütteki karbonhidratların konsantrasyonu ile kontrol edilmektedir ve burada fermentasyonun sonlandırılmasında, laktik asit bakterileri ile metabolize edilen karbonhidrat konsantrasyonu, 5 mg/g ve 0.01 mg/g arasındaki bir aralıkta bulunmaktadır,

15

(c) azalma ayrıca, en azından laktik asit bakterilerinin metabolik aktivitesinden kaynaklanmaktadır ve

20

(d) fermentasyon, en az bir laktozu yetersiz *Streptococcus thermophilus* ve en az bir laktozu yetersiz *Lactobacillus delbrueckii* alt tür *bulgaricus* içeren bir başlatıcı kültürün kullanıldığı bir yöntem vasıtasıyla uygulanmaktadır, burada karbonhidrat, laktozdan farklı, fermente edilebilir bir karbonhidrattır.

25

2. Laktik asit bakterilerinin, laktozu metabolize edemediği ve başlatıcı kültürün ilave edilmesinden önce, sütteki laktik asit ile metabolize edilebilen karbonhidratların toplam konsantrasyonunun 45mg/g miktarının altında olduğu, istem 1'e göre bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik yöntem.

30

3. Fermentasyonun, 30 ve 45 °C arasındaki bir sıcaklıkta gerçekleştirildiği, istemler 1 ila 2'den herhangi birine göre bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik yöntem.

4. Fermentasyonun sonlandırılmasının ardından, fermente ürünün, 15 ve 45 °C arasında bir sıcaklıkta paketlenildiği, istemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik yöntem.

5

5. İzole LAB suşu olup, aşağıdakiler ile karakterize edilmektedir:

(a) bir *Streptococcus thermophilus* suşu olup, suş:

10

- (i) DSM 28952 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suştur; veya

15

(b) bir *Streptococcus thermophilus* suşu olup, suş:

- (i) DSM 28953 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suştur.

20

6. Fermente gıda ürünü olup, aşağıdaki suşlardan birini veya birçoğunu içermektedir:

(a) bir *Streptococcus thermophilus* suşu olup, suş:

25

- (i) DSM 28952 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suştur; veya

30

(b) bir *Streptococcus thermophilus* suşu olup, suş:

5 (i) DSM 28953 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suştur;
ve tercihe bağlı olarak

(c) bir *Lactobacillus delbrueckii* türü *bulgaricus* suşu olup, suş:

10 (i) DSM 28910 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suştur.

7. Bir bileşim olup, aşağıdakileri içermektedir:

15 (a) *Streptococcus thermophilus* suşu olup, suş:

20 (i) DSM 28952 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suştur;
veya

(b) *Streptococcus thermophilus* suşu, suş:

25 (i) DSM 28953 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suştur;

ve

30 (c) bir *Lactobacillus delbrueckii* türü *bulgaricus* suşu olup, suş:

(i) DSM 28910 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-

24946.37

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanana suştur.

5

TARİFNAME**ASİTLEŞME SONRASINA YÖNELİK GELİŞMİŞ KONTROLE SAHİP
BİR FERMENTE SÜT ÜRÜNÜNÜN ÜRETİLMESİ İÇİN YÖNTEM**

5

TEKNİK ALAN

Mevcut buluş, bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik olan, süütün, laktik asit bakterilerini içeren bir başlatıcı kültür vasıtasıyla fermente edildiği ve fermentasyonun, laktik asit bakterileri ile metabolize edilebilen karbonhidratların konsantrasyonunun azaltılması vasıtasıyla sonlandırıldığı adımları içeren yöntemlerle ilgilidir. Mevcut buluşun yöntemleri, örneğin bir diğer işlem ve depolama sırasında fermentasyonun sonlandırılmasının ardından bakterilerin yol açtığı asitleştirme benzeri asitleştirme sonrası gelişmiş bir kontrolü sağlamaktadır.

15

ÖNCEKİ TEKNİK

Fermente süt ürünlerinin üretilmesine yönelik çoğu mevcut yöntem, aşağıdaki adım dizisi ile karakterize edilebilmektedir:

20

(a) süt sütte mevcut laktozdan elde edilen glikozu metabolize edebilen laktik asit bakterileri (veya LAB) içeren bir başlatıcı kültür kullanılarak fermente edilmektedir;

(b) fermentasyon, laktik asit üretimine neden olmaktadır, bu da ilk olarak 6.4 ila 6.8 aralığında bir Ph'ın (inek sütü için) bir 3.8 ve 4.7 pH aralığına azalmasına neden olmaktadır;

(c) fermentasyon, söz konusu fermente ürünü için istenilen pH'a ulaşıldığında, fermente süt ürünün hızlı bir şekilde soğutulması ile sonlandırılmaktadır.

30 Bu yöntem, örneğin yoğurt ve yoğurtlu içecekleri üretmek için kullanılmaktadır.

Önceden belirlenmiş bir pH değerinde fermente süt ürününün hızlı bir şekilde soğutulması, fermentasyonu sonlandırmak için uygulanmaktadır. Fermente ürün soğutulmadan fermentasyona devam edecektir. Fakat hızlı soğutma, doku kaybına yol açtığı için dezavantajlara sahip olmaktadır. Bir hızlı soğutma 5 adımından kaçınılması da bir ünite çalışmasını yedekleyecektir ve bu şekilde üretim maliyetlerini azaltacaktır.

Hızlı bir soğutma adımını içeren yöntemlerde bile, asitleştirme sonrası, örneğin fermentasyonun sonlandırılmasının ardından, örneğin istenilen pH'a ulaşılmasının ardından LAB vasıtasıyla laktik asit üretimi gözlemlenmektedir. Asitleşme 10 sonrasının, günümüzde süt ürünlerinin fermentasyonu sırasında en önemli problemlerden birisini temsil ettiği düşünülmektedir. Fermente süt ürününün işlenmesi ve depolanması sırasında pH değerinin daha da azalması, yükselmiş asit ve azalmış raf ömrü gibi problemlere neden olmaktadır.

15 Asitleşme sonrasının kontrol edilmesine yönelik yaklaşımlardan birisi, nispeten asidik bir pH'a sahip süt ürünlerinin üretilmesidir. Bu yöntemlerde, LAB'nin ve laktik asit üretiminin daha da büyümesi, asidik pH ile inhibe edilmektedir. Fakat sadece daha fazla laktik asit üretimi inhibe edilmektedir ve tamamen sonlandırılmamaktadır ve yöntem, bir hafif bir tada sahip olan 20 fermente süt ürünlerinin üretimi için açıkça uygun değildir.

Asitleşme sonrası, *L. bulgaricus*'un metabolik aktivitesi ile kontrol edildiği ve peptit alımının yol açtığı ve amino asit metabolizmasında eksiklik gösteren suşların, asitleşme sonrasını kontrol etmek için üretildiği varsayılmıştır 25 (US2010/0021586 ve WO2006/042862A1 numaralı Patent Dokümanları). Asitleşme sonrasının kontrol edilmesine yönelik diğer yaklaşımlar, önceki teknikte açıklanmıştır ve zayıf bir şekilde asitleştirme sonrası aktivite ile karakterize edilen spesifik LAB suşlarının kullanımına dayalı süreçleri içermektedir (WO2010/139765).

30

Asitleşme sonrasının minimize edilmesine yönelik bir alternatif yaklaşım,

proteinin laktoza olan oranının kontrolü, tamponlama kapasitesinin kontrolü ve fermentasyon sırasında önceden belirlenmiş bir aralık içerisinde tamponlama kapasitesinin ve pH'ın sürdürülmesine dayalı olmaktadır (WO2013/169205 numaralı Patent Dokümanı). Fakat bu yaklaşım, fermentasyon sırasında bir dizi

5 süreç parametresinin saptanmasını gerektirmektedir ve önceden belirlenmiş aralıkların fermentasyon sırasında sürdürülmesini temin etmek için proteinlerin veya laktozun veya bir tamponun fermentasyon ortamına eklentisini gerektirebilmektedir.

10 İstem 1'e göre US2005/196388 numaralı Patent Dokümanı, beta-galaktosidaz aktivitesinden yoksun olan bir mutant *L. bulgaricus* suşunu tarif etmektedir, burada mutant suşu, laktoz operanun kodlama sekanslarından birisinde bir anlamsız mutasyonu taşımaktadır. Mutant, bir fermente süt ürününün hazırlanmasına yönelik bir yöntemde kullanılabilmektedir. Mutant sulunun

15 büyümesi ve asitleşmesi, ana suştan çok daha yavaştır, fakat mutant suşu, eklenen glikozda büyüebilmektedir.

Fermente süt ürünlerinin üretilmesine yönelik yöntemlerin geliştirilmesine hala ihtiyaç duyulduğu görülmektedir, burada yöntemler, fermente süt ürününde

20 asitleşme sonrası aktivitenin daha iyi bir kontrolünü sağlamaktadır.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Bu problem artık aşırı derecede düşük asitleşme sonrası aktivite sergileyen bir süt

25 ürününü sağlayan mevcut buluşun yöntemleri vasıtasıyla çözülmektedir.

Belirgin olarak, mevcut buluş, sütün fermente olduğu bir adımı içeren bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır, burada:

30 (a) fermentasyon, bir başlatıcı kültür ile başlatılmaktadır, burada başlatıcı kültür, süte eklenen bir veya bir kaç karbonhidratı metabolize edebilen laktik

asidi içermektedir,

(b) fermentasyon, bir veya bir kaç karbonhidratın konsantrasyonunun fermentasyon sırasında azalması ile sonlandırılmaktadır, burada fermentasyonun sonlandırılması, fermente edilecek olan sütte
5 karbonhidratların konsantrasyonu ile kontrol edilmektedir ve burada fermentasyonun sonlandırılmasında, laktik asit bakterileri ile metabolize edilen karbonhidrat konsantrasyonu, 5 mg/g ve 0.01 mg/g arasında bir aralıkta olmaktadır,

(c) azalma en azından laktik asit bakterilerinin metabolik aktivitesinden
10 kaynaklanmaktadır ve

(d) fermentasyon, en az bir laktozu eksik *Streptococcus thermophilus* ve en az bir laktozu eksik *Lactobacillus delbrueckii* alt tür *bulgaricus* içeren bir başlatıcı kültürü kullanan bir yöntemle uygulanmaktadır, burada karbonhidrat, laktozdan farklı fermente edilebilir bir karbonhidrattır.

15

Mucitler şaşırtıcı bir şekilde fermentasyonun sonlandırılmasının, fermentasyon için gerekli verimliliği veya süreyi önemli ölçüde etkilemeden fermente edilecek olan sütte bulunan karbonhidratların konsantrasyonu ile kontrol edilebildiğini keşfetmiştir. Bu, fermentasyona yönelik LAB için mevcut sütte bulunan
20 karbonhidratların azaltılmasının, fermentasyon sürecini inhibe etmesi veya geciktirmesi ve bu şekilde yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin geniş ölçekli üretim için kullanılamayan etkisiz bir süreçte sonuçlanması varsayıldığı için şaşırtıcıdır. Mucitler aynı zamanda, fermentasyon sürecinin, esasen tüm karbonhidratların, LAB ile tüketildiği ve daha sonrasında neredeyse tamamen
25 sonlandığı (Şekil 1; %1 laktoz) bir noktaya kadar hızlıca ilerlediğine dikkat çekmiştir. LAB için mevcut karbonhidratların oldukça düşük bir konsantrasyonunun mevcudiyetinde fermentasyon sürecinin, uzatılmış bir süreç üzerinde LAB'nin bir düşük asitleşme aktivitesi ile sonuçlanması beklenmiştir. Belirli bir yapılandırmada, fermente edilmiş süt ürünü, 20 saatlik bir süreç
30 boyunca adım (ii)'de fermentasyon için kullanılan sıcaklıkta fermentasyonun sonlandırılmasından sonra depolanması halinde, ürünün pH değerinin, 0.3 pH

birim aralığı içerisinde sürdürülmesi ile karakterize edilmektedir.

Bu, yöntemin, adım (ii)'de fermentasyon için kullanılan sıcaklıkta fermentasyonun sonlandırılmasının ardından 20 saatlik bir süreç boyunca
5 fermente edilmiş süt ürününün sürdürüldüğü bir adımı içermesinin gerekli olduğu anlamına gelmektedir. Bu, düşük asitleşme sonrasını doğrulamak için kullanılabilen işlevsel bir testtir. Bir fermentasyon sıcaklığında depolanması halinde 20 saatlik bir süreç boyunca bir fermente süt ürününün bir pH değerinin 0.3 pH birim aralığı içerisinde sürdürülmesi, oldukça düşük asitleşme sonrasının
10 bir göstergesidir.

Bir diğer yapılandırmada, mevcut buluş, esasen herhangi bir asitleşme sonrası ile karakterize olmayan bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik ve fermente süt ürününün, 20 saatlik bir süreç boyunca adım (ii)'de fermentasyon için
15 kullanılan sıcaklıkta fermentasyonun sonlandırılmasından sonra depolanması halinde, ürünün pH değerinin, bir 0.1 pH birim aralığı içerisinde sürdürülmesi ile karakterize edildiği yöntemlere yönlendirilmektedir. Bir fermentasyon sıcaklığında depolanması halinde, 20 saatlik bir süreç boyunca bir fermente süt ürününün bir pH değerinin bir 0.1 pH birim aralığı içerisinde sürdürülmesi,
20 asitleşme sonrasının yokluğunun bir göstergesidir.

Belirli bir diğer yapılandırmada, mevcut buluş, bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik yöntemleri sağlamaktadır, burada fermente ürün, 15 ve 45 °C arasında bir sıcaklıkta paketlenmektedir.

25

Düşük asitleşme sonrasından dolayı, bu yöntem, fermentasyon sonrası bir soğutma adımını gerektirmemektedir.

Mevcut buluş aynı zamanda bu yöntemlerle elde edilen fermente süt ürünlerini
30 sağlamaktadır. Bu fermente süt ürünleri, fermentasyon için kullanılan sıcaklıkta depolanması halinde, 20 saatlik bir süreç boyunca ürünün pH değerinin bir 0.3 pH

birim aralığı içerisinde sürdürülmesi ile karakterize edilmektedir. Ürünler aynı zamanda fermentasyon için kullanılan LAB ile metabolize edilebilen karbonhidratların oldukça düşük bir konsantrasyonu ile karakterize edilmektedir. Diğer karbonhidratlar, önemli ölçüde daha yüksek konsantrasyonda mevcut
5 olabilmektedir.

TEKNİĞİN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Genelde, mevcut buluş, bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik olan,
10 sütün fermente edildiği bir adımı içeren bir yöntemi sağlamaktadır, burada:

- (a) fermentasyon, bir başlatıcı kültür ile başlatılmaktadır, burada başlatıcı kültür, süte eklenen bir veya bir kaç karbonhidratı metabolize edebilen laktik asidi içermektedir,
- 15 (b) fermentasyon, fermentasyon sırasında bir veya bir kaç karbonhidratın konsantrasyonunun azaltılmasıyla sonlandırılmaktadır, burada fermentasyonun sonlandırılması, fermente edilecek olan üstte karbonhidratların konsantrasyonu ile kontrol edilmektedir ve burada fermentasyonun sonlandırılmasında, laktik asit bakterileri ile metabolize edilen karbonhidrat konsantrasyonu, 5 mg/g ve
20 0.01 mg/g aralığında olmaktadır,
- (c) azalma en azından laktik asit bakterilerinin metabolik aktivitesinden kaynaklanmaktadır ve
- (d) fermentasyon, en az bir laktozu eksik *Streptococcus thermophilus* ve en az bir laktozu eksik *Lactobacillus delbrueckii* alt tür *bulgaricus* içeren bir
25 başlatıcı kültürü kullanan bir yöntemle uygulanmaktadır, burada karbonhidrat, laktozdan farklı fermente edilebilir bir karbonhidrattır.

Mevcut uygulamanın kapsamında, “süt” terimi, hayvanların meme bezleri vasıtasıyla veya bitkiler vasıtasıyla üretilen sıvıları ifade edecek yaygın anlamında
30 geniş yelpazede kullanılmaktadır. Mevcut buluşa göre, süt işlenmiş olabilmektedir ve “süt” terimi, tüm süt, az yağlı süt, yağsız süt, düşük yağlı süt,

tam yağlı süt, laktozu azaltılmış süt veya konsantre sütü içermektedir. Yağsız süt, yağ içermeyen veya az yağlı süt ürünüdür. Düşük yağlı süt genellikle yaklaşık %1 ila yaklaşık %2 arasında yağ içeren süt olarak belirlenmektedir. Tam yağlı süt genellikle %2 yağ veya daha fazlasını içermektedir. “Süt” teriminin, farklı memelilerden ve bitkisel kaynaklardan elde edilen sütleri kapsamı amaçlanmaktadır. Sütün memeli kaynakları, kısıtlayıcı olmayacak şekilde inek, koyun, keçi, bufalo, deve, lama, kısırak ve geyiği içermektedir. Bitkisel kaynaklı süt, kısıtlayıcı olmayacak şekilde soya fasulyesi, bezelye, fıstık, arpa, pirinç, yulaf, kinoa, badem, kaju, hindistancevizi, fındık, kenevir, susam ve ayçiçeği tohumundan çıkarılan sütü içermektedir.

Mevcut buluşun yöntemlerinde ve ürünlerinde, ineklerden türetilen süt, en çok tercih edilecek şekilde fermentasyona yönelik bir başlangıç malzemesi olarak kullanılmaktadır.

Laktozu azaltılmış süt ticari olarak elde edilebilmektedir (örneğin Select Milk Producers Inc., Texas, ABD). Laktozu azaltılmış süt, glikoz ve galaktoza laktaz enzimi vasıtasıyla veya nano-filtrasyon, elektrodializ, iyon değişim kromatografisi ve santrifüjleme vasıtasıyla laktozun hidrolize edilmesi dahil olmak üzere teknikte bilinen herhangi bir yöntemle üretilmektedir.

“Süt bazı” terimi, LAB’nin büyümesine ve fermentasyonuna yönelik bir ortam olarak kullanılabilen süt veya süt bileşenlerine dayalı bir bileşimi ifade etmek için, mevcut başvuruda geniş yelpazede kullanılmaktadır. Süt bazı, süttten türetilen bileşenleri ve LAB’nin büyütülmesi veya fermente edilmesi amacıyla yönelik olarak kullanılabilen herhangi bir diğer bileşeni içermektedir.

Mevcut başvurunun kapsamında, “laktik asit bakterileri” veya “LAB”, karbonhidrat fermentasyonunun ana metabolik nihai ürün olarak laktik asit üreten gıda dereceli bakterileri ifade etmek için kullanılmaktadır. Bu bakterileri, genel metabolik ve fizyolojik özelliklerle ilişkili olmaktadır ve genellikle Gram pozitif,

düşük-GC, asit toleransı, gram pozitif, düşük-GC, asit toleranslı, spor yapmayan, solumayan, çubuk şeklinde basil veya koksidir. Fermentasyon aşaması sırasında, bu bakterilerle laktoz tüketimi, laktik asidin formasyonuna, pH'ın azaltılmasına ve bir protein pıhtılaşmasının formasyonu ile sonuçlanmasına yol açmaktadır. Bu bakteriler bu şekilde süt asitleşmesinden ve süt ürünlerinin dokusundan sorumludur. Burada kullanıldığı üzere, “laktik asit bakterileri” terimi, kısıtlayıcı olmayacak şekilde *Lactobacillus* türleri, *Bifidobacterium* türleri, *Streptococcus* türleri, *Lactococcus* türleri, örneğin *Lactobacillus delbrueckii alt türü bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* ve *Leuconostoc* türünün genine ait bakterileri kapsamaktadır.

Fermente süt ürünlerinin üretilmesine yönelik sürecin fermentasyon adımı, süte bir başlatıcı kültürünün eklentisini içermektedir. Mevcut kapsamda kullanıldığı gibi “başlatıcı” veya “başlatıcı kültür” terimleri, özellikle laktik asit bakterileri olmak üzere, süt bazının asitleştirilmesinden sorumlu olan bir veya birden fazla gıda dereceli mikro-organizmaların bir kültürünü ifade etmektedir. Başlatıcı kültürler, taze, dondurulmuş veya dondurularak kurutulmuş olabilmektedir. Bir fermente süt ürününün üretimine yönelik olarak, başlatıcı, toplam süt miktarının hacmi cinsinden %0.01 ila 3, tercihen %0.01 ila 0.025 aralığında bir miktarda eklenebilmektedir.

“Sütte mevcut bir veya bir kaç karbonhidratı metabolize edebilen” terimi, karbonhidrat fermentasyonunun ana metabolik nihai ürün olarak laktik asit üretimine neden olan LAB'nin metabolik aktivitesini açıklamak için mevcut buluşun kapsamında kullanılmaktadır. Aşağıda daha kapsamlı bir şekilde açıklanacağı üzere, LAB, sütte mevcut bir veya bir kaç karbonhidratı metabolize edebilmektedir. Karbonhidratlar, doğal sütte mevcut olabilmektedir veya süte eklenmiş olabilmektedir.

Belirli yapılandırmalarda, mevcut buluş, glikozu metabolize edebilen LAB'yi kullanarak yöntemleri sağlamaktadır. Mevcut buluş, LAB'ların, glikoz gibi diğer karbonhidratları metabolize edebildiği laktoz metabolizmasında bir eksik çeken LAB'yi kullanarak yöntemleri sağlamaktadır.

5

Mevcut buluşun yöntemleri, sütün fermente edildiği ve fermentasyon sırasında, fermentasyonun, bir veya bir kaç karbonhidrat konsantrasyonunun azaltılması vasıtasıyla sonlandırıldığı bir adımla karakterize edilmektedir. Bu, fermentasyon ortamında mevcut LAB'nin, metabolize edilebilen karbonhidratların oldukça düşük bir konsantrasyonundan dolayı önemli laktik asit miktarlarını artık üretmediği anlamına gelmektedir. Bir yapılandırmada, fermentasyonun sonlandırılması, 0.3 pH birimlerinden daha az bir aralık içerisinde sürdürülen bir pH değeri ile karakterize edilebilirken, kültür, 20 saatliğine fermentasyon için kullanılan sıcaklıkta sürdürülmektedir. Örneğin sütün yukarıda açıklandığı gibi fermente edildiği bir adımı içeren bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik bir yöntemin uygulanması halinde, bir kişi, fermentasyonun sonlandırılmasının, ürün 20 saatliğine fermentasyon sıcaklığında sürdürülerek fermentasyon sırasında bir veya bir kaç karbonhidratın konsantrasyonunun azaltılmasından kaynaklanıp kaynaklanmadığını test edebilmektedir. PH'ın, bu süre sırasında 0.3 pH biriminden daha fazlasıyla değişmemesi halinde, ferementasyonun sonlandırılması, fermentasyon sırasında bir veya bir kaç karbonhidratın konsantrasyonunun azaltılmasından kaynaklanmıştır.

Metabolik aktivite için mevcut olarak kalan karbonhidratlar, fermentasyon için kullanılan sıcaklıkta önemli derecede asitleşme sonrasına yol açarken, istenilen pH seviyesine ulaşılır ulaşılmaz soğutma vasıtasıyla fermentasyonu sonlandıran önceki tekniğin yöntemleri, bu testi karşılayamamaktadır (Şekil 2 ve 3 en düşük eğri).

Mevcut buluşun yöntemleri aynı zamanda karbonhidratlarının konsantrasyonunun azalmasının, en azından laktik asit bakterilerin metabolik aktivitesinden kaynaklanması ile karakterize edilmektedir. Bu, diğer bileşenler, örneğin laktaz

gibi enzimler de fermentasyon sırasında metabolize edilebilen karbonhidratın azaltılmasına katkıda bulunabilmesine rağmen, laktik asit bakterilerinin, karbonhidratların azalmasına katkıda bulunduğu anlamına gelmektedir.

- 5 Bazı yapılandırmalarda, mevcut buluşun yöntemleri, fermente ürünün, 15 ve 45 °C arasında bir sıcaklıkta paketlenildiği bir adımı içermektedir. Yukarıda gösterildiği üzere, önceki tekniğin ana problemlerinden birisi, fermentasyonu sonlandırmak için fermentasyon ürününün hızlı bir şekilde soğutulmasına dair ihtiyacı giderememesidir. Mevcut buluşun yöntemleri, fermente ürünün 15 ve 45
- 10 °C arasında bir sıcaklıkta paketlenildiği bir adımı içerebilmektedir. Bu, önceki tekniğin yöntemlerine karşı olarak, hızlı soğutmanın kesinlikle gerekli olmadığını göstermektedir.

- 15 Fermentasyonun sonlandırılması, laktik asit bakterileri ile metabolize edilebilen bir veya bir kaç karbonhidratın konsantrasyonu ile karakterize edilebilmektedir. Fermentasyonun sonlandırılmasında, laktik asit bakterileri ile metabolize edilen karbonhidrat konsantrasyonu, 5mg/g ve 0.01mg/g arasında aralıktadır.

- 20 Yukarıda gösterildiği üzere, mevcut buluşa göre bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik yöntemler aynı zamanda depolama sırasında özellikle stabil bir pH değeri ile karakterize edilebilmektedir. Fermente ürün, fermentasyon için kullanılan sıcaklıkta depolandığında 20 saatlik bir süreç boyunca bir 0.3 pH birim aralığı içerisinde sürdürülebilmektedir.

- 25 Bir diğer alternatifte, mevcut buluşa göre bir fermente süt ürününün üretilmesine yönelik yöntemler, 22 ve 45 °C arasında fermentasyon sırasında bir sıcaklıkla karakterize edilebilmektedir. Bu sıcaklık aralığı, mezofilik ve termofilik kültürler için kullanılan aralığı içermektedir.

- 30 Bir yapılandırmaya göre, mevcut buluş, yukarıda açıklanan, mezofilik ve termofilik kültürlerin 22 ve 45 °C arasında bir sıcaklıkta fermente edildiği bir yöntemi sağlamaktadır.

Mevcut buluş aynı zamanda yukarıda açıklandığı gibi yöntemlerle ele edilen fermente süt ürünlerini sağlamaktadır. Mevcut buluşun fermente süt ürünleri, tercihen yoğurt, meyveli yoğurt, yoğurt içerikli içecek veya peynir dahil olmak
5 üzere fermente gıda ürünleridir.

En çok tercih edilen yapılandırmada, mevcut buluşun tüm yöntemleri, bir yoğurtun üretilmesine yönelik yöntemlerdir ve mevcut buluşun ürünü, yoğurttur.

10 Mevcut başvurunun kapsamında, “yoğurt” terimi, *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ve tercihe bağlı olarak *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus paracasei* gibi diğer mikroorganizmaları veya bunlardan türetilen herhangi bir mikroorganizmayı
15 içeren ürünleri ifade etmektedir. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii alt türü bulgaricus*’dan başka laktik asit suşları, flora dengesinin artırılması özelliği gibi elde edilen ürünün çeşitli özelliklerini sunması için dahil edilmektedir. Burada kullanıldığı üzere, “yoğurt” terimi, yoğurt, karıştırılmış yoğurt, içilen yoğurt, Petit Suisse, ısıl işlem görmüş yoğurt, bir yüksek protein
20 seviyesi ile karakterize edilen Yunan stili yoğurt ve yoğurt benzeri ürünleri kapsamaktadır.

Belirgin olarak, “yoğurt” terimi, kısıtlayıcı olmayacak şekilde örneğin eş zamanlı olarak kültürlenmiş ve en az 10 milyon CFU (koloni oluşturan birim)/g bir
25 miktarda nihai üründe canlı olduğu keşfedilen tek spesifik termofilik laktik asit bakterilerinin (örn. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*) vasıtasıyla laktik asit fermentasyonu ile elde edilen pıhtılaşmış süt ürünleri gibi Fransız ve Avrupa Düzenlemelerine göre belirlenen yoğurtu kapsamaktadır. Yoğurtlar tercihe bağlı olarak ek süt ürünü ham maddelerini (örn.
30 kaymak) veya şeker veya tatlandırıcı maddeler, bir veya birden fazla kıvam arttırıcı, meyve, erikler veya besin maddeleri, özellikle vitaminler, mineraller ve

- lifler ve aynı zamanda stabilizörler ve kalınlaştırıcılar gibi diğer içerikleri içerebilmektedir. Bir alternatifte yoğurt, AFNOR NF 04-600 standardına ve/veya kodeks StanA-IIa-1975 standardına göre fermente sütlere ve yoğurtlara yönelik tarifnameleri karşılamaktadır. AFNOR NF 04-600 standardını yerine getirmek için, ürünün, fermentasyon sonrasında ısıtılmış olması gerekmemektedir ve sütün ham maddeleri, elde edilen ürünün minimum %70'ini (m/m) temsil etmelidir.
- Mozarella ve Pizza peyniri ve Feta gibi bir peynir aynı zamanda *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* (alt tür *bulgaricus*) içeren bir başlatıcı kültür kullanılarak fermentasyon ile hazırlanabilmektedir (Hoier et al. (2010) in The Technology of Cheesemaking, 2nd Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192).

Laktozu yetersiz LAB ve Laktozu eksik LAB kullanılarak bir fermente süt ürününün üretilmeisine yönelik yöntemler

15

Bir diğer yapılandırmada, mevcut buluş, laktozu eksik LAB sağlamaktadır.

- “Laktoz metabolizmasında eksiklik” ve “laktozu eksik” terimleri, hücre büyümesinin bir kaynağı olarak laktozu kullanabilme veya hücre canlılığını sürdürebilme kabiliyetlerini kısmen veya tamamen kaybeden LAB'yi karakterize etmek için mevcut buluşun kapsamında kullanılmaktadır. İlgili LAB, sakaroz, galaktoz ve/veya glikoz veya bir diğer fermente edilebilir karbonhidratta seçilen bir veya bir kaç karbonhidratı metabolize edebilmektedir. Bu karbonhidratlar, laktozu eksik mutantlar vasıtasıyla fermentasyonu desteklemek için yeterli miktarda sütte doğal bir şekilde mevcut olmadığı için, süte bu karbonhidratları eklemek gerekli olacaktır. Laktozu eksik ve kısmen eksik LAB, laktoz ve X-Gal içeren bir ortamda beyaz koloniler olarak karakterize edilebilmektedir.

- Aşağıda Örnek 2'de kapsamlı bir şekilde açıklandığı üzere, mucitler, özellikle *Streptococcus thermophilus* (ST) ve *Lactobacillus delbrueckii* türleri *bulgaricus* (LB) suşları olmak üzere bir dizi laktozu eksik LAB'yi izole etmiştir. Bu laktozu

eksik LAB, sakarozu metabolize etmektedir.

Suşlar, laktozu eksik olmayan CHCC15914 suşundan türetilmiştir. Dolayısıyla, mevcut buluş, bir izole *Streptococcus thermophilus* suşunu sağlamaktadır, burada
5 suş, DSM 28909 erişim numarası altında 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr adresinde depolanan suştur.

Bir diğer yönüne göre, mevcut buluş, aşağıdaki laktozu eksik LAB suşları ile
10 ilgilidir:

(a) bir *Streptococcus thermophilus* suşu, burada suş şu şekildedir:

(i) DSM 28952 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-
15 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkul-turen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suş; veya

(b) bir *Streptococcus thermophilus* suşu, burada suş şu şekildedir:

(i) DSM 28953 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-
20 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkul-turen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suş.

25 Mevcut buluş aynı zamanda burada açıklandığı üzere bir fermente süt ü rnnn üretilmesine yönelik yöntemlerde bu suşların kullanımı ile ilgilidir. Dahası buluş, aşağıdaki bir veya birden fazla suşu içeren fermente gıda ü rnleri ile ilgilidir:

(a) bir *Streptococcus thermophilus* suşu, burada suş şu şekildedir:

30

(i) DSM 28952 erişim numarası, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suş; veya

(b) bir *Streptococcus thermophilus* suşu, burada suş şu şekildedir:

5

(i) DSM 28953 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suş; ve tercihe bağlı olarak

10

(c) bir *Lactobacillus delbrueckii* türü *bulgaricus* suşu, suş şu şekildedir:

(i) DSM 28910 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suş.

15

Fermente gıda ürünleri, bir yoğurt, meyvalı yoğurt, bir yoğurt içerikli içecek veya bir peynir olabilmektedir.

20 Bazı yapılandırmalarda, yöntem aynı zamanda, fermente ürünün, 15 ve 45 °C arasında bir sıcaklıkta paketlenildiği bir adımı içermesi ile karakterize edilmektedir. Diğer alternatiflerde yöntem, fermente ürünün pH değerinin, 20 saatlik bir süreç boyunca fermentasyon için kullanılan sıcaklıkta fermentasyonun sonlandırılmasının ardından depolanması halinde bir 0.3 pH birim aralığı veya bir 25 0.1 pH birim aralığı içerisinde sürdürülmesi ile karakterize edilebilmektedir.

Streptococcus thermophilus ve *Lactobacillus delbrueckii* türü *Bulgaricus* ile metabolize edilebilen toplam karbonhidrat konsantrasyonu, 30mg/g ila 2mg/g aralığında veya 20mg/g 3mg/g aralığında veya 10mg/g ila 4mg/g aralığında 30 olabilmektedir.

Bu ilerleme şekli, yaklaşık %5 (50mg/g) bir laktoz konsantrasyonuna sahip normal sütün, üretim sürecinde kullanılabilmesi ve fermentasyonun, eklenen karbonhidrat miktarı ile kesin bir şekilde kontrol edilebilmesi avantajına sahiptir. Eklenecek olan karbonhidrat konsantrasyonu, son pH, sıcaklık, başlatıcı kültür ve benzeri dahil arzu edilen fermentasyon koşullarını test eden çalışmalarda belirlenebilmektedir.

Bu alternatifin tercih edilen bir yapılandırmasında, fermentasyon, sakarozu metabolize edebilen (suc+) LAB kullanılarak uygulanmaktadır ve fermentasyondan önce süte sakaroz eklenmektedir. Bir alternatifte, sakaroz konsantrasyonu, 30mg/g ila 2mg/g aralığında veya 20mg/g 3mg/g veya 10mg/g ila 4mg/g aralığında olmaktadır.

Mevcut buluş aynı zamanda aşağıdakileri içeren bir bileşimle ilgilidir

15

(a) bir *Streptococcus thermophilus* suşu, burada suş şu şekildedir:

(i) DSM 28952 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suş; veya

20

(b) bir *Streptococcus thermophilus* suşu, burada suş şu şekildedir:

(i) DSM 28953 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suş;

25

ve

(c) bir *Lactobacillus delbrueckii* türü *bulgaricus* suşu, suş şu şekildedir:

30

(i) DSM 28910 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanan suş.

ŞEKİL GÖSTERGELERİ

5

Şekil 1, sakaroz ile takviye edilen sütü fermente etmek için kullanıldığında *S. thermophilus* (CHCC15914) ve *Lactobacillus delbrueckii* türü *bulgaricus*'un (CHCC10019) asitleşme aktivitesi ile *S. thermophilus* (CHCC17862) ve *lactobacillus delbrueckii* türü *bulgaricus*'un (CHCC18994) asitleşme aktivitesini kıyaslamaktadır.

10

Şekil 2, sakaroz ile takviye edilen ve *S. thermophilus*'un (CHCC15914) asitleşme aktivitesi ile kıyaslanan sütü fermente etmek için kullanıldığında *S. thermophilus* (CHCC17861) ve *Lactobacillus delbrueckii* türü *bulgaricus*'un (CHCC18994) farklı oranlarının asitleşme aktivitesini göstermektedir.

15

LAB Suşları:

Sonraki örnekler, CH suşlarını kullanmaktadır, bazısı, Chr. Hansen'in önceki patent başvuruları için biriktirilmiştir. Suşlara yönelik diğer bilgi, ilgili patent başvurusu tarafından sağlanmakta ve aşağıdaki gibi biriktirilmiştir:

20

(i) *Lactobacillus delbrueckii* türü *bulgaricus* (CHCC10019), DSM 19252 erişim numarası altında, 2007-04-03 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig ile WO2011/000879 sayılı patent dokümanı için depolanmıştır.

25

Sonraki örneklerde kullanılmış kalan suşlar, mevcut başvuru için biriktirilmiştir veya Chr Hansen'den ticari olarak temine edilebilmektedir.

30

Örnek 1: Laktozu yetersiz LAB kullanarak bir süt ürününün üretilmesine

yönelik yöntemler

Laktozu eksik mutantlar, *S. thermophilus* (ST) (CHCC15914) ve *Lactobacillus delbrueckii* türü *bulgaricus* (LB) (CHCC10019) EPS pozitif suşlarından izole edilmiştir. Suşlar, CHCC15914 için sırasıyla %1 laktoz ve 200 mg/ml X-Gal içeren M17'de beyaz koloniler (bir laktoz eksikliği fenotipini göstermektedir) olarak UV-mutagenезinden sonra seçilmiştir. CHCC10019 için %1 laktoz ve 200 mg/ml X-Gal içeren MRS agar plakaları.

Her iki sokak türü suşu, β -galaktosidaz aktivitesine sahiptir ve sokak türü kolonilerin, β -galaktosidaz aktivitesinden dolayı mavi olduğu görülmüştür.

CHCC10019'dan bir laktozu eksik mutant izole edilmiş ve CHCC18994 olarak belirtilmiştir.

CHCC15914'den, bir laktozu eksik mutantlar izole edilmiş ve sırasıyla CHCC17861 ve CHCC17862 olarak belirtilmiştir.

İzole laktozu eksik mutantların büyüme özellikleri aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

LB CHCC18994 fenotipi: lac-, suc-, gal-, glc+
 ST CHCC17861 fenotipi: lac-, suc+ , gal+, glc+
 ST CHCC17862 fenotipi: lac-, suc+ , gal+, glc+

Tam laktoz operon, tüm üç mutant için dizilmiştir ve mutasyon türünü ortaya çıkarmak için ilgili sokak türü suşu ile kıyaslanmıştır.

An suşla (CHCC15914) kıyaslama, CHCC17861'in, mutasyonun bir kaç nükleotid aşağı akışında suşunan kodlama sekansında bir stop kodonuna yönelen *lacZ* geninin başlangıcında (β -galaktosidaz için kodlama) bir ekstra "T" nükleotide sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. CHCC17862, *lacZ* geninin kodlama

sekansını da kesen bir nükleotid delesyonu sergilemiştir.

- CHCC18994 için, *lacZ* geninin içerisinde bir mutasyon belirlenmiştir. Bu, *lacZ* içerisinde 8 nükleotid bir değişimle (5'-CTT CCA AGC-3' ila 5'-CGC TAC TAT-3') ve sonuç olarak 3 amino asit bir değişim (Leu-Pro-Ser to Arg-Tyr-Tyr) ile sonuçlanmıştır, bu da laktozu eksik fenotipini açıklamaktadır.

- Tekil suşlar olarak veya kombinasyon halinde (ST + LB) kullanıldığında tüm mutantlar, laktozdan farklı bir fermente edilebilir karbonhidrat eklentisine bağlı olarak sütü asitleştirmektedir. Laktozu eksik kültürlerin asitleşme aktivitesi, MRS (LB ağırlık cinsinden ve LB lac- mutant); %1 laktoz (ST ağırlık cinsinden) içeren MT17; veya farklı sakaroz konsantrasyonlarını içeren M17'de (%1 ve %0.5; ST lac-mutantını içeren fermentasyon) gece boyunca kültürleri kullanarak belirlenmiştir. Süt aşılanmıştır ve fermentasyon, 37 °C'de pH gelişimi ile takip edilmiştir.

- 20 ve 40 saat boyunca fermentasyon sıcaklığı altında pH gelişimi, sırasıyla Şekil 2 ve 3'de gösterilmektedir ve sakarozun, neredeyse laktozu metabolize edebilme kabiliyetine sahip olan ana LAB'nin neden olduğu süreç kadar hızlı olan bir fermentasyon sürecini sunan laktozu eksik suşlarla metabolize edildiğini göstermektedir. Sakaroz ile harekete geçirilen fermentasyon süreci hemen sonlandırılmakta ve sakaroz tüketildiğinde bir düz çizgiye girmektedir. Karbonhidrat tükenmesinin neden olduğu fermentasyonun sonlandırılmasından sonra, pH, yaklaşık pH 4.5'de stabil kalmıştır. Oldukça stabil olan nihai bir pH, CHCC17861, CHCC17862, veya CHCC18994 tekil suşlar olarak veya LB mutantı ile birlikte ST mutantlarından birisinin bir karışımı olarak (karışım, Şekil 3'de gösterilmektedir) bulunmuştur. Bu, bir tipik yoğurdun üretilmesine yönelik bir fermentasyon yönteminde kullanılacak başlatıcı kültüre benzemektedir.

- Suşlar (CHCC17861 ve CHCC17862) arasında herhangi bir önemli fark gözlemlenmemektedir. Sakaroz eklentisi bu şekilde asitleştirme aktivitesinin

oldukça kesin bir protokolünü sağlamaktadır.

Bazı fermentasyonlarda, bir “destek” formasyonu, karışık kültürlerin pH eğrileri içerisinde gözlemlenmiştir, bu da metabolizmanın, asit üretimi tamamen durmadan önce değiştiğini göstermektedir (Şekil 3). Bunun incelenmesine yönelik ST oranı: LB değiştirilmiştir ve bu, destek formasyonunda bir değişime yol açmıştır. Lac-ST konsantrasyonunun azalması ve lac-LB suşunun artışı, pH desteğinin azalması ve hatta daha aytay bir pH-“eğrisi” ile sonuçlanmıştır.

Öte yandan şaşırtıcı bir şekilde, sakaroz tükendiğinde ve pH desteğini ortadan kaldırdığında %100 ST CHCC17861 kullanımı, tamamen kesilmiş bir asit üretimine neden olmaktadır, fakat pH düşüşü, pH değerinden daha yüksek 0.3 bir değerde durmaktadır (Şekil 3).

Tüm durumlarda, pH, fermentasyon sürecinin sonuna kadar (48 saat) 4.75’de sabit kalmıştır.

ST/LB eş fermentasyonunda, *Lactobacillus del-brueckii* alt türü *bulgaricus* bölümü, son pH düşüşünden ve aynı zamanda asitleşme sonrası bir ana bölümden sorumludur. Bu sebepten dolayı, LB konsantrasyonu, çoğu yoğurt fermentasyon sürecinde ST konsantrasyonundan daha düşük olmaktadır.

Bu, pH değerinin, eklenen sakarozun veya bir diğer fermente edilebilir karbonhidratın konsantrasyonu ile tamamen kontrol edilebilmektedir, *Lb. Bulgaricus* kolay bir şekilde arttırılabilmektedir.

Lac- kültürü, örneğin 6 saat sonrasında daha yüksek bir nihai pH değeri ile sonuçlanacaktır, fakat önemli ölçüde daha düşük asitleşme sonrasına ve bu şekilde uzatılmış raf ömrüne sahip olacaktır.

30

Bazı deneylerde, pH’ın, fermentasyonun sonlandırılmasının ardından yaklaşık 5

saatliğine oldukça sabit olduğu ve daha sonrasında sonraki 10 saat (veri gösterilmemiştir) boyunca hafifçe düştüğü gözlemlenmiştir. Bu, görünüşe göre spontane ters evrim revertantlar, örneğin spontane mutasyon ile laktozu kullanabilme kabiliyetini kazanan LAB'den kaynaklanmaktadır.

5

DEPOLAMA ve UZMAN ÇÖZÜMÜ

Başvuran, aşağıda açıklandığı gibi mevcut başvuru için biriktirilen mikroorganizmaların bir numunesinin, günümüzde patentin verildiği tarihe kadar sadece bir uzman tarafından temin edilebilmesini talep etmektedir.

10

Streptococcus thermophilus (CHCC15914), DSM 28909 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor-ganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanmıştır.

15

Lactobacillus delbrueckii türü *bulgaricus* (CHCC18994), DSM 28910 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor-ganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanmıştır.

20

Streptococcus thermophilus (CHCC17861), DSM 28952 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor-ganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanmıştır.

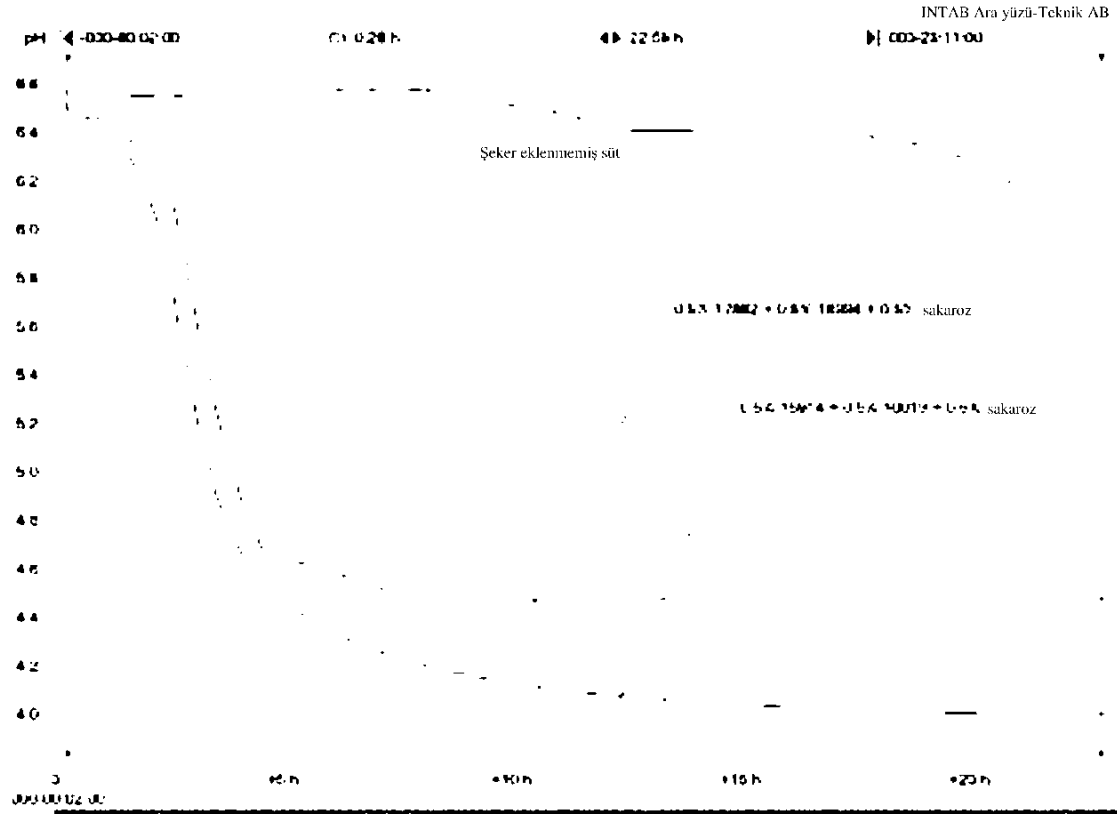
25

Streptococcus thermophilus (CHCC17862), DSM 28953 erişim numarası altında, 2014-06-12 tarihinde DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkul-turen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig adresinde depolanmıştır.

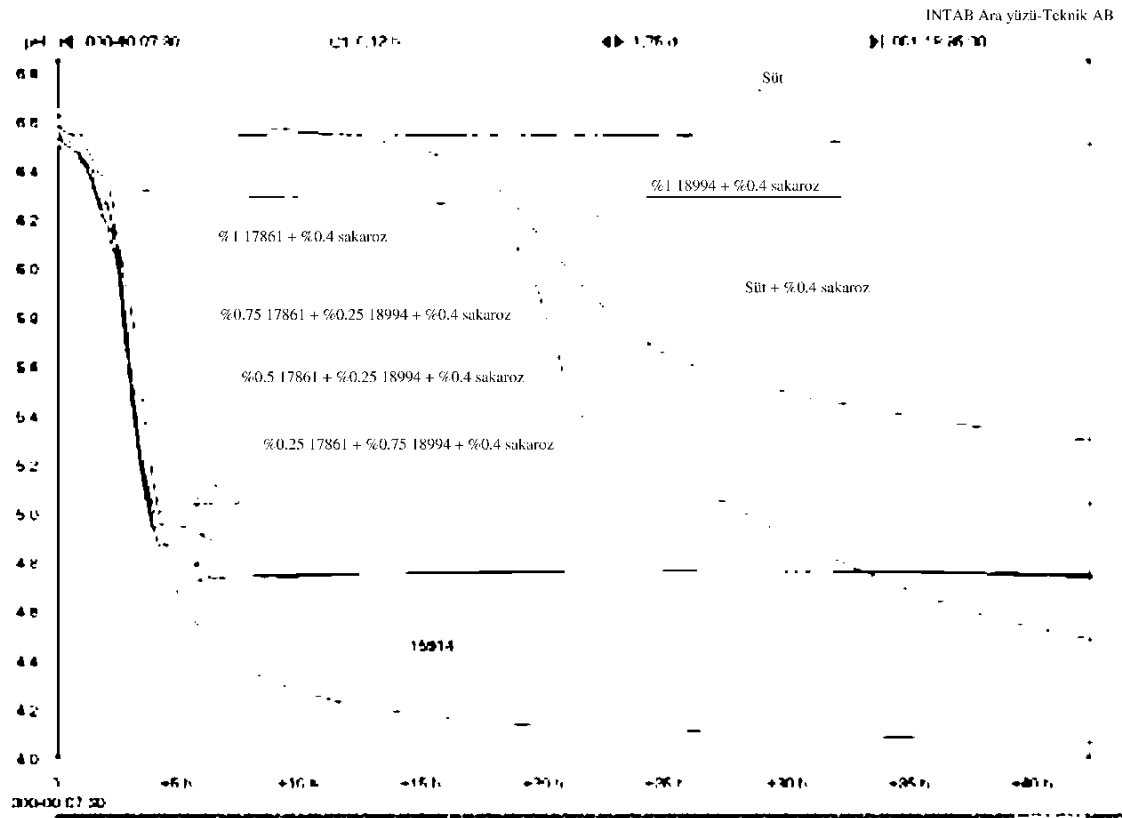
30

24946.37

Birikimler, patent prosedürünün amaçlarına yönelik mikroorganizmaların birikiminin uluslar arası tanımında Budapeşte antlaşmasına göre oluşturulmuştur.



Sekil 1



Şekil 2