



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108347952 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201680061151.5

DSM 32089 2015.07.16

(22)申请日 2016.08.30

DSM 32091 2015.07.16

(30)优先权数据

DSM 32096 2015.07.22

15183194.8 2015.08.31 EP

DSM 22584 2009.05.19

DSM 32092 2015.07.16

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(71)申请人 科.汉森有限公司

2018.04.19

地址 丹麦霍尔斯霍姆

(86)PCT国际申请的申请数据

(72)发明人 C·L·M·尼尔森

PCT/EP2016/070398 2016.08.30

蒂娜·霍恩贝克 P·拉斯马森

(87)PCT国际申请的公布数据

罗尼·波尔森

W02017/037052 EN 2017.03.09

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

(83)生物保藏信息

代理人 郑霞

DSM 32084 2015.07.16

(51)Int.Cl.

DSM 32085 2015.07.16

A23C 9/123(2006.01)

DSM 32086 2015.07.16

C12R 1/225(2006.01)

DSM 32087 2015.07.16

DSM 32088 2015.07.16

DSM 32090 2015.07.16

权利要求书3页 说明书14页

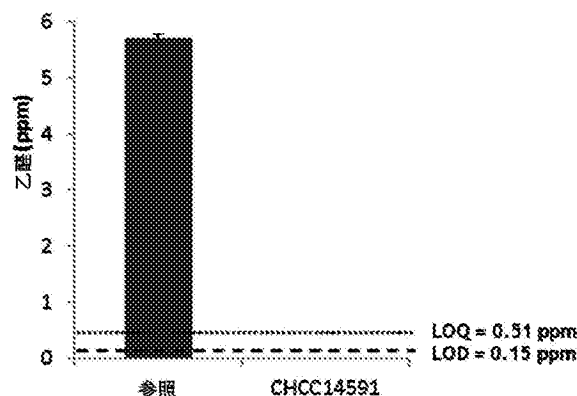
PCT/R0/134表9页 附图5页

(54)发明名称

抑制后酸化的发酵乳杆菌细菌

(57)摘要

本发明涉及发酵乳杆菌种的细菌,其中所述细菌的特征在于,与用不含所述发酵乳杆菌的相同起子培养物发酵的乳制品相比,在发酵后的储存期间,它增加包含所述发酵乳杆菌的发酵乳制品的pH。在相关的实施方案中,本发明提供发酵乳杆菌种的细菌,其特征在于包含所述发酵乳杆菌的发酵乳制品当在25℃下储存至少14天时保持pH大于4.0,其中所述发酵乳制品通过以下方法获得,所述方法包括将奶与至少 10^7 CFU/g的浓度的发酵乳杆菌和起子培养物一起孵育,发酵直至达到4.6的pH,摇动发酵产物并冷却。本发明还涉及包含所述细菌的组合物、使用所述细菌生产发酵乳制品的方法和由此获得的产品。



1. 发酵乳杆菌种的细菌,其中所述细菌的特征在于,与用不含所述发酵乳杆菌的相同起子培养物发酵的乳制品相比,在发酵后的储存期间,它增加包含所述发酵乳杆菌的发酵乳制品的pH。

2. 根据权利要求1所述的发酵乳杆菌种的细菌,其中pH的增加为至少0.1的值。

3. 根据权利要求1或2所述的发酵乳杆菌种的细菌,其中在25℃下储存用起子培养物和至少 10^7 cfu/g的浓度的所述发酵乳杆菌发酵的产品21天后确定pH的增加。

4. 发酵乳杆菌种的细菌,其特征在于包含所述发酵乳杆菌的发酵乳制品当在25℃下储存至少14天时保持pH大于4.0,其中所述发酵乳制品通过以下方法获得,所述方法包括将乳与至少 10^7 CFU/g的浓度的发酵乳杆菌和与起子培养物一起孵育,发酵直至达到4.6的pH,摇动发酵产品并冷却。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的发酵乳杆菌种的细菌,其中用于制备所述发酵乳制品的起子培养物包含LAB,所述LAB能够在发酵期间在10小时或更短时间内将乳制品的pH降低至pH 4.6的值。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的发酵乳杆菌种的细菌,其中所述起子培养物包含嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 和德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) 的混合物。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的发酵乳杆菌种的细菌,其中所述细菌具有将发酵乳制品中由起子培养物在发酵期间产生的乙醛浓度降低至少50%的能力。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的发酵乳杆菌种的细菌,其中所述细菌具有将发酵乳制品中由起子培养物在发酵期间产生的乙醛浓度降低至少50%、至少75%、至少95%或至少98%的能力,其中乙醛浓度在包括下列步骤的测定中确定:

(1) 通过如下步骤制备发酵乳制品:

(a) 将乳与至少 10^7 CFU/g的浓度的发酵乳杆菌和与起子培养物一起孵育,

(b) 发酵直至达到4.6的pH,和;

(2) 将发酵乳制品在 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存14天;

(3) 将200 μl 4N H_2SO_4 加入至1g所述发酵乳制品,并通过静态顶空气相色谱法确定乙醛的浓度。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的发酵乳杆菌种的细菌,其中所述细菌选自以下组成的组:

(a) 保藏为DSM32084的发酵乳杆菌菌株;

(b) 保藏为DSM32085的发酵乳杆菌菌株;

(c) 保藏为DSM32086的发酵乳杆菌菌株;

(d) 保藏为DSM32087的发酵乳杆菌菌株;

(e) 保藏为DSM32088的发酵乳杆菌菌株;

(f) 保藏为DSM32089的发酵乳杆菌菌株;

(g) 保藏为DSM32090的发酵乳杆菌菌株;

(h) 保藏为DSM32091的发酵乳杆菌菌株;

(i) 保藏为DSM32096的发酵乳杆菌菌株;

(j) 保藏为DSM22584的发酵乳杆菌菌株;或

(k) 能够自根据 (a) 至 (j) 的保藏菌之一得到的突变体菌株, 其中所述突变体特征在于, 与用不含所述发酵乳杆菌的相同起子培养物发酵的乳制品相比, 在发酵后的储存期间, 它增加包含所述突变体发酵乳杆菌的发酵乳制品的 pH。

10. 组合物, 其包含至少一种根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的发酵乳杆菌菌株。

11. 根据权利要求 10 所述的组合物, 其中所述组合物进一步包含至少一种选自下列的另外的细菌:

(a) 以保藏号 DSM32092 保藏于德国微生物保藏中心 (DSMZ) 的鼠李糖乳杆菌菌株 CHCC15860;

(b) 以保藏号 DSM23035 保藏于德国微生物保藏中心 (DSMZ) 的鼠李糖乳杆菌菌株 CHCC5366;

(c) 以保藏号 DSM24616 保藏于德国微生物保藏中心 (DSMZ) 的鼠李糖乳杆菌菌株 CHCC12697;

(d) 以保藏号 DSM24651 保藏于德国微生物保藏中心 (DSMZ) 的副干酪乳杆菌菌株 CHCC12777; 和

(e) 以保藏号 DSM25612 保藏于德国微生物保藏中心 (DSMZ) 的副干酪乳杆菌菌株 CHCC14676。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的组合物, 其还包含至少一种低温保护性化合物。

13. 根据权利要求 10 至 12 中任一项所述的组合物, 其中所述组合物是固体冷冻或冷冻干燥起子培养物, 所述起子培养物包含浓度为每克冷冻物质至少 10^9 个菌落形成单位或浓度为每克冷冻物质至少 10^{10} 个菌落形成单位或浓度为每克冷冻物质至少 10^{11} 个菌落形成单位的乳酸菌。

14. 生产发酵乳制品的方法, 其包括将根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的发酵乳杆菌或根据权利要求 11 至 13 中任一项所述的组合物添加至乳或乳制品中, 并在约 22°C 至约 43°C 的温度发酵混合物直至达到 4.6 或小于 4.6 的 pH。

15. 根据权利要求 14 所述的方法, 其包括将根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的发酵乳杆菌或根据权利要求 6 至 9 中任一项所述的组合物添加至乳或乳制品中, 并发酵所述混合物

(a) 使得发酵终止时在发酵乳制品中权利要求 1 的发酵乳杆菌的浓度是至少 1×10^6 cfu/g 或至少 1×10^7 cfu/g; 和/或

(b) 使得在发酵乳制品的表面上权利要求 1 的发酵乳杆菌的浓度是至少 1×10^5 cfu/cm²。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的方法, 其中所述发酵产品在 7°C 以上的温度, 优选在 7°C 至 25°C 的温度储存。

17. 根据权利要求 14 至 16 之一所述的方法, 其中所述发酵产品储存至少 14 天的时间, 并且其中所述发酵乳制品的 pH 保持大于 pH 4.0。

18. 生产食品、饲料或药品的方法, 其包括根据权利要求 14 至 17 中任一项所述的生产发酵乳制品的方法。

19. 能够通过权利要求 18 的方法获得的食品、饲料或药品。

20. 食品、饲料或药品, 其包含根据权利要求 1 至 9 之一选择的发酵乳杆菌种的细菌和以下一种或多种:

(a) 至少一种另外的细菌, 所述至少一种另外的细菌选自一种或多种下列属: 乳球菌属

(*Lactococcus* spp.)、链球菌属(*Streptococcus* spp.)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus* spp.)、明串珠菌属(*Leuconostoc* spp.)、假明串珠菌属(*Pseudoleuconostoc* spp.)、片球菌属(*Pediococcus* spp.)、短杆菌属(*Brevibacterium* spp.)和肠球菌属(*Enterococcus* spp.)；

(b) 以保藏号DSM32092保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的鼠李糖乳杆菌菌株CHCC15860；

(c) 以保藏号DSM23035保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的鼠李糖乳杆菌菌株CHCC5366；

(d) 以保藏号DSM24616保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的鼠李糖乳杆菌菌株CHCC12697；

(e) 以保藏号DSM24651保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的副干酪乳杆菌菌株CHCC12777；和

(f) 以保藏号DSM25612保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的副干酪乳杆菌菌株CHCC14676。

抑制后酸化的发酵乳杆菌细菌

技术领域

[0001] 本发明涉及抑制后酸化的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*), 后酸化是在冷藏温度以上的温度储存的发酵乳制品中经常观察到的效果。本发明进一步提供包括该细菌的辅助培养物、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, 其包括食品、饲料和药品。

背景技术

[0002] 数十年来, 乳酸菌 (LAB) 已被用于增加食品的保质期。在发酵过程中, LAB 产生乳酸以及其它有机酸, 其引起发酵产物 pH 降低。具有酸性 pH 值的产物不支持大多数微生物 (包括致病和腐败生物体) 的进一步生长。

[0003] 然而, 酵母菌和霉菌的生长不受低 pH 影响, 并且经常导致发酵乳制品变质。

[0004] 传统上, 酸奶是通过用由两种乳酸菌 (LAB) (德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)) 的混合物组成的特定酸奶起子培养物发酵奶而产生的。起子在酸奶生产中的主要作用是 (i) 通过将乳糖转化为乳酸而进行的酸化, (ii) 例如通过蛋白质变性和胞外多糖的产生而产生粘性质地, 和 (iii) 形成典型的酸奶风味 (1)。

[0005] 典型的酸奶风味是由赋予酸味和清爽味道的乳酸以及各种羰基化合物如丙酮、二乙酰和乙醛的混合物引起的, 后者被认为是主要的风味成分 (2)。

[0006] 发酵结束后, 储存酸奶直到食用。在此期间, LAB 可导致产品进一步酸化, 特别是当储存在冷藏温度以上时。这种现象被称为后酸化并且通常被认为代表在大多数酸奶类型随时间观察到的不期望的性状。后酸化可导致诸如脱水收缩、存活计数的减少增加、产品中乳酸的积累和不期望的风味的形成等缺陷。这主要是由于在低 pH 值和冷藏温度下德氏乳杆菌保加利亚亚种菌株的不受控生长 (4)。通过应用良好的生产实践和使用具有减少后酸化行为的培养物如例如 Chr. Hansen Mild2.0®, 可以在有限程度上影响它。解决这个问题的另一种可能性是在其制造后对酸奶进行巴氏杀菌。虽然这种操作会大大地帮助制造商处理和分配, 但酸奶巴氏杀菌并不常常适用, 因为许多消费者希望获得含有提供完整乳糖酶活性的活微生物的发酵乳制品。此外, 含有嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 和双歧杆菌的轻度酸化酸奶相关培养物提供较少后酸化的优点。

[0007] 同时, 已经观察到, 具有抗真菌作用的起子培养物, 即也被称为生物保护细菌起子培养物的培养物 (例如 Holdbac® YM-C plus 和 FreshQ®4), 似乎在生产发酵乳制品的方法中增加后酸化, 特别是当发酵产物在环境温度下储存时。

[0008] 由于这些发现, 仍然需要在生产发酵乳制品的方法中改善后酸化的控制。

发明内容

[0009] 本发明提供发酵乳杆菌种的细菌, 其特征在于与用不含所述发酵乳杆菌的相同起子培养物发酵的乳制品相比, 在发酵后的储存期间, 它增加包含所述发酵乳杆菌的发酵乳

制品的pH(即抵消后酸化)。pH的增加可以是任何增加,但优选达到至少0.1的值。优选在25℃下储存发酵产物21天后测定增加。

[0010] 本发明人惊奇地发现本发明的发酵乳杆菌菌株不仅不促成后酸化,而且还通过增加用这些菌株产生的发酵乳制品的pH值而实际上拮抗后酸化。如下面的实施例所示,在使用显示明显后酸化的起子培养物(包括许多市售的起子培养物,特别是当与商业抗真菌细菌一起使用时)的发酵过程中,该作用特别显著。鉴定了抑制起子培养物的后酸化的总共10种不同的发酵乳杆菌菌株。

[0011] 在相关的实施方案中,本发明还提供发酵乳杆菌种的细菌,其特征在于包含所述发酵乳杆菌的发酵乳制品当在25℃下储存至少14天时保持pH大于4.0,其中所述发酵乳制品通过以下方法获得,所述方法包括将奶与至少 10^7 CFU/g的浓度的发酵乳杆菌和起子培养物一起孵育,发酵直至达到4.6的pH,摇动发酵产物并冷却。

[0012] 本发明的细菌可具有的另外特征在于减少起子培养物中由其它细菌产生的乙醛的存在。例如,本发明的某些发酵乳杆菌菌株可具有的进一步特征在于具有将发酵乳制品中由起子培养物在发酵期间产生的乙醛浓度降低至少50%的能力。

[0013] 在相关的实施方案中,本发明的发酵乳杆菌菌株可以具有的进一步特征在于所述细菌分泌在0至5ppm的范围内的二乙酰。

[0014] 因此,本发明提供如上所述的细菌、包含其的组合物、使用所述细菌生产发酵乳制品的方法以及由此获得的产品。

具体实施方式

[0015] 本发明提供发酵乳杆菌种的细菌,其特征在于与用不含所述发酵乳杆菌的相同起子培养物发酵的乳制品相比,在发酵后的储存期间,它增加包含所述发酵乳杆菌的发酵乳制品的pH。pH的增加可以是任何增加,但优选达到至少0.1的值。优选在25℃下储存发酵产物21天后测定增加。

[0016] 本发明的发酵乳杆菌菌株能够具有的特征在于与用不含所述发酵乳杆菌的相同起子培养物发酵的乳制品相比,在发酵后的储存期间,它们增加包含所述发酵乳杆菌的发酵乳制品的pH(即抵消后酸化),其中pH的增加至少为0.1的值,并且在25℃下储存发酵产物21天后测定,并且其中用于制备发酵乳制品的起子培养物包含能够在发酵期间将乳制品的pH在10小时或更短时间内降低至pH值4.6的LAB。例如,测定可以基于嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种的混合物。各种混合物经常用于生产酸奶并且已知会导致后酸化。

[0017] 在备选的方面,本发明还提供发酵乳杆菌种的细菌,其特征在于包含所述发酵乳杆菌的发酵乳制品当在25℃下储存至少14天时保持pH大于4.0,其中所述发酵乳制品通过以下方法获得,所述方法包括将奶与至少 10^7 CFU/g的浓度的发酵乳杆菌和起子培养物一起孵育,发酵直至达到4.6的pH,摇动发酵产物并冷却。应该理解的是,规定本发明的发酵乳杆菌菌株当在25℃下储存至少14天时可保持pH大于4.0的特征,仅仅表征通常用于确定作用的测定。本发明的发酵乳杆菌菌株、包含其的组合物(包括食品或饲料产品)没有必要或不需要实际上在这些条件下储存。此外,在一个方面,该测定可以使用包含能够在发酵期间将乳制品的pH在10小时或更短时间内降低至pH值4.6的LAB的起子培养物进行。例如,该测定可以基于嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种的混合物。

[0018] 本发明的发酵乳杆菌菌株具有特别的优点,因为它们降低后酸化的风险并由此改善由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。

[0019] 如在实施例中所指出的,当将本发明的发酵乳杆菌菌株在发酵前以至少 10^7 CFU/g的浓度加入到奶中时,观察到其增加发酵乳制品的pH值的作用。因此,本发明包括至少 10^7 CFU/g的浓度的本发明发酵乳杆菌菌株、包含其的组合物和包含其的发酵食品。优选的浓度范围包括 10^7 CFU/g至 10^{11} CFU/g、 10^7 CFU/g至 10^{10} CFU/g和 10^7 CFU/g至 10^9 CFU/g的浓度。

[0020] 已知常见的起子培养物例如嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种的市售混合物产生挥发性化合物,其显著促成发酵产品的感官性质。根据一个方面,本发明的细菌的特征还在于分泌低量或基本上不分泌影响食品的感官性质的挥发性化合物。乙醛、二乙酰和乙偶姻是已知的挥发性化合物,其影响食品的感官性质。

[0021] 在相关的实施方案中,本发明的细菌的特征在于减少起子培养物中由其它细菌产生的乙醛的存在。例如,本发明的某些发酵乳杆菌菌株可具有的进一步特征在于具有将发酵乳制品中由起子培养物在发酵期间产生的乙醛浓度降低至少50%的能力。本领域已知用于确定发酵产物中乙醛浓度的不同测定,并且根据本发明,其可以用于该目的。将发酵乳制品中由起子培养物在发酵期间产生的乙醛浓度降低至少50%的能力优选在下列测定中确定,所述测定包括:

[0022] (1) 通过如下制备发酵乳制品:

[0023] (a) 将奶与至少 10^7 CFU/g的浓度的发酵乳杆菌和起子培养物一起孵育,

[0024] (b) 发酵直至达到4.6的pH,和;

[0025] (2) 将发酵乳制品在 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存14天;

[0026] (3) 将200 μl 4N H_2SO_4 加入至1g发酵乳制品,并通过静态顶空气相色谱法确定乙醛的浓度。

[0027] 乙醛是发酵过程中由乳酸菌产生的味道成分。虽然该成分在某些应用中是期望的,但在其它应用中减少或避免乙醛的存在会是有利的。因此降低发酵乳制品中乙醛浓度的发酵乳杆菌细菌在特定应用中提供优点,例如当制备增甜酸奶时。本发明的发酵乳杆菌菌株可以例如将发酵乳制品中由起子培养物在发酵期间产生的乙醛浓度降低至少75%、至少95%或至少98%。

[0028] 或者或另外地,本发明的发酵乳杆菌菌株可以具有的特征在于所述细菌分泌在0至5ppm的范围内的二乙酰。同样,本领域已知用于确定发酵产物中二乙酰浓度的不同测定,并且根据本发明,其可以用于该目的。将发酵乳制品中由起子培养物在发酵期间产生的二乙酰浓度降低至少50%的能力优选在下列测定中确定,所述测定包括:

[0029] (1) 通过如下制备发酵乳制品:

[0030] (a) 将奶与至少 10^7 CFU/g的浓度的发酵乳杆菌和起子培养物一起孵育,

[0031] (b) 发酵直至达到4.6的pH,和;

[0032] (2) 将发酵乳制品在 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存14天;

[0033] (3) 将200 μl 4N H_2SO_4 加入至1g发酵乳制品,并通过静态顶空气相色谱法确定二乙酰的浓度。

[0034] 分泌低浓度二乙酰的发酵乳杆菌在用这些细菌生产食品的方法中具有优势,因为产生高浓度这些挥发性化合物的菌株影响最终产品的味道,因此不能用于所有应用。本发

明的发酵乳杆菌菌株能够具有的特征在于所述细菌分泌在0至3ppm或0至2ppm的范围内的二乙酰。

[0035] 本发明的细菌可有利地来源于以下保藏菌株之一：

[0036] (a) 以保藏号：32084保藏于德国微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig (布伦瑞克D-38124, 茵霍芬街7B) 的发酵乳杆菌菌株CHCC12798;

[0037] (b) 以保藏号：32085保藏于德国微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), 布伦瑞克D-38124, 茵霍芬街7B的发酵乳杆菌菌株CHCC12797;

[0038] (c) 以保藏号：32086保藏于德国微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), 布伦瑞克D-38124, 茵霍芬街7B的发酵乳杆菌菌株CHCC14591;

[0039] (d) 以保藏号：32087保藏于德国微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), 布伦瑞克D-38124, 茵霍芬街7B的发酵乳杆菌菌株CHCC14588;

[0040] (e) 以保藏号：32088保藏于德国微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), 布伦瑞克D-38124, 茵霍芬街7B的发酵乳杆菌菌株CHCC15844;

[0041] (f) 以保藏号：32089保藏于德国微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), 布伦瑞克D-38124, 茵霍芬街7B的发酵乳杆菌菌株CHCC15865;

[0042] (g) 以保藏号：32090保藏于德国微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), 布伦瑞克D-38124, 茵霍芬街7B的发酵乳杆菌菌株CHCC15847;

[0043] (h) 以保藏号：32091保藏于德国微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), 布伦瑞克D-38124, 茵霍芬街7B的发酵乳杆菌菌株CHCC15848;

[0044] (i) 以保藏号：32096保藏于德国微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), 布伦瑞克D-38124, 茵霍芬街7B的发酵乳杆菌菌株CHCC15926;

[0045] (j) 以保藏号：22584保藏于德国微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), 布伦瑞克D-38124, 茵霍芬街7B的发酵乳杆菌菌株CHCC2008;

[0046] (k) 可自 (a) - (j) 的保藏菌之一得到的突变菌株, 其中所述突变体特征在于, 与用不含所述发酵乳杆菌的相同起子培养物发酵的乳制品相比, 在发酵后的储存期间, 它增加包含所述发酵乳杆菌的发酵乳制品的pH。

[0047] 由突变体引起的pH增加可以是任何增加, 但优选达到至少0.1的值。优选在25℃下储存发酵产物21天后测定增加。

[0048] 在本申请的上下文中, 术语“乳酸菌”或“LAB”用于指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。这些细菌通过它们共同的代谢和生理特征相关,并且通常为革兰氏阳性、低GC、耐酸、不形成孢子、不呼吸的棒状杆菌或球菌。在发酵阶段期间,这些细菌对乳糖的消耗导致乳酸的形成,降低pH并导致形成蛋白质凝结物。因此这些细菌负责奶的酸化和乳制品的质地。如本文所用,术语“乳酸菌”包括但不限于属于下列属的细菌:乳杆菌属 (*Lactobacillus* spp.)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium* spp.)、链球菌属 (*Streptococcus* spp.)、乳球菌属 (*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*)和明串珠菌属 (*Leuconostoc* spp.)。

[0049] 取决于繁殖的最佳温度,将LAB表征为嗜温或嗜热LAB。术语“嗜温菌”是指在中等温度下生长最好的微生物。本文中的术语“嗜温发酵”是指在约22℃至约35℃之间的温度下发酵。术语“嗜温发酵乳制品”是指通过嗜温起子培养物的嗜温发酵制备的发酵乳制品,并且包括诸如酪乳、酸奶、培养奶、斯美塔纳、酸奶油和新鲜奶酪例如夸克、tvorog和奶油奶酪等发酵乳制品。工业上最有用的嗜温细菌包括乳球菌属和明串珠菌属。

[0050] 术语“嗜热菌”是指在高温下生长最好的微生物。术语“嗜热发酵”是指在约35℃至约45℃的温度下进行的发酵方法。术语“嗜热发酵乳制品”是指使用嗜热起子培养物通过嗜热发酵制备的发酵乳制品,并且包括诸如凝固型酸奶、搅拌酸奶、脱乳清酸奶和饮用酸奶等发酵乳制品。工业上最有用的嗜热菌包括链球菌属和乳杆菌属。

[0051] 如下文将概述的,本发明包括使用嗜温和嗜热发酵的方法。

[0052] 关于真菌、酵母和霉菌的术语“抑制”是指例如相对于不含本发明细菌的食品,在包含本发明细菌的食品和/或食品表面上,真菌、酵母和霉菌在生长或孢子形成上的减少或在数目或浓度上的降低。本发明的发酵乳杆菌提供的抑制程度优选通过在所述发酵乳杆菌存在和不存在琼脂固化发酵乳上的生长来确定。

[0053] 在本发明上下文中,术语“突变体”应理解为通过例如基因工程、辐射和/或化学处理源自本发明菌株的菌株。优选突变体是功能上等同的突变体,例如具有与保藏菌株基本相同或改进的性质(尤其关于抑制后酸化的作用而言)的突变体。这种突变体是本发明的一部分。特别地,术语“突变体”是指通过使本发明的菌株经历任何常规使用的诱变处理或自发发生的突变而获得的菌株,所述诱变处理包括用化学诱变剂如乙烷甲烷磺酸盐(EMS)或N-甲基-N'-硝基-N-硝基胍(NTG)、紫外线进行的处理。突变体可经历几次诱变处理(单一处理应理解为一个诱变步骤,然后是筛选/选择步骤),但本发明优选进行不超过20次、或不超过10次、或不超过5次处理(或筛选/选择步骤)。在本发明优选的突变体中,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%的核苷酸已经改变为另一个核苷酸或缺失。

[0054] 在描述本发明的上下文中(特别是在随附权利要求书的上下文中)使用的术语“一”、“一个”和“该”以及类似的指称对象应被解释为涵盖单数和复数两者,除非在本文中另外指出或明显与上下文矛盾。

[0055] 本发明进一步提供包含至少一种发酵乳杆菌种的细菌的组合物,其特征在于在如

上所述的测定中包含所述发酵乳杆菌的发酵乳制品在25℃下储存至少14天时维持pH大于4.0。

[0056] 各种组合物可以包含许多其它细菌,包括LAB。因此,本发明的优选组合物的特征在于,所述组合物还包含至少一种另外的细菌,所述另外的细菌选自下列属和种的一种或多种:乳杆菌属、双歧杆菌属、链球菌属、乳球菌属,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(*Lactobacillus helveticus*)、嗜酸乳杆菌、短双歧杆菌和明串珠菌属。

[0057] 在特别优选的实施方案中,本发明的组合物包含至少一种如上所述抑制后酸化的发酵乳杆菌种的细菌以及一种或多种第二细菌。在一个实施方案中,将本发明的发酵乳杆菌的几种不同菌株组合。另外的细菌可以例如选自具有抗真菌活性的细菌:

[0058] (a) 以保藏号:DSM32092保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)菌株CHCC15860;

[0059] (b) 以保藏号:DSM23035保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的鼠李糖乳杆菌的菌株CHCC5366;

[0060] (c) 以保藏号:DSM24616保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的鼠李糖乳杆菌的菌株CHCC12697;

[0061] (d) 以保藏号:DSM24651保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的副干酪乳杆菌的菌株CHCC12777;和

[0062] (e) 以保藏号:DSM25612保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的副干酪乳杆菌的菌株CHCC14676。

[0063] 本发明的组合物可另外包含许多其它组分,包括一种或多种低温保护性化合物以及调味化合物。

[0064] LAB最通常以起子培养物的形式添加到奶中。在本文上下文中使用的术语“起子”或“起子培养物”是指一种或多种食品级微生物、特别是乳酸菌的培养物,所述微生物负责乳基质的酸化。起子培养物可为新鲜的,但是最经常为冷冻或冷冻干燥的。这些产品也被称为“直投式”(Direct Vat Set,DVS)培养物以及产生用于直接接种发酵容器或发酵罐用于生产乳制品如发酵乳制品或奶酪。各种起子培养物可市购自许多来源,包括F-DVS YoFlex Mild 2.0、F-DVS YF-L901、FD-DVS YF-812和F-DVS CH-1,这四中培养物可市购自Chr.Hansen,含有嗜热链球菌和德氏乳杆菌加利亚亚种的混合物。

[0065] 因此,在一方面,本发明提供呈固体冷冻或冷冻干燥起子培养物形式的组合物,其包含浓度为每克冷冻物质至少 10^9 个菌落形成单位或浓度为每克冷冻物质至少 10^{10} 个菌落形成单位或浓度为每克冷冻物质至少 10^{11} 个菌落形成单位的乳酸菌,所述组合物包含如上所述抑制后酸化的发酵乳杆菌种的细菌。

[0066] 本发明还提供发酵乳杆菌和包含其的组合物,其特征在于多于一种上述特征。例如,本发明提供发酵乳杆菌种的细菌,其中所述细菌的特征在于,与用不含所述发酵乳杆菌的相同起子培养物发酵的乳制品相比,在发酵后的储存期间,它增加包含所述发酵乳杆菌的发酵乳制品的pH,

[0067] 其中pH的增加至少为0.1的值,

[0068] 并且其中在25℃下储存用至少 10^7 CFU/g的浓度的所述发酵乳杆菌和起子培养物

发酵的产物21天后确定pH的增加,和

[0069] 其中所述细菌具有将发酵乳制品中由起子培养物在发酵期间产生的乙醛浓度降低至少50%的能力。

[0070] 在另一个实施方案中,本发明提供生产发酵乳制品的方法,其包括添加如上所述抑制后酸化的发酵乳杆菌或包含其的组合物至奶或乳制品,并在约22℃至约43℃的温度发酵混合物直至达到小于4.6的pH。

[0071] 在本申请的上下文中,术语“奶/乳”以其常规含义广泛地用于指通常由动物乳腺或植物产生的液体。根据本发明,可能已经加工了奶,并且术语“奶/乳”包括全脂奶(whole milk)、脱脂奶、无脂奶、低脂奶、全脂奶(full fat milk)、乳糖减少的奶或浓缩奶。无脂奶是无脂或脱脂乳制品。低脂奶通常被定义为含有约1%至约2%脂肪的奶。全脂奶通常含有2%或更多的脂肪。术语“奶/乳”旨在包含来自不同哺乳动物和植物来源的奶。奶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。奶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、大麻、芝麻籽和葵花籽中提取的奶。在本发明的方法和产品中,来自奶牛的奶最优选用作发酵的原料。

[0072] 术语“奶/乳”还包括脂肪减少和/或乳糖降低的乳制品。可以使用本领域众所周知的方法来制备各种产品,并且可以市购(例如从Select Milk Producers Inc., Texas, USA)。可以根据本领域已知的任何方法生产乳糖减少的奶,所述方法包括通过乳糖酶将乳糖水解成葡萄糖和半乳糖,或者通过纳滤、电渗析、离子交换色谱和离心来进行。

[0073] 在“乳制品”或“乳基质”在本申请中被广泛地用于指基于奶或可作用于LAB生长和发酵的培养基的奶成分的组合物。乳制品或基质包含源自奶的成分和可用于生长或发酵LAB的目的的任何其它成分。

[0074] 用于制造发酵乳制品的方法的发酵步骤包括向奶中添加LAB。用于生产乳制品的发酵方法是众所周知的,普通技术人员可以选择发酵方法条件,包括温度、氧气、微生物的量和特性以及发酵时间。

[0075] 在发酵之前,可以根据本领域已知的方法将奶基质均化并巴氏杀菌。如本文所用,“均化”意指剧烈混合以获得可溶性悬浮液或乳液。如果在发酵之前进行均化,则可以进行均化以将乳脂分解成更小的尺寸,从而其不再从奶中分离。这可以通过在高压下迫使奶通过小孔来完成。如本文所用,“巴氏杀菌”意指处理奶基质以减少或消除活生物体如微生物的存在。优选地,通过将特定温度保持特定时间达到巴氏杀菌。特定的温度通常通过加热达到。可以选择温度和持续时间以杀死或失活某些细菌如有害细菌。可后接快速冷却步骤。

[0076] 在本发明的特别有利的方法中,将如上所述抑制后酸化的发酵乳杆菌或者将包含其的组合物加入到奶或乳制品中,并且以下列方式发酵该混合物,所述方式使得

[0077] (a) 在发酵乳制品中发酵终止时抑制后酸化的发酵乳杆菌的浓度是至少 1×10^6 CFU/g或至少 1×10^7 CFU/g;和/或

[0078] (b) 在发酵乳制品的表面上抑制后酸化的发酵乳杆菌的浓度是至少 1×10^5 cfu/cm²。

[0079] 这种处理方式具有的优点在于可以充分利用所述发酵乳杆菌的抑制后酸化的作用。

[0080] 本发明进一步提供这样的方法,其中发酵产物在7℃以上的温度,优选在7℃和25℃之间的温度下储存。该产物可以在任何时间储存,但优选储存至少14天的时间,并且其中

储存期间发酵乳制品的pH保持大于pH4.0。

[0081] 本发明进一步提供生产食品、饲料或药品的方法,其包括生产如上所述的发酵乳制品的方法;以及通过该方法可获得的食品、饲料或药品。

[0082] 进行发酵以生产食品、饲料产品或药品。术语“发酵乳制品”、“食品”或“饲料”产品是指可通过本发明的发酵方法获得的产品,并且包括奶酪、酸奶、水果酸奶、酸奶饮料、脱乳清酸奶(希腊酸奶,浓缩酸奶)、夸克、清爽干酪(fromage frais)和奶油奶酪。术语食品还包括其它发酵食品,包括发酵肉类,如发酵香肠和发酵鱼类产品。

[0083] 术语“奶酪”应理解为包括任何奶酪,包括硬的、半硬的和软的奶酪,例如以下类型的奶酪:茅屋奶酪(Cottage)、菲达奶酪(Feta)、切达奶酪(Cheddar)、帕玛森(Parmesan)、马苏里拉(Mozzarella)、埃曼塔尔奶酪(Emmentaler)、丹博奶酪(Danbo)、高达干酪(Gouda)、伊丹奶酪Edam、菲达式奶酪(Feta-type)、蓝奶酪、盐水奶酪、卡门培尔(Camembert)和布里奶酪(Brie)。本领域技术人员知道如何将凝结物转化成奶酪,方法可以见于文献中,参见例如Kosikowski, F.V., 和V.V.Mistry, “Cheese and Fermented Milk Foods (奶酪和发酵奶食品)”, 1997, 第3版. F.V.Kosikowski, L.L.C. Westport, CT. 如本文所用, 具有低于1.7% (w/w) 的NaCl浓度的奶酪被称为“低盐奶酪”。

[0084] 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和任选的其它微生物的产品, 所述其它微生物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由其衍生的任何微生物。包括嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种以外的乳酸菌株以给予终产品各种性质, 例如促进菌群的平衡的性质。如本文所用, 术语“酸奶”包括凝固型酸奶 (set yoghurt)、搅拌酸奶、饮用酸奶、小瑞士酸奶 (Petit Suisse)、热处理酸奶、特征为高蛋白质水平的脱乳清酸奶或希腊型酸奶和酸奶样产品。

[0085] 具体而言, 术语“酸奶”包括但不限于根据法国和欧洲法规定的酸奶, 例如通过仅借助特定嗜热乳酸菌 (即, 德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌) 的乳酸发酵获得的凝固乳制品, 所述乳酸菌被同时培养并被发现以至少1000万CFU (菌落形成单位) /g的量存活于终产品中。酸奶可以任选地含有添加的乳品原料 (例如奶油) 或其它成分如糖或甜味剂、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, 酸奶符合AFNOR NF 04-600标准和/或法典StanA-11a-1975标准对于发酵乳和酸奶的规范。为了满足AFNOR NF 04-600标准, 产品在发酵后必须不被加热, 并且乳品原料必须占终产品的最低70% (m/m)。

[0086] 在另一个实施方案中, 本发明提供食品、饲料或药品, 其包括一种或多种如上所述抑制后酸化的发酵乳杆菌种的细菌和一种或多种的:

[0087] (a) 至少一种另外的选自一种或多种下列属的细菌: 乳球菌属、链球菌属、乳酸杆菌属、明串珠菌属、假明串珠菌属 (*Pseudoleuconostoc* spp.)、片球菌属 (*Pediococcus* spp.)、短杆菌属 (*Brevibacterium* spp.) 和肠球菌属 (*Enterococcus* spp.);

[0088] (b) 以保藏号: DSM32092保藏于德国微生物保藏中心 (DSMZ) 的菌株CHCC15860的鼠李糖乳杆菌;

[0089] (c) 以保藏号: DSM23035保藏于德国微生物保藏中心 (DSMZ) 的菌株CHCC5366的鼠

李糖乳杆菌；

[0090] (d) 以保藏号:DSM24616保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的菌株CHCC12697的鼠李糖乳杆菌；

[0091] (e) 以保藏号:DSM24651保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的菌株CHCC12777的副干酪乳杆菌；和

[0092] (f) 以保藏号:DSM25612保藏于德国微生物保藏中心(DSMZ)的菌株CHCC14676的副干酪乳杆菌

附图说明

[0093] 图1:在(A) $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 或(B) $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存21天时,发酵乳制品随时间的pH发展。将产品用仅起子培养物(参照, Δ) 或起子培养物联合**FreshQ®4** ($\diamond$)、**Holdbac®YM-C Plus** (o) 或发酵乳杆菌CHCC14591 ($\square$) 发酵。

[0094] 图2:在(A) $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 和(B) $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存28天时,发酵乳制品随时间的pH发展。将产品用仅起子培养物(参照) 或起子培养物联合**FreshQ®4**、**Holdbac®YM-C Plus** 或发酵乳杆菌菌株发酵。

[0095] 图3:在用仅起子培养物(参照) 或起子培养物结合发酵乳杆菌菌株发酵的发酵乳制品中在 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存14天后的乙醛水平。LOD:检测限。LOQ:定量限。

[0096] 图4:在用仅起子培养物(参照) 或起子培养物结合发酵乳杆菌CHCC14591发酵的发酵乳制品中,在 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存14天后的乙醛水平。LOD:检测限。LOQ:定量限。

[0097] 图5:在 43°C 在奶(1%脂肪和4.5%蛋白质)中生长的四种商业起子培养物(FD-DVS YF-L812、F-DVS YF-L901、F-DVS YoFlex Mild 2.0和F-DVS CH-1)的酸化曲线。

[0098] 图6:在 6°C 储存长达43天后的用四种商业起子培养物(FD-DVS YF-L812、F-DVS YF-L901、F-DVS YoFlex Mild 2.0和F-DVS CH-1)之一发酵的酸奶的后酸化曲线。

[0099] 图7:在用仅起子培养物FD DVS YF-L812或F-DVS CH-1(参照) 或起子培养物联合9种发酵乳杆菌菌株之一发酵的发酵乳制品中,在 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存14天后的乙醛水平。LOD:检测限。LOQ:定量限。

[0100] 实施例1:

[0101] 发酵乳杆菌CHCC14591对后酸化的作用的分析

[0102] 将减脂(1.5%w/v)的均质奶在 $90 \pm 1^\circ\text{C}$ 下热处理20分钟并立即冷却。以0.02% (v/w) 接种商业起子培养物(F-DVS Mild 2.0), 并将接种的奶分配到200ml瓶中。一个瓶用 2×10^7 CFU/g总浓度的发酵乳杆菌CHCC14591接种, 两个瓶用推荐的剂量(对于**FreshU®4**和**Holdbac®YM-C Plus**分别为100U/T和20DCU/100L)的两种商业生物保护培养物(**FreshQ®4**和**Holdbac®YM-C Plus**)接种, 并且一个瓶用作参照, 并仅用起子培养物接种。所有瓶在 $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 的水浴中孵育并在这些条件下发酵直至达到 4.60 ± 0.1 的pH。发酵后, 剧烈摇动瓶以破碎凝结物并在冰上冷却。

[0103] 为监视对后酸化的作用, 将四个发酵奶样品(仅起始物、**FreshQ®4**、**Holdbac®YM-C Plus**和发酵乳杆菌CHCC14591)储存在 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下21天, 并在第1、7、14和21天测量pH。

[0104] 作用如图1所示,表明在奶发酵期间添加发酵乳杆菌CHCC14591导致与仅使用起子培养物相比和尤其与使用均促成后酸化的两种商业生物保护培养物相比较低的后酸化。

[0105] 实施例2:

[0106] 10种发酵乳杆菌菌株对后酸化的作用的分析

[0107] 将减脂(1.5%w/v)的均质奶在 $90 \pm 1^\circ\text{C}$ 下热处理20分钟并立即冷却。以0.02% (v/w) 接种商业起子培养物(F-DVS YF-L901),并将接种的奶分配到200ml瓶中。10个瓶用 $1 \times 10^7\text{CFU/g}$ 浓度的发酵乳杆菌菌株接种,并且一个瓶用作参照,并仅用起子培养物接种。所有瓶在 $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 的水浴中孵育并在这些条件下发酵直至达到 4.60 ± 0.1 的pH。发酵后,剧烈摇动瓶以破碎凝结物并在冰上冷却。

[0108] 测试的发酵乳杆菌菌株是:发酵乳杆菌CHCC12798、发酵乳杆菌CHCC12797、发酵乳杆菌CHCC14591、发酵乳杆菌CHCC14588、发酵乳杆菌CHCC15844、发酵乳杆菌CHCC15865、发酵乳杆菌CHCC15847、发酵乳杆菌CHCC15848、发酵乳杆菌CHCC15926和发酵乳杆菌CHCC2008。

[0109] 为监视对后酸化的作用,将11个发酵奶样品(仅起始物和起始物联合10个发酵乳杆菌菌株)储存在 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下28天,并在第1、7、14、21和28天测量pH。

[0110] 对后酸化的作用如图2所示,并表明与参考酸奶相比,发酵乳杆菌菌株——发酵乳杆菌CHCC12798、发酵乳杆菌CHCC12797、发酵乳杆菌CHCC14591、发酵乳杆菌CHCC14588、发酵乳杆菌CHCC15844、发酵乳杆菌CHCC15865、发酵乳杆菌CHCC15847、发酵乳杆菌CHCC15848、发酵乳杆菌CHCC15926和发酵乳杆菌CHCC2008的每种菌株,不会促成后酸化或甚至降低后酸化。

[0111] 这些发现是出乎意料的并且非常显著,因为观察到现有技术的抗真菌食品级细菌增加由起子培养物引起的后酸化作用。

[0112] 实施例3:

[0113] 10种发酵乳杆菌菌株对乙醛含量的作用

[0114] 测试了10种发酵乳杆菌菌株降低乙醛含量的能力。

[0115] 将减脂(1.5%w/v)的均质牛奶在 $90 \pm 1^\circ\text{C}$ 下热处理20分钟并立即冷却。以0.02% (v/w) 接种商业起子培养物(F-DVS YF-L901Yo-Flex®),并将接种的奶分配到200ml瓶中。10个瓶用 $1 \times 10^7\text{CFU/g}$ 浓度的发酵乳杆菌菌株接种,并且一个瓶用作参照,并仅用起子培养物接种。所有瓶在 $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 的水浴中孵育并在这些条件下发酵直至达到 4.60 ± 0.1 的pH。发酵后,剧烈摇动瓶以破碎凝结物并在冰上冷却。将瓶在 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存14天。

[0116] 在第14天,通过静态顶空气相色谱法(HSGC)分析样品中的乙醛,HSGC是分析复杂基质中的挥发物的灵敏方法。该装置由与具有火焰离子化检测器(FID)的气相色谱仪连接的静态顶空采样器组成。为此目的使用了以下设备:

[0117] HS-自动采样器:HS40XI,TurboMatrix 110,Perkin Elmer。

[0118] HS软件:HSControl v.2.00,Perkin Elmer。

[0119] GC:Autosystem XL,Perkin Elmer。

[0120] GC软件:Turbochrom导航仪,Perkin Elmer。

[0121] 柱:HP-FFAP 25m $\times$ 0.20mm $\times$ 0.33 μm ,Agilent Technologies

[0122] 已知浓度的标准品用于确定响应因子(校准),对照用于控制使用的响应因子在分

析系列内以及系列间和随时间(月)稳定。使用来自标准品的响应因子确定样品和对照中挥发物的浓度(ppm)。通过加入200 μ l 4N H₂SO₄至1g酸奶样品而制备样品,并立即通过HSGC分析。

[0123] 结果如图3所示,并表明发酵乳杆菌CHCC12798、发酵乳杆菌CHCC12797、发酵乳杆菌CHCC14591、发酵乳杆菌CHCC14588、发酵乳杆菌CHCC15844、发酵乳杆菌CHCC15865、发酵乳杆菌CHCC15847、发酵乳杆菌CHCC15848、发酵乳杆菌CHCC15926和发酵乳杆菌CHCC2008的每种菌株具有降低发酵乳制品中由起子培养物在发酵期间产生的乙醛的浓度的能力。

[0124] 实施例4:

[0125] 一种发酵乳杆菌菌株对乙醛含量的作用

[0126] 测试了一种发酵乳杆菌菌株降低乙醛含量的能力。

[0127] 将减脂(1.5%w/v)的均质牛奶在90 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C下热处理20分钟并立即冷却。以0.02%(v/w)接种商业起子培养物(F-DVS Mild 2.0),并将接种的奶分配到2个200ml瓶中。1个瓶以1 $\times$ 10⁷CFU/g的浓度接种发酵乳杆菌菌株,并且一个瓶用作参照,并仅用起子培养物接种。两个瓶在43 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C的水浴中孵育并在这些条件下发酵直至达到4.60 $\pm$ 0.1的pH。发酵后,剧烈摇动瓶以破碎凝结物并在冰上冷却。将瓶在7 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C下储存14天。

[0128] 在第14天,通过静态顶空气相色谱法(HSGC)分析样品中的乙醛,HSGC是分析复杂基质中的挥发物的灵敏方法。该装置由与具有火焰离子化检测器(FID)的气相色谱仪连接的静态顶空采样器组成。为此目的使用了以下设备:

[0129] HS-自动采样器:HS40XI,TurboMatrix 110,Perkin Elmer。

[0130] HS软件:HSControl v.2.00,Perkin Elmer。

[0131] GC:Autosystem XL,Perkin Elmer。

[0132] GC软件:Turbochrom导航仪,Perkin Elmer。

[0133] 柱:HP-FFAP 25m $\times$ 0.20mm $\times$ 0.33 μ m,Agilent Technologies

[0134] 已知浓度的标准品用于确定响应因子(校准),对照用于控制使用的响应因子在分析系列内以及系列间和随时间(月)稳定。使用来自标准品的响应因子确定样品和对照中挥发物的浓度(ppm)。通过加入200 μ l 4N H₂SO₄至1g酸奶样品而制备样品,并立即通过HSGC分析。

[0135] 结果如图4所示,并表明发酵乳杆菌CHCC14591具有降低发酵乳制品中由起子培养物在发酵期间产生的乙醛的浓度的能力。

[0136] 实施例5:

[0137] 商业起子培养物的功能分析

[0138] 基于不同的酸化特征来选择本文所包括的三种商业起子培养物。三种是冷冻的,F-DVS CH-1,F-DVS YoFlex Mild 2.0和F-DVS YF-L901;一种是冷冻干燥的,FD-DVS YF-L812。为了测试酸化特征的差异,将半脂奶用脱脂奶粉标准化为1%脂肪和4.5%蛋白质,并在85 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C热处理30分钟并立即冷却。将四种不同的商业起子培养物之一(F-DVS CH-1、F-DVS YoFlex Mild 2.0、F-DVS YF-L901或FD-DVS YF-L812)以0.02%(v/w)接种,并将接种的奶分配到200ml瓶中。将瓶在43 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C的水浴中孵育并在这些条件下发酵直至达到pH 4.5。在整个发酵过程中连续测量pH。随后,将瓶在6 $^{\circ}$ C下储存43天,并且以7天的间隔测量pH以确定后酸化的水平。

[0139] 图5中显示了三种商业起子培养物F-DVS CH-1、F-DVS YoFlex Mild2.0、F-DVS YF-L901和FD-DVS YF-L812的酸化特征。F-DVS CH-1显示快速发酵时间,在4.87小时内达到pH 4.55。F-DVS YoFlex Mild 2.0显示中间发酵时间,在5.29小时内达到pH 4.55。FD-DVS YF-L812和F-DVS YF-L901显示较慢的发酵,分别在6.45和5.87小时达到pH 4.55。后酸化特征显示FD-DVS YF-L812和F-DVS YoFlex Mild 2.0非常低的后酸化水平(在6℃储存43天后分别为 $\Delta \text{pH}=0.12$ 和 $\Delta \text{pH}=0.11$),F-DVS YF-L901中间的后酸化水平(在6℃下储存43天后 $\Delta \text{pH}=0.26$),和F-DVS CH-1的高度的后酸化(在6℃下储存43天后 $\Delta \text{pH}=0.55$) (图6)。

[0140] 实施例6:

[0141] 当用两种不同的起子培养物发酵时九种发酵乳杆菌菌株对乙醛含量的作用

[0142] 测试了9种发酵乳杆菌菌株降低乙醛含量的能力。

[0143] 将减脂(1.5%w/v)的均质牛奶在 $90 \pm 1^\circ\text{C}$ 下热处理20分钟并立即冷却。将奶以0.02% (v/w) 用两种商业起子培养物之一(F-DVS CH-1或FD-DVS YF-L812)接种,并将接种的奶分配到200ml瓶中。9个瓶以 1×10^7 CFU/g的浓度的发酵乳杆菌菌株接种,并且一个瓶用每种起子培养物接种用作参照,并仅用起子培养物接种。所有瓶在 $43 \pm 1^\circ\text{C}$ 的水浴中孵育并在这些条件下发酵直至达到 4.55 ± 0.1 的pH。发酵后,剧烈摇动瓶以破碎凝结物并在冰上冷却。将瓶在 $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 下储存14天。

[0144] 测试的发酵乳杆菌菌株是:发酵乳杆菌CHCC12798、发酵乳杆菌CHCC12797、发酵乳杆菌CHCC14591、发酵乳杆菌CHCC14588、发酵乳杆菌CHCC15844、发酵乳杆菌CHCC15865、发酵乳杆菌CHCC15847、发酵乳杆菌CHCC15926和发酵乳杆菌CHCC2008。

[0145] 在第14天,通过静态顶空气相色谱法(HSGC)分析样品中的乙醛,HSGC是分析复杂基质中的挥发物的灵敏方法。该装置由与具有火焰离子化检测器(FID)的气相色谱仪连接的静态顶空采样器组成。为此目的使用了以下设备:

[0146] HS-自动采样器:HS40XI,TurboMatrix 110,Perkin Elmer。

[0147] HS软件:HSControl v.2.00,Perkin Elmer。

[0148] GC:Autosystem XL,Perkin Elmer。

[0149] GC软件:Turbochrom导航仪,Perkin Elmer。

[0150] 柱:HP-FFAP 25m $\times$ 0.20mm $\times$ 0.33 μm ,Agilent Technologies

[0151] 已知浓度的标准品用于确定响应因子(校准),对照用于控制使用的响应因子在分析系列内以及系列间和随时间(月)稳定。使用来自标准品的响应因子确定样品和对照中挥发物的浓度(ppm)。通过加入200 μl 4N H_2SO_4 至1g酸奶样品而制备样品,并立即通过HSGC分析。

[0152] 结果如图7所示,并表明发酵乳杆菌CHCC12798、发酵乳杆菌CHCC12797、发酵乳杆菌CHCC14591、发酵乳杆菌CHCC14588、发酵乳杆菌CHCC15844、发酵乳杆菌CHCC15865、发酵乳杆菌CHCC15847、发酵乳杆菌CHCC15926和发酵乳杆菌CHCC2008的每种菌株具有降低发酵乳制品中由起子培养物在发酵期间产生的乙醛的浓度的能力。

[0153] 参考文献

[0154] 1.Tamime,A.Y.,和H.C.Deeth.1980.Yoghurt:technology and biochemistry.J.Food Prot.43:939-977.

[0155] 2.A.C.S.D.Chaves,M.Fernandez,A.L.S.Lerayer,I.Mierau,M.Kleerebezem,和

J.Hughenoltz,2002,Metabolic Engineering of Acetaldehyde Production by Streptococcus thermophilus (嗜热链球菌生产乙醛的代谢工程)

[0156] 3.Lees,G.J.,和G.R.Jago.1976.Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria(由乳酸菌从苏氨酸形成乙醛).J.Dairy Res.43:75-83.

[0157] 4.Kurmann,J.A.(1982)Die Obersauerung der Joghurtgallerte,ein häufig auftretender und zu wenig beachteter Produktionsfehler,dessen Entstehung und **Bekämpfung** (酸奶果冻的过度酸化,一种频繁发生和被忽视的生产错误,其形成和控制).Dt.Molkerei-Zeitung 103,690-698.

[0158] 保藏和专家解决方案

[0159] 申请人要求下述保藏的微生物样品只能提供给专家,直到本专利的授权日。

[0160] 发酵乳杆菌菌株CHCC12798,其以保藏号32084于2015-07-16保藏在德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦瑞克D-38124,茵霍芬街7B。

[0161] 发酵乳杆菌菌株CHCC12797,其以保藏号32085于2015-07-16保藏在德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦瑞克D-38124,茵霍芬街7B。

[0162] 发酵乳杆菌菌株CHCC14591,其以保藏号32086于2015-07-16保藏在德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦瑞克D-38124,茵霍芬街7B。

[0163] 发酵乳杆菌菌株CHCC14588,其以保藏号32087于2015-07-16保藏在德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦瑞克D-38124,茵霍芬街7B。

[0164] 发酵乳杆菌菌株CHCC15844,其以保藏号32088于2015-07-16保藏在德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦瑞克D-38124,茵霍芬街7B。

[0165] 发酵乳杆菌菌株CHCC15865,其以保藏号32089于2015-07-16保藏在德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦瑞克D-38124,茵霍芬街7B。

[0166] 发酵乳杆菌菌株CHCC15847,其以保藏号32090于2015-07-16保藏在德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦瑞克D-38124,茵霍芬街7B。

[0167] 发酵乳杆菌菌株CHCC15848以保藏号32091于2015-07-16保藏在德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦瑞克D-38124,茵霍芬街7B。

[0168] 发酵乳杆菌菌株CHCC15926,其以保藏号32096于2015-07-22保藏在德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦瑞克D-38124,茵霍芬街7B。

[0169] 发酵乳杆菌菌株CHCC2008,其以保藏号22584于2009-05-19保藏在德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦

瑞克D-38124,茵霍芬街7B。

[0170] 鼠李糖乳杆菌菌株CHCC15860,其以保藏号32092于2015-07-16保藏在德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH;DSMZ),布伦瑞克D-38124,茵霍芬街7B。

[0171] 该保藏是根据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约而进行的。

[0001]

关于微生物保藏的说明

申请人或代理人档案号 P5942PCOO	国际申请号 PCT/EP2016/070398
----------------------	-------------------------

关于微生物保藏的说明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

微生物保藏的说明	
A. 对说明书第 21 页, 第 35 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 ☐
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 2015-07-16	保藏号 DSM 32084
C. 补充说明 (必要时)	更多信息在附加页中 ☐
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”) 无	

由受理局填写
☒ 本页已经和国际申请一起收到
授权官员 弗洛伦斯·奥斯丹

由国际局填写
☐ 国际局收到本页日期
授权官员

附页

微生物保藏(2)	
A.对说明书第 22 页, 第 1 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 ☐	
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 2015-07-16	保藏号 DSM 32085
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 ☐	
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”) 无	

微生物保藏(3)	
A.对说明书第 22 页, 第 6 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 ☐	
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 2015-07-16	保藏号 DSM 32086
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 ☐	

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”）

无

微生物保藏(4)

A.对说明书第 22 页，第 11 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 ☐

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 2015-07-16

保藏号 DSM 32087

C.补充说明（必要时）

更多信息在附加页中 ☐

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）

附页

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”） 无	
微生物保藏(5)	
A.对说明书第 22 页，第 16 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 ☐	
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 2015-07-16	保藏号 DSM 32088
C.补充说明（必要时） 更多信息在附加页中 ☐	
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”） 无	
微生物保藏(6)	
A.对说明书第 22 页，第 26 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 ☐	
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	

附页

保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 德国	
保藏日期 2015-07-16	保藏号 DSM 32090
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 ☐	
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”) 无	

微生物保藏(7)	
A.对说明书第 22 页,第 21 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 ☐	
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 2015-07-16	保藏号 DSM 32089
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 ☐	
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)	

附页

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”） 无	
微生物保藏(8)	
A.对说明书第 22 页，第 31 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 ☐
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 2015-07-16	保藏号 DSM 32091
C.补充说明（必要时）	更多信息在附加页中 ☐
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”） 无	
微生物保藏(9)	

附页

A.对说明书第 22 页, 第 36 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 ☐	
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 2015-07-22	保藏号 DSM 32096
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 ☐	
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”) 无	

微生物保藏(10)	
A.对说明书第 23 页, 第 5 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 ☐	
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 2009-05-19	保藏号 DSM 22584
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 ☐	

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”）

无

微生物保藏(11)

A.对说明书第 23 页，第 10 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 ☐

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 2015-07-16

保藏号 DSM 32092

C.补充说明（必要时）

更多信息在附加页中 ☐

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）

附页

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”）
无

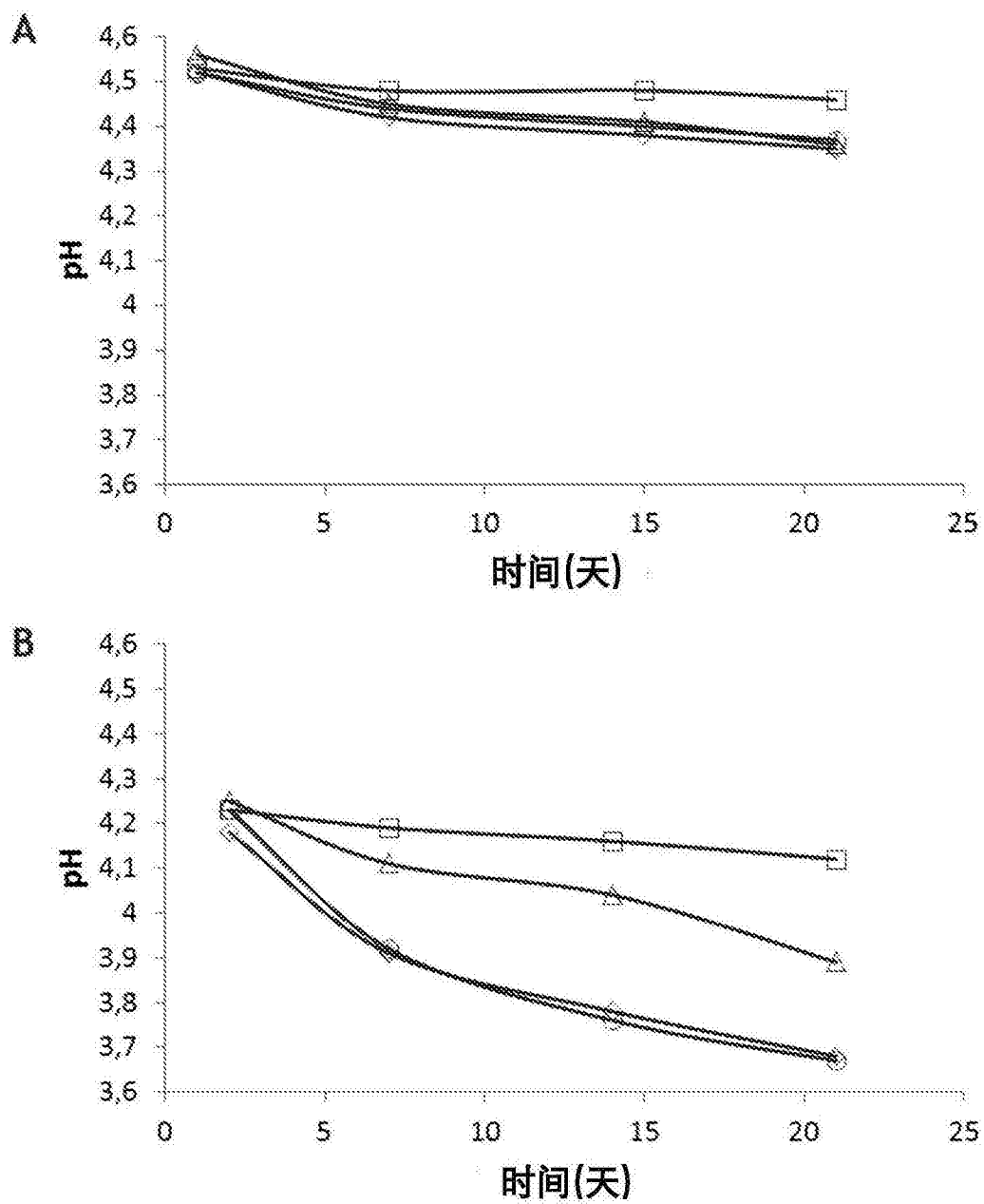


图1

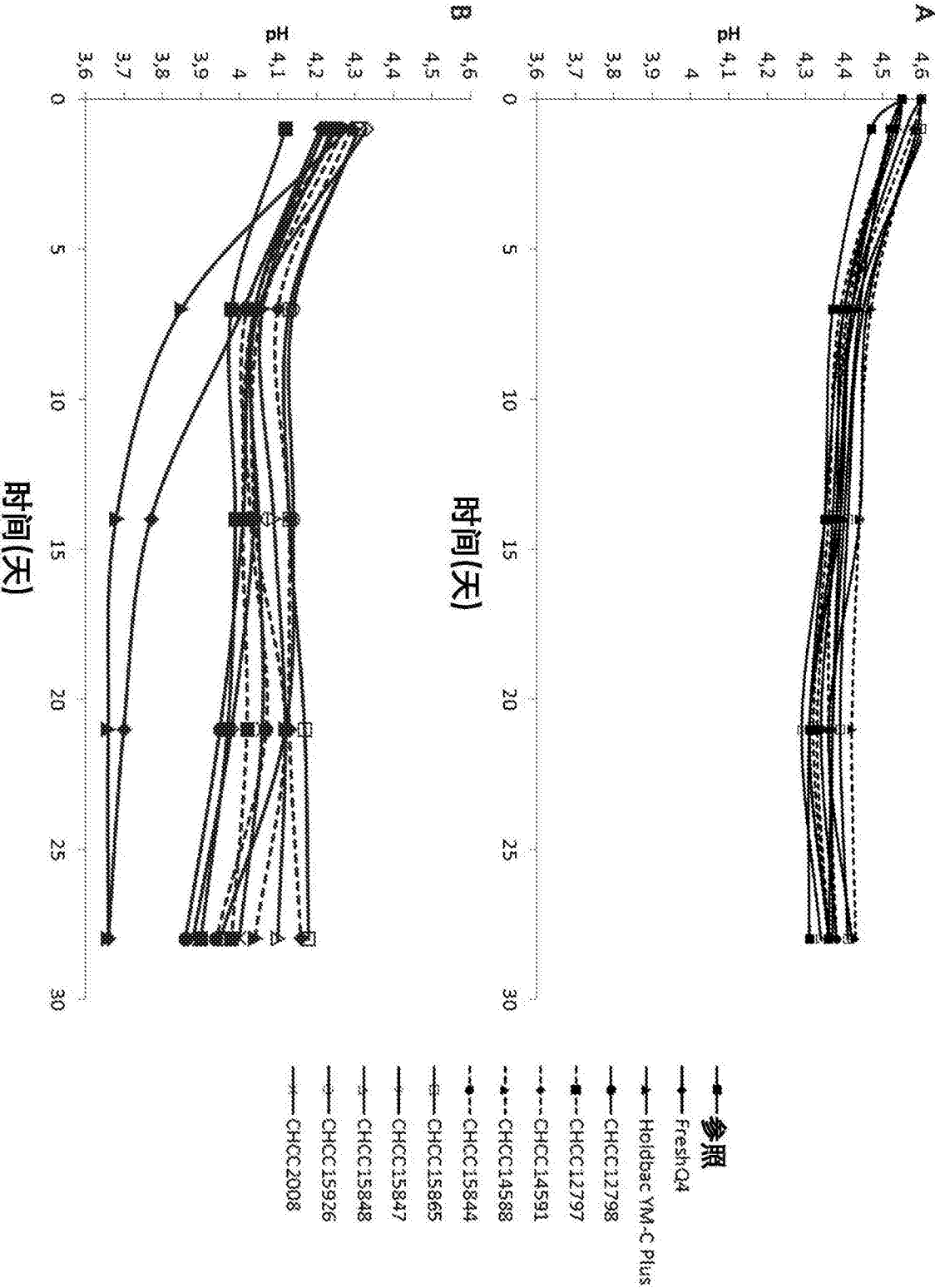


图2

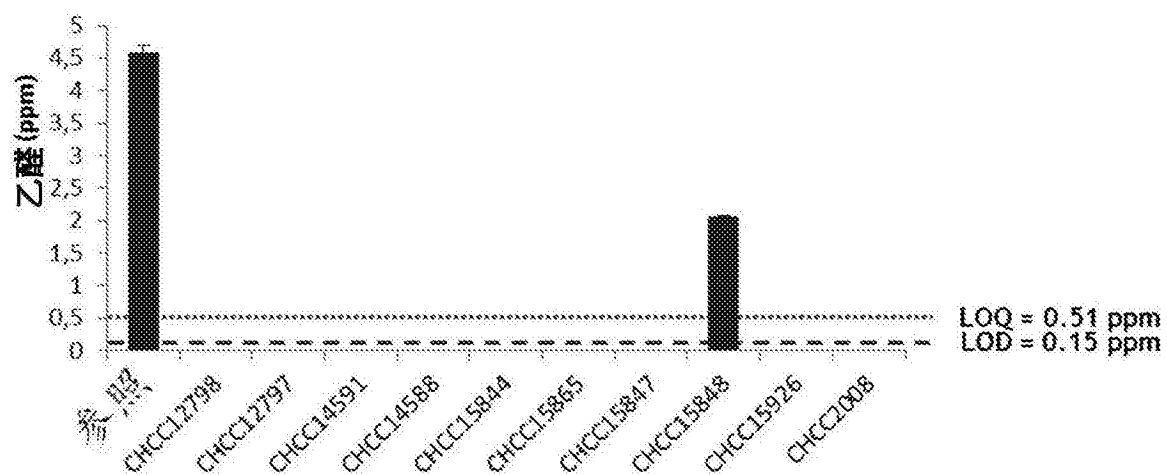


图3

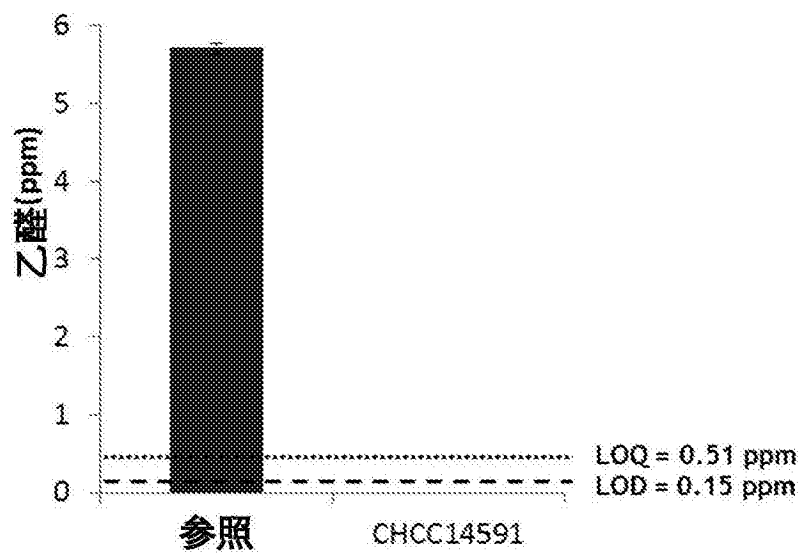


图4

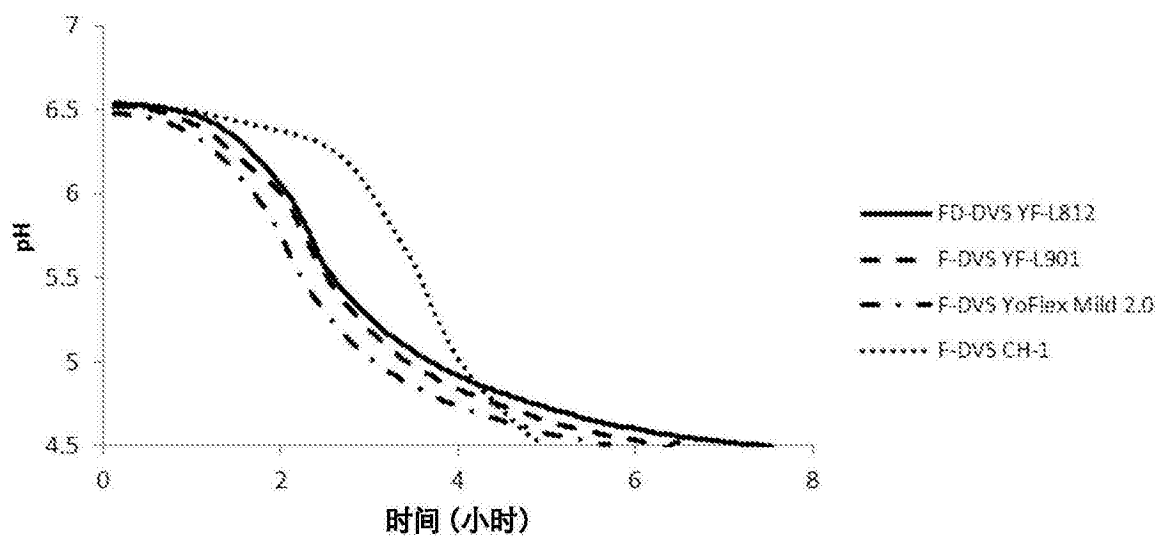


图5

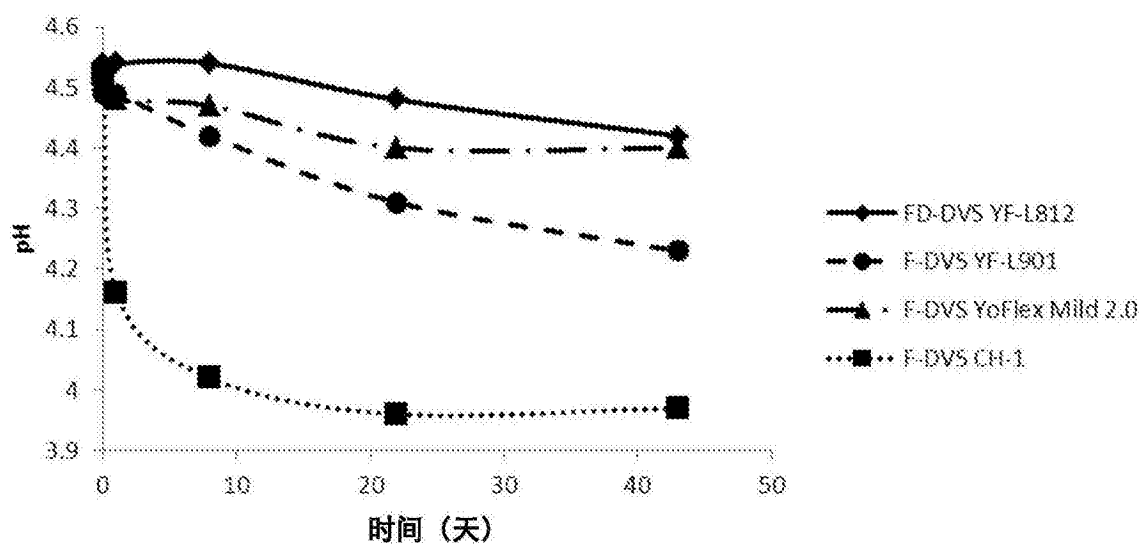


图6

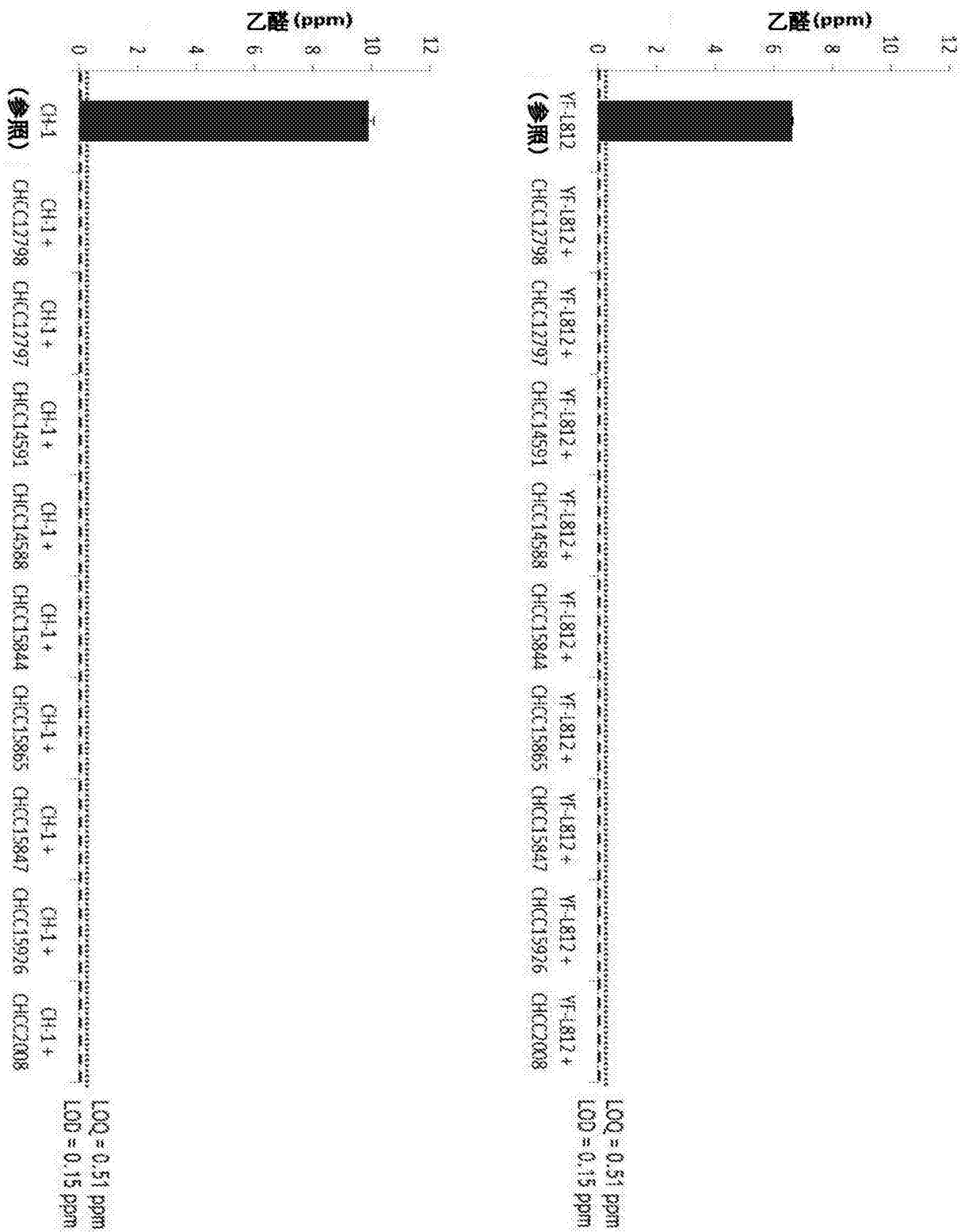


图7