



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I511676 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 11 日

(21)申請案號：099111588

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 14 日

(51)Int. Cl. : A23L3/3571 (2006.01)

C12N1/20 (2006.01)

C12N1/14 (2006.01)

A21D8/04 (2006.01)

(30)優先權：2009/04/15 日本

JP2009-099033

(71)申請人：三井物產股份有限公司 (日本) MITSUI &amp; CO., LTD. (JP)

日本

若素製藥股份有限公司 (日本) WAKAMOTO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (JP)

日本

(72)發明人：小久保直美 KOKUBO, NAOMI (JP)；小澤美幸 OZAWA, MIYUKI (JP)；中谷清  
吾 NAKAYA, SEIGO (JP)；加藤梓 KATO, AZUSA (JP)；一之瀬辰一郎 ICHINOSE,  
SHINICHIRO (JP)；佐佐木四郎 SASAKI, SHIRO (JP)

(74)代理人：桂齊恆；閻啟泰

(83)生物材料寄存：

財團法人食品工業發展研究所 BCRC 910479 2010 年 06 月 03 日

(56)參考文獻：

CN 1703146A

JP P3277251

JP 2003-169680A

審查人員：林秀芸

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：3 共 34 頁

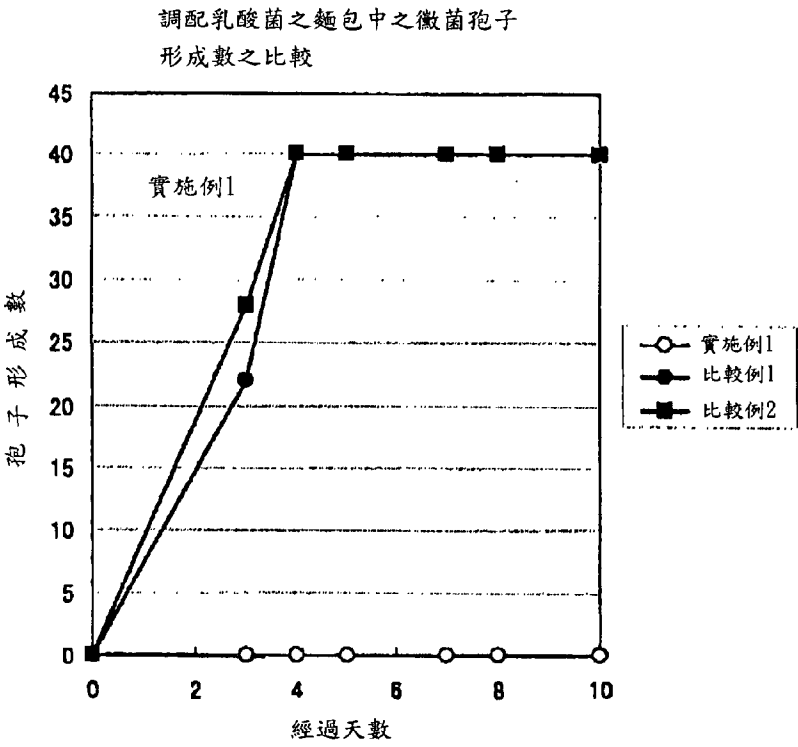
(54)名稱

乳酸桿菌屬菌株以及具有防黴性之食品

(57)摘要

本發明之課題在於提供一種有效地抑制黴菌或金黃色葡萄球菌等之增殖、安全且對食品風味之影響較少的新穎菌株。本發明係關於舊金山乳酸桿菌 WB1006(Lactobacillus sanfranciscensis WB1006) (FERM ABP-11246)之菌株。又，本發明係關於一種使用該菌株之食品。

圖 1



## 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99111588

A23L 3/35

※申請日：99.4.14

※IPC 分類：C12N 1/20

C12N 1/16

一、發明名稱：(中文/英文)

A21D 9/04

乳酸桿菌屬菌株以及具有防黴性之食品

## 二、中文發明摘要：

本發明之課題在於提供一種有效地抑制黴菌或金黃色葡萄球菌等之增殖、安全且對食品風味之影響較少的新穎菌株。本發明係關於舊金山乳酸桿菌 WB1006 (*Lactobacillus sanfranciscensis* WB1006) (FERM ABP-11246) 之菌株。又，本發明係關於一種使用該菌株之食品。

## 三、英文發明摘要：

無

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 ( 1 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種新穎之舊金山乳酸桿菌 (*Lactobacillus sanfranciscensis*) 菌株、其培養物或其含有物或者冷凍乾燥菌粉，以及使用該菌株而獲得之麵包等食品。

### 【先前技術】

麵包會由於發黴而品質下降而失去商品價值。通常，麵包係於清潔環境下製造，但由於是在常溫下配送、銷售，故有時亦於一部分麵包中添加防黴劑。作為防黴劑，主要係使用含有乙酸或檸檬酸等酸味劑，此外亦使用含有乙酸鈉等 pH 調整劑或丙酸、乙醇等抑菌劑者。但由於該等添加物而產生與麵包原本之風味有別，增添酸味或酸臭、醇類臭味等之問題。出於此種背景及近年來自然派意識之高漲，而有避免使用該等化學防黴劑之傾向，根據長年之使用經驗，目前係使用微生物中被認為安全性較高之乳酸菌來製造具有防黴效果特徵之麵包（專利文獻 1）。

由該乳酸菌及酵母醱酵所得之具有酸味之麵包麵團種稱為酸麵種，使用該等酸麵種而製作之有名之麵包中，有美國西海岸之舊金山酸麵包 (sanfrancisco sour bread) 或義大利之潘娜朵妮 (panettone)，作為自該等酸麵種中分離出之乳酸菌，通常為舊金山乳酸桿菌 (*Lactobacillus sanfranciscensis*)、胚芽乳酸桿菌 (*Lactobacillus plantarum*)、短乳酸桿菌 (*Lactobacillus brevis*)、乾酪乳

酸桿菌 (*Lactobacillus casei*)、醱酵乳酸桿菌 (*Lactobacillus fermentum*) 等 (非專利文獻 1)。進而，作為新菌種，有科莫乳酸桿菌 (*Lactobacillus comoensis*) (專利文獻 2)、酸法里納乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidifarinaris*) (專利文獻 3) 之報告。

屬於酸麵種之類別的潘娜朵妮種係據說僅可在義大利之一部分地方培養的極特殊之麵包種。例如，作為科莫乳酸桿菌與其他乳酸菌或酵母共存之潘娜朵妮種，目前亦每天進行利用義大利北部之傳承技術來傳種，藉此得以維持 (專利文獻 4)。

已知使用潘娜朵妮種之麵包可在不使用防腐劑的情況下表現出防黴、防腐效果等，該等效果係由潘娜朵妮種中棲息之乳酸菌或其醱酵產物等所賦予 (專利文獻 5)。

作為藉由用於麵包等飲食品中而發揮防止發黴之效果之方法，已知有一種利用使乳酸菌之菌體及油脂於水性介質中反應而獲得之產物的脂肪酶處理物之方法 (專利文獻 6)。此外亦揭示於醇飲料等中，作為食品用防菌劑或防蛀牙劑，可列舉黃腐鏈黴菌 (*Streptomyces fulvissimus*) FERM P-16347 之培養物之利用，其對作為食物中毒原因菌之金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 亦有增殖抑制效果 (專利文獻 7)。

又，嗜酸乳酸桿菌群之乳酸菌 L-55 株具有對大腸桿菌、金黃色葡萄球菌、枯草桿菌、李斯特菌等細菌之抗菌物質產生能力，通常可列舉作為優格等食品中所添加之乳酸菌，但對於麵包之效果則不明確 (專利文獻 8)。

傳統之潘娜朵妮種係於使用小麥粉等之培養基中，使各個地域之氣候、風土中自然表生之乳酸菌或酵母等增殖而成。通常係藉由傳種而維持。因此，視地域之氣候或風土不同，而構成特有之菌群。先前已經有在研究自該潘娜朵妮種中分離、培養特定之乳酸菌，接種至以小麥粉為主的液狀或麵團狀之培養基中使其發酵（專利文獻 9、10），其產品已於市場上銷售。

酸麵種係多個菌種之乳酸菌與酵母共存繁殖而構成難以人工再現之微生物環境，藉此發揮其特性。該種僅於各個特定地域、環境中可穩定傳種，容易因地域或操作方法等改變而發生變化。又，有時因原本應不致於存在之微生物等的混入、增殖而失去種之功能。

於自酸麵種中分離、純粹培養乳酸菌並將其用作種之情形時，雖可使最初製備之酸麵種之穩定性提昇，但若反覆傳種，則仍然會由於同樣之原因而容易產生酸麵種之性質與最初不同之問題（專利文獻 11）。

進而，於對酸麵種用乳酸菌進行純粹培養之情形時，有視菌種不同而必須準備特殊之營養培養基等麻煩。例如，作為具代表性之酸麵種用乳酸菌之舊金山乳酸桿菌之營養培養基已知有數種，但可列舉如下的問題：（1）製備較為費事、（2）由培養基成分之批次差所導致的培養產量之偏差較大、（3）增殖量不充分而不適於大量培養等。又，作為麵包麵團種之產品形態，有液種或麵團種，但該種視保存狀況不同而存在即便於消費期限內其性能亦不固定之問題。

又，作為食物中毒菌而廣為人知之金黃色葡萄球菌係棲息於人類之皮膚或其傷口等上。因此，調理麵包等利用手工作業來進行調理之食品很多情況下會引起食物中毒。由金黃色葡萄球菌引起之食物中毒之主要原因為細菌增殖時所產生之耐熱性之毒素。即便藉由加熱而細菌死滅，毒素之活性亦不會喪失，因此一般認為，對於預防而言重要的是抑制細菌增殖本身。但是，先前，有效地抑制金黃色葡萄球菌之增殖之方法尚不為人所知。

### 先前技術文獻

專利文獻 1：日本專利特開 2004-081212 號公報

專利文獻 2：日本專利特開昭 63-146742 號公報

專利文獻 3：日本專利特開 2003-169680 號公報

專利文獻 4：日本專利特開昭 63-112977 號公報

專利文獻 5：日本專利特開 2002-291466 號公報

專利文獻 6：國際公開第 2005/104879 號公報

專利文獻 7：日本專利特開 2002-000261 號公報

專利文獻 8：日本專利特開 2003-230376 號公報

專利文獻 9：日本專利特開 2006-158382 號公報

專利文獻 10：日本專利特開 2007-244274 號公報

專利文獻 11：日本專利特開平 5-252937 號公報

非專利文獻 1：「乳酸菌的科學與技術」，乳酸菌研究集談會編，學會出版中心，1996 年 4 月發行

### 【發明內容】

### 發明所欲解決之問題

市售之利用乳酸菌的製麵包用產品之防黴效果仍未必無法說相當充分，故強烈期望能夠探索出可有效地抑制黴菌等之增殖、安全且對食品風味之影響較少的新穎乳酸菌及開發其產品。又，亦有報告指出，視乳酸菌之菌種不同，由於共存之酵母所引起的防黴效果會改變，因而期望即便使用廣泛利用之市售酵母亦不影響防黴效果。因此，製作可充分期待防黴效果之乳酸菌之可長期保存之冷凍乾燥菌粉等，並建立利用該冷凍乾燥菌粉之醱酵方法所得到之麵包製造法相當重要。

### 解決問題之手段

本發明係鑑於上述問題研發而成者，其係關於本發明者等發現之新穎之舊金山乳酸桿菌 WB1006 (*Lactobacillus sanfranciscensis* WB1006) (FERM ABP-11246) 的菌株。

又，本發明係關於一種具有以下之 (1) 至 (9) 之菌學性質之菌株：

- (1) 革蘭氏陽性
- (2) 桿菌
- (3) 無運動性
- (4) 無孢子
- (5) 兼性厭氧性
- (6) 過氧化氫酶陰性
- (7) 繁殖溫度 10~28℃
- (8) 繁殖 pH 值 5.5~9.0

(9) 利用麥芽糖而生成 D(+)-乳酸、L(+)-乳酸、乙醇及二氧化碳。

又，本發明係關於上述菌株之培養物、含有物或冷凍乾燥菌粉。上述菌株較佳為活菌。

又，本發明係關於一種菌株之培養方法，其特徵在於將上述菌株接種至培養基中進行培養。

又，本發明係關於一種食品之製造方法及藉由該製造方法而獲得之食品，上述食品之製造方法之特徵在於包括使上述培養物、含有物或冷凍乾燥菌粉發酵之步驟。

又，本發明係關於一種食品添加物，其含有上述菌株、培養物、含有物或冷凍乾燥菌粉作為有效成分，抑制黴菌及金黃色葡萄球菌之增殖。

上述食品添加物較佳為經過加熱後亦防止黴菌及金黃色葡萄球菌之增殖。

又，本發明係關於一種含有上述食品添加物之食品。

上述食品較佳為藉由菌株使食品材料發酵而成。

又，本發明係有關於一種原種之製造方法，其用於獲得黴菌及金黃色葡萄球菌之增殖抑制效果，係使含有乳酸菌、小麥粉及水之混合物發酵；上述乳酸菌為主要利用葡萄糖以外之一種糖，微弱地利用其他糖之乳酸菌。

於上述製造方法中，上述混合物較佳為進一步含有酵母菌。

於上述製造方法中，上述乳酸菌較佳為於 10~15℃ 下可繁殖之乳酸菌。

又，本發明係關於一種食品之製造方法，其係由如下步驟所構成：使用藉由上述方法而製造之原種來製造中種，然後製造最終麵團。

## 發明之效果

若使用本發明之舊金山乳酸桿菌 WB1006 來製造麵包等食品，則與使用先前可確認防黴性的舊金山乳酸桿菌 (*Lactobacillus sanfranciscensis*) 或胚芽乳酸桿菌 (*Lactobacillus plantarum*) 而製造之麵包相比較，防黴性或金黃色葡萄球菌之增殖抑制作用較高，風味及食感亦較優異。特別是將本發明之菌株調配於麵包中之情形時，即便經過麵包麵團之烘烤或調理麵包之調理等加熱處理，亦可維持對黴菌及金黃色葡萄球菌之增殖抑制效果。因此，若將本發明之菌株調配至麵包麵團中，則即便於經過高溫下之烘烤、調理等而製造之麵包中，亦可抑制金黃色葡萄球菌自身之增殖，而從根本上防止難以分解去除之耐熱性毒素之產生。

又，本發明之菌株亦無需傳種維持、可藉由保存亦容易之冷凍乾燥菌粉來製作穩定之原種。藉由本發明之舊金山乳酸桿菌 WB1006，可更簡便地再現目前為止利用義大利北部之傳統製法而製作的潘娜朵妮之特徵即耐存放及防黴效果，此係本發明之菌株之重大效果。

## 【實施方式】

### (I) 菌株

本發明之菌株即舊金山乳酸桿菌 WB1006 係以寄存編號：FERM P-21711 而於 2008 年 10 月 29 日寄存於獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心，且以領取編號：FERM ABP-11246 而於 2010 年 4 月 8 日移交至國際

寄存。

本發明之舊金山乳酸桿菌 WB10061 係自製麵包用之潘娜朵妮原種中分離、發現之乳酸菌。WB1006 係存在於潘娜朵妮原種中之數種乳酸菌中表現出優異防黴性之菌株。一般認為，先前潘娜朵妮獨特之風味、食感及長期之耐存放性係藉由將數種乳酸菌組合而發揮，而 WB1006 即便於單獨使用之情形時亦可發揮此種效果。

以下表示本發明之舊金山乳酸桿菌 WB1006 之菌學性質。

- (1) 革蘭氏陽性
- (2) 桿菌
- (3) 無運動性
- (4) 無孢子
- (5) 兼性厭氧性
- (6) 過氧化氫酶陰性
- (7) 繁殖溫度  $10\sim 28^{\circ}\text{C}$  (最適繁殖溫度  $25^{\circ}\text{C}$ )
- (8) 繁殖 pH 值  $5.5\sim 9.0$
- (9) 利用麥芽糖而生成 D(+)-乳酸、L(+)-乳酸、乙醇及二氧化碳

又，雖極微弱，但視培養條件不同有時亦利用葡萄糖。

本發明之菌株係革蘭氏陽性、無孢子、兼性厭氧性、過氧化氫酶陰性之桿菌，且由糖而生成乳酸及乙醇，故一般認為其屬於絕對異質發酵型 (obligatory heterofermentative) 之乳酸桿菌屬。

以下表示本發明之菌株之培養性質。

(1) 1%麥芽糖加 MRS 洋菜平板培養基

菌落係於 25°C 下培養 3~4 天，而為直徑約 2~3 mm 或其以下之圓形、半透鏡狀突起、不透明之灰白色、稍乾燥之形狀。

(2) MYP 液體培養基

於 25°C 下培養 24 小時而菌體增殖，培養基白濁，產生綿毛狀之沈澱。

(3) MYP 洋菜培養基（穿刺培養）

藉由穿刺而同樣地繁殖。

以下表示本發明之菌株之生理、生化學性質。

(1) 繁殖溫度 10~28°C (最適繁殖溫度 25°C)

(2) 繁殖 pH 值範圍 5.5~9.0

(3) 與氧之關係 兼性厭氧性。於氧存在下或厭氧性條件下均可繁殖。

(4) 繁殖必需物質 上述 MYP 液體培養基中必需麥芽糖、酵母萃取物及脂肪酸、特別是不飽和脂肪酸。

(5) 糖類發酵性

利用麥芽糖而產生酸及氣體。

(6) 石蕊牛乳：不變

(7) 硝酸鹽的還原：陰性

(8) 不將明膠液化。

(9) 脲酶：陰性

(10) 過氧化氫酶：陰性

(11) 不水解澱粉。

(12) 由麥芽糖之產物：L(+)-乳酸、D(+)-乳酸、乙醇

若對本發明之菌株與舊金山乳酸桿菌 JCM5668 之糖利用性進行比較，本發明之菌株對於麥芽糖有特異性，具有於通常之培養條件下幾乎不利用葡萄糖之特徵。另一方面，舊金山乳酸桿菌 JCM5668 則同時利用麥芽糖與葡萄糖。

本發明之菌株較佳為藉由 16SrRNA 基因分析而與舊金山乳酸桿菌之標準菌株即舊金山乳酸桿菌 JCM5668（日本菌種保存中心（JAPAN COLLECTION OF MICROORGANISMS），獨立行政法人，理化學研究所）於 1564 bp 中表現出 97% 以上之同源性，更佳為表現出 99% 以上之同源性。

於本發明中，將上述菌株用作培養物、含有物或冷凍乾燥菌粉。本發明之菌株可自潘娜朵妮種獲取，例如可藉由公知之方法自麵包製造所用之潘娜朵妮種中單離。例如可於經滅菌之生理鹽水中將潘娜朵妮原種階段性地稀釋，塗佈（接種）至 MYP 洋菜培養基或 1% 麥芽糖加 MRS 洋菜培養基等分離用洋菜培養基（添加有 10 ppm 之環己醯亞胺及 10 ppm 之疊氮化鈉者）中進行培養，藉此分離菌落並進行單離。

若為本發明之菌株，則可僅將菌株接種至培養基中來進行培養。即便不每天進行傳種，酸麵種之性質亦可維持初期之性質，故可簡單地培養。又，若為本發明之菌株，則無需準備特殊之營養培養基，故製備不費事，因此不存在由培養基成分之批次差所導致的培養產量之偏差，可大量培養。此處，對於培養中所使用之培養基，可視目的而選擇洋菜培養基及液體培養基。為了促進本發明之菌株之繁殖，較佳為於其培養基中含有酵母萃取物或 Tween 80。

培養溫度為  $10^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$ ，較佳為  $23^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$ ，更佳為  $25^{\circ}\text{C}$ ；可增殖之 pH 值較佳為  $\text{pH}5.5 \sim 9.0$ ，更佳為  $\text{pH}5.5 \sim 7.0$ 。培養時間較佳為 2~4 天。本發明之菌株之培養溫度帶為  $28^{\circ}\text{C}$  以下，低於舊金山乳酸桿菌 JCM5668 之培養溫度帶  $30 \sim 35^{\circ}\text{C}$ ，於無需大規模之保溫設備之方面而言較優異。本發明之菌株可將其單獨培養，但由於不影響其他菌株之增殖，故亦可與多種酵母一起培養。作為其他酵母，可列舉啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、少孢酵母 (*Saccharomyces exiguus*) 等。

所謂菌株之培養物，係指對菌株自身進行培養所得者。

所謂菌株之含有物，係指含有菌株之粉狀、液狀、麵團狀或固體狀之產品。

所謂菌株之冷凍乾燥菌粉，係指急速冷凍後於減壓狀態下使水分昇華所得之粉末。作為菌株之冷凍溫度，溫度較佳為  $-50 \sim -80^{\circ}\text{C}$ ，減壓時之壓力較佳為  $15 \sim 100 \text{ Pa}$ 。

菌株就以於培養物、含有物或冷凍乾燥菌粉中，利用乳酸菌之繁殖過程中所產生之物質（醱酵產物）的觀點而言，較佳為活菌。

## （II）菌株之用途（食品添加物）

可調配本發明之菌株及其培養物、含有物以及冷凍乾燥菌粉作為有效成分而製造食品添加物。本發明之食品添加物係指於食品之製造時及保存時為了特定目的而添加者，只要為下述添加至麵包等食品中者即可，並無特別限定，例如可列舉抗菌劑、抗黴劑。

本發明之食品添加物表現出抑制黴菌及金黃色葡萄球菌

菌於食品中增殖之效果。再者，此處所謂抑制增殖，係指阻礙細胞分裂。

本發明之食品添加物對廣泛之黴菌表現出增殖抑制效果，抑制屬於麴菌屬 (*Aspergillus sp.*)、青黴菌屬 (*Penicillium sp.*)、節菱孢菌屬 (*Arthriniun sp.*)、頂孢黴屬 (*Acremonium sp.*)、交鏈孢黴屬 (*Alternaria sp.*)、外瓶黴屬 (*Exophiala sp.*)、附球黴屬 (*Epicoccum sp.*)、短梗黴屬 (*Aureobasidium sp.*)、彎孢黴屬 (*Curvularia sp.*)、枝孢黴屬 (*Cladosporium sp.*)、毛殼菌屬 (*Chaetomium sp.*)、地黴屬 (*Geotrichum sp.*)、孢子絲菌屬 (*Sporothrix sp.*)、木黴菌屬 (*Trichoderma sp.*)、毛癬菌屬 (*Trichophyton sp.*)、蠕孢菌屬 (*Drechslera sp.*)、黑孢黴屬 (*Nigrospora sp.*)、麵包黴屬 (*Neurospora sp.*)、畢赤酵母屬 (*Pichia sp.*)、鼓孢瘤座黴屬 (*Pithomyces sp.*)、瓶黴屬 (*Phialophora sp.*)、莖點黴屬 (*Phoma sp.*)、鐮孢菌屬 (*Fusarium sp.*)、擬青黴屬 (*Paecilomyces sp.*)、擬盤多毛孢屬 (*Pestalotiopsis sp.*)、灰黴菌屬 (*Botrytis sp.*)、白黴菌屬 (*Mucor sp.*)、紅麴黴屬 (*Monascus sp.*)、叢梗孢屬 (*Moniliella sp.*)、散囊菌屬 (*Eurotium sp.*)、紅酵母屬 (*Rhodotorula sp.*)及節擔菌屬 (*Wallemia sp.*)之黴之增殖。其中，對麴菌屬、青黴菌屬之增殖抑制效果較高，特別是對黑麴菌 (*Aspergillus niger*)及產黃青黴菌 (*Penicillium chrysogenum*)表現出顯著之增殖抑制效果。又，本發明之食品添加物對金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)亦表現出強力之增殖抑制效

果。

本發明之食品添加物之形態並無特別限定，粉末狀、液體狀、固體狀均可。又，本發明之食品添加物之特徵在於含有本發明之菌株、培養物、含有物、冷凍乾燥菌粉作為有效成分，亦可含有其他成分。作為其他成分，例如可列舉製造用劑、防腐劑、抗氧化劑、抗菌劑、抗黴劑等中通常所包括者，並無特別限定，於將食品添加物製成固體狀之情形時，例如可列舉賦形劑、黏合劑、製造助劑等。

本發明之食品添加物對黴菌及金黃色葡萄球菌之增殖效果即便於對食品進行了加熱處理之情形時亦不會失去。此處，加熱處理之具體方法並無特別限定，利用烘箱之烘烤、加壓條件下之加熱、及濕熱下之處理均可進行。本發明中之加熱處理係指初溫 80℃ 以上之加熱，較佳為初溫 90℃ 以上之加熱。

### (III) 食品之製造方法

可使用本發明之菌株來製造食品。作為食品，並無特別限定，就伴隨著可有效率地生成醱酵產物的醱酵之方面而言，例如較佳為麵包、丹麥酥 (Danish)、潘娜朵妮等各種烘焙產品；蛋糕、松餅 (waffle) 等生點心產品，瑪德蓮 (madeleine)、費南雪 (financier) 等半生點心產品，餅乾等乾點心產品等。

麵包、點心類之製法並無特別限定，較佳為於製造階段中促進本發明之菌株之醱酵，而於食品中生成、蓄積醱酵產物。可使用上述菌株或菌株之含有物而用於所有的製麵包法中，例如就抑制黴菌之增殖之方面而言，更佳為調 S

配菌株之含有物之中種法。

中種法具體係由如下步驟構成：將原種添加至中種中並使其醱酵後，進一步添加其他原料，進行混捏、成形、醱酵而製成最終麵團後，經過烘烤、冷卻步驟。

於本發明中，所謂原種，係指將含有小麥粉、水及乳酸菌之混合物揉捏成團並使其醱酵而成者。上述混合物中亦可進一步含有酵母菌，但不含酵母菌之原種亦可獲得充分之效果。再者，於本發明中，酵母菌並無特別限定，可使用麵包製造中通常使用之啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）。

作為原種之製造法，並無特別限定，為了抑制黴菌及金黃色葡萄球菌之增殖，較佳為可促進乳酸菌之醱酵產物之良好生成的方法。關於原種中所含之水相對於小麥粉之調配比率，於通常之製麵包法中，將小麥粉設為 100 時較佳為 50~120。關於原種中所含之本發明之菌粉相對於小麥粉之調配比率，將小麥粉設為 100 時較佳為 1~2，其理由在於可良好地生成本發明菌之醱酵產物。關於原種中所含之酵母菌相對於小麥粉之調配比率，將小麥粉設為 100 時較佳為 0.1~0.2，其理由在於可適當地進行酵母菌之醱酵，而可獲得風味佳之麵包。

原種之製造步驟並無特別限定，作為將上述混合物揉捏成團之溫度，以乳酸菌之活性為理由，較佳為 18~32℃，更佳為 20~30℃。作為將上述混合物揉捏成團後使其醱酵之溫度，為了使乳酸菌之活性達到最大，較佳為 18~32℃，更佳為 25~30℃。作為使混合物醱酵之濕度，為了使麵團

之表面不乾燥，較佳為 50~100RH%，更佳為 70~80RH%。作為使混合物醱酵之時間，為了使菌數之增殖充分，較佳為 8~48 小時，更佳為 12~24 小時。

作為使原種醱酵之乳酸菌，就製造醱酵食品時不與酵母菌等酵母爭奪營養而可獲得充分之效果的方面而言，較佳為具有如下性質作為菌學性質之乳酸菌，即，主要利用葡萄糖以外之一種糖，且微弱地利用與上述不同且包含葡萄糖之糖。進而，作為上述乳酸菌，為了獲得表現出保存穩定性效果之醱酵產物，較佳為具有在 10~15℃ 之繁殖溫度範圍內繁殖之性質作為菌學性質之乳酸菌。作為上述乳酸菌，更佳為具有主要利用麥芽糖、且微弱地利用葡萄糖之性質之乳酸菌，特佳為舊金山乳酸桿菌 WB1006 株。再者，所謂主要利用麥芽糖、微弱地利用葡萄糖之性質，係指必需麥芽糖作為主要之碳源、且即便缺乏葡萄糖亦幾乎不影響繁殖之性質。具體而言係指於含有麥芽糖之培養基中開始培養之 24 小時後可容易地確認到增殖；而含有葡萄糖之培養基中開始培養之 48 小時以後，藉由離心將菌收集以目測可確認到有稍微增殖之性質。

中種之製造方法、及將原種添加至中種中並使其醱酵之方法並無特別限定，可採用通常之製麵包法中所謂之中種法。將原種添加至中種中並使其醱酵後添加之其他原料並無特別限定，例如可列舉食鹽、砂糖、脫脂奶粉、起酥油、水、製麵包改良劑、乳產品等麵包製造中通常使用之原料。混捏、分割、成形、醱酵、烘烤、冷卻無需藉由特定之方法來進行，可利用通常之製麵包法中所謂之中種法

來進行。

於將本發明之菌株製備成冷凍乾燥菌粉而用於麵包種之情形時，培養時可使用上述 MYP 液體培養基。使用該 MYP 液體培養基所得之冷凍乾燥菌粉係穩定性良好。又，MYP 液體培養基之培養液亦可用作製麵包時之液種。此時，藉由使菌液懸浮於 10~20%脫脂乳液中可提昇穩定性。

### 實施例

以下，根據實施例對本發明加以具體說明，但本發明並非僅限定於該等實施例。

#### 1.舊金山乳酸桿菌 WB1006 之分離方法

於經滅菌之生理鹽水中將麵包製造所使用之潘娜朵妮原種階段性地稀釋，塗佈於 MYP 洋菜培養基或 1%麥芽糖添加 MRS 天培養基等分離用洋菜培養基（添加有 10 ppm 之環己醯亞胺及 10 ppm 之疊氮化鈉者）中進行培養，藉此分離。關於培養條件，係於 25℃ 下培養 2~4 天，將所形成之菌落分離。

#### 2.菌學性質之鑑定

藉由 MYP 液體培養基對舊金山乳酸桿菌 WB1006 之形態性質進行鑑定。MYP 液體培養基係將麥芽糖 10 g、酵母萃取物 5 g、蛋白胨 1 g、乙酸鈉 1 g、麩胺酸鈉 1 g、硫酸鎂 200 mg、硫酸錳 20 mg、硫酸亞鐵 10 mg、氯化鈉 10 mg、Tween80 0.25 g 添加至水 1000 ml 中，並利用 1N NaOH 將 pH 值調整成 6.6 而成者。

於 MYP 液體培養基中之 24 小時培養中，該舊金山乳酸桿菌 WB1006 為  $1.0 \sim 5.0 \times 0.4 \mu\text{m}$  之長桿菌，且單一或

鏈狀地存在。未形成孢子，為非運動性且為革蘭氏陽性。各種菌學特性之鑑定係依照「乳酸菌實驗指南」（朝倉書店），且參照伯吉氏系統細菌學手冊（Bergey's Manual of Systematic Bacteriology）Vol.2（1986）作為分類鑑定之基準。以下示出所得之菌學性質。

（1）革蘭氏陽性

（2）桿菌

（3）無運動性

（4）無孢子

（5）兼性厭氧性

（6）過氧化氫酶陰性

（7）繁殖溫度 10～28℃（最適繁殖溫度 25℃）

（8）繁殖 pH 值 5.5～9.0

（9）利用麥芽糖而生成 D(+)-乳酸、L(+)-乳酸、乙醇及二氧化碳。

又，雖極微弱，但視培養條件不同有時亦利用葡萄糖。

### 3. 培養性質之鑑定

利用（1）至（3）之各培養基來研究本發明之舊金山乳酸桿菌 WB1006 之培養性質。

（1）1%麥芽糖加 MRS 洋菜平板培養基

上述培養基係於 Difco Lactobacilli MRS broth 1000 ml 中進一步添加麥芽糖 10 g 及洋菜 15 g 而成之培養基。菌落係於 25℃ 下培養 3～4 天，而為直徑約 2～3 mm 或其以下之圓形、半透鏡狀突起、不透明之灰白色、稍乾燥之形狀。

（2）MYP 液體培養基

於 25℃ 下培養 24 小時而菌體增殖，培養基白濁，產生綿毛狀之沈澱。

### (3) MYP 洋菜培養基（穿刺培養）

MYP 洋菜培養基係於 MYP 液體培養基 1000 ml 中進一步添加洋菜 15 g 而成之培養基。藉由穿刺而同樣地繁殖。

### 4. 生理、生化學性質之鑑定

各種菌學性質之鑑定係依照「乳酸菌實驗指南」（朝倉書店）來進行。以下示出所得之生理、生化學性質。

以下示出本發明之菌株之生理、生化學性質。

(1) 繁殖溫度 10~28℃ (最適繁殖溫度 25℃)

(2) 繁殖 pH 值範圍 5.5~9.0

(3) 與氧之關係

兼性厭氧性。於氧存在下或厭氧性條件下均可繁殖。

(4) 繁殖必需物質

上述 MYP 液體培養基中必需麥芽糖、酵母萃取物及脂肪酸，特別是不飽和脂肪酸。

(5) 糖類發酵性

利用麥芽糖而產生酸及氣體。

(6) 石蕊牛乳：不變

(7) 硝酸鹽之還原：陰性

(8) 不將明膠液化。

(9) 脲酶：陰性

(10) 過氧化氫酶：陰性

(11) 不水解澱粉。

(12) 由麥芽糖所生之產物：L(+)-乳酸、D(+)-乳酸、

乙醇

### 5. 遺傳學分析

如下般進行本發明之舊金山乳酸桿菌 WB1006 之基因學分析。為確認舊金山乳酸桿菌 WB1006 之分類學位置，將 16SrRNA 基因之鹼基序列資料與已知種之序列資料進行比較。關於 DNA 之抽取，係依照常法對在 MYP 液體培養基中於 25℃ 下培養了 24 小時之菌液進行抽取。根據 16SrRNA 基因分析之結果，與舊金山乳酸桿菌之標準菌株即舊金山乳酸桿菌 JCM5668 (JAPAN COLLECTION OF MICROORGANISMS, 獨立行政法人 理化學研究所) 於 1564 bp 中表現出 99.7% 之同源性。

### 6. 舊金山乳酸桿菌 WB1006 與標準菌株之比較

對本發明之菌株與舊金山乳酸桿菌 JCM5668 之糖利用性進行比較，結果本發明菌作為碳源而特別針對麥芽糖，且於通常之培養條件下幾乎不利用葡萄糖。另一方面，舊金山乳酸桿菌 JCM5668 將麥芽糖與葡萄糖均利用。又，本發明之菌株之培養溫度帶亦較低，繁殖溫度為 28℃，特別於 25℃ 下表現出良好之繁殖，而舊金山乳酸桿菌 JCM5668 之最適繁殖溫度為 30~35℃。因此，與公知之菌株相比較而不一致，故將本發明之菌株命名為新穎之舊金山乳酸桿菌 WB1006。

### 實施例 1 (麵包之製造)

於 MYP 液體培養基中，麥芽糖係使用和光純藥工業股份有限公司製造之「麥芽糖一水合物」，酵母萃取物係使用 Difco 公司製造之「酵母萃取物 (Yeast Extract)」，蛋

白朮係使用 Difco 公司製造之「蛋白朮 (Peptone, Bacto TM)」，乙酸鈉係使用和光純藥工業股份有限公司製造之「乙酸鈉三水合物」，麩胺酸鈉係使用和光純藥工業股份有限公司製造之「L-麩胺酸單鈉」，硫酸鎂係使用和光純藥工業股份有限公司製造之「硫酸鎂七水合物」，硫酸錳係使用和光純藥工業股份有限公司製造之「硫酸錳 (II) 四水合物」，硫酸亞鐵係使用和光純藥工業股份有限公司製造之「硫酸亞鐵 (II) 七水合物」，氯化鈉係使用和光純藥工業股份有限公司製造之「氯化鈉」，Tween80 係使用和光純藥工業股份有限公司製造之「聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐單油酸酯」。

又，製麵包時，小麥粉係使用日本製粉股份有限公司製造之「Eagle」，酵母係使用 Oriental Yeast 股份有限公司之「US Yeast」，食鹽係使用財團法人鹽事業中心製造之「食鹽」，砂糖係使用三井製糖股份有限公司製造之「砂糖 GHCl」，脫脂奶粉係使用 JT Foods 股份有限公司製造之「Milfine」，起酥油係使用 ADEKA 股份有限公司製造之「Premium Short CF」，製麵包改良劑係使用 Oriental Yeast 股份有限公司之「Dow Natural GF」。

麵包之製造係利用中種法來進行。以下述表 1 所示之調配比例來混合原料，將該混合物於 24℃ 下揉捏成團，於 28℃、75RH% 下使其發酵 2 小時，製成原種。

[表 1]

| 原 料       | 重量份  |
|-----------|------|
| 小麥粉（高筋麵粉） | 100  |
| 酵母菌       | 0.15 |
| 乳酸菌菌液或菌粉  | 1    |
| 水         | 49   |

接著，將上述原種與表 2 所記載之原料混合，製備中種。混合條件為低速 3 分鐘、中速 1 分鐘（L3M1），於 24℃ 下揉捏成團後，於 28℃、75RH% 下使其醱酵 4 小時。

[表 2]

| 原 料       | 重量份 |
|-----------|-----|
| 小麥粉（高筋麵粉） | 70  |
| 酵母菌       | 2   |
| 製麵包改良劑    | 0.1 |
| 上述原種      | 20  |
| 水         | 40  |

使用上述中種，以表 3 所示之調配比例將原材料混合而進行主混捏後，一次醱酵 20 分鐘後以分割重量 220 g 分割麵團，醒麵 20 分鐘成形後，於 2 斤麵包模具中將麵團裝入至 6 個模具中，進行最終醱酵（35℃、75RH%、60 分鐘）、烘烤（上火 200℃、下火 230℃、32 分鐘），製造麵包。主混捏之混合條件為低速 3 分鐘、中速 3 分鐘、高速 1 分鐘，添加起酥油後混捏低速 2 分鐘、中速 2 分鐘、高速 1 分鐘，於 26℃ 下揉捏成團。

[表 3]

| 原 料       | 重量份   |
|-----------|-------|
| 上述中種      | 132.1 |
| 小麥粉（高筋麵粉） | 30    |
| 食鹽        | 2     |
| 砂糖        | 5     |
| 脫脂奶粉      | 2     |
| 起酥油       | 5     |
| 水         | 28    |

## 比較例 1（麵包之製造）

於實施例 1 中，完全不添加原種中所含之本發明之菌株，除此以外，利用與實施例 1 相同之方法製作麵包。

## 比較例 2（麵包之製造）

於實施例 1 中，於原種中不使用本發明之菌株而使用舊金山乳酸桿菌 JCM5668（標準株），除此以外，利用與實施例 1 相同之方法製作麵包。

## 試驗例 1（調配乳酸菌之麵包之防黴性之評價）

## [試驗方法]

使用實施例 1 及比較例 1～2 中獲得之麵包，進行黴菌之強制污染試驗。作為黴菌，係將著名之黑麴菌（以下簡稱為 *A.niger*）作為試驗菌株。將各麵包切片，於 40 個部位各植入約 50 個孢子，對確認到孢子之形成之部位進行計數，測定孢子形成所需之天數。比較例 1～2 係自污染約 3 天後起確認到黴菌之孢子形成。然而，使用本發明之菌株

之麵包的實施例即便於污染約 35 天後亦確認不到黴菌之孢子形成。將試驗結果示於表 4 及圖 1 中。

因此，由試驗例證明，藉由將本發明之菌株於麵包中用作種，可獲得較先前更高之防黴效果。

[表 4]

| 經過天數<br>(天) | 實施例 1 | 比較例 1 | 比較例 2 |
|-------------|-------|-------|-------|
| 0           | 0     | 0     | 0     |
| 3           | 0     | 22    | 28    |
| 4           | 0     | 40    | 40    |
| 5           | 0     | 40    | 40    |
| 7           | 0     | 40    | 40    |
| 8           | 0     | 40    | 40    |
| 10          | 0     | 40    | 40    |

#### 實施例 2 (麵包之製造)

實施例 2 係與實施例 1 同樣地使用 MYP 液體培養基及製麵包材料。麵包之製造方法係使用中種法。以下述表 5 所示之調配比例將原料混合，將其混合物於 24℃ 下揉捏成團，於 28℃、75RH% 下使其醱酵 12 小時，製成原種。

[表 5]

| 原 料        | 重量份 |
|------------|-----|
| 小麥粉 (高筋麵粉) | 100 |
| 乳酸菌液或菌粉    | 1   |
| 水          | 120 |

接著，將上述表 5 之原種與表 6 所記載之原料混合，製備中種。混合條件係低速 3 分鐘，於 24℃ 下揉捏成團後，於 28℃、75RH% 下使其醱酵 4 小時。

[表 6]

| 原 料       | 重量份 |
|-----------|-----|
| 小麥粉（高筋麵粉） | 70  |
| 酵母菌       | 2   |
| 原種        | 20  |
| 水         | 40  |

使用表 6 所示之中種，以下述表 7 所示之調配比例將原料混合，實施主混捏。主混捏後以分割重量 220 g 分割麵團，醒麵 20 分鐘後，於成形後裝入至模具中，進行最終醱酵（35℃、75RH%、60 分鐘）、烘烤（下火 175℃、上火 200℃、20 分鐘），製造麵包。主混捏之混合條件為低速 3 分鐘、中速 2 分鐘，添加起酥油後混捏低速 2 分鐘、中速 1 分鐘，於 26℃ 下揉捏成團。

[表 7]

| 原 料       | 重量份 |
|-----------|-----|
| 中種        | 132 |
| 小麥粉（高筋麵粉） | 30  |
| 食鹽        | 2   |
| 砂糖        | 5   |
| 製麵包改良劑    | 0.2 |
| 脫脂奶粉      | 2   |
| 起酥油       | 5   |
| 水         | 28  |

### 比較例 3（麵包之製造）

於實施例 2 中，完全不添加原種中所含之本發明之菌株，除此以外，利用與實施例 2 相同之方法製作麵包。

### 試驗例 2（調配乳酸菌之麵包之防黴性評價）

使用實施例 2 及比較例 3 中獲得之麵包，進行黴菌之強制污染試驗。作為黴菌，係將著名之產黃青黴菌（以下簡稱為 *P.chrysogenum*）作為試驗菌株，利用與試驗例 1 相同之方法評價防黴性。比較例 3 係自污染約 3 天後起確認到黴菌之孢子形成，自所有接種部位可確認到孢子形成。實施例 2 係於污染約 6 天後確認到孢子形成，7～10 天後亦自一部分部位可確認到孢子形成。與比較例 3 相比，實施例 2 之污染部位增加之傾向非常緩慢。將試驗結果示於表 8 及圖 2 中。

[表 8]

| 經過天數<br>(天) | 實施例 2 | 比較例 3 |
|-------------|-------|-------|
| 0           | 0     | 0     |
| 2           | 0     | 0     |
| 3           | 0     | 40    |
| 4           | 0     | 40    |
| 6           | 3     | 40    |
| 7           | 3     | 40    |
| 9           | 3     | 40    |
| 10          | 5     | 40    |

其次，使用調配有本發明之菌株的實施例 2 中製造之麵包、及未調配菌株的比較例 3 中製造之麵包，研究作為食物中毒菌而廣為人知之金黃色葡萄球菌之增殖抑制作用。

試驗例 3(調配乳酸菌之麵包的金黃色葡萄球菌之增殖抑制作用)

[試驗方法]

作為金黃色葡萄球菌，係將 *Staphylococcus aureus* JCM2413（以下簡稱為金黃色葡萄球菌）用作試驗菌株。

將上述比較例 3 及實施例 2 之各麵包切片，將麵包內部切成 2.5 cm×2.5 cm 見方（2.5～2.8 g/樣品），接種約 1000 個/500  $\mu$  L/樣品之金黃色葡萄球菌。將接種了試驗菌之麵包於密閉容器中於 35℃ 下培養 24 小時。培養後，將樣品懸浮於 PBS(－)中，於葡萄球菌分離用培養基(*Staphylococcus* Medium No.110，日水製藥)中測定活菌數，對將未添加乳酸菌之麵包（比較例 3）之增殖設為 100%時的調配有本發明菌之麵包（實施例 2）的增殖比例進行比較。將結果示於表 9 及圖 3 中。表中之金黃色葡萄球菌數係以  $n=4$  進行試驗並示出其平均值。

[表 9]

| 實施例編號 | 金黃色葡萄球菌數（個/樣品）     |                      |
|-------|--------------------|----------------------|
|       | 剛接種後               | 24 小時後               |
| 比較例 3 | $1.02 \times 10^3$ | $3.01 \times 10^8$   |
| 實施例 2 | $1.02 \times 10^3$ | $1.99 \times 10^6$ * |

\* $p < 0.05$  相對於比較例 3 之統計學顯著差異 (Student t-test)

於比較例 3 中，金黃色葡萄球菌增殖至  $3 \times 10^8$  個/樣品。於調配有本發明之菌株之麵包的實施例 2 中，金黃色葡萄球菌為  $2.0 \times 10^6$  個/樣品。相對於比較例 3，增加率為百分之一以下。由上述試驗證明，藉由將本發明之菌株調配至麵包中，可抑制金黃色葡萄球菌之增殖。

又，由試驗例 1~3 證明，於將本發明之菌株調配至中種中之情形時，即便於藉由烘烤而製造麵包後，亦有對黴菌及金黃色葡萄球菌之增殖抑制效果。

### 產業上之可利用性

本發明不僅可有效地抑制黴菌之增殖而且可有效地抑制金黃色葡萄球菌等細菌之增殖，安全且對食品風味之影響較少，可作為具有保存穩定性優異之效果的冷凍乾燥菌粉而使用，任何人均可簡便地製造穩定之酸麵種及麵包等食品。

### 【圖式簡單說明】

圖 1 係表示比較例 1~2 及實施例 1 中所製造之麵包中的黑麴菌 (*Aspergillus niger*) 之孢子形成部位數之經時變化的圖表。

圖 2 係表示比較例 3 及實施例 2 中所製造之麵包中的產黃青黴菌 (*Penicillium chrysogenum*) 之孢子形成部位數之經時變化的圖表。

圖 3 係表示比較例 3 及實施例 2 中所製造之麵包中的金黃色葡萄球菌數之增加率的圖表。

【主要元件符號說明】

無



## 七、申請專利範圍：

104年5月07日修正本

1. 一種舊金山乳酸桿菌 (*Lactobacillus sanfranciscensis*)  
FERM ABP-11246 菌株。

2. 一種隸屬於舊金山乳酸桿菌 (*Lactobacillus sanfranciscensis*) 之菌株，其具有以下之 (1) 至 (9) 之菌學性質：

- (1) 革蘭氏陽性
- (2) 桿菌
- (3) 無運動性
- (4) 無孢子
- (5) 兼性厭氧性
- (6) 過氧化氫酶陰性
- (7) 繁殖溫度 10~28℃
- (8) 繁殖 pH 值 5.5~9.0
- (9) 利用麥芽糖且幾乎不利用葡萄糖，而生成 D(+)-  
乳酸、L(+)-乳酸、乙醇及二氧化碳。

3. 一種菌株之培養物、含有物或冷凍乾燥菌粉，其中該菌株為申請專利範圍第 1 項或第 2 項之菌株。

4. 如申請專利範圍第 3 項之培養物、含有物或冷凍乾燥菌粉，其中菌株為活菌。

5. 一種菌株之培養方法，其特徵在於：將申請專利範圍第 1 項或第 2 項之菌株接種至培養基中進行培養。

6. 一種食品添加物，其含有申請專利範圍第 1~4 項中任一項之菌株、培養物、含有物或冷凍乾燥菌粉作為有效成分；

抑制黴菌及金黃色葡萄球菌之增殖。

7.如申請專利範圍第 6 項之食品添加物，其即便經過加熱處理後亦抑制黴菌及金黃色葡萄球菌之增殖。

8.一種食品，其含有申請專利範圍第 6 項或第 7 項之食品添加物。

9.如申請專利範圍第 8 項之食品，其係藉由菌株使食品材料發酵而成。

10.一種原種之製造方法，其係申請專利範圍第 2 項之菌株的製造方法，其用於獲得黴菌及金黃色葡萄球菌之增殖抑制效果，係使含有乳酸菌、小麥粉及水之混合物發酵；

該乳酸菌為主要利用葡萄糖以外之 1 種糖、微弱地利用其他糖之乳酸菌。

11.如申請專利範圍第 10 項之原種之製造方法，其中該混合物進一步含有酵母菌。

12.如申請專利範圍第 11 項之原種之製造方法，其中該乳酸菌為於 10~15℃ 下可繁殖之乳酸菌。

13.一種食品之製造方法，其係由如下步驟所構成：使用藉由申請專利範圍第 10~12 項中任一項之原種之製造方法所製造之原種來製造中種，然後製造最終麵團。

## 八、圖式：

(如次頁)

圖 1

調配乳酸菌之麵包中之黴菌孢子  
形成數之比較

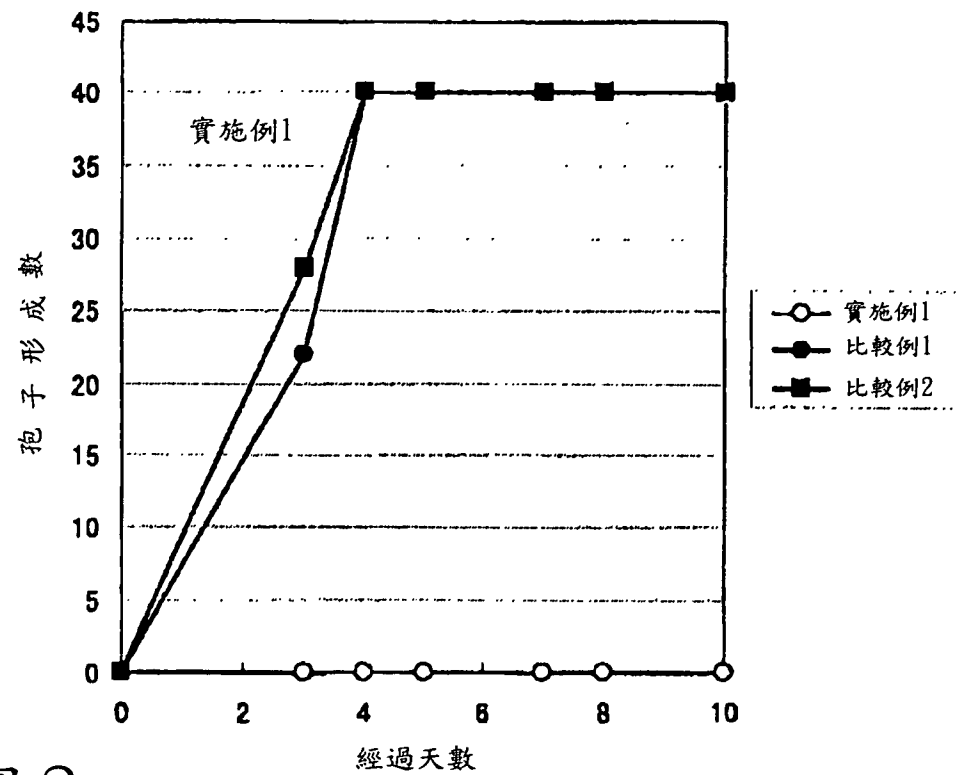


圖 2

調配乳酸菌之麵包中之產黃青黴菌  
(*P. chrysogenum*) 孢子形成數之比較

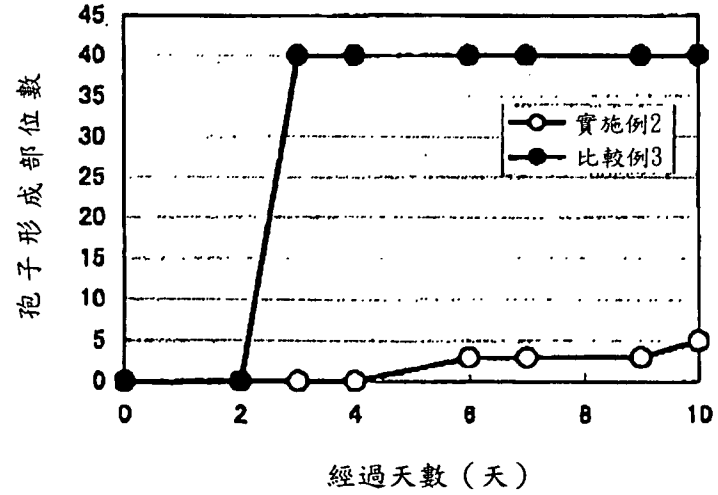


圖 3

