



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103501622 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201280017203. 0

(22) 申请日 2012. 04. 09

(30) 优先权数据

11161665. 2 2011. 04. 08 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 10. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/056386 2012. 04. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/136832 EN 2012. 10. 11

(83) 生物保藏信息

DSM 24616 2011. 03. 01

(73) 专利权人 科·汉森有限公司

地址 丹麦霍尔斯霍姆

(72) 发明人 露西安娜·吉梅内斯

贡纳尔·欧尔戈德

乔治奥斯·特哈斯

盖尔·莱蒂·布克霍恩

迪特·玛丽·勃兰特

迪特·玛丽·福克恩伯格

布里吉特·韦德尔·撒芝

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陈建芳 阎斌斌

(51) Int. Cl.

A23C 9/123(2006. 01)

A23C 19/032(2006. 01)

A23L 1/03(2006. 01)

C12N 1/20(2006. 01)

C12P 7/18(2006. 01)

C12P 7/26(2006. 01)

C12R 1/225(2006. 01)

C12R 1/46(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101932250 A, 2010. 12. 29,

DEGHEIDI M A ET AL. Utilization of probiotic bacteria in UF white soft cheese. 《EGYPTIAN JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, EGYPTIAN SOCIETY OF DAIRY SCIENCE, CAIRO, EG》. 2009, 第 37 卷 (第 1 期), 第 73-84 页.

CICHOSZ GRAINYNA ET AL. Aroma compounds in gouda cheese produced with addition of probiotic strains. 《POLISH JOURNAL OF NATURAL SCIENCES》. 2006, 第 21 卷 (第 2 期), 第 987-997 页.

审查员 许闽婷

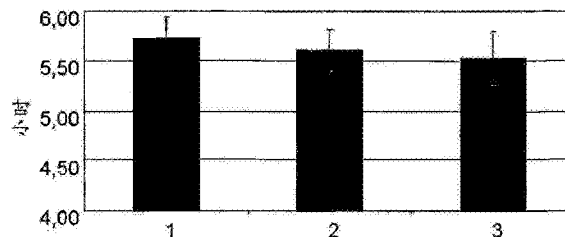
权利要求书1页 说明书13页 附图4页

(54) 发明名称

增味性鼠李糖乳杆菌 (LACTOBACILLUS RHAMNOSUS)

(57) 摘要

本发明涉及适于制备乳制品的组合物, 所述组合物包含至少一种起子培养物和鼠李糖乳杆菌 (Lactobacillus rhamnosus) 菌株, 所述鼠李糖乳杆菌菌株能够赋予所述乳制品提高的奶油风味而不会负面地影响所述乳制品的流变性、发酵时间或后酸化。本发明进一步涉及制备具有高丁二酮含量的诸如低脂肪酸奶或奶酪等乳制品的方法。可用于制备这种乳制品的鼠李糖乳杆菌菌株也是本发明的一部分。



1. 一种适于制备乳制品的组合物, 包含起子培养物和鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株, 其中所述鼠李糖乳杆菌菌株是以保藏号 DSM24616 保藏在德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ) 的鼠李糖乳杆菌 CHCC12697。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述起子培养物是嗜热性起子培养物。

3. 根据权利要求 2 所述的组合物, 其中所述起子培养物选自乳球菌属 (*Lactococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*) 和乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 组成的组。

4. 一种根据前述权利要求中任一权利要求所述的组合物用于制备乳制品的用途。

5. 根据权利要求 4 所述的用途, 其中所述乳制品是发酵乳产品。

6. 根据权利要求 5 所述的用途, 其中所述发酵乳产品是酸奶。

7. 根据权利要求 4 所述的用途, 其中所述乳制品是奶酪。

8. 根据权利要求 4 到 7 中任一权利要求所述的用途, 其中所述乳制品包含至少 0.75ppm 丁二酮。

9. 根据权利要求 8 所述的用途, 其中所述乳制品包含至少 1.5ppm 丁二酮。

10. 一种产生乳制品的方法, 包括:

a) 向乳基质接种根据权利要求 1 到 3 中任一权利要求所述的组合物;

b) 发酵所述乳基质;

c) 任选地将另外的微生物和 / 或添加剂添加到所述乳基质;

d) 任选地后处理所述乳基质; 和

e) 任选地包装所述乳制品。

11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中步骤 b) 包括在高于 35°C 的温度发酵所述乳基质。

12. 一种以保藏号 DSM24616 保藏在德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ) 的鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 菌株。

增味性鼠李糖乳杆菌 (LACTOBACILLUS RHAMNOSUS)

技术领域

[0001] 本发明涉及适于制备乳制品的组合物,所述组合物包含至少一种起子培养物和鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株,所述鼠李糖乳杆菌菌株能够赋予所述乳制品提高的奶油风味而不会负面地影响所述乳制品的流变性。本发明进一步涉及制备具有高丁二酮 (diacetyl) 含量的诸如低脂肪酸奶或奶酪等乳制品的方法。可用于制备这种乳制品的鼠李糖乳杆菌菌株也是本发明的一部分。

背景技术

[0002] 在乳品业,消费者对于具有低脂肪含量或不具有脂肪含量的产品的需求正与日俱增。

[0003] 然而,这种低脂肪乳制品经常缺乏奶油风味。

[0004] 丁二酮是高价产品并且在乳品业将它用作产生黄油味的化合物添加到诸如人造黄油和油基产品等产品中。

[0005] 杂乳酸菌形成作为副产物的丁二酮 / 乙偶姻 (acetoin) 以及作为主要产物的乳酸盐。细胞通过丙酮酸氧化酶从丙酮酸盐和焦磷酸硫胺素形成活性乙醛。活性乙醛与另一分子的丙酮酸盐缩合并形成 α -乙酰乳酸合成酶。人们对于鼠李糖乳杆菌中丁二酮的形成并未完全了解——在乳酸乳球菌乳酸亚种丁二酮乳酸生物变型 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyfactis*) 中,已经提出 α -乙酰乳酸盐通过 α -乙酰乳酸氧化酶氧化成丁二酮 (Jyoti 等 2003)。乙偶姻是通过 α -乙酰乳酸盐的脱羧来直接形成。乙偶姻也可以通过不可逆丁二酮还原酶将丁二酮还原成乙偶姻来形成。

[0006] 鼠李糖乳杆菌是可用于产生如丁二酮和乙偶姻等风味化合物的杂乳酸菌 (Jyoti 等 2003)。所产生丁二酮的水平取决于菌株以及菌株所生长的基质。

[0007] 美国专利号 4,867,992 和美国专利号 5,236,833 涉及通过利用产乳酸菌分别发酵咖啡基质和果胶基质来产生丁二酮的方法。

[0008] 丁二酮和 / 或乙偶姻的制备、浓缩和向食品的添加会带来巨大成本。

[0009] US4,678,673 涉及利用产生丁二酮和乙偶姻的鼠李糖乳杆菌菌株发酵的油料种子产品。发酵的油料种子产品具有黄油或乳品样风味。没有提到在乳制品中使用鼠李糖乳杆菌。

[0010] 因此,需要制备具有改进的奶油风味而不高成本地添加丁二酮和 / 或乙偶姻的乳制品的方法。

发明内容

[0011] 本发明的一个目标是提供用于制备具有通过鼠李糖乳杆菌菌株的存在赋予的提高了的奶油味的改进乳制品的组合物和方法。

[0012] 本发明的另一目标是提供具有改进的性质的新颖鼠李糖乳杆菌菌株,所述性质与能够使诸如酸奶或奶酪等乳制品具有提高的奶油风味有关。

[0013] 其它目标将在下文中变得明显,另外一些目标对于本发明所属领域的技术人员来说将是显而易见的。

[0014] 在本文的工作实施例中可以看出,所述以保藏号 DSM24616 保藏在德国微生物菌种保藏中心 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) (DSMZ) 的鼠李糖乳杆菌菌株 CHCC12697 产生丁二酮和乙偶姻,从而使乳制品具有提高的奶油风味,而不会显著影响乳制品的流变性和后酸化。

[0015] 因此,本发明的第一个方面涉及用于制备乳制品的组合物,所述组合物包含至少一种起子培养物和鼠李糖乳杆菌菌株。

[0016] 在更优选的实施方案中,鼠李糖乳杆菌菌株是以保藏号 DSM24616 保藏在德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ) 的鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 或其突变菌株,其中所述突变菌株通过使用保藏的菌株作为起始材料获得。

[0017] 本发明的第二个方面涉及根据本发明的第一个方面的组合物用于制备乳制品的用途。

[0018] 本发明的第三个方面涉及产生乳制品的方法,所述方法包括以下步骤:

[0019] a) 向乳基质接种根据本发明的第一个方面的组合物;

[0020] b) 发酵所述乳基质;

[0021] c) 任选地将另外的微生物和/或添加剂添加到所述乳基质;

[0022] d) 任选地后处理所述乳基质;和

[0023] e) 任选地包装所述乳制品。

[0024] 本发明的第四个方面涉及可通过根据本发明的第三个方面的方法获得的乳制品。

[0025] 本发明的第五个方面涉及以保藏号 DSM24616 保藏在德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ) 的鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 菌株或其突变菌株,其中所述突变菌株通过使用所述保藏的菌株作为起始材料获得。

附图说明

[0026] 图 1 绘示酸奶的发酵时间 (达到 pH4.55 的时间)。利用含有嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 和保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) 的多个菌株的乳酸菌培养物来制备酸奶,所述乳酸菌培养物含有 0% 鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 (1)、7.5% 鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 (2) 和 15% 鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 (3)。由 3 个重复计算标准偏差值。

[0027] 图 2 图解说明酸奶 pH 在 42 天内的演变。利用含有嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌的多个菌株的乳酸菌培养物制备酸奶,所述乳酸菌培养物含有 0% 鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 (1)、7.5% 鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 (2) 和 15% 鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 (3)。由 3 个重复计算标准偏差值。

[0028] 图 3 绘示酸奶的流变学测量。利用含有嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌的多个菌株的乳酸菌培养物制备酸奶,所述乳酸菌培养物含有 0% 鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 (1)、7.5% 鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 (2) 和 15% 鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 (3)。由 3 个重复计算标准偏差值。

[0029] 图 4 显示酸奶中的丁二酮。利用含有嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌的多个菌株的

乳酸菌培养物制备酸奶,所述乳酸菌培养物含有 0% 鼠李糖乳杆菌 CHCC12697(1)、7.5% 鼠李糖乳杆菌 CHCC12697(2) 和 15% 鼠李糖乳杆菌 CHCC12697(3)。由 2 个重复计算标准偏差值。

[0030] 图 5 显示在利用鼠李糖乳杆菌 CHCC12534(以 0.003g/1 接种)或鼠李糖乳杆菌 CHCC12697(以 0.003g/1 接种)和酸奶背景(嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌(以总共 0.007g/1 接种))的单一菌株在 43℃ 在乳中发酵后,发酵乳中的挥发性化合物(VOC)的浓度。

[0031] 图 6 显示在利用菌株鼠李糖乳杆菌 CHCC12534(以 0.003g/1 接种)或鼠李糖乳杆菌 CHCC12697(以 0.003g/1 接种)在酸奶背景(嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌(以总共 0.007g/1 接种))中在 43℃ 在乳中发酵后,发酵乳中的挥发性化合物(VOC)的浓度。

[0032] 图 7 显示在 7 周熟化后,添加鼠李糖乳杆菌 CHCC12697(以 0.02% (w/w) 接种)(LBArh12697)或不添加鼠李糖乳杆菌 CHCC12697(无添加物)的 Gouda40+ 奶酪中的丁二酮风味的感官评估。结果呈现为具有 95.0% 最小有效距离间隔(Least Significant Distance interval)的平均感官值。

[0033] 图 8 显示在 7 周熟化后,添加鼠李糖乳杆菌 CHCC12697(以 0.02% (w/w) 接种)(LBArh12697)或不添加(无添加物)鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 的 Gouda40+ 奶酪中的丁二酮气味的感官评估。结果呈现为具有 95.0% 最小有效距离间隔的平均感官值。

[0034] 图 9 显示在 7 周和 19 周熟化后,在添加鼠李糖乳杆菌 CHCC12697(以 0.02% (w/w) 接种)(LBArh12697)或不添加(无添加物)鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 的 Gouda40+ 奶酪中分别检测到的丁二酮量。结果呈现为具有标准偏差间隔获得的平均丁二酮值(信/噪比)。

具体实施方式

[0035] 定义

[0036] 如本文中所使用,术语“乳酸菌”指发酵糖同时产生酸(包括乳酸(作为主要产生的酸)、乙酸和丙酸)的革兰氏阳性微需氧或厌氧菌。工业上最有用的乳酸菌发现于“乳杆菌目(Lactobacillales)”,包括乳球菌属(Lactococcus spp.)、链球菌属(Streptococcus spp.)、乳杆菌属(Lactobacillus spp.)、明串球菌属(Leuconostoc spp.)、伪明串球菌属(Pseudoleuconostoc spp.)、片球菌属(Pediococcus spp.)、短杆菌属(Brevibacterium spp.)、肠球菌属(Enterococcus spp.)和丙酸杆菌属(Propionibacterium spp.)。另外,属于严格厌氧菌的组的产乳酸菌双歧杆菌(即双歧杆菌属(Bifidobacterium spp.))一般包含在乳酸菌的组中。这些经常单独或与其它乳酸菌组合用作食物培养物。

[0037] 包括乳杆菌种和嗜热链球菌种的细菌在内的乳酸菌通常以用于批量起子繁殖(bulk starter propagation)的冷冻或冻干培养物的形式或以所谓的“直投式”(Direct Vat Set ;DVS)培养物的形式供应给乳品业,旨在直接接种到发酵器皿或桶中,用于产生乳制品,例如发酵奶产品或奶酪。所述乳酸菌培养物一般称作“起子培养物”或“起子”。

[0038] 术语“嗜中温生物”在本文中是指在中等温度(15℃ -40℃)下繁衍最好的微生物。工业上最有用的嗜中温菌包括乳球菌属和明串球菌属。术语“嗜中温发酵”在本文中是指在约 12℃ 至约 35℃ 的温度下发酵。术语“嗜中温乳制品”是指通过嗜中温起子培养物的嗜中温发酵制备的乳制品并且包括诸如以下的乳制品:酪乳、酸乳、发酵乳(cultured milk)、

斯美塔那酸奶油 (smetana)、酸乳脂和新鲜奶酪,例如 quark 奶酪、tvarog 奶酪和乳脂奶酪。

[0039] 术语“嗜热生物”在本文中是指在高于 43℃ 的温度下繁衍最好的微生物。工业上最有用的嗜热性菌包括链球菌属和乳杆菌属。术语“嗜热发酵”在本文中是指在高于约 35℃ 的温度下发酵。术语“嗜热性乳制品”是指通过嗜热性起子培养物的嗜热性发酵制备的乳制品并且包括诸如酸奶等乳制品。

[0040] 术语“乳”应理解为通过给任何哺乳动物(例如奶牛、绵羊、山羊、水牛或骆驼)挤奶而获得的乳分泌物。在优选实施方案中,乳是牛乳。术语乳还包括由植物材料制得的蛋白质/脂肪溶液,例如豆乳。

[0041] 术语“乳基质”可为可根据本发明方法经受发酵的任何生乳和/或加工乳材料。因此,有用的乳基质包括但不限于包含蛋白质的任何乳或乳状产品的溶液/悬浮液,所述乳或乳状产品是例如全脂乳、低脂乳、脱脂乳、酪乳、复原乳粉(reconstituted milk powder)、炼乳(condensed milk)、乳粉(dried milk)、乳清、乳清渗透物、乳糖、由乳糖结晶获得的母液、乳清蛋白浓缩物或乳脂。显然,乳基质可来源于任何哺乳动物,例如基本上纯的哺乳动物乳或复原乳粉。

[0042] 在发酵之前,乳基质可根据所属领域中已知的方法进行均质化和巴氏灭菌(pasteurized)。

[0043] 本文所用的“均质化”意指强烈混合以获得可溶的悬浮液或乳液。如果均质化在发酵之前执行,那么进行均质化以将乳中的脂肪破碎成较小尺寸以便其不再与乳分离。这可通过在高压下迫使乳通过小孔来实现。

[0044] 本文所用的“巴氏灭菌”意指处理乳基质以减少或消除诸如微生物等活生物体的存在。优选地,巴氏灭菌是通过维持指定温度指定时段来获得的。指定温度通常通过加热来获得。可选择温度和持续时间以便杀死或灭活某些细菌,例如有害细菌。随后可进行快速冷却步骤。

[0045] 本发明方法中的“发酵”意指通过微生物的作用将碳水化合物转化为醇类或酸类。优选地,本发明方法中的发酵包括将乳糖转化为乳酸。

[0046] 打算用于产生乳制品的发酵工艺是众所周知的,并且所属领域技术人员将了解如何选择适宜的工艺条件,例如温度、氧、微生物的量和特性以及处理时间。显然,应选择发酵条件以便实现本发明,即获得固体(例如奶酪)或液体形式(发酵奶产品)的乳制品。

[0047] 在本上下文中,术语“剪切应力”决定粘度。粘度(单位是 Pa·s)定义为剪切应力(Pa)/剪切速率(1/s)。

[0048] 剪切应力值在本文中报告为在剪切速率=3001/s 下的标准。感官实验已显示(数据未显示),当使用在剪切速率 3001/s 下测量的粘度时,发现流变学测量与感官粘度/口腔浓厚感(mouth thickness)之间的最好相关性。

[0049] 在本上下文中,术语“突变体”应理解为借助例如遗传工程、辐射、UV 光和/或化学处理和/或诱导基因组变化的方法从本发明菌株得到的菌株。优选地,突变体为功能上等效的突变体,例如具有与母本菌株基本上相同或比母菌株改进的性质(例如关于丁二酮产生、粘度、凝胶硬度、口腔包覆感、风味、后酸化、酸化速度和/或噬菌体稳健性(phage robustness))的突变体。这种突变体是本发明的一部分。尤其地,术语“突变体”是指通过使本发明菌株经受任何常规的诱变处理(包括用诸如乙烷甲烷磺酸盐(EMS)或 N-甲

基 -N' - 硝基 -N- 硝基胍 (NTG) 等化学诱变剂、UV 光处理) 而获得的菌株, 或自发地发生的突变体。突变体可能已经受若干次诱变处理(单次处理应理解为包含一个诱变步骤、之后筛选 / 选择步骤), 但本申请优选地, 实施不超过 20 次或不超过 10 次或不超过 5 次处理(或筛选 / 选择步骤)。在本申请优选的突变体中, 与母本菌株相比, 细菌基因组中小于 5% 或小于 1% 或甚至小于 0.1% 的核苷酸已转变为另一核苷酸, 或缺失。

[0050] 除非本文另外指明或者上下文明显矛盾, 否则在描述本发明的上下文中(尤其在下文权利要求书的上下文中) 所用术语“a/an(一)”和“所述”以及类似指示物应理解为涵盖单数与复数二者。除非另有说明, 否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应理解为开放性术语(即, 意指“包括但不限于”)。除非本文另外指明, 否则本文叙述的值的范围仅仅打算作为个别地表示落入此范围内的每一单独值的简化方法, 并且每一单独值都被并入本说明书中, 就如同其在本文中被个别地叙述一样。除非本文另有说明或上下文明显矛盾, 否则, 本文所描述的所有方法都可按任何适宜的顺序执行。除非另外要求, 否则, 使用本文所提供的任何和所有实例或例示性用语(例如, “诸如”) 仅仅打算用于更好地阐明本发明, 而并不对本发明范围构成限制。本说明书中的任何用语都不应理解为表明是任何非实施本发明必不可少的要求要素。

[0051] 本发明的实施方式和各个方面

[0052] 本发明的发明人已惊讶地发现, 通过用鼠李糖乳杆菌菌株与起子培养物接种和发酵乳基质, 可赋予所得乳制品可口的奶油风味而不会负面地影响乳制品的质地、发酵时间和后酸化。

[0053] 在以保藏号 DSM24616 保藏在德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ) 的鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 存在下通过嗜中温 (26°C 和 30°C) 和嗜热性 (43°C) 发酵工艺制备的乳制品中检测到提高的奶油风味。

[0054] 术语“提高的奶油风味”意指与不包含根据本发明的鼠李糖乳杆菌菌株的产品相比, 所述产品中丁二酮和 / 或乙偶姻的含量有所增加和 / 或所述产品的由感官小组 (sensory panel) 所测定的奶油风味提高。

[0055] 不希望受到理论约束, 认为根据本发明的鼠李糖乳杆菌菌株赋予乳制品的提高的奶油风味归因于鼠李糖乳杆菌菌株的提高的丁二酮和 / 或乙偶姻产量。

[0056] 在一个优选的实施方案中, 所述乳制品是低脂肪 / 无脂肪发酵乳产品或奶酪, 当根据本发明的鼠李糖乳杆菌菌株没有用于发酵中时, 所述乳制品是基本上没有奶油风味的。

[0057] 如本文所述的鼠李糖乳杆菌菌株可用于用以制备乳制品的组合物, 所述组合物包含至少一种起子培养物和鼠李糖乳杆菌菌株。

[0058] 通常, 这种组合物包含浓缩形式的细菌, 包括冷冻、干燥或冷冻干燥的浓缩物, 其通常具有 10^4 cfu 到 10^{12} cfu(菌落形成单位) / 克组合物范围内的活细胞浓度, 包括至少 10^4 cfu/ 克组合物, 诸如至少 10^5 cfu/g, 例如至少 10^6 cfu/g, 诸如至少 10^7 cfu/g, 例如, 至少 10^8 cfu/g, 诸如至少 10^9 cfu/g, 例如至少 10^{10} cfu/g, 诸如至少 10^{11} cfu/g。因此, 本发明的抗微生物组合物优选以冷冻、干燥或冷冻干燥的形式存在, 例如作为直投式 (DVS) 培养物存在。然而, 如本文所用的抗微生物组合物还可为在诸如水或 PBS 缓冲液等液体介质中悬浮冷冻、干燥或冷冻干燥细胞浓缩物后获得的液体。倘若本发明的抗微生物组合物是悬浮液, 那

么活细胞浓度在 10^4 cfu 到 10^{12} cfu(菌落形成单位)/ml 组合物范围内,包括至少 10^4 cfu/ml 组合物,诸如至少 10^5 cfu/ml,例如至少 10^6 cfu/ml,诸如至少 10^7 cfu/ml,例如至少 10^8 cfu/ml,诸如至少 10^9 cfu/ml,例如至少 10^{10} cfu/ml,诸如至少 10^{11} cfu/ml。

[0059] 所述组合物另外可含有作为其它组分的冷冻保护剂和 / 或常用添加剂,包括营养素,例如酵母提取物、糖和维生素,例如维生素 A、C、D、K 或 B 族维生素。可添加到本发明组合物的适宜冷冻保护剂是改进微生物的耐寒性的组分,例如甘露醇、山梨醇、三聚磷酸钠、木糖醇、甘油、棉子糖、麦芽糖糊精、赤藓醇、苏糖醇、海藻糖、葡萄糖和果糖。其它添加剂可包括例如碳水化合物、调味剂、矿物质、酶(例如粗制凝乳酶(rennet)、乳糖酶和 / 或磷脂酶)。

[0060] 由于在乳酸菌发酵工艺中应用混合培养物作为起子培养物是正常的,因此在某些实施方案中所述组合物包含属于相同种或属于不同种的许多菌株。起子培养物中乳酸菌的这种有用组合的典型实施例是保加利亚乳杆菌菌株与嗜热链球菌菌株的混合物。

[0061] 在本发明一优选实施方案中,起子培养物是嗜热性起子培养物并且所述组合物适于嗜热性发酵。

[0062] 在另一优选实施方案中,起子培养物选自链球菌属和乳杆菌属组成的组。优选实施方案中的起子培养物包含至少一种乳酸乳球菌菌株。起子培养物可包含所属领域中已知的任何乳酸乳球菌菌株,例如来自乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)、乳酸乳球菌霍氏亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*)或乳酸乳球菌乳酸亚种的菌株。在再一优选实施方案中,起子培养物包含乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)菌株和乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)菌株。

[0063] 所述组合物可用于制备具有提高的奶油风味的乳制品。

[0064] 在一优选实施方案中,乳制品是发酵乳产品,例如酸奶。在另一优选实施方案中,乳制品是奶酪。

[0065] 在一优选实施方案中,乳制品含有至少 0.75ppm 丁二酮,诸如至少 1.0ppm 丁二酮,诸如至少 1.5ppm 丁二酮。嗜中温乳制品可包含约 0.75ppm 至 3.00ppm 的丁二酮,更优选地约 1.00ppm 至 2.50ppm 的丁二酮且最优选地约 1.5ppm 至 2ppm 的丁二酮。在一优选实施方案中,嗜中温乳制品含有超过 1.5ppm 丁二酮。所属领域技术人员会了解许多用来测定本发明乳制品中丁二酮的含量的方法。例如,含量可通过适宜的色谱方法(例如静态顶空气相色谱法(HSGC))测定。

[0066] 如上文所述,本发明一方面涉及制造具有奶油风味的乳制品的方法,包括:

[0067] a) 向乳基质接种根据本发明第一个方面的组合物;

[0068] b) 发酵所述乳基质;

[0069] c) 任选地将其它微生物和 / 或添加剂添加到所述乳基质;

[0070] d) 任选地后处理所述乳基质;和

[0071] e) 任选地包装所述乳制品。

[0072] 如上文所述,打算用于步骤 a) 中的乳基质可为可根据本发明方法经受发酵的任何生乳和 / 或加工乳材料。

[0073] 可通过任何适宜的方法向乳基质接种上述组合物。例如,可通过直接接种到发酵

器皿来向乳基质接种。

[0074] 在一个优选实施方案中,步骤 b) 包括在高于约 37℃ 的温度发酵乳基质。发酵优选将在约 38℃ 到约 45℃、更优选地约 39℃ 到约 42℃ 的温度实施。在另一优选实施方案中,乳基质将在约 40℃ 发酵。打算用于产生乳制品的发酵工艺是众所周知的,并且所属领域技术人员将了解如何选择适宜的工艺条件,例如温度、氧、微生物的量和特性以及处理时间。显然,应选择发酵条件以便获得适于产生具有改进的风味和高质地的乳制品的发酵乳产品。

[0075] 另外的微生物和 / 或添加剂可在步骤 (b) 中的乳基质发酵之前、期间或之后添加到乳基质。可添加到乳基质的微生物将以有利方式促成乳制品的性质。例如,所述微生物可改良或支持乳制品的丁二酮产生、粘度、凝胶硬度、口腔包覆感、风味、后酸化和 / 或酸化速度。任选地,可将其它成分添加到乳基质,例如着色剂、稳定剂,例如果胶、淀粉、改性淀粉、CMC 等;或多不饱和脂肪酸,例如 ω -3 脂肪酸。所述成分可在产生过程期间的任何时间点添加,例如在发酵之前或发酵之后添加。

[0076] 乳基质可进一步通过产生期望乳制品所需的任何方式进行后处理。例如,可将另外的组分(例如冷冻保护剂和 / 或常用添加剂,包括诸如酵母提取物、糖和维生素等营养素)添加到乳基质。此外,乳基质可例如经均质化或热处理,即巴氏灭菌。

[0077] 乳制品可以所属领域中已知的任何适宜方式包装。例如,乳制品可包装在体积在例如 25ml 到 1500ml 范围内的密封容器中。所述产品可在产生过程期间的任何时间点进行包装,例如在紧随接种步骤之后进行包装,并且然后在包装中发酵。

[0078] 通过所述方法获得的乳制品包括作为典型实例的产品,例如酸奶、酸乳脂、奶酪和酪乳。

[0079] 可通过上述方法获得的乳制品也是本发明的一部分。

[0080] 在一优选实施方案中,乳制品是发酵乳产品。优选地,发酵乳产品是酸奶。

[0081] 在再一优选实施方案中,乳制品是奶酪。

[0082] 在一优选实施方案中,乳制品含有至少 0.75ppm 丁二酮,例如至少 1.0ppm 丁二酮,例如至少 1.5ppm 丁二酮。

[0083] 本发明的第五个方面涉及以保藏号 DSM24616 保藏在德国微生物菌种保藏中心(DSMZ)的鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 菌株。除这种菌株之外,本发明还涉及从它衍生得到的突变体,即,它们已经通过使用保藏的菌株 CHCC12697 作为起始材料获得。突变菌株可例如借助遗传工程、辐射、UV 光、化学处理和 / 或诱导基因组变化的方法从 CHCC12697 衍生得到。根据本发明的突变体基本上将与母本菌株在乙酸盐、乙醛、丁二酮和 / 或乙偶姻的产生水平方面具有相同特性。优选地,与其母本菌株相比,所述突变体基本上产生至少 80% 或更多、至少 90% 或更多、至少 95% 或更多、或甚至高达 100% 或更高的乙酸盐、乙醛、丁二酮和 / 或乙偶姻。

[0084] 所属领域技术人员清楚的是,通过使用保藏的菌株作为起始材料,所属领域的读者可通过常规的诱变或再分离技术来常规地获得其保留本文所述相关特征和优点的进一步突变体或衍生物。因此,第一个方面的术语“其突变体”涉及通过使用保藏的菌株作为起始材料获得的突变菌株。

[0085] 下文将以非限制性实施例的方式来描述本发明的实施方案。

[0086] 实施例

[0087] 实施例 1 :在酸化的经沸腾的乳中筛选具有高乙偶姻水平的嗜热性乳杆菌属。

[0088] 检查所选 176 种乳杆菌菌株在 30℃、37℃、40℃和 43℃经约 24 小时酸化经沸腾的乳的能力。在发酵后借助顶空气相色谱来直接检查来自 37℃孵育的酸化的经沸腾的乳的挥发性有机化合物 (VOC),如实施例 5 中所述。发现命名为 CHCC12697 的菌株产生了高水平的乙偶姻 (135ppm) 以及相当高水平的乙醛 (8ppm) (数据未显示)。观察到这种菌株在嗜中温温度 (30–37℃) 以及在嗜热性温度 (40–43℃) 都会酸化经沸腾的乳。还观察到所述菌株在补加有 2%葡萄糖或 2%乳糖或 2%果糖或 2%半乳糖的 MRS 肉汤中在 40℃和 43℃会生长到高 OD。所述菌株对抗生素不具有抗性。部分 16S rRNA 基因测序显示,所述菌株为鼠李糖乳杆菌。

[0089] 实施例 2 :制备酸奶的方法

[0090] 脱脂乳 (DanMselk,Aria) 添加有 2%脱脂乳粉 (Aria) 并且在 90℃加热处理 20 分钟。向这种溶液接种背景起子培养物,并接种或不接种鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 菌株。

[0091] 用于制备酸奶的背景起子培养物包含以 0.02%比率接种的呈冷冻直投 (F-DVS) 形式的嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌的多个菌株。将结果部分中所述量的呈 F-DVS 形式的鼠李糖乳杆菌菌株添加到背景起子培养物。在接种时,嗜热链球菌菌株和鼠李糖乳杆菌菌株的细胞计数高于 1×10^{10} cfu/g,并且保加利亚乳杆菌菌株的细胞计数高于 1×10^8 cfu/g。

[0092] 将被接种的溶液加热到 43℃并且发酵到 pH4.55。达到 pH4.55 的时间是示于图 1 中的发酵时间。当达到 pH4.55 时,将酸奶泵送经过 25℃和 2 巴压力的后处理单元并且填充到塑料杯,然后将所述塑料杯冷藏。在冷藏 1 天后进行流变学测量。在冷藏 1 天、14 天、28 天和 42 天后测量酸奶 pH 的演变。在冷藏 7 天后进行丁二酮测量。

[0093] 实施例 3 :测量 pH 演变的方法

[0094] 在分析当天 (在冷藏 1 天、14 天、28 天和 42 天后),从冷藏处取出一个装有酸奶的塑料杯并且使用 pH 计 (pHM240,MeterLab) 测量 pH。在测量之前,校准 pH 计 (利用 7.00 和 4.01 缓冲液进行 2 点校准)。与样品一样,将用于校准的缓冲液冷藏。图 2 显示 pH 的演变。

[0095] 实施例 4 :测量凝胶硬度和粘度的方法

[0096] 通过使用带有自动样品更换器的 Anton Paar 流变仪 (Physica DSR 流变仪 +ASC) 来测量凝胶硬度。将测量锤置于装有 20ml 酸奶样品的测量杯中,所述酸奶样品已手动搅拌并且加热到 13℃。在已将测量锤置于酸奶样品中后,施加等待时间。通过等待,使通过将测量锤置于杯中而破坏的大部分结构复原。接下来,通过振荡来测量凝胶硬度。此处,使菌株保持恒定在 0.3%并且使频率从 0.5Hz 增加到 30Hz。从这些测量,可计算弹性模量 (G') 和粘性模量 (G''),并且从这些模量获得复数模量 (G^*) :

[0097]
$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$$

[0098] 然后使 1Hz 下的 G^* 与凝胶硬度相关联并且用于不同样品的比较 (图 3)。

[0099] 使用相同设备 (Anton Paar 流变仪),通过以下方式测量粘度:将剪切速率从 0.27071/s 增加到 3001/s 并且每 10s 测量点 (剪切应力)。然后将剪切速率从 2751/s 降低到 0.27071/s 并且每 10s 测量点。在流动曲线量测中将产品的粘度与 3001/s 下的剪切应力相关联并且绘示于图 3 中。

[0100] 实施例 5 :测量挥发性化合物 (VOC) 的方法

[0101] 通过静态顶空气相色谱法 (HSGC) 来分析酸奶样品,所述色谱法是分析复杂基质中的挥发物的强有力技术。所述装备由连接到带有火焰离子化检测器 (FID) 的气相色谱仪的静态顶空进样器组成。以下是所用装置(包括柱)和软件列表:

[0102] HS- 自动进样器 :HS40XI, TurboMatrix110, Perkin Elmer.

[0103] HS- 软件 :HSControl v. 2. 00, Perkin Elmer.

[0104] GC :Autosystem XL, Perkin Elmer.

[0105] GC- 软件 :Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

[0106] 柱 :HP-FFAP25m x0. 20mm x0. 33 μ m, Agilent Technologies.

[0107] 使用已知浓度的标准物来测定响应因子(校准),使用对照来控制所用响应因子在分析系列内以及系列之间并且随时间(数月)稳定。使用源于标准物的响应因子来测定样品和对照中挥发物的浓度(ppm)。

[0108] 通过将 200 μ L 4N H_2SO_4 添加到 1g 酸奶样品来制备样品。

[0109] 丁二酮含量绘示于图 4 中。

[0110] 结果

[0111] 图 1-4 的图形概述了在利用具有和不具有鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 菌株的乳酸菌培养物制备的酸奶中获得的结果。

[0112] 在用于制备酸奶的乳酸菌培养物中存在鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 菌株不影响酸奶的发酵时间(图 1)、后酸化(图 2)或流变学特性(图 3)。

[0113] 当鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 菌株存在于用于制备酸奶的乳酸菌培养物中时,可在酸奶中测量到显著更高量的丁二酮(图 4)。

[0114] 实施例 6 :酸奶的感官分析

[0115] 为了记录酸奶培养物中存在鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 的影响,利用经过训练的小组对奶油风味执行感官评估。所述测试作为 2-AFC 测试(AFC——交替性强迫选择)/成对比较测试实施。当应集中于一种属性(在这种情况下为奶油风味)对两个样品进行评估时,此测试是适当的。此测试应视为单方面的,因为目的在于确认鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 菌株的存在提高奶油风味。

[0116] 从总共 20 份中,要求评价员(从两个样品中)指出具有最高强度的奶油风味的样品。在 20 份中指出了 15 份含有鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 菌株的酸奶具有最高强度的奶油风味。此数字构成显著差异($\alpha=0.05$)。

[0117] 关于 2-AFC 测试(AFC- 交替性强迫选择)/成对比较测试的参考文献 :Meilgaard M. C., Civille, G. V. 和 Carr, B. T. (2007). Sensory Evaluation Techniques, 4th ed. Chapter 7 :Attribute Difference Tests :How does attribute X Differ Between Samples? pp. 105-128 CRC Press (感官评估技术,第 4 版,第 7 章 :属性差异测试 :样品间的属性 X 如何差异? 第 105-128 页 . CRC 出版社)。

[0118] 实施例 7 :由两种鼠李糖乳杆菌菌株产生的与酸奶味道相关的所选 VOC 的筛选。

[0119] 为了测定通过在发酵乳产品中分别使用鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 和鼠李糖乳杆菌 CHCC12534 对与酸奶味道相关的 VOC 的水平的影响,在乳(0.1%脂肪、3.7%蛋白质和 4.8%乳糖)中在酸奶发酵条件(43 $^{\circ}$ C)下实施测试,其中所述菌株单独地或与作为背景(30%接种物)的酸奶培养物(保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌)一起被测试。在 16hr 发酵

后测定乙偶姻、乙醛、乙醇和丁二酮的水平,如实施例 5 中所述。

[0120] 使用乳 (0.1%脂肪、3.7%蛋白质和 4.8%乳糖) 和鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 与鼠李糖乳杆菌 CHCC12534 的过夜培养物 (10g/l) 在微量测定板中执行测试。通过 Multiprobe II PLUS 机器人 (Perkin Elmer) 进行液体处理。

[0121] 结果:

[0122] 表 1:用 CHCC12534、CHCC12697 或酸奶培养物 (背景) 发酵的乳中 VOC 的水平。

[0123]

	乙醛	乙醇	丁二酮	乙偶姻
CHCC12534 (0.003 g/l)	2.8	2.4	2.7	60.5
CHCC12697 (0.003 g/l)	3.7	1.9	2.8	67.4
背景(0.007 g/l)	5.8	1.8	1.8	36.5
乳	0.1	0.3	0.0	0.0

[0124] 与用作背景的酸奶培养物相比, CHCC12697 与 CHCC12534 二者甚至在小于一半接种比率的情况下仍然产生显著更高水平的丁二酮和乙偶姻。酸奶培养物产生显著更高的乙醛水平 (更高的接种比率)。在单一菌株水平下, CHCC12697 与 CHCC12534 的特征没有彼此显著不同 (表 1 和图 5)。

[0125] 表 2:用 CHCC12534 和酸奶培养物 (CHCC12534+ 背景)、CHCC12697 和酸奶培养物 (CHCC12697+ 背景) 或酸奶培养物 (背景) 发酵的乳中 VOC 的水平。

[0126]

	乙醛	乙醇	丁二酮	乙偶姻
CHCC12534 (0.003 g/l)+背景(0.007 g/l)	3.7	2.4	5.0	61.8
CHCC12697 (0.003 g/l)+背景(0.007 g/l)	12.7	4.2	5.2	127.9
背景(0.007 g/l)	5.8	1.8	1.8	36.5
乳	0.1	0.3	0.0	0.0

[0127] 与 CHCC12534 (30% 接种物)+酸奶背景相比, 以及与单独背景培养物相比, CHCC12697 (30% 接种物)+酸奶背景培养物产生显著更高水平的乙偶姻、乙醛和乙醇。

[0128] 与酸奶背景培养物一起的 CHCC12697 和 CHCC12534 (二者都为 30% 接种物) 不产生显著不同水平的丁二酮 (表 2 和图 6)。

[0129] 根据表 3, 在酸奶培养物中添加 30% CHCC12697 使 VOC 增加。

[0130] 表 3:添加 30% CHCC12697 或 30% CHCC12534 使酸奶培养物的 VOC 增加

	CHCC12697	CHCC12534
乙醛	119%	-36%
乙醇	133%	33%
丁二酮	189%	178%
乙偶姻	246%	68%

[0132] 实施例 8:具有鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 的酸奶的感官性质。

[0133] 为了分析具有鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 的酸奶的凝胶硬度、口腔浓厚感和奶油风味, 在 3L 标度容器中从添加有 2% 脱脂乳粉的均质化脱脂乳制备酸奶。在 92℃ 将基质巴氏灭菌 20 分钟并在 43℃ 冷却以供接种。以 0.02% 接种背景起子培养物 (嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌)。添加过夜培养物 (15g/ 批次) 形式的鼠李糖乳杆菌 CHCC12697。

[0134] 将酸奶发酵到 pH4.55, 然后搅拌, 冷却并包装在 200ml 容器中。7 天后, 由 5 位成员构成的感官小组对样品进行感官评估。所述小组使用参考样品 (未添加风味培养物) 为

样品的等级次序建立固定点 (0 值)。然后就每一描述信息与参考样品进行比较来对所述样品估值 (-2 到 5), 并且使用所有判断人员的平均值来生成每一描述信息的平均值评分 (表 4)。

[0135] 表 4: 添加有鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 的酸奶样品的感官评估。

[0136]

	凝胶硬度	口腔浓厚感	奶油风味	乙醛	丁二酮
CHCC12697					
(鼠李糖乳杆菌)	2	1.8	1.5	0.8	1.8
背景/无调味剂	0.1	0.5	1	0.1	0.25

[0137] 将 CHCC12697 添加到酸奶产生高凝胶硬度、良好口腔浓厚感和提高的奶油风味。

[0138] 实施例 9: 制备 Gouda40+ 奶酪的方法

[0139] 由 150L 经巴氏灭菌 (72℃ 持续 20 秒) 的全乳制备 Gouda40+ 奶酪。将所述乳冷却到 5℃ 并且在使用前根据蛋白质水平 (3.4% 到 3.7%) 利用 38% 乳脂将其标准化 (脂肪 / 蛋白质比率)。基于所述乳的蛋白质含量并且针对在干物质中具有 40% 脂肪的 Gouda 奶酪来计算标准化。

[0140] 在标准化后, 将乳在热交换器中预加热到 32℃ 的预熟化温度并且泵送到奶酪桶。持续缓慢搅拌 (235rpm) 直到粗制凝乳酶分散于乳中为止。

[0141] 使用表 5 中的参数制备 Gouda40+ 奶酪。

[0142] 将 0.01% (w/w) 酸化培养物 (CHN-19, Chr. Hansen A/S)、0.02% (w/w) 粗制凝乳酶 (Chy-Max Plus, Chr. Hansen A/S)、0.01% (w/w) CaCl_2 (34% 溶液) 和 0.01% (w/w) 硝酸的添加物添加到每一奶酪桶。将 0.02% (w/w) 添加物培养物 (鼠李糖乳杆菌 CHCC12697) 添加到 1 个桶以便测试菌株在 7 周熟化后对丁二酮的气味和风味的影响。

[0143] 将奶酪在 10℃ 22% 盐水中盐化 20hr。将奶酪涂覆并真空包装在塑料袋中并且在 9℃ 储存 1 周, 之后在 13℃ 储存 3 周并在 9℃ 储存 2 周。此后, 将 Gouda40+ 储存在 5℃。

[0144] 表 5: Gouda40+ 的奶酪制备参数。

[0145]

步骤	持续时间	值
预发酵	35min	32℃
粗制凝乳酶时间	35min	
预搅拌	20min	
乳清分离 (Whey off)	5min	52.5kg
中度搅拌	10min	

烫洗时间 (Scald time)	15min	38℃ /45kg51℃水
最终搅拌	40min	
凝结到桶末端	5min	
预压制	25min	1 巴 /10min-2 巴 /15min
压制 1	15min	2 巴 /15min
压制 2	15min	3.5 巴 /15min
压制 3	90min	5 巴 /90min

[0146] 实施例 10 :奶酪的化学分析

[0147] 为了记录 Gouda40+ 奶酪中存在鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 的影响,利用经过训练的小组分别对丁二酮的气味和风味执行感官评估。

[0148] 使用分级测试实施感官评估。样品在感官评估之前保持在 13℃。将样品随机分发给带盖塑料盒中并且用三位数随机数字标记。以从 1 到 8 的标度对奶酪样品评分,1 为低强度气口或风味,8 为高强度气口或风味。对每一感官描述信息实施方差分析。借助显示由 12 位评价员评价的感官描述信息的平均值的曲线来解释 ANOVA 结果。所述曲线还显示每一平均值附近的间隔。所展示的间隔是基于费雪最小显著差异 (Fisher' s least significant difference) (LSD) 程序。它们是以下述方式构建 :如果两个平均值相同,那么它们的间隔将重叠 95.0%时间。任一对不垂直重叠的间隔都表明一对具有统计学显著差异的平均值。

[0149] 将鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 添加到 Gouda40+ 奶酪显著增加丁二酮的气味和风味的感官知觉 (图 7 和 8)。

[0150] 实施例 11 :奶酪的化学分析

[0151] 为了记录 Gouda40+ 奶酪中存在鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 的影响,如实施例 5 中所述 (奶酪样品制剂除外),使用气相色谱对丁二酮含量执行化学分析。

[0152] 使用一次性 3mL 注射器对奶酪块 (plug) 进行取样。用刀去除底部,并且将注射器推入奶酪中,切下一个“奶酪块”。将该“奶酪块”转移到 20mL 顶空小瓶。为了分析氧敏感性化合物,在用盖封闭前用氮冲洗小瓶。不将酸添加到奶酪样品。

[0153] 将鼠李糖乳杆菌 CHCC12697 添加到 Gouda40+ 奶酪显著增加奶酪中丁二酮的水平 (图 9)。

[0154] 保藏物和专家解决方案

[0155] 申请人请求下文所述的保藏微生物的样品在所述专利被授权的日期前只可供专家得到。

[0156] 鼠李糖乳杆菌菌株 CHCC12697 在 2011 年 3 月 1 日保藏于德国微生物菌种保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ;DSMZ) (Inhoffenstr. 7B, D-38124 布伦瑞克 (Braunschweig)),并被赋予保藏号 DSM24616。

[0157] 根据国际承认用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约 (Budapest treaty on the international recognition of the deposit of microorganisms for the

purposes of patent procedure) 进行保藏。

[0158] 参考文献

[0159] Jyoti, B. D. , Suresh, A. K. 和 Venkatesh, K. V. (2003) :Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates(多种基质上的鼠李糖乳杆菌的丁二酮产生和生长). *World Journal of Microbiology&Biotechnology*19 : 509-514.

[0160] US4, 678, 673 (Marshall 等)

[0161] US4, 867, 992 (Boniello 等)

[0162] US5, 236, 833 (Duboff 等)

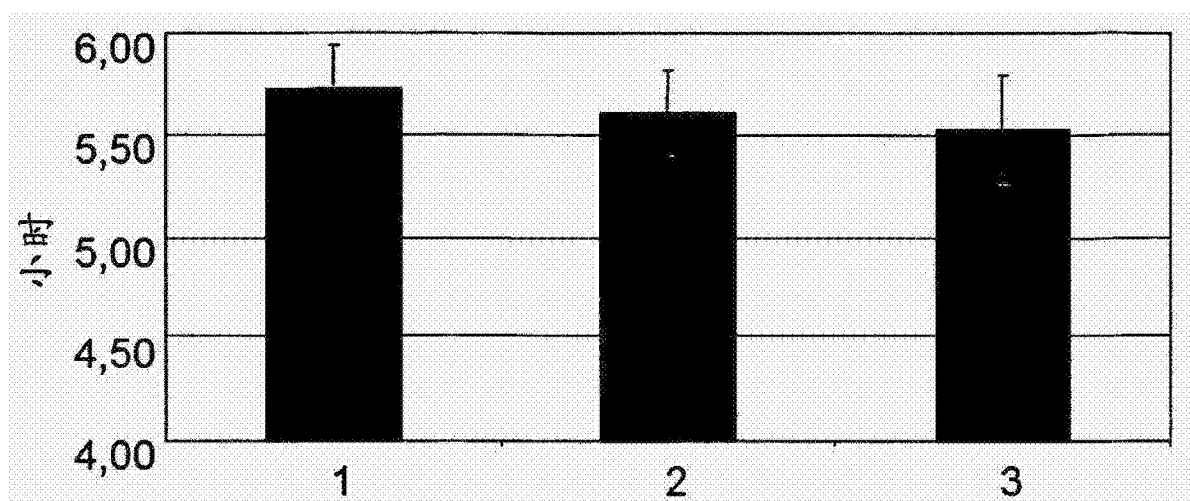


图 1

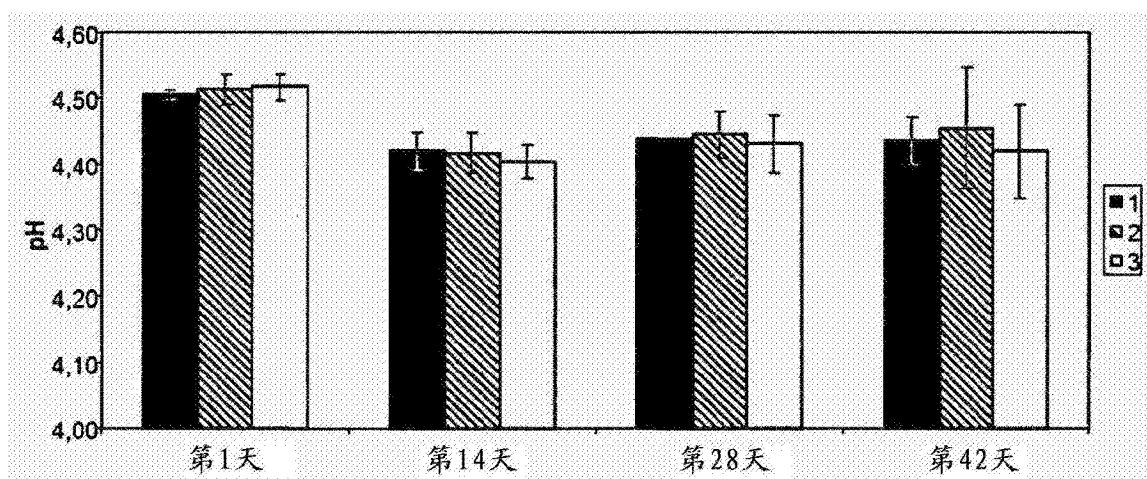


图 2

300 1/s下的剪切应力
1 Hz下的凝胶硬度 (G*)

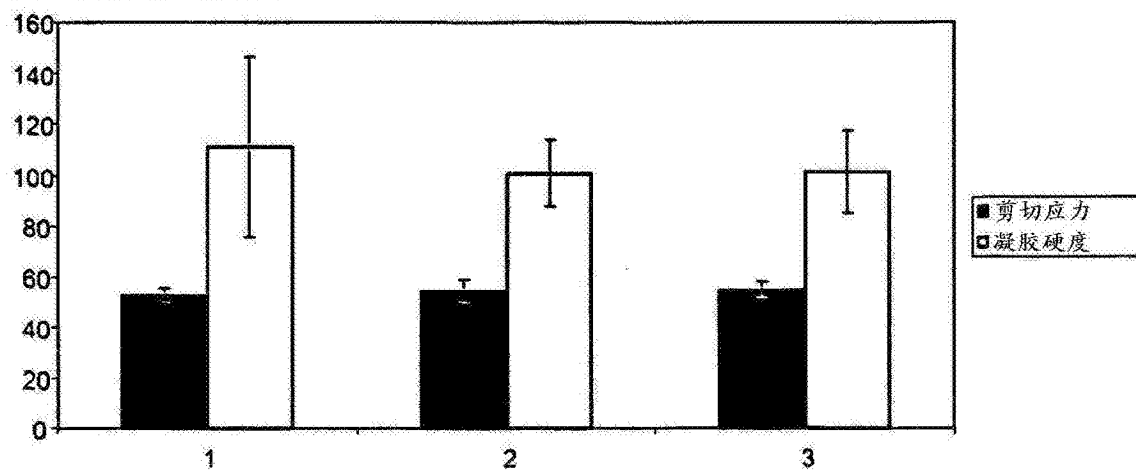


图 3

Γ'' (ppm)

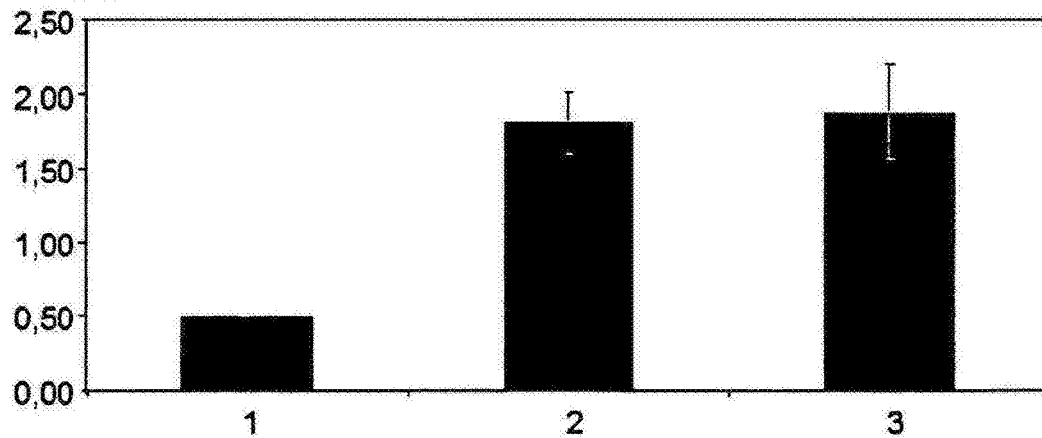


图 4

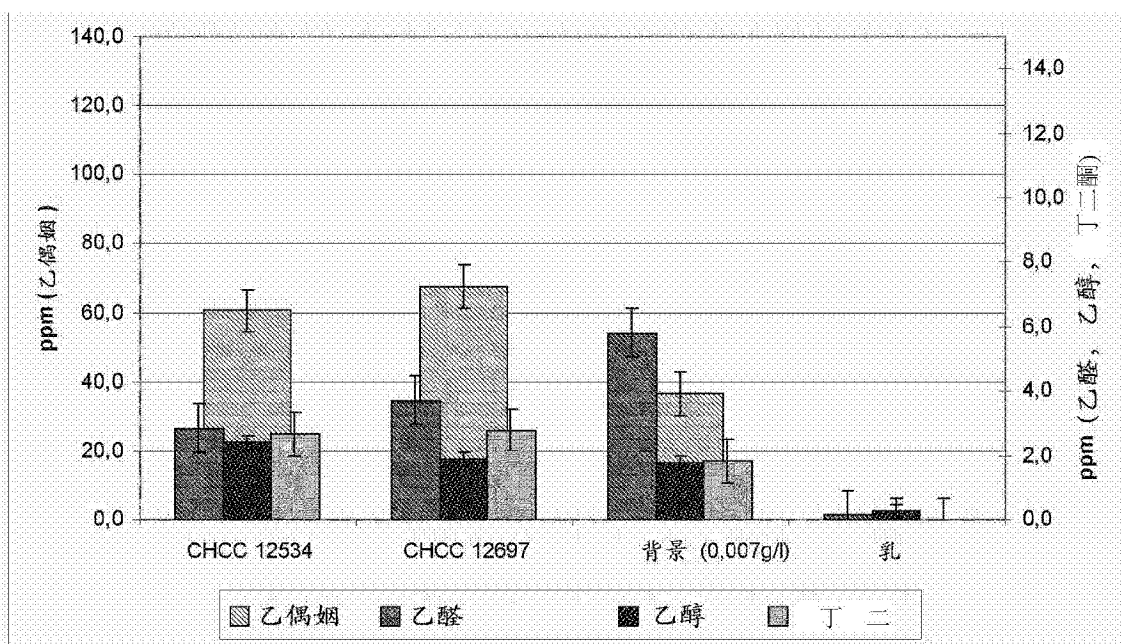


图 5

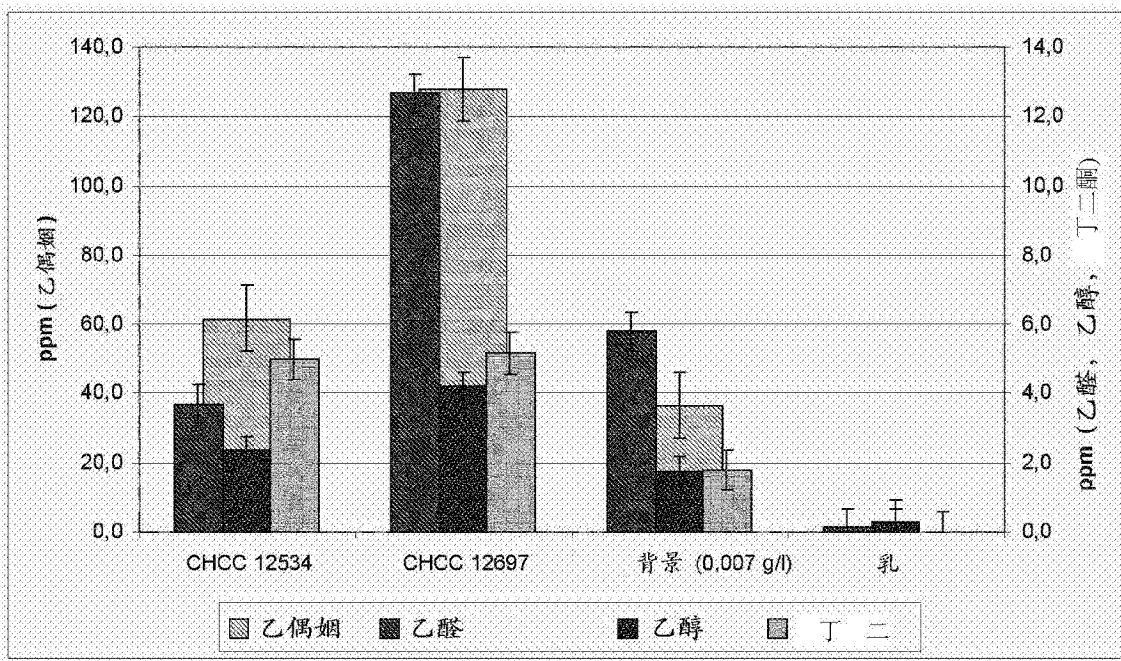


图 6

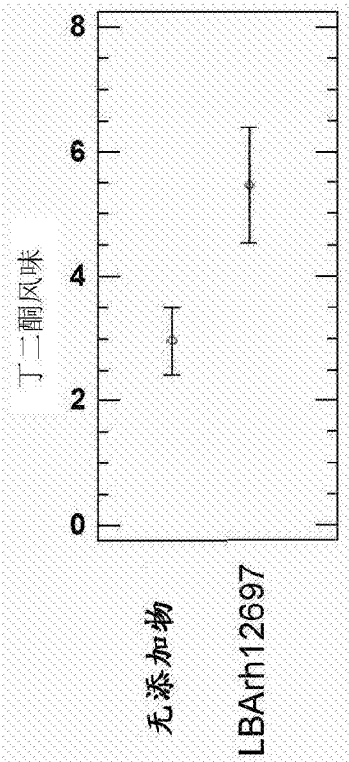


图 7

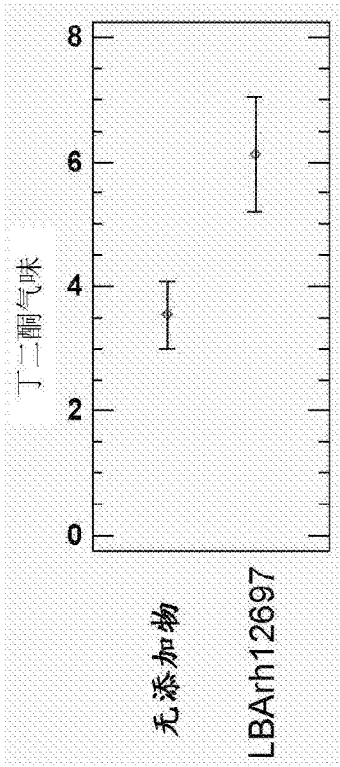


图 8

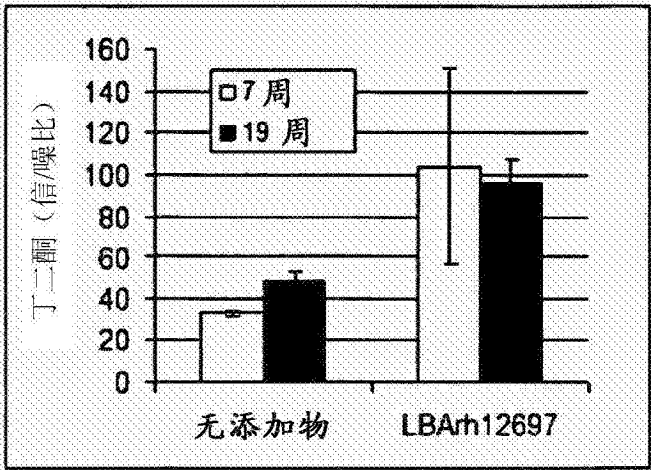


图 9