



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A23C 9/123 (2006.01); A23C 9/127 (2006.01); A23L 29/065 (2006.01); A23L 3/3463 (2006.01); C12N 1/20 (2006.01); C12R 1/225 (2006.01); C12R 1/25 (2006.01); A23V 2002/00 (2006.01); A23Y 2220/63 (2006.01); A23Y 2220/67 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2014151746, 21.05.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.05.2013Дата регистрации:
24.01.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.05.2012 US 61/649,651

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2016 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 24.01.2018 Бюл. № 3

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 22.12.2014(86) Заявка РСТ:
EP 2013/060370 (21.05.2013)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/174792 (28.11.2013)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

**БЕНФЕЛЬТ Конни (ДК),
МОРГЕНСТЕРН Хеике Урсула (ДК)**

(73) Патентообладатель(и):

**ДЮПОН НЬЮТРИШН
БАЙОСАЙЕНСИЗ АПС (ДК)**(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 0005378458 A1, 03.01.1995. WO
2003040349 A1, 15.05.2003. US 0005908646 A1,
01.06.1999. RU 2306774 C2, 27.09.2007.(54) ШТАММ LACTOBACILLUS, ОБЛАДАЮЩИЙ ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРОТИВ
ДРОЖЖЕЙ И ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ (ВАРИАНТЫ), И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к штаммам бактерий рода *Lactobacillus*, композициям на их основе и их применению. Предложены штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DSM 25832, штамм бактерий *Lactobacillus plantarum* DSM 25833, штамм бактерий *Lactobacillus plantarum* DSM 25834, штамм бактерий *Lactobacillus plantarum* DSM 25835, штамм бактерий *Lactobacillus plantarum* DSM 25836 и штамм бактерий

Lactobacillus plantarum DSM 25837. Указанные штаммы обладают ингибирующей активностью против дрожжей и плесневых грибов. Предложены также варианты бактериальной композиции, содержащей выбранные штаммы в комбинации с бактерией рода *Propionibacterium* или другим штаммом рода *Lactobacillus*. Указанные штаммы могут быть применены в получении молочного продукта или в способе

R U 2 6 4 2 3 0 6 C 2

R U 2 6 4 2 3 0 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A23C 9/123 (2006.01); A23C 9/127 (2006.01); A23L 29/065 (2006.01); A23L 3/3463 (2006.01); C12N 1/20 (2006.01); C12R 1/225 (2006.01); C12R 1/25 (2006.01); A23V 2002/00 (2006.01); A23Y 2220/63 (2006.01); A23Y 2220/67 (2006.01)

(21)(22) Application: **2014151746, 21.05.2013**(24) Effective date for property rights:
21.05.2013Registration date:
24.01.2018

Priority:

(30) Convention priority:
21.05.2012 US 61/649,651(43) Application published: **10.07.2016** Bull. № 19(45) Date of publication: **24.01.2018** Bull. № 3(85) Commencement of national phase: **22.12.2014**(86) PCT application:
EP 2013/060370 (21.05.2013)(87) PCT publication:
WO 2013/174792 (28.11.2013)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskiji Partnery"**

(72) Inventor(s):

**BENFELT Konni (DK),
MORGENSTERN Kheike Ursula (DK)**

(73) Proprietor(s):

**DYUPON NYUTRISHN BAJOSAJENSIZ APS
(DK)**(54) **LACTOBACILLUS STRAIN HAVING INHIBITORY ACTIVITY AGAINST YEASTS AND MOULD FUNGI (VERSIONS), AND ITS APPLICATION**

(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: strain of bacteria *Lactobacillus paracasei* DSM 25832, a strain of bacteria *Lactobacillus plantarum* DSM 25833, a strain of bacteria *Lactobacillus plantarum* DSM 25834, a strain of bacteria *Lactobacillus plantarum* DSM 25835, a strain of bacteria *Lactobacillus plantarum* DSM 25836, and a strain of bacteria *Lactobacillus plantarum* DSM 25837 are proposed. These strains have inhibitory activity

against yeasts and mould fungi. The versions of a bacterial composition containing selected strains in combination with a bacterium of the *Propionibacterium* genus or another strain of the *Lactobacillus* genus are also proposed.

EFFECT: obtaining a dairy product, applying in the yeast and mould fungi growth control method.

17 cl, 8 dwg, 6 tbl, 3 ex

C 2
9 0 3 2 4 9
R U

R U
2 6 4 2 3 0 6
C 2

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым штаммам рода *Lactobacillus*, а также препаратам и композициям, таким как ферментативные бульоны, защитные культуры, конечный пищевой или кормовой продукт исключительно с *Lactobacillus* или в комбинации с бактериями рода *Propionibacterium*. Настоящее изобретение также относится к способам контроля роста контаминанта, такого как бактерии, дрожжи и плесневые грибы, посредством применения таких новых штаммов *Lactobacillus*.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Дрожжи и плесневые грибы играют основную роль в порче различных видов молочных продуктов, таких как йогурт, подслащенные сливки и сметана, а также разновидности свежих и зрелых сыров, и таким образом могут приводить к значительным экономическим потерям. Для сохранения молочных продуктов и обеспечения и продления срока хранения применяют химические консерванты, такие как органические кислоты и их соли (например, сорбат и пропионат). Недостатками при применении химических консервантов являются требования к маркировке (часто в виде чисел E) и потенциальные побочные эффекты на органолептические свойства пищевых продуктов.

Известно, что молочнокислые бактерии продуцируют различные противомикробные соединения, такие как органические кислоты, пероксид водорода, диацетил и бактериоцины. Молочнокислые бактерии и продукты, продуцируемые молочнокислыми бактериями, были предложены в качестве добавки альтернативного типа для улучшения сохранности пищи или корма для животных. Коммерческий противомикробный продукт Nisaplin® (Danisco) основан на низине, очищенном из *Lactococcus lactis*.

EP 0302300 относится к способу получения продукта с низким молекулярным весом, ингибирующего дрожжи и плесневые грибы, посредством культивирования видов *Lactobacillus casei* и выделения продукта из среды.

US 2008286406 A1 относится к штамму *Lactobacillus delbrueckii* подвида *lactis*, обладающему противогрибковой активностью против плесневых грибов рода *Penicillium*, а также к его применению при контроле плесневых грибов в корме для животных.

US 2008299098 A1 относится к штамму *Lactobacillus johnsonii* и его применению в качестве пробиотика, в качестве профилактического средства или в качестве средства для поверхностной обработки материалов против различных патогенов человека и животных.

WO 2009130423 относится к штамму *Lactobacillus paracasei* подвида *paracasei* и его применению в качестве пробиотика.

DE 202006014937 относится к смеси молочного жира с пониженным содержанием жира, которая содержит масло и культуры биологической защиты от молочнокислых бактерий при отсутствии консервантов.

В 1993 Valio, финской компанией молочных продуктов, в EP 0576780 описан новый штамм микроорганизма, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LC-705 (депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) как DSM 7061), обладающий регулирующим действием в отношении дрожжей и плесневых грибов. В EP 0576780 также описывают применение защитной культуры для подавления роста грибов посредством смеси штамма *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* и штамма *Propionibacterium freudenreichii* подвида *shermanii* (DSMZ 7067). Характерная особенность данной совместной культуры заключалась в том, что комбинация *Lactobacillus* и *Propionibacterium* обладала улучшенной противогрибковой активностью, нежели *Lactobacillus rhamnosus* сам по себе. Культуру запустили в серийное производство Wiesby

под названием “Bio Profit” и переименовали в HOLDBAC™ YM-B Danisco.

В EP 1308506 (Федеральный институт технологии Швейцарии (ETH) в Цюрихе, Швейцария) также описывают комбинацию молочнокислых и пропионовых бактерий. Штамм *Lactobacillus paracasei* подвид *paracasei* (DSM 14514) из ETH запустили в серийное
5 производство в виде смеси с *Propionibacterium freudenreichii* подвид *shermanii* DSM 7067 от Valio под названием HOLDBAC™ YM-C.

Патентная заявка WO 03/040349 относится к смеси бактерий, не являющейся заквасочной культурой, которая не содержит метаболитов и содержит вид *Propionibacterium jensenii* и вторую бактерию, выбранную из рода *Lactobacillus*.

10 ЦЕЛЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Целью вариантов осуществления настоящего изобретения является обеспечение улучшенных штаммов, а также препаратов и композиций, таких как ферментативные бульоны, защитные культуры, конечные пищевые или кормовые продукты, содержащие такие улучшенные *Lactobacillus* отдельно или в комбинации с бактериями рода
15 *Propionibacterium*.

Целью вариантов осуществления настоящего изобретения является обеспечение способов контроля роста контаминанта, такого как бактерии, дрожжи или плесневые грибы, с помощью таких новых штаммов *Lactobacillus*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 Автор(авторами) настоящего изобретения было обнаружено, что новые штаммы *Lactobacillus* обладают улучшенными свойствами в отношении способности контролировать рост контаминанта, такого как бактерии, дрожжи или плесневые грибы.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к бактерии рода
25 *Lactobacillus*, выбранным из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
 - b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
 - c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
 - d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
 - 30 e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
 - f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837
- и их функциональных эквивалентов.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к бактериальному препарату, характеризующемуся тем, что он содержит *Lactobacillus*, выбранную из списка,
35 состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- 40 e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837

или их функциональных эквивалентов, отдельно или в комбинации с бактерией рода *Propionibacterium*, с каким-либо другим штаммом рода *Lactobacillus* или с обоими.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к применению бактерий рода
45 *Lactobacillus*, выбранных из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;

- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837

или их функциональных эквивалентов, при получении конечного пищевого или
5 кормового продукта.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к применению
бактериального препарата, содержащего *Lactobacillus*, выбранную из списка, состоящего
из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- 10 b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837

15 или их функциональных эквивалентов, для контроля роста контаминанта, такого
как бактерии, дрожжи или плесневые грибы.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу контроля
роста контаминанта, такого как бактерии, дрожжи или плесневые грибы,
характеризующемуся применением бактериального препарата, содержащего

20 *Lactobacillus*, выбранную из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- 25 e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837,

или их функциональных эквивалентов, отдельно или в комбинации с бактерией рода
Propionibacterium, с другим штаммом бактерии *Lactobacillus* или с обоими.

В некоторых вариантах осуществления способ также включает в качестве этапа
30 очистку и/или концентрирование указанных бактерий рода *Lactobacillus*.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к применению препарата
жизнеспособных бактерий *Lactobacillus*, выбранных из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- 35 c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837,

40 или их функциональных эквивалентов для контроля роста контаминанта, такого
как бактерии, дрожжи или плесневые грибы.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу контроля
роста контаминанта, такого как бактерии, дрожжи или плесневые грибы, в композиции,
при этом способ характеризуется наличием в данной композиции жизнеспособных
бактерий *Lactobacillus*, выбранных из группы, состоящей из:

- 45 a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;

- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
 - f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837
- или их функциональных эквивалентов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

5 Фиг. 1-8 представляют собой результаты анализа верхнего слоя. Прозрачные зоны вокруг колоний LAB являются видимыми при продуцировании противогрибковых метаболитов *Lactobacilli*.

Фиг. 1: *Lactobacillus plantarum* DSM 25834 и ее ингибирующее действие в отношении *Penicillium* sp. DCS 436.

10 Фиг. 2: *Lactobacillus plantarum* DSM 25834 и ее ингибирующее действие в отношении *Penicillium* sp. DCS 1066.

Фиг. 3: *Lactobacillus plantarum* DSM 25836 и ее ингибирующее действие в отношении *Penicillium* sp. DCS 435.

15 Фиг. 4: *Lactobacillus plantarum* DSM 25836 и ее ингибирующее действие в отношении *Penicillium* sp. DCS 436.

Фиг. 5: *Lactobacillus plantarum* DSM 25836 и ее ингибирующее действие в отношении *Debaryomyces hansenii* DCS 1037.

Фиг. 6: *Lactobacillus plantarum* DSM 25833 и ее ингибирующее действие в отношении *Fusarium* sp. DCS 1106.

20 Фиг. 7: *Lactobacillus plantarum* DSM 25833 и ее ингибирующее действие в отношении *Penicillium* sp. DCS 1540.

Фиг. 8: *Lactobacillus plantarum* DSM 25835 и ее ингибирующее действие в отношении *Penicillium* sp. DCS 1540.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

25 Настоящее изобретение относится к улучшенным штаммам *Lactobacillus*, обладающим ингибирующей активностью против бактерий, дрожжей или плесневых грибов. Эти бактерии являются подходящими для обеспечения сохранности продуктов (например, пищи или корма).

Противогрибковые действия коммерчески доступных противогрибковых культур
30 **HOLDBAC™** YM-B и YM-C (DuPont, Дания) были продемонстрированы в различных исследованиях с нагрузкой в различных видах ферментированных кисломолочных продуктов, таких как йогурт, свежий сыр, сметана и белый соленый сыр. Также применение **HOLDBAC™** YM-B и YM-C оценивали во внутрипроизводственных
35 испытаниях в сыре типа гауда. Результаты показали замедленный рост плесневых грибов, вызывающих порчу, на сырах, приготовленных с YM-B или YM-C по сравнению с образцом без добавления защитной культуры. Предполагается, что присутствие только штамма *Propionibacterium* потенциально может вызвать образование противогрибковых метаболитов штаммом *Lactobacillus*. Авторы настоящего изобретения показали, что основная часть противогрибковой активности исходит от *Lactobacillus*.

40 Описанные в примерах штаммы изучали методом посева на агар.

Эти штаммы могут применяться для разработки противогрибковых культур, в частности для применения в молочном производстве. С помощью противогрибковых молочнокислых бактерий по настоящему изобретению было бы возможным применение противогрибковых культур на основе принципа совместной культуры **HOLDBAC** YM, например, для применения в йогурте (включая питьевой йогурт), сметане, полутвердом
45 и твердом сыре, зерненом твороге, свежем сыре, кислом сыре, сливочном сыре и белом соленом сыре. Потенциальным применением могут являться другие области пищевого применения, такие как, например, закваска, а также защита кормовых продуктов, таких

как, например, силос.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Применяемый в данном документе термин “жизнеспособный” относится к бактериальным клеткам, способным к активному метаболизму, выживанию, росту или
5 размножению.

Применяемый в данном документе термин “защитная культура *Lactobacillus*” относится к композиции, содержащей живые *Lactobacillus* (чистые культуры или концентраты культур), которая не является конечным пищевым продуктом, подходящим для потребления, но которую добавляют к продуктам питания с целью снижения рисков,
10 опосредованных патогенными или токсикогенными микроорганизмами. Включенными в это определение являются композиции, такие как среды для ферментации или их концентрированные препараты, в которых *Lactobacillus* выращивают в подходящих средах.

Европейская ассоциация пищевых продуктов и культур (EFFCA) охарактеризовала защитные культуры следующим образом: термин “защитные культуры” применим к микробным культурам, применяемым при производстве пищевых продуктов (MFC), проявляющим метаболическую активность, способствующую подавлению или контролю роста нежелательных микроорганизмов в пищевых продуктах. Такими нежелательными микроорганизмами могут быть патогенные или токсикогенные бактерии и грибы, но
15 также могут быть включены виды, вызывающие порчу пищевых продуктов.

Защитные культуры рассматривают как составную часть заквасочных культур, которые являются традиционными средствами технологии пищевых продуктов, применяемой для производства кисломолочных пищевых продуктов, таких как сыр, йогурт, некоторые колбасы, вино и т.д. Общим свойством кисломолочных продуктов
25 является то, что они обладают более долгим сроком хранения, чем несброженное исходное сырье (например, сыр имеет гораздо более долгий срок хранения, чем молоко). Это свойство является результатом активного метаболизма культуры для ферментации, воздействующей посредством сложной системы конкуренции за питательные вещества и сайты связывания, а также посредством продуцирования ингибирующих метаболитов,
30 таких как органические кислоты, перекись водорода, диацетил, реутерин и бактериоцины.

В зависимости от конкретных применяемых культур, культуры обычно придают многочисленные свойства пищевому продукту, которые также представляют собой органолептические свойства и пищевую ценность. В этом отношении аналогичные виды заквасочных культур, применяемых в способах ферментации, также применяли
35 по отношению к пищевому продукту с целью применения потенциала “биологической защиты” с воздействием или без воздействия на органолептические свойства. Для таких заквасочных культур применяли термин защитная культура.

Их применение не ограничено “классическими” кисломолочными пищевыми продуктами, но также играет важную роль, когда их метаболическая активность имеет место в пищевом продукте с нейтральным значением pH и высокой активностью воды, которые подвергаются повышенному риску роста патогенов пищевых продуктов. Применение “защитных культур” является дополнительным мероприятием для улучшения гигиены пищевых продуктов и не стоит пренебрегать каким-либо мероприятием надлежащей производственной практики, обеспечивающим высокий
45 стандарт пищевой безопасности.

Защитные культуры скорее являются составной частью заквасочных культур, нежели добавками. Очевидно, что эти культуры развивают собственный защитный и полезный потенциал подобно всем заквасочным культурам в результате своей метаболической

активности внутри или на поверхности пищевого продукта. (EFFCA, декабрь 2011 г.).

Защитную культуру добавляют вместе с заквасочной культурой к основе пищевого продукта или корма перед ферментацией пищевого продукта или корма. Таким образом, защитная культура подвергается этапу ферментации и способна расти и/или обладать 5 метаболитической активностью. Заквасочная культура необходима для получения кисломолочных пищевых продуктов, таких как йогурт, сыр или сметана, и способствует желаемым изменениям при формировании вкуса, структуры и запаха продукта. В дополнение к этому, защитные культуры добавляют к пищевому продукту для ограничения роста патогенных бактерий или бактерий, вызывающих порчу пищевого 10 продукта, и, таким образом, снижают риск пищевых отравлений и обеспечивают срок хранения.

Применяемый в данном документе термин “конечный пищевой или кормовой продукт” относится к композиции, подходящей для потребления, такой как для потребления человеком или животным в форме пищевого или кормового продукта.

Применяемый в данном документе термин “препарат” относится к любой композиции или ее частям, полученным из среды, обусловленной ростом бактерий рода *Lactobacillus* или их экстрактом, включая экстракты, содержащие один или несколько клеточных компонентов нежизнеспособных бактерий, таких как липиды, белки или нуклеиновая кислота, полученные из бактерий рода *Lactobacillus*. Включенные в данное определение 15 препараты представляют собой как жидкие препараты, так и порошкообразные препараты, в которых в значительной степени удалили воду.

Термин “контаминант”, применяемый в данном документе, относится к любому нежелательному или случайному росту любого микроорганизма, такого как бактерии, грибы, такие как дрожжевые или плесневые грибы. В некоторых случаях контаминант 20 может вызывать заболевание. Однако часто контаминант только ухудшает и портит продукт, в котором он находится, и/или придает неприятный или нежелательный вкус или вкусовое ощущение.

В некоторых вариантах осуществления контаминантом являются грибы, выбранные из списка, состоящего из видов *Penicillium*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium solitum*, 30 *Penicillium glabrum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus* sp., *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Eurotium* spp., *Fusarium* spp., *Candida* spp., *Candida colliculosa*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefir*, *Candida lambica*, *Candida lipolytica*, *Candida lusitaniae*, *Candida sake*, *Candida sphaerica*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Candida rugosa*, *Candida zeylanoides*, 35 *Debaryomyces* spp., *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces* spp., *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula* spp., *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces servazzii* и *Geotrichum* spp., *Geotrichum candidum*.

В некоторых вариантах осуществления контаминант представляет собой бактерии, отличные от конкретного штамма *Lactobacillus*, применяемого в способах в соответствии 40 с настоящим изобретением, выбранные из списка, состоящего из *Listeria monocytogenes*, видов *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Clostridium* sp., *Enterobacteriaceae*, таких как *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp.

Lactobacillus

Применяемый в данном документе термин “любой другой штамм рода *Lactobacillus*” или “любой другой штамм *Lactobacillus*” относится к любому штамму рода *Lactobacillus*, который не является штаммом *Lactobacillus*, выбранным из списка, состоящего из: 45 *Lactobacillus paracasei* DSM 25832, *Lactobacillus plantarum* DSM 25833, *Lactobacillus plantarum*

DSM 25834, *Lactobacillus plantarum* DSM 25835, *Lactobacillus plantarum* DSM 25836 и *Lactobacillus plantarum* DSM 25837, таким как штаммы *Lactobacillus*, которые могут применяться для производства йогурта, сыра, квашеной капусты, соленых огурцов, пива, вина, сидра, кимчи, какао и других кисломолочных продуктов питания, а также животных кормов, таких как силос. Термин *Lactobacillus* предназначен для включения организмов, описанных в (<http://www.bacterio.cict.fr/l/Lactobacillus.html>), и, в частности, включающих *L. acetotolerans*, *L. acidifarinae*, *L. acidipiscis*, *L. acidophilus*, *L. agilis*, *L. algidus*, *L. alimentarius*, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylophobicus*, *L. amylovorus*, *L. animalis*, *L. antri*, *L. apodemi*, *L. aviarius*, *L. bifermentans*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. camelliae*, *L. casei*, *L. catenaformis*, *L. ceti*, *L. coleohominis*, *L. collinoides*, *L. composti*, *L. concavus*, *L. coryniformis*, *L. crispatus*, *L. crustorum*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii* подвид *delbrueckii*, *L. delbrueckii* подвид *bulgaricus*, *L. delbrueckii* подвид *lactis*, *L. dextrinicus*, *L. diolivorans*, *L. equi*, *L. equigenerosi*, *L. farraginis*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. fornicalis*, *L. fructivorans*, *L. frumenti*, *L. fuchuensis*, *L. gallinarum*, *L. gasserii*, *L. gastricus*, *L. ghanensis*, *L. graminis*, *L. hammesii*, *L. hamsteri*, *L. harbinensis*, *L. hayakitensis*, *L. helveticus*, *L. hilgardii*, *L. homohiochii*, *L. iners*, *L. ingluviei*, *L. intestinalis*, *L. jensenii*, *L. johnsonii*, *L. kalixensis*, *L. kefiranofaciens*, *L. kefirii*, *L. kimchii*, *L. kitasatonis*, *L. kunkeei*, *L. leichmannii*, *L. lindneri*, *L. malefermentans*, *L. mali*, *L. manihotivorans*, *L. mindensis*, *L. mucosae*, *L. murinus*, *L. nagelii*, *L. namurensis*, *L. nantensis*, *L. oligofermentans*, *L. oris*, *L. panis*, *L. pantheris*, *L. parabrevis*, *L. parabuchneri*, *L. paracollinoides*, *L. parafarraginis*, *L. parakefirii*, *L. paralimentarius*, *L. parapantarum*, *L. pentosus*, *L. perolens*, *L. plantarum*, *L. pontis*, *L. psittaci*, *L. rennini*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. rimaе*, *L. rogosae*, *L. rossiae*, *L. ruminis*, *L. saerimneri*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. sanfranciscensis*, *L. satsumensis*, *L. secaliphilus*, *L. sharpeae*, *L. siliginis*, *L. spicheri*, *L. suebicus*, *L. thailandensis*, *L. ultunensis*, *L. vaccinostercus*, *L. vaginalis*, *L. versmoldensis*, *L. vini*, *L. vitulinus*, *L. zae* и *L. zymae*, а также их разновидности.

Термин *Lactobacillus* предназначен для включения любого конкретного штамма *Lactobacillus*, описанного в EP0576780, EP 1308506 EP 1796698, EP 2245943, EP 1530642, EP 1740726, WO 03/040349 WO/2006/032542, WO/2007/132359, WO/2004/013343 и WO/2010/081138.

В некоторых вариантах осуществления любой другой штамм *Lactobacillus* выбран из *Lactobacillus paracasei* подвида *paracasei* DSM 14514 и *Lactobacillus rhamnosus* DSM 7061. *Propionibacterium*

Применяемый в данном документе термин “штамм бактерии *Propionibacterium*” относится к любому другому штамму рода *Propionibacterium*, включая виды *Propionibacterium acidifaciens*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium australiense*, *Propionibacterium avidum*, *Propionibacterium cyclohexanicum*, *Propionibacterium freudenreichii* подвид *freudenreichii*, *Propionibacterium freudenreichii* подвид *shermanii*, *Propionibacterium granulorum*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium microaerophilum*, *Propionibacterium propionicum* и *Propionibacterium thoenii*, а также их варианты. Этот термин предполагает включение конкретных штаммов *Propionibacterium*, описанных в настоящем раскрытии, и в любом из EP0576780, EP1308506, WO03/040349 и US4728516, включая *Propionibacterium freudenreichii* подвид *shermanii* DSM 7067.

КОНКРЕТНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых вариантах осуществления бактериальным препаратом в соответствии с настоящим изобретением является клеточная суспензия в ферментативном бульоне отдельно или в комбинации с бактерией рода *Propionibacterium* или любым другим штаммом *Lactobacillus*.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный препарат в соответствии с настоящим изобретением высушивают с помощью сублимационной сушки или замораживают.

5 В некоторых вариантах осуществления бактериальный препарат в соответствии с настоящим изобретением характеризуется тем, что он дополнительно содержит традиционные средства, применяемые для контроля дрожжей и плесневых грибов, такие как пропионат или фенилаланин.

10 В некоторых вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением является защитной культурой *Lactobacillus*, при этом указанные жизнеспособные бактерии рода *Lactobacillus* присутствуют в количестве по меньшей мере 10^7 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^7 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^8 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^9 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^{10} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^{10} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^{11} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^{11} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^{12} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^{12} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^{13} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^{13} КОЕ/г или мл композиции.

20 В некоторых вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением является конечным пищевым или кормовым продуктом, при этом указанные жизнеспособные бактерии рода *Lactobacillus* присутствуют в количестве по меньшей мере 10^5 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^5 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^6 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^6 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^7 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^7 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^8 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^8 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^9 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^9 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^{10} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^{10} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^{11} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^{11} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^{12} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^{12} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^{13} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^{13} КОЕ/г или мл композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция или препарат в соответствии с настоящим изобретением является защитной культурой *Lactobacillus*.

40 В некоторых вариантах осуществления композиция или препарат в соответствии с настоящим изобретением является конечным пищевым или кормовым продуктом.

В некоторых вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением находится с или без клеточных остатков указанных бактерий рода *Propionibacterium*.

45 В некоторых вариантах осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением является защитной культурой *Lactobacillus*, при этом указанные жизнеспособные бактерии рода *Lactobacillus* присутствуют в количестве по меньшей мере 10^7 КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^7 КОЕ/г или мл, таком как по

КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^{11} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^{11} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^{12} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^{12} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 10^{13} КОЕ/г или мл, таком как по меньшей мере 5×10^{13} КОЕ/г или мл композиции.

В некоторых вариантах осуществления композиция или препарат в соответствии с настоящим изобретением применяется для получения пищевого продукта или кормового продукта, такого как молочный йогурт. В некоторых вариантах осуществления продукт питания выбран из группы, состоящей из молочных продуктов, йогурта, питьевого йогурта, сыра, такого как свежий сыр, сливочный сыр, зерненный творог, полумягкий и мягкий сыр, полутвердый и твердый сыр, белый соленый сыр, кисломолочных продуктов и сметаны, квашеной капусты, солений, пива, вина, сидра, кимчхи, какао, закваски и других кисломолочных пищевых продуктов, а также животных кормов, таких как силос.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения “любые другие бактерии рода *Lactobacillus*” выбраны из *Lactobacillus paracasei* DSM 14514 и *Lactobacillus rhamnosus* DSM 7061.

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ В СООТВЕТСТВИИ С НАСТОЯЩИМ ИЗОБРЕТЕНИЕМ

1. Бактерия рода *Lactobacillus*, выбранная из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837

или их функциональных эквивалентов.

2. Бактериальный препарат, характеризующийся тем, что он содержит *Lactobacillus*, выбранную из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837

или их функциональных эквивалентов, отдельно или в комбинации с бактерией рода *Propionibacterium*, с каким-либо другим штаммом рода *Propionibacterium* или с обоими.

3. Бактериальный препарат в соответствии с вариантом осуществления 2, которым является клеточная суспензия в ферментативном бульоне отдельно или в комбинации с бактерией рода *Propionibacterium*, с другим штаммом *Lactobacillus* или с обоими.

4. Бактериальный препарат в соответствии с любым из вариантов осуществления 2-3, характеризующийся тем, что он содержит штамм *Propionibacterium*, выбранный из *Propionibacterium acidipropionici* DSM 25845; *Propionibacterium freudenreichii* DSM 25846; *Propionibacterium freudenreichii* DSM 25847; *Propionibacterium thoenii* DSM 25848; *Propionibacterium thoenii* DSM 25849 и *Propionibacterium freudenreichii* подвида *shermanii* DSM 7067 или любой их комбинации.

5. Бактериальный препарат в соответствии с любым из вариантов осуществления 2-4, причем препарат является концентрированным.

6. Бактериальный препарат в соответствии с любым из вариантов осуществления 2-4, причем препарат является высушенным с помощью сублимационной сушки.

7. Бактериальный препарат в соответствии с любым из вариантов осуществления 2-6, характеризующийся тем, что он дополнительно содержит традиционные средства, применяемые для контроля дрожжей и плесневых грибов, такие как пропионат или фенилаланин.

8. Применение бактерий рода *Lactobacillus*, выбранных из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- 10 c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837

15 или их функциональных эквивалентов, при получении конечного пищевого или кормового продукта.

9. Применение бактериального препарата, содержащего *Lactobacillus*, выбранную из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- 20 c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837

25 или их функциональных эквивалентов, для контроля роста контаминанта, такого как бактерии, дрожжи или плесневые грибы.

10. Способ контроля роста контаминанта, такого как бактерии, дрожжи или плесневые грибы, характеризующийся применением бактериального препарата, содержащего *Lactobacillus*, выбранную из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- 30 b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837

35 или их функциональных эквивалентов, отдельно или в комбинации с бактерией рода *Propionibacterium*, с другим штаммом рода *Lactobacillus* или с обоими.

11. Применение препарата на основе жизнеспособных бактерий *Lactobacillus*, выбранных из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- 40 b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837

45 или их функциональных эквивалентов, для контроля роста контаминанта, такого как бактерии, дрожжи или плесневые грибы.

12. Способ контроля роста контаминанта, такого как бактерии, дрожжи или плесневые грибы, в композиции, при этом способ характеризуется наличием в данной

композиции жизнеспособных бактерий *Lactobacillus* штамма, выбранного из группы, состоящей из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
 - b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
 - 5 c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
 - d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
 - e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
 - f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837
- или их функциональных эквивалентов.

10 Пример 1

Тест-штаммы молочнокислых бактерий

Применяли следующие штаммы молочнокислых бактерий:

Lactobacillus paracasei DSM 25832;

Lactobacillus plantarum DSM 25833;

15 *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;

Lactobacillus plantarum DSM 25835;

Lactobacillus plantarum DSM 25836;

Lactobacillus plantarum DSM 25837;

Культивирование молочнокислых бактерий

20 Молочнокислые бактерии размножали в бульоне MRS (Oxoid Limited, Бэйзингсток, Великобритания) при температуре 30°C. Пассажи выполняли добавлением 0,1 мл из прекультур к 10 мл бульона MRS, культивирование проводили, как описано выше. Перед применением культуры выдерживали при температуре 4–6°C.

Индикаторные штаммы дрожжей и плесневых грибов

25 В таблицах 1 и 2 ниже приведены штаммы дрожжей и плесневых грибов.

Таблица 1		
Список штаммов дрожжей, применяемых в скрининге в отношении противогрибковой активности		
Номер штамма	Название штамма	Ссылка
205-J	<i>Candida lipolytica</i>	DuPont A/S ¹
30 DCS 605	<i>Debaryomyces hansenii</i>	DSM 70238 ²
DCS 1037	<i>Debaryomyces hansenii</i>	DuPont A/S
DSC 1055	<i>Candida sake</i>	DuPont A/S
DSC 1057	<i>Candida sake</i>	DuPont A/S
DSC 1063	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	DuPont A/S
35 DCS 1087	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CFSQE 63 ³
DCS 1088	<i>Candida pulcherrima</i>	Miescher ⁴
DCS 1089	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	CBS 1555 ⁵
DCS 1228	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DuPont A/S
DCS 1518	<i>Candida parapsilosis</i>	DuPont A/S
1) Danisco Nutrition Biosciences ApS, Брабранд, Дания. 2) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Брауншвейг, Германия. 3) Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J. and Schnürer J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters 219: 129-135. 4) Miescher S. 1999. Antimicrobial and autolytic systems of dairy propionibacteria. PhD thesis No.13486. ETH Цюрих, Швейцария. 5) Centraalbureau voor Schimmelcultures, Утрехт, Нидерланды.		

45 Перед применением штаммы дрожжей культивировали в бульоне, состоящем из 2% глюкозы (v/vg, Херлев, Дания), 0,5% дрожжевого экстракта (Oxoid Limited, Бэйзингсток, Великобритания) и 0,01% пептона из казеина (Oxoid), растворенного в растворе однозамещенного фосфорнокислого калия (312 мкмоль/л, pH 7,20±0,10). Стерильный глицерин добавляли в концентрации 33% об./об. к среде с выращенными дрожжами

перед хранением в криопробирках при температуре -80°C . После замораживания дрожжевые культуры подсчитывали на солодово-пептонном агаре (Oxoid).

Таблица 2

Список штаммов плесневых грибов, применяемых в скрининге в отношении противогрибковой активности		
Номер штамма	Название штамма	Происхождение
DCS 434	Penicillium sp.	DuPont A/S
DCS 435	Penicillium sp.	DuPont A/S
DCS 436	Penicillium sp.	DuPont A/S
DCS 437	Penicillium sp.	DuPont A/S
DCS 708	Aspergillus ochraceus	CBS 116.39
DCS 709	Aspergillus parasiticus	CBS 100926
DCS 1065	Penicillium sp.	DuPont A/S
DCS 1066	Penicillium sp.	DuPont A/S
DCS 1069	Aspergillus versicolor	DSM 63292
DCS 1099	Eurotium sp.	DTU 123 ⁶
DCS 1105	Fusarium sp.	DTU 40496
DCS 1106	Fusarium sp.	DTU 40872
DCS 1540	Penicillium sp.	DuPont A/S
DCS 1541	Penicillium sp.	DuPont A/S
DCS 1558	Penicillium sp.	DuPont A/S

6) Danmarks Tekniske Universitet, Лингби, Дания.

Штаммы плесневых грибов культивировали на солодово-пептонном скошенном агаре (Oxoid) до тех пор, пока не становилась видимой споруляция. Споры собирали добавлением дважды 5 мл стерильной водопроводной воды с добавкой 0,01% Tween 80 (Merck). Стерильный глицерин добавляли в концентрации 33% об./об. к растворам со спорами перед хранением в криопробирках при температуре -80°C . Подсчет спор проводили после замораживания на солодово-пептонном агаре (Oxoid).

Анализ верхнего слоя

Тест-штаммы молочнокислых бактерий высевали каплями (три капли на чашку Петри) на агар MRS. Чашки Петри инкубировали при температуре 30°C .

Чашки Петри с выращенными колониями молочнокислых бактерий покрывали мягким агаром с солодовым экстрактом, состоящим из 2% бульона с солодовым экстрактом (Oxoid) и 0,8% агар-агара (Merck, KGaA, Пармштадт, Германия), доведенным до температуры 47°C , содержащим 10^4 клеток дрожжей/мл или 10^4 спор плесневых грибов/мл. Покрытые чашки Петри инкубировали в течение 3–5 дней при температуре 25°C и проверяли на наличие зон ингибирования вокруг тестируемых колоний. В качестве контроля роста для каждого индикаторного организма готовили чашки Петри с агаром без капельных тест-штаммов. Площадь зон классифицировали следующим образом.

отсутствие ингибирования, чашка Петри полностью заросла	-
отсутствие роста грибов на капле	(+)
отсутствие роста грибов на расстоянии 5 мм вокруг капли	+
отсутствие роста грибов на расстоянии 10 мм вокруг капли	++
отсутствие роста грибов на расстоянии 15 мм вокруг капли	+++
отсутствие роста грибов на расстоянии свыше 15 мм вокруг капли	++++

Результаты

Шесть штаммов молочнокислых бактерий испытывали на наличие противогрибковой активности. В связи с этим штаммы капельно высевали в чашки Петри с агаром с MRS, на который помещали грибы, указанные в таблице 1 и 2, включенные в мягкий

агар с солодовым экстрактом. Чашки Петри хранили при температуре 25°C и проверяли на наличие зон ингибирования вокруг колоний молочнокислых бактерий.

Все шесть штаммов тестируемых молочнокислых бактерий продемонстрировали противогрибковую активность при анализе в верхнем слое, как приведено в таблице 3. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837 анализировали во втором испытании и применяли не все грибы, по этому штамму некоторые результаты недоступны.

Как правило, молочнокислые бактерии демонстрируют отличные спектры ингибирования. Наивысшую активность обнаружили у *Lactobacillus plantarum* DSM 25833, после которой следовали *Lactobacillus plantarum* DSM 25834 и *Lactobacillus plantarum* DSM 25836. Более слабую активность отмечали у *Lactobacillus paracasei* DSM 25832 по сравнению со штаммами *Lactobacillus plantarum*.

Таблица 3							
Противогрибковая активность выбранных штаммов <i>Lactobacillus</i> при анализе в верхнем слое							
	Lb. paracasei DSM 25832	Lb. plantarum DSM 25833	Lb. plantarum DSM 25834	Lb. plantarum DSM 25835	Lb. plantarum DSM 25836	Lb. plantarum DSM 25837	
15	<i>Candida lipolytica</i> 205-J	+++	++	++	++	+	н.о.
	<i>Debaryomyces hansenii</i> DCS 605	+++	++++	++	++	++	н.о.
20	<i>Debaryomyces hansenii</i> DCS 1037	++	++	++	++	++	н.о.
	<i>Candida sake</i> DCS 1055	+	+++	+++	++	++	++++
	<i>Candida sake</i> DCS 1057	++	+++	++	+++	+++	н.о.
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> DCS 1063	+++	+++	+++	+++	+++	++
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> DCS 1087	-	++	++	+	+	+
25	<i>Candida pulcherrima</i> DCS 1088	-	+	+	(+)	+	н.о.
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> DCS 1089	-	+	+	+	-	-
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DCS 1228	++	++	+++	++	+	н.о.
30	<i>Candida parapsilosis</i> DCS 1518	-	++	++	++	+	н.о.
	<i>Penicillium</i> sp. DCS 434	+	+	++	+	++	н.о.
	<i>Penicillium</i> sp. DCS 435	+	++	+	+	++	н.о.
	<i>Penicillium</i> sp. DCS 436	++	++	+++	+++	+++	н.о.
	<i>Penicillium</i> sp. DCS 437	+	+	(+)	(+)	+	н.о.
35	<i>Aspergillus ochraceus</i> DCS 708	+++	++++	+++	++	+++	++
	<i>Aspergillus parasiticus</i> DCS 709	(+)	(+)	(+)	(+)	+	(+)
	<i>Penicillium</i> sp. DCS 1065	+++	++++	++++	+++	++++	+++
	<i>Penicillium</i> sp. DCS 1066	++	++++	++++	+++	+++	+++
40	<i>Aspergillus versicolor</i> DCS 1069	++++	++++	++++	++++	++++	+++
	<i>Eurotium</i> sp. DCS 1099	+	++++	++++	+	++++	+++
	<i>Fusarium</i> sp. DCS 1105	+++	++++	++++	++++	++++	+++
	<i>Fusarium</i> sp. DCS 1106	+++	++++	++++	++++	++++	++++
	<i>Penicillium</i> sp. DCS 1540	++	++++	++++	+++	++++	+
	<i>Penicillium</i> sp. DCS 1541	+	++++	++	++	++	++
45	<i>Penicillium</i> sp. DCS 1558	++++	++++	++++	++++	++++	++++
н.о.: не определено.							

ПРИМЕР 2

Исследование противогрибковой активности *Lactobacillus paracasei* подвида *paracasei*

DSM 14514 в методе посева на агар

Замороженные концентрированные образцы *Lactobacillus paracasei* подвида *paracasei* DSM 14514 оценивали в отношении противогрибковой активности в методе посева на агар. Контрольный образец без противогрибковых культур включали в оценку для сравнения. Противогрибковую активность оценивали с помощью индикаторных штаммов, приведенных в таблице 1.

Таблица 1		
Список штаммов дрожжей и плесневых грибов, применяемых в методе посева на агар		
Номер штамма	Название штамма	Ссылка
DCS 605	<i>Debaryomyces hansenii</i>	DSM 70238 ¹
DCS 1065	<i>Penicillium</i> sp.	DuPont A/S ²
DCS 1540	<i>Penicillium</i> sp.	DuPont A/S
DCS 1541	<i>Penicillium</i> sp.	DuPont A/S

1) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Брауншвейг, Германия. Перед применением *Debaryomyces hansenii* DCS 605 выращивали в бульоне, состоящем из 2% глюкозы (vwt, Херлев, Дания), 0,5% дрожжевого экстракта (Oxoid Limited, Бейзингсток, Великобритания) и 0,01% пептона из казеина (Oxoid), растворенного в растворе однозамещенного фосфорнокислого калия (312 мкмоль/л, рН 7,20±0,10). Стерильный глицерин добавляли в концентрации 33% об./об. к среде с выращенными дрожжами перед хранением в криопробирках при температуре -80°C. После замораживания дрожжевую культуру подсчитывали на солодово-пептонном агаре (Oxoid). *Penicillium* sp. DCS 1065, *Penicillium* sp. DCS 1540 и *Penicillium* sp. DCS 1541 выращивали на солодово-пептонном скошенном агаре (Oxoid) до тех пор, пока не становилась видимой споруляция. Споры собирали добавлением дважды 5 мл стерильной водопроводной воды с добавкой 0,01% Tween 80 (Merck). Стерильный глицерин добавляли в концентрации 33% об./об. к растворам со спорами перед хранением в криопробирках при температуре -80°C. Подсчет спор проводили после замораживания на солодово-пептонном агаре (Oxoid). Порции по 750 г коммерчески доступного молока УНТ с содержанием 3,5% жира подкисляли коммерческой заквасочной культурой йогурта. Заквасочная культура йогурта состояла из штаммов *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrückii* подвида *bulgaricus* (Danisco A/S, Дания). Тестовые образцы дополнительно инокулировали защитными штаммами до содержания $5,0 \cdot 10^6$ КОЕ/г. Ферментацию выполняли в течение приблизительно 7–9 ч при температуре 42°C до тех пор, пока рН в культурах йогурта не достиг 4,50. Образцы интенсивно встряхивали и 650 г йогурта взвешивали в стерильную бутылку. После этого 325 г раствора агара, состоящего из 25 г агар-агара (Merck) на литр, доведенного до 47°C, добавляли в йогурт и бутылки слегка встряхивали до получения гомогенной смеси йогурта и агара. Смесь йогурта и агара наливали в чашки Петри. После затвердения агара с йогуртом разбавленные растворы дрожжей и растворы со спорами плесневых грибов наносили капельно на чашки Петри с агаром и рост индикаторных штаммов на чашках Петри с противогрибковыми культурами и без противогрибковых культур сравнивали после инкубации при температуре 25°C. Штамм дрожжей *Debaryomyces hansenii* DCS 605 капельно наносили при концентрациях $5,0 \cdot 10^1$ КОЕ/капля, $5,0 \cdot 10^2$ КОЕ/капля и $5,0 \cdot 10^3$ КОЕ/капля на чашки Петри в трех повторностях. Штаммы плесневых грибов *Penicillium* sp. DCS 1540, *Penicillium* sp. 1541 и *Penicillium* sp. DCS 1065 капельно наносили при концентрации 20 спор/капля на чашки Петри. Ингибирующую активность образцов рассчитывали путем сравнения роста плесневых грибов на незащищенных контрольных

образцах с ростом на образцах, полученных с добавленными защитными штаммами согласно следующему уравнению

$$\text{Ингибирующая активность [\%]} = 100 - \left[\frac{\text{Диаметр колонии на чашке Петри с защитной культурой}}{\text{Диаметр колонии на контрольной чашке Петри}} \cdot 100 \right]$$

Пример 3

Исследование противогрибковой активности в модельной системе сыра

Замороженные концентрированные образцы *Lactobacillus plantarum* DSM 25833

оценивали в отношении противогрибковой активности с помощью модельной системы сыра. Контрольный образец без противогрибковых культур включали в оценку для сравнения. Противогрибковую активность оценивали с помощью индикаторных штаммов, приведенных в таблице 2.

Список применяемых штаммов плесневых грибов		
Номер штамма	Название штамма	Ссылка
DCS 1540	<i>Penicillium</i> sp.	DuPont A/S
DCS 1541	<i>Penicillium</i> sp.	DuPont A/S
DCS 1558	<i>Penicillium</i> sp.	DuPont A/S

Penicillium sp. DCS 1540, *Penicillium* sp. DCS 1541 и *Penicillium* sp. DCS 1558 выращивали на солодово-пептонном скошенном агаре (Oxoid) до тех пор, пока не становилась видимой споруляция. Споры собирали добавлением дважды 5 мл стерильной водопроводной воды с добавкой 0,01% Tween 80 (Merck). Стерильный глицерин добавляли в концентрации 33% об./об. к растворам со спорами перед хранением при температуре -80°C. Подсчет спор проводили после замораживания на солодово-пептонном агаре (Oxoid). Модель сыра замешивали с применением порций по 500 мл негомогенизированного молока. Молоком наполняли центрифужные бутылки и нагревали до температуры 32°C. Молоко инокулировали коммерчески доступной термофильной заквасочной культурой йогурта. Заквасочная культура сыра состояла из штаммов *Lactococcus lactis* (Danisco A/S, Дания). Тестовые образцы дополнительно инокулировали защитными штаммами до содержания $5,0 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Молоко коагулировали коммерчески доступным жидким животным реннином (Danisco A/S, Дания). Сгусток нарезали на кубики размером примерно 1×1×1 см. Смесь частиц сыворотки и сгустка встряхивали в течение 20 мин на вращающемся смесителе при 10 об/мин. Сорок процентов (приблизительно 200 мл) сыворотки удаляли и заменяли равным объемом стерильной воды при температуре 32°C. Смесь перемешивали в течение дополнительных 10 мин, как описано выше. После этого бутылки центрифугировали при 300g в течение 10 мин при комнатной температуре в центрифуге, оборудованной бакет-ротатором. Затем сыворотку удаляли и бутылки центрифугировали при 1400g в течение 1 ч при температуре 30°C. Сгусток опрокидывали в тот же контейнер, сыворотку удаляли и проводили конечное центрифугирование, как описано ранее, в течение 30 мин. Куски сгустка небольшого размера хранили в контейнерах, помещенных на водяную баню при температуре 32°C до тех пор, пока pH не достигал приблизительно 5,2. Сыры солили в течение 5 мин, наливая 45 мл стерильного насыщенного раствора (330 г/л NaCl; pH довели до 5,4; 12°C) в бутылку. Затем сыры помещали в стерильную коробку, оборудованную решеткой для облегчения оттока сыворотки, и хранили в течение ночи при температуре 12°C. На следующий день сыры упаковывали под вакуумом и оставляли созревать при температуре 12°C в течение 28 дней. После созревания поверхность сыров инокулировали растворами со спорами трех различных

штаммов плесневых грибов. Штаммы плесневых грибов *Penicillium* sp. DCS 1540, *Penicillium* sp. DCS 1541 и *Penicillium* sp. DCS 1558 капельно наносили на сыры при концентрациях 5 спор/капля, 10 спор/капля и 50 спор/капля в трех повторностях. Сыры инкубировали при температуре 12°C и визуально исследовали рост плесневых грибов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Противогрибковая активность *Lactobacillus plantarum* DSM 25833 в модельной системе сыра

В испытании в модельную систему сыра замешивали с различными защитными культурами. Противогрибковые штаммы добавляли к негомогенизированному молоку при исходных уровнях $5,0 \cdot 10^6$ КОЕ/г. Молоко подкисляли коммерческой заквасочной культурой сыра, коагулировали коммерчески доступным животным реннином и сгусток нарезали кубиками. Сыворотку удаляли центрифугированием и сыры прессовали и солили, а затем оставляли созревать в течение 28 дней. После созревания поверхность сыров инокулировали растворами со спорами трех различных штаммов плесневых грибов. Штаммы плесневых грибов *Penicillium* sp. DCS 1540, *Penicillium* sp. DCS 1541 и *Penicillium* sp. DCS 1558 капельно наносили на сыры при концентрациях 5, 10 и 50 спор в трех повторностях. Сыры инкубировали при температуре 12°C и визуально исследовали рост плесневых грибов. Каждый раз отмечали, когда одна из девяти капель на поверхности сыра проявляла видимый рост плесневых грибов. Средний срок хранения сыров рассчитывали, принимая среднее число дней хранения, при котором рост плесневых грибов был заметен на девяти каплях на поверхности сыра. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5		
Средний срок хранения экспериментальных сыров, полученных с противогрибковыми культурами и без противогрибковых культур		
	Ссылка	<i>Lb. plantarum</i> DSM 25833
	Средний срок хранения [дн.]	
<i>Penicillium</i> sp. DCS 1540	6	24 ¹
<i>Penicillium</i> sp. DCS 1541	7	16
<i>Penicillium</i> sp. DCS 1558	12	61 ^{1,2}

¹ Рост плесневых грибов не наблюдался на всех девяти каплях в конце эксперимента.
² Испытание завершали через 61 день.

Добавление *Lactobacillus plantarum* DSM 25833 к модельным сырам замедляло рост индикаторных плесневых грибов по сравнению с контрольным образцом без добавленных противогрибковых культур.

(57) Формула изобретения

1. Штамм бактерий рода *Lactobacillus*, представленный *Lactobacillus paracasei* DSM 25832, обладающий ингибирующей активностью против дрожжей и плесневых грибов.

2. Штамм бактерий рода *Lactobacillus*, представленный *Lactobacillus plantarum* DSM 25833, обладающий ингибирующей активностью против дрожжей и плесневых грибов.

3. Штамм бактерий рода *Lactobacillus*, представленный *Lactobacillus plantarum* DSM 25834, обладающий ингибирующей активностью против дрожжей и плесневых грибов.

4. Штамм бактерий рода *Lactobacillus*, представленный *Lactobacillus plantarum* DSM 25835, обладающий ингибирующей активностью против дрожжей и плесневых грибов.

5. Штамм бактерий рода *Lactobacillus*, представленный *Lactobacillus plantarum* DSM 25836, обладающий ингибирующей активностью против дрожжей и плесневых грибов.

6. Штамм бактерий рода *Lactobacillus*, представленный *Lactobacillus plantarum* DSM

25837, обладающий ингибирующей активностью против дрожжей и плесневых грибов.

7. Бактериальная композиция, обладающая ингибирующей активностью против дрожжей и плесневых грибов, отличающаяся тем, что содержит штамм рода *Lactobacillus*, выбранный из списка, состоящего из:

- 5 a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- 10 f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837,

в комбинации с бактерией рода *Propionibacterium*, где указанный штамм *Lactobacillus* является жизнеспособным и присутствует в количестве 10^7 КОЕ/г или мл препарата.

8. Бактериальная композиция по п.7, отличающаяся тем, что содержит штамм *Propionibacterium*, выбранный из *Propionibacterium acidipropionici* DSM 25845; *Propionibacterium freudenreichii* DSM 25846; *Propionibacterium freudenreichii* DSM 25847; *Propionibacterium thoenii* DSM 25848; *Propionibacterium thoenii* DSM 25849 и *Propionibacterium freudenreichii* подвида *shermanii* DSM 7067 или любой их комбинации.

9. Бактериальная композиция, обладающая ингибирующей активностью против дрожжей и плесневых грибов, отличающаяся тем, что содержит штамм рода *Lactobacillus*, выбранный из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- 25 d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837,

в комбинации с другим штаммом рода *Lactobacillus*, где указанный штамм *Lactobacillus* является жизнеспособным и присутствует в количестве 10^7 КОЕ/г или мл препарата

10. Бактериальная композиция по любому из пп.7-9, которая является концентрированной.

11. Бактериальная композиция по любому из пп.7-10, которая является высушенной с помощью сублимационной сушки.

12. Бактериальная композиция по любому из пп.7-10, отличающаяся тем, что дополнительно содержит традиционные средства, применяемые для контроля дрожжей и плесневых грибов, такие как пропионат или фенилаланин.

13. Применение штамма бактериального рода *Lactobacillus*, выбранного из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- 45 e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837,

в получении молочного продукта.

14. Применение штамма бактерий рода *Lactobacillus*, выбранного из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- 5 e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837,

в контроле роста дрожжей и плесневых грибов.

15. Способ контроля роста дрожжей и плесневых грибов в молочном продукте, отличающийся тем, что в указанный молочный продукт добавляют бактериальную

10 композицию, содержащую штамм *Lactobacillus*, выбранный из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- 15 e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837,

в комбинации с бактерией рода *Propionibacterium*.

16. Способ контроля роста дрожжей и плесневых грибов в молочном продукте, отличающийся тем, что в указанный молочный продукт добавляют бактериальную

20 композицию, содержащую штамм *Lactobacillus*, выбранный из списка, состоящего из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- 25 e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837,

в комбинации с другим штаммом рода *Lactobacillus*.

17. Способ контроля роста дрожжей и плесневых грибов в ферментированном молочном продукте, отличающийся тем, что

30 (1) добавляют вместе с заквасочной культурой в пищевую основу бактериальный препарат, содержащий штамм *Lactobacillus*, выбранный из группы, состоящей из:

- a. *Lactobacillus paracasei* DSM 25832;
- b. *Lactobacillus plantarum* DSM 25833;
- c. *Lactobacillus plantarum* DSM 25834;
- 35 d. *Lactobacillus plantarum* DSM 25835;
- e. *Lactobacillus plantarum* DSM 25836;
- f. *Lactobacillus plantarum* DSM 25837, и

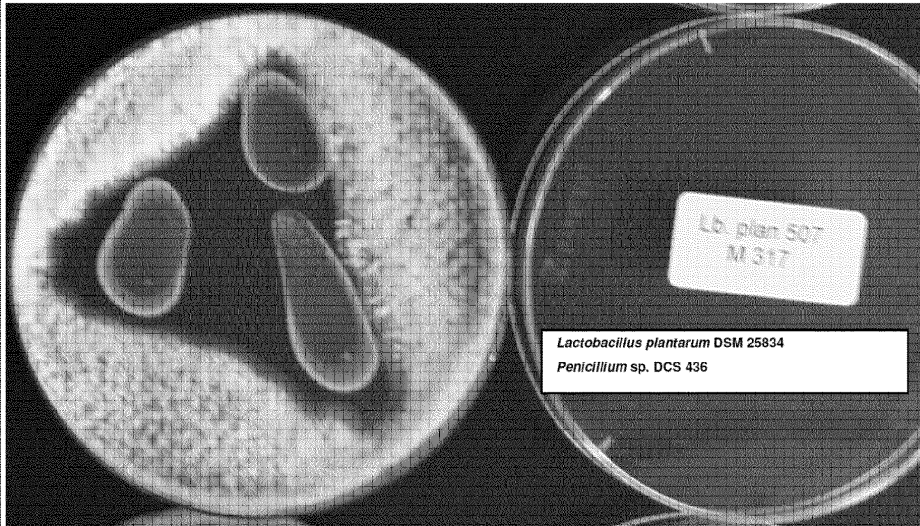
(2) ферментируют указанную пищевую основу для производства ферментированного молочного продукта.

40

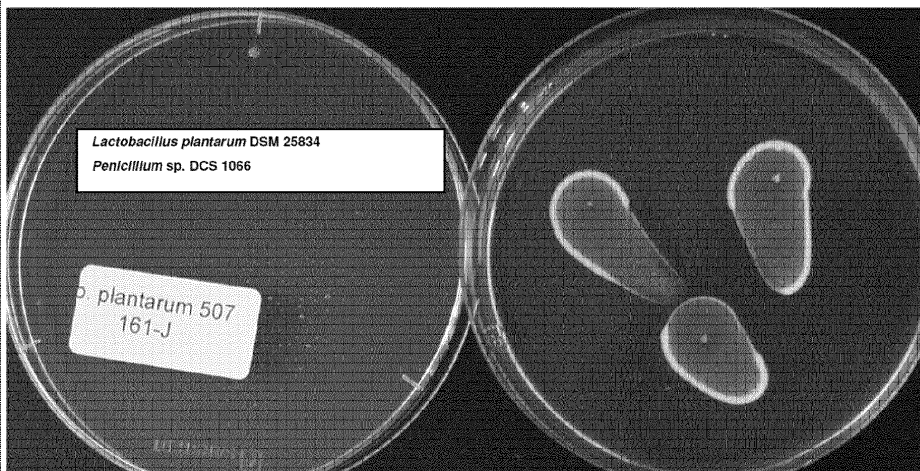
45

Фиг.1

1/4

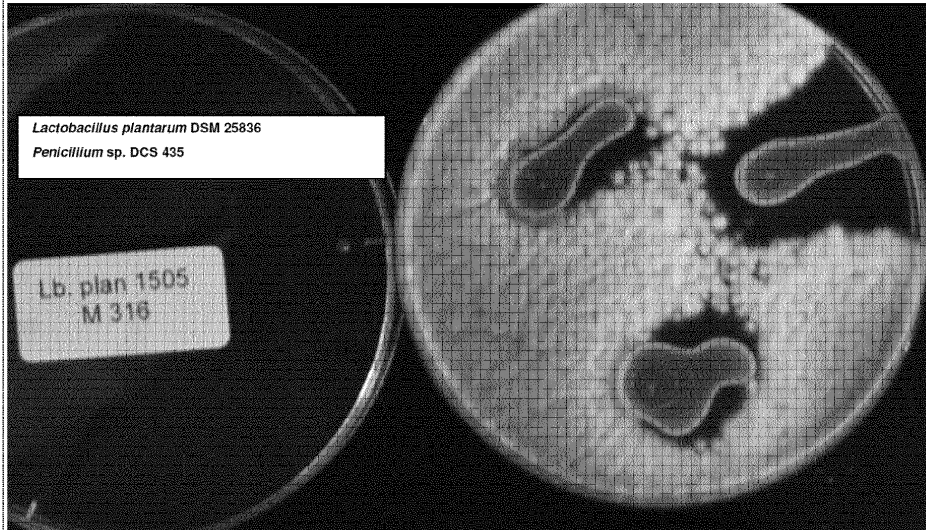


Фиг.2

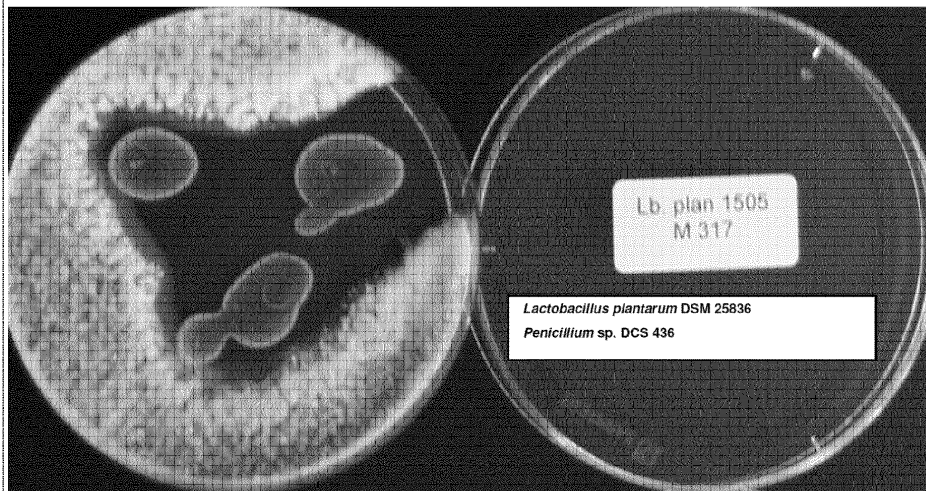


Фиг.3

2/4

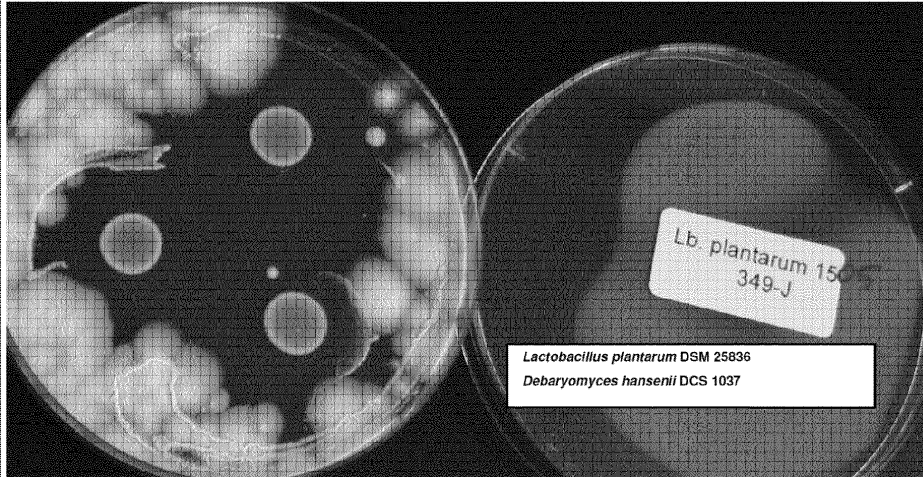


Фиг.4

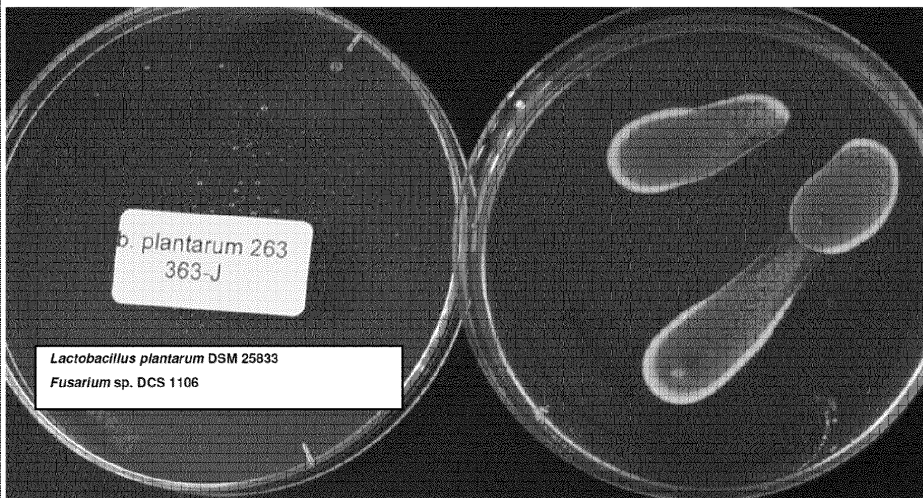


Фиг.5

3/4

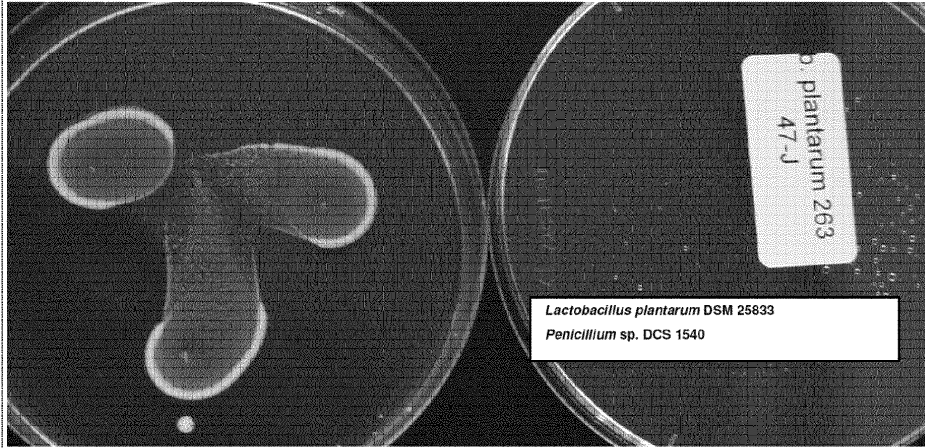


Фиг.6



Фиг.7

4/4



Фиг.8

