



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115812099 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 17

(21) 申请号 202180032207.5

DSM 33517 2020.05.05

(22) 申请日 2021.05.20

DSM 33518 2020.05.05

(30) 优先权数据

DSM 33519 2020.05.05

20177382.7 2020.05.29 EP

DSM 33520 2020.05.05

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(71) 申请人 科·汉森有限公司

2022.10.31

地址 丹麦赫斯霍尔姆

(86) PCT国际申请的申请数据

(72) 发明人 C·L·M·尼尔森

PCT/EP2021/063460 2021.05.20

S·比德斯特鲁普

薇拉·库欣娜·波尔森

(87) PCT国际申请的公布数据

S·席德勒 K·I·瑟伦森

W02021/239574 EN 2021.12.02

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司

公司 11713

(83) 生物保藏信息

专利代理师 王建秀 刘小立

DSM 32092 2015.07.16

DSM 32093 2015.07.16

DSM 32094 2015.07.16

DSM 33515 2020.05.05

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

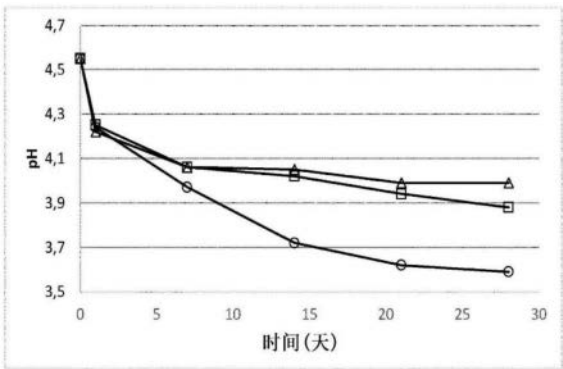
权利要求书2页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

低后酸化的生物保护性乳酸菌

(57) 摘要

本发明属于乳制品技术领域。其涉及生产发酵乳制品的方法,特征在于使用了细菌鼠李糖乳杆菌(Lactobacillus rhamnosus)DSM 33515或从其能获得的突变体。鼠李糖乳杆菌细菌DSM 33515在发酵乳制品中具有低的后酸化,并且可以提供抗微生物作用。本发明还提供了鼠李糖乳杆菌DSM 33515或从其能够获得的突变体以及相关组合物。



1. 作为DSM 33515保藏的物种鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 的细菌或从所保藏的细菌能够获得的突变体鼠李糖乳杆菌, 其中所述保藏的细菌或所述突变体:

(a) 与包含作为DSM 32092保藏的鼠李糖乳杆菌细菌的乳制品相比, 在发酵后的储存期间, 增加包含所述保藏的细菌或所述突变体的发酵乳制品的pH, 其中pH的增加为至少0.1的值, 并且其中pH的增加是在将用起子培养物和浓度为至少 10^7 CFU/g的所述鼠李糖乳杆菌的菌株发酵的制品在25°C下储存超过28天后测定的; 和

(b) 与不包含所述保藏的细菌或所述突变体的乳制品相比, 在发酵后的储存期间, 降低包含所述保藏的细菌或所述突变体的发酵乳制品的霉菌生长, 其中霉菌生长的降低是在将用起子培养物和浓度为至少 10^7 CFU/g的所述突变体发酵的制品在7°C下储存超过28天后测定的。

2. 作为DSM 33515保藏的物种鼠李糖乳杆菌的细菌或从所保藏的细菌能够获得的突变体鼠李糖乳杆菌, 其中与包含作为DSM 32092保藏的菌株鼠李糖乳杆菌的细菌的乳制品相比, 所述保藏的细菌和所述突变体在发酵后的储存期间增加包含所述保藏的细菌或所述突变体的发酵乳制品的pH, 其中pH的增加为至少0.1的值, 并且其中pH的增加是在将用起子培养物和浓度为至少 10^7 CFU/g的所述鼠李糖乳杆菌菌株发酵的制品在25°C下储存超过28天后测定的。

3. 作为DSM 33515保藏的物种鼠李糖乳杆菌的细菌或从所保藏的细菌能够获得的突变体鼠李糖乳杆菌, 其中与不包含所述保藏的细菌或所述突变体的乳制品相比, 所述保藏细菌和所述突变体在发酵后的储存期间降低包含所述保藏的细菌或者所述突变体的发酵乳制品中的霉菌生长, 其中霉菌生长的降低是在将由起子培养物和浓度为至少 10^7 CFU/g的所述保藏的细菌或所述突变体发酵的制品在7°C下储存超过28天后测定的。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的细菌, 其中与不包含所述保藏的细菌或所述突变体的乳制品相比, 所述保藏的细菌和所述突变体在发酵后的储存期间降低包含所述保藏的细菌或所述突变体的发酵乳制品中酵母的生长, 其中酵母生长的降低是在将用起子培养物和浓度为至少 10^7 CFU/g的所述保藏的细菌或所述突变体发酵的制品在7°C下储存超过28天后测定的。

5. 组合物, 包含权利要求1-4中任一项所述的物种鼠李糖乳杆菌的细菌。

6. 根据权利要求5所述的组合物, 其中所述组合物进一步包含起子培养物。

7. 根据权利要求5或6中任一项所述的组合物, 其中所述组合物进一步包含冷冻保护剂、冻干保护剂、抗氧化剂和/或营养物。

8. 根据权利要求5-6中任一项所述的组合物, 其中所述组合物是冷冻的或冷干的。

9. 生产发酵乳制品的方法, 包括将根据权利要求1-4中任一项所述的物种鼠李糖乳杆菌的细菌或根据权利要求5-8中任一项所述的组合物添加到乳或乳制品中, 并使混合物在约22°C至约43°C的温度下发酵, 直至pH达到4.6或小于4.6。

10. 发酵乳制品, 其包含根据权利要求1-4中任一项所述的物种鼠李糖乳杆菌的细菌。

11. 根据权利要求10所述的发酵乳制品, 其中所述发酵乳制品是通过根据权利要求9所述的方法获得的。

12. 根据权利要求10-11中任一项所述的发酵乳制品, 其中所述发酵乳制品当在25°C下储存至少28天时将pH保持在高于3.8。

13. 根据权利要求10-12中任一项所述的发酵乳制品,其中所述物种鼠李糖乳杆菌菌株的细菌以至少 10^7 CFU/g的浓度存在。

14. 食品、饲料或药品,包含根据权利要求1-4中任一项所述的细菌或根据权利要求5-8所述的组合物。

15. 根据权利要求14所述的食物、饲料或药品,能够通过权利要求9所述的方法获得。

低后酸化的生物保护性乳酸菌

技术领域

[0001] 本发明涉及减少发酵乳制品的后酸化并可以提供抗微生物作用的鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 细菌。后酸化和微生物污染是在贮存于冷藏温度以上的发酵乳制品中经常观察到的影响。本发明还提供了包含该细菌的起子培养物、使用该细菌或培养物生产发酵乳制品的方法以及由此获得的发酵乳制品,包括食品、饲料和药品。

背景技术

[0002] 乳酸菌 (lactic acid bacteria, LAB) 几十年来一直用于延长食品的保质期。在发酵期间,乳酸菌会产生乳酸和其他有机化合物,从而降低食品的pH,从而使得其不利于酵母和霉菌等不良微生物的生长。

[0003] 生物保护被定义为使用天然或受控抗微生物化合物延长食品的保质期和增强食品的安全性。在乳制品中,霉菌和酵母细胞的腐败是不利地影响保质期的主要问题之一。在过去的十年中,人们已经投入了大量努力来探索LAB的生物保护潜力,以从各种食物来源中鉴定具有生物保护特性的新菌株,并阐明观察到的生物活性背后的机制。LAB产生的许多代谢物已被鉴定为具有抗真菌活性。

[0004] 进一步的研究表明,不同生物对有限资源的竞争性排斥是乳酸菌抑制真菌生长的主要机制。特别是,必需微量元素锰的耗竭是乳制品中乳酸菌的主要生物保护机制。还表明,锰清除是一种积极的机制,它需要能量来维持高锰梯度 (Siedler et al. "Competitive exclusion is a major bioprotective mechanism of lactobacilli against fungal spoilage in fermented milk products." *Applied and environmental microbiology* 86.7 (2020))。

[0005] 同时,已经发现,生物保护性菌株的高抗真菌活性通常伴随着高活性,这会导致后酸化,即发酵终止后继续酸化。LAB中生物保护性化合物的产生通常显示出与生长相关的动力学,因此,如果生长减少,预计其会停止 (Lv et al. "Modelling the production of nisin by *Lactococcus lactis* in fed-batch culture." *Applied microbiology and biotechnology* 68.3 (2005): 322-326)。由于乳酸化通常与生长有关 (Dandoy et al. "The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS." *Microbial cell factories*. Vol.10.No.S1.BioMed Central, 2011), 预计表现出后酸化减少的菌株也会具有减少的生物保护作用。

[0006] 欧洲专利EP16182341B1公开了具有抗微生物作用的鼠李糖乳杆菌菌株 CBS141584。然而,没有提到低后酸化。

[0007] 因此,开发提供低后酸化和高生物保护作用组合的新型生物保护菌株被视为一项挑战。

发明内容

[0008] 因此,本发明提供了作为DSM 33515保藏的物种鼠李糖乳杆菌的细菌或可从该保藏的细菌获得的突变鼠李糖乳杆菌。

[0009] 保藏的细菌或可从其获得的突变体能够:

[0010] (a) 与包含作为DSM 32092保藏的鼠李糖乳杆菌细菌的乳制品相比,在发酵后的储存期间,增加包含保藏的细菌或突变体的发酵乳制品的pH,其中pH的增加值为至少0.1的值,并且其中pH的增加是在将用起子培养物和浓度为至少 10^7 CFU/g的鼠李糖乳杆菌菌株发酵的制品在25℃下储存超过28天后测定的;和

[0011] (b) 与不包含保藏的细菌或突变体的乳制品相比,在发酵后的储存期间,降低包含保藏的细菌或突变体的发酵乳制品的霉菌生长,其中霉菌生长的降低是在将用起子培养物和浓度为至少 10^7 CFU/g的所述突变体发酵的制品在7℃下储存超过28天后测定的。

[0012] 在另一个实施方案中,本发明提供了作为DSM 33515保藏的物种鼠李糖乳杆菌的细菌或可从所保藏的细菌获得的突变鼠李糖乳杆菌,其中与包含作为DSM 32092保藏的鼠李糖乳杆菌细菌的乳制品相比,所保藏的细菌或所述突变体在发酵后的储存期间增加包含所保藏的细菌或突变体的发酵乳制品的pH,其中pH的增加为至少0.1的值,并且其中pH的增加是在将用起子培养物和浓度为至少 10^7 CFU/g的鼠李糖乳杆菌菌株发酵的制品在25℃下储存超过28天后测定的。

[0013] 在另一方面,本发明提供了作为DSM 33515保藏的物种鼠李糖乳杆菌的细菌或可从所保藏的细菌获得的突变鼠李糖乳杆菌,其中与不包含保藏的细菌或突变体的乳制品相比,保藏的细菌和突变体在发酵后的储存期间降低包含保藏的细菌或突变体的发酵乳制品中的霉菌生长,其中霉菌生长的降低是在将用起子培养物和浓度为至少 10^7 CFU/g的保藏的细菌或突变体发酵的制品在7℃下储存超过28天后测定的。

[0014] 本发明还提供了包含上述物种鼠李糖乳杆菌的细菌的组合物。在一个实施方案中,该组合物还包含起子培养物。在另一个实施方案中,该组合物还包含至少一种冷冻保护化合物。在优选的实施方案中,组合物是冷冻或冷干的。

[0015] 本发明还提供了生产发酵乳制品的方法,包括将上述物种鼠李糖乳杆菌菌株的细菌或包含该细菌的组合物添加到乳或乳制品中,并在约22℃至约43℃的温度下使混合物发酵,直至pH达到4.6或小于4.6。

[0016] 本发明提供了包含上述物种鼠李糖乳杆菌的细菌的发酵乳制品。优选通过上述方法获得发酵乳制品。在另一个实施方案中,发酵乳制品在25℃下储存至少28天时将pH保持高于3.8。在另一个实施方案中,物种鼠李糖乳杆菌的细菌以至少 10^7 CFU/g的浓度存在。

[0017] 此外,本发明提供了包含上述物种鼠李糖乳杆菌的细菌或包含该细菌的组合物、食品、饲料或药品。在优选的实施方案中,食品、饲料或药品可通过上述方法获得。

附图说明

[0018] 图1

[0019] 图1显示了发酵乳制品在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存28天时随时间变化的pH发展。该制品是用以下发酵的:仅起子培养物(FD-DVS YF-L812,含有德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)和嗜热链球菌(*Streptococcus*

thermophilus)) (参考 Δ), 或起子培养物与作为DSM 33515保藏的细菌的组合 ($\square$), 或起子培养物与作为DSM 32092保藏的细菌的组合 (0)。

[0020] 图2

[0021] 图2显示了发酵乳制品在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存28天时随时间变化的pH发展。该制品是用以下发酵的: 仅起子培养物 (FD-DVS Premium 5.0, 含有德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌) (参考 Δ), 或起子培养物与作为DSM 33515保藏的细菌的组合 ($\square$), 或起子培养物与作为DSM 32092保藏的细菌的组合 (0)。

[0022] 图3

[0023] 图3显示了霉菌在由用以下发酵的乳制备的平板上的生长: 单独的起子培养物 (参考, 第一列), 或起子培养物与作为DSM 33515保藏的鼠李糖乳杆菌细菌的组合 (第二列), 或起子培养物与作为DSM3209保藏的鼠李糖乳杆菌细菌的组合 (第三列)。以500个孢子/斑点的浓度添加靶污染物: (A) 短密青霉 (*P.brevicompactum*)、(B) 皮落青霉 (*P.crustosum*)、(C) 离生青霉 (*P.solitum*)、(D) 卡尼青霉 (*P.carneum*)、(E) 酒青霉 (*P.paneum*) 和 (F) 娄地青霉 (*P.roqueforti*)。将平板在 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 下孵育28天。

[0024] 图4

[0025] 图4显示了发酵乳制品在 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存28天时随时间变化的pH发展。制品用以下发酵: 仅起子培养物 (参考, 0), 或与作为DSM 33515保藏的细菌组合的起子培养物 ($\square$), 或与CBS141584组合的起子培养物 (Δ)。

[0026] 图5

[0027] 图5显示了发酵乳制品在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存28天时随时间变化的pH发展。制品是用以下发酵的: 仅起子培养物 (参考, 0), 或起子培养物与作为DSM 33515保藏的细菌的组合 ($\square$), 或起子培养物与鼠李糖乳杆菌菌株CBS141584的组合 (Δ)。

具体实施方式

[0028] 具有生物保护作用、为传统发酵制品提供安全的添加方案的食物培养物是可获得的, 包括鼠李糖乳杆菌培养物DSM 32092。这些生物保护菌株与普通起子培养物组合用于将乳共同发酵成发酵制品。在发酵期间, DSM 32092会发挥生物保护作用, 从而针对霉菌和酵母菌延长发酵制品的保质期。在特定pH时, 使许多乳制品 (例如酸奶) 的发酵停止, 并将制品冷却, 发酵后, 细菌通常在储存期间仍然具有活性。由此产生进一步的乳酸, 该过程称为后酸化。所得的最终产物的较低pH对产物具有负面的感官影响, 因此是不期望的。本文描述的本发明包括开发表现出后酸化减少和高生物保护作用组合的新的和改善的生物保护菌株。对DSM 32092的11000多个突变体进行的广泛筛选导致鉴别出了菌株DSM 33515。该菌株提供低后酸化和高抗真菌活性。

[0029] 因此, 本发明的鼠李糖乳杆菌菌株, 即作为DSM 33515保藏的菌株和保持有利特性的突变体, 其特征在于, 包含所述菌株的发酵乳制品在 25°C 下储存至少28天时将pH保持在高于3.8, 其中所述发酵乳制品通过包括以下的方法获得: 将所述鼠李糖乳杆菌菌株或上述包含该菌株的组合物添加到乳或乳制品中, 并在约 22°C 至约 43°C 的温度下使该混合物发酵, 直至pH达到4.6或小于4.6, 摇动发酵制品并冷却。应当理解, 指定本发明的鼠李糖乳杆菌菌株在 25°C 下储存至少28天时可将pH保持在高于3.8这一特征, 仅仅表征通常用于确定

效果的测定。实际上,不必或不要求将本发明的鼠李糖乳杆菌菌株、包含该菌株的组合物,包括食品或饲料产品,储存在这些条件下。

[0030] 本发明的鼠李糖乳杆菌菌株是按如下生成的:

[0031] 使用甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变从母株 DSM 32092 获得突变库。进行预实验以确定 EMS 对该菌株的效力和杀伤率。 $\geq 95\%$ 的杀伤率是目标。基于此,将 15 μ l EMS 添加到 1ml 过夜培养物中 (OD_{620} 约 3-4)。然后将培养物在 37°C 下孵育 4h,接着稀释成 10^{-2} 至 10^{-6} 的系列。随后,将稀释的培养物铺展在 MRS 平板上,以测试细胞计数。使用无菌玻璃珠将突变库铺展在 MRS-Difco 琼脂上,并在 37°C 厌氧孵育 2 天。使用菌落拾取机器人拾取约 11,000 个单菌落,然后接种于 96 孔低孔微量滴定板中的 200 μ l MRS-Difco 肉汤中,并在 37°C 下厌氧孵育过夜。将 20 μ l 的体积用于乳酸化,将剩余体积用甘油 (20%) 富集、冷冻并储存。将 20 μ l 的体积转移到 96 孔深孔板中,该深孔板含有 1980 μ l 富含 2% 蔗糖和 pH 颜色指示剂的 UHT 脱脂乳 (1% 接种物),并在 40°C 下孵育 40h。UHT 脱脂乳通过以下方式制备:将含有 38% 蛋白质、53% 乳糖、< 1.25 脂肪和 3.9% 水分的脱脂乳粉 (丹麦 Arla Foods amla) 重构至 9.5% 的干物质水平,并在 99°C 下巴氏杀菌 30min,然后冷却至 40°C。使用 Poulsen 等人 2019 年 (Poulsen et al. 2019 (Poulsen, V.K., Derkx, P., Oregaard, G. (2019): "High-Throughput Screening for Texturing Lactococcus Strains". FEMS Microbiological Letters)) 描述的 pH 颜色法在底部扫描含有酸化乳的板,其中颜色 (色调) 值被转换为 pH 值。在 5 个 96 孔微量滴定板中收集 462 个在 MRS-Difco 肉汤中生长良好且终端 pH 高于母株的突变菌株,并在存在或不存在起子培养物 YF-L812 (德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌) 的情况下用于酸化乳。将接种的 pH 颜色指示剂乳样品孵育在平板扫描仪 (HP ScanJet G4010) 的顶部,温度控制罩设置为 40°C,当存在起子培养物时孵育 20h,或在不存在起子培养物时孵育 40h。评估 462 份发酵乳样品和对照 (未接种任何菌株和母株 DSM 32092 的乳) 抑制来自物种汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*) 的酵母菌株的能力,该菌株此前已作为腐败菌株从酸奶中分离出来。将 150 μ l 发酵乳转移到 96 孔板中的单个孔中,并用约 20 个汉逊德巴利酵母菌株细胞接种孔。在 17°C 下孵育 4 天后,在选择性 YGC 琼脂平板上点样稀释行,以通过光学检查分析酵母生长。对与母株相比终端 pH 提高 (至少 0.2 个单位) 的先导物 (lead) (至少能够与母株一样好地抑制汉逊德巴利酵母) 进行三轮单菌落纯化,并随后在奶瓶 (200ml 规格) 中表征其乳酸化特性和其酵母抑制能力。有趣的是,绝大多数非后酸化先导物丧失了抑制酵母的能力。462 份先导物中只有约 1% 保留了其生物活性,即具有与母株相似的生物活性,但未后酸化。从中选择了 DSM 33515,因为它是具有非常好的感官特性的表现最佳的菌株。

[0032] 本发明的鼠李糖乳杆菌菌株具有特殊优点,因为它在保持抗真菌活性的同时降低了后酸化风险,从而提高了用这些细菌制成的食品的储存稳定性,特别是在高于冷藏温度的条件下的储存稳定性。

[0033] 与作为 DSM 32092 保藏的鼠李糖乳杆菌细菌菌株相比,突变体引起的 pH 增加达到至少 0.1 的值。该增加是在将发酵制品于 25°C 下储存超过 28 天后测定的。

[0034] 在本申请的上下文中,术语“乳酸菌”或“LAB”用于表示产生乳酸作为碳水化合物发酵的主要代谢终产物的食品级细菌。这些细菌因其共同的代谢和生理特征而相关,通常为革兰氏阳性、低 GC、耐酸、不产孢、无呼吸、杆状杆菌或球菌。在发酵阶段,这些细菌对乳糖的消耗会导致乳酸的形成,降低 pH 并导致蛋白质凝块形成。因此,这些细菌负责乳的酸化和

乳制品的质地。如本文所用,术语“乳酸菌”包括但不限于属于以下属的细菌:乳杆菌属的物种(*Lactobacillus* spp.)、双歧杆菌属的物种(*Bifidobacterium* spp.)、链球菌属的物种(*Streptococcus* spp.)、乳球菌属的物种(*Lactococcus* spp.),例如德氏乳杆菌保加利亚亚种、嗜热链球菌、乳酸乳杆菌(*Lactobacillus lactis*)、动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*),以及明串珠菌属的物种(*Leuconostoc* spp.)。

[0035] “霉菌”是以称为菌丝的多细胞丝形式生长的真菌。与霉菌有关的术语“抑制”是指霉菌的生长或孢子形成的降低或霉菌数量或浓度的减少,例如,与不包含此类细菌的食品相比,在包含本发明细菌的食品中和/或包含本发明细菌的食品表面上。本发明的鼠李糖乳杆菌菌株提供的抑制程度优选通过在存在和不存在鼠李糖乳酸杆菌细菌的情况下在琼脂固化发酵乳上生长来测定。霉菌的实例是青霉属(*Penicillium*)的成员,例如离生青霉、短密青霉、皮落青霉、娄地青霉、酒青霉以及卡尼青霉。

[0036] 酵母是以单细胞形式生长的真菌。本发明的鼠李糖乳杆菌菌株,即保藏为DSM 33515的菌株和保持有利特性的突变体抑制霉菌生长并可进一步抑制酵母生长。就酵母菌的生长而言,术语“抑制”还指酵母菌生长的降低或酵母数量或浓度的减少,例如,与不包含此类细菌的食品相比,在包含本发明细菌的食品中和/或包含本发明细菌的食品表面上。同样,本发明的鼠李糖乳杆菌菌株提供的抑制程度优选通过在存在和不存在鼠李糖乳酸杆菌细菌的情况下在琼脂固化发酵乳上生长来测定。

[0037] 用于确定发酵乳制品中霉菌或酵母生长降低的测定优选通过以下方式进行:给乳接种单独的起子培养物以及起子培养物和浓度至少为 10^7 CFU/g的本发明的鼠李糖乳杆菌,使乳发酵,直至pH达到4.6,将发酵乳与琼脂混合,将混合物填充到琼脂平板中,以500个孢子/斑点的浓度添加靶霉菌和/或酵母污染物,将平板在7℃下储存28天,并将含有本发明鼠李糖乳杆菌的平板上的霉菌和/或酵母的生长与仅含有商业起子培养物的平板进行比较。实施例2中提供了各测定的全部细节。

[0038] 在本发明的上下文中,术语“突变体”应理解为衍生自本发明的菌株的菌株,例如通过例如基因工程、辐射和/或化学处理。优选的是,突变体是功能等同突变体,例如,具有与保藏的菌株基本相同或改善的特性,特别是与抑制后酸化和/或生物保护的效果相关的特性。各突变体代表了本发明的实施方案。术语“突变体”特别是指通过使本发明的菌株经受任何常规使用的诱变处理(包括用化学诱变剂例如乙烷甲烷磺酸盐(EMS)或N-甲基-N'-硝基-N-硝基胍(NTG)处理)、紫外光而获得的菌株,或是指自发发生的突变体。突变体可能已经经历了多次诱变处理(单次处理应理解为一个诱变步骤,然后是筛选/选择步骤),但目前优选进行不超过20次或不超过10次或不超过5次处理(或筛选/选择步骤)。在目前优选的突变株中,与母株相比,细菌基因组中少于5%或少于1%或甚至少于0.1%的核苷酸被另一个核苷酸移位或缺失。

[0039] 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)使用术语“一(a/an)”以及“该/所述(the)”和类似的指示词应解释为涵盖单数和复数,除非本文中另有说明或上下文中明确矛盾。

[0040] 各组合物可包含许多其他细菌,包括LAB。因此,优选的本发明组合物的特征在于,该组合物还包含至少一种其他细菌,该细菌选自以下属和种中的一种或多种:乳杆菌属的物种、双歧杆菌属的物种、链球菌属的物种、乳球菌属的物种,例如德氏乳杆菌保加利亚亚种、嗜热链球菌、乳酸乳杆菌、动物双歧杆菌、乳酸乳球菌、副干酪乳杆菌、植物乳杆菌、瑞士乳杆菌、嗜酸乳杆菌、短双歧杆菌,以及明串珠菌属的物种。

[0041] 在特别优选的实施方案中,本发明的组合物包含作为DSM 33515保藏的物种鼠李糖乳杆菌的细菌或可从所保藏的细菌获得的突变鼠李糖乳杆菌和一种或多种其他细菌。在一个实施方案中,组合鼠李糖乳杆菌细菌的几种不同的菌株。

[0042] 本发明的组合物可以额外包含冷冻保护剂、冻干保护剂、抗氧化剂、营养物、填充剂、食用香料或其混合物。该组合物可以为冷冻或冻干形式。该组合物优选包含冷冻保护剂、冻干保护剂、抗氧化剂和/或营养物中的一种或多种,更优选冷冻保护剂、冻干保护剂和/或抗氧化剂,最优选冷冻保护或冻干保护剂或两者。本领域技术人员已知冷冻保护剂和冻干保护剂等保护剂的用途。合适的冷冻保护剂或冻干保护剂包括单糖、二糖、三糖和多糖(例如葡萄糖、甘露糖、木糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖、麦芽糊精、淀粉和阿拉伯树胶(阿拉伯胶)和类似物)、多元醇(例如赤藓糖醇、甘油、肌醇、甘露醇、山梨醇、苏糖醇、木糖醇和类似物)、氨基酸(例如脯氨酸、谷氨酸)、复合物(如脱脂乳、蛋白胨、明胶、酵母提取物)和无机化合物(例如三聚磷酸钠)。合适的抗氧化剂包括抗坏血酸、柠檬酸及其盐、没食子酸、半胱氨酸、山梨醇、甘露醇、麦芽糖。合适的营养物包括糖、氨基酸、脂肪酸、矿物质、微量元素、维生素(例如维生素B族、维生素C)。该组合物可以任选地包含其他物质,包括填充剂(例如乳糖、麦芽糊精)和/或食用香料。

[0043] LAB最通常以起子培养物的形式添加到乳中。本上下文中使用的术语“起子”或“起子培养物”是指负责乳基质的酸化的一种或多种食品级微生物的培养物,尤其是乳酸菌的培养物。起子培养物可以是新鲜的,但最常见的是冷冻或冻干的。这些产品也称为“直投式起子(Direct Vat Set)”(DVS)培养物,并且为了用于直接接种发酵容器或发酵罐而产生,以生产乳制品,例如发酵乳制品或奶酪。各起子培养物可从多种来源商购,包括Premium 5.0、YF-L812、F-DBA YoFlex Mild 2.0、F-DVS YF-L901、FD-DVS CH-1,四种可从Chr.Hansen商业获得的培养物含有嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种的混合物。

[0044] 在一个方面中,本发明因此提供了固体冷冻或冷干起子培养物形式的组合物,其包含浓度为每克冷冻材料至少 10^9 菌落形成单位(CFU)或浓度为每克冷冻材料至少 10^{10} CFU或浓度为每克冷冻材料至少 10^{11} CFU的乳酸菌。这些起子培养物还包含作为DSM 33515保藏的物种鼠李糖乳杆菌的细菌或可从所保藏的细菌获得的突变鼠李糖乳杆菌。

[0045] 还描述了鼠李糖乳杆菌菌株,其中该细菌的特征在于,与用含有作为DSM 32092保藏的鼠李糖乳酸杆菌细菌的相同起子培养物发酵的乳制品相比,其在发酵后的储存期间增加包含所述鼠李糖乳酸杆菌菌株的发酵乳制品的pH,其中pH的增加为至少0.1的值,并且其中pH的增加是在将用起子培养物和浓度为至少 10^7 CFU/g的鼠李糖乳杆菌发酵的制品在25℃下储存超过28天后测定的。

[0046] 在另一个实施方案中,本发明提供了生产发酵乳制品的方法,其包括将所述本发明的鼠李糖乳杆菌菌株或包含该菌株的组合物添加到乳或乳制品中,并在约22℃至约43℃的温度下使混合物发酵,直至pH达到4.6或小于4.6。

[0047] 在本申请的上下文中,术语“乳”以其常用含义广泛用于指由动物的乳腺或植物产生的液体。根据本发明,乳可以已经经过加工,并且术语“乳”包括全脂乳、脱脂乳、无脂乳、低脂乳、全脂乳、低乳糖乳或浓缩乳。无脂乳是无脂或脱脂的乳制品。低脂乳通常定义为含有约1%至约2%脂肪的乳。全脂乳通常含有2%或更多的脂肪。术语“乳”旨在包括来自不同哺乳动物和植物来源的乳。乳的哺乳动物来源包括但不限于奶牛、绵羊、山羊、水牛、骆驼、美洲驼、母马和鹿。乳的植物来源包括但不限于从大豆、豌豆、花生、大麦、大米、燕麦、藜麦、杏仁、腰果、椰子、榛子、芝麻籽和向日葵籽中提取的乳。在本发明的方法和制品中,最优选使用来自奶牛的乳作为发酵的起始原料。

[0048] 术语“乳”还包括减脂和/或低乳糖乳制品。各产品可使用本领域公知的方法来制备,并且可商业获得。可根据本领域已知的任何方法生产低乳糖乳,包括通过乳糖酶将乳糖水解为葡萄糖和半乳糖,或通过纳滤、电渗析、离子交换层析和离心。

[0049] 术语“乳制品”或“乳基质”在本申请中广泛用于表示基于乳或乳组分、可用作LAB生长和发酵的培养基的组合物。乳制品或乳基质包含源自乳的组分以及可用于LAB生长或发酵的任何其他组分。

[0050] 在发酵之前,可根据本领域已知的方法将乳基质均质化和巴氏杀菌。本文所用的“均质化”是指强烈混合以获得可溶性悬浮液或乳液。如果在发酵前进行均质化,可以进行均质化以将乳脂分解成较小的尺寸,使其不再与乳分离。这可以通过在高压下迫使乳通过小孔来实现。本文所用的“巴氏杀菌”是指处理乳基质以减少或消除活生物体(例如微生物)的存在。优选,通过将规定的温度保持规定的时间段来实现巴氏杀菌。通常通过加热达到规定的温度。可以选择温度和持续时间以杀死或灭活某些细菌,例如有害细菌。随后可以进行快速冷却步骤。

[0051] 本发明还提供了方法,其中将发酵制品储存在7℃以上的温度下,优选7℃至25℃的温度下。该制品可随时储存,但优选储存至少14天,并且其中发酵乳制品的pH在储存期间保持在pH 4.0以上。

[0052] 本发明还提供了生产食品、饲料或药品的方法,包括上述生产发酵乳制品的方法,和通过该方法可获得食品、饲料或药品。

[0053] 进行发酵以生产食品、饲料制品或药品。术语“发酵乳制品”、“食品”或“饲料”制品是指可通过本发明的发酵方法获得的制品,包括奶酪、酸奶、水果酸奶、酸奶饮料、脱乳清酸奶(strained yoghurt)(希腊酸奶、酸奶酪(Labneh))、夸克(quark)、鲜奶酪(fromage frais)和奶油奶酪。术语食品还包括其他发酵食品,包括发酵肉,例如发酵香肠和发酵鱼制品。

[0054] 术语“奶酪”应理解为包括任何奶酪,包括硬、半硬和软奶酪,例如以下类型的奶酪:茅屋奶酪(Cottage)、菲达奶酪(Feta)、切达奶酪(Cheddar)、帕尔马奶酪(Parmesan)、马苏里拉奶酪(Mozzarella)、埃曼塔尔奶酪(Emmentaler)、丹博奶酪(Danbo)、高达奶酪(Gouda)、荷兰球形干酪(Edam)、菲达型奶酪、蓝奶酪、盐水奶酪、卡蒙贝尔奶酪(Camembert)和布里奶酪(Brie)。本领域技术人员知道如何将凝块转化为奶酪,方法可在文献中找到,参见例如Kosikowski,F.V.,and V.V.Mistry,“Cheese and Fermented Milk Foods”,1997,3rd Ed.F.V.Kosikowski,L.L.C.Westport,CT。如本文所用,NaCl浓度低于1.7%(w/w)的奶酪称为“低盐奶酪”。

[0055] 在本申请的上下文中,术语“酸奶”是指包含嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种以及任选的其他微生物的制品,例如德氏乳杆菌乳酸亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*)、动物双歧杆菌乳酸亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*)、乳酸乳球菌、嗜酸乳杆菌和副干酪乳杆菌,或其衍生的任何微生物。包括除嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种以外的乳酸菌株是为了赋予成品各种特性,例如促进菌群平衡的特性。如本文所用,术语“酸奶”包括凝固型酸奶、搅拌型酸奶、饮用酸奶、小瑞士酸奶 (*Petit Suisse*)、热处理酸奶、以高蛋白水平为特征的脱乳清酸奶或希腊型酸奶以及类似酸奶的制品。

[0056] 特别是,术语“酸奶”包括但不限于根据法国和欧洲法规定义的酸奶,例如,仅通过特定嗜热乳酸菌(即德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌)的乳酸发酵而获得的凝结乳制品,该嗜热乳酸菌同时培养并发现以至少1000万CFU(菌落形成单位)/g的量在最终制品中存活。酸奶可以任选地含有添加的乳原料(例如奶油)或其他成分,例如糖或甜味剂、一种或多种调味剂、水果、谷物或营养物质,特别是维生素、矿物质和纤维,以及稳定剂和增稠剂。任选地,酸奶满足AFNOR NF 04-600标准和/或法典StanA-IIa-1975标准的发酵乳和酸奶的规范。为了满足AFNOR NF 04-600标准,发酵后产品不得加热制品,且乳原料必须占成品的至少70%(m/m)。

[0057] 保藏和专家解决方案

[0058] 申请人要求,根据《布达佩斯条约》缔约国工业产权局管辖的有效规定,在授予专利之日之前,仅向专家提供下文所述保藏的微生物的样品。

[0059] 申请人于2015-07-16日将鼠李糖乳杆菌菌株DSM 32092保藏在德国微生物保藏中心(*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*;DSMZ),布伦瑞克因霍芬街7B,D-38124(*Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig*),并且获得的登录号为DSM 32092。

[0060] 申请人于2015-07-16日将离生青霉DSM 32093保藏在德国微生物保藏中心(*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*;DSMZ),布伦瑞克因霍芬街7B,D-38124,并且获得的登录号为DSM32093。

[0061] 申请人于2015-07-16日将短密青霉DSM 32094保藏德国微生物保藏中心(*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*;DSMZ),布伦瑞克因霍芬街7B,D-38124,并且获得的登录号为DSM32094。

[0062] 申请人于2020-05-05日将鼠李糖乳杆菌DSM 33515保藏在德国微生物保藏中心(*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*;DSMZ),布伦瑞克因霍芬街7B,D-38124,并且获得的登录号为DSM 33515。

[0063] 申请人于2020-05-05日将皮落青霉DSM 33517保藏在德国微生物保藏中心(*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*;DSMZ),布伦瑞克因霍芬街7B,D-38124,并且获得的登录号为DSM33517。

[0064] 申请人于2020-05-05日将娄地青霉DSM 33518保藏在德国微生物保藏中心(*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*;DSMZ),布伦瑞克因霍芬街7B,D-38124,并且获得的登录号为DSM33518。

[0065] 申请人于2020-05-05将酒青霉DSM 33519保藏在德国微生物保藏中心(*Deutsche*

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦瑞克因霍芬街7B,D-38124,并且获得的登录号为DSM 33519。

[0066] 申请人于2020-05-05日将卡尼青霉DSM 33520保藏在德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦瑞克因霍芬街7B,D-38124,并且获得的登录号为DSM33520。

[0067] 实施例

[0068] 实施例1

[0069] 作为DSM 33515保藏的生物保护性鼠李糖乳杆菌菌株-对后酸化的影响小

[0070] 与单独的起子培养物和作为DSM 32092保藏的母菌株相比,测试作为DSM 33515保藏的菌株鼠李糖乳杆菌对后酸化的影响。

[0071] 为此,将由2.8%蛋白质、1.2%脂肪和10%蔗糖组成的均质乳基质在 $95\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下热处理5min并立即冷却。以0.02% (v/w) 接种商业起子培养物(FD-DVS YF-L812或FD-DVS Premium 5.0),并将接种的乳分配到3升桶中。一个桶接种了总浓度为 $1\times 10^7\text{CFU/g}$ 的保藏为DSM 33515的鼠李糖乳杆菌细菌,一个桶接种总浓度为 $1\times 10^7\text{CFU/g}$ 的作为DSM 32092保藏的鼠李糖乳杆菌细菌,一个桶用作参考且仅接种了起子培养物。将所有瓶子在 $43\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的水浴中孵育,并在这些条件下发酵,直到pH达到 4.60 ± 0.1 。发酵后,将瓶子剧烈搅拌以打破凝块,分配到50ml杯子中,并立即在冰上冷却。

[0072] 为了监测对后酸化的影响,将三个发酵乳样品(仅起子、起子+作为DSM 33515的细菌和起子+DSM 32092)分别在 $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $12\pm 1^{\circ}\text{C}$ 和 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下储存28天,以及在 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下储存7天,并在第1、7、14、21和28天测量pH。

[0073] 当与FD-DVS YF-L812和FD-DVSPremium 5.0组合时,对后酸化的影响分别如图1和图2所示,显示添加作为DSM 33515保藏的鼠李糖乳杆菌细菌与作为DSM32092保藏的鼠李糖乳杆菌细菌相比诱导的后酸化更少。

[0074] 实施例2

[0075] 鼠李糖乳杆菌菌株DSM 33515将低后酸化作用与高抗霉菌效果相结合

[0076] 为了分析作为DSM 33515保藏的鼠李糖乳杆菌细菌的抑制作用,使用半定量琼脂试验,类似于酸奶的制造过程和制品:

[0077] 将由2.8%蛋白质、1.2%脂肪和10%蔗糖组成的均质乳基质在 $95\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下热处理5min并立即冷却。以0.02% (v/w) 接种商业起子培养物(FD-DVS YF-L812),并将接种的乳分配到3L桶中。一个桶接种了总浓度为 $1\times 10^7\text{CFU/g}$ 的作为DSM 33515保藏的鼠李糖乳杆菌细菌,另一个桶接种了总浓度为 $1\times 10^7\text{CFU/g}$ 的鼠李糖乳杆菌DSM 32092,一个桶用作参考且仅接种了起子培养物。将所有桶在 $43\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的水浴中孵育,并在这些条件下发酵,直至pH达到 4.60 ± 0.1 。发酵后,将桶剧烈搅拌以打破凝块,分配到200ml杯子中,并立即在冷却室中冷却。然后将发酵乳加热至 40°C 的温度,并添加40ml已融化并冷却至 60°C 的5%无菌琼脂溶液。然后将这种发酵乳和琼脂溶液倒入无菌皮氏菌培养皿中,并在LAF工作台中将平板干燥30min。

[0078] 将以下六种不同霉菌的孢子悬浮液以500个孢子/斑点的浓度点样在琼脂平板上:作为DSM 32094保藏的短密青霉、作为DSS 33517保藏的皮落青霉、作为DS M 32093保藏的离生青霉、作为DSC 33520保藏的卡尼青霉、作为D M 33519保藏的酒青霉和作为DSD 33518

保藏的娄地青霉。在每个板上点样三种霉菌,并以500个孢子/斑点的浓度添加靶污染物。将平板在 $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下孵育28天,并定期检查霉菌的生长。

[0079] 琼脂试验的结果如图3所示,显示所有测试的霉菌在由仅用起子培养物发酵的乳(参考)制成的琼脂平板上生长良好。然而,当在乳发酵期间存在作为DSM 33515保藏的鼠李糖乳杆菌细菌时,所得的平板抑制了所测试的六种青霉的生长。鼠李糖乳杆菌的作用水平与鼠李糖乳杆菌DSM32092相似,已知DSM 32092诱导更多的后酸化。

[0080] 实施例3

[0081] 感官评价

[0082] 将作为DSM 33515保藏的生物保护性鼠李糖乳杆菌菌株置于发酵乳制品中,该乳制品在略微加速的温度(12°C)或 25°C 下储存两周,与单独的起子培养物和母株DSM 32092相比,测试其对感官的影响。

[0083] 将由2.8%蛋白质、1.2%脂肪和10%蔗糖组成的均质乳基质在 $95\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下热处理5min并立即冷却。以0.02% (v/w) 接种商业起子培养物(FD-DVS YF-L812),并将接种的乳分配到3L桶中。一桶接种了总浓度为 $1\times 10^7\text{CFU/g}$ 的作为DSM 33515保藏的鼠李糖乳杆菌细菌,一桶接种了总浓度为 $1\times 10^7\text{CFU/g}$ 的作为DSM32092保藏的鼠李糖乳杆菌细菌,一桶用作参考且仅接种了起子培养物。将所有桶在 $43\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的水浴中孵育,并在这些条件下发酵,直至pH达到 4.60 ± 0.1 。发酵后,将桶剧烈搅拌以打破凝块,将其分配到200mL杯子中,并立即在冷却室中冷却。将一组样品在 12°C 下储存两周,将另一组样品在 25°C 下储存两周。

[0084] 在描述性分析中,训练有素的专家组在感知强度尺度上对产品的规定属性进行评级。然后,用这些定量评级描述评估产品集产品之间的相似性和差异(Lawless, H.T., & Heymann, H. (2010). *Sensory evaluation of food: principles and practices*. Springer Science&Business Media):

[0085] 12名训练有素的评判员参加了测试以评估六份样品,其中只有三份样品在此相关。属性列表基于在 25°C 下存储的相同样品的评估。为了进行评估,按照拉丁方设计,以两个重复即总共12个样品,以随机顺序将样品提交给评判员。属性强度按具有五个区间的结构化线刻度进行评级,该结构化线刻度的左端标有“无”,右端标有“许多”。

[0086] 强度评估结果的统计评估包括三因素MANOVA(多元方差分析)和Wilks检验,以检查总体样品差异,以及ANOVA(方差分析),以发现哪些属性存在显著差异,二者均考虑因素制品、判断和重复以及它们的双向交互作用。当属性具有显著的产品效应时,使用最小显著差异(Least Significant Difference, LSD)检验来检测产品样品之间的显著差异。选择了显著性水平 $\alpha=0.05$ 用于研究。

[0087] 对在 12°C 和 25°C 下储存14天的样品进行的感官评价结果分别列于表1和表2中。这些结果表明,与母菌株DSM 3351相比,添加作为DSM33515保藏的鼠李糖乳杆菌细菌与起子培养物,当在 12°C 或 25°C 下储存14天时,改善了制品的感官特性。具体而言,与在 12°C 下储存14天的参考样品相比,察觉到具有DSM 32092的样品的黄油味较少。当将样品在 25°C 下储存14天时,与仅接种了起子培养物的样品相比,鼠李糖乳杆菌DSM 32092提供了更多的酸味,但甜味和乳香较少。

[0088] 表1:对在 12°C 下储存14天的样品进行的感官评估的结果。属性列表、来自样品的三因素ANOVA的因素产品的F值以及每个属性的相应p值和显著性、基于(发现在产品之间存

在显著差异的) 属性的最小显著性差异检验 (LSD) 的样品的平均值和分组, 不同字母表示 $p < 0.05$ 时的显著差异。

[0089]

属性	产品的 F-值	p-值	平均值 (分组)		
			参考	DSM 33515	DSM 32092
酸奶风味	0.03	1	54.20 A	53.67 A	54.22 A
乳状	1.19	0.329	52.28 A	51.65 A	44.57 A
黄油状	2.17	0.072	42.32 A	31.03 AB	29.92 B
酵母	1	0.426	36.02 A	25.93 A	28.20 A
纸板味	1.08	0.384	6.39 A	7.84 A	7.79 A
涩味	0.23	0.948	25.3 A	27.9 A	30.7 A
甜味	1.86	0.118	47.22 AB	45.63 AB	37.65 B
酸味	1.32	0.27	38.27 AB	43.25 AB	42.69 AB
苦味	0.47	0.797	6.96 A	5.05 A	5.97 A
异味	1.23	0.31	5.54 A	4.43 A	5.67 A

[0090] *在 $p < 0.05$ 时显著

[0091] 表2: 对在25℃下储存14天的样品进行的感官评估的结果。属性列表、来自样品的三因素ANOVA的因素产品的F值以及每个属性的相应p值和显著性、基于(发现在产品之间存在显著差异的) 属性的最小显著性差异检验 (LSD) 的样品的平均值和分组, 不同字母表示 $p < 0.05$ 时的显著差异。

[0092]

属性	产品的 F-值	p-值	平均值 (分组)		
			参考	DSM 33515	DSM 32092
酸奶风味	0.49	0.779	62.31 A	56.59 A	60.13 A
乳状	3.38	0.01*	54.64 A	52.09 A	34.57 C
黄油状	1.71	0.15	42.15 A	39.37 A	31.71 AB
酵母	2.66	0.033*	31.13 ABC	22.55 C	27.03 BC
纸板味	1.25	0.3	6.84 B	11.35 A	8.98 AB
涩味	1.54	0.195	24.7 B	31.3 AB	27.9 AB

[0093]

甜味	7.33	<0.001*	57.18 A	45.03 AB	21.25 C
酸味	7.15	<0.001*	43.84 C	49.68 BC	78.87 A
苦味	1.17	0.337	7.47 AB	14.84 A	8.72 AB
异味	0.89	0.498	3.38 A	13.86 A	9.34 A

[0094] *在 $p<0.05$ 时显著

[0095] 从表中可以看出,察觉到用DSM 33515制备的样品比用DSM 32092制备的样品更乳状、更甜、酸味更小。

[0096] 实施例4

[0097] 与CBS141584相比,鼠李糖乳杆菌菌株DSM 33515对后酸化的影响更小

[0098] 与单独的起子培养物和欧洲专利EP16182341中公开的作为CBS141584保藏的菌株相比,测试鼠李糖乳杆菌DSM 33515对后酸化的影响。

[0099] 为此,将由2.8%蛋白质、1.2%脂肪和10%蔗糖组成的均质乳基质在 $95\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下热处理5min并立即冷却。以0.02% (v/w) 接种商业起子培养物 (FD-DVS YF-L812, Chr. Hansen A/S Denmark, 含有德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌), 并将接种的乳分配到3升桶中。一个桶接种了总浓度为 1×10^7 CFU/g的作为DSM 33515保藏的鼠李糖乳杆菌细菌, 一个桶接种了总浓度为 1×10^7 CFU/g的CBS141584, 一个桶作为参考且仅接种了起子培养物。将所有瓶子在 $43\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的水浴中孵育, 并在这些条件下发酵, 直到pH达到 4.60 ± 0.1 。发酵后, 将瓶子剧烈搅拌以打破凝块, 分配到50ml杯子中, 并立即在冰上冷却。

[0100] 为了监测对后酸化的影响, 将三份发酵乳样品 (仅起子、起子+作为DSM 33515保藏细菌和起子+CBS141584) 在 $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ 和 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下储存28天, 并在第1、7、14、21和28天测量pH值。

[0101] 图4和图5显示了DSM 33515和CBS141584与起子培养物组合时对后酸化的影响。显然, 与CBS141584相比, 添加鼠李糖乳杆菌细菌DSM33515诱导更少的后酸化。

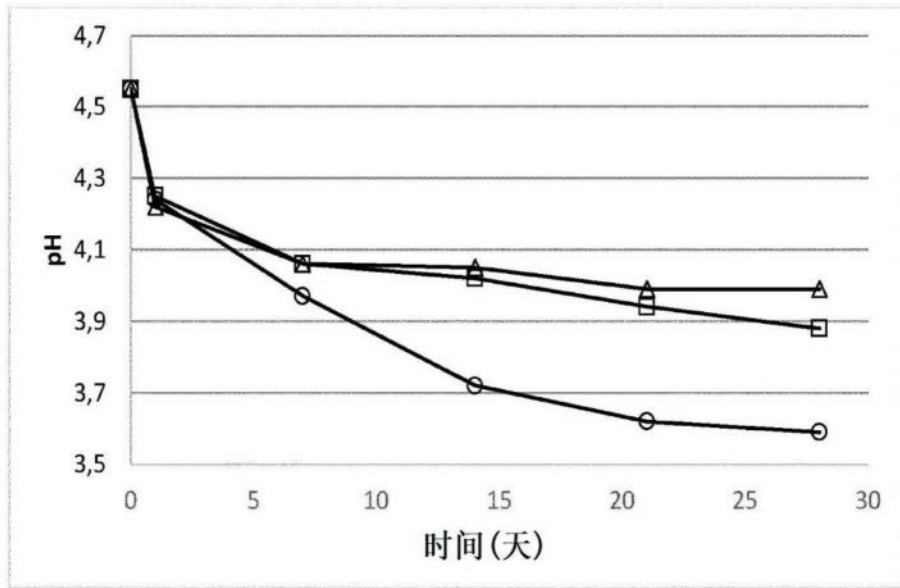


图1

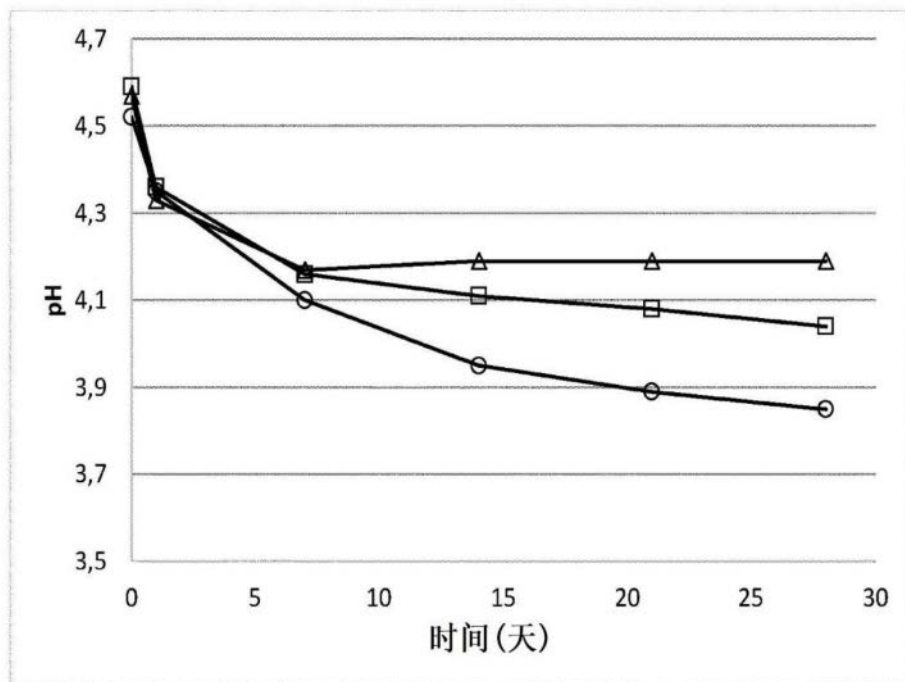


图2

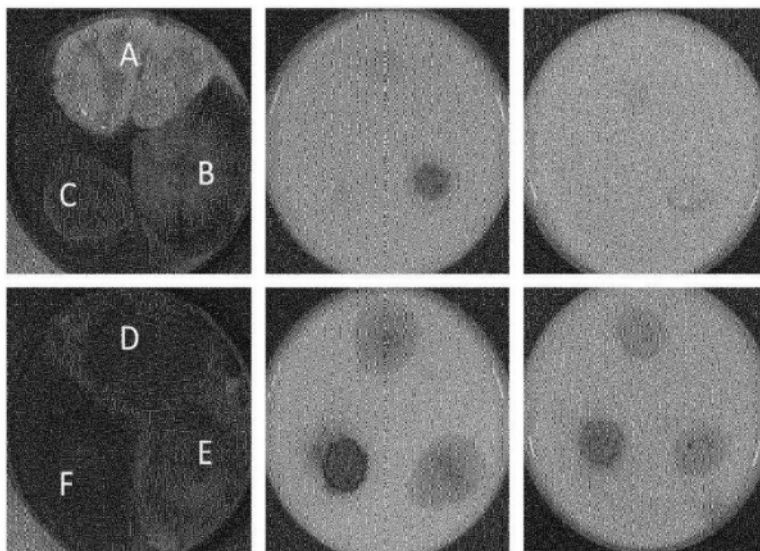


图3

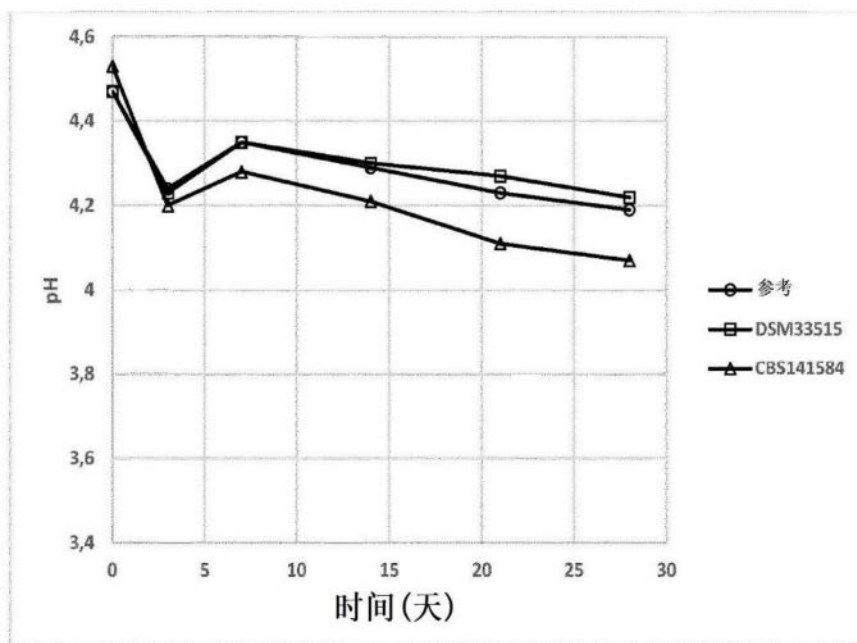


图4

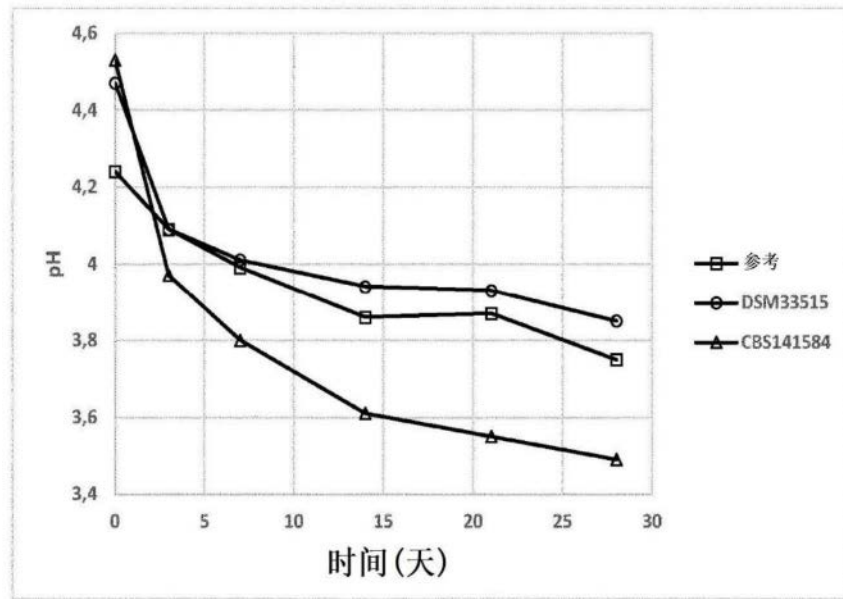


图5