



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109642205 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201780051520.7

(22)申请日 2017.08.24

(30)优先权数据

PCT/DK2016/000031 2016.09.01 DK

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.02.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/071352 2017.08.24

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/041717 EN 2018.03.08

(83)生物保藏信息

DSM25955 2012.04.27

DSM19242 2007.03.29

DSM17876 2006.01.11

(71)申请人 科·汉森有限公司

地址 丹麦赫斯霍尔姆

(72)发明人 帕特里克·德克斯 托马斯·简森
K·I·瑟伦森

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

代理人 康健 王思琪

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A23C 9/123(2006.01)

C07K 14/315(2006.01)

C12R 1/46(2006.01)

权利要求书3页 说明书12页

PCT/R0/134表3页 附图5页

(54)发明名称

新细菌

(57)摘要

本发明涉及具有质构化特性的细菌细胞,包含所述细胞的起子培养物和使用所述细菌细胞制造的乳制品。

1. 乳酸菌 (LAB), 其含有小于10ppm (百万分率, mg/Kg干重) 的铁离子 (例如Fe²⁺), 例如小于9ppm、小于8ppm、小于6ppm或小于3ppm。

2. LAB, 其含有小于6ppm (百万分率, mg/Kg干重) 的锰离子 (例如Mn²⁺), 例如小于5.5ppm、小于5.2ppm、小于5ppm、小于4ppm或小于2ppm。

3. 任一前述权利要求所述的LAB, 其总计含有小于16ppm的Fe²⁺和Mn²⁺, 例如小于15ppm、小于14ppm、小于13ppm、小于10ppm或小于7ppm。

4. 任一前述权利要求所述的乳酸菌 (LAB), 其具有被扰乱的二价金属离子代谢 (DMIM)。

5. 乳酸菌 (LAB), 其具有被扰乱的二价金属离子代谢 (DMIM)。

6. 任一前述权利要求所述的LAB, 其中所述被扰乱的DMIM是降低的DMIM。

7. 任一前述权利要求所述的LAB, 其中所述被扰乱的DMIM是由fur基因的表达改变 (例如降低) 引起的, 所述表达改变例如所述基因的 (部分或完全) 失活、所述基因或其部分的缺失和/或其他DNA插入所述基因中。

8. 任一前述权利要求所述的LAB, 其中所述被扰乱的DMIM是由与二价金属离子吸收相关的基因中的突变引起的, 所述突变例如敲除突变。

9. 任一前述权利要求所述的LAB, 其中所述被扰乱的DMIM是由mntH基因的表达降低引起的, 所述表达降低例如所述基因的 (部分或完全) 失活、所述基因或其部分的缺失和/或其他DNA插入所述基因中。

10. 任一前述权利要求所述的LAB, 其中所述被扰乱的DMIM是由fatC基因或涉及铁吸收的任何其他基因的表达降低引起的, 所述表达降低例如所述基因的 (部分或完全) 失活、所述基因或其部分的缺失和/或其他DNA插入所述基因中。

11. 任一前述权利要求所述的LAB, 其中所述被扰乱的DMIM是由所述细菌对亚硝酸盐具有抗性引起的。

12. 任一前述权利要求所述的LAB, 其中所述二价金属离子选自由Fe²⁺、Mg²⁺以及Mn²⁺组成的组, 优选组Fe²⁺和Mg²⁺。

13. 任一前述权利要求所述的LAB, 其中所述二价金属离子是Fe²⁺。

14. 任一前述权利要求所述的LAB, 其中所述二价金属离子是Mn²⁺。

15. 任一前述权利要求所述的LAB, 其已通过诱变和/或通过基因工程获得。

16. 任一前述权利要求所述的LAB, 其已通过二价金属离子浓度低于0.25μg/g, 例如低于0.2μg/g的培养基中生长而获得, 所述二价金属离子选自由Fe²⁺和Mn²⁺组成的组。

17. 任一前述权利要求所述的LAB, 其属于物种保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)。

18. 任一前述权利要求所述的LAB, 其属于物种嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)。

19. 菌株嗜热链球菌CHCC15712 (DSM25955), 或该菌株的突变体或变体, 例如具有改善的EPS产生的突变体或变体。

20. 任一前述权利要求所述的LAB, 其对亚硝酸盐具有抗性。

21. 任一前述权利要求所述的LAB, 当用每毫升10E8 CFU接种乳时, 所述LAB在所述乳中产生大于约50Pa.s (例如大于60或70Pa.s) 的粘度, 所述粘度是在37℃下、在9.5%的复原脱脂乳中细菌生长16小时后, 作为剪切应力被测量的。

22. 组合物,其包含前述权利要求中任一项所述的LAB(乳酸菌)。
23. 前述权利要求所述的组合物,其是起子培养物。
24. 包含LAB的组合物,所述组合物进一步包含金属离子螯合剂(例如EDTA),所述金属离子螯合剂优选浓度为1ppm或更高。
25. 任一前述权利要求所述的组合物,其包含每mg至少 10^9 CFU(细胞形成单位)的LAB。
26. 任一前述权利要求所述的组合物,其包含每mg至少 10^{11} CFU的LAB。
27. 前述权利要求所述的组合物,其包含每mg 10^{10} CFU至 10^{14} CFU的LAB。
28. 任一前述权利要求所述的组合物,其为冷冻形式或干燥形式,例如冻干形式。
29. 任一前述权利要求所述的组合物,其含有小于10ppm的 Fe^{2+} ,例如小于9.5ppm、小于9ppm、小于8ppm、小于6ppm或小于3ppm。
30. 任一前述权利要求所述的组合物,其含有小于6ppm的 Mn^{2+} ,例如小于5.5ppm、小于5.2ppm、小于5ppm、小于4ppm或小于2ppm。
31. 任一前述权利要求所述的组合物,其总计含有小于16ppm的 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} ,例如小于15ppm、小于14ppm、小于13ppm、小于10ppm或小于7ppm。
32. 任一前述权利要求所述的组合物,其含有至少2种不同的LAB菌株,例如至少3种、至少5种或至少10种。
33. 前述权利要求所述的组合物,其中至少2种不同的LAB菌株属于不同的物种。
34. 用于生产乳制品(例如发酵乳(例如酸奶)或奶酪例如帕斯塔菲拉塔奶酪或新鲜奶酪)的方法,包括用任一前述权利要求所述的LAB、任一前述权利要求所述的菌株或任一前述权利要求所述的组合物使乳基质发酵。
35. 用于生产乳制品(例如发酵乳(例如酸奶)或奶酪例如帕斯塔菲拉塔奶酪或新鲜奶酪)的方法,所述方法包括用LAB,例如任一前述权利要求所述的LAB,使 Fe^{2+} 浓度低于 $0.25\mu\text{g/g}$ (例如低于 $0.20\mu\text{g/g}$ 或低于 $0.15\mu\text{g/g}$)的乳基质发酵。
36. 用于生产乳制品(例如发酵乳(例如酸奶)或奶酪)的方法,所述方法包括用LAB,例如任一前述权利要求所述的LAB,使 Mn^{2+} 浓度低于 $0.025\mu\text{g/g}$ (例如低于 $0.020\mu\text{g/g}$ 或低于 $0.015\mu\text{g/g}$)的乳基质发酵。
37. 用于生产乳制品(例如发酵乳(例如酸奶)或奶酪例如帕斯塔菲拉塔奶酪或新鲜奶酪)的方法,包括用不含活性fur蛋白质的LAB使乳基质发酵。
38. 任一前述权利要求所述的方法,其中所述LAB是嗜热链球菌的菌株。
39. 任一前述权利要求所述的方法,其中所述LAB是保加利亚乳杆菌的菌株。
40. 乳制品,例如发酵乳制品(例如发酵乳(例如酸奶)或奶酪例如帕斯塔菲拉塔奶酪或新鲜奶酪),其可通过任一前述权利要求所述的方法获得。
41. 前述权利要求所述的乳制品,其任选地包含选自以下组成的组的成分:水果浓缩物、糖浆、益生菌培养物、着色剂、增稠剂、调味剂和防腐剂;和/或其任选地为搅拌型制品、凝固型制品或可饮用制品的形式。
42. 用于生产LAB菌株的方法,所述LAB菌株当被接种到乳基质中时提供质构(或提供与母菌株相比增加的质构),包括:
 - 在LAB菌株(母菌株)的fur基因中引入突变,即通过基因工程或诱变,和

-筛选具有与所述母菌株相比改善的质构化特性的突变体。

43. 用于改善LAB菌株(其能够产生EPS)的EPS产生的方法,所述方法包括:在用所述菌株接种之前、期间或之后从培养基(例如生产培养基或乳基质)除去Fe²⁺离子。

44. 前述权利要求所述的方法,其中所得培养基的Fe²⁺离子的浓度低于0.25μg/g(例如低于0.20μg/g或低于0.15μg/g)。

45. 任一前述权利要求所述的用于改善LAB菌株的EPS产生的方法,所述方法进一步包括:在用所述菌株接种之前、期间或之后从所述培养基除去Mn²⁺离子。

46. 前述权利要求所述的用于改善LAB菌株的EPS产生的方法,其中所得培养基的Mn²⁺浓度低于0.025μg/g(例如低于0.020μg/g或低于0.015μg/g)。

47. 任一前述权利要求所述的方法,其中生长进行至少2小时或至少4小时。

48. 生产LAB菌株(其能够产生EPS)的方法,所述方法包括:使fur基因(部分或完全)失活。

新细菌

技术领域

[0001] 本发明涉及具有质构化特性的细菌细胞、包含所述细胞的起子培养物和使用所述细菌细胞制造的乳制品。

背景技术

[0002] 为了改善食品的味道和质构,而且为了延长这些食品的保质期,食品工业使用许多细菌,特别是乳酸菌(LAB)。在乳品工业的情况下,LAB广泛用于实现乳的酸化(通过发酵),但也用于使掺入其的产品质构化。

[0003] 在食品工业所用的LAB中,可以提及到的是链球菌属(*Streptococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)。

[0004] LAB单独或与其他细菌组合广泛用于生产食品,特别是发酵制品。它们特别用于配制用于生产发酵乳例如酸奶的起子培养物。它们中的某些在发酵制品的质构发展中起主导作用。这种特征与多糖的产生密切相关。在嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)和保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)菌株中,可以区分质构化菌株和非质构化菌株。

[0005] 为了满足工业的要求,有必要提出LAB的新的质构化菌株,特别是嗜热链球菌和乳杆菌属物种的新的质构化菌株。一个特定的焦点可能是减少例如乳制品中蛋白质或果胶(两者都改善质构)的量,因为这两者都是昂贵的。

[0006] 因此,本发明提出解决的问题是提供具有用于质构化食品的良好特性的乳酸细菌菌株,所述食品特别是其中将乳酸菌(例如嗜热链球菌)的质构化菌株与乳杆菌属物种的菌株一起使用的产品。

发明内容

[0007] 本发明人惊奇地发现,乳酸菌细胞或含有乳酸菌细胞的起子培养物中的金属离子的浓度会影响质构的形成,当将这样的乳酸菌细胞或起子培养物用于生产发酵乳时。

[0008] 根据这一令人惊讶的发现,本发明涉及具有改善的质构化特性的新LAB菌株和生产这种菌株的方法,以及涉及使用这种菌株制备的发酵乳制品。

[0009] 因此,本发明的一个方面涉及能够使乳基质质构化的乳酸菌组合物,所述组合物包含细胞内金属离子浓度降低的乳酸菌,和/或所述组合物包含金属离子量降低的乳酸菌。

[0010] 预期这种细胞可以以不同方式获得,例如:

[0011] 可选的A):对细胞进行遗传修饰,从而细胞不吸收金属离子,或仅以低速吸收金属离子,或者从而细胞不能合成功能完善的离子结合蛋白,可选的B):使细胞在没有金属离子或具有低浓度金属离子的生长培养基中生长,例如,通过向培养基中加入金属离子螯合剂,或

[0012] 可选的C):分离突变细胞,例如通过母细胞的诱变处理(包括用化学诱变剂或UV光

处理)获得的突变细胞。

[0013] 对于可选的A), 本发明人描述了这样的发现: 离子代谢受到扰乱 (例如降低、抑制) 的质构化LAB的突变体将在发酵乳制品中提供优异的质构。

[0014] 在第二方面, 本发明涉及用于增加用LAB发酵的乳制品的粘度的方法, 所述方法包括使铁 (特别是 Fe^{2+}) 和/或锰 (特别是 Mn^{2+}) 含量降低的乳基质发酵, 或使其中至少一种所述金属离子部分或完全不能进入LAB的乳基质发酵。

具体实施方式

[0015] 本发明基于以下令人惊讶的发现, 即用嗜热链球菌菌株CHCC15712发酵的乳表现出增加的剪切应力以及增加的凝胶硬度, 相信这两个重要的流变学参数与酸奶和酸奶类制品的质构特性有关, 嗜热链球菌菌株CHCC15712是作为产胞外多糖的菌株嗜热链球菌CHCC9844的突变体分离的。通过监测自容量移液管的流出时间测量的粘度也增加了 (参见实施例1)。

[0016] 来自CHCC9844和CHCC15712的EPS的分离和表征显示CHCC15712的EPS产生增加9%, 这与粘度增加很好地相关 (实施例2)。

[0017] 通过分析突变体CHCC15712, 本发明人惊奇地发现, 与CHCC9844相比, 细胞含有浓度异常低的 Fe^{2+} 和其他金属离子。

[0018] 本发明人研究了所述令人惊讶的发现的可能机制, 并且在CHCC9844的基因组序列中, 他们在EpsA基因的上游区域中鉴定了CHCC9844eps操纵子的一部分, 与Fur (铁吸收调节剂) 盒高度同源的序列, 表明Fur参与调节CHCC9844的EPS表达 (图1A和1B)。

[0019] 在不希望受具体理论或假说约束的情况下, 相信EpsA表达受Fur的控制, 并且EpsA的去抑制导致EPS产量增加和质构增加。因此, 与具有正常吸收的母菌株相比, 任何具有受损的二价金属吸收的突变体将提供增加的质构。

[0020] 通过与CHCC9844比较的CHCC15712的DNA阵列 (表达微阵列) 分析, 显示特异性铁吸收基因盒 (Fat操纵子) 下调。与CHCC9844相比, fatABC基因在CHCC15712中约4倍降低表达, 而fatD2倍降低表达。

[0021] 有关上述可选的A) 的探讨:

[0022] 发明人推测, 铁转运蛋白的这种下调将导致细胞内 Fe^{2+} 或 Fe^{3+} 浓度降低, 这再次将导致Fur调节剂与Fur盒的结合较少。由于Fur作为阻遏物起作用, 因此受Fur控制的基因由于 $\text{Fe}^{2+/3+}$ 浓度降低而去抑制。

[0023] 参与铁吸收的所有其他基因的下调, 例如, 二价金属离子ABC吸收系统 (NRAMP), 也会导致较低的细胞内铁浓度, 并通过Fur调节, 导致质构增加。

[0024] 通过制备CHCC9844的基因工程突变体测试了该假说, 在所述突变体中, Fur基因失活。使用移液管流出测试测量对质构的影响。wt (野生型) 菌株CHCC9844的移液管值为 $24 \pm 1\text{s}$, 而fur突变体KA509经测量为 $38 \pm 0\text{s}$, 相当于58%的增加 (实施例3)。

[0025] 还使用DNA微阵列评估了fur失活对基因表达的影响。已知参与铁吸收的fatABDC基因受Fur调节。在KA509中, 与CHCC9844野生型菌株相比, 这些基因下调4倍。当KA509在10mM Fe^{2+} 存在的情况下生长时, fat基因簇的表达没有实质性变化。相反, 当母菌株CHCC9844在铁存在的情况下生长时, fatC和fatD基因被诱导4倍。

[0026] 有关上述可选的B)的探讨

[0027] 通过在EDTA即金属螯合剂存在的情况下进行乳酸化实验进一步测试了该假说。添加EDTA应减少可用铁的量,因此导致EpsA的去抑制,从而导致质构增加。实际上,观察到向乳中添加1mM EDTA使CHCC15712发酵的乳的质构增加了25% (实施例5)。

[0028] 有关上述可选的C)的探讨

[0029] 基于来自CHCC9844的突变体表现出与铁吸收相关的基因表达降低这一发现,从CHCC9844分离亚硝酸盐抗性突变体。

[0030] 对于亚硝酸盐抗性突变体,使用移液管测试的流出时间以及由此的粘度增加。最高的增加经测量为突变体9844-K2,为47% (实施例4)。

[0031] 该实验证明,有可能通过分离亚硝酸盐抗性突变体,来进一步增加eps阳性嗜热链球菌菌株的质构化特性。本发明也包括该实施方案。

[0032] 基于上述令人惊讶的发现,本发明的第一方面涉及在细胞内总计含有小于4200ppm (百万分率,mg/Kg干重)的所有二价金属离子,例如小于4100ppm,小于4000ppm、3000ppm或小于2000ppm的细菌细胞,例如乳酸菌 (LAB)。这种细菌细胞的令人感兴趣的实施方案为:

[0033] -LAB,其总计含有小于4200ppm的Fe²⁺、Mg²⁺和Mn²⁺,例如小于4100、小于4000、小于3000、小于2000或小于1000ppm。

[0034] -LAB,其含有小于4200ppm的Mg²⁺,例如小于4100、小于4000、小于3000、小于2000或小于1000ppm。

[0035] -LAB,其含有小于10ppm的Fe²⁺,例如小于9ppm、小于8、小于6或小于3ppm。

[0036] -LAB,其含有小于6ppm的Mn²⁺,例如小于5.5、小于5、小于4或小于2ppm。

[0037] -LAB,其总计含有小于16ppm的Fe²⁺和Mn²⁺,例如小于15、小于14、小于10或小于7ppm。

[0038] -冻干形式的LAB,其含有小于2000ppm的任何二价金属离子,特别是Mg。

[0039] -冻干形式的LAB,其含有小于4000ppm (w/w) 的二价金属离子。

[0040] -干燥形式的LAB,其含有小于10ppm (w/w) 的铁,例如小于9ppm或小于8。

[0041] -冻干形式的LAB,含有小于8ppm (w/w) 的铁。

[0042] 当允许发酵乳基质发酵时,本发明第一方面的细菌细胞能够使乳基质质构化。因此,另一个令人感兴趣的实施方案涉及本发明的乳酸菌,当用每毫升10E8CFU (菌落形成单位) 接种乳时,所述乳酸菌在乳中产生大于约50Pa.s (例如大于60或70Pa.s) 的粘度,所述粘度是在37℃下、在9.5%的复原脱脂乳中细菌生长16小时后,作为剪切应力测量的。

[0043] 其他令人感兴趣的实施方案是:

[0044] -乳酸菌 (LAB),其具有被扰乱的二价金属离子代谢 (DMIM)。

[0045] -LAB,其具有被扰乱的二价金属离子代谢 (DMIM)。

[0046] -LAB,其中被扰乱的DMIM是DMIM的降低。

[0047] -LAB,其中被扰乱的DMIM是由fur基因的表达改变引起的。

[0048] -LAB,其中被扰乱的DMIM是由与二价金属离子吸收有关的基因中的突变引起的。

[0049] -LAB,其中被扰乱的DMIM是由mntH基因的表达降低引起的。

[0050] -LAB,其中被扰乱的DMIM是由fatC基因或参与铁吸收的任何其他基因的表达降低

引起的。

[0051] -LAB,其中被扰乱的DMIM是由细菌对亚碲酸盐具有抗性引起的。

[0052] -LAB,其中所述二价金属离子选自由Fe²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Te²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Ni²⁺以及Cu²⁺组成的组。

[0053] -LAB,其中所述二价金属离子选自由Fe²⁺、Mg²⁺和Mn²⁺组成的组。

[0054] -LAB,其中所述二价金属离子是Fe²⁺。

[0055] -LAB,其中所述二价金属离子是Mn²⁺。

[0056] -LAB,其已通过诱变、通过基因工程和/或通过二价金属离子(例如Fe)的浓度低于0.1% (w/v)的培养基中生长而获得。

[0057] -LAB,其属于选自由嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)和保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)组成的组的物种。

[0058] -LAB,其属于物种嗜热链球菌。

[0059] -LAB,其对亚碲酸盐具有抗性。

[0060] -菌株嗜热链球菌CHCC15712(DSM25955),或该菌株的突变体或变体。

[0061] 在第二方面,本发明涉及包含第一方面的LAB的组合物。

[0062] 在第三方面,本发明涉及包含LAB的组合物,所述组合物进一步包含金属离子螯合剂(例如EDTA或铁载体或离子载体),优选浓度为1ppm或更高。

[0063] 第二和第三方面的令人感兴趣的实施方案是:

[0064] -组合物,其是起子培养物。

[0065] -组合物,其包含至少10E9CFU的本发明的LAB。

[0066] -组合物,其包含至少10E11 (10exp11) CFU的本发明的LAB。

[0067] -组合物,其包含10E10CFU至10E14CFU的本发明的LAB。

[0068] -组合物,其可用作起子培养物,和/或为冷冻或干燥形式,例如冻干形式。

[0069] -组合物,其总计含有小于4200ppm的所有二价金属离子,例如小于4100、小于4000、小于3000、小于2000或小于1000ppm。

[0070] -组合物,其总计含有小于4200ppm的Fe²⁺、Mg²⁺和Mn²⁺,例如小于4100、小于4000、小于3000、小于2000或小于1000ppm。

[0071] -组合物,其含有小于4200ppm的Mg²⁺,例如小于4100、小于4000、小于3000、小于2000或小于1000ppm。

[0072] -组合物,其含有小于10ppm的Fe²⁺,例如小于8、小于6或小于3ppm。

[0073] -组合物,其含有小于6ppm的Mn²⁺,例如小于5、小于4或小于2ppm。

[0074] -组合物,其总计含有小于16ppm的Fe²⁺和Mn²⁺,例如小于15、小于14、小于10或小于7ppm。

[0075] -组合物,其含有2种不同的LAB菌株。

[0076] -组合物,其中所述2种不同的LAB菌株属于不同的物种。

[0077] 在第四方面,本发明涉及用于生产发酵乳制品/乳制品的方法,包括用本发明的LAB、本发明的菌株/细胞或本发明的组合物使乳基质发酵。

[0078] 在第六方面,本发明涉及乳制品,例如可通过本发明的方法获得的发酵乳制品(例如酸奶或酪乳)或奶酪(例如新鲜奶酪或帕斯塔菲拉塔奶酪(*pasta filata*))。乳制品任选

地包含选自由以下组成的组的成分：水果浓缩物、糖浆、益生菌培养物、着色剂、增稠剂、调味剂和防腐剂；和/或任选地为搅拌型制品、凝固型(set type)制品或可饮用制品的形式。

[0079] 在又一个方面，本发明涉及用于生产LAB菌株的方法，所述LAB菌株当被接种到乳基质中时提供质构，所述方法包括：i) 提供LAB菌株(母菌株)，ii) 在所述母菌株的fur基因中引入突变，即通过基因工程或诱变，和iii) 筛选具有与母菌株相比改善的质构化特性的突变体。

[0080] 下面列出了本发明的其他令人感兴趣的方面(权利要求方面)：

[0081] 1. 乳酸菌(LAB)，其含有小于10ppm(百万分率，mg/Kg干重)的铁离子(例如Fe²⁺)，例如小于9，小于8ppm，小于6或小于3ppm。

[0082] 2. LAB，其含有小于6ppm(百万分率，mg/Kg干重)的锰离子(例如Mn²⁺)，例如小于5.5，小于5.2ppm，小于5ppm，小于4或小于2ppm。

[0083] 3. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其总计含有小于16ppm的Fe²⁺和Mn²⁺，例如小于15ppm，小于14ppm，小于13ppm，小于10或小于7ppm。

[0084] 4. 任一前述权利要求方面所述的乳酸菌(LAB)，其具有被扰乱的二价金属离子代谢(DMIM)。

[0085] 5. 乳酸菌(LAB)，其具有被扰乱的二价金属离子代谢(DMIM)。

[0086] 6. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其中被扰乱的DMIM是降低的DMIM。

[0087] 7. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其中被扰乱的DMIM是由fur基因的表达改变引起的，例如所述基因的(部分或完全)失活、所述基因或其部分的缺失和/或其他DNA插入所述基因中。

[0088] 8. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其中被扰乱的DMIM是由与二价金属离子吸收相关的基因中的突变引起的，例如敲除突变。

[0089] 9. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其中被扰乱的DMIM是由mntH基因的表达降低引起的。

[0090] 10. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其中被扰乱的DMIM是由fatC基因或参与铁吸收的任何其他基因的表达降低引起的。

[0091] 11. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其中被扰乱的DMIM是由细菌对亚硝酸盐具有抗性引起的。

[0092] 12. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其中二价金属离子选自由Fe²⁺、Mg²⁺以及Mn²⁺组成的组，优选组Fe²⁺和Mg²⁺。

[0093] 13. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其中二价金属离子是Fe²⁺。

[0094] 14. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其中二价金属离子是Mn²⁺。

[0095] 15. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其已通过诱变和/或通过基因工程获得。

[0096] 16. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其已通过二价金属离子浓度低于0.25微克/克，例如低于0.2μg/g的培养基中生长而获得，所述二价金属离子选自由Fe²⁺和Mn²⁺组成的组。

[0097] 17. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其属于物种保加利亚乳杆菌。

[0098] 18. 任一前述权利要求方面所述的LAB，其属于物种嗜热链球菌。

- [0099] 19. 菌株嗜热链球菌CHCC15712 (DSM25955), 或该菌株的突变体或变体, 例如具有改善的EPS生产的突变体或变体。
- [0100] 20. 任一前述权利要求方面所述的LAB, 其对亚硝酸盐具有抗性。
- [0101] 21. 任一前述权利要求方面所述的LAB, 当以每毫升 10^8 CFU接种乳时, 所述细菌在 37°C 下、在9.5%的复原脱脂乳中细菌生长16小时后, 在所述乳中产生作为剪切应力测量的大于约 $50\text{Pa}\cdot\text{s}$ (例如大于60或 $70\text{Pa}\cdot\text{s}$) 的粘度。
- [0102] 22. 组合物, 其包含任一前述权利要求方面所述的LAB (乳酸菌)。
- [0103] 23. 前述权利要求方面所述的组合物, 其是起子培养物。
- [0104] 24. 包含LAB的组合物, 所述组合物进一步包含金属离子螯合剂 (例如EDTA), 优选浓度为1ppm或更高。
- [0105] 25. 任一前述权利要求方面所述的组合物, 其包含每mg至少 10^9 CFU (细胞形成单位) 的LAB。
- [0106] 26. 任一前述权利要求方面所述的组合物, 其包含每mg至少 10^{11} CFU的LAB。
- [0107] 27. 前述权利要求方面所述的组合物, 其包含每mg 10^{10} CFU至 10^{14} CFU的LAB。
- [0108] 28. 任一前述权利要求方面所述的组合物, 其为冷冻或干燥形式, 例如冻干形式。
- [0109] 29. 任一前述权利要求方面所述的组合物, 其含有小于10ppm的 Fe^{2+} , 例如小于9.5, 小于9ppm, 小于8ppm, 小于6或小于3ppm。
- [0110] 30. 任一前述权利要求方面所述的组合物, 其含有小于6ppm的 Mn^{2+} , 例如小于5.5, 小于5.2ppm, 小于5ppm, 小于4或小于2ppm。
- [0111] 31. 任一前述权利要求方面所述的组合物, 其总计含有小于16ppm的 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} , 例如小于15ppm, 小于14ppm, 小于13ppm, 小于10或小于7ppm。
- [0112] 32. 任一前述权利要求方面所述的组合物, 其含有至少2种不同的LAB菌株, 例如至少3种, 至少5种或至少10种。
- [0113] 33. 前述权利要求方面所述的组合物, 其中至少2种不同的LAB菌株属于不同的物种。
- [0114] 34. 用于生产乳制品 (例如发酵乳 (例如酸奶) 或奶酪例如帕斯塔菲拉塔奶酪或新鲜奶酪) 的方法, 包括用任一前述权利要求方面所述的LAB、任一前述权利要求方面所述的菌株或任一前述权利要求方面所述的组合物使乳基质发酵。
- [0115] 35. 用于生产乳制品 (例如发酵乳 (例如酸奶) 或奶酪例如帕斯塔菲拉塔奶酪或新鲜奶酪) 的方法, 所述方法包括用LAB, 例如任一前述权利要求方面所述的LAB, 使 Fe^{2+} 浓度低于 $0.25\mu\text{g/g}$ (例如低于 $0.20\mu\text{g/g}$ 或低于 $0.15\mu\text{g/g}$) 的乳基质发酵。
- [0116] 36. 用于生产乳制品 (例如发酵乳 (例如酸奶) 或奶酪) 的方法, 所述方法包括用LAB, 例如任一前述权利要求方面所述的LAB, 使 Mn^{2+} 浓度低于 $0.025\mu\text{g/g}$ (例如低于 $0.020\mu\text{g/g}$ 或低于 $0.015\mu\text{g/g}$) 的乳基质发酵。
- [0117] 37. 用于生产乳制品 (例如发酵乳 (例如酸奶) 或奶酪例如帕斯塔菲拉塔奶酪或新鲜奶酪) 的方法, 包括用不含活性fur蛋白质的LAB使乳基质发酵。
- [0118] 38. 任一前述权利要求方面所述的方法, 其中LAB是嗜热链球菌的菌株。
- [0119] 39. 任一前述权利要求方面所述的方法, 其中LAB是保加利亚乳杆菌的菌株。
- [0120] 40. 乳制品, 例如发酵乳制品 (例如发酵乳 (例如酸奶) 或奶酪例如帕斯塔菲拉塔奶

酪或新鲜奶酪),其可通过任一前述权利要求方面所述的方法获得。

[0121] 41. 前述权利要求方面所述的乳制品,其任选地包含选自以下各项组成的组的成分:水果浓缩物、糖浆、益生菌培养物、着色剂、增稠剂、调味剂和防腐剂;和/或其任选地为搅拌型制品、凝固型制品或可饮用制品的形式。

[0122] 45. 用于生产LAB菌株的方法,所述LAB菌株在接种到乳基质中时提供质构(或提供与母菌株相比增加的质构),包括:

[0123] -在LAB菌株(母菌株)的fur基因中引入突变,即通过基因工程或诱变,和

[0124] -筛选具有与母菌株相比改善的质构化特性的突变体。

[0125] 46. 用于改善LAB菌株(其能够产生EPS)的EPS产生的方法,所述方法包括:在用菌株接种之前、期间或之后从培养基(例如生产培养基或乳基质)中除去Fe²⁺离子,例如通过添加金属螯合剂。

[0126] 47. 前述权利要求方面所述的方法,其中所得培养基的Fe²⁺离子的浓度低于0.25μg/g(例如低于0.20或低于0.15μg/g)。

[0127] 48. 任一前述权利要求方面所述的用于改善LAB菌株的EPS产生的方法,所述方法进一步包括:在用所述菌株接种之前、期间或之后从所述培养基中除去Mn²⁺离子。

[0128] 49. 前述权利要求方面所述的用于改善LAB菌株的EPS产生的方法,其中所得培养基的Mn²⁺浓度低于0.025μg/g(例如低于0.020或低于0.015μg/g)。

[0129] 50. 任一前述权利要求方面所述的方法,其中生长进行至少5小时。

[0130] 51. 生产LAB菌株(其能够产生EPS)的方法,所述方法包括:使fur基因(部分或完全)失活。

[0131] 定义

[0132] 本文所用的术语“乳酸菌”(简称为LAB)表示发酵糖来产生酸的革兰氏阳性微量需氧或厌氧性细菌,所述酸包括乳酸作为主要产生的酸、乙酸和丙酸。工业上最有用的乳酸菌见于“乳杆菌目(Lactobacillales)”中,其包括乳球菌属的种(Lactococcus spp.)、链球菌属的种(Streptococcus spp.)、乳杆菌属的种(Lactobacillus spp.)、明串珠菌属的种(Leuconostoc spp.)、假明串珠菌属的种(PseudoLeuconostoc spp.)、片球菌属的种(Pediococcus spp.)、短杆菌属的种(Brevibacterium spp.)、肠球菌属的种(Enterococcus spp.)和丙酸杆菌属的种(Propionibacterium spp.)。另外,属于严格厌氧性细菌的产乳酸细菌双歧杆菌即双歧杆菌属的种(Bifidobacterium spp.),通常包括在乳酸菌中。这些细菌经常单独或与其他乳酸菌组合,作为培养物用于食品发酵中。通常将乳酸菌,包括乳杆菌属的种和嗜热链球菌的细菌,作为用于批量起子繁殖的冷冻或冻干培养物或作为用于直接接种到发酵容器或发酵槽的所谓的“直投式”(Direct Vat Set,DVS)培养物供应给乳制品工业,以生产乳制品,例如发酵乳制品。这种培养物通常称为“起子培养物”或“起子”。一些乳品厂也使用“批量起子”,其中在接种于例如乳之前,现场繁殖所述培养物。

[0133] 在本发明的上下文中,术语“乳基质(milk substrate)”可以是可以根据本发明的方法进行发酵的任何未加工的和/或加工过的乳料。因此,有用的乳基质包括但不限于任何乳或包含蛋白质的乳样产品的溶液/悬浮液,例如全脂乳或低脂乳、脱脂乳、酪乳、复原乳粉(reconstituted milk powder)、炼乳、乳粉(dried milk)、乳清、乳清渗透物、乳糖、来自乳

糖结晶的母液、乳清蛋白质浓缩物或奶油(cream)。显然,乳基质可以来自任何哺乳动物,例如可以是基本上纯的哺乳动物乳,或复原乳粉。优选地,乳基质中至少部分蛋白质是天然存在于乳中的蛋白质,例如酪蛋白或乳清蛋白。然而,部分蛋白质可以是不天然存在于乳中的蛋白质。在发酵之前,可以根据本领域已知的方法将乳基质均质化并巴氏杀菌。

[0134] 术语“乳”应理解为通过对诸如奶牛、绵羊、山羊、水牛或骆驼等任何哺乳动物挤奶获得的乳状分泌物。在优选的实施方案中,乳是牛乳。术语乳还包括由植物材料制成的乳,例如豆奶(soy milk)。任选地,乳可以是被酸化的,例如通过添加酸(例如柠檬酸、乙酸或乳酸),或者乳可以是混合的,例如与水混合。乳可以是未加工的,或例如通过过滤、灭菌、巴氏杀菌、均质化等加工过的,或者它可以是复原乳粉(reconstituted dried milk)。根据本发明的“牛乳”的一个重要例子是巴氏杀菌牛乳。应当理解,可以在用细菌接种之前、期间和/或之后酸化、混合或加工乳。

[0135] 牛乳含有的铁的浓度为约 $0.03\text{mg}/100\text{g}=0.3\mu\text{g}/\text{g}=0.3\text{ppm}$ 。

[0136] 牛乳含有的锰的浓度为约 $0.03\mu\text{g}/\text{g}=0.03\text{ppm}$ 。

[0137] 在本发明的上下文中,术语“突变体”应理解为通过例如基因工程、辐射和/或化学处理和/或选择、适应、筛选等由本发明的菌株衍生的菌株。该术语还包括具有改善或改变的噬菌体抗性的突变体,例如,噬菌体强化的突变体。优选突变体是功能等同的突变体,例如,突变体具有与母菌株基本上相同或改善的特性(例如关于产量、粘度、凝胶硬度、口腔覆盖度、风味、后酸化、酸化速度和/或噬菌体稳健性)的突变体。在本发明的上下文中,本发明的突变体优选是,当使乳基质发酵时,关于EPS产生和/或用于产生粘度时,具有相同或改善的特性的突变体。这种突变体是本发明的一部分。特别是,所述术语“突变体”是指通过使本发明的菌株经受任何常规使用的诱变处理而获得的菌株,所述常规使用的诱变处理包括用诸如甲基磺酸乙酯(EMS)或N-甲基-N'-硝基-N-硝基胍(NTG)等化学诱变剂、UV光等处理,或指自发发生的突变体。术语突变体还包括亚碲酸盐抗性突变体。术语亚碲酸盐抗性突变体理解为能够在含有 $0.1\text{mM K}_2\text{TeO}_3$ 的M17琼脂平板上生长(形成菌落)的突变体。

[0138] 突变体可能已经受了几次诱变处理(单一处理应理解为一个诱变步骤,然后进行筛选/选择步骤),但目前优选进行不超过1000次,不超过100次,不超过20次,不超过10次,或不超过5次处理。在目前优选的突变体中,与母菌株相比,细菌基因组中小于5%,或小于1%或甚至小于0.1%的核苷酸已发生改变(例如通过取代、插入、缺失或其组合)。

[0139] 在本发明的上下文中,术语“变体”应理解为在功能上等同于本发明的菌株的菌株,例如,例如就粘度、凝胶硬度、口腔包覆度、风味、后酸化、酸化速度和/或噬菌体稳健性而言,具有基本相同或改善的特性。可以使用适当的筛选技术鉴定的这些变体是本发明的一部分。

[0140] 基因失活意味着基因(包括启动子和其他调节区)以基因或其产物失去其活性(部分或完全)的方式被修改。例如,失活可以是基因的(部分或完全)缺失、基因的突变(例如通过基因工程或诱变)、提供敲除突变体、引入移码、插入例如终止密码子等。

[0141] 在描述本发明的上下文中(特别是在以下权利要求的上下文中)术语“a(一个/种)”和“an(一个/种)”和“所述(the)”以及类似的指示对象的使用应解释为涵盖单数和复数,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾。除非另有说明,否则术语“包含(comprising)”、“具有(having)”、“包括(including)”和“含有(cotaining)”应解释为开放

式术语(即,意味着“包括但不限于”)。除非本文另有说明,否则本文中对数值范围的叙述仅旨在用作单独提及落入该范围内的每个单独值的简写方法,并且每个单独的值并入本说明书中,如同其在本文中被单独叙述一样。除非本文另有说明或上下文明显矛盾,否则本文所述的所有方法均可以任何合适的顺序进行。除非另外声明,否则本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“诸如/例如”)的使用仅旨在更好地说明本发明,而不是对本发明的范围进行限制。不应将说明书中的语言解释为表明任何未要求保护的要素对于本发明的实践是必不可少的。

[0142] 实施例

[0143] 实施例1:通过常规诱变分离具有扰乱的铁代谢的嗜热链球菌突变体

[0144] 嗜热链球菌CHCC15712被分离为产胞外多糖的菌株嗜热链球菌CHCC9844的突变体。用CHCC15712发酵的乳显示出增加的剪切应力以及增加的凝胶硬度,据信与酸奶类产品的质构化特性有关的两个重要的流变学参数。通过监测自容量移液管的流出时间测量的粘度也增加。

[0145] 通过监测自25ml容量移液管的流出时间来测量粘度,所述移液管已经填充有25ml的发酵乳,所述发酵乳是通过当乳接种了每毫升 10^8 CFU时,在 37°C 下在9.5%复原脱脂乳中细菌生长16小时制备的。

[0146] 在配备有C25同轴测量系统的流变仪(StressTech,Reologica Instruments, Sweden)上评估样品的流变性质。粘度测试在21个步骤中以从0.27到 300 s^{-1} 变化的剪切速率进行。剪切速率先增大后减小,记录剪切应力和表观粘度的上下曲线。延迟和积分时间分别为5s和10s。为了进一步分析,选择 300 s^{-1} 的剪切应力。

[0147] 流变仪结果表明,与CHCC9844相比,CHCC15712的剪切应力和凝胶硬度增加20%。

[0148] 还通过计算自25ml容量移液管的流出时间来测量粘度。对于CHCC15712,与野生型菌株CHCC9844相比,经测量粘度增加9%(参见图2)。流出时间从35秒增加到38秒,这与9%的粘度增加有关。

[0149] 实施例2:在M17肉汤中产生胞外多糖。

[0150] 使两种菌株CHCC9844和CHCC15712在 37°C 下在具有1%乳糖的M17肉汤中生长16小时。通过离心除去细胞,通过用96%三氯乙酸溶液(TCA)沉淀蛋白质,然后用96%乙醇沉淀EPS,从上清液中提取EPS。然后用Milli Q-水将EPS样品在 4°C 下透析至少24小时(Slide-A-lyzer透析盒,0.5-3ml,MWCO 10000,Thermo scientific)。然后用4M TFA(三氟乙酸)水解EPS,并通过HPLC分析单糖的组成和量。

[0151] HPLC分析显示,在CHCC9844和CHCC15712的EPS中存在鼠李糖、半乳糖胺、半乳糖、葡萄糖和甘露糖(参见图3)。碳水化合物鼠李糖、半乳糖胺、半乳糖和葡萄糖浓度似乎增加了。总的来说,EPS碳水化合物增加了13%(从1868ppm增加到2114ppm)。该数值良好相关于测量的CHCC15712的粘度增加(实施例1)。

[0152]

	鼠李糖	半乳糖胺	葡萄糖胺	半乳糖	葡萄糖	甘露糖	总计
CHCC9844	174	238	28,7	421,4	511,35	495	1868
CHCC15712	210	305	17	482	597	502	2114

[0153] 实施例3:具有增加的质构形成的GMO fur失活突变体

[0154] 菌株KA509是CHCC9844的突变体,其中fur基因是基因失活的。这通过容纳内部片段的质粒载体的单交换来完成,所述内部片段含有CHCC9844fur基因的2-385位碱基。所得的突变体具有在长度为485bp的fur CDS(密码子序列)的第一个核苷酸后插入的载体。这导致基因的破坏,因此使其失活。使用置于载体中的一个引物和一个置于内部片段下游的fur基因中的一个引物,通过PCR检查正确的插入。

[0155] 使用移液管流出测试检查对质构的影响。wt菌株CHCC9844的移液管值为 24 ± 1 s,而fur突变体经测量为 38 ± 0 s,相当于58%的增加(图4)。

[0156] 还使用DNA微阵列评估fur失活对基因表达的影响。在KA509中,与CHCC9844wt菌株相比,基因fatABDC下调4倍。当KA509在10mM Fe²⁺存在的情况下生长时,fat基因簇的表达没有实质性变化。相反,当母菌株CHCC9844在铁存在的情况下生长时,fatC和fatD基因被诱导4倍。

[0157] 实施例4:从嗜热链球菌CHCC9844中分离粘度参数增加的亚硝酸盐抗性突变体。

[0158] 基于我们的发现,即来自CHCC9844的突变体显示与铁吸收相关的基因表达降低,从CHCC9844分离出亚硝酸盐抗性突变体。

[0159] 在含有0.1mM K₂TeO₃的M17琼脂平板上直接筛选突变体。纯化了表现出稳定的亚硝酸盐抗性表型的4个突变体。将来自含有0.1%K₂TeO₃的M17过夜培养物的四个CHCC9844突变体1%接种于乳中,并在37℃下培养24小时。然后通过测量自25ml移液管的流出时间来测定发酵乳的粘度。流出时间越长,测试培养基的粘度越高:对于每个菌株,流出时间表示为三次测量的平均值(参见图5)。

[0160] 对于四种亚硝酸盐抗性突变体,流出时间增加,并且由此粘度增加。最高增加经测量为具有47%的突变体9844-K2。

[0161] 该实验证明,通过分离亚硝酸盐抗性突变体来进一步增加eps阳性嗜热链球菌菌株的质构化特性是可能的。

[0162] 实施例5:添加金属螯合剂(EDTA)对质构的影响

[0163] 通过在EDTA即金属螯合剂存在的情况下进行乳酸化来测试降低的铁浓度调节粘度这一假说。添加EDTA应减少可用的铁的量,因此导致EpsA的去抑制,从而导致质构增加。实际上,观察到向乳中添加1mM EDTA使CHCC15712的质构增加25%(图6)。

[0164] 实施例6:测量二价金属离子含量的方法。

[0165] 已经针对细胞内二价离子浓度的含量分析了无扰乱的二价离子代谢的嗜热链球菌菌株。

[0166] 为了测定细胞内离子浓度,将细胞在M17-2%乳糖中培养过夜。

[0167] 将50ml以5000rpm离心10分钟后,用50ml M17-2%乳糖培养基洗涤细胞。将所有试管以5000rpm离心10分钟,弃去上清液,然后用5ml PBS缓冲液洗涤细胞(用Chelex o/n处理,10g于1升缓冲液中)。将所有试管以5000rpm离心10分钟,然后用5ml PBS缓冲液洗涤,以5000rpm离心10分钟,并洗涤/重悬于1ml PBS缓冲液中,并转移至2ml Eppendorf(微量离心)管中。然后将所述试管以 $15,000 \times g$ 离心15分钟,并尽可能多地弃去上清液。

[0168] 将试管在RT(室温)下以speedvac o/n干燥。称重所有颗粒。

[0169] 称重后,通过加入200μL含有0.1%Triton X-100的浓缩(65%)硝酸,在95℃下振荡试管10分钟,然后将每个试管涡旋20秒,使颗粒溶解。

- [0170] 涡旋后,将试管以 $15.000 \times g$ 离心5分钟,并取出上清液置于新试管中。
- [0171] 通过ICP-MS(电感耦合等离子体质谱法)测定样品的金属离子浓度。
- [0172] 结果(参见图7a、7b和7c)表示为单位为mg/kg干重细胞的离子浓度。因此,在本上下文中,术语ppm(百万分率)应理解为每Kg干重细胞质量测量的离子mg。
- [0173] 本文描述了本发明的优选实施方案,包括发明人已知的实施本发明的最佳方式。在阅读前面的说明后,那些优选实施方案的变化对于本领域普通技术人员来说可以变得显而易见。发明人预期熟练的技术人员酌情采用这些变化,并且发明人预期本发明以不同于本文具体描述的方式实施本发明。因此,本发明包括适用法律所允许的所附权利要求中所述主题的所有修改和等同物。此外,除非本文另有说明或上下文明显矛盾,否则本发明涵盖上述元素的所有可能变化的任何组合。

附图说明

- [0174] 图1a描绘了来自芽孢杆菌(*Bacillus*)、格氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)和CHCC9844的Fur盒的比对。在所有三种菌株中发现的核苷酸涂为红色,芽孢杆菌和CHCC9844之间共有的核苷酸涂为绿色,CHCC9844和戈氏链球菌之间共有的核苷酸涂为蓝色。
- [0175] 图1b描绘了嗜热链球菌CHCC9844中的启动子区和epsA基因的第一部分。假设的fur盒涂为蓝色。图中示出了启动子区域的其他特征。
- [0176] 图2描绘了用质构化突变体CHCC15712进行的粘度测试。通过计算自25ml容量移液管的流出时间来测量粘度。该图显示了三次测量的平均值。
- [0177] 图3描绘了分泌于M17肉汤中的胞外多糖的单糖组成。单一单糖的浓度以ppm表示。
- [0178] 图4描绘了用fur突变体KA 509进行的粘度测试。通过计算自25ml容量移液管的流出时间来测量粘度。该图显示了三次测量的平均值。
- [0179] 图5描绘了使用来自CHCC9844的四种亚碲酸盐抗性突变体进行的粘度测试。通过计算自25ml容量移液管的流出时间(秒)来测量粘度。该图显示了三次测量的平均值。
- [0180] 图6描绘了在含有和不含1mM EDTA的乳中进行的粘度测试。通过计算自25ml容量移液管的流出时间(秒)来测量粘度。该图显示了三次测量的平均值。
- [0181] 图7a、7b和7c分别描述了Fe、Mg和Mn的细胞内浓度。
- [0182] 保藏和专家解决方案
- [0183] 菌株嗜热链球菌CHCC15712于2012年4月27日以保藏号DSMZ 25955保藏于DSMZ(德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), 因霍芬街7B, 布伦瑞克D-38124, 德国)。
- [0184] CHCC4895于2007年3月29日以保藏号DSMZ 19242保藏于DSMZ。
- [0185] CHCC8833于2006年1月11日以保藏号DSMZ 17876保藏于DSMZ。
- [0186] 根据有关国际上认可的用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约进行保藏。
- [0187] 本申请人请求所保藏微生物的样品应仅供本申请人批准的专家使用。
- [0188] 参考文献
- [0189] Lin et al., *Microbiology* (2011), 157, 419-429.
- [0190] E.P.Skaar, *PLoS Pathog.* (2010) Aug 12; 6 (8) :e1000949.
- [0191] Baichoo et al., *Molecular Microbiology* (2002) 45 (6) , 1613-1629.

[0192] Kosikowski, F.V. and Mistry, V.V., "Cheese and Fermented Milk Foods (干酪和发酵乳食品)", 1997, 3rd Ed. F.V. Kosikowski, L.L.C. Westport, CT

[0193] Albert Saavedra et al., 2013, Advanced Materials Research (先进材料研究), 825, 115

[0194] 本专利文件中引用的所有参考文献均在此通过引用整体并入本文。

[0001]

20190222



2017800515207

关于微生物保藏の説明

申请人或代理人档案号 P4419PC02	国际申请号 PCT/EP2017/071352
----------------------	-------------------------

关于微生物保藏の説明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

微生物保藏の説明	
A.对说明书第 17 页, 第 20 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的説明	
B. 保藏事項	更多的保藏在附加頁説明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 德国	
保藏日期 2012-04-27	保藏号 DSM25955
C.补充説明 (必要时)	更多信息在附加頁中 <input type="checkbox"/>
样品仅可提供给专家	
D.本説明是为下列指定国作的 (如果説明不是为所有指定国而作的) 所有指定国	
E.补充説明 (必要时) 下列説明将随后向国际局提供 (写出説明的类别, 例如: “保藏的编号”) DSM25955	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本頁已经和国际申請一起收到
授权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本頁日期
授权官员

[0002]

20190222



附页

微生物保藏(2)	
A.对说明书第 17 页, 第 23 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>	
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 德国	
保藏日期 2007-03-29	保藏号 DSM19242
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>	
样品仅可提供给专家	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的) 所有指定国	
E.补充说明(必要时) 下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”) DSM19242	

微生物保藏(3)	
A.对说明书第 17 页, 第 24 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>	
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 德国	
保藏日期 2006-01-11	保藏号 DSM17876
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>	

[0003]

20190222



附页

样品仅可提供给专家
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）
所有指定国
E.补充说明（必要时）
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） DSM17876

图1A

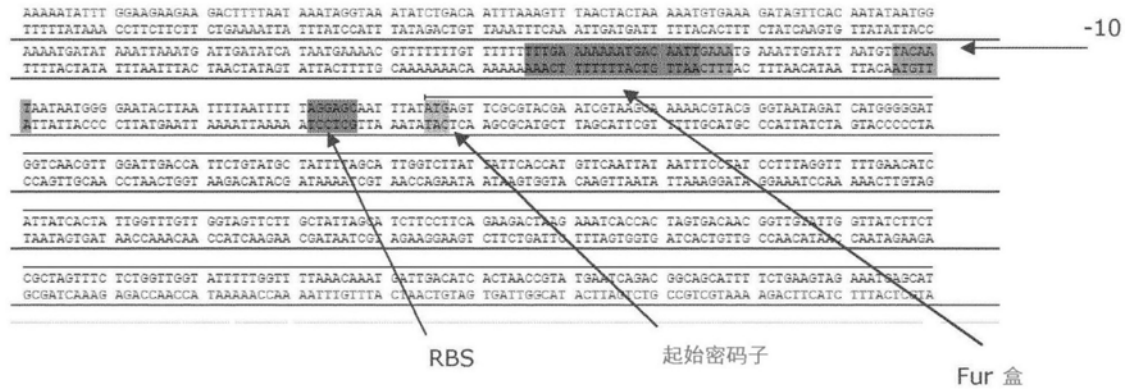


图1B

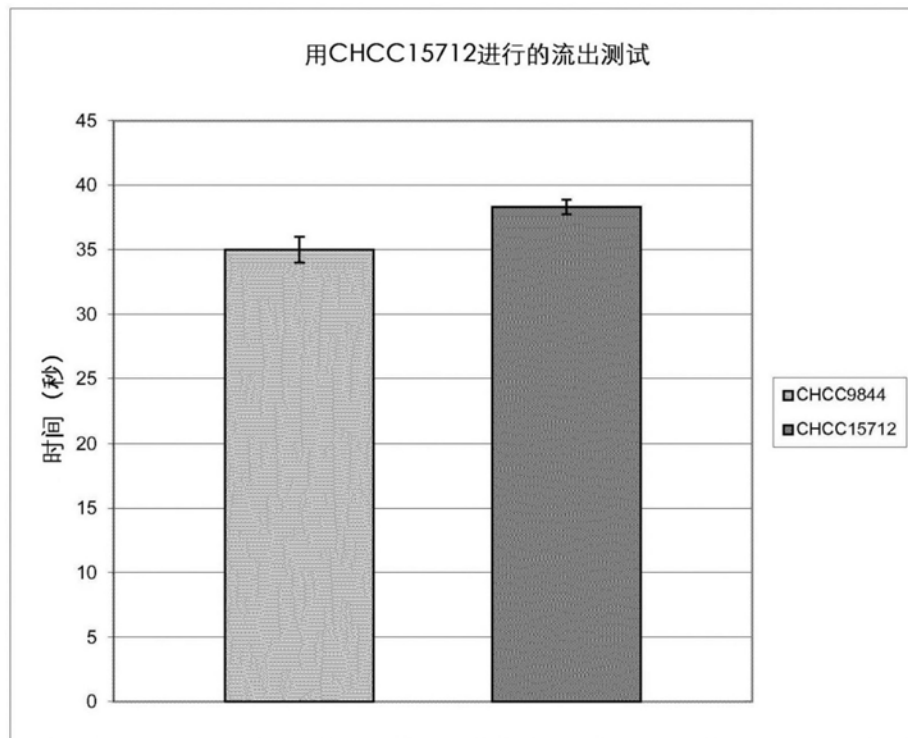


图2

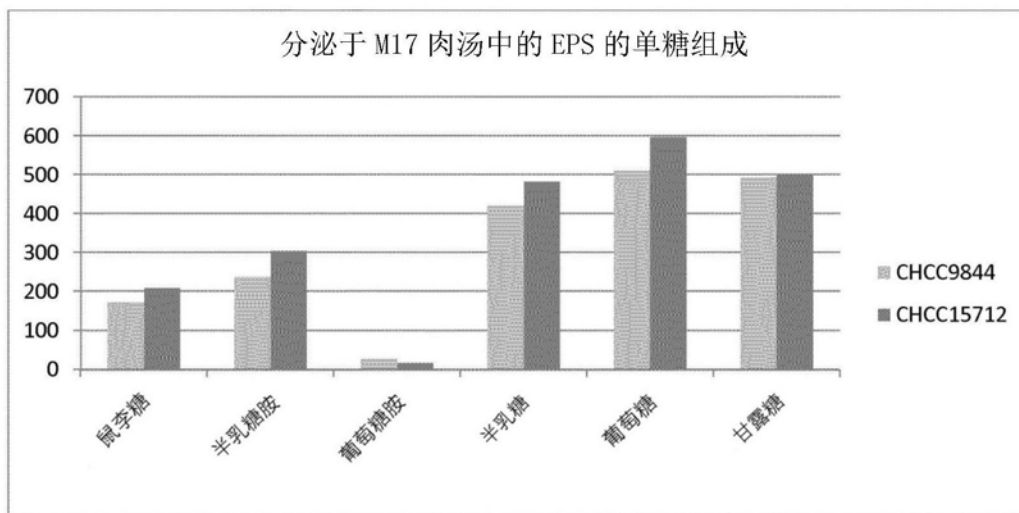


图3

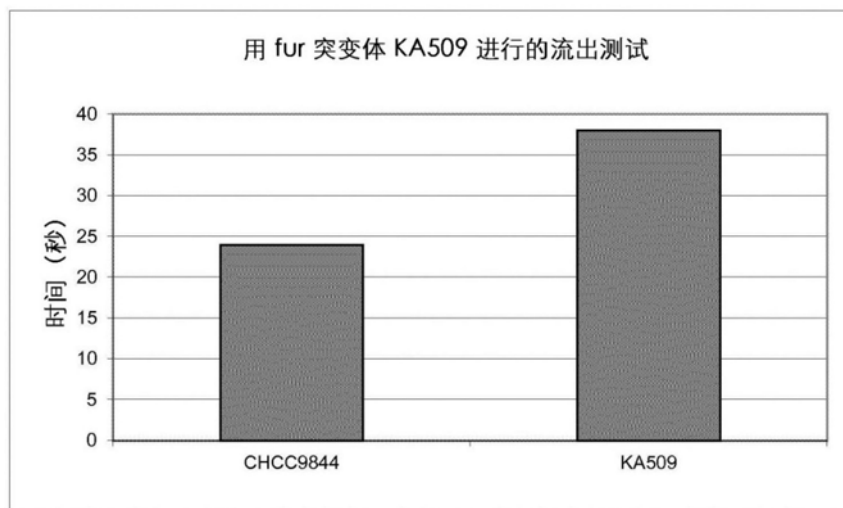


图4

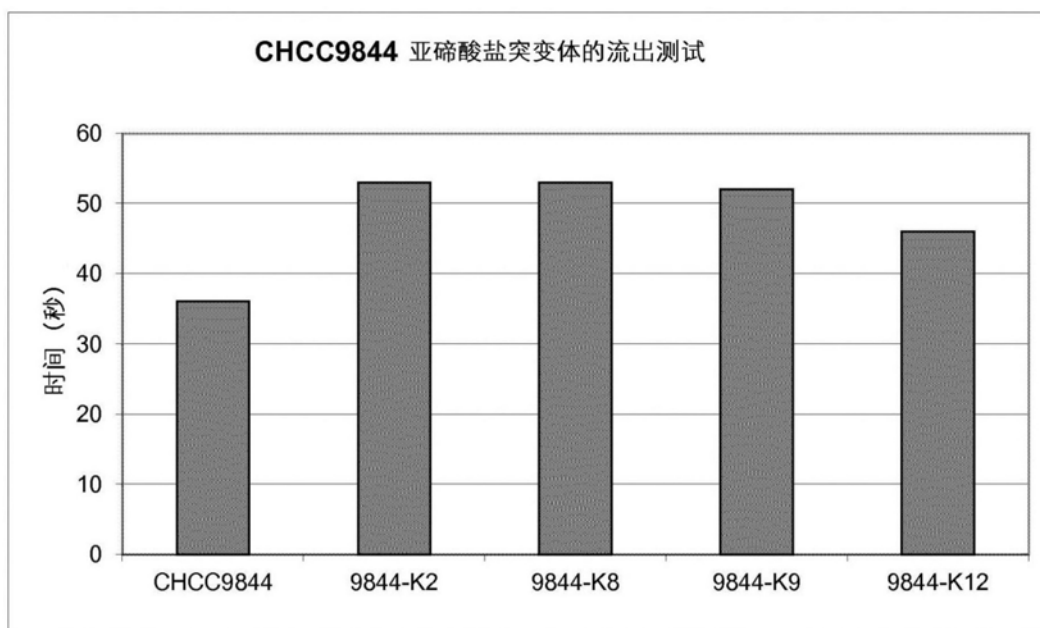


图5

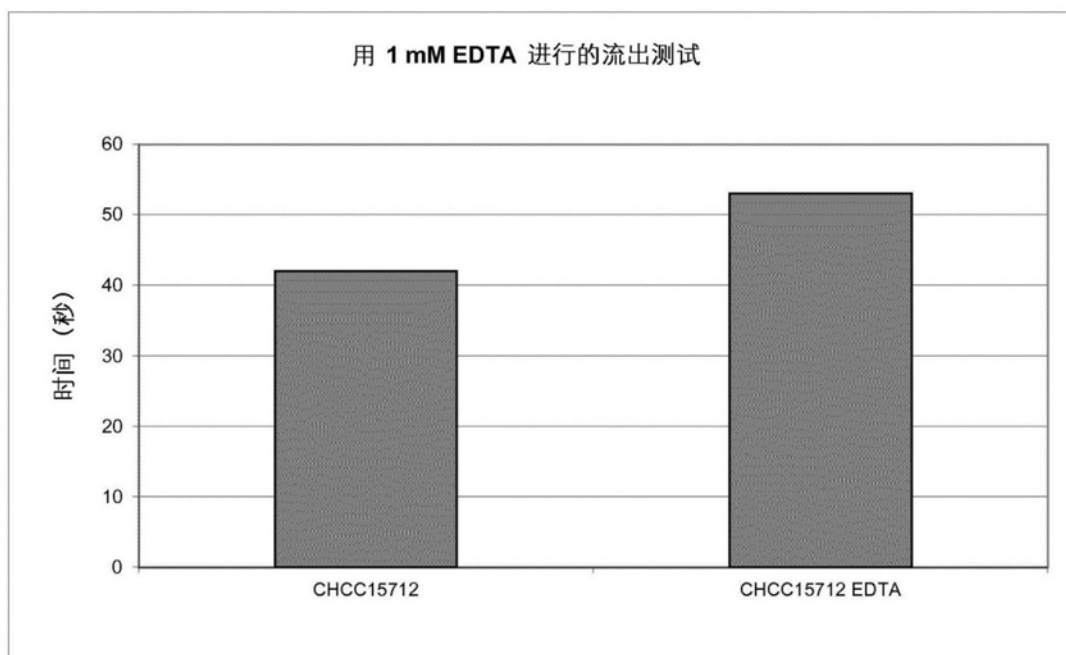


图6

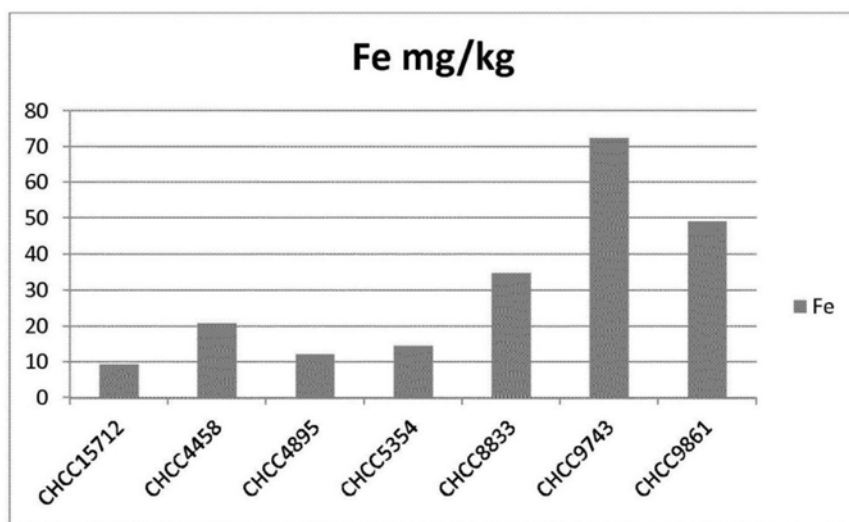


图7a

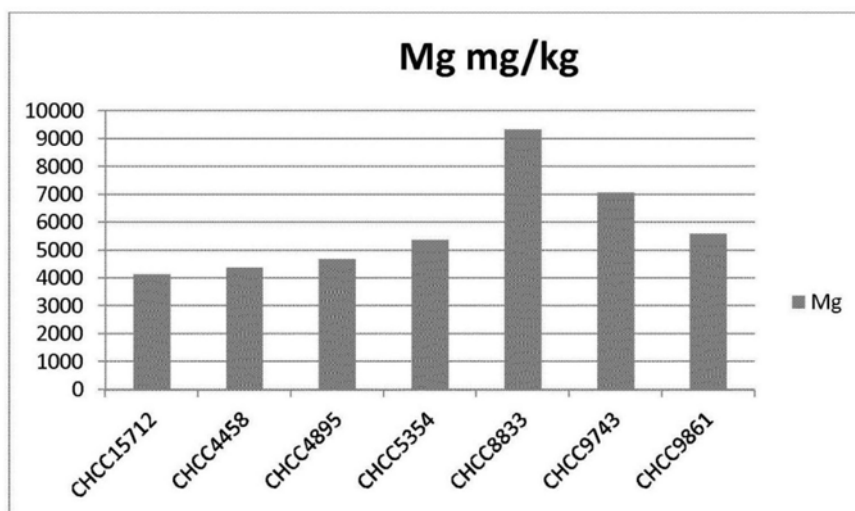


图7b

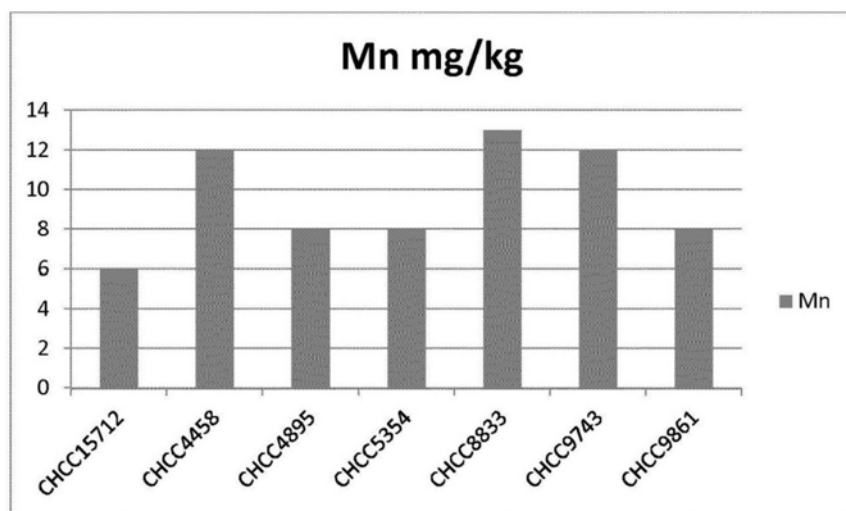


图7c