



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **118250**

(13) **C2**

(51) МПК

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

**C12R 1/46** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2014 12639**  
(22) Дата подання заявки: **25.04.2013**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **26.12.2018**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **12165517.9, 12198766.3**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **25.04.2012, 20.12.2012**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP, EP**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.12.2014, Бюл.№ 24**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **26.12.2018, Бюл.№ 24**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2013/058655, 25.04.2013**  
(72) Винахідник(и): **Йохансен Ерік (DK), Серенсен Кім Іб (DK), Курік-Боуден Мір'яна (US), Юнге ете Піа (DK)**

(73) Власник(и): **КР. ХАНСЕН А/С**,  
Boege Alle 10-12, DK-2970 Hoersholm,  
Denmark (DK)  
(74) Представник: **Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115**  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
Natural sweetening of food products by engineering Lactococcus lactis for glucose production / Pool W.A., Neves A.R., Kok J. et al. // Metabolic Engineering. – 2006. - Vol. 8. - № 5. - P. 456-464.  
Lactose metabolism in Streptococcus-lactis studies with a mutant lacking glucokinase and Mannose-Phosphotransferase Activities / Thompson J., Chassy B., Egan W. et al. // Journal of Bacteriology. - 1985. - Vol. 162. - № 1. - P. 217-223.  
WO 2011/026863 A1, 10.03.2011.  
Control of sugar utilization in the oral bacteria Streptococcus salivarius and Streptococcus sanguis by the phosphoenolpyruvate: Glucose phosphotransferase system / Vadeboncoeur C., Bourgeau G., Mayrand D. et al. // Archives of Oral Biology. - 1983. - Vol. 28. - № 2. - P. 123-131.

**UA 118250 C2**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
Physiological Study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* Strains in a Novel Chemically Defined Medium / Chervaux C., Ehrlich S., Maguin E. // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2000. - Vol. 66. - № 12. - P. 5306-5311.  
Engineering of carbon distribution between glycolysis and sugar nucleotide biosynthesis in *Lactococcus lactis* / Boels I., Kleerebezem M., Vos W. // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2003. - Vol. 69. - № 2. - P. 1129-1135.  
Positive selection for resistance to 2-deoxyglucose gives rise, in *Streptococcus salivarius*, to seven classes of pleiotropic mutants, including *ptsH* and *ptsI* missense mutants / Gauthier L., Thomas S., Gagnon G. et al. // *Molecular Microbiology*. - 1994. - Vol. 13. - № 6. - P. 1101-1109.  
Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources / Hopkins M., Cummings J., Macfarlane G. // *Journal of Applied Microbiology*. - 1998. - Vol. 85. - № 2. - P. 381-386.

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
Molecular and biochemical analysis of the galactose phenotype of dairy *Streptococcus thermophilus* strains reveals four different fermentation profiles / De Vin F., Radstrom P., Herman L. et al // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2005. - Vol. 71. - №7. - P. 3659-3667.  
Emergence of a Cell Wall Protease in the *Streptococcus thermophilus* Population / Delorme Ch., Bartholini C., Bolotine A. et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2010. - Vol. 76. - № 2. - P. 451-460.  
Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria / De Vos W., Hugenholtz J. // *Trends in Biotechnology*. - 2004. - Vol. 22. - № 2. - P. 72-79.  
Genetic and biochemical characterization of the phosphoenolpyruvate:glucose/mannose phosphotransferase system of *Streptococcus thermophilus* / Cochu A., Vadeboncoeur Ch., Moineau S. et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2003. - Vol. 69. - № 9. - P. 5423-5432.

---

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТОВАНИХ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ З ПІДВИЩЕНОЮ ПРИРОДНОЮ СОЛОДКІСТЮ**

---

**(57) Реферат:**

Винахід належить до галактозо-ферментуючого штаму *Streptococcus thermophilus*, де штам несе мутацію в послідовності ДНК гена *glcK*, що кодує білок глюкокінази, де мутація повністю або частково інактивує білок глюкокінази, завдяки чому штам стає стійким до 2-дезоксиглюкози для забезпечення його здатності рости з утворенням колонії при висіванні штрихом на чашку з середовищем M17, що містить 2 % (мас./об.) лактози або 2 % (мас./об.) галактози і 20 мМ 2-дсзоксиглюкози після інкубації при 40 °С протягом 20 годин, способу його одержання та до застосування вказаних штамів для зменшення вмісту лактози в ферментованому харчовому продукті.

Галузь техніки винаходу

Даний винахід стосується штамів і культур бактерій *Streptococcus thermophilus*, що мають підсолоджувальну здатність, зумовлену виділенням високих рівнів глюкози, які утворилися в результаті деградації лактози, штамів бактерій *Lactobacillus delbrueckii*, підвид *bulgaricus*, що

5 мають підсолоджувальну здатність, зумовлену виділенням високих рівнів глюкози, які утворилися в результаті деградації лактози, заквашувальних культур, які містять такі штами, а також кисломолочних продуктів, одержаних з використанням вказаних культур. Даний винахід також стосується способу одержання вказаних штамів і застосування таких штамів для одержання кисломолочних продуктів, а також для підвищення солодкості кисломолочних

10 продуктів при зниженні в них вмісту лактози.

Рівень техніки винаходу

Чисті кисломолочні продукти мають терпкий або кислий смак в результаті перетворення лактози в молочну кислоту під дією молочнокислих бактерій в процесі ферментації. Тому їх часто підсолоджують шляхом додавання фруктів, меду, цукру або штучних підсолоджувачів, щоб задовольнити потребу клієнтів в продукті з солодшим смаком.

15

Харчова промисловість характеризується підвищеним попитом на низькокалорійні продукти харчування з солодким смаком, які сприяють подоланню проблем, пов'язаних з надмірною вагою і ожирінням, які стали дуже поширеними в останні 20 років. Солодкість, що звичайно розглядається як приємне відчуття, генерується цукром і деякими іншими речовинами.

20

Сприйняття різного цукру сильно розрізняється.

Якщо солодкість сахарози прийняти за 100 одиниць, солодкість лактози становитиме 16, галактози 32 і глюкози 74 (Godshall (1988). Food Technology 42 (11): 71-78). Таким чином, глюкоза, сприймається більш ніж в 4 рази солодше лактози, але при цьому дає приблизно такий же рівень калорій.

25

Цукор в ферментованих харчових продуктах частіше замінюють підсолоджувачами, такими як аспартам, ацесульфам К, сукралоза і сахарин, які можуть забезпечувати солодкість при нижчому споживанні калорій. Однак той факт, що застосування штучних підсолоджувачів може привести до появи присмаку, а також результати деяких досліджень, які свідчать про те, що споживання штучних підсолоджувачів пов'язане з такими недоліками, як збільшення почуття голоду, розвиток алергії, раку і т. д., приводять до того, що споживачі надають перевагу кисломолочним продуктам, які містять тільки натуральні підсолоджувачі, або, переважно, не містять доданих підсолоджувачів.

30

Таким чином, особливою задачею є розробка кисломолочних продуктів з високою природною (внутрішньої) солодкістю.

35

Кислотність кисломолочних продуктів залежить значною мірою від присутніх молочнокислих бактерій і параметрів процесу, які використовуються для одержання кисломолочного продукту.

Ферментація дисахариду лактози в молочнокислих бактеріях дуже добре вивчена, оскільки він є основним джерелом вуглецю в молоці. У багатьох видів лактоза після поглинання розщеплюється під дією  $\beta$ -галактозидази на глюкозу і галактозу. Глюкоза фосфорилується глюкокіназою з одержанням глюкозо-6-фосфату і ферментується за допомогою шляху Ембдена-Мейєргофа-Парнеса (гліколізу) більшістю молочнокислих бактерій (фіг. 1).

40

*Streptococcus thermophilus* є однією з молочнокислих бактерій, що найбільш широко використовуються для комерційної термофільної ферментації молока, де вказаний організм звичайно використовують як частину змішаної закваски, де як інший компонент використовують *Lactobacillus* sp., наприклад, *Lactobacillus delbrueckii*, підвид *bulgaricus*, для одержання йогурту, або *Lactobacillus helveticus* для одержання сиру типу швейцарського.

45

Юридичне визначення йогурту в багатьох країнах вимагає застосування *Streptococcus thermophilus* поряд з *Lactobacillus delbrueckii*, підвид *bulgaricus*. Обидва види генерують бажані кількості ацетальдегіду, важливого компонента аромату йогурту.

50

Лактоза і сахароза легше ферментуються *Streptococcus thermophilus*, ніж моносахариди, які складають їх. При використанні *Streptococcus thermophilus* в присутності надлишку галактози ферментуються тільки глюкозний фрагмент молекули лактози, а галактоза накопичується в кисломолочних продуктах. В йогурті, де висока концентрація кислоти обмежує бродіння, залишається вільна галактоза, хоча вільна галактоза, продукується на ранніх стадіях виробництва швейцарського сиру, згодом ферментується *Lactobacillus helveticus*.

55

Однак деякими дослідниками описані штами *Streptococcus thermophilus* і *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, які ферментують галактозу (Hutkins et al: (1986) J, Dairy Sci, 69(1); 1-8; Vaillancourt et al. (2002), J. Bacteriol. 184 (3); 785-793), а в WO 2011/026863 (Chr. Hansen) описаний спосіб одержання штамів *Streptococcus thermophilus*, здатних зброджувати галактозу.

Щоб задовольнити вимоги харчової промисловості, потрібні нові штами, зокрема, штами *Streptococcus thermophilus* і штами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, які забезпечують підвищену природну солодкість при відсутності зайвих калорій безпосередньо в ферментованих продуктах (внутрішня солодкість) шляхом екскреції глюкози.

5 Pool et al. (2006. *Metabolic Engineering* 8(5); 456-464) розкривають штам *Lactococcus lactis*, в якому метаболізм глюкози повністю зруйнований в результаті делеції генів, які кодують глюкокіназу, *EII(man/glc)* і нещодавно виявленого глюкоза-PTS *EII(cel)*. Спосіб конструювання являє собою генетичну рекомбінацію з метою генерування всіх мутацій і, отже, одержаний штам являє собою генетично модифікований організм (ГМО), який в цей час не може

10 використовуватися в харчових продуктах.

Thompson et al. (1985. *J Bacteriol.* 162 (1); 217-223) досліджують метаболізм лактози в *Streptococcus lactis* (в цей час перейменований в *Lactococcus lactis*). У цій роботі 2-дезоксиглюкозу використовують для одержання мутанта в системі маноза-PTS. Потім даний мутант піддають мутації з використанням УФ-мутагенезу з подальшим скринінгом на негативні

15 за глюкозою колонії методом реплік. За допомогою вказаного способу виділяють подвійний мутант (за маноза-PTS і глюкокіназою). Одержаний подвійний мутант використовують для вивчення механізмів, які беруть участь в регуляції ферментації лактози під дією "заквашувальних" організмів. Ці мутанти мають декілька недоліків порівняно з батьківським штамом, які роблять їх непридатними для включення в комерційну заквашувальну культуру.

20 Вихід клітин мутантів складає половину від виходу клітин батьківського штаму на моль ферментованої лактози, а час подвоєння у мутантів значно збільшується при вирощуванні на лактозі. Подібним чином, вихід молочної кислоти складає половину від виходу молочної кислоти у батьківського штаму на моль ферментованої лактози. Поведінку вказаних штамів в молоці не аналізують, але очікується, що швидкість підкислення може значно зменшуватися.

25 Крім того, *Lactococcus lactis* звичайно не вибирають для одержання ацетальдегіду і він не бере участь у задоволенні вимог до юридичного визначення йогурту.

Chervaux et al. (2000. *Appl. And Environ. Microbiol.*, 66, 5306-5311), досліджують фізіологію штамів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в новому хімічно визначеному середовищі і виділених 2-дезоксиглюкоза-стійких мутантів, дефіцитних по ферментації глюкози.

30 Спостерігають декілька різних фенотипів і описують штам-специфічні ефекти.

Жоден з вищезазначених підходів не вирішує проблему одержання штамів *Streptococcus thermophilus* і штамів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* з поліпшеною здатністю забезпечувати природну солодкість харчових продуктів, які одержують шляхом ферментації такими штамми окремо, або разом з іншими штамми молочнокислих бактерій.

35 Крім того, жоден з вищезгаданих підходів не вирішує проблему зниження вмісту лактози в харчових продуктах, які одержують шляхом ферментації такими штамми, до рівня, прийнятнього для осіб з непереносимістю лактози.

Суть винаходу

40 На відміну від описаного вище попереднього рівня техніки автори даного винаходу виявили, що штами *Streptococcus thermophilus*, які містять мутацію в гені глюкокінази (*glcK*), можна вибирати шляхом піддавання галактоза-ферментуючих штамів *Streptococcus thermophilus* впливу 2-дезоксиглюкози, і що вказані клітини розщеплюють лактозу і галактозу і виділяють глюкозу в довкілля при вирощуванні на молочному субстраті.

45 Несподівано було виявлено, що вказані штами *Streptococcus thermophilus* самі по собі ще повністю здатні підкислювати молоко, хоча час підкислення до pH 5 збільшується на 2-5 годин. Отже, їх можна використовувати як такі для зброджування молока.

Однак глюкоза використовується як джерело вуглецю багатьма молочнокислими бактеріями і глюкоза, що виділяється, може споживатися іншими мікроорганізмами, присутніми в кисломолочному продукті.

50 Для подолання даної проблеми даний винахід пропонує 2-дезоксиглюкоза-стійкі мутанти *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, які або втрачають здатність рости на глюкозі як джерелі вуглецю, або мають знижену здатність до росту в таких умовах. Мутантні штами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* не тільки не споживають глюкозу, яка секретується в молоко іншими мікроорганізмами, які можуть бути присутніми, а й виділяють велику кількість

55 глюкози в довкілля і, що дивно, все ще мають здатність підкислювати молоко, хоча час підкислення до pH 5 затримується на 2-5 годин. Отже, їх можна використовувати як такі для зброджування молока.

Такі бактерії харчових категорій можна використовувати для збагачення кисломолочних продуктів глюкозою. Глюкоза створює сильніше відчуття солодкості, ніж лактоза і галактоза, і як

така екскреція глюкози в молочний субстрат приводить до підвищення відчуття солодкості (внутрішньої) в кисломолочному продукті.

Автори даного винаходу виявили, що, якщо молочний субстрат зброджують штамом *Streptococcus thermophilus* і штамом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* відповідно до даного винаходу, рівень лактози в молоці значно зменшується.

Непереносимість лактози являє собою стан, що характеризується відсутністю здатності розщеплювати лактозу. Більшість суб'єктів з непереносимістю лактози може перенести деяку кількість лактози в раціоні, причому важкість симптомів (що включають в себе нудоту, спазми, здуття живота, діарею і метеоризм) збільшується із зростанням кількості споживаної лактози.

Таким чином, можливість одержання продуктів харчування, які або не містять лактозу, або містять знижену кількість лактози, має велике значення в даній галузі промисловості.

Загальні граничні значення досі не були встановлені ЕУ для вмісту лактози в продуктах харчування з низьким вмістом лактози і в продуктах харчування, що не містять лактози, однак Управління з контролю якості продуктів харчування Фінляндії Evira встановлює Північні граничні значення вмісту лактози, що становлять менше 10 мг/100 г або 100 мл для харчових продуктів, що не містять лактозу, і менше 1 г/100 г або 100 мл для харчових продуктів з низьким вмістом лактози.

Молочна промисловість сьогодні стикається з проблемою забезпечення альтернативи додаванню підсолоджувачів у кисломолочні продукти, щоб досягнути бажаного солодкого смаку без додаткових калорій. Крім того, бажано розробити спосіб зменшення вмісту лактози в кисломолочних продуктах до рівня, прийнятного для споживачів з непереносимістю лактози.

Вищезгадані проблеми вирішуються шляхом одержання мутантних штамів *Streptococcus thermophilus* і мутантних штамів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, які виділяють глюкозу в молоко, якщо 9,5 % В-молоко інокують  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл штаму *Streptococcus thermophilus* даного винаходу або  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу, і ферментують штамами *Streptococcus thermophilus* або штамом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу при 40 °C протягом щонайменше 20 годин. Переважно такі мутантні штами самі по собі виділяють щонайменше 5 мг/мл глюкози в В-молоко, якщо 9,5 % В-молоко інокують  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл штаму *Streptococcus thermophilus* даного винаходу або  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу, і ферментують штамами *Streptococcus thermophilus* або штамом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу при 40 °C протягом щонайменше 20 годин. Штами зберігають здатність підкислювати молоко, хоча час підкислення до pH 5 збільшується на 2-5 годин. Кінцевий кисломолочний продукт містить менше 15 мг/мл лактози в ферментованому молоці. Отже, в кінцевому кисломолочному продукті показник внутрішньої солодкості підвищується приблизно в 2 рази або більше.

Щоб одержати штами *Streptococcus thermophilus*, автори даного винаходу розробили спосіб виділення 2-дезоксиглюкоза-стійких мутантних штамів з вихідного галактоза-ферментуючого штаму *Streptococcus thermophilus*, переважно, з мутацією в опероні галактози, яка підвищує експресію оперона, який раніше експресувався на низькому рівні або не експресувався, де фенотип стійкості до 2-дезоксиглюкози зумовлений мутацією в гені глюкокінази (*glcK*), яка частково або повністю інактивує кодований білок. Спосіб включає в себе піддавання вихідного штаму впливу 2-дезоксиглюкози і вибір мутантних штамів, здатних рости в присутності 2-дезоксиглюкози на чашках з агаром, що містять середовище M17+2 % галактози, наприклад, як описано в прикладі 1 цього документа. Вказані мутанти піддають скринінгу і вибирають штами, в яких швидкість росту в середовищі M17+2 % галактози вища, ніж в середовищі M17+2 % глюкози.

Несподівано було виявлено, що мутантні штами *Streptococcus thermophilus* з мутацією в гені глюкокінази (*glcK*), але з очевидно нормальною функціонуючою системою транспортерів глюкози, секретують глюкозу. Вказані мутанти називають CHCC15757 і CHCC15887.

Крім того, автори даного винаходу виявили, що штами *Streptococcus thermophilus* з ще вищою здатністю до ферментації лактози і екскреції глюкози можна вибрати, піддаючи штами *Streptococcus thermophilus* з мутацією в гені глюкокінази впливу 2-дезоксиглюкози, з подальшим відбиранням штамів, які не здатні рости в 9,5 % В-молоці за винятком випадків, коли до В-молока додають сахарозу в концентрації, що становить лише 0,01 %.

Один з таких мутантів з підвищеною ферментацією лактози і секрецією глюкози позначають CHCC16404.

Виявлено, що CHCC16404 містить мутацію в гені транспортера глюкози (MARIM), що приводить до інактивації білка транспортера глюкози, відповідального за транспорт глюкози в клітину.

Щоб одержати штами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, автори даного винаходу розробили спосіб виділення 2-дезоксиглюкоза-стійких штамів, одержаних в результаті мутації вихідного штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, в яких здатність рости на глюкозі як на джерелі вуглецю або відсутня, або знижена. Спосіб включає в себе піддавання вихідного

штаму впливу 2-дезоксиглюкози і вибір мутантних штамів, здатних рости в присутності 2-дезоксиглюкози на чашках з агаром, що містять середовище MRS-IM з додаванням 2 % лактози, наприклад, як описано в даному документі в прикладі 5. Указані мутанти піддають скринінгу і вибирають штами, в яких здатність до росту на MRS-IM, що містить 2 % глюкози, або повністю втрачена, або знижена порівняно з вихідним штамом, який може рости в присутності глюкози.

Відповідно до вказаного несподіваного відкриття, даний винахід стосується нових штамів молочнокислих бактерій, зокрема, штамів *Streptococcus thermophilus*, які несуть мутацію в гені *glcK*, або мутантів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, які виділяють глюкозу в ферментований продукт, забезпечуючи природну солодкість без додаткових калорій, способу одержання таких штамів, кисломолочних продуктів, одержаних з використанням таких штамів, і застосування таких штамів для одержання кисломолочних продуктів з підвищеною солодкістю і зниженим рівнем лактози.

Крім того, несподівано було виявлено, що штами *Streptococcus thermophilus* і *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу посилюють ріст штаму BB-12® *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, пробіотичної бактерії, яка сама по собі погано росте в молоці.

Короткий опис креслень

На фіг. 1 наведене схематичне зображення катаболізму лактози в *Streptococcus thermophilus*. *GlcK*, глюкокіназа; *LacS*, транспортер лактози; *LacZ*, β-галактозидаза; *GalM*, мутаротаза; *GalK*, галактокіназа; *GalT*, галактозо-1-фосфат уридилтрансфераза; *GalE*, UDP-глюкозо-4 епімераза; *Gal1P*, галактозо-1-фосфат.

На фіг. 2 зображена ДНК-послідовність (SEQ ID NO. 1) гена глюкокінази (*glcK*) *Streptococcus thermophilus*, а також кодована нею амінокислотна послідовність (SEQ ID NO. 2). Відповідно, вказані заміни окремих нуклеотидів в CHCC15757 і CHCC15887.

На фіг. 3 зображений оперон *man*, який кодує фосфотрансферазну систему (PTS) глюкози/манози в *Streptococcus thermophilus*. Виявлено, що мутантний штам CHCC16404, який характеризується підвищеною ферментацією лактози і секрецією глюкози порівняно з вихідним штамом CHCC15757, містить мутацію в гені *manM*, що кодує білок IIC<sup>Man</sup> PTS глюкози/манози. В результаті заміни G на T кодон GAA, що кодує глутамінову кислоту в положенні 209, замінюється на стоп-кодон TAA (\*), що зупиняє трансляцію в CHCC16404 і інактивує функцію білка.

На фіг. 4 зображена ДНК-послідовність (SEQ ID NO. 5) гена *manM* зі штаму *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, а також кодована нею амінокислотна послідовність (SEQ ID NO. 6). Вказана єдина нуклеотидна заміна в CHCC16404.

Докладний опис винаходу

У даному описі термін "молочнокисла бактерія" означає грампозитивну мікроаерофільну або анаеробну бактерію, яка ферментує цукри з утворенням кислот, що включають в себе молочну кислоту як переважно продуковану кислоту, оцтову кислоту і пропіонову кислоту. У промисловості найбільш широко використовуються молочнокислі бактерії, які належать до ряду "Lactobacillales", який включає в себе *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. і *Propionibacterium* spp. Молочнокислі бактерії, зокрема бактерії видів *Lactobacillus* sp. і *Streptococcus thermophilus*, звичайно постачаються в молочну промисловість у вигляді заморожених або ліофілізованих культур для розмноження виробничої закваски, або як так званих культур "прямого внесення" (DVS), призначених для прямого внесення в ферментаційну посудину або чан для одержання молочного продукту, такого як кисломолочний продукт. Такі культури загалом називають "заквашувальні культури" або "закваски".

Якщо не вказано інше, або якщо це явно не суперечить контексту, терміни, що використовуються в контексті опису даного винаходу (особливо в контексті нижченаведеної формули винаходу) в однині, потрібно тлумачити як такі, що охоплюють і однину, і множину. Якщо не вказано інше, терміни "що містить", "що має", "що включає в себе" і "що складається з" потрібно тлумачити як необмежувальні терміни (тобто як такі, що мають значення "що включає в себе, без обмеження"). Якщо не вказано інше, діапазони значень в даному описі наводяться тільки для короткої згадки всіх окремих значень, що знаходяться в межах діапазону, причому кожне окреме значення включене в опис, як яби воно було окремо вказане в цьому документі. Якщо не вказано інше, або якщо це явно не суперечить контексту, всі описані тут способи можна здійснювати в будь-якому придатному порядку. Використання кожного і всіх прикладів

або ілюстративних виразів (наприклад, "такий як") в даному винаході призначене тільки для кращого висвітлення винаходу і не накладає обмежень на об'єм винаходу, якщо не заявлене інше. Жоден вираз в описі не повинен бути витлумачений як вказівка на який-небудь незаявлений елемент як необхідний для практичного здійснення винаходу.

У деяких країнах, юридичне визначення йогурту вимагає присутності як *Streptococcus thermophilus*, так і *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Обидва види генерують бажані кількості ацетальдегіду, важливого ароматизуючого компонента йогурту.

Шляхом ферментації з використанням як *Streptococcus thermophilus*, так і *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Hoier et al. (2010) in *The Technology of Cheesemaking*, 2<sup>nd</sup> Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192), також можна одержати сир, такий як моцарела і сир для піци, а також фета.

Для задоволення вимог харчової промисловості бажано розробити нові штами, зокрема штами *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* і штами *Streptococcus thermophilus*, які продукують більше природної солодкості безпосередньо в ферментованих продуктах (внутрішня солодкість) за відсутності доданих калорій.

*Streptococcus thermophilus* являє собою одну з молочнокислих бактерій, що найбільш широко використовуються для комерційної ферментації молока, причому даний організм звичайно використовують як частину змішаної закваски, де іншим компонентом є *Lactobacillus sp.*, наприклад, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* у випадку одержання йогурту і *Lactobacillus helveticus* у випадку одержання сиру швейцарського типу.

Лактоза і сахароза легше ферментуються *Streptococcus thermophilus*, ніж моносахариди, які складають їх. При використанні *Streptococcus thermophilus* тільки частина глюкози з молекули лактози зброджується під дією цих бактерій, а галактоза накопичується в кисломолочних продуктах. У йогурті, де висока концентрація кислоти обмежує ферментацію, вільна галактоза залишається, тоді як вільна галактоза, продукується на ранніх стадіях виробництва швейцарського сиру, згодом ферментованих *Lactobacillus helveticus*. *Lactococcus lactis*, присутня в багатьох заквашувальних культурах, що використовуються для виробництва сиру, також здатна споживати галактозу, продуковану *Streptococcus thermophilus*.

Щоб досягнути найбільш оптимальних показників росту штамів *Streptococcus thermophilus*, автори даного винаходу піддають галактозо-ферментуючі штами *Streptococcus thermophilus* впливу засобу селекції 2-дезоксиглюкози. Як правило, 2-дезоксиглюкоза-стійкі мутанти містять мутації в гені, що кодує глюकोкіназу, і в генах, що кодують транспорт глюкози. Виділені мутанти, СНСС15757, СНСС15887 і СНСС16404, стійкі до 2-дезоксиглюкози, містять мутації в гені глюкокінази (glcK). Автори даного винаходу виявили, що крім мутації в гені глюкокінази, СНСС16404 містить мутацію стоп-кодону в гені транспортера глюкози/манози, яка могла б пояснити, чому експортована глюкоза не транспортується назад в клітини.

Несподівано було виявлено, що такі мутанти самі по собі повністю зберігають здатність підкислювати молоко, хоча час підкислення до рН 5 збільшується на 2-5 годин. Отже, їх можна використовувати для зброджування молока і вони зберігають здатність вихідних штамів до згортання молока, характерного для йогурту. Крім того, виявлено, що мутанти виділяють більше 5 мг/мл глюкози після інокуляції в 9,5 % В-молоко  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл штамів *Streptococcus thermophilus* СНСС15757 або СНСС15887 і ферментації при 40 °С протягом щонайменше 20 годин без необхідності виділення мутантів по транспорту глюкози, або після інокуляції в 9,5 % В-молоко, що містить 0,05 % сахарози,  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл штаму *Streptococcus thermophilus* штаму СНСС16404 і ферментації при 40 °С протягом щонайменше 20 годин. При цьому в ферментованому молоці залишається лише близько 10 мг/мл лактози і менше 1,5 мг/мл лактози (межа виявлення), відповідно. Таким чином, застосування таких штамів для виробництва кисломолочних продуктів може мати велике значення для людей з непереносимістю лактози.

Отже, кінцевий кисломолочний має вищий показник внутрішньої солодкості, що становить щонайменше 2,0, згідно зі способом розрахунку Godshall (1988. *Food Technology* 42(11): 71-78).

Таким чином, перший аспект даного винаходу стосується галактозо-ферментуючого мутантного штаму *Streptococcus thermophilus*, який несе мутацію в послідовності ДНК гена glcK, що кодує білок глюкокінази, де мутація інактивує кодований білок глюкокінази або здійснює негативний вплив на експресію гена. Способи вимірювання рівня активності глюкокінази або рівня експресії гена глюкокінази добре відомі (Porter et al. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 709; 178-186) і включають в себе ферментні аналізи, які можна провести з використанням комерційно доступних наборів, а також транскриптоміку або кількісну ПЛР із використанням легко доступних матеріалів.

Використовуваний тут термін бактеріальний "штам" стосується бактерії, яка залишається генетично незмінною при вирощуванні або розмноженні. Сукупність ідентичних бактерій входить в об'єм даного терміну.

Використовуваний тут термін "галактоза-ферментуючі штами *Streptococcus thermophilus*" стосується штамів *Streptococcus thermophilus*, які здатні рости на/в середовищі M17+2 % галактози. Галактоза-ферментуючі штами *Streptococcus thermophilus* визначають тут як штами *Streptococcus thermophilus*, які знижують рН бульйону M17, що містить 2 % галактози як єдиний вуглевод, до 5,5 або нижче, після інокуляції нічної культури в кількості 1 % й інкубації протягом 24 годин при 37 °С.

Галактоза-ферментуючі штами можна одержати за способом, описаним в WO 2011/026863.

Термін "мутація, яка інактивує білок глюकोкінази" в даному винаході стосується мутації, яка приводить до "інактивації білка глюкокінази", тобто до утворення білка глюкокінази, який, у випадку його присутності в клітині, не здатний нормально функціонувати, а також мутацій, які перешкоджають утворенню білка глюкокінази, або приводять до деградації білка глюкокінази.

Зокрема, інактивований білок глюкокінази являє собою білок, який, на відміну від функціонального білка глюкокінази, не здатний забезпечувати фосфорилювання глюкози з утворенням глюкозо-6-фосфату, або забезпечує фосфорилювання глюкози з утворенням глюкозо-6-фосфату з набагато нижчою швидкістю. Ген, який кодує такий інактивований білок глюкокінази, на відміну від гена, що кодує функціональний білок глюкокінази, містить мутацію у відкритій рамці зчитування (ORF), причому вказана мутація може включати в себе, без обмеження, делецію, мутацію, що обумовлює зсув рамки зчитування, введення стоп-кодону або мутацію, що обумовлює амінокислотну заміну, яка приводить до зміни функціональних властивостей білка, або мутацію промотору, яка зменшує або припиняє транскрипцію або трансляцію гена.

У переважних варіантах здійснення мутація знижує активність (швидкість фосфорилювання глюкози з утворенням глюкозо-6-фосфату) білка глюкокінази щонайменше на 50 %, наприклад, щонайменше на 60 %, наприклад, щонайменше на 70 %, наприклад, щонайменше на 80 %, наприклад, щонайменше на 90 %.

Активність глюкокінази можна визначити за допомогою ферментативних аналізів глюкокінази, як описано в Pool et al. (2006, *Metabolic Engineering* 8: 456-464).

Використовуваний тут термін "функціональний білок глюкокінази" стосується білка глюкокінази, який, у випадку його присутності в клітині, сприяє фосфорилюванню глюкози з утворенням глюкозо-6-фосфату. Зокрема, функціональний білок може являти собою глюкокіназу, яка кодується геном, який містить ORF, яка має послідовність, відповідну положенням 1-966 SEQ ID NO. 1, або послідовність, яка щонайменше на 85 % ідентична, наприклад, щонайменше на 90 % ідентична, наприклад, щонайменше на 95 % ідентична, наприклад, щонайменше на 98 % ідентична, наприклад, щонайменше на 99 % ідентична послідовності, відповідній положенням 1-966 SEQ ID NO. 1.

Процент ідентичності двох послідовностей можна визначити за допомогою математичних алгоритмів, таких, як алгоритм Karlin and Altschul (1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264), модифікований алгоритм описаний в Karlin and Altschul (1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877); алгоритм Myers and Miller (1988. *CABIOS* 4; 11-17); алгоритм Needleman and Wunsch (1970. *J. Mol. Biol.* 48; 443-453); і алгоритм Pearson and Lipman (1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85; 2444-2448). Також існують комп'ютерні програми для визначення ідентичності нуклеотидних або амінокислотних послідовностей, оснований на вказаних математичних алгоритмах. Наприклад, порівняння нуклеотидних послідовностей можна здійснити за допомогою програми BLASTN, оцінка=100, довжина слова=12. Порівняння амінокислотних послідовностей можна виконати за допомогою програми BLASTX, оцінка=50, довжина слова=3. Як інші параметри програми BLAST можна використовувати параметри за замовчуванням.

У багатьох країнах не дозволяється використовувати генетично модифіковані організми (ГМО) для одержання кисломолочних продуктів. Замість цього даний винахід пропонує спосіб одержання мутантних штамів, які зустрічаються в природі або індуковані, які можуть забезпечити бажане накопичення глюкози в кисломолочному продукті.

Таким чином, в набагато більш переважному варіанті здійснення даного винаходу мутантний штам являє собою мутант, який зустрічається в природі або індукований мутант.

Використовуваний тут термін "мутантна бактерія" або "мутантний штам" стосується природної (спонтанної, що зустрічається в природі) мутантної бактерії або індукованої мутантної бактерії, геном (ДНК) якої містить одну або декілька мутацій, відсутніх в ДНК дикого типу. "Індукований мутант" являє собою бактерію, яка містить мутацію, індуковану людиною, наприклад, шляхом обробки хімічними мутагенами, УФ- або гамма-опроміненням і т. д. Навпаки,



"спонтанний мутант" або "природний мутант" не є наслідком мутагенезу, що проводиться людиною. Мутантні бактерії, описані в даному документі, не є ГМО (генетично модифікованим організмом), тобто, для їх одержання не використовують технології рекомбінантних ДНК.

"Штам дикого типу" являє собою не мутантну форму бактерії, що зустрічається в природі.

Такі терміни, як "штами з підсолоджувальною здатністю", "штами, здатні забезпечити бажане накопичення глюкози в кисломолочному продукті", і "штами з підвищеною здатністю до природного підсолоджування харчових продуктів" використовуються тут як взаємозамінні для опису переваги застосування штамів даного винаходу для ферментації молочних продуктів.

У переважному варіанті здійснення мутантний штам *Streptococcus thermophilus* даного винаходу підвищує кількість глюкози в 9,5 % В-молоці щонайменше до 5 мг/мл при інокуляції в 9,5 % В-молоко в концентрації  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл і вирощуванні при 40 °С протягом щонайменше 20 годин.

В іншому переважному варіанті здійснення винаходу мутантний штам *Streptococcus thermophilus* даного винаходу збільшує кількість глюкози в 9,5 % В-молоці, що містить 0,05 % сахарози, щонайменше до 5 мг/мл після інокуляції в 9,5 % В-молоко, що містить 0,05 % сахарози, в концентрації  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл і вирощування при 40 °С протягом щонайменше 20 годин.

У контексті даного винаходу, 9,5 % В-молоко являє собою кип'ячене молоко, одержане шляхом перерозчинення знятого сухого молока низької жирності з одержанням концентрації сухої речовини 9,5 %, пастеризації при 99 °С протягом 30 хв... і подальшого охолодження до 40 °С.

У більш переважних варіантах здійснення даного винаходу мутантний штам приводить до збільшення кількості глюкози щонайменше до 6 мг/мл, наприклад, щонайменше до 7 мг/мл, наприклад, щонайменше до 8 мг/мл, наприклад, щонайменше до 9 мг/мл, наприклад, щонайменше до 10 мг/мл, наприклад, щонайменше до 11 мг/мл, наприклад, щонайменше до 12 мг/мл, наприклад, щонайменше до 13 мг/мл, наприклад, щонайменше до 14 мг/мл, наприклад, щонайменше до 15 мг/мл, наприклад, щонайменше до 20 мг/мл, наприклад, щонайменше до 25 мг/мл.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу мутантний штам *Streptococcus thermophilus* має стійкість до 2-дезоксиглюкози.

Термін "стійкий до 2-дезоксиглюкози" в даному документі стосується конкретного мутантного бактеріального штаму, що має здатність рости з утворенням колонії при висіванні штрихом на чашки з середовищем M17, що містить 20 мМ 2-дезоксиглюкозу після інкубації при 40 °С протягом 20 годин. Наявність 2-дезоксиглюкози в культуральному середовищі перешкоджає росту немутантних штамів, але не впливає або практично не впливає на ріст мутантних штамів. Немутантні штами, які можна використовувати як чутливі контрольні штами для визначення стійкості, переважно включають в себе штами CHCC14994 і CHCC11976.

Приклади 1 і 2 даного опису ілюструють виділення мутантних штамів *Streptococcus thermophilus*, стійких до 2-дезоксиглюкози.

У наступному варіанті здійснення мутантний штам даного винаходу можна охарактеризувати за характером росту. Характер росту відрізняється тим, що швидкість росту мутантного штаму в середовищі M17+2 % галактози вища, ніж в середовищі M17+2 % глюкози. Швидкість росту визначають як розвиток оптичної густини культури в експонентній фазі росту при 600 нм ( $OD_{600}$ ) з плином часу, як описано в прикладі 2 даного документа.

У переважному варіанті здійснення швидкість росту щонайменше на 5 % вища, наприклад, щонайменше на 10 % вища, наприклад, щонайменше на 15 % вища, наприклад, щонайменше на 20 % вища в середовищі M17+2 % галактози, ніж в середовищі M17+2 % глюкози.

У переважному варіанті здійснення мутація включає в себе заміну кодону, який кодує серин, на кодон, що кодує пролін, в положенні 72 SEQ ID NO. 2. Переважно мутація в гені *glcK* включає в себе заміну Т на С в положенні 214 SEQ ID NO. 1.

В іншому переважному варіанті здійснення мутація включає в себе заміну кодону, який кодує треонін, на кодон, що кодує ізолейцин, в положенні 141 SEQ ID NO. 2.

Переважно мутація в гені *glcK* включає в себе заміну С на Т в положенні 422 SEQ ID NO. 1.

Потрібно зазначити, що ген *glcK* *Streptococcus thermophilus* можна інактивувати за допомогою мутацій інших типів в інших ділянках гена *glcK*.

У переважному варіанті здійснення штам *Streptococcus thermophilus* несе мутацію, яка зменшує транспорт глюкози в клітину.

Використовуваний тут термін "мутація, яка зменшує транспорт глюкози в клітину", стосується мутації в гені, що кодує білок, який бере участь в транспорті глюкози, яка приводить до накопичення глюкози в середовищі, яке оточує клітину. Рівень глюкози в культуральному

середовищі штаму *Streptococcus thermophilus* можна легко виміряти за допомогою способів, відомих фахівцям в даній галузі, а також за способом, описаному в прикладі 4 даного документа, якщо культуральне середовище являє собою молочний субстрат.

У переважних варіантах здійснення мутація знижує транспорт глюкози в клітину щонайменше на 50 %, наприклад, щонайменше на 60 %, наприклад, щонайменше на 70 %, наприклад, щонайменше на 80 %, наприклад, щонайменше на 90 %.

Транспорт глюкози в клітину можна визначити за допомогою аналізу поглинання глюкози, описаного Cochu et al. (2003. Appl Environ Microbiol 69(9); 5423-5432).

Переважно штам *Streptococcus thermophilus* несе мутацію в гені, що кодує компонент транспортера глюкози, де мутація інактивує білок транспортера глюкози або здійснює негативний ефект на експресію гена.

Компонент може являти собою будь-який компонент білка транспортера глюкози, який грає важливу роль в транспорті глюкози. Наприклад, передбачається, що інактивація будь-якого компонента PTS глюкози/манози в *Streptococcus thermophilus*, зображеного на фіг. 3, може привести до інактивації функції транспортера глюкози.

Використовуваний тут термін "мутація, яка інактивує транспортер глюкози", стосується мутації, що приводить до "інактивації транспортера глюкози", білка транспортера глюкози, який у випадку присутності в клітині не здатний виконувати нормальну функцію, а також до мутацій, які перешкоджають утворенню білка транспортера глюкози або приводять до деградації білка транспортера глюкози.

Зокрема, інактивований білок транспортера глюкози являє собою білок, який порівняно з функціональним білком транспортера глюкози не може забезпечити транспорт глюкози через плазматичну мембрану або забезпечує транспорт глюкози через плазматичну мембрану з набагато нижчою швидкістю. Ген, що кодує такий інактивований білок транспортера глюкози, порівняно з геном, що кодує функціональний білок транспортера глюкози, містить мутацію у відкритій рамці зчитування (ORF), де вказана мутація може включати в себе, без обмеження, делецію, зсув рамки зчитування, введення стоп-кодону або мутацію, що приводить до амінокислотної заміни, яка змінює функціональні властивості білка, або мутацію промотора, яка зменшує або припиняє транскрипцію або трансляцію гена.

У переважних варіантах здійснення мутація знижує активність (швидкість транспорту глюкози) білка транспортера глюкози щонайменше на 50 %, наприклад, щонайменше на 60 %, наприклад, щонайменше на 70 %, наприклад, щонайменше на 80 %, наприклад, щонайменше на 90 %.

Активність транспортера глюкози можна визначити за допомогою аналізу поглинання глюкози, описаного Cochu et al. (2003. Appl Environ Microbiol 69 (9); 5423-5432).

Використовуваний тут термін "функціональний білок транспортера глюкози" стосується білка транспортера глюкози, який, у випадку присутності в клітині, забезпечує транспорт глюкози через плазматичну мембрану.

Більш переважний штам *Streptococcus thermophilus* несе мутацію в послідовності ДНК гена *manM*, що кодує білок IIC<sup>Man</sup> системи фосфотрансферази глюкози/манози, де мутація інактивує білок IIC<sup>Man</sup> або здійснює негативний вплив на експресію гена.

У ще більш переважному варіанті здійснення мутація включає в себе заміну кодону, який кодує глутамінову кислоту, на стоп-кодон в положенні 209 SEQ ID NO. 6 білка IIC<sup>Man</sup> фосфотрансферазної системи глюкози/манози. Переважно мутація включає в себе заміну G на T в положенні 625 SEQ ID NO. 5.

Другий аспект даного винаходу стосується штаму *Streptococcus thermophilus*, вибраного з групи, що включає в себе штам *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 25850, штам *Streptococcus thermophilus* CHCC15887, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 25851, штам *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 26722, а також одержані з них штами.

У контексті даного винаходу термін "одержані з них штами" потрібно розуміти як штами, одержані, або штами, які можуть бути одержані зі штаму даного винаходу (або вихідного штаму), наприклад, за допомогою методів генної інженерії, в результаті опромінення і/або хімічної обробки. "Одержані з них штами" також можуть являти собою спонтанно утворювані мутанти.

Переважно "одержані з них штами" являють собою функціонально еквівалентні мутанти, наприклад, мутанти, які мають такі ж або поліпшені властивості (наприклад, пов'язані з виведенням глюкози) порівняно з вихідним штамом. Такі "одержані з них штами" є частиною

даного винаходу. Зокрема, термін "одержані з них штами" стосується штамів, одержаних шляхом піддавання штаму даного винаходу будь-якій традиційно використовуваний мутагенній обробці, яка включає в себе обробку хімічним мутагеном, таким, як етанметансульфонат (EMS) або N-метил-N'-нітро-N-нітрогуанідин (НТГ), ультрафіолетовим світлом, або мутантів, які спонтанно утворюються. Мутант може бути одержаний в результаті декількох мутагенних обробок (одну обробку потрібно розуміти як одну стадію мутагенезу з подальшою стадією скринінгу/відбору), однак в цей час надають перевагу, щоб кількість обробок (або стадій скринінгу/відбору) не перевищувала 20, не перевищувала 10 або не перевищувала 5. В теперішній час переважно, щоб мутант містив менше 1 %, менше 0,1 %, менше 0,01 %, менше 0,001 % або навіть менше 0,0001 % замін або делецій нуклеотидів у бактеріальному геномі, порівняно з вихідним штамом.

Відповідно, в переважному варіанті здійснення штам *Streptococcus thermophilus* вибирають з групи, що включає в себе штам *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 25850, штам *Streptococcus thermophilus* CHCC15887, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 25851, штам *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 26722, а також одержані з них мутантні штами, де мутантні штами одержують з використанням одного з депонованих штамів як вихідного матеріалу, і де мутант має таку ж або додатково поліпшену здатність ферментувати лактозу і/або секретувати глюкозу порівняно з вказаним депонованим штамом.

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* являє собою молочнокислу бактерію, яку часто використовують для комерційної ферментації молока, де вказаний організм звичайно використовують як частину змішаної заквашувальної культури.

Лактоза ферментується *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* легше, ніж моносахариди глюкоза, фруктоза і маноза, причому штами цього виду звичайно не ростуть на галактозі (Buchanan R.E., Gibbons N.E., eds (1974): *Bergey's manual of determinative bacteriology* (The Williams & Wilkins Co. Baltimore, Md), 8th ed, ). У процесі ферментації лактози під дією *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, тільки глюкозний фрагмент молекули лактози ферментується і, отже, галактоза накопичується в кисломолочних продуктах.

Щоб одержати *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, не здатний рости на глюкозі як джерелі вуглецю, автори даного винаходу піддають штами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* впливу 2-дезоксиглюкози. Виділені мутанти стійкі до 2-дезоксиглюкози і здатні рости в молочному субстраті без застосування глюкози як джерела вуглецю. Виявлено, що мутанти підвищують вміст глюкози в молоці. Відповідно, кисломолочні продукти, одержані з використанням вказаних штамів, характеризуються вищим вмістом глюкози, і, отже, мають солодший смак.

Несподівано було виявлено, що штами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу, які використовуються окремо, повністю зберігають здатність підкислювати молоко, хоча час підкислення до pH 5 збільшується на 2-5 годин. Крім того, як показано в прикладах, виявлено, що вказані штами виділяють приблизно 5 мг/мл або більше глюкози, і при цьому в ферментованому молоці залишається менш ніж приблизно 10 мг/мл лактози, якщо 9,5 % В-молоко інокують  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу і ферментують штамом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу при 40 °C протягом щонайменше 20 годин. Отже, застосування таких штамів для одержання кисломолочних продуктів може мати значення для людей з непереносимістю лактози.

Таким чином, кінцевий кисломолочний продукт має вищий показник внутрішньої солодкості, який згідно зі способом обчислення Godshall (1988. *Food Technology* 42(11):71-78), становить приблизно 2 або вище, наприклад, 2,5 або вище, або, наприклад, 3 або вище.

Третій аспект даного винаходу стосується штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, який відрізняється тим, що штам стійкий до 2-дезоксиглюкози.

Термін "стійкий до 2-дезоксиглюкози", який використовується в застосуванні до штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, означає, що конкретний бактеріальний штам має здатність рости з утворенням колонії після інкубації при 40 °C протягом 20 годин при висіванні штрихом на чашку з середовищем MRS-IM, що містить 2 % лактози і 20 мм 2-дезоксиглюкози. Наявність 2-дезоксиглюкози в культуральному середовищі перешкоджає росту штамів, які не мають стійкості, і не впливає, або практично не впливає на ріст стійких штамів. Штами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, які не мають стійкості, які можна використовувати як чутливі контрольні штами для аналізу стійкості, включають в себе штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних

культур (DSMZ) під номером доступу DSM 26419 і CHCC10019, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) під номером доступу DSM 19252.

У випадку, якщо в чашках з агаровим середовищем MRS-IM, що містить 2 % лактози, і, крім того, 20 мМ 2-дезоксиглюкози, спостерігається надмірний ріст колоній, доцільно збільшити концентрацію 2-дезоксиглюкози в чашках, наприклад, до 30 мМ або навіть до 40 мМ або вище. Якщо колонії не утворюються, доцільно зменшити концентрацію 2-дезоксиглюкози в чашках, наприклад, до 15 мМ, або до 10 мМ, або навіть нижче. При необхідності швидкість мутацій можна збільшити шляхом застосування придатних схем фізичного або хімічного мутагенезу.

Переважаючий штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу збільшує кількість глюкози в 9,5 % В-молоці щонайменше до 5 мг/мл після інокуляції в 9,5 % В-молоко в концентрації  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл і вирощування при 40 °С протягом щонайменше 20 годин, наприклад, протягом періоду від 20 до 30 годин, наприклад, протягом 20 годин.

У більш переважних варіантах здійснення даного винаходу мутантний штам приводить до збільшення кількості глюкози щонайменше до 6 мг/мл, наприклад, щонайменше до 7 мг/мл, наприклад, щонайменше до 8 мг/мл, наприклад, щонайменше до 9 мг/мл, наприклад, щонайменше до 10 мг/мл, наприклад, щонайменше до 11 мг/мл, наприклад, щонайменше до 12 мг/мл, наприклад, щонайменше до 13 мг/мл, наприклад, щонайменше до 14 мг/мл, наприклад, щонайменше до 15 мг/мл.

Четвертий аспект даного винаходу стосується штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, вибраного з групи, що включає в себе штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM26420, штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) під номером доступу DSM26421, і одержані з них штами.

Термін "одержані з них штами" має вказане вище визначення.

Відповідно, в переважному варіанті здійснення штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* вибраний з групи, що включає в себе штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) під номером доступу DSM26420, штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) під номером доступу DSM26421, і одержані з них мутантні штами, де мутантні штами одержують з використанням одного з депонованих штамів як вихідного матеріалу, причому мутанти мають таку ж, як і у депонованого штаму, або додатково поліпшену порівняно з депонованим штамом здатність ферментувати лактозу і/або секретувати глюкозу.

П'ятий аспект даного винаходу стосується композиції, що містить від  $10^4$  до  $10^{12}$  КУО (колонієутворювальних одиниць)/г штаму *Streptococcus thermophilus* відповідно до першого або другого аспекту даного винаходу, наприклад, від  $10^5$  до  $10^{11}$  КУО/г, наприклад, від  $10^6$  до  $10^{10}$  КУО/г, або, наприклад, від  $10^7$  до  $10^9$  КУО/г штаму *Streptococcus thermophilus*.

У переважному варіанті здійснення штаму *Streptococcus thermophilus* не здатний підкислювати 9,5 % В-молоко, тобто зменшувати рН менше ніж на 1,0, після інокуляції 9,5 % В-молока  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл штаму *Streptococcus thermophilus* і інкубації протягом 14 годин при 40 °С, а композиція додатково містить кількість сполуки, яка може ініціювати підкислення 9,5 % В-молока під дією штаму *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, депонованого в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 26722, тобто зменшення рН на 1,0 або більше після інокуляції 9,5 % В-молока  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл штаму *Streptococcus thermophilus* й інкубації протягом 14 годин при 40 °С.

Переважаюча сполука являє собою сахарозу.

Переважаюча кількість сахарози становить від 0,000001 до 2 %, наприклад, від 0,00001 до 0,2 %, наприклад, від 0,0001 % до 0,1 %, наприклад, від 0,001 до 0,05 %.

В особливо переважному варіанті здійснення композиція додатково містить від  $10^4$  до  $10^{12}$  КУО/г штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу, наприклад, від  $10^5$  до  $10^{11}$  КУО/г, наприклад, від  $10^6$  до  $10^{10}$  КУО/г, або, наприклад, від  $10^7$  до  $10^9$  КУО/г штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Переважаюча композиція даного винаходу містить, наприклад, штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 і/або штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 в поєднанні зі штамом *Streptococcus thermophilus* CHCC15757. Більш переважна композиція містить штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 і/або штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 в поєднанні зі штамом *Streptococcus thermophilus* CHCC15887. Ще більш переважна композиція містить штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

bulgaricus CHCC16159 і/або штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 в поєднанні зі штамом *Streptococcus thermophilus* CHCC16404.

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* й інші молочнокислі бактерії звичайно використовують як заквашувальні культури в технологічних процесах для одержання різних харчових продуктів, наприклад, в молочній промисловості для одержання кисломолочних продуктів. Отже, в іншому переважному варіанті здійснення композицію можна використовувати як заквашувальну культуру.

Заквашувальні культури можна одержати у вигляді заморожених або сухих заквасок, крім рідких заквашувальних культур. Таким чином, в наступному переважному варіанті здійснення композиція знаходиться у вигляді замороженої, ліофілізованої або рідкої форми.

Як описано в WO 2005/003327, до заквашувальної культури корисно додати визначені кріопротектори. Таким чином, композиція закваски відповідно до даного винаходу може містити один або декілька кріопротекторних засобів, вибраних з групи, що включає в себе інозин-5'-монофосфат (ІМФ), аденозин-5'-монофосфат (АМФ), гуанозин-5'-монофосфат (ГМФ), уранозин-5'-монофосфат (УМФ), цитидин-5'-монофосфат (ЦМФ), аденін, гуанін, урацил, цитозин, аденозин, гуанозин, уридин, цитидин, гіпоксантин, ксантин, гіпоксантин, оротидин, тимідин, інозин, а також похідні вказаних сполук.

Шостий аспект даного винаходу стосується способу одержання кисломолочного продукту, що включає в себе інокуляцію і ферментацію молочного субстрату щонайменше одним штамом *Streptococcus thermophilus* відповідно до першого або другого аспекту даного винаходу.

Під терміном "молоко" мається на увазі продукт секреції молока, одержаний шляхом доїння будь-якого ссавця, такого, як корова, вівця, коза, буйвол або верблюд. У переважному варіанті здійснення молоко являє собою коров'яче молоко.

Термін "молочний субстрат" може стосуватися будь-якого необробленого і/або обробленого молочного матеріалу, який можна піддати ферментації за способом даного винаходу. Так, придатні для застосування молочні субстрати включають в себе, без обмеження, розчини/суспензії будь-яких молочних або молоко-подібних продуктів, що містять білок, такі, як цільне або знежирене молоко, зняте молоко, пахта, відновлене сухе молоко, згущене молоко, сухе молоко, сироватка, сироватковий пермеат, лактоза, маточна рідина, одержана при кристалізації лактози, концентрат білка молочної сироватки або вершки. Очевидно, що молочний субстрат може бути одержаний від будь-якого ссавця, наприклад, він може являти собою практично чисте молоко ссавця або перерозчинений молочний порошок.

Переважно щонайменше частина білків молочного субстрату являють собою білки молока, які зустрічаються в природі, такі, як казеїн або білок молочної сироватки. Однак частину білків можуть становити білки молока, що не зустрічаються в природі.

Перед ферментацією молочний субстрат можна гомогенізувати і пастеризувати за допомогою відомих в даній галузі способів.

У даному описі термін "гомогенізація" означає інтенсивне перемішування з одержанням розчинної суспензії або емульсії. Якщо гомогенізацію проводять перед ферментацією, її можна провести так, щоб розбити молочний жир з одержанням частинок дрібніших розмірів, які більше не будуть відділятися від молока. Цього можна досягнути, продавлюючи молоко при високому тиску через маленькі отвори.

У даному описі термін "пастеризація" означає обробку молочного субстрату з метою зменшення або усунення присутності в ньому живих організмів, таких, як мікроорганізми. Переважно пастеризацію проводять шляхом підтримки заданої температури протягом заданого періоду часу. Заданої температури, як правило, досягають шляхом нагрівання. Температуру і тривалість нагрівання вибирають так, щоб вбити або інактивувати деякі бактерії, такі як шкідливі бактерії. Потім можна використовувати стадію швидкого охолодження.

Термін "ферментація" в застосуванні до способів даного винаходу означає перетворення вуглеводів у спирти або кислоти під дією мікроорганізму. Переважно в способах даного винаходу ферментація включає в себе перетворення лактози в молочну кислоту.

Способи ферментації, які використовуються у виробництві кисломолочних продуктів, добре відомі, і фахівці в даній галузі можуть вибрати придатні технологічні умови, такі, як температура, кисень, кількість і характеристики мікроорганізму (мікроорганізмів) і час процесу. Очевидно, що умови ферментації вибирають таким чином, щоб досягнути здійснення даного винаходу, тобто, щоб одержати молочний продукт в твердій або рідкій формі (кисломолочний продукт).

Використовуваний тут термін "кисломолочний продукт" стосується харчового або кормового продукту, причому одержання харчового або кормового продукту включає в себе ферментацію молочного субстрату молочнокислими бактеріями. Використовуваний тут термін

"кисломолочний продукт" включає в себе, без обмеження, такі продукти, як йогурт, сир, сметана і пахта, а також ферментована сироватка.

У переважному варіанті здійснення концентрація інокульованих клітин *Streptococcus thermophilus* становить від  $10^4$  до  $10^9$  КУО клітин *Streptococcus thermophilus* на мл молочного субстрату, наприклад, від  $10^4$  до  $10^8$  КУО клітин *Streptococcus thermophilus* на мл молочного субстрату.

В іншому переважному варіанті здійснення штам *Streptococcus thermophilus* не здатний підкислювати 9,5 % В-молоко, тобто він зменшує рН менше, ніж на 1,0 після інокуляції 9,5 % В-молока  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл штаму *Streptococcus thermophilus* і інкубації протягом 14 годин при 40 °С, тому в молочний субстрат додають кількість сполуки, ефективну для ініціації підкислення 9,5 % В-молока під дією штаму *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, депонованого в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 26722, що визначають як зменшення рН на 1,0 або більше після інокуляції 9,5 % В-молока  $10^6$ - $10^7$  КУО/мл штаму *Streptococcus thermophilus* й інкубації протягом 14 годин при 40 °С.

Переважно сполука являє собою сахарозу.

Переважно кількість сахарози становить від 0,000001 до 2 %, наприклад, від 0,00001 до 0,2 %, наприклад, від 0,0001 до 0,1 %, наприклад, від 0,001 до 0,05 %.

Сьомий аспект даного винаходу стосується способу одержання кисломолочного продукту, який включає в себе інокуляцію і ферментацію молочного субстрату щонайменше одним штамом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* відповідно до третього або четвертого аспекту даного винаходу.

У переважному варіанті здійснення концентрація інокульованих клітин *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* становить від  $10^4$  до  $10^9$  КУО на мл молочного субстрату, наприклад, від  $10^4$  до  $10^8$  КУО на мл молочного субстрату.

У переважному варіанті здійснення спосіб одержання кисломолочного продукту включає в себе інокуляцію і ферментацію молочного субстрату щонайменше одним штамом *Streptococcus thermophilus* даного винаходу і щонайменше одним штамом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу.

В іншому переважному варіанті кисломолочний продукт являє собою йогурт або сир.

Приклади сирів, які одержують шляхом ферментації під дією *Streptococcus thermophilus* і *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, включають в себе моцарелу і сир для піци (Hoier et al. (2010) in *The Technology of Cheese making*, 2<sup>nd</sup> Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192).

Переважно кисломолочний продукт являє собою йогурт.

У контексті даного винаходу закваска для йогурту являє собою бактеріальну культуру, яка містить щонайменше один штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* і щонайменше одним штамом *Streptococcus thermophilus*. Відповідно до даного винаходу термін "йогурт" стосується кисломолочного продукту, одержаного шляхом інокуляції і ферментації молока композицією, що містить штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* і штам *Streptococcus thermophilus*.

У восьмому аспекті даний винахід стосується кисломолочного продукту, одержаного за способом, описаним в шостому або сьомому аспекті даного винаходу.

У дев'ятому аспекті даний винахід стосується кисломолочного продукту, що містить щонайменше один штам *Streptococcus thermophilus*, описаний в першому або другому аспекті даного винаходу.

У десятому аспекті даний винахід стосується кисломолочного продукту, що містить щонайменше один штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, описаний в третьому або четвертому аспекті даного винаходу.

У переважному варіанті здійснення кисломолочний продукт містить щонайменше один штам *Streptococcus thermophilus* даного винаходу і щонайменше один штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу.

В іншому переважному варіанті кисломолочний продукт являє собою йогурт або сир. Переважно кисломолочний продукт являє собою йогурт.

В одинадцятому аспекті даний винахід стосується застосування штаму *Streptococcus thermophilus*, описаного в першому або у другому аспекті даного винаходу, для одержання кисломолочного продукту.

У дванадцятому аспекті даний винахід стосується застосування *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, відповідно до третього або четвертого аспекту даного винаходу для одержання кисломолочного продукту.

Тринадцятий аспект даного винаходу стосується застосування штаму *Streptococcus thermophilus* даного винаходу і штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу для одержання кисломолочного продукту.

Чотирнадцятий аспект стосується застосування штаму *Streptococcus thermophilus*, описаного в першому або у другому аспекті даного винаходу, для підвищення солодкості кисломолочного продукту.

У п'ятнадцятому аспекті даний винахід стосується застосування штаму *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, описаного в третьому і четвертому аспекті даного винаходу, для підвищення солодкості кисломолочного продукту.

У шістнадцятому аспекті даний винахід направлений на застосування штаму *Streptococcus thermophilus*, описаного в першому або у другому аспекті даного винаходу, і штаму *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, описаного в третьому і четвертому аспекті даного винаходу, для підвищення солодкості кисломолочного продукту.

Зокрема, оскільки діти, як споживча група, надають перевагу продуктам харчування з солодким смаком, передбачається, що штам *Streptococcus thermophilus* даного винаходу і штам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* даного винаходу можна використовувати для збільшення солодкості кисломолочних продуктів, призначених для дітей.

Сімнадцятий аспект даного винаходу стосується кисломолочного продукту даного винаходу, що містить знижену кількість калорій.

Кисломолочний продукт даного винаходу приблизно можна використовувати в раціоні людей, які страждають від надмірної ваги або ожиріння.

Таким чином, в переважному варіанті здійснення кисломолочний продукт даного винаходу призначений для зменшення споживання калорій людьми, які страждають від надмірної ваги або ожиріння.

Надмірна вага і ожиріння являють собою медичні стани, визначені Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) як ненормальне або надмірне накопичення жиру, яке становить небезпеку для здоров'я. Індекс маси тіла (BMI), який можна використовувати як приблизний показник для діагностики надмірної ваги і ожиріння у дорослих, розраховують шляхом ділення маси суб'єкта в кілограмах на квадрат його/її росту в метрах ( $\text{кг}/\text{м}^2$ ). Відповідно до визначення ВООЗ, якщо BMI більший або дорівнює 25, суб'єкт має надмірну вагу, а якщо BMI більший або дорівнює 30, то суб'єкт страждає від ожиріння.

Вісімнадцятий аспект даного винаходу стосується застосування штаму *Streptococcus thermophilus*, описаного в першому або у другому аспекті даного винаходу, для зниження вмісту лактози в кисломолочному продукті.

У дев'ятнадцятому аспекті даний винахід стосується застосування штаму *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, описаного в третьому або четвертому аспекті даного винаходу, для зниження вмісту лактози в кисломолочному продукті.

Двадцятий аспект даного винаходу стосується застосування штаму *Streptococcus thermophilus*, описаного в першому або у другому аспекті даного винаходу, і штаму *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, описаного в третьому або четвертому аспекті даного винаходу, для зниження вмісту лактози в кисломолочному продукті.

Двадцять перший аспект даного винаходу направлений на кисломолочний продукт даного винаходу, що дозволяє уникнути симптомів непереносимості лактози.

Двадцять другий аспект стосується композиції даного винаходу, призначеної для застосування як лікарського засобу.

У двадцять третьому аспекті винахід стосується застосування штаму *Streptococcus thermophilus* даного винаходу для поліпшення росту штаму *Bifidobacterium*.

У переважному варіанті штам *Bifidobacterium* належить до видів, вибраних з групи, що включає в себе *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis* і *Bifidobacterium infantis*, і може являти собою, наприклад, штам, вибраний з групи, що включає в себе штам *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12®, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) під номером доступу DSM 15954, штам *Bifidobacterium animalis*, депонований в DSMZ під номером доступу DSM 15954, штам *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, депонований в DSMZ під номером доступу DSM 15953, і штам *Bifidobacterium longum subsp. longum*, депонований в DSMZ під номером доступу DSM 15955. Найбільш переважний штам *Bifidobacterium* являє собою штам *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12®, депонований в DSMZ під номером доступу DSM 15954.

У двадцять четвертому аспекті даний винахід стосується застосування штаму *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* даного винаходу для поліпшення росту штаму *Bifidobacterium*.

У переважному варіанті здійснення штам *Bifidobacterium* належить до видів, вибраних з групи, яка включає в себе *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis* і *Bifidobacterium*

infantis, і може являти собою, наприклад, штам, вибраний з групи, яка включає в себе штам *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) під номером доступу DSM 15954, штам *Bifidobacterium animalis*, депонований в DSMZ під номером доступу DSM 15954, штам *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, депонований в DSMZ під номером доступу DSM 15953, і штам *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, депонований в DSMZ під номером доступу DSM 15955. Найбільш переважний штам *Bifidobacterium* являє собою штам *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®, депонований в DSMZ під номером доступу DSM 15954.

Двадцять п'ятий аспект стосується застосування штаму *Streptococcus thermophilus* даного винаходу і штаму *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* даного винаходу для поліпшення росту штаму *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 15954.

2-Дезоксиглюкозу і визначення характеру росту бактерій в середовищі M17+2 % галактози порівняно з середовищем M17+2 % глюкози, використовують для відбору бактерій, що містять мутацію в гені глюкокінази (*glcK*).

У двадцять шостому аспекті даний винахід пропонує спосіб скринінгу і виділення штаму *Streptococcus thermophilus*, що містить мутантний ген *glcK*. Спосіб включає в себе наступні стадії:

а) одержання галактоза-ферментуючого вихідного штаму *Streptococcus thermophilus*;  
 б) відбір і виділення з пулу мутантних штамів *Streptococcus thermophilus*, одержаних з вихідного штаму, сукупності мутантних штамів *Streptococcus thermophilus*, стійких до 2-дезоксиглюкози; і

с) відбір і виділення з пулу мутантних штамів *Streptococcus thermophilus*, стійких до 2-дезоксиглюкози, мутантного штаму *Streptococcus thermophilus*, швидкість росту якого в середовищі M17+2 % галактози вища, ніж в середовищі M17+2 % глюкози.

Термін "стійкий до 2-дезоксиглюкози" в даному документі стосується конкретного мутантного бактеріального штаму, що має здатність рости з утворенням колонії при висіванні штрихом на чашки з середовищем M17, що містить 20 мМ 2-дезоксиглюкозу після інкубації при 40 °C протягом 20 годин. Наявність 2-дезоксиглюкози в культуральному середовищі перешкоджає росту немутантних штамів, але не впливає або практично не впливає на ріст мутантних штамів. Немутантні штами, які можна використовувати як чутливі контрольні штами для визначення стійкості переважно включають в себе штами CHCC14994 і CHCC11976.

Приклади 1 і 2 даного опису ілюструють виділення мутантних штамів *Streptococcus thermophilus*, стійких до 2-дезоксиглюкози.

У переважному варіанті здійснення спосіб додатково включає в себе стадію а1) мутагенезу вихідного штаму, наприклад, шляхом піддавання вихідного штаму впливу хімічного і/або фізичного мутагену.

В іншому переважному варіанті здійснення спосіб додатково включає в себе стадію d) відбору і виділення з пулу 2-дезоксиглюкоза-стійких штамів *Streptococcus thermophilus*, відібраних на стадії с), штаму *Streptococcus thermophilus*, швидкість росту якого в середовищі M17+2 % сахарози є високою, але дорівнює нулю, або щонайменше на 0-50 % нижча, ніж швидкість росту вихідного штаму в середовищі M17+2 % глюкози.

Галактоза-ферментуючі вихідні штами *Streptococcus thermophilus*, здатні до росту на/в середовищі M17+2 % галактози, визначають тут як штами *Streptococcus thermophilus*, які знижують рН бульйону M17, що містить 2 % галактози як єдиний вуглевод, до 5,5 або нижче, після інокуляції нічної культури в кількості 1 % і інкубації протягом 24 годин при 37 °C. Такі галактоза-позитивні штами описані на попередньому рівні техніки, а в WO2011/026863 (Chr. Hansen A/S) описаний спосіб одержання таких штамів.

У набагато більш переважному варіанті вихідний штам вибирають з групи, що включає в себе штам *Streptococcus thermophilus* CHCC14994, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 25838, штам *Streptococcus thermophilus* CHCC11976, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 22934, і одержані з них штами.

У контексті даного винаходу, термін "одержані з них штами" потрібно розуміти як штами, одержані, або штами, які можуть бути одержані, з галактоза-ферментуючих вихідних штамів *Streptococcus thermophilus*, наприклад, за допомогою методів генної інженерії, в результаті опромінення і/або хімічної обробки. "Одержані з них штами" також можуть являти собою мутанти, що спонтанно утворюються. Переважно "одержані з них штами" являють собою функціонально еквівалентні мутанти, наприклад, мутанти, які мають такі ж або поліпшені властивості (наприклад, пов'язані з ферментацією галактози) порівняно з вихідним штамом. Такі



"одержані з них штами" є частиною даного винаходу. Зокрема, термін "одержані з них штами" стосується штамів, одержаним шляхом піддавання штаму даного винаходу будь-якій мутагенній обробці, що традиційно використовується, яка включає в себе обробку хімічним мутагеном, таким, як етанметансульфонат (EMS) або N-метил-N'-нітро-N-нітрогуанідин (NTG), ультрафіолетовим світлом, або мутантів, які спонтанно утворюються. Мутант може бути одержаний в результаті декількох мутагенних обробок (одну обробку потрібно розуміти як одну стадію мутагенезу з подальшою стадією скринінг/відбору), однак в цей час надають перевагу, щоб кількість обробок (або стадій скринінг/відбору) не перевищувала 20, не перевищувала 10 або не перевищувала 5. В даний час переважно, щоб мутант містив менше 1 %, менше 0,1 %, менше 0,01 %, менше 0,001 % або навіть менше 0,0001 % замін або делецій нуклеотидів у бактеріальному геномі, порівняно з вихідним штамом.

У двадцять сьомому аспекті мутантний штам *Streptococcus thermophilus*, який можна одержати за способом двадцять сьомого аспекту, входить в об'єм даного опису.

У двадцять восьмому аспекті даний винахід пропонує спосіб скринінгу і виділення штаму *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* з порушенням метаболізму глюкози. Спосіб включає в себе наступні стадії:

а) одержання вихідного штаму *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*;

б) відбір і виділення з пулу мутантних штамів *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, одержаних з вихідного штаму, сукупності штамів *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, стійких до 2-дезоксиглюкози; і

в) відбір і виділення з пулу мутантних штамів *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, стійких до 2-дезоксиглюкози, штаму *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, швидкість росту якого в середовищі MRS-IM+2 % лактози вища, ніж в середовищі MRS-IM+2 % глюкози.

Виділення мутантних штамів *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, стійких до 2-дезоксиглюкози, детально описане в прикладах. За допомогою селекційного аналізу стійкості до 2-дезоксиглюкози, описаного в прикладі 5, фахівець в даній галузі може легко перевірити конкретний штам, який становить інтерес (наприклад, штам з відповідного комерційного продукту), на наявність відповідної стійкості до 2-дезоксиглюкози. За допомогою аналізу росту мутанта, стійкого до 2-дезоксиглюкози, описаного в прикладі 6, фахівець в даній галузі може легко визначити, чи має конкретний штам, який становить інтерес (наприклад, штам з відповідного комерційного продукту), відповідний характер росту, який є властивістю вибраних мутантів.

У переважному варіанті здійснення спосіб додатково включає в себе стадію а1) мутагенезу вихідного штаму, наприклад, шляхом піддавання вихідного штаму впливу хімічного і/або фізичного мутагену.

Вихідні штами *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, здатні рости на/в середовищі MRS-IM+2 % лактози, визначають тут як такі, що мають здатність знижувати рН в бульйоні MRS-IM, що містить 2 % лактози як єдиний вуглевод, до 5,5 або нижче, після інокуляції з нічної культури в кількості 1 % і інкубації протягом 24 годин при 37 °C.

У значно більш переважному варіанті вихідний штам вибраний з групи, що включає в себе штам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CHCC759, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 26419, штам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CHCC10019 штам, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 19252, і одержані з них штами.

У двадцять дев'ятому аспекті штам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, який можна одержати за допомогою способу, описаного в двадцять восьмому аспекті, входить в об'єм даного опису.

Варіанти здійснення даного винаходу описані нижче за допомогою необмежувальних прикладів.

Приклади

Матеріали і методи

Середовище:

Для *Streptococcus thermophilus* використовують середовище M17, відоме фахівцям в даній галузі.

Агарове середовище M17 має наступний склад на літр H<sub>2</sub>O:

агар, 12,75 г

аскорбінова кислота, 0,5 г

казеїновий пептон (трипсиновий), 2,5 г

динатрію β-гліцерофосфату пентагідрат, 19 г

гідрат сульфату магнію, 0,25 г

- м'ясний екстракт, 5 г  
 м'ясний пептон (пепсиновий), 2,5 г  
 соєвий пептон (папаїновий), 5 г  
 дріжджовий екстракт, 2,5 г  
 кінцеве значення pH 7,1±0,2 (25 °C)  
 Бульйон M17 має наступний склад на літр H<sub>2</sub>O:  
 аскорбінова кислота, 0,5 г  
 сульфат магнію, 0,25 г  
 м'ясний екстракт, 5 г  
 м'ясний пептон (пепсиновий), 2,5 г  
 гліцерофосфат натрію, 19 г  
 соєвий пептон (папаїновий), 5 г  
 триптон, 2,5 г  
 дріжджовий екстракт, 2,5 г  
 кінцеве значення pH 7,0±0,2 (25 °C)  
 Як джерела вуглецю додають стерильну лактозу, 20 г/л, глюкозу, 20 г/л, або галактозу, 20 г/л.  
 Як відомо фахівцям в даній галузі, середовище M17 можна використовувати для вирощування *Streptococcus thermophilus*.  
 Крім того, фахівцям в даній галузі потрібно розуміти, що в контексті даного винаходу можна використовувати концентрат M17, одержаний від різних постачальників, і, незалежно від конкретного постачальника (з урахуванням вимірювання стандартної похибки), можна одержати такий же результат відносно стійкості до 2-дезоксиглюкози релевантних клітин, які становлять інтерес, як і в даному винаході.  
 Для культивування *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* використовують середовище MRS-IM. MRS-IM використовують у вигляді чашки з агаром або бульйону.

Агарове середовище MRS-IM має наступний склад на літр H<sub>2</sub>O:

Триптон	Oxoid L 42	10,0 г
Дріжджовий екстракт	Oxoid L 21	5,0 г
Твін 80	Merck nr 8,22187	1,0 г
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck nr 105104	2,6 г
Na-ацетат	Merck nr 106267	5,0 г
Діамонію гідроксид	Merck nr 101154	2,0 г
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	Merck nr 105882	0,2 г
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	Merck nr 105941	0,05 г
Агар	SO-BI-GEL	13,0 г

pH доводять після автоклавування до 6,9±0,1 при 25 °C.

30

Бульйон MRS-IM, що використовується в наведених нижче прикладах для рідких культур, має наступний склад на літр H<sub>2</sub>O:

Триптон	Oxoid L 42	10,0 г
Дріжджовий екстракт	Oxoid L 21	5,0 г
Твін 80	Merck nr 8,22187	1,0 г
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck nr 105104	2,6 г
Na-ацетат	Merck nr 106267	5,0 г
Діамонію гідроксид	Merck nr 101154	2,0 г
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	Merck nr 105882	0,2 г
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	Merck nr 105941	0,05 г

pH доводять після автоклавування до 6,9±0,1 при 25 °C.

Лактозу, 20 г/л, що використовується як джерело вуглецю, або глюкозу, 20 г/л, спочатку стерилізують фільтрацією і потім додають до автоклавованого бульйону.

35

Вказане вище середовище MRS-IM можна піддати деякій модифікації, при умові, що така модифікація не впливає на здатність середовища підтримувати ріст *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Крім того, фахівцям в даній галузі повинно бути зрозуміло, що середовище MRS-IM можна одержати з використанням концентрату MRS-IM або різних описаних вище

компонентів, одержаних з різних джерел. Вказані середовища подібним чином використовують в наведених нижче прикладах, зокрема, в селекційному аналізі стійкості до 2-дезоксиглюкози.

Вихідні штами

5 *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 (штам з мутацією в гені GalK, здатний ферментувати галактозу і продукувати екзополісахариди, як описано в WO 2011/026863).

*Streptococcus thermophilus* CHCC14994 (галактоза-ферментуючий штам).

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759.

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC10019.

Штами, стійкі до 2-дезоксиглюкози

10 *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 (2-дезоксиглюкоза-стійкий мутант CHCC14994).

*Streptococcus thermophilus* CHCC15887 (2-дезоксиглюкоза-стійкий мутант CHCC11976).

*Streptococcus thermophilus* CHCC16404 (мутант CHCC15757, що має підвищену здатність ферментувати лактозу і здатний секретувати глюкозу).

15 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 (2-дезоксиглюкоза-стійкий мутант CHCC759).

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 (2-дезоксиглюкоза-стійкий мутант CHCC10019).

Приклад 1: Застосування 2-дезоксиглюкози для виділення мутантів *Streptococcus thermophilus* по глюकोкіназі, що характеризуються підвищеною екскрецією глюкози

20 Щоб виділити мутанти штаму *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 і штаму *Streptococcus thermophilus* CHCC14994, клітини, одержані в результаті вирощування однієї колонії, інокують в 10 мл бульйону M17, що містить 2 % лактози, і вирощують протягом ночі при 40 °C.

25 На наступний день штами висівають в серійних розведеннях на чашки з агаром M17, що містять 2 % галактози і 2-дезоксиглюкозу в концентрації або 20 мМ (CHCC14994), або 30 мМ (CHCC11976), і інкубують протягом 20 год. при 40 °C. Спочатку стійкі колонії повторно висівають штрихом на чашки з агаром такого ж типу, як і при селекції. Клітини, які вижили, використовують для інокуляції свіжого бульйону M17, що містить або 2 % лактози, 2 % галактози, або 2 % глюкози, і вимірюють ріст.

30 Визначають кількість мутантів, здатних рости на галактозі швидше, ніж на глюкозі, як описано в прикладі 2. Ідентифікують два такі мутанти, CHCC15757 і CHCC15887, які були одержані з CHCC14994 і CHCC11976, відповідно.

Приклад 2: Характер росту мутанта, стійкого до 2-дезоксиглюкози

35 Щоб вибрати мутанти, стійкі до 2-дезоксиглюкози і здатні рости на галактозі, використовують два штами, вибрані з колекції галактоза-ферментуючих штамів. Тоді як швидкість росту галактоза-ферментуючих штамів в експонентній фазі в бульйоні M17+2 % глюкози щонайменше на 10 % вища, ніж в бульйоні M17+2 % галактози, 2-дезоксиглюкоза-стійкі мутанти, одержані з CHCC11976 і CHCC14994, такі, як CHCC15757 і CHCC15887, в експонентній фазі в бульйоні M17+2 % галактози ростуть швидше, ніж в бульйоні M17+2 % глюкози.

40 У даному описі ріст в експонентній фазі вимірюють як зміну оптичної густини культури, що знаходиться в експонентній фазі росту, при 600 нанометрів ( $OD_{600}$ ) з плином часу при 40 °C.

Як відомо фахівцям в даній галузі, зміна оптичної густини може варіювати залежно від виду, якщо культура знаходиться в експонентній фазі росту. Досвідченому фахівцеві відомо, як визначити ріст в експонентній фазі, наприклад, при  $OD_{600}$  в діапазоні 0,1-1,0.

45 Оптичну густину (OD) культури вимірюють за допомогою спектрофотометра.

Висновок:

50 На основі визначеного за способом прикладу 2 характеру росту 2-дезоксиглюкоза-стійкого мутанта - для штаму, який конкретно становить інтерес (наприклад, одного з відповідних комерційних продуктів), - фахівець в даній галузі може регулярно перевіряти, чи має конкретний штам, який становить інтерес, характер росту, відповідний даному винаходу, який є особливістю вибраних мутантів.

Приклад 3: Мутаційний аналіз гена, що кодує глюकोкіназу

55 З мутантів, одержаних за способом прикладу 1, виділяють загальну ДНК і проводять мутаційний аналіз гена, який кодує глюकोкіназу. Секвенування гена глюकोкінази демонструє, що ген штаму CHCC15757 містить неконсервативну мутацію в кодоні 141, що приводить до заміни треоніну на ізолейцин. Секвенування гена мутанта CHCC15887 виявляє мутацію в кодоні 72, що приводить до неконсервативної амінокислотної заміни серину на пролін (фіг. 2).

2-Дезоксиглюкоза-стійкі штами, відповідні умовам, визначеним в прикладах 1 і 2, і виділені за способом прикладу 1, характеризуються наявністю мутації в гені, що кодує глюकोкіназу (glcK).

Мутація може привести до амінокислотної заміни в ферменті, що кодується, або до утворення стоп-кодону, що вкорочує кодований фермент.

Для виявлення мутації в гені *glcK*, конкретний штам, який становить інтерес, вирощують в рідкому бульйоні (M17), що містить 2 % лактози, при 40 °С протягом ночі. Виділяють хромосомальну ДНК, яку потім піддають аналізу методом ПЛР із використанням двох праймерів, комплементарних консервативним ділянкам, розташованим безпосередньо перед геном, який кодує глюкокіназу, і відразу після даного гена. Праймери мають наступні послідовності:

GK1F: 5' CTT GGG TAA AAG GCT CTA TG 3' (SEQ ID NO 3.)

GK1R: 5' CGT TTT TCA ACA AAA AAG TGC TACC 3\* (SEQ ID NO 4)

Для проведення реакцій ПЛР використовують умови, описані виробником набору для ПЛР-ампліфікації (Roche), наприклад

2 мкл хромосомальної ДНК

1 мкл праймера GK1F

1 мкл праймера GK1R

25 мкл загальної реакційної суміші

21 мкл H<sub>2</sub>O

Програма для ПЛР: (94 °С - 1,5 хв., 50 °С - 1 хв., 72 °С - 1,5 хв.) ×30)

Після ампліфікації методом ПЛР одержують фрагмент розміром 1168 п. о. Після очищення з використанням набору для очищення методом ПЛР, Biorad, фрагмент ПЛР піддають ДНК-секвенуванню на Macrogen з використанням таких же двох праймерів, як і для ампліфікації. Після секвенування послідовність ДНК порівнюють з послідовністю ДНК вихідного штаму.

Приклад 4: Вуглеводний аналіз ферментованого молока

В іншому експерименті визначають концентрацію відповідного цукру в молоці, ферментованому з використанням CHCC14994, CHCC11976, CHCC15757 і CHCC15887, відповідно. 9,5 % В-молоко інокують 1 % (10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> КУО/мл) культури, вирощеної протягом ночі в бульйоні M17, що містить 2 % галактози. Підкислення відстежують за допомогою реєструвального пристрою INTAB PC і програмного забезпечення Easview. Після 30 годин підкислення при 40 °С відбирають зразки молока для аналізу ВЕРХ, щоб визначити вміст відповідного цукру і кислот. Криві підкислення демонструють, що у мутантів підкислення починається трохи пізніше, але закінчується при таких же кінцевих значеннях рН. Дані ВЕРХ представлені в таблиці 1.

Таблица 1

Результати аналізу зразків молока методом ВЕРХ

Зразок	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	
№.	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	
	Лимонна кислота	Молочна кислота	Оцтова кислота	Галактоза	Глюкоза	Лактоза	Фруктоза	Солод-кість
Межа детекції	<1.25	<1.25	<1.25	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	
Молоко	1.8	1.7	<1.25	<1.5	<1.5	47.6	<1.5	761.6
CHCC11976	2.0	8.2	<1.25	7.2	<1.5	34.4	<1.5	781
CHCC15887	1.8	7.8	<1.25	10.9	8.3	11.9	<1.5	1156
CHCC14994	1.8	7.2	<1.25	4.9	<1.5	34.3	<1.5	705.6
CHCC15757	1.7	7.1	<1.25	10.3	11.3	13.8	<1.5	1390

Розрахунок солодкості: мг/мл глюкози\*74 + мг/мл лактози\*16 + мг/мл галактози\*32

З таблиці 1 видно, що два *glcK*-мутантні штами, CHCC15757 і CHCC15887, споживають щонайменше 71 % лактози, тоді як вихідні штами споживають приблизно 28 % лактози. У

випадку застосування мутанта з максимальною здатністю до ферментації лактози, CHCC15887, в кисломолочному продукті залишається всього 11,9 мг/мл лактози, що свідчить про те, що даний продукт підходить навіть для людей з непереносимістю лактози. Дуже важливо те, що два *glcK*-мутанти виділяють від 8,3 до 11,3 мг/мл глюкози, тоді як у вихідних штамів рівень секреції глюкози знаходиться нижче рівня детекції. У той же час обидва мутантних штами також секретують більше галактози, ніж вихідні штами: від 34 до 52 %. З урахуванням того, що солодкість сахарози приймають за 100, а солодкість лактози - за 16, солодкість галактози становить 32, а солодкість глюкози становить 74,3, і розрахунок відносної солодкості кінцевого ферментованого продукту дозволяє передбачити, що при використанні найкращого мутанта CHCC15757 солодкість буде в 2,0 рази вища, ніж при ферментації з використанням відповідного вихідного штаму CHCC14994.

Оскільки два *glcK*-мутантні штами, CHCC15757 і CHCC15887, виділяють високі рівні глюкози, вважають, що мутації в гені *glcK* інактивують кодований білок глюкокінази.

Приклад 5: Відбір 2-дезоксиглюкоза-стійких штамів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Відбір 2-дезоксиглюкоза-стійких мутантів

Два штами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, CHCC759 і CHCC10019, які становлять інтерес, незалежно один від одного інокують в 10 мл описаного вище бульйону MRS-IM, що містить 2 % лактози, та інкубують в анаеробних умовах при 40 °C протягом ночі. На наступній стадії зразки вказаних культур, які містять приблизно  $3 \times 10^8$  клітин, висівають на чашки з агарним середовищем MRS-IM, що містить 2 % лактози і, крім того, 20 мМ 2-дезоксиглюкози. Колонії, які утворилися на чашках, очищують шляхом висівання штрихом окремих колоній на чашки з агарним середовищем MRS-IM, що містить 2 % лактози і, крім того, 20 мМ 2-дезоксиглюкози, і потім характеризують, як описано нижче.

Аналіз стійкості до 2-дезоксиглюкози:

Нижченаведений спосіб можна використовувати для визначення стійкості штаму, що становить інтерес, до 2-дезоксиглюкози. Штами, які становлять інтерес, інокують в 10 мл описаного вище бульйону MRS-IM, що містить 2 % лактози, і інкубують в анаеробних умовах при 40 °C протягом ночі. На наступній стадії розбавлені зразки вказаних культур, які містять приблизно  $10^4$ - $10^5$  клітин, вміщують на чашки з агарним середовищем MRS-IM, що містить, крім 2 % лактози, таку ж концентрацію 2-дезоксиглюкози, яка використовувалася для відбору стійкого мутанта (звичайно 20 мМ, але можна використовувати й інші концентрації). Чашки з агаром інкубують в анаеробних умовах протягом 20 годин при 40 °C і оглядають. Штами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, які не є стійкими до 2-дезоксиглюкози, утворюють мало колоній, або взагалі не утворюють, тоді як штами, стійкі до 2-дезоксиглюкози, утворюють множини колоній. Відповідні контролю включають в себе штами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, CHCC759 і CHCC10019, які є чутливими до 2-дезоксиглюкози в концентрації 20 мМ, і CHCC16159 і CHCC16160, стійкі до 20 мМ 2-дезоксиглюкози.

Результат: За допомогою даного способу виділяють декілька клонів, здатних рости в умовах селекції в присутності 2-дезоксиглюкози. Мутантні штами, здатні швидко рости на чашках з 2-дезоксиглюкозою, означають CHCC16159 (одержаний з вихідного штаму CHCC759) і CHCC16160 (одержаний з вихідного штаму CHCC10019). Вказані мутантні штами вміщують на зберігання в Німецьку колекцію мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) GmbH.

Приклад 6: Характер росту 2-дезоксиглюкоза-стійких мутантів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Щоб пересвідчитися, що 2-дезоксиглюкоза-стійкі мутанти *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* не здатні рости, або гірше ростуть на глюкозі як на джерелі вуглецю, характер росту мутантів порівнюють з характером росту вихідних штамів шляхом вирощування вихідних штамів, CHCC759 і CHCC10019, і мутантів, CHCC16159 і CHCC16160, в бульйоні MRS-IM, що містить 2 % глюкози.

У той час, як 2 вихідні штами, CHCC759 і CHCC10019, експонентно ростуть в бульйоні MRS-IM, що містить 2 % глюкози, згодом подвоєння менше 10 годин, два 2-дезоксиглюкоза-стійкі мутанти, CHCC16159 і CHCC16160, в даному середовищі не ростуть, або ростуть дуже повільно. Ріст в експонентній фазі реєструють шляхом вимірювання оптичної густини експонентно зростаючої культури при 600 нм ( $OD_{600}$ ) при 40 °C за допомогою спектрофотометра. Експонентна фаза росту досягається в діапазоні  $OD_{600}$  0,1-1,0.

Приклад 7: Вуглеводний аналіз молока, ферментованого з використанням штамів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

В іншому експерименті визначають концентрації різних цукрів в молоці, ферментованих з використанням штамів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759, CHCC10019, CHCC16159 і CHCC16160, відповідно. 9,5 % В-молоко інокують 1 % ( $10^6$ - $10^7$  КУО/мл) рідкої

- культури, вирощеної протягом ночі в анаеробних умовах в бульйоні MRS-IM, що містить 2 % лактози. Підкислення відстежують за допомогою реєструючого пристрою INTAB PC і програмного забезпечення Easyview. Після 30 годин підкислення при 40 °C відбирають зразки молока для аналізу ВЕРХ, щоб визначити вміст різних цукрів і органічних кислот. Криві підкислення демонструють, що у мутантів підкислення починається трохи пізніше, але закінчується при таких же кінцевих значеннях рН. Дані ВЕРХ представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

## Результати аналізу зразків молока методом ВЕРХ

Зразок	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	
No.	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	
	Лимонна кислота	Молочна кислота	Оцтова кислота	Галактоза	Глюкоза	Лактоза	Фруктоза	Солодкість
Межа детекції	<1.25	<1.25	<1.25	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5	
Молоко	1.9	<1.25	<1.25	<1.5	<1.5	55.5	<1.5	888
CHCC759	1.8	9.6	<1.25	13.1	4.2	18.1	<1.5	1021
CHCC16159	2.0	7.9	<1.25	21.4	15.2	1.7	<1.5	1841
CHCC10019	1.8	11.1	<1.25	12.4	>1.5	20.8	<1.5	730
CHCC16160	1.9	5.4	<1.25	19.4	15.8	2.9	<1.5	1841

Розрахунок солодкості: мг/мл глюкози\*74 + мг/мл лактози\*16 + мг/мл галактози\*32

- Як можна бачити з таблиці 2, два 2-дезоксиглюкоза-стійкі мутантні штами, CHCC16159 і CHCC16160, споживають щонайменше приблизно 94 % лактози, тоді як вихідні штами споживають щонайменше приблизно 37 % лактози. У випадку застосування мутанта, що характеризується найвищою продукцією молочної кислоти, CHCC16160, в ферментованому молоці залишається всього 2,9 мг/мл лактози. Кисломолочні продукти з таким низьким рівнем лактози підходять для споживання людьми з непереносимістю лактози.

- Важливо зазначити, що два мутантні штами, CHCC16159 і CHCC16160, виділяють від 15,2 до 15,8 мг/мл глюкози, в той час як секреція глюкози у вихідних штамів знаходиться нижче рівня детекції у випадку застосування CHCC10019 і становить 4,2 мг/мл у випадку застосування CHCC759, відповідно. У той же час обидва мутантні штами також виділяють більше галактози, ніж вихідні штами. Якщо солодкість сахарози приймають за 100, а солодкість лактози становить 16, солодкість галактози становить 32, а солодкість глюкози становить 74,3, розрахунок відносної солодкості кінцевого ферментованого продукту дозволяє передбачити, що мутант CHCC16160 продукує кисломолочний продукт, який в 2,5 рази солодший, ніж продукт, одержаний з використанням відповідного вихідного штаму CHCC10019.

- Приклад 8: Вибір мутанта *Streptococcus thermophilus*, що має підвищену здатність до ферментації лактози і здатний секретувати глюкозу

- Щоб виділити мутантний штам *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, що має підвищену здатність до ферментації лактози і здатний секретувати глюкозу, клітини, одержані в результаті вирощування однієї колонії, висівають в 10 мл бульйону M17, що містить 2 % галактози, і вирощують протягом ночі при 40 °C.

- На наступний день штам висівають в серійному розведенні на чашки з агарним середовищем M17, що містить 2 % галактози і 2-дезоксиглюкозу в концентрації 30 мМ, й інкубують протягом 20 годин при 40 °C. Спочатку колонії, які мають стійкість, повторно висівають штрихом на чашки з агаром такого ж типу, які використовувалися для селекції. Клітини, які вижили, використовують для інокуляції свіжого бульйону M17, що містить 2 % лактози, або 2 % галактози, або 2 % сахарози, або 2 % глюкози.

У результаті виділяють мутант CHCC16404, одержаний з CHCC15757, який не здатний рости в В-молоці, але може рости в середовищі M17, що містить 2 % сахарози, при 40 °С. Крім того, CHCC16404 не здатний рости в M17, що містить 2 % глюкози.

Ріст в експонентній фазі в даному описі вимірюють як розвиток оптичної густини експонентно зростаючої культури при 600 нанометрах ( $OD_{600}$ ) з плином часу при 40 °С.

Приклад 9: Характер росту мутанта *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, що має підвищену здатність до ферментації лактози і здатний секретувати глюкозу

Щоб забезпечити підтримку і належний ріст мутанта CHCC16404, штам вирощують при 40 °С в M17, що містить 2 % сахарози. Несподівано автори даного винаходу виявили, що мутантний штам CHCC16404 може підкислювати 9,5 % В-молоко тільки в тому випадку, якщо до штаму додають 1 % ( $10^6$ - $10^7$  КУО/мл) культури, вирощеної протягом ночі в бульйоні M17, що містить 2 % сахарози, або якщо в молоко додати сахарозу. Автори виявили, що додавання до молока всього лише 0,01 % сахарози надає штаму CHCC16404 здатність підкислювати 9,5 % В-молоко. Крім того, CHCC16404 не може рости в M17, що містить 2 % глюкози, при 40 °С, на відміну від вихідного штаму CHCC15757, здатного рости в тих же умовах в середовищі M17, що містить глюкозу. У сукупності одержані результати свідчать про те, що обробка штаму CHCC15757 2-дезоксиглюкозою, що приводить до одержання штаму CHCC16404, дозволяє вибрати мутацію, яка інактивує систему поглинання глюкози, унеможливаючи поглинання секретованої глюкози з середовища.

Приклад 10: Вуглеводний аналіз молока, ферментованого з використанням мутанта *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, що має підвищену здатність до ферментації лактози і здатний секретувати глюкозу

В іншому експерименті концентрації відповідного цукру визначають в молоці, ферментованому з використанням CHCC16404. У пляшки, що містять 9,5 % В-молоко з додаванням 0,01, 0,02, 0,03 і 0,05 % сахарози, відповідно, вносять 1 % ( $10^6$ - $10^7$  КУО/мл) культури, вирощеної протягом ночі в бульйоні M17, що містить 2 % сахарози. Підкислення відстежують за допомогою реєструючого пристрою INTAB PC і програмного забезпечення Easyview. Після 30 годин підкислення при 40 °С відбирають зразки молока для аналізу ВЕРХ, щоб визначити вміст відповідних цукрів і кислот.

З таблиці 3 видно, що мутант CHCC16404, що має підвищену здатність до ферментації лактози і здатний секретувати глюкозу, як не дивно, споживає всю лактозу при всіх концентраціях доданої сахарози, що тестуються в даному експерименті. Автори також зазначили, що при додаванні підвищених концентрацій сахарози (наприклад, >0,1 мг/мл) ферментація лактози не завершується, перш ніж буде досягнуте кінцеве значення рН. Крім того, таблиця 3 також показує, що вся лактоза перетворюється в глюкозу і галактозу, і що тільки частина галактози використовується для ферментації при всіх концентраціях доданої сахарози. Цікаво, що секретована глюкоза не поглинається повторно, і в результаті в молоці залишається більше 23,9 мг/мл глюкози. Оскільки ферментується приблизно 25 % галактози, після ферментації в молоці залишається більше 16 мг/мл галактози. Одержані результати свідчать про те, що CHCC16404, крім мутації *glcK*, успадкованої від вихідного штаму CHCC15757, також несе мутацію, яка інактивує систему поглинання глюкози, унеможливаючи поглинання секретованої глюкози з середовища. Порівняння результатів, наведених в таблиці 3, і результатів, наведених в таблиці 1, з урахуванням того, що солодкість сахарози приймають за 100, солодкість лактози становить 16, солодкість галактози становить 32, а солодкість глюкози становить 74,3, після обчислення відносної солодкості кінцевого ферментованого продукту, дозволяє зробити висновок, що штам CHCC16404 генерує солодкість приблизно в 3,5 рази вище, ніж штам CHCC14994.

Таблиця 3

Результати аналізу зразків молока методом ВЕРХ

Зразок	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	
No.	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	
	Лимонна кислота	Молочна кислота	Оцтова кислота	Галактоза	Глюкоза	Лактоза	Солод-кість
Межа детекції	<1.25	<1.25	<1.25	<1.5	<1.5	<1.5	
Молоко	1.8	1.7	<1.25	<1.5	<1.5	47.6	762
CHCC16404+ 0.01% сахарози	1.9	5.4	<1.25	16.1	23.9	<1.5	2291
CHCC16404+ 0.02% сахарози	2.0	5.6	<1.25	17.0	25.3	<1.5	2424
CHCC16404+ 0.03% сахарози	2.0	5.6	<1.25	16.4	24.1	<1.5	2315
CHCC16404+ 0.05% сахарози	2.1	6.0	<1.25	17.3	25.4	<1.5	2441

Розрахунок солодкості: мг/мл глюкози\*74 + мг/мл лактози\*16 + мг/мл галактози\*32

Приклад 11: Вуглеводний аналіз молока, ферментованого з використанням поєднання штамів *Streptococcus thermophilus* і штамів *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

У даному експерименті визначають концентрації цукрів і органічних кислот в молоці, ферментованому з використанням поєднань штаму *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (вибраного з CHCC759, CHCC10019, CHCC16159 і CHCC16160) і штаму *Streptococcus thermophilus*, як який використовують один з CHCC14994, CHCC15757 і CHCC16404.

Виробництво йогурту звичайно включає в себе використання змішаної заквашувальної культури, що містить як штами *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, так і штами *Streptococcus thermophilus*. Як правило, молочний субстрат, що використовується у виробництві йогурту, інокують 1 частиною *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* і 9 частинами *Streptococcus thermophilus*. Щоб проаналізувати здатність до секреції глюкози в стандартній установці для виробництва йогурту, 9,5 % В-молоко інокують 0,1 % культури *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, вирощеної протягом ночі в анаеробних умовах в бульйоні HRS-IM, що містить 2 % лактози, і 0,9 % культури *Streptococcus thermophilus*, вирощеної протягом ночі в бульйоні M17, що містить 2 % галактози (CHCC15757) або 2 % сахарози (CHCC16404). Підкислення відстежують за допомогою реєструючого пристрою INTAB PC і програмного забезпечення Easyview. Після 30 годин підкислення беруть зразки молока і проводять аналіз методом ВЕРХ, щоб визначити вміст різних цукрів і кислот. Результати ВЕРХ представлені в таблиці 4.



Таблиця 4

Результати ВЕРХ-аналізу зразків молока, ферментованого змішаними культурами

Зразок	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	Кіл-ть	
	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	мг/мл	
	Лимонна кислота	Молочна кислота	Оцтова кислота	Галактоза	Глюкоза	Лактоза	Солодкість
Межа детекції	<1.25	<1.25	<1.25	<1.5	<1.5	<1.5	
Молоко	1.7	<1.25	<1.25	<1.5	<1.5	51.6	
CHCC14994+CHCC10019	1.8	7.6	<1.25	5.7	<1.5	33.6	722
CHCC14994+CHCC16159	1.9	7.7	<1.25	5.6	<1.5	36.4	762
CHCC15757+CHCC10019	1.7	9.7	<1.25	12.9	6.5	13.2	1108
CHCC15757+CHCC16159	2.0	10.4	<1.25	17.1	14.1	9.5	1743
CHCC14994 + CHCC759	1.7	7.4	<1.25	5.6	<1.5	31.6	686
CHCC14994 + CHCC16160	1.8	7.3	<1.25	5.5	<1.5	32.4	693
CHCC15757+CHCC759	2.1	13.8	<1.25	16.6	6.5	12.2	1209
CHCC15757+CHCC16160	2.0	8.7	<1.25	13.2	11.8	8.5	1432
CHCC16404+CHCC10019	2.2	8.1	<1.25	11.5	1.8	24.9	900.1
CHCC16404+CHCC16159	2.2	7.8	1.3	20.9	14.9	3.9	1838.3
CHCC16404+CHCC16160	2.3	7.7	<1.25	23.1	22.3	<1.5	2396.1
CHCC16404*+CHCC10019	2.1	10.7	<1.25	17.7	11.9	3.2	1501.8
CHCC16404*+CHCC16159	2.0	11.0	<1.25	22.2	20.2	<1.5	2211.3
CHCC16404*+CHCC16160	2.1	6.6	<1.25	18.3	25.8	<1.5	2502.5

\* додавання 0,05 % сахарози

Розрахунок солодкості: мг/мл глюкози\*74 + мг/мл лактози\*16 + мг/мл галактози\*32

З таблиці 4 слідує, що 2-дезоксиглюкоза-стійкі мутантні штами CHCC15757 і CHCC16404 *Streptococcus thermophilus* здатні секретувати глюкозу в молоко, незалежно від того, чи використовують їх в поєднанні з вихідним штамом *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, або з мутантним штамом, стійким до 2-дезоксиглюкози. Однак концентрація глюкози вище при використанні поєднання 2-дезоксиглюкоза-стійких мутантних штамів обох видів, наприклад,

поєднання CHCC15757 і CHCC16159, або поєднання CHCC15757 і CHCC16160. Виявлено, що при використанні вказаних змішаних культур споживається щонайменше 82 % лактози і виділяється від 11,8 до 14,1 мг/мл глюкози. Подібні результати одержують при використанні штаму *Streptococcus thermophilus* CHCC15887, який також являє собою 2-дезоксиглюкоза-стійкий мутант з мутацією в гені *glcK*.

У той же час присутність 2-дезоксиглюкоза-стійкого мутантного штаму в заквашувальній культурі також приводить до підвищення екскреції галактози. При використанні поєднання мутантних штамів, наприклад, CHCC15757 і CHCC16159, екскреція галактози приблизно в 3 рази вище (17,1 мг/мл), ніж при використанні заквашувальної культури, що містить відповідні вихідні штами CHCC14994 і CHCC10019.

Секреція глюкози є ще ефективнішою, якщо використовують поєднання глюкозо-секретуючого мутантного штаму *Streptococcus thermophilus* CHCC16404, що має підвищену здатність до ферментації лактози, і 2-дезоксиглюкоза-стійких мутантних штамів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, наприклад, поєднання CHCC16404 і CHCC16159, або поєднання CHCC164C4 і CHCC16160.

З урахуванням того, що солодкість сахарози приймають за 100 (контрольне значення), солодкість лактози становить 16, солодкість галактози становить 32, а солодкість глюкози становить 74, розрахунок відносної солодкості кінцевого ферментованого продукту, представленого в останньому рядку таблиці 4, дозволяє передбачити, що різні поєднання штамів дають визначення кінцевої концентрації залишкової лактози, глюкози і галактози в кінцевому ферментованому продукті. Для одержання йогурту з максимальною внутрішньою солодкістю, зумовленою високими концентраціями секретованих глюкози і галактози і відсутністю залишкової лактози, найбільш ефективним є поєднання штамів CHCC16404 і CHCC16160. З використанням даного поєднання можна одержати йогурт в 3,6 рази солодший, ніж з використанням відповідного поєднання з 2-DG-чутливих штамів *Streptococcus thermophilus* і *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, CHCC14994 і CHCC10019, причому в ферментованому молоці не залишається детектованих рівнів лактози.

Приклад 12. Поліпшення росту біфідобактерій шляхом застосування глюкозо-секретуючих мутантів *Streptococcus thermophilus* і *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Деякі з найбільш відомих пробіотичних бактерій, таких, як *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® (комерційно доступні від Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Denmark), погано ростуть самі по собі в такому середовищі, як молоко, що містить лактозу. У даному експерименті автори досліджують вплив поєднання *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® з глюкозо-секретуючим штамом *Streptococcus thermophilus* або *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Експеримент 1:

CHCC 5445 (BB-12®) вирощують в анаеробних умовах протягом ночі при 40 °C в MRS+0,05 % хлориду цистеїну.

CHCC14994 вирощують протягом ночі при 40 °C в M17, що містить 2 % галактози.

CHCC 15757 вирощують протягом ночі при 40 °C в M17, що містить 2 % галактози.

Експеримент 2:

CHCC 5445 (BB-12®) вирощують в анаеробних умовах протягом ночі при 40 °C в MRS+0,05 % хлориду цистеїну.

CHCC10019 вирощують протягом ночі в анаеробних умовах при 40 °C в MRS, що містить 2 % лактози

CHCC16159 вирощують протягом ночі в анаеробних умовах при 40 °C в MRS, що містить 2 % лактози

У шість пляшок, що містять 200 мл В-молока, додають при 40 °C в загальній складності 1 % вирощених культур, що мають схожу оптичну густину, й інкубують протягом ночі:

1. 1 % CHCC 5445 (BB-12®)

2. 0,5 % CHCC 5445 (BB-12®)+0,5 % CHCC14994

3. 0,5 % CHCC 5445 (BB-12®)+0,5 % CHCC15757

4. 1 % CHCC5445 (BB-12®)

5. 0,5 % CHCC 5445 (BB-12®)+0,5 % CHCC10019

6. 0,5 % CHCC 5445 (BB-12®)+0,5 % CHCC16159

Підкислення відбувається тільки в пляшках 2-3 і 5-6 внаслідок поганої ефективності BB-12 в молоці. Після ферментації 100 мкл кожної культури висівають в різному розведенні ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) на чашки з агаром, призначені спеціально для вирощування BB-12®, тобто, які містять MRS+0,05 % хлориду цистеїну+10 мкг/мл тетрацикліну, і потім інкубують протягом ночі в анаеробних умовах при 40 °C. Потім шляхом підрахунку визначають кількість колоній і середній результат наводять в таблиці 5 як КУО/мл (кількість колонієутворювальних одиниць на мілілітр).

Таблиця 5

КУО/мл BB-12 в кисломолочних культурах

Експеримент	Культури	КУО/мл
1	1% CHCC 5445 (BB-12)	4,50E+07
1	0,5% CHCC 5445 (BB-12) + 0,5 % CHCC14994	4,00E+07
1	0,5% CHCC 5445 (BB-12) + 0,5 % CHCC15757	4,00E+08
2	1% CHCC 5445 (BB-12)	6,00E+07
2	0,5% CHCC 5445 (BB-12) + 0,5 % CHCC10019	2,00E+07
2	0,5% CHCC 5445 (BB-12) + 0,5 % CHCC16159	1,40E+08

Тільки тоді, коли глюкозо-секретуючі мутанти *Streptococcus thermophilus*, CHCC15757, і *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, CHCC16159, присутні разом з BB-12®, піст BB-12® посилюється, причому в даних культурах загальна кількість клітин, представлена у вигляді КУО/мл, приблизно на  $10 \times (1 \log)$  вище. Даний результат дозволяє передбачити, що глюкозо-секретуючі штами можна використовувати для того, щоб підвищити вміст пробіотичних штамів, таких, як BB-12®, при використанні в змішаних культурах.

Приклад 13. Порівняння геномів CHCC15757 і CHCC16404 і визначення мутації в гені, що кодує білок IIC<sup>Man</sup> системи фосфотрансферази глюкози/манози (PTS).

Препарати геномної ДНК CHCC15757 і CHCC16404 секвенують в Пекінському інституті геноміки (BGI, Пекін, Китай), збирання і завершення проводять з використанням програмного забезпечення для геномних інструментальних засобів CLC (CLCBio, Aarhus, Denmark). Геномні послідовності CHCC15757 і CHCC16404 вирівнюють з використанням анотованої геномної послідовності CHRZ1066 як еталон, використовуючи програмне забезпечення Mauve 2.3.1. Після вирівнювання проводять аналіз одонуклеотидного поліморфізму (SNP) за допомогою безкоштовного програмного забезпечення Mauve 2.3.1 для CHCC15757 і CHCC16404. У результаті ідентифікують заміну G на T в кодоні GAA (який кодує глутамінову кислоту), відповідному амінокислотному положенню 209, в гені *manM*, що кодує білок IIC<sup>Man</sup> з PTS глюкози/манози. Дана заміна приводить до введення стоп-кодону TAA в положенні, відповідному положенню 209 білка (фіг. 3), і, як наслідок, до продукції усиченого і нефункціонального білка IIC<sup>Man</sup>. Таким чином, передбачають, що дана мутація приводить до запобігання транспорту глюкози в клітину через PTS глюкози/манози.

Депонування і експертні рішення

На прохання заявника зразки депонованих мікроорганізмів, вказаних нижче, можуть бути доступні тільки для експерта до дати видачі патенту.

Штам *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 вміщений на зберігання в Німецьку колекцію мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 3 квітня 2012 року під номером доступу DSM 25850

Штам *Streptococcus thermophilus* CHCC15887 вміщений на зберігання в Німецьку колекцію мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 3 квітня 2012 року під номером доступу DSM 25851

Штам *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 вміщений на зберігання в Німецьку колекцію мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 12 грудня 2012 року під номером доступу DSM 26722.

Штам *Streptococcus thermophilus* CHCC14994 вміщений на зберігання в Німецьку колекцію мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 3 квітня 2012 року під номером доступу DSM 25838.

Штам *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 вміщений на зберігання в Німецьку колекцію мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 8 вересня 2009 року під номером доступу DSM 22934.

Штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759 вміщений на зберігання в Німецьку колекцію мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 6 вересня 2012 року під номером доступу DSM 26419.

Штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC10019 вміщений на зберігання в Німецьку колекцію мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 3 квітня 2007 року під номером доступу DSM 19252.

5 Штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 вміщений на зберігання в Німецьку колекцію мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 6 вересня 2012 року під номером доступу DSM 26420.

Штам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 вміщений на зберігання в Німецьку колекцію мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 6 вересня 2012 року під номером доступу DSM 26421.

10 Штам *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CHCC5445 (BB-12®) вміщений на зберігання в Німецьку колекцію мікроорганізмів і клітинних культур (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, 30 вересня 2003 року під номером доступу DSM 15954.

Депонування здійснюють відповідно до Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентної процедури.

15 Посилання

**WO 2011/026863**

**Pool et al. (2006) Metabolic Engineering 8(5); 456-464**

**Thompson et al. (1985) J. Bacteriol. 162(1); 217-223**

**Chervaux et al. (2000). Appl and Environ Microbiol, 66, 5306-5311**

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

**Høier et al. (2010) in The Technology of Cheesemaking, 2<sup>nd</sup> Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192.**

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Chr. Hansen A/S

<120> Застосування молочнокислих бактерій для одержання ферментованих харчових продуктів з підвищеною природною солодкістю

<130> P4456PC00

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 969

<212> ДНК

<213> *Streptococcus thermophilus*

<400> 1  
atgagtaaga aactcttagg tattgacctt ggtggaacaa ctgttaagtt tggatatttg  
60  
actgcagatg gtgaagttca agaaaaatgg gctattgaaa caaatacgtt tgaaaaatgg  
120  
agccacattg ttcctgacat tgtagaatct ttgaaacacc gtttggaatt gtatggactt  
180  
actgctgaag attttatttg aattggtatg ggatctccag gtgcagttga ccgagaaaat  
240  
aaaacagtaa cgggtgcctt taacttgaac tgggcagaaa ctcaagaagt tggctctggt  
300  
attgaaaaag aacttggtat tccattcgct attgataatg atgctaattg ggctgcactg  
360  
ggtgaacgtt ggggttggtgc tgggtgtaac aatcggaatg ttgtctttat aacattgggt  
420  
acaggtgttg gtggcgggtg tatcgctgat ggtaacttaa ttcattggtg tgccgggtgt  
480  
ggtggggaaa ttggtcacat tattgttgaa cctgacacag gatttgagtg tacttgcgga  
540  
aacaaggggt gtctggaaac tgtagcttca gcaacaggta ttgtacgtgt agcacatcat  
600  
ttggcagaaa aatacgaagg aaactcttct attaaagctg ctgtagacaa tggtagattt  
660  
gtgacaagta aagatattat cgtagctgct actgaagggtg ataagtttgc tgacagcatt  
720  
gttgataaag tctctaaata cctcggactt gcaacagcaa acatctcaaa cattcttaac  
780  
ccagattctg tcgttatcgg tgggtggtgt tctgccgcag gagaattctt gcgtagtcgt  
840

gttgaaggat actttacacg ttatgcattc ccacaagttc gccgtacaac aaaagtgaaa  
900

ttagcggagc ttggaaatga tgcaggaatc attggagctg ctagtcttgc ttatagtatt  
960

gacaaataa  
969

<210> 2  
<211> 322  
<212> B1JOK  
<213> Streptococcus thermophilus

<400> 2

Met Ser Lys Lys Leu Leu Gly Ile Asp Leu Gly Gly Thr Thr Val Lys  
1 5 10 15

Phe Gly Ile Leu Thr Ala Asp Gly Glu Val Gln Glu Lys Trp Ala Ile  
20 25 30

Glu Thr Asn Thr Phe Glu Asn Gly Ser His Ile Val Pro Asp Ile Val  
35 40 45

Glu Ser Leu Lys His Arg Leu Glu Leu Tyr Gly Leu Thr Ala Glu Asp  
50 55 60

Phe Ile Gly Ile Gly Met Gly Ser Pro Gly Ala Val Asp Arg Glu Asn  
65 70 75 80

Lys Thr Val Thr Gly Ala Phe Asn Leu Asn Trp Ala Glu Thr Gln Glu  
85 90 95

Val Gly Ser Val Ile Glu Lys Glu Leu Gly Ile Pro Phe Ala Ile Asp  
100 105 110

Asn Asp Ala Asn Val Ala Ala Leu Gly Glu Arg Trp Val Gly Ala Gly  
115 120 125

Ala Asn Asn Arg Asn Val Val Phe Ile Thr Leu Gly Thr Gly Val Gly  
130 135 140

Gly Gly Val Ile Ala Asp Gly Asn Leu Ile His Gly Val Ala Gly Ala  
145 150 155 160

Gly Gly Glu Ile Gly His Ile Ile Val Glu Pro Asp Thr Gly Phe Glu  
165 170 175

Cys Thr Cys Gly Asn Lys Gly Cys Leu Glu Thr Val Ala Ser Ala Thr  
180 185 190

Gly Ile Val Arg Val Ala His His Leu Ala Glu Lys Tyr Glu Gly Asn  
195 200 205

Ser Ser Ile Lys Ala Ala Val Asp Asn Gly Glu Phe Val Thr Ser Lys  
210 215 220

Asp Ile Ile Val Ala Ala Thr Glu Gly Asp Lys Phe Ala Asp Ser Ile  
225 230 235 240

Val Asp Lys Val Ser Lys Tyr Leu Gly Leu Ala Thr Ala Asn Ile Ser  
245 250 255

Asn Ile Leu Asn Pro Asp Ser Val Val Ile Gly Gly Gly Val Ser Ala  
260 265 270

Ala Gly Glu Phe Leu Arg Ser Arg Val Glu Gly Tyr Phe Thr Arg Tyr  
275 280 285

Ala Phe Pro Gln Val Arg Arg Thr Thr Lys Val Lys Leu Ala Glu Leu  
290 295 300

Gly Asn Asp Ala Gly Ile Ile Gly Ala Ala Ser Leu Ala Tyr Ser Ile  
305 310 315 320

Asp Lys

<210> 3  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Streptococcus thermophilus

<400> 3  
cttgggtaaa aggctctatg  
20

<210> 4  
<211> 25  
<212> ДНК  
<213> Streptococcus thermophilus

<400> 4  
cgtttttcaa caaaaaagtg ctacc  
25

```

<210> 5
<211> 828
<212> ДНК
<213> Streptococcus thermophilus

<400> 5
atgtcagata tgtcaattat ttctgcgatt ttggtcgtag ctggtgcctt ccttgctggt
60

cttgaaagta tccttgacca attccaattc caccaaccac ttggtgcatg taccctcatc
120

ggtgctgcc aaggtaacct cactgcaggt atcatgcttg gtggttctct tcaaatgatt
180

acccttgctt gggcaaacaat cggtgctgcc gtagctcctg acgttgccct tgcattctgtt
240

gocgctgcc tcatTTTggt taaaggTggt aaatttacag ctgaaggTat cggTgTtgcg
300

attgcaatag ctatcctgct tgcagttgca ggtctcttcc taactatgcc tgttcgtaca
360

gcattctattg cctttgttca tgctgcagat aaagctgcag aacacggaaa catcgctggt
420

gttgaacgtg catactacct cgctctcctt cttcaagggtt tgcgtattgc tgtgccagca
480

gcccttcttc ttgccatccc ggccaatct gttcaacatg cccttggtt gatgcctgac
540

tggtcacc c atggTttggt tgcggTggt ggtatggTcg tagccgTtggt ttacgccatg
600

attatcaata tgatggctac tcgtgaagtt tggccattct tcgccattgg ttttgctttg
660

gcagcaatta gccaatgac acttatcgct cttagtacca ttggtgttgc catgccttc
720

atctacctca acctttctaa acaaggTggc ggaaatggtg gcggaaatgg tggcggaact
780

tcattctggtt caggcgaccc aatcggcgat atcttggaag actactag
828

```

```

<210> 6
<211> 275
<212> БИЛОК
<213> Streptococcus thermophilus

```

<400> 6

```

Met Ser Asp Met Ser Ile Ile Ser Ala Ile Leu Val Val Ala Val Ala
1           5           10          15

```



Phe Leu Ala Gly Leu Glu Ser Ile Leu Asp Gln Phe Gln Phe His Gln  
 20 25 30  
 Pro Leu Val Ala Cys Thr Leu Ile Gly Ala Ala Thr Gly Asn Leu Thr  
 35 40 45  
 Ala Gly Ile Met Leu Gly Gly Ser Leu Gln Met Ile Thr Leu Ala Trp  
 50 55 60  
 Ala Asn Ile Gly Ala Ala Val Ala Pro Asp Val Ala Leu Ala Ser Val  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Ala Ile Ile Leu Val Lys Gly Gly Lys Phe Thr Ala Glu Gly  
 85 90 95  
 Ile Gly Val Ala Ile Ala Ile Ala Ile Leu Leu Ala Val Ala Gly Leu  
 100 105 110  
 Phe Leu Thr Met Pro Val Arg Thr Ala Ser Ile Ala Phe Val His Ala  
 115 120 125  
 Ala Asp Lys Ala Ala Glu His Gly Asn Ile Ala Gly Val Glu Arg Ala  
 130 135 140  
 Tyr Tyr Leu Ala Leu Leu Leu Gln Gly Leu Arg Ile Ala Val Pro Ala  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Leu Leu Ala Ile Pro Ala Gln Ser Val Gln His Ala Leu Gly  
 165 170 175  
 Leu Met Pro Asp Trp Leu Thr His Gly Leu Val Val Gly Gly Gly Met  
 180 185 190  
 Val Val Ala Val Gly Tyr Ala Met Ile Ile Asn Met Met Ala Thr Arg  
 195 200 205  
 Glu Val Trp Pro Phe Phe Ala Ile Gly Phe Ala Leu Ala Ala Ile Ser  
 210 215 220  
 Gln Leu Thr Leu Ile Ala Leu Ser Thr Ile Gly Val Ala Ile Ala Phe  
 225 230 235 240  
 Ile Tyr Leu Asn Leu Ser Lys Gln Gly Gly Gly Asn Gly Gly Gly Asn  
 245 250 255

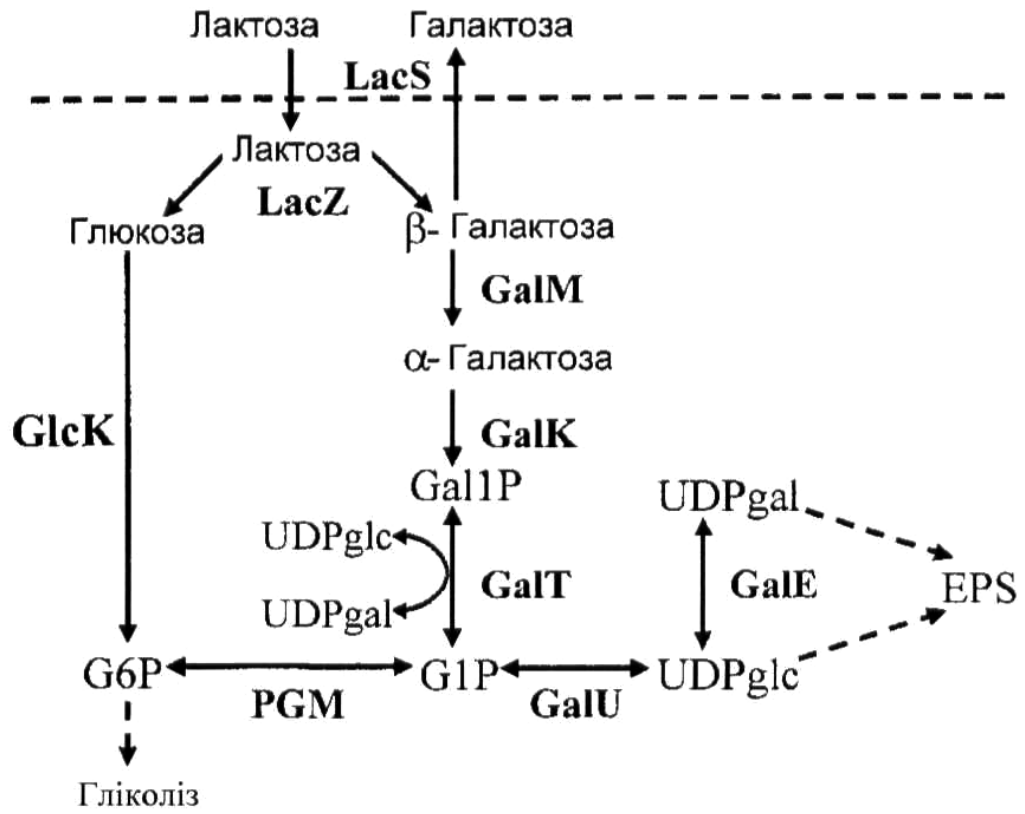
Gly Gly Gly Thr Ser Ser Gly Ser Gly Asp Pro Ile Gly Asp Ile Leu  
260 265 270

Glu Asp Tyr  
275

1

# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Галактоза-ферментуючий штам *Streptococcus thermophilus*, де штам несе мутацію в послідовності ДНК гена *glcK*, що кодує білок гліюкокінази, де мутація повністю або частково інактивує білок гліюкокінази, завдяки чому штам стає стійким до 2-дезоксиглюкози для забезпечення його здатності рости з утворенням колонії при висіванні штрихом на чашку з середовищем M17, що містить 2 % (мас./об.) лактози або 2 % (мас./об.) галактози і 20 мМ 2-дезоксиглюкози після інкубації при 40 °С протягом 20 годин.
- 10 2. Штам *Streptococcus thermophilus* за п. 1, де штам, вибраний з групи, яка включає в себе штам *Streptococcus thermophilus* CHCC 15757, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 25850, штам *Streptococcus thermophilus* CHCC 15887, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 25851, штам *Streptococcus thermophilus* CHCC 16404, депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур під номером доступу DSM 26722.
- 15 3. Композиція, яка містить від  $10^4$  до  $10^{12}$  КУО/г штаму *Streptococcus thermophilus* за п. 1 або 2.
4. Композиція за п. 3, де композиція додатково містить від  $10^4$  до  $10^{12}$  КУО/г щонайменше одного мутантного штаму *Lactobacillus delhruueckii* *supsp. hulgarius*, де зазначений штам є стійким до 2-дезоксиглюкози для забезпечення його здатності рости з утворенням колонії при висіванні штрихом на чашку з середовищем MRS-IM, що містить 2 % (мас./об.) лактози і 20 мМ 2-дезоксиглюкози після інкубації при 40 °С протягом 20 годин.
- 20 5. Спосіб отримання кисломолочного продукту, який включає в себе інокуляцію і ферментацію молочного субстрату щонайменше одним штамом *Streptococcus thermophilus* за п. 1 або 2.
- 25 6. Спосіб отримання кисломолочного продукту, який включає в себе інокуляцію і ферментацію молочного субстрату композицією за п. 3 або 4.
7. Кисломолочний продукт, який містить щонайменше один штам *Streptococcus thermophilus* за п. 1 або 2.
8. Кисломолочний продукт, який містить композицію за п. 3 або 4.
- 30 9. Застосування композиції за п. 3 або 4 для отримання кисломолочного продукту.
10. Застосування композиції за п. 3 або 4 для збільшення солодкості кисломолочного продукту.
11. Застосування композиції за п. 3 або 4 для зменшення вмісту лактози в кисломолочному продукті.
12. Кисломолочний продукт за будь-яким з пп. 7-8, що дозволяє уникнути симптомів непереносимості лактози.
- 35 13. Застосування штаму *Streptococcus thermophilus* за п. 1 або 2 для покращення росту штаму *Bifidobacterium* в молоці, яке містить лактозу.
14. Застосування композиції за п. 3 або 4 для покращення росту штаму *Bifidobacterium* в молоці, що містить лактозу.
- 40 15. Спосіб скринінгу і виділення штаму *Streptococcus thermophilus* мутантним геном *glcK*, де спосіб включає в себе наступні стадії:
  - а) отримання галактоза-ферментуючого вихідного штаму *Streptococcus thermophilus*;
  - б) відбір і виділення з пулу мутантних штамів *Streptococcus thermophilus*, отриманих з вихідного штаму, пулу мутантних штамів *Streptococcus thermophilus*, стійких до 2-дезоксиглюкози для забезпечення їхньої здатності рости з утворенням колонії при висіванні штрихом на чашку з середовищем M17, що містить 2 % (мас./об.) лактози або 2 % (мас./об.) галактози і 20 мМ 2-дезоксиглюкози після інкубації при 40 °С протягом 20 годин; і
  - с) відбір і виділення з пулу мутантних штамів *Streptococcus thermophilus*, стійких до 2-дезоксиглюкози, мутантного штаму *Streptococcus thermophilus*, якщо швидкість росту мутантного штаму *Streptococcus thermophilus* в середовища M17 + 2 % галактози вища, ніж в середовищі M17 + 2% глюкози.
- 50



Фіг. 1

```

MetSerLysLys LeuLeuGly IleAspLeu GlyGlyThrThr ValLysPhe GlyIleLeu ThrAlaAspGly GluValGln GluLysTrp AlaIleGluThr
1 ATGAGTAAAG AACTCTTAGG TATTGACCTT GGTGGAACAA CTGTAAAGCT TGGTAATTTG ACTGCAGATG GTGAAGTTCA AGAAAAATGG GCTATTGAAA

TAsnThrPhe GluAsnGly SerHisIleVal ProAspIle ValGluSer LeuLysHisArg LeuGluLeu TyrGlyLeu ThrAlaGluAsp PheIleGly
101 CAAATACGTT TGAAAATGGT AGCCACATTG TTCTGACAT TGTAGAATCT TTGAAACACC GTTGGGAATT GTATGGACTT ACTGCTGAAG ATTTTATTGG

Pro
IleGlyMet GlySerProGly AlaValAsp ArgGluAsn LysThrValThr GlyAlaPhe AsnLeuAsn TrpAlaGluThr GlnGluVal GlySerVal
201 AATTGGTATG GGATCTCCAG GTGCAGTTGA CCGAGANAAT AAAACAGTAA CCGGTGCTT TAACTTGAAC TGGGCAGAAA CTCAGAAGT TGGCTCTGTT
CHCC15887
C
IleGluLysGlu LeuGlyIle ProPheAla IleAspAsnAsp AlaAsnVal AlaAlaIleu GlyGluArgTrp ValGlyAla GlyAlaAsn AsnArgAsnVal
301 ATTCAAAAAG AACTTCGTAT TCCATTCGCT ATTCATAATG ATGCTAATGT GGCTGCACTG GGTGAACGTT GGGTGGTGC TGGTGTAAAC AATCGGAATG

Ile
VValPheIle ThrLeuGly ThrGlyValGly GlyGlyVal IleAlaAsp GlyAsnIleIle HisGlyVal AlaGlyAla GlyGlyGluIle GlyHisIle
401 TTGTCTTTAT AACATTGGGT ACAGGTGTTG GTGGCGTGT TATCCTCAT GGTAACTTAA TTCATGGTGT TGCCCGTGCT GGTGGGAAA TTGTCACAT
CHCC15757
T
IleValGlu ProAspThrGly PheGluCys ThrCysGly AsnLysGlyCys LeuGluThr ValAlaSer AlaThrGlyIle ValArgVal AlaHisHis
501 TATTCTTGAA CCTGACACAG GATTGAGTG TACTTGCGA AACAAAGGCT GTCTGGAAAC TGTAGCTTCA GCAACAGGTA TTGTACGTGT AGCACATCAT

LeuAlaGluLys TyrGluGly AsnSerSer IleLysAlaAla ValAspAsn GlyGluPhe ValThrSerLys AspIleIle ValAlaAla ThrGluGlyAsp
601 TGGCAGAAA AATACGAAGG AACTCTTCT ATTAAGCTG CTGCACACAA TGGTCACTT GTGAC/AGTA AAGATATTAT CGTAGCTGCT ACTGAAGTGT

ALysPheAla AspSerIle ValAspLysVal SerLysTyr LeuGlyLeu AlaThrAlaAsn IleSerAsn IleLeuAsn ProAspSerVal ValIleGly
701 ATAAGTTTGC TGACAGCATT GTTGATAAAG TCCTAAATA CCGCGGACTT GCAACAGCAA ACATCTCAAA CATCTTAAAC CCAGATCTGT TCGTATCGG

GlyGlyVal SerAlaAlaGly GluPheLeu ArgSerArg ValGluGlyTyr PheThrArg TyrAlaPhe ProIleValArg ArgThrThr LysValLys
801 TGGTGGTGT TCTGCCGAG GAGAATCTT GCTAGTCTG GTTGAACGAT ACTTACAG TTATGCATTC CCACAAGTTC GCGTACAAC AAAAGTGAAA

LeuAlaGluLeu GlyAsnAsp AlaGlyIle IleGlyAlaAla SerLeuAla TyrSerIle AspLys* (SEQ ID NO. 2)
901 TTAGCGGAGC TCGAAATGA TGCAGGAAC ATTGGAGCTG CTAGICTTSC TTATAGTATT GACAAATAA (SEQ ID NO. 1)

```

Fig. 2

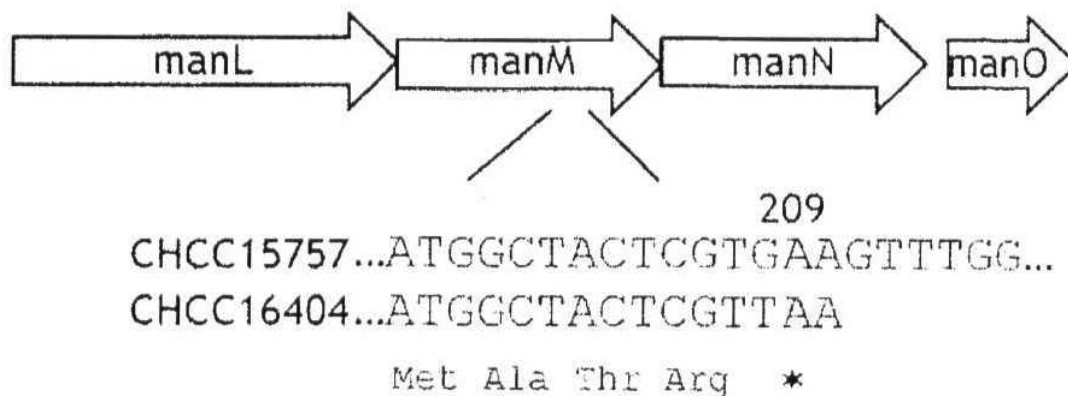


Fig. 3

```

      M S D M S I I S A I L V V A V A F L A G
-----
1  ATGTCAGATA TGTC AATTAT TTCTGCGATT TTGGTCGTAG CTGTTGCCTT CCTTGCTGGT
   L E S I L D Q F Q F H Q P L V A C T L I
-----
61  CTTGAAAGTA TCCTTGACCA ATTCCAATTC CACCAACCAC TTGTTGCATG TACCCTCATC
   G A A T G N L T A G I M L G G S L Q M I
-----
121 GGTGCTGCCA CAGGTAACCT CACTGCAGGT ATCATGCTTG GTGTTTCTCT TCAAATGATT
   T L A W A N I G A A V A P D V A L A S V
-----
181 ACCCTTGCTT GGGCAAACAT CGGTGCTGCC GTAGCTCCTG ACGTTGCCCT TGCATCTGTT
   A A A I I L V K G G K F T A E G I G V A
-----
241 GCCGCTGCCA TCATTTTGGT TAAAGGTGGT AAATTTACAG CTGAAGGTAT CGGTGTTGGC
   I A I A I L L A V A G L F L T M P V R T
-----
301 ATTGCAATAG CTATCTGCT TGCAGTTGCA GGTCTCTTCC TAACTATGCC TGTTCGTACA
   A S I A F V H A A D K A A E H G N I A G
-----
361 GCATCTATTG CCTTTGTTCA TGCTGCAGAT AAAGCTGCAG AACACGGAAA CATCGCTGGT
   V E R A Y Y L A L L L Q G L R I A V P A
-----
421 GTTGAACGTG CATACTACCT CGCTCTCCTT CITCAAGGTT TGGCTATTGC TGTGCCAGCA
   A L L L A I P A Q S V Q H A L G L M P D
-----
481 GCCCTTCTTC TTGCCATCCC GGCCCAATCT GTTCAACATG CCCTTGGCTT GATGCCTGAC
   W L T H G L V V G G G M V V A V G Y A M
-----
541 TGGCTCACCC ATGGTTTGGT TGTCGGTGGT GGIATGGTCG TAGCCGTTGG TTACGCCATG
   I I N M M A T R E V W P F F A I G F A L
-----
601 ATTATCAATA TGATGGCTAC TCGTGAAGTT TGGCCATTCT TCGCCATTGG TTTTGCTTTG
CHCC16404 T
      A A I S O L T L I A L S T I G V A I A F
-----
661 GCAGCAATTA GCCAATTGAC ACTTATCGCT CTTAGTACCA TTGGTGTTC CATCGCCTTC
   I Y L N L S K Q G G G N G G G N G G G T
-----
721 ATCTACCTCA ACCTTTCTAA ACAAGGTGGC GGAAATGGTG GCGGAAATGG TGGCGGAAC
   S S G S G D P I G D I L E D Y (SEQ ID NO.6)
-----
781 TCATCTGGTT CAGGCGACCC AATCGGCGAT ATCTTGAAG ACTAC (SEQ ID NO.5)

```

Фіг. 4

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

---