(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115397247 A
(43)申请公布日 2022.11.25

(21)申请号 202180027811.9
(22)申请日 2021.04.12
(30)优先权数据
2020-071708 2020.04.13 JP
2020-071709 2020.04.13 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/015188 2021.04.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/210539 JA 2021.10.21
(71)申请人 合同酒精株式会社
地址 日本千叶县
(72)发明人 小笠原准季 滨口和广
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 赵青
(51)Int.Cl.
A23C 9/127(2006.01)
A23C 9/13(2006.01)
C12N 15/55(2006.01)
C12N 9/16(2006.01)

权利要求书1页 说明书18页
序列表3页 附图13页

(54)发明名称

发酵乳及其制造方法、以及脱磷酸乳

(57)摘要

本发明提供品质稳定的发酵乳及其制造方法、以及脱磷酸乳。一种发酵乳，含有0.8g/100g以上的脱磷酸化酪蛋白。

CN 115397247 A

1.一种发酵乳，含有0.8g/100g以上的脱磷酸化酪蛋白。

2.根据权利要求1所述的发酵乳，其中，脱磷酸化酪蛋白的含量为0.8～1.5g/100g。

3.根据权利要求1或2所述的发酵乳，其中，游离磷酸的含量为15mM以上。

4.根据权利要求1～3中任一项所述的发酵乳，其中，发酵乳为酸奶。

5.一种脱磷酸乳，含有脱磷酸化酪蛋白。

6.根据权利要求5所述的脱磷酸乳，其中，脱磷酸化酪蛋白的含量为0.8g/100g以上。

7.一种发酵乳的制造方法，包括以下的任一工序：

(a)在蛋白磷酸酶的存在下使原料乳发酵的工序，

(b)使利用蛋白磷酸酶进行酶处理而成的原料乳发酵的工序。

8.根据权利要求7所述的发酵乳的制造方法，其中，蛋白磷酸酶为属于木霉属的微生物来源的蛋白磷酸酶。

9.根据权利要求8所述的发酵乳的制造方法，其中，属于木霉属的微生物为绿木霉。

10.根据权利要求7～9中任一项所述的发酵乳的制造方法，其中，蛋白磷酸酶为下述(i)～(iii)中的任一者，

(i)由序列号2表示的氨基酸序列构成的蛋白质，

(ii)由在序列号2表示的氨基酸序列中缺失、替换或附加了1～几个氨基酸的氨基酸序列构成且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质，

(iii)由与序列号2表示的氨基酸序列具有80％以上的序列同一性的氨基酸序列构成且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质。

11.根据权利要求7～10中任一项所述的发酵乳的制造方法，其中，发酵乳为酸奶。

12.一种发酵乳用酶剂，含有蛋白磷酸酶。

13.根据权利要求12所述的发酵乳用酶剂，其中，蛋白磷酸酶为属于木霉属的微生物来源的蛋白磷酸酶。

14.根据权利要求13所述的发酵乳用酶剂，其中，属于木霉属的微生物为绿木霉。

15.根据权利要求12～14中任一项所述的发酵乳用酶剂，其中，蛋白磷酸酶为下述(i)～(iii)中的任一者，

(i)由序列号2表示的氨基酸序列构成的蛋白质，

(ii)由在序列号2表示的氨基酸序列中缺失、替换或附加了1～几个氨基酸的氨基酸序列构成且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质，

(iii)由与序列号2表示的氨基酸序列具有80％以上的序列同一性的氨基酸序列构成且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质。

16.一种具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质，为下述(i)～(iii)中的任一者，

(i)由序列号2表示的氨基酸序列构成的蛋白质，

(ii)由在序列号2表示的氨基酸序列中缺失、替换或附加了1～几个氨基酸的氨基酸序列构成且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质，

(iii)由与序列号2表示的氨基酸序列具有80％以上的序列同一性的氨基酸序列构成且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质。

发酵乳及其制造方法、以及脱磷酸乳

技术领域

[0001] 本发明涉及发酵乳及其制造方法、以及脱磷酸乳。

背景技术

[0002] 发酵乳通过利用乳酸菌等微生物使原料乳发酵来制造。近年来，发酵时乳酸菌在菌体外产生的菌体外多糖(EPS)的生理功能受到关注。

[0003] 已知乳的主要蛋白质为酪蛋白，当因发酵而使pH降低时，酪蛋白胶束聚集而形成凝胶。酪蛋白主要分类为α_{S1}、α_{S2}、β、κ这4种，分别具有键合于8个、11个、5个、1个丝氨酸残基的磷酸。该酪蛋白中的磷酸修饰参与酪蛋白胶束表面、疏水核心的疏水性。

[0004] 发酵乳的组织(物性)经时变化，其中，保存过程中的脱水(乳清的分离)是降低商品价值的重要因素之一。因此，迄今为止，以防止脱水等为目的而利用果胶等稳定剂、乳蛋白质浓缩物等功能性乳原料。另外，还对酶的利用也进行了研究，例如，已经报道了利用转谷氨酰胺酶等具有凝乳活性的酶、葡萄糖氧化酶等的方法(例如，专利文献1)。

[0005] 然而，并不知道利用了作用于酪蛋白的磷酸丝氨酸的酶而得到的乳和发酵乳的制造。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:国际公开第2015/041194号

发明内容

[0009] 本发明的课题在于提供品质稳定的发酵乳及其制造方法、以及脱磷酸乳。

[0010] 本发明人着眼于酪蛋白的磷酸丝氨酸，进行了深入研究，结果发现:从酪蛋白的丝氨酸残基上脱去磷酸后的脱磷酸化酪蛋白与发酵乳的物性相关，包含规定量的该脱磷酸化酪蛋白的发酵乳的脱水得到抑制，出现粘度和破坏应力的上升，另外，菌体外多糖(EPS)的产生量增加。另外，发现通过在蛋白磷酸酶的存在下使原料乳发酵，或者使利用了蛋白磷酸酶进行酶处理而成的原料乳发酵，从而看到发酵乳的脱水的抑制、粘度和破坏应力的上升的效果，另外，发现菌体外多糖(EPS)的产生增加，从而完成了本发明。

[0011] 即，本发明提供以下的〔1〕～〔6〕。

[0012] 〔1〕一种发酵乳，含有0.8g/100g以上的脱磷酸化酪蛋白。

[0013] 〔2〕根据〔1〕所述的发酵乳，其中，脱磷酸化酪蛋白的含量为0.8～1.5g/100g。

[0014] 〔3〕根据〔1〕或〔2〕所述的发酵乳，其中，游离的磷酸的含量为15mM以上。

[0015] 〔4〕根据〔1〕～〔3〕中任一项所述的发酵乳，其中，发酵乳为酸奶。

[0016] 〔5〕一种脱磷酸乳，含有脱磷酸化酪蛋白。

[0017] 〔6〕根据〔5〕所述的脱磷酸乳，其中，脱磷酸化酪蛋白的含量为0.8g/100g以上。

[0018] 另外，本发明提供以下的〔7〕～〔13〕。

[0019] 〔7〕一种发酵乳的制造方法，包括以下的任一工序：

[0020] (a)在蛋白磷酸酶的存在下使原料乳发酵的工序，

[0021] (b)使利用蛋白磷酸酶进行酶处理而成的原料乳发酵的工序。

[0022] 〔8〕根据〔7〕所述的发酵乳的制造方法，其中，蛋白磷酸酶为属于木霉属的微生物来源的蛋白磷酸酶。

[0023] 〔9〕根据〔8〕所述的发酵乳的制造方法，其中，属于木霉属的微生物为绿木霉。

[0024] 〔10〕根据〔7〕～〔9〕中任一项所述的发酵乳的制造方法，其中，蛋白磷酸酶为下述(i)～(iii)中的任一者。

[0025] (i)由序列号2表示的氨基酸序列构成的蛋白质，

[0026] (ii)由在序列号2表示的氨基酸序列中缺失、替换或附加1～几个氨基酸的氨基酸序列构成且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质，

[0027] (iii)由与序列号2表示的氨基酸序列具有80％以上的序列同一性的氨基酸序列构成且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质。

[0028] 〔11〕根据〔7〕～〔10〕中任一项所述的发酵乳的制造方法，其中，发酵乳为酸奶。

[0029] 〔12〕一种发酵乳用酶剂，含有蛋白磷酸酶。

[0030] 〔13〕一种具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质，为下述(i)～(iii)中的任一者。

[0031] (i)由序列号2表示的氨基酸序列构成的蛋白质，

[0032] (ii)由在序列号2表示的氨基酸序列中缺失、替换或附加1～几个氨基酸的氨基酸序列构成且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质，

[0033] (iii)由与序列号2表示的氨基酸序列具有80％以上的序列同一性的氨基酸序列构成且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质。

[0034] 本发明的发酵乳的脱水少、粘性高、具有稳固的组织。另外，含有许多菌体外多糖(EPS)，生理功能优异。

[0035] 另外，根据本发明的发酵乳的制造方法，能够提供一种脱水少、粘性高、具有稳固的组织且含有许多菌体外多糖(EPS)的发酵乳。

[0036] 另外，本发明的脱磷酸乳通过使酪蛋白分子的疏水性上升来改变口感。在使用了脱磷酸乳的乳制品中也同样得到该效果。

附图说明

[0037] 图1是示意地示出牛奶的电泳图的图。

[0038] 图2是示出测定磷酸化酪蛋白和脱磷酸化酪蛋白的方法的图。

[0039] 图3是示出绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的a.温度依赖性、b.温度稳定性、c.pH依赖性、d.pH稳定性的图。

[0040] 图4是示出绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的金属离子需求性的图。

[0041] 图5是示出实施例1的发酵乳中的游离磷酸浓度的图。

[0042] 图6是示出实施例2的脱磷酸乳中的游离磷酸浓度的图。

[0043] 图7是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的脱水率(％)、游离磷酸浓度(mM)和pH的图。

[0044] 图8是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的脱水率(％)、游离磷酸浓度(mM)和pH的图。

[0045] 图9是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的菌体外多糖(EPS)量(μg/g－发酵乳)的图。

[0046] 图10是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的粘度(cp)的图。

[0047] 图11是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的破坏强度解析结果的图。

[0048] 图12是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的脱水率(%)、游离磷酸浓度(mM)和pH的图。

[0049] 图13是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的菌体外多糖(EPS)量(μg/g－发酵乳)的图。

[0050] 图14是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的粘度(cp)的图。

[0051] 图15是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的破坏强度解析结果的图。

[0052] 图16是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的脱水率(%)、游离磷酸浓度(mM)和pH的图。

[0053] 图17是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的菌体外多糖(EPS)量(μg/g－发酵乳)的图。

[0054] 图18是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的粘度(cp)的图。

[0055] 图19是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的破坏强度解析结果的图。

[0056] 图20是示出使绿木霉Gv29－8来源蛋白磷酸酶处理原料乳发酵的发酵乳的脱水率(%)、游离磷酸浓度(mM)和pH的图。

[0057] 图21是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的pH的推移的图。

[0058] 图22是示出添加有绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶的发酵乳的脱水率(%)、游离磷酸浓度(mM)和pH的图。

[0059] 图23是示出通过绿木霉Gv29－8来源蛋白磷酸酶处理所致的原料乳中的游离磷酸浓度和钙离子浓度的推移的图。

具体实施方式

[0060] 本说明书中，发酵乳是指乳等省令(有关乳及乳制品的成分标准等的省令，昭和26年厚生省令第52号)中定义的发酵乳和乳酸菌饮料。发酵乳被定义为“利用乳酸菌或酵母使乳或包含与其同等以上的脱脂乳固体成分的乳等进行发酵、制成糊状或液体的产品或将它们冷冻而成的产品”，乳酸菌饮料被定义为“将利用乳酸菌或酵母使乳等进行发酵所得的物质进行加工或者作为主要原料而得的饮料(不包括发酵乳)”。

[0061] 作为分类为上述“制成糊状的产品”的发酵乳，可举出硬酸奶、软酸奶，作为分类为上述“制成液体的产品”的发酵乳，可举出饮用酸奶(直饮酸奶)，作为分类为上述“冷冻而成的产品”的发酵乳，可举出冷冻酸奶。从容易享受本发明的效果的方面考虑，本发明的发酵乳优选硬酸奶、软酸奶。

[0062] 本发明的发酵乳含有0.8g/100g以上的脱磷酸化酪蛋白。脱磷酸化酪蛋白是乳中的酪蛋白的丝氨酸磷酸脱去而生成的。

[0063] 发酵乳中的脱磷酸化酪蛋白的含量，从发酵乳的脱水抑制效果、粘度和破坏应力的上升效果和EPS产生量的增大效果的观点考虑，优选为0.9g/100g以上，更优选为1.0g/100g以上，另外，优选为1.5g/100g以下，更优选为1.4g/100g以下，进一步优选为1.3g/100g以下。

[0064] 本发明的发酵乳中，作为酪蛋白中的脱磷酸化酪蛋白的比例，优选为25～45％，更优选为26～43％。

[0065] 本说明书中，酪蛋白的分析可以通过将已知浓度的各酪蛋白(α酪蛋白、β酪蛋白和κ酪蛋白)和试样供于聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS－PAGE)，进行考马斯亮蓝染色(CBB染色)后，使用图像解析软件将条带的强度数值化而制成标准曲线，算出试样中的酪蛋白量。

[0066] 另外，本说明书中，脱磷酸化酪蛋白的分析按照以下记载的方法而进行。

[0067] 脱磷酸化酪蛋白可以利用电泳方法进行定量。该方法根据电泳结果而算出磷酸化酪蛋白和脱磷酸化酪蛋白量。使用图1进行说明。应予说明，电泳方法如后述的实施例所记载。

[0068] 图1示意地示出牛奶的电泳图。磷酸化的酪蛋白具有α酪蛋白1、β酪蛋白2和κ酪蛋白3这3个区域，可以通过将它们累计而算出磷酸化酪蛋白量。虽然也存在除此以外的磷酸化酪蛋白，但由于为微量，因此可以忽略。应予说明，牛乳中的αs－1酪蛋白、αs－2酪蛋白、β酪蛋白和κ酪蛋白的总和在总酪蛋白量中约占97％。

[0069] 脱磷酸化酪蛋白与各酪蛋白的条带邻接而存在。脱磷酸化酪蛋白由于脱磷酸的程度各种各样，因此在电泳后处于弥散状态。磷酸化酪蛋白条带和脱磷酸化酪蛋白区域由于浓度不同，因此可以通过目视来确认。可以通过将各脱磷酸化酪蛋白区域11、21、31进行累计而算出脱磷酸化酪蛋白量。脱磷酸化酪蛋白区域31的末端可以通过目视确认染色区域与非染色区域的边界而作为末端。

[0070] 使用牛来源的乳时，按照磷酸化酪蛋白量变多的顺序依次为α酪蛋白、β酪蛋白和κ酪蛋白。对来源不同的乳也可以按照与上述同样的方法来测定脱磷酸化酪蛋白的程度。可以以占总酪蛋白量的90％以上的方式选择一种以上的特定酪蛋白进行测定。

[0071] 图1中示出了良好的条带形状，实际上即便使各种条件一致，大多情况下条带形状也会扭曲。利用图2对此时的磷酸化酪蛋白和脱磷酸化酪蛋白的测定方法进行说明。

[0072] 图2的条带前端100(电泳开始侧)与条带前端的基端110之间存在非条带区域时，可以在非条带区域的面积目视为50％处设定累计开始线A，从此处起计算条带区域的面积。在设定累计开始线A时，可以参考将电泳图绘制成曲线图所得的图。

[0073] 图2的条带前端200(电泳结束侧)与条带前端的基端210之间存在非条带区域时，可以在非条带区域的面积目视为50％处设定累计结束线B，计算到此为止的条带区域的面积。在设定累计结束线B时，可以参考将电泳图绘制成曲线图所得的图。

[0074] 利用上述方法设定累计开始线和累计结束线，对存在于它们之间的条带区域的浓度进行定量即可。

[0075] 可以利用与上述同样的方法对脱磷酸区域的浓度进行定量。

[0076] 本发明的发酵乳优选进一步含有游离磷酸。

[0077] 从发酵乳的脱水抑制效果、粘度和破坏应力的上升效果、以及EPS产生量的增大效果的观点考虑，发酵乳中的游离磷酸的含量优选为15mM以上，更优选为15mM～40mM的范围

内。

[0078] 为了使发酵乳含有脱磷酸化酪蛋白，例如，可以在蛋白磷酸酶的存在下使作为发酵乳的原料的原料乳发酵。另外，可以在原料乳的发酵前对原料乳进行蛋白磷酸酶处理，使该处理后的脱磷酸乳发酵。

[0079] 即，本发明的发酵乳的制造方法具有以下的任一工序：

[0080] (a)在蛋白磷酸酶的存在下使原料乳发酵的工序，

[0081] (b)使利用蛋白磷酸酶进行酶处理而成的原料乳发酵的工序。

[0082] 原料乳只要含有酪蛋白即可，可使用一般的乳来源的原料。例如，可举出生乳、牛乳、特别牛乳、生山羊乳、杀菌山羊乳、生绵羊乳、成分调整牛乳、低脂肪牛乳、无脂肪牛乳、加工乳、奶油、黄油、起酥油、奶酪、浓缩乳清、冰奶油类、浓缩乳、脱脂浓缩乳、无糖炼乳、无糖脱脂炼乳、加糖炼乳、加糖脱脂炼乳、全脂奶粉、脱脂奶粉、奶油粉、乳清粉末、蛋白质浓缩乳清粉末、酪乳粉等。

[0083] 原料乳中包含的酪蛋白的量没有特别限定，优选为0.01～10g/100g，更优选为0.1～8g/100g，进一步优选为1～5g/100g。

[0084] 原料乳的pH优选为pH4.0～8.0，更优选为pH4.7～7.5，进一步优选为pH5.3～6.8。添加了下述除原料乳以外的其它成分的原料乳的pH也同样。

[0085] 原料乳中可以根据需要在不损害本发明的效果的范围含有可在发酵之前配合的其它成分、可在发酵之后配合的其它成分。作为该其它成分，例如，可举出甜味剂(单糖、低聚糖、糖醇、合成甜味剂等)、稳定剂(明胶、果胶、角叉菜胶、黄原胶等)、果汁、果肉、香料等。

[0086] 蛋白磷酸酶是将磷酸化蛋白质脱磷酸化的酶，本说明书中只要能够使原料乳中的酪蛋白的丝氨酸磷酸脱去即可。蛋白磷酸酶优选在发酵中将原料乳的酪蛋白的丝氨酸磷酸脱去。

[0087] 蛋白磷酸酶的最佳(最适)pH优选在4.0～7.5的范围，更优选为4.5～7.0，进一步优选为5.0～6.0。

[0088] 蛋白磷酸酶优选在发酵乳的制造中缓慢失活，并在发酵乳中失活。具体而言，优选即便在pH5.0～6.0的弱酸性下也发挥作用，在pH小于4.5时失活。在原料乳的发酵过程中，缓慢地从酪蛋白中脱去磷酸。认为游离磷酸在乳中增加，乳酸菌代谢游离磷酸的过程中容易生成EPS。通过在发酵结束后使蛋白磷酸酶失活，能够易于稳定地保持发酵乳的品质，因而优选。

[0089] 蛋白磷酸酶的最佳温度优选在1℃～60℃的范围，更优选在10℃～55℃的范围。

[0090] 本发明中使用的蛋白磷酸酶优选具有上述的最佳pH和最佳温度。蛋白磷酸酶的种类和起源不限，优选为属于木霉属(Trichoderma)、曲霉属(Aspergillus)、酵母属(Sccharomyces)、芽孢杆菌属(Bacillus)、链霉菌属(Streptomyces)的微生物来源的蛋白磷酸酶，更优选为绿木霉(Trichoderma virens)来源的蛋白磷酸酶，进一步优选为绿木霉Gv29－8来源的假想蛋白质(XP__013951069.1hypothetical protein TRIVIDRAFT__87714)。该假想蛋白质(XP__013951069.1hypothetical protein TRIVIDRAFT__87714)由本发明人阐明蛋白磷酸酶活性，具有下述性质。

[0091] (a)最佳温度:50℃

[0092] (b)温度稳定性:在43℃、2小时条件下为80％以上的残留活性

[0093] (c)最佳pH:pH5.42

[0094] (d)pH稳定性:在pH4.7～6.8、6小时条件下为80％以上的残留活性

[0095] (e)金属离子需求性:由2.5～5.0mM的Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+}等2价金属阳离子活化

[0096] 编码绿木霉Gv29－8来源的蛋白磷酸酶(XP__013951069.1hypothetical protein TRIVIDRAFT__87714)的DNA的碱基序列示于序列表的序列号1,氨基酸序列示于序列表的序列号2。

[0097] 蛋白磷酸酶除了野生型以外,也可以为使编码该蛋白磷酸酶的基因在大肠杆菌等宿主表达的、利用各种基因操作使该基因改变并表达的且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质。

[0098] 蛋白磷酸酶优选为下述(i)～(iii)中的任一蛋白质。

[0099] (i)由序列号2表示的氨基酸序列构成的蛋白质

[0100] (ii)由在序列号2表示的氨基酸序列中缺失、替换或附加1～几个氨基酸的氨基酸序列构成且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质

[0101] (iii)由与序列号2表示的氨基酸序列具有80％以上的序列同一性的氨基酸序列构成且具有蛋白磷酸酶活性的蛋白质

[0102] 在序列号2表示的氨基酸序列中缺失、替换或附加了1～几个氨基酸的氨基酸序列中的、氨基酸的缺失、替换或附加的数量只要表现出与由序列号2表示的氨基酸序列构成的蛋白磷酸酶同等的酶活性,就没有限定,优选为1～20个,进一步优选为1～10个,进一步优选为1～8个。

[0103] 另外,与序列号2表示的氨基酸序列的序列同一性为80％以上,优选为85％以上,更优选为90％以上,进一步优选为95％以上,更进一步优选为99％以上。这样的序列的同一性百分比可以使用具备以基准序列为查询序列(照会配列)进行比较的算法的公开或市售的软件而进行计算。作为例子,可以使用BLAST、FASTA或GENETYX(GENETYX公司制)等。

[0104] 本发明中使用的蛋白磷酸酶由于使发酵乳的品质稳定化,而且增强其生理功能,因此作为发酵乳用的酶剂是有用的。

[0105] 工序(a)中,蛋白磷酸酶只要在原料乳的发酵时存在即可,添加它的时机没有特别限制。

[0106] 工序(a)中的蛋白磷酸酶的使用量只要是能够脱去原料乳中的酪蛋白的丝氨酸磷酸的浓度即可。例如,相对于原料乳1mL,优选为0.1～25U,更优选为0.5～15U,进一步优选为1～10U。这里,本说明书中,1U是指在每1mL的包含10mM的Tris－HCl的pH6.0的20mM MES－NaOH缓冲液溶解有20mg的牛奶酪蛋白的底物液中添加1/10量的酶液,在37℃下进行反应,添加等量的反应停止液,在该条件下每1分钟游离1μmol磷酸的酶量。

[0107] 工序(a)中的发酵方法依据一般的方法。例如,将原料乳和其它原材料混合、溶解,将由此制备的发酵混合物均质化、加热杀菌、冷却后添加微生物(发酵剂,starter)和蛋白磷酸酶,进行发酵。冷却后可以根据需要进行粉碎、均质化。

[0108] 发酵温度只要是微生物(发酵剂,starter)生长的温度且酶不失活的温度即可,可以根据其种类而适当地设定,优选为20℃～45℃,更优选为30℃～37℃。

[0109] 发酵时间例如为1～48小时,优选为2～24小时,更优选为3～10小时,进一步优选为3～6小时,特别优选为3～5小时。

[0110] 发酵乳的pH优选为4.0～5.0。

[0111] 工序(b)中供于发酵的用蛋白磷酸酶进行酶处理而成的原料乳(脱磷酸乳)只要利用蛋白磷酸酶将原料乳中的酪蛋白脱磷酸化即可。预先将原料乳用蛋白磷酸酶进行酶处理时,可以将更多的酪蛋白脱磷酸化,另外,容易控制酪蛋白的脱磷酸化程度。

[0112] 工序(b)中的蛋白磷酸酶的使用量只要是能够脱去原料乳中的酪蛋白的丝氨酸磷酸的浓度即可。例如,相对于原料乳1质量份,优选为0.1～25U,更优选为0.5～15U,进一步优选为1～10U。

[0113] 原料乳的酶处理优选以1℃～60℃的反应温度进行0.1小时～24小时反应。反应温度优选为10℃～60℃,更优选为30℃～55℃,进一步优选为40℃～50℃。反应时间优选为0.3小时～12小时,更优选为0.5小时～5小时,特别优选为1小时～4小时。

[0114] 将原料乳用蛋白磷酸酶进行酶处理之前,可以调节原料乳的pH。

[0115] 酶处理后可以在不使酶失活的情况下使原料乳发酵,或者可以进行通过加热等而使酶失活的处理后使其发酵。优选在不失活的情况下使原料乳发酵。在发酵时也缓慢地进行酪蛋白的脱磷酸化。

[0116] 使酶失活的处理中的加热的条件优选为高温短时间的加热,例如,优选以60～100℃加热1分钟～30分钟。也可以在原料乳的杀菌工序前进行酶处理后,在原料乳的杀菌工序中使酶失活。

[0117] 工序(b)中的发酵方法与工序(a)同样依据一般的方法,例如,将包含利用蛋白磷酸酶进行酶处理而成的原料乳以及其它原材料的发酵混合物均质化、加热杀菌、冷却后,添加微生物(发酵剂),使其发酵。另外,冷却后也可以根据需要进行粉碎、均质化。

[0118] 发酵温度可以与工序(a)同样地适当设定,优选为20℃～45℃,更优选为30℃～37℃。

[0119] 发酵时间例如为1～48小时,优选为2～24小时,更优选为3～10小时,进一步优选为3～6小时,特别优选为3～5小时。

[0120] 发酵乳的pH优选为4.0～5.0。

[0121] 本发明中,从容易形成均匀的凝乳、另外在处理性和成本方面上优异的观点考虑,优选通过工序(a)来制造发酵乳。

[0122] 通过对原料乳进行蛋白磷酸酶处理,从而将原料乳中的酪蛋白脱磷酸化,得到含有脱磷酸化酪蛋白的脱磷酸乳。通过利用酪蛋白的脱磷酸化使酪蛋白分子的疏水性上升,从而使乳的口感变化。利用该口感的变化,本发明的脱磷酸乳能够与原料乳同样地除了发酵乳以外还用于各种乳制品。

[0123] 从使口感良好的观点、得到品质稳定的发酵乳的观点考虑,本发明的脱磷酸乳中的脱磷酸化酪蛋白的含量优选为0.8g/100g以上,更优选为0.9g/100g以上,进一步优选为1.0g/100g以上,另外,优选为1.5g/100g以下,更优选为1.4g/100g以下。

[0124] 本发明的脱磷酸乳中,作为酪蛋白中的脱磷酸化酪蛋白的比例,优选为45%～65%,更优选为48～63%。

[0125] 另外,脱磷酸乳优选进一步含有游离磷酸,从使口感良好的观点、得到品质稳定的发酵乳的观点考虑,脱磷酸乳中的游离磷酸的含量优选在1mM～100mM的范围内,更优选在5mM～50mM的范围内,进一步优选在10mM～40mM的范围内,更进一步优选在12mM～30mM的范围内。

[0126] 在原料乳的发酵、以及用蛋白磷酸酶进行酶处理而成的原料乳(脱磷酸乳)的发酵中使用一般的乳酸菌、酵母等发酵剂。

[0127] 作为乳酸菌,例如,可举出乳杆菌属细菌(干酪乳杆菌(Lactobacillus casei)、嗜酸乳杆菌(Lactobacillus acidophilus)等)、乳球菌属细菌(乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)等)、明串球菌属细菌(肠膜明串珠菌(Leuconostoc mesenteroides)等)、肠球菌属细菌(粪肠球菌(Enterococcus faecalis)等)、双歧杆菌属细菌(两岐双歧杆菌(Bifidobacterium bifidum)、短双歧杆菌(Bifidobacterium breve)等)。

[0128] 作为酵母,例如,可举出酵母属(Saccharomyces cerevisiae等)的酵母。

[0129] 发酵剂中包含的乳酸菌或酵母的菌数(活菌)例如为10^5～10^{13}cfu/mL、优选为10^6～10^{12}cfu/mL、更优选为10^7～10^{11}cfu/mL、进一步优选为10^8～10^{10}cfu/mL。

[0130] 发酵剂的使用量没有特别限定,可以根据其种类而适当地设定,例如,为原料乳和/或脱磷酸乳的0.01～10质量%,优选为0.1～10质量%,更优选为0.5～10质量%。

[0131] 本发明的发酵乳可以根据需要在不损害本发明的效果的范围含有可在发酵之前配合的其它成分、可在发酵之后配合的其它成分。作为该其它成分,例如,可举出甜味剂(单糖、低聚糖、糖醇、合成甜味剂等)、稳定剂(明胶、果胶、角叉菜胶、黄原胶等)、果汁、果肉、香料等。

[0132] 如后述的实施例所示,本发明的发酵乳的脱水少、粘性高而具有稳固的硬度。

[0133] 对于发酵乳的粘度,优选利用后述的测定方法将发酵乳进行30秒处理时的粘度为3000Pa·s以上。上限值没有特别限定,例如为10000Pa·s。

[0134] 另外,发酵乳的硬度以后述的实施例中记载的破坏强度解析的值计,破坏负荷优选为0.41N以上,更优选为0.45N以上,进一步优选为0.5N以上。上限值没有特别限定,例如为1.0N。

[0135] 另外,本发明的发酵乳包含大量菌体外多糖(EPS)。发酵乳中的EPS量可以每1g发酵乳为40μg以上、60μg以上、80μg以上、110μg以上、180μg以上。上限值没有特别限定,例如为300μg。

[0136] 实施例

[0137] 以下,举出实施例对本发明进行更详细的说明,但本发明不受任何限定。

[0138] 制造例1绿木霉Gv29－8来源蛋白磷酸酶(以下,记为“PPase”)的纯化

[0139] 将绿木霉(Trichoderma virens)NBRC6355株接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(荣研),在25℃下进行3天需氧培养。将在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上生长的生产菌的菌落与琼脂培养基一起切出成约5mm见方,将菌落移植到由5.0％蔗糖、2.0％TUBERMINE FV(Roquette Japan)、0.3％氯化钙、0.1％硫酸镁、0.001％磷酸氢二钾构成的生产培养基(pH4.0)中,以27℃、220r/min的条件进行4天旋转振荡培养。

[0140] 将约700mL的培养液通过使用ADVANTEC No.2滤纸(ADVANTEC)和3.0％KC－Flock(日本制纸)的抽滤进行固液分离,将得到的滤液利用UF(AHP,旭化成)浓缩至约1/10量后。接着,将PEG4000(Nacalai Tesque)以终浓度为15％的方式添加于浓缩液,溶解后,在4℃下静置过夜。然后,以8000r/min、4℃的条件进行20分钟离心分离(HIMAC CENTRIFUGE CR20B2,HITACHI),废弃上清。将得到的沉淀用约10mL的20mM乙酸-乙酸钾缓冲液(pH4.8)溶解,将该溶液在50℃下保温1小时后,以14800r/min、4℃的条件进行10分钟离心分离

(LEGEND MICRO 21R,Thermo Fisher Scientific),回收其上清作为纯化蛋白质。

[0141] 对纯化后的蛋白质进行鉴定,结果,根据氨基酸序列信息可知为绿木霉Gv29－8来源的假想蛋白质(XP__013951069.1hypothetical protein TRIVIDRAFT__87714)。该蛋白质功能未知。

[0142] 对纯化蛋白质,确认蛋白磷酸酶(PPase)活性。

[0143] 1)PPase活性测定

[0144] 将0.2g的牛奶酪蛋白(CALBIOCHEM制,Casein,Bovine Milk,Carbohydrate and Fatty Acid Free)量取到容量20mL的烧杯中,添加2.0mL的0.1M Tris－HCl缓冲液(pH9.0)和少量的蒸馏水,使用磁力搅拌器进行溶解。接着,添加2.0mL的0.2M MES－NaOH缓冲液(pH6.0)和约10mL的蒸馏水,使用1.0当量的盐酸而调节为pH6.0后,定容至20mL。将其作为底物液。分取底物液450μL注入到容量1.5mL的离心管中,加入酶样品50μL,精确反应20分钟。反应后,添加500μL的每1L含有18.0g三氯乙酸、18.0g无水乙酸钠、19.8g乙酸的反应停止液,进行剧烈搅拌,以15000r/min、4℃的条件进行5分钟离心分离。将其上清的适当稀释液200μL添加到800μL的蒸馏水中,接着添加2M硫酸和40g/L钼酸铵水溶液30μL,充分进行搅拌。向其中添加0.1M抗坏血酸钠水溶液50μL,再次搅拌后,以40℃保温20分钟。其后,使用分光光度计(UV－1240,岛津制作所制)测定880nm处的吸光度,通过使用磷酸二氢钾所预先制作的标准曲线而算出磷酸浓度(μM)。活性值由下述公式进行计算。

[0145] 活性值(U/mL)＝磷酸浓度(μM)×反应液量(L)/反应时间(分钟)/酶量(mL)×稀释率

[0146] a温度依赖性:对室温(23.5℃)、37℃、43℃、50℃、60℃的各温度下的PPase活性进行测定。

[0147] b温度稳定性:在4℃、25℃、37℃、43℃、50℃、60℃的各温度下将PPase样品保温2小时,以15000r/min、4℃的条件进行离心分离,测定其上清的残留活性。

[0148] c pH依赖性:将酪蛋白浓度为3倍的底物液用0.2M乙酸－乙酸钾缓冲液(pH3.6、4.2、4、7、5.2、5.6)、MES－NaOH缓冲液(pH5.3、6.0、6.8)、Tris－HCl缓冲液(pH7.0、7.5、8.0、9.0)的各缓冲液进行3倍稀释,在4℃下静置6小时后,测定各样品的残留活性。应予说明,测定将底物用各缓冲液稀释后的pH,将其值作为反应时的pH。

[0149] d pH稳定性:用0.2M乙酸－乙酸钾缓冲液(pH3.6、4.2、4、7、5.6、6.0)、MES－NaOH缓冲液(pH5.3、6.0、6.8)、Tris－HCl缓冲液(pH7.5、8.0、9.0)的各缓冲液进行10倍稀释,在4℃下静置6小时后,测定各样品的残留活性。

[0150] e金属离子需求性:将钠、钾、锂、钙、钴、锰的氯化物盐和EDTA二钠盐水溶液以在反应液内为2.5mM、5mM、10mM的方式进行添加,测定此时的PPase活性。

[0151] 将PPase的温度依赖性示于图3中的a,将温度稳定性示于图3中的b,将pH依赖性示于图3中的c,将pH稳定性示于图3中的d,将金属离子需求性示于图4。根据图3中的a～d可知:对于PPase而言,最佳温度为50℃,最佳pH为pH5.42,以43℃/2小时和pH4.7～6.8/6小时保持了80％以上的残留活性。

[0152] 另外,根据图4可知:PPase由2.5～5.0mM的Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+}等2价金属阳离子活化。

[0153] 实施例1

[0154] (1)发酵乳的制备

[0155] 在美味牛奶(明治制)中添加2%的脱脂奶粉(森永乳业制),充分振荡混合使其溶解,在沸水中一边搅拌20分钟一边进行杀菌。将杀菌后的原料乳以43℃保温约30分钟后,添加发酵剂L812(Chr.Hansen公司制)和表1中示出的PPase或20mM乙酸－乙酸钾缓冲液(pH5.2)以使酶活性的终浓度为0～10U/mL－milk,在43℃下发酵4.5小时,得到发酵乳。

[0156] 应予说明,PPase使用用20mM乙酸－乙酸钾缓冲液(pH5.2)适当稀释后的溶液。实施例1的发酵乳中的酪蛋白量为3.3g/100g。

[0157] [表1]

[0158]

试验区	原料乳(mL)	PPase(mL)	乙酸缓冲液(mL)	发酵剂(mL)	PPase终浓度(U/ml-milk)
1	12	0	0.364	10	0
2	12	0.364	0	10	1
3	12	0.364	0	10	2
4	12	0.364	0	10	3
5	12	0.364	0	10	5
6	12	0.364	0	10	10

[0159] (2)脱磷酸化酪蛋白的测定

[0160] 将发酵乳用蒸馏水进行50倍稀释,与×2样品缓冲液进行等体积混合,在沸水中加热5分钟,制成测定样品。对SuperSepTM Phos－tag(12.5%,富士胶片和光纯药)上样测定样品10μL,以25mM的恒定电流进行电泳。将电泳后的凝胶进行染色和脱色后,使用图像处理软件(Image J)将电泳图绘制曲线图。接着,设定根据有无磷酸修饰而变动的区域,算出各区域面积后,算出各酶量下的脱磷酸化酪蛋白的比例和脱磷酸化酪蛋白量(绝对量)。

[0161] (3)游离磷酸浓度(mM)的测定

[0162] 将上述(1)中制备的发酵乳剧烈振荡混合而使凝乳均匀化。分取将凝乳均匀化的发酵乳1mL注入到容量1.5mL的离心管中,以15000r/min、4℃的条件进行10分钟离心分离。将其上清的适当稀释液200μL添加到800μL的蒸馏水中,接着添加2M硫酸和40g/L钼酸铵水溶液30μL,充分进行搅拌。向其中添加0.1M抗坏血酸钠水溶液50μL,再次搅拌后,以40℃保温20分钟。然后,使用分光光度计(UV－1240,岛津制作所制)测定880nm处的吸光度,通过使用磷酸二氢钾所预先制作的标准曲线而算出磷酸浓度(mM)。

[0163] (4)结果

[0164] 将脱磷酸化酪蛋白的测定结果示于表2。将游离磷酸浓度的测定结果示于图5。

[0165] [表2]

[0166]

	PPase终浓度 (U/mL-milk)	α		β		κ		总酪蛋白	
		比例(%)	绝对值(g/100g)	比例(%)	绝对值(g/100g)	比例(%)	绝对值(g/100g)	比例(%)	绝对值(g/100g)
发酵乳	0	25.1	0.4	13.6	0.1	25.8	0.1	21.5	0.7
	1	28.8	0.5	24.8	0.3	18.2	0.1	26.3	0.9
	2	28.6	0.5	27.6	0.3	21.7	0.1	27.5	0.9
	3	35.8	0.6	46.0	0.5	32.0	0.1	39.8	1.3
	5	38.9	0.7	46.2	0.5	26.0	0.1	40.2	1.3
	10	40.3	0.7	45.1	0.5	29.6	0.1	40.9	1.3

[0167] 实施例2

[0168] (1)脱磷酸乳的制备

[0169] 在使用1N HCl调节为pH5.9的美味牛奶(明治制)中添加表3中示出的量的300U/mL

的PPase，在43℃下静置4小时而得到脱磷酸乳。实施例2的脱磷酸乳中的酪蛋白量为2.5g/100g。

[0170] [表3]

[0171]

试验区	原料乳（mL）	PPase（μL）	水（μL）	PPase终浓度(U/ml-milk)
1	0.5	0	50	0
2	0.5	5	45	3
3	0.5	8.3	41.7	5

[0172] (2)脱磷酸化酪蛋白的测定

[0173] 使用使PPase发挥作用后的脱磷酸乳，除此以外，利用与实施例1同样的方法来测定脱磷酸化酪蛋白。

[0174] (3)游离磷酸浓度(mM)的测定

[0175] 使用使PPase发挥作用后的脱磷酸乳，除此以外，利用与实施例1同样的方法来测定游离磷酸浓度。

[0176] (4)结果

[0177] 将脱磷酸化酪蛋白的测定结果示于表4。将游离磷酸浓度的测定结果示于图6。

[0178] [表4]

[0179]

	PPase终浓度 (U/mL-milk)	α		β		κ		总酪蛋白	
		比例(%)	绝对值(g/100g)	比例(%)	绝对值(g/100g)	比例(%)	绝对值(g/100g)	比例(%)	绝对值(g/100g)
脱磷酸乳	0	31.4	0.4	32.5	0.3	6.9	0.0	28.4	0.7
	3	50.8	0.6	54.2	0.4	15.6	0.0	48.2	1.1
	5	55.1	0.7	81.5	0.6	40.6	0.1	61.7	1.4

[0180] 实施例3

[0181] (1)发酵乳的制备

[0182] 向容量500mL的中号瓶中量取低温杀菌牛乳(高梨乳业制)392g和脱脂奶粉(森永乳业制)8g,充分振荡混合使其溶解,在沸水中一边搅拌20分钟一边进行杀菌。将杀菌后的原料乳以43℃保温约30分钟后,添加发酵剂L812(Chr.Hansen公司制,以下相同)至0.01g/

mL,温和地颠倒混合10次左右。其后,将添加了发酵剂的原料乳每管10mL分取注入到预先添加了表5的样品的容量15mL的螺旋盖管中,扭上盖温和地颠倒混合2～3次后,在43℃下发酵5小时。发酵后,在4℃冷却过夜而得到发酵乳。用pH计(F72－S,HORIBA)测定发酵乳的pH。

[0183] [表5]

[0184] 发酵乳中添加的各样品

[0185]

样品	添加量(mL)	样品终浓度
空白 (20 mM 乙酸-乙酸钾缓冲液 (pH 5.2))	0.48	—
纯化PPase (11 U/mL)	0.48	0.53 U/mL-milk
磷酸(1.47 M)	0.0068+Buf.0.4732	1 mM
	0.034+Buf.0.446	5 mM
	0.068+Buf.0.412	10 mM

[0186] (2)脱水率的测定

[0187] 将上述(1)中制备的发酵乳样品剧烈振荡混合而使凝乳均匀化,将约5mL注入到容量15mL的带有刻度的螺旋盖管中后,以3000r/min(KOKUSAN制,H－19F MR)、8℃的条件进行10分钟离心分离。然后,读取样品总量和固体成分的体积,由下式算出脱水率。

[0188] 脱水率(%)＝100－((固体成分体积/样品体积)×100)

[0189] (3)游离磷酸浓度(mM)的测定

[0190] 将使凝乳均匀化后的发酵乳样品1mL注入到容量1.5mL的离心管中,以15000r/min(TOMY制,微量高速冷却离心机MRX－150)、4℃的条件进行10分钟离心分离。将其上清的适当稀释液200μL添加于800μL的蒸馏水中,接着添加2M硫酸和40g/L钼酸铵水溶液30μL,充分进行搅拌。向其中添加0.1M抗坏血酸钠水溶液50μL,再次搅拌后,以40℃保温20分钟。其后,使用分光光度计(UV－1240,岛津制作所制)测定880nm处的吸光度,通过使用磷酸二氢钾所预先制作的标准曲线而算出磷酸浓度(mM)。

[0191] (4)结果

[0192] 将结果示于图7。根据图7可知:加入PPase的发酵乳与无添加(空白)相比脱水率较低。另一方面,含有作为PPase的反应产物的磷酸、但不含有脱磷酸化酪蛋白的发酵乳脱水没有得到抑制。

[0193] 另外,根据图7可知:通过在发酵时添加PPase而与无添加(空白)相比看到脱水抑制的效果。另一方面,即便添加作为PPase的反应产物的磷酸,也并未抑制脱水。

[0194] 实施例4

[0195] (1)发酵乳的制备

[0196] 向容量500mL的中号瓶中量取低温杀菌牛乳(高梨乳业制)392g和脱脂奶粉(森永乳业制)8g,充分振荡混合使其溶解,在沸水中进行20分钟加热杀菌后,在43℃下保温约30分钟。向其中添加40mg的发酵剂L812,温和地颠倒混合10次。然后,向预先分取注入1.46mL的适当稀释后的纯化PPase(1.0U/mL－milk或3.0U/mL－milk)或20mM乙酸－乙酸钾缓冲液(pH5.2)的果酱瓶中各量取放入原料乳60g,颠倒混合5次后,在43℃下发酵4.5小时。发酵

后，在4℃下冷却过夜而得到发酵乳。将发酵乳的pH利用pH计(Thermo Fisher制，ORION 3STAR)进行测定。

[0197] (2)脱水率的测定

[0198] 利用与实施例3同样的方法进行测定。

[0199] (3)游离磷酸浓度(mM)的测定

[0200] 利用与实施例3同样的方法进行测定。

[0201] (4)EPS测定

[0202] 称量发酵乳样品0.4g，添加100％(w/v)TCA溶液200μL进行颠倒混合，以15000r/min(TOMY制，微量高速冷却离心机MRX－150，以下相同)、4℃的条件进行10分钟离心分离。将其上清全部回收到新的离心管中，添加丙酮500μL，在4℃下静置过夜。其后，以15000r/min、4℃的条件进行10分钟离心分离，废弃上清后，将沉淀的颗粒用400μL的MilliQ水溶解，接着添加丙酮400μL进行颠倒混合，在4℃下静置过夜。其后，以15000r/min、4℃的条件进行10分钟离心分离，废弃上清后，将沉淀物溶解于300μL的MilliQ水中。将其溶解液以15000r/min、4℃的条件进行10分钟离心分离，回收上清。使用其中的100μL利用HPLC(Waters)来测定单糖和二糖量。进一步使用剩余的200μL利用苯酚硫酸法测定总糖量。从总糖量中减去单糖和二糖而算出三糖以上的菌体外多糖量。

[0203] (5)粘度测定

[0204] 将发酵乳样品剧烈振荡混合而均匀化，向粘度计(DV－I Prime，BROOK FIERD)用一次性样品室(铝制)中分取注入13.5g。主轴使用SC4－29，以10r/min进行测定，每30秒读取一次粘度，进行记录。应予说明，全部操作在10℃环境下进行。

[0205] (6)破坏强度解析

[0206] 装置使用GREEP METER RE2－33005C(山电制)，柱塞使用No.3。

[0207] 测定在测力传感器(load cell)0.01、放大倍率(amplifier magnification)0.1、存储间隔(storage pitch)0.07秒、测定应变率60％、测定速度1mm/秒、样品厚度自动测定的模式下进行。

[0208] (7)结果

[0209] 将脱水率、游离磷酸浓度和发酵后pH的测定结果示于图8，将EPS浓度示于图9，将粘度的测定结果示于图10，将破坏强度解析结果示于图11。

[0210] 含有脱磷酸化酪蛋白的发酵乳与无添加(空白)相比，脱水率低(图8)，菌体外多糖(EPS)量多(图9)。该发酵乳的粘度比无添加高出1000cP以上(图10)。另外，该发酵乳的破坏应力与无添加相比较高，破坏后的应力的降低(＝易碎性)减少(图11)。

[0211] 实施例5

[0212] (1)发酵乳的制备

[0213] 向5个容量250mL的中号瓶中量取低温杀菌牛乳(高梨乳业制)147g和脱脂奶粉(森永乳业制)3g，充分振荡混合使其溶解。然后，在沸水中进行20分钟加热杀菌后，在43℃下保温约30分钟。向其中添加表6中示出的各种发酵剂(全部为Chr.hansen公司制)，温和地颠倒混合10次。其后，向预先分取注入了0.488mL的123U/mL的纯化PPase(Final 1.0U/mL－milk)或20mM乙酸－乙酸钾缓冲液(pH5.2)的果酱瓶中各量取放入60g原料乳，颠倒混合5次后，在43℃下发酵4.5小时。发酵后，在4℃下冷却过夜而得到发酵乳。

[0214] [表6]

[0215] 发酵剂的名称和添加量

[0216]

发酵剂	添加量
L811	15mg
L812	15mg
Harmony	30mg

[0217] (2)脱磷酸化酪蛋白的测定、(3)脱水率的测定、(4)游离磷酸浓度(mM)的测定、(5)EPS测定、(6)粘度测定、(7)破坏强度解析

[0218] 利用与上述实施例4同样的方法进行测定。

[0219] (8)结果

[0220] 将脱水率、游离磷酸浓度和发酵后pH的测定结果示于图12,将EPS浓度示于图13,将粘度的测定结果示于图14,将破坏强度解析结果示于图15。

[0221] 含有脱磷酸化酪蛋白的发酵乳与无添加(空白)相比,脱水率低(图12),菌体外多糖(EPS)量多(图13)。该发酵乳的粘度比无添加高1000～2000cP(图14)。另外,该发酵乳的破坏应力高于无添加(图15)。

[0222] 另外,通过添加PPase,从而与无添加(空白)相比在所有发酵剂中出现脱水抑制、游离磷酸量增加、pH的降低(图12)。菌体外多糖(EPS)量在所有发酵剂中与无添加相比增加(图13)。发酵乳的粘度测定的结果:粘度上升1000～2000cP(图14)。另外,实施发酵乳的破坏强度解析的结果,在所有发酵剂中看到了破坏应力的上升(图15)。

[0223] 实施例6(1)发酵乳的制备

[0224] 向容量500mL的中号瓶中量取低温杀菌牛乳(高梨乳业制)392g和脱脂奶粉(森永乳业制)8g,充分振荡混合使其溶解,在沸水中进行20分钟加热杀菌后,在43℃下保温约30分钟。向其中添加40mg发酵剂L812,温和地颠倒混合10次。其后,向预先分取注入了1.46mL的适当稀释后的纯化PPase或20mM乙酸-乙酸钾缓冲液(pH5.2)的果酱瓶中各量取放入60g原料乳,颠倒混合5次后,在43℃下发酵4.5小时。发酵后,在4℃下冷却过夜而得到发酵乳。将发酵乳的pH利用pH计(Thermo Fisher制,ORION 3STAR)进行测定。

[0225] (2)脱水率的测定、(3)游离磷酸浓度(mM)的测定、(4)EPS测定

[0226] 利用与上述实施例4同样的方法进行测定。

[0227] (5)粘度测定

[0228] 将发酵乳样品剧烈振荡混合而均匀化,向粘度计(DV－I Prime,BROOK FIERD)用一次性样品室(铝制)中分取注入13.5g。主轴使用SC4－29,以10r/min进行测定,每30秒读取一次粘度,进行记录。应予说明,所有操作在10℃环境下进行。

[0229] (6)破坏强度解析

[0230] 装置使用GREEP METER RE2－33005C(山电制),柱塞使用No.3。测定在测力传感器0.01、放大倍率0.1、存储间隔0.07秒、测定应变率60％、测定速度1mm/秒、样品厚度自动测定的模式下进行。

[0231] (7)结果

[0232] 将脱水率、游离磷酸浓度和发酵后pH的测定结果示于图16,将EPS浓度示于图17,将粘度的测定结果示于图18,将破坏强度解析结果示于图19。在发酵乳中以0.1～3.0U/

mL－milk的范围添加PPase后，与无添加(空白)相比，看到脱水抑制、游离磷酸量增加、pH的降低(图16)。菌体外多糖(EPS)量在1.0和3.0U/mL－milk的PPase添加中与无添加相比增加(图17)。测定添加有PPase的发酵乳的粘度，结果，在添加0.1～0.5U/mL－milk的PPase时，与无添加相比上升1000cP左右，在添加1.0和3.0U/mL－milk的PPase时，进一步上升(图18)。另外，实施添加了PPase的发酵乳的破坏强度解析，结果，虽然没有看到浓度依赖性，但与无添加相比破坏应力增加。另外，在添加0.5U/mL－milk以上的PPase时，破坏后的应力的降低(＝易碎性)减少(图19)。

[0233] 实施例7(原料乳的酶处理)

[0234] (1)发酵乳的制备

[0235] 向容量500mL的中号瓶中量取超高温瞬间杀菌牛乳(明治制美味牛奶)或低温杀菌牛乳(高梨乳业制)392g和脱脂奶粉(森永乳业制)8g，充分振荡混合使其溶解。向其中添加2mL的纯化PPase(700U/mL，Final23.3U/mL－milk)或20mM乙酸－乙酸钾缓冲液(pH5.2)，颠倒混合5次。接着，向果酱瓶中各量取放入60g，颠倒混合5次后，在37℃下静置3小时，得到酶处理乳。将各果酱瓶在沸水中煮沸20分钟而使PPase失活。接着，冷却至室温后，向各果酱瓶中添加20mg发酵剂L812，温和地颠倒混合10次，在43℃下进行4.5小时发酵。发酵后，在4℃下冷却过夜而得到发酵乳。将发酵乳的pH利用pH计(Thermo Fisher制，ORION 3STAR)进行测定。

[0236] (2)脱水率的测定、(3)游离磷酸浓度(mM)的测定

[0237] 利用与上述实施例4同样的方法进行测定。

[0238] (4)结果

[0239] 将脱水率、游离磷酸浓度和发酵后pH的测定结果示于图20。通过PPase处理原料乳的发酵，从而与无添加(空白)相比看到脱水抑制、游离磷酸量增加、pH的降低(图20)。其结果暗示了乳中包含的酪蛋白只要被脱磷酸化即可，在发酵中或发酵乳中无需PPase以活性状态存在。

[0240] 实施例8

[0241] (1)发酵乳的制备

[0242] 向容量500mL的中号瓶中量取超高温瞬间杀菌牛乳(明治制美味牛奶)392g和脱脂奶粉(森永乳业制)8g，充分振荡混合使其溶解，在沸水中一边搅拌20分钟一边进行杀菌。将杀菌后的原料乳以43℃保温约30分钟后，添加0.571mL的纯化PPase(350U/mL，Final 1U/mL－milk)或20mM乙酸－乙酸钾缓冲液(pH4.5)和发酵剂L812 20mg，温和地颠倒混合10次左右。向8个容量15mL的螺旋盖管中各量取注入10g，扭上盖温和地颠倒混合2～3次后，在43℃下进行5小时发酵。发酵后，在4℃下冷却过夜而得到发酵乳。将发酵前、从发酵开始起2.5小时、3小时、3.5小时、4小时、4.5小时的pH利用pH计(Thermo Fisher制，ORION 3STAR)进行测定。

[0243] (2)结果

[0244] 将结果示于图21。确认了相对于加入了乙酸－乙酸钾缓冲液的无添加(空白)，添加了PPase的发酵乳的pH降低变快。推测因PPase而使磷酸增多。另外，还确认了添加了PPase的发酵乳的凝乳变快。

[0245] 实施例9(调整发酵时间以使发酵后的pH符合约4.5)

[0246] (1)发酵乳的制备

[0247] 向果酱瓶中分取注入60g来代替容量15mL的螺旋盖管，为了符合发酵后的pH而使添加了缓冲液的体系的发酵时间为4.75小时、添加了PPase的体系的发酵时间为3.5小时，除此以外，与实施例8同样地制备发酵乳。将发酵乳的pH利用pH计(Thermo Fisher制，ORION 3STAR)进行测定。

[0248] (2)脱水率的测定、(3)游离磷酸浓度(mM)的测定

[0249] 利用与上述实施例4同样的方法进行测定。

[0250] (4)结果

[0251] 将结果示于图22。尽管发酵后的pH同为约4.5，但与无添加(空白)相比，因发酵时的PPase的添加而看到了脱水抑制、游离磷酸量增加。由此暗示了脱水率的减少、游离磷酸量增加并未因发酵后的pH而受到影响，而是通过PPase的作用而得到的。

[0252] 参考例(酶处理乳中的游离磷酸浓度和钙离子浓度)

[0253] (1)酶处理乳的制备

[0254] 在超高温瞬间杀菌牛乳(明治制美味牛奶pH6.76)0.45mL或该牛乳中加入1M盐酸而调节至pH5.48所得的乳中，添加纯化PPase 0.05mL(700U/mL)，以37℃使其反应规定时间后，添加18％三氯乙酸0.5mL进行混合而使反应停止，得到酶处理乳。

[0255] (2)游离磷酸浓度的测定

[0256] 将酶处理前后的游离磷酸浓度(mM)利用与上述实施例3同样的方法进行测定。

[0257] (3)钙离子浓度的测定

[0258] 将酶处理前后的乳以无稀释的状态置于钙离子传感器(堀场制作所制LAQUA twin)上进行测定。

[0259] (4)结果

[0260] 将结果示于图23。调节为pH5.48的乳与pH6.76的乳相比PPase的反应性高，游离磷酸浓度暂时上升，但收敛于一定值。pH6.76的乳经时上升，收敛于一定值。添加了PPase的任一乳中游离磷酸浓度都收敛于一定值。由于伴随着酶反应，钙离子浓度也变化，因此暗示了在乳中生成磷酸钙，并以一定浓度达到平衡状态。

序列表

<110> 合同酒精株式会社

<120> 发酵乳

<130> GD0015

<150> JP2020-071708

<151> 2020-04-13

<150> JP2020-071709

<151> 2020-04-13

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1379

<212> DNA

<213> 绿木霉 Gv29-8

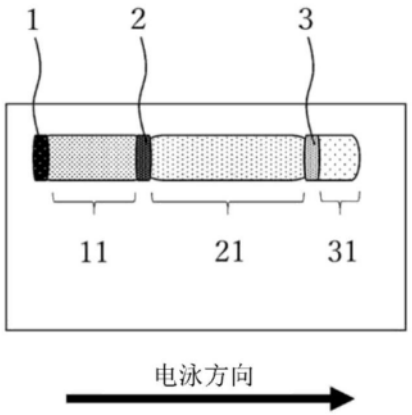
<400> 1

atgctgtcca aggttgtctc tctgctggct gccgccggcc tggcctctgc cgccgccgtt 60
gacaagagcc actgcaagcc tcccaagcct tcctccacca tcactgtctg ggagtctcag 120
tacactgcca ccggcactgc tgctgttgct gctgctgctg ccacggccaa gaccagcagc 180
ccgaccagcc acgtcaaggg caaggccttt gaccgctttg ttgtcattta ctttgagaac 240
caggactacg acaaggctga tggtgaccgt aagtttgaat ctcgaatcct ttgtctaaag 300
aaggggaccc ggaagacgct gacagtattt gctttgcagc caacttcact tggttcgcca 360
agaagggtgt caagttgacc aactacttcg gtgtcactca cccttctgag cccaactata 420
tggccggtat tattggtgac tactttggca tgcagaacga tgacttcaac tctgccgact 480
tcaacgtgtc caccgtcatc gacctgctcg aggatcgtgg catctcttgg ggccactacc 540
aggaggacca gccctacacc ggctacgagg gcttcagcta cgtcaacacc aagaccggtg 600
ccaacgacta cgtccgcaag cacaaccccg ccatcttggc caacagcgtc acccactacg 660
agcagcgcct gtcccaggtc aagaacctgt ccatgatcga caccggtcgc tccatgttcc 720
acaaggacct caaggacaac aagctgcctc agtggatgtt catcaccccc aacatgacct 780
ctgacggcca cgacaccaac gtcggcgttg ctggcaagtg gtgccgtgct ttcctcgagc 840
ccctcctgaa cgataagcac ttcatggaca acacccttgt cctcctcacc tgggatgaga 900
acgagaccta tgcccagcgc aaccagattc tcgcaatctt gctcggtgac gccgtcccca 960
agcaccttgt tggcaccacc gacaacaact tctataacca ctacagcgag atcgccaccg 1020
tcgaggccaa ctggaacctc cacactctgg gccgctggga tgttggtgcc aacgtcttcg 1080
acctggttgc caaggagact ggcgaccgcc tccgcaagtg gtcttccacc agggctgcca 1140
acagccactt ctggaacgcc tcttacgccg gtgtcttcaa cgaggagact ggcaacccca 1200
acaaccagta ccctgccccc aacctggctc tcgaccgcag cttctctggc cgtaccatcc 1260
tgcccgccat taagaagacc tgggagcaca gcaagtctgc cacctactac gccgacacca 1320
ttgagctccc cgacggcctg aaccctcccc agggatacaa gcccgtctcc accaactaa 1379

<210> 2
<211> 434
<212> PRT
<213> 绿木霉 Gv29-8
<400> 2

Met Leu Ser Lys Val Val Ser Leu Leu Ala Ala Ala Gly Leu Ala Ser
1 5 10 15
Ala Ala Ala Val Asp Lys Ser His Cys Lys Pro Pro Lys Pro Ser Ser
20 25 30
Thr Ile Thr Val Trp Glu Ser Gln Tyr Thr Ala Thr Gly Thr Ala Ala
35 40 45
Val Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Lys Thr Ser Ser Pro Thr Ser His
50 55 60
Val Lys Gly Lys Ala Phe Asp Arg Phe Val Val Ile Tyr Phe Glu Asn
65 70 75 80
Gln Asp Tyr Asp Lys Ala Asp Gly Asp Pro Asn Phe Thr Trp Phe Ala
85 90 95
Lys Lys Gly Val Lys Thr Asn Tyr Phe Gly Val Thr His Pro Ser Glu
100 105 110
Pro Asn Tyr Met Ala Gly Ile Ile Gly Asp Tyr Phe Gly Met Gln Asn
115 120 125
Asp Asp Phe Asn Ser Ala Asp Phe Asn Val Ser Thr Val Ile Asp Leu
130 135 140
Leu Glu Asp Arg Gly Ile Ser Trp Gly His Tyr Gln Glu Asp Gln Pro
145 150 155 160
Tyr Thr Gly Tyr Glu Gly Phe Ser Tyr Val Asn Thr Lys Thr Gly Ala
165 170 175
Asn Asp Tyr Val Arg Lys His Asn Pro Ala Ile Leu Ala Asn Ser Val
180 185 190
Thr His Tyr Glu Gln Arg Leu Ser Gln Val Lys Asn Leu Ser Met Ile
195 200 205
Asp Thr Gly Arg Ser Met Phe His Lys Asp Leu Lys Asp Asn Lys Leu
210 215 220
Pro Gln Trp Met Phe Ile Thr Pro Asn Met Thr Ser Asp Gly His Asp
225 230 235 240
Thr Asn Val Gly Val Ala Gly Lys Trp Cys Arg Ala Phe Leu Glu Pro
245 250 255
Leu Leu Asn Asp Lys His Phe Met Asp Asn Thr Leu Val Leu Leu Thr
260 265 270

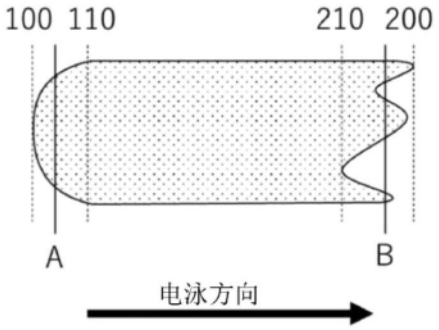
Trp Asp Glu Asn Glu Thr Tyr Ala Gln Arg Asn Gln Ile Leu Ala Ile
275 280 285
Leu Leu Gly Asp Ala Val Pro Lys His Leu Val Gly Thr Thr Asp Asn
290 295 300
Asn Phe Tyr Asn His Tyr Ser Glu Ile Ala Thr Val Glu Ala Asn Trp
305 310 315 320
Asn Leu His Thr Leu Gly Arg Trp Asp Val Gly Ala Asn Val Phe Asp
325 330 335
Leu Val Ala Lys Glu Thr Gly Asp Arg Leu Arg Lys Trp Ser Ser Thr
340 345 350
Arg Ala Ala Asn Ser His Phe Trp Asn Ala Ser Tyr Ala Gly Val Phe
355 360 365
Asn Glu Glu Thr Gly Asn Pro Asn Asn Gln Tyr Pro Ala Pro Asn Leu
370 375 380
Ala Leu Asp Arg Ser Phe Ser Gly Arg Thr Ile Leu Pro Ala Ile Lys
385 390 395 400
Lys Thr Trp Glu His Ser Lys Ser Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Thr Ile
405 410 415
Glu Leu Pro Asp Gly Leu Asn Pro Pro Gln Gly Tyr Lys Pro Val Ser
420 425 430
Thr Asn



【 符号说明 】

1 α酪蛋白
2 β酪蛋白
3 κ酪蛋白
11 α酪蛋白的脱磷酸化区域
21 β酪蛋白的脱磷酸化区域
31 κ酪蛋白的脱磷酸化区域

图1



【 符号说明 】

100 条带前端（电泳开始侧）
110 条带前端的基端
200 条带前端（电泳结束侧）
210 条带前端的基端
A 累计开始线
B 累计结束线

图2

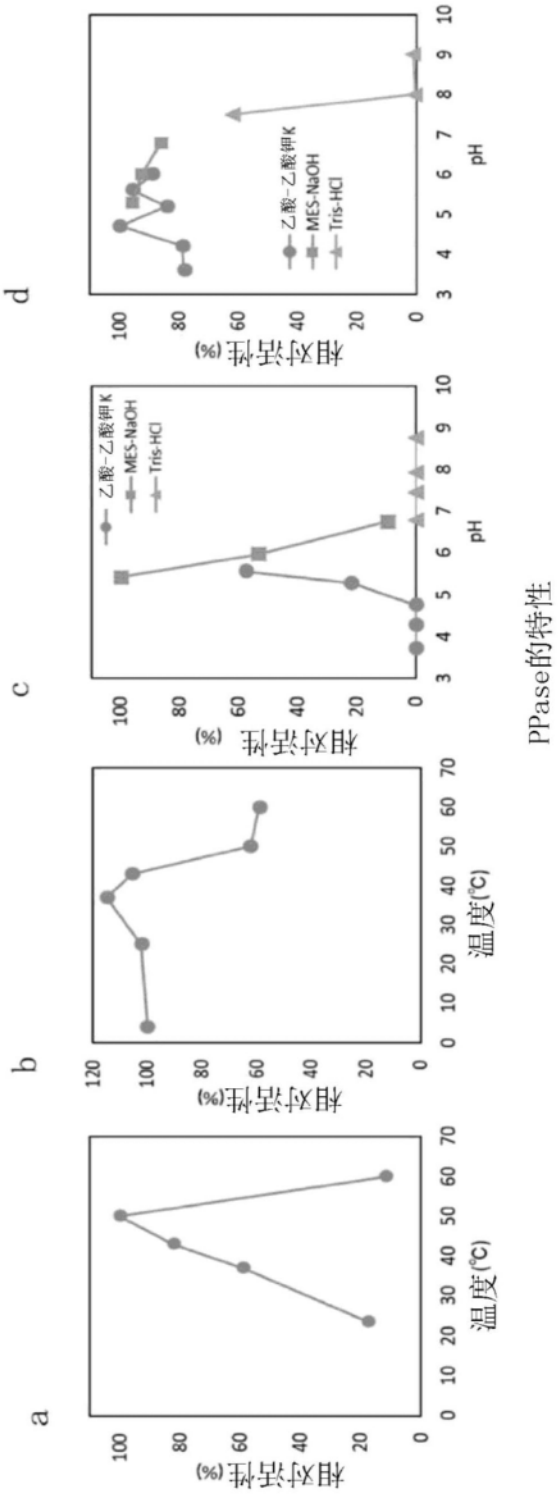


图3

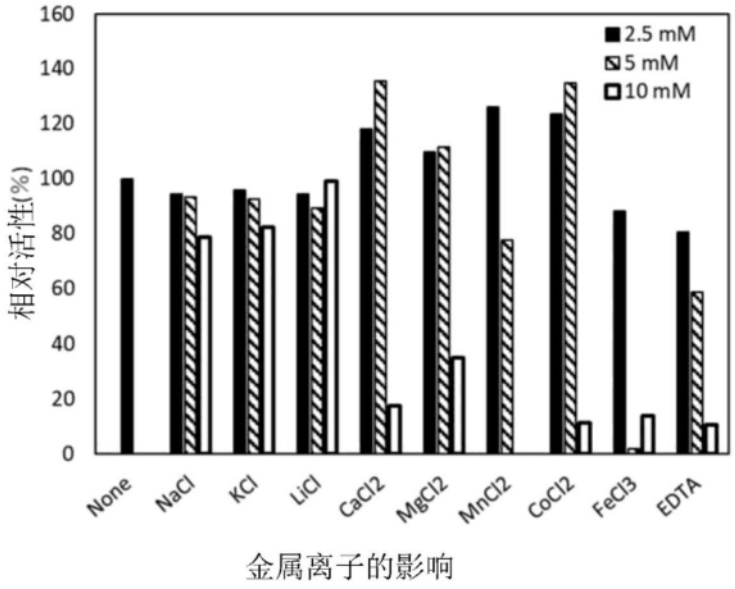

160
140
120
100
80
60
40
20
0
相对活性(%)
2.5 mM
5 mM
10 mM
None
NaCl
KCl
LiCl
CaCl2
MgCl2
MnCl2
CoCl2
FeCl3
EDTA
金属离子的影响

图4

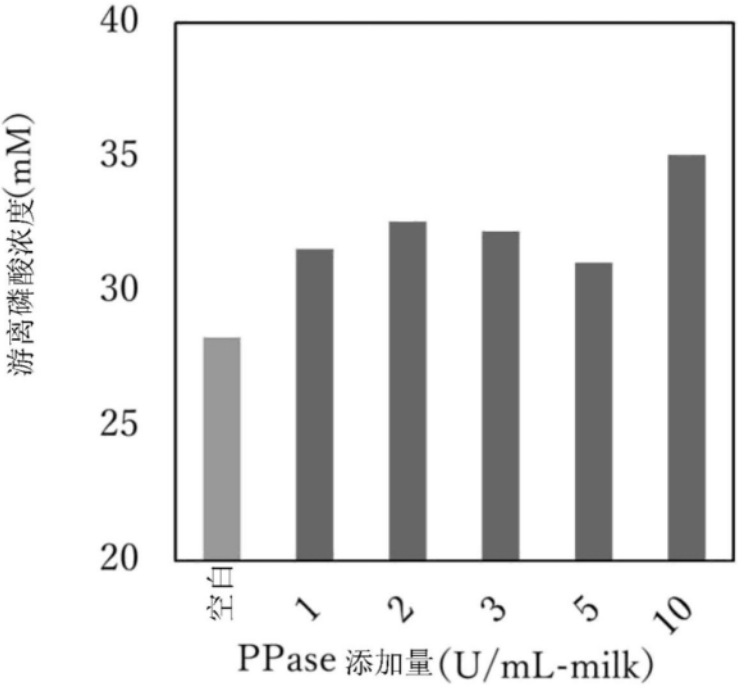

40
35
30
25
20
游离磷酸浓度(mM)
空白
1
2
3
5
10
PPase 添加量(U/mL-milk)

图5

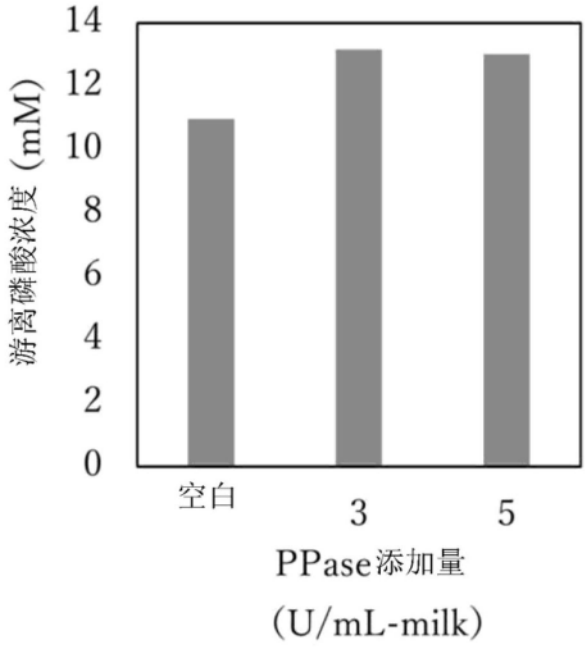

游离磷酸浓度（mM）
14
12
10
8
6
4
2
0
空白
3
5
PPase添加量
(U/mL-milk)

图6

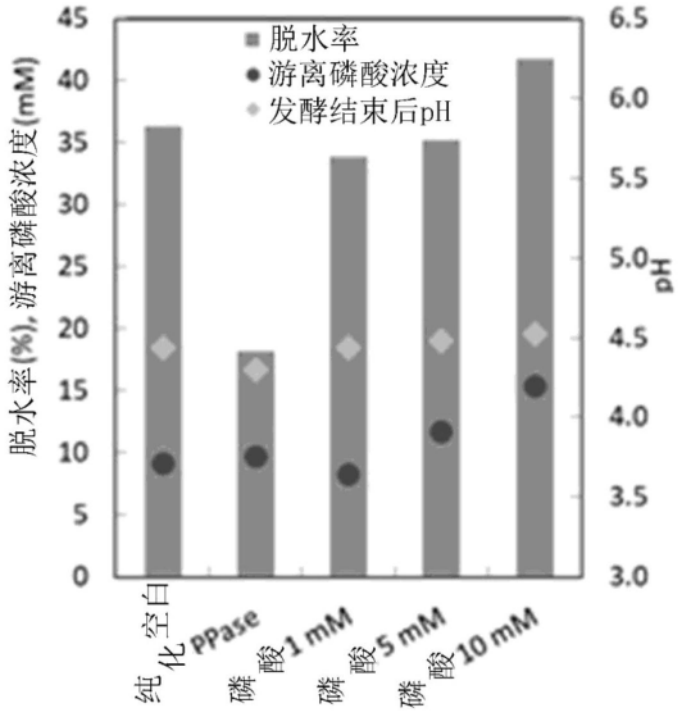

脱水率(%), 游离磷酸浓度(mM)
pH
脱水率
游离磷酸浓度
发酵结束后pH
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
纯化空白
PPase磷酸1 mM
PPase磷酸5 mM
PPase磷酸10 mM

图7

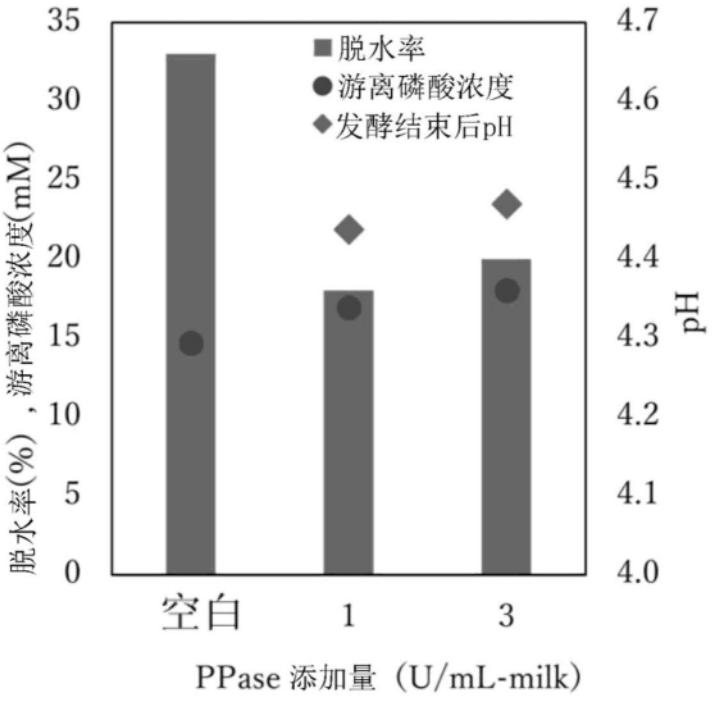

脱水率
游离磷酸浓度
发酵结束后pH
脱水率(%)，游离磷酸浓度(mM)
pH
35
30
25
20
15
10
5
0
4.7
4.6
4.5
4.4
4.3
4.2
4.1
4.0
空白
1
3
PPase 添加量（U/mL-milk）

图8

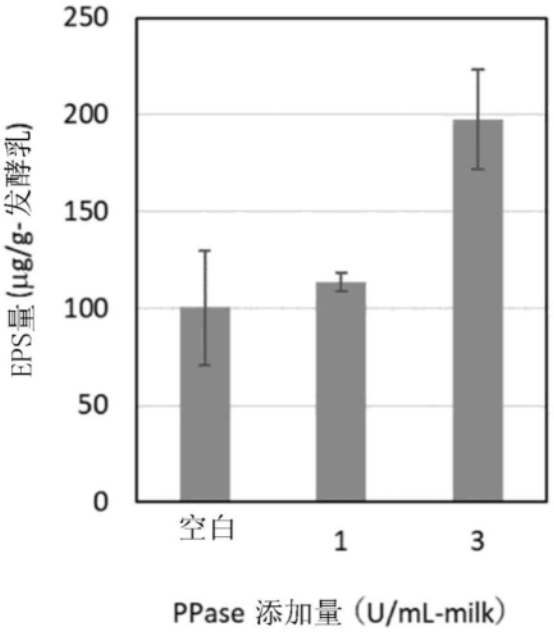

EPS量(μg/g-发酵乳)
250
200
150
100
50
0
空白
1
3
PPase 添加量（U/mL-milk）

图9

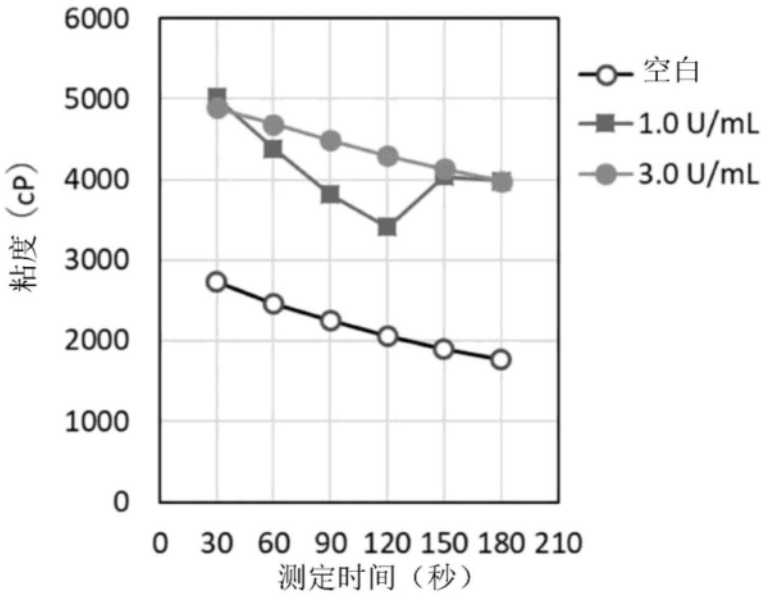

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
粘度（cP）
0 30 60 90 120 150 180 210
测定时间（秒）
空白
1.0 U/mL
3.0 U/mL

图10

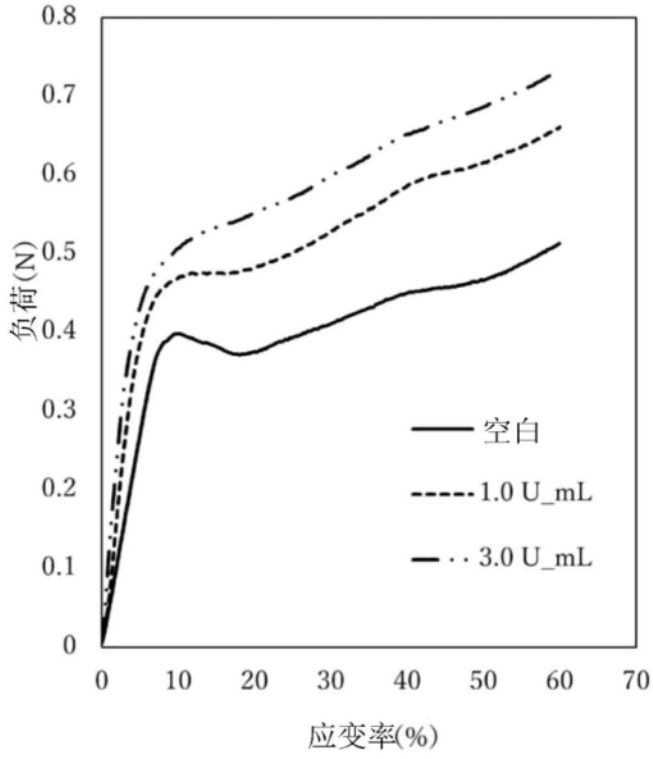
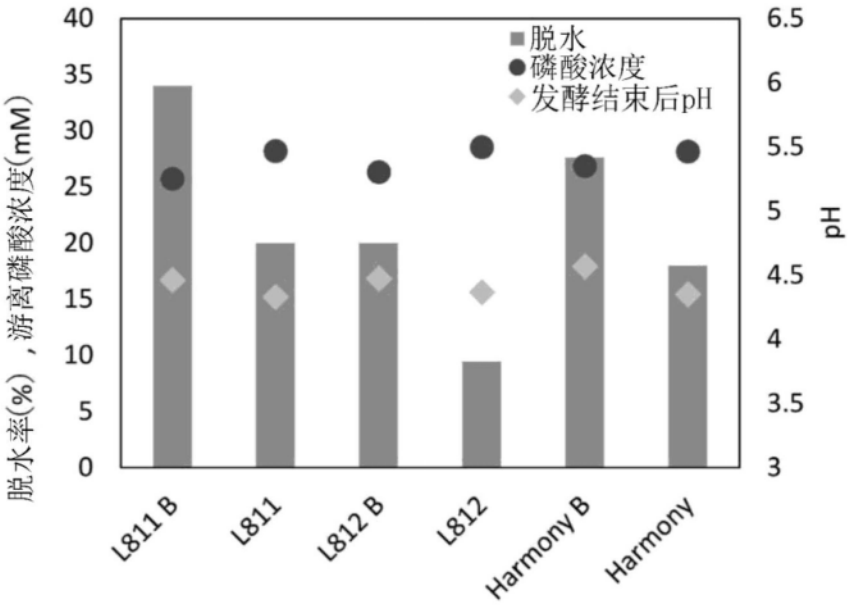
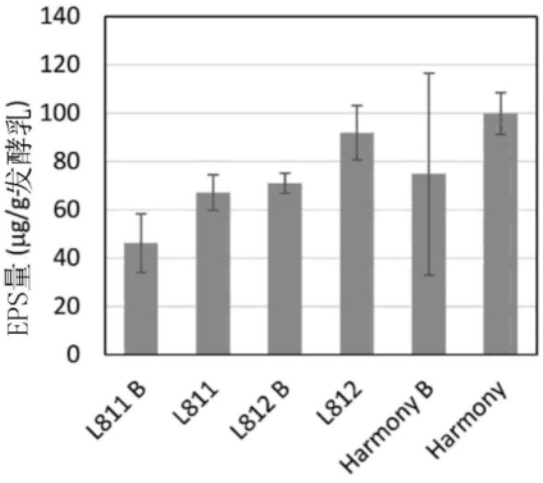

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
负荷(N)
0 10 20 30 40 50 60 70
应变率(%)
空白
1.0 U_mL
3.0 U_mL

图11



（B为空白）

图12



（B为空白）

图13

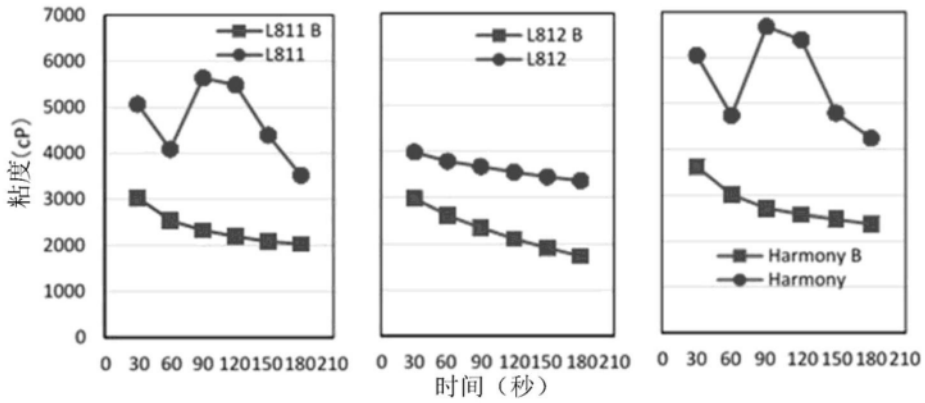

粘度(cP)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
L811 B
L811
L812 B
L812
Harmony B
Harmony
0 30 60 90 120150 180210
时间（秒）

图14

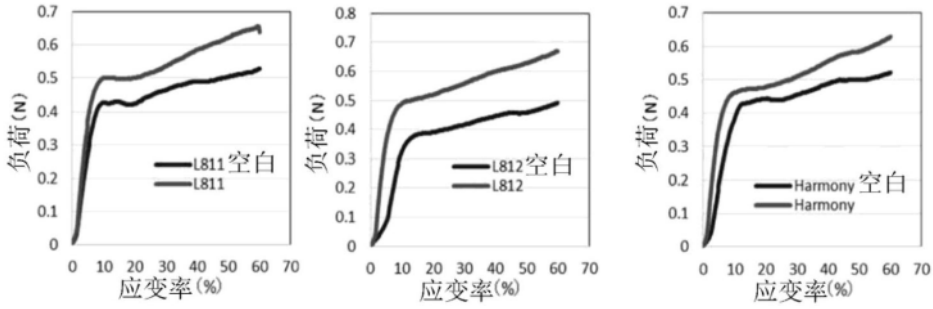

负荷(N)
应变率(%)
L811空白
L811
L812空白
L812
Harmony空白
Harmony

图15

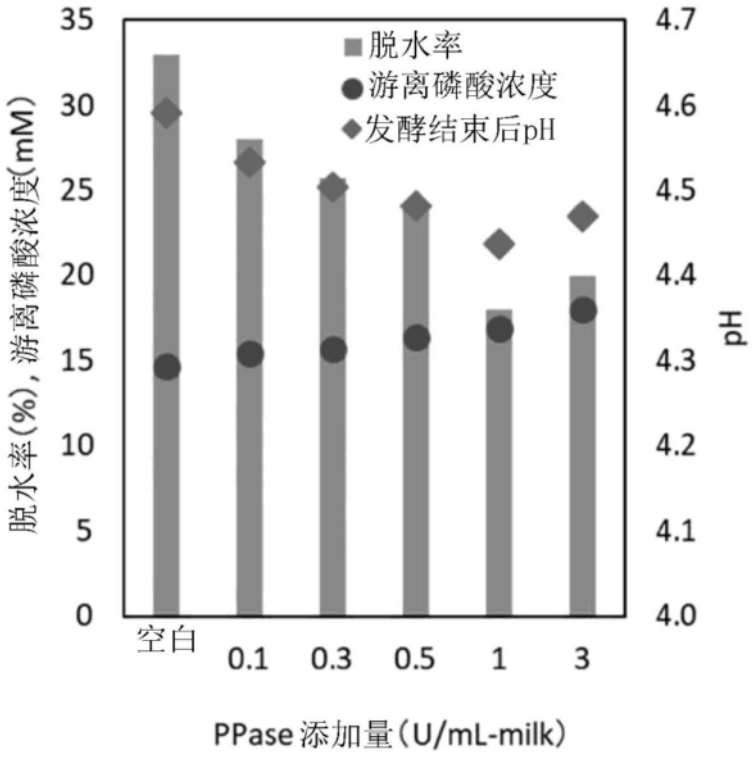

脱水率
游离磷酸浓度
发酵结束后pH
脱水率(%)，游离磷酸浓度(mM)
pH
35
30
25
20
15
10
5
0
4.7
4.6
4.5
4.4
4.3
4.2
4.1
4.0
空白
0.1
0.3
0.5
1
3
PPase 添加量(U/mL-milk)

图16

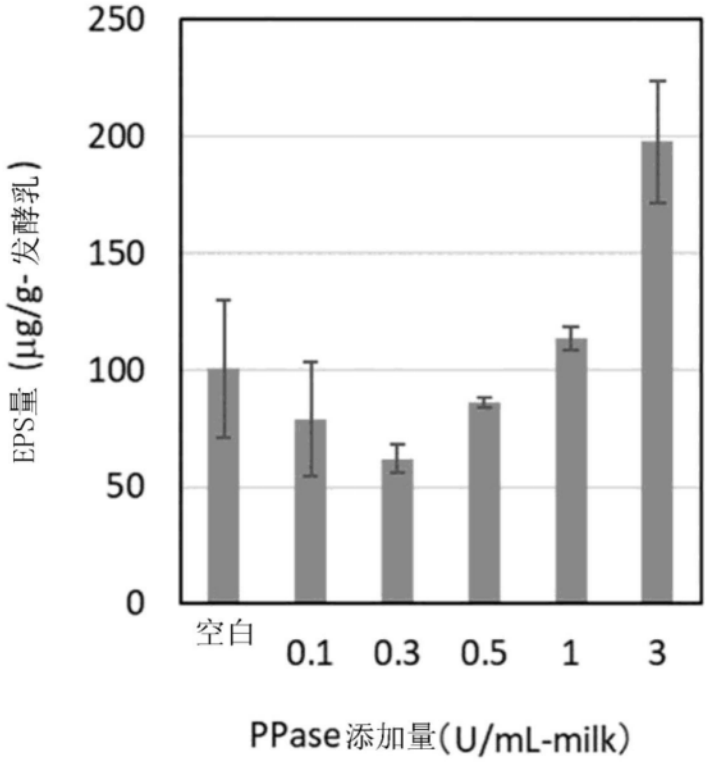

EPS量 (μg/g- 发酵乳)
250
200
150
100
50
0
空白
0.1
0.3
0.5
1
3
PPase添加量(U/mL-milk)

图17

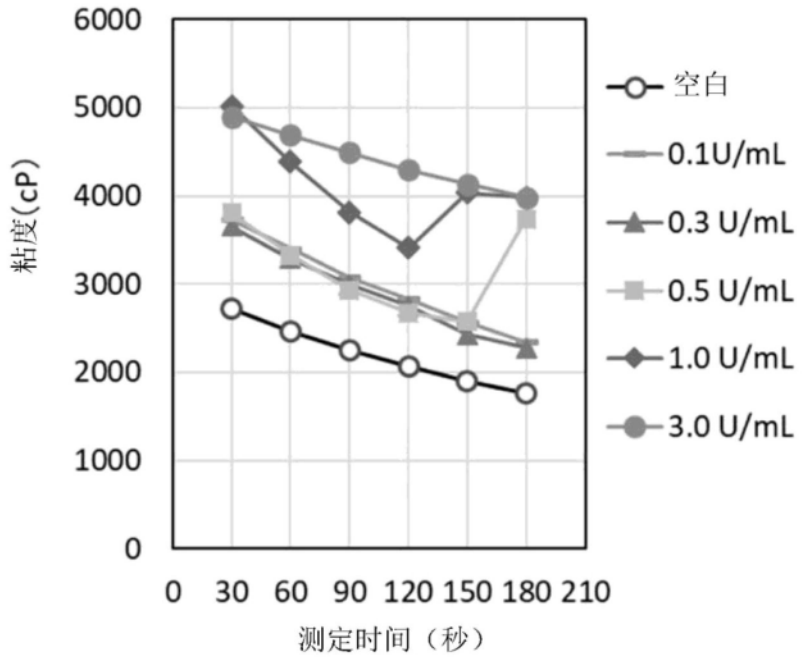

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
粘度(cP)
0 30 60 90 120 150 180 210
测定时间（秒）
空白
0.1U/mL
0.3 U/mL
0.5 U/mL
1.0 U/mL
3.0 U/mL

图18

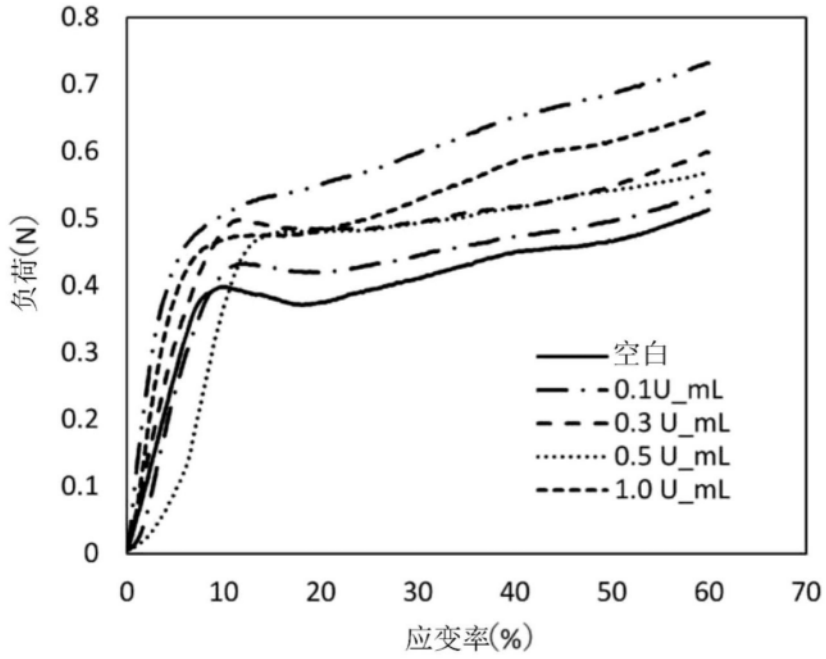

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
负荷(N)
0 10 20 30 40 50 60 70
应变率(%)
空白
0.1U_mL
0.3 U_mL
0.5 U_mL
1.0 U_mL

图19

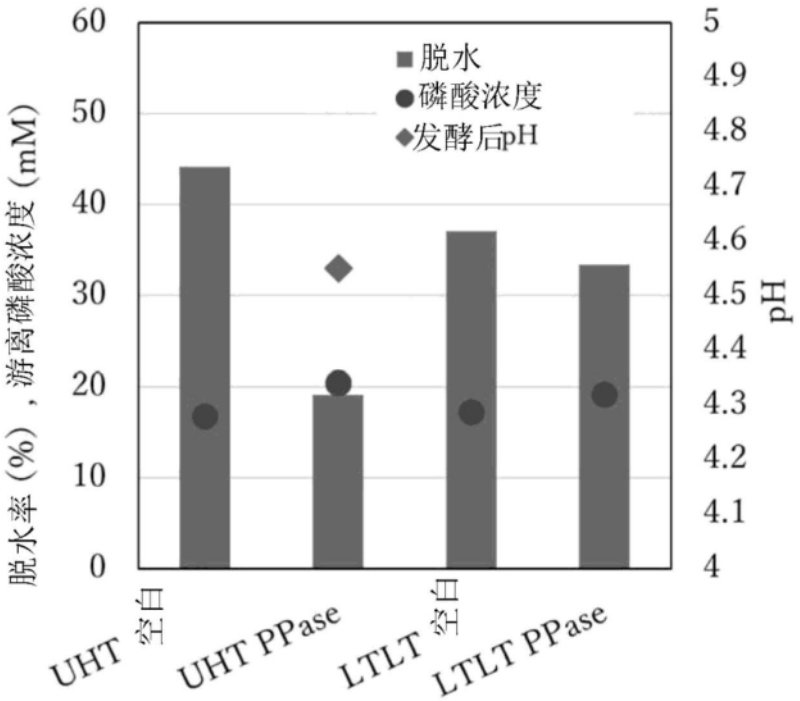

脱水
磷酸浓度
发酵后pH
脱水率（%），游离磷酸浓度（mM）
pH
60
50
40
30
20
10
0
5
4.9
4.8
4.7
4.6
4.5
4.4
4.3
4.2
4.1
4
UHT 空白
UHT PPase
LTLT 空白
LTLT PPase

图20

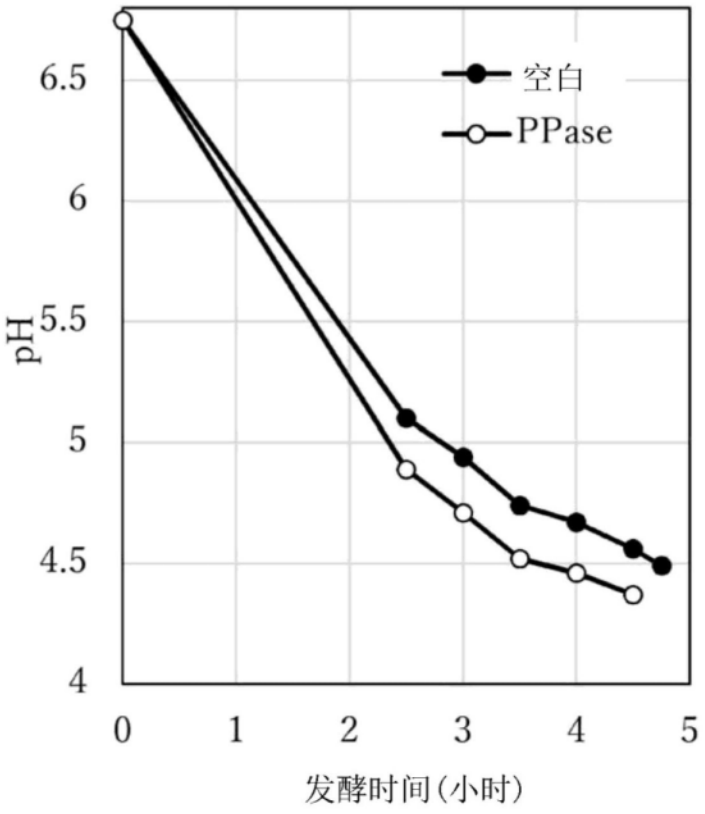

空白
PPase
pH
6.5
6
5.5
5
4.5
4
0
1
2
3
4
5
发酵时间(小时)

图21

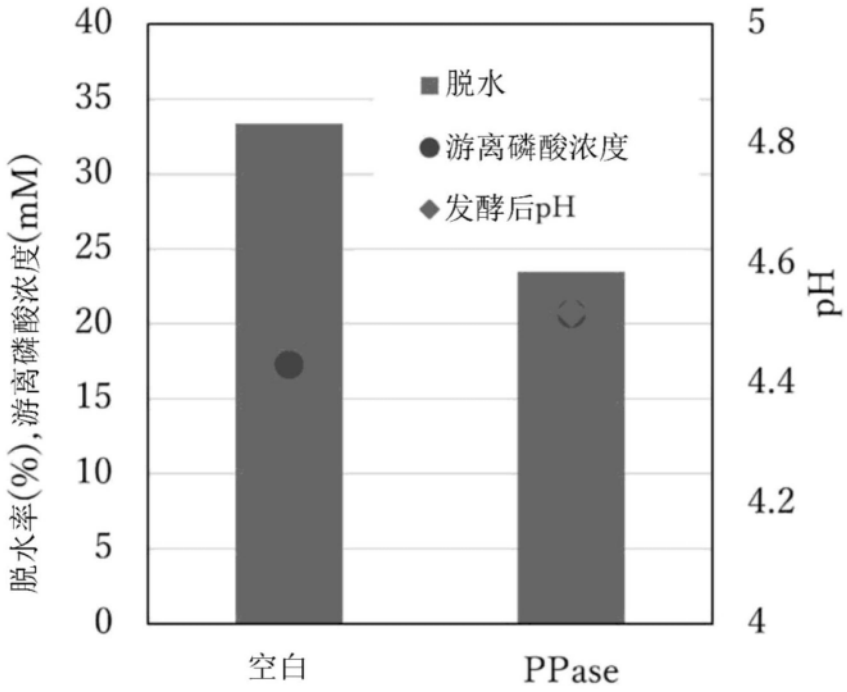

脱水率(%),游离磷酸浓度(mM)
pH
脱水
游离磷酸浓度
发酵后pH
40
35
30
25
20
15
10
5
0
5
4.8
4.6
4.4
4.2
4
空白
PPase

图22

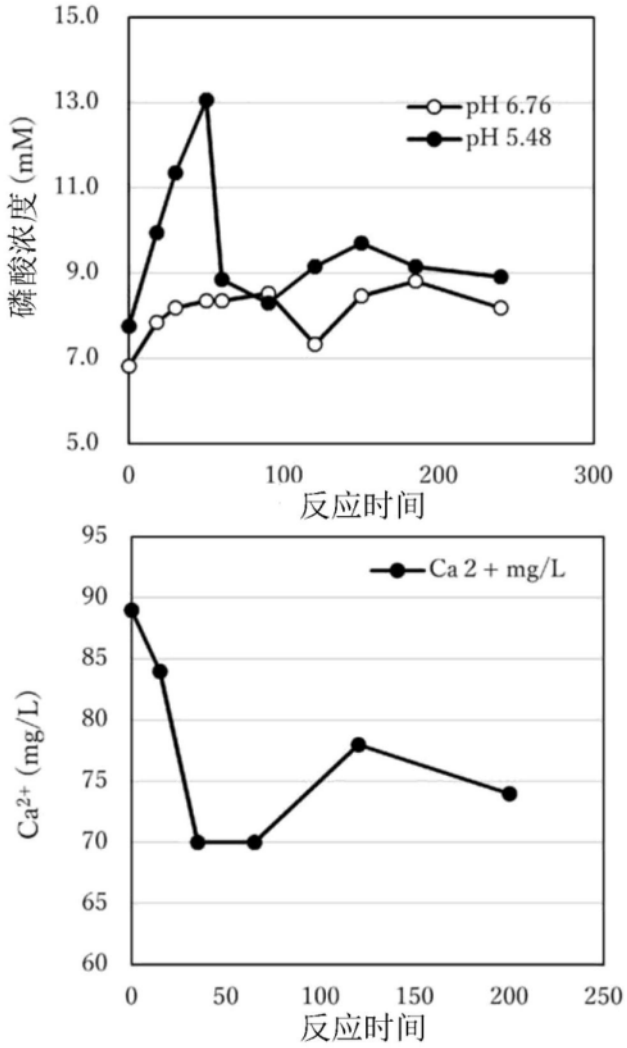

15.0
13.0
11.0
9.0
7.0
5.0
磷酸浓度 (mM)
pH 6.76
pH 5.48
0
100
200
300
反应时间
95
90
85
80
75
70
65
60
Ca2+ (mg/L)
Ca 2 + mg/L
0
50
100
150
200
250
反应时间

图23