

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102892299 A

(43) 申请公布日 2013.01.23

(21) 申请号 201180018576.5

(22) 申请日 2011.08.31

(30) 优先权数据

2010-194521 2010.08.31 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012.10.11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2011/069726 2011.08.31

(87) PCT申请的公布数据

W02012/029835 JA 2012.03.08

(83) 生物保藏信息

FERM BP-11277 2010.08.11

FERM BP-11276 2010.08.11

FERM BP-11275 2010.08.11

(71) 申请人 森永乳业株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 小田卷俊孝 米泽寿美子

丸山广志 高桥典俊

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int. Cl.

A23C 9/127(2006.01)

C12N 1/20(2006.01)

C12N 15/09(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 15 页

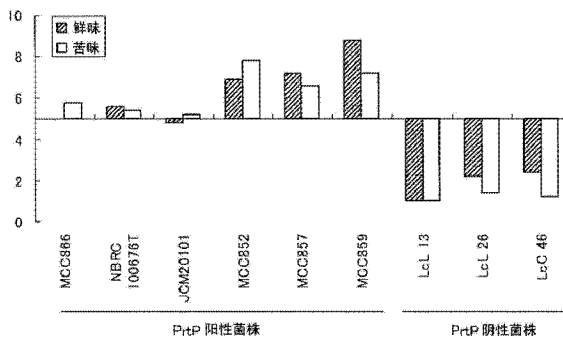
序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

含有双歧杆菌属细菌的发酵食品的生产方法

(57) 摘要

该方法通过使用具有如下性质的乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌来发酵乳原料:当含有例如1%(W/W)葡萄糖和10%(W/W)还原脱脂乳的培养基接种有每1ml培养基 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU的不具有细胞壁定位蛋白酶的乳酸乳球菌和每1ml培养基 1.0×10^7 至 3.0×10^9 CFU的双歧杆菌属细菌,并培养细菌,并且当培养基的pH达到4.6至5.5时将培养基从培养温度迅速冷却至10°C,并在10°C下保存两周时,所述双歧杆菌属细菌保持至少30%的存活率。



1. 一种发酵食品的生产方法,其包括通过使用不具有细胞壁定位蛋白酶的乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌来发酵乳原料。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述乳酸乳球菌具有如下性质:当基于每1ml含有1%(W/W)葡萄糖和10%(W/W)还原脱脂奶粉的培养基以 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU的量将所述细菌接种至所述培养基,并在37°C下培养4至24小时,所述培养基不凝固。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述乳酸乳球菌具有如下性质:当基于每1ml含有1%(W/W)葡萄糖和10%(W/W)还原脱脂奶粉的培养基分别以 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU和 1.0×10^7 至 3.0×10^9 CFU的量将所述细菌和所述双歧杆菌属细菌接种至所述培养基,培养,并当所述培养基的pH变为4.6至5.5时将所述培养基从培养温度迅速冷却至10°C,并在10°C下保存2周时,在所述培养基中的溶解氧浓度保持在2ppm以下。

4. 根据权利要求1至3任一项所述的方法,其中所述乳酸乳球菌具有如下性质:当基于每1ml含有1%(W/W)葡萄糖和10%(W/W)还原脱脂奶粉的培养基分别以 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU和 1.0×10^7 至 3.0×10^9 CFU的量将所述细菌和所述双歧杆菌属细菌接种至所述培养基,培养,并当所述培养基的pH变为4.6至5.5时将所述培养基从培养温度迅速冷却至10°C,并在10°C下保存2周时,所述双歧杆菌属细菌的存活率保持在30%以上。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的方法,其中所述乳酸乳球菌具有如下性质:当基于每1ml含有1%(W/W)葡萄糖和10%(W/W)还原脱脂奶粉的培养基分别以 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU、 1.0×10^7 至 3.0×10^9 CFU、 1.0×10^3 至 9.0×10^7 CFU和 1.0×10^3 至 9.0×10^7 CFU的量将所述细菌、所述双歧杆菌属细菌、嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种接种至所述培养基,并在37°C下培养3至24小时,所述培养基凝固。

6. 根据权利要求1至5任一项所述的方法,其中所述乳酸乳球菌选自自由乳酸乳球菌乳酸亚种和乳酸乳球菌乳脂亚种组成的组。

7. 根据权利要求1至6任一项所述的方法,其中所述乳酸乳球菌选自自由乳酸乳球菌乳酸亚种LcL13(FERM BP-11276)、乳酸乳球菌乳酸亚种LcL26(FERM BP-11277)和乳酸乳球菌乳脂亚种LcC46(FERM BP-11275)组成的组。

8. 根据权利要求1至7任一项所述的方法,其中所述双歧杆菌属细菌为长双歧杆菌。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述长双歧杆菌为长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株。

10. 根据权利要求1至9任一项所述的方法,其中将选自嗜热链球菌和德式乳杆菌组成的组的乳酸菌进一步用于发酵。

11. 一种发酵食品,其通过根据权利要求1至10任一项所述的方法来生产。

12. 一种用于发酵含有双歧杆菌属细菌的乳原料的起子,其包括不具有细胞壁定位蛋白酶的乳酸乳球菌。

13. 根据权利要求12所述的用于发酵包括双歧杆菌属细菌的乳原料的起子,其中所述乳酸乳球菌具有如下性质:当基于每1ml含有1%(W/W)葡萄糖和10%(W/W)还原脱脂奶粉的培养基以 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU的量将所述细菌接种至所述培养基,并在37°C下培养4至24小时,所述培养基不凝固。

14. 根据权利要求12或13所述的用于发酵包括双歧杆菌属细菌的乳原料的起子,其中所述乳酸乳球菌具有如下性质:当基于每1ml含有1%(W/W)葡萄糖和10%(W/W)还原脱脂奶

粉的培养基分别以 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU 和 1.0×10^7 至 3.0×10^9 CFU 的量将所述细菌和所述双歧杆菌属细菌接种至所述培养基, 培养, 并当所述培养基的 pH 变为 4.6 至 5.5 时将所述培养基从培养温度迅速冷却至 10°C , 并在 10°C 下保存 2 周时, 所述双歧杆菌属细菌的存活率保持在 30% 以上。

15. 根据权利要求 12 至 14 任一项所述的用于发酵包括双歧杆菌属细菌的乳原料的起子, 其中所述乳酸乳球菌具有如下性质: 当基于每 1ml 含有 1%(W/W) 葡萄糖和 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基分别以 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU、 1.0×10^7 至 3.0×10^9 CFU、 2.0×10^5 至 9.0×10^7 CFU 和 2.0×10^5 至 9.0×10^7 CFU 的量将所述细菌、所述双歧杆菌属细菌、嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种接种至所述培养基, 并在 37°C 下培养 3 至 24 小时时, 所述培养基凝固。

16. 根据权利要求 12 至 15 任一项所述的用于发酵包括双歧杆菌属细菌的乳原料的起子, 其中所述乳酸乳球菌选自由乳酸乳球菌乳酸亚种和乳酸乳球菌乳脂亚种组成的组。

17. 根据权利要求 12 至 16 任一项所述的用于发酵包括双歧杆菌属细菌的乳原料的起子, 其中所述乳酸乳球菌选自由乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL13 (FERM BP-11276)、乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL26 (FERM BP-11277) 和乳酸乳球菌乳脂亚种 LcC46 (FERMBP-11275) 组成的组。

18. 根据权利要求 12 至 17 任一项所述的用于发酵包括双歧杆菌属细菌的乳原料的起子, 其中所述双歧杆菌属细菌为长双歧杆菌。

19. 根据权利要求 18 所述的用于发酵包括双歧杆菌属细菌的乳原料的起子, 其中所述长双歧杆菌为长双歧杆菌 ATCCBAA-999 菌株。

20. 一种细菌菌株, 其选自由乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL13 (FERM BP-11276)、乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL26 (FERMBP-11277) 和乳酸乳球菌乳脂亚种 LcC46 (FERM BP-11275) 组成的组。

含有双歧杆菌属细菌的发酵食品的生产方法

技术领域

[0001] 本发明涉及可通过使用乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 和双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 细菌来发酵乳原料 (milk raw material) 而获得的发酵食品的生产方法, 以及适用于所述方法的乳酸乳球菌。

背景技术

[0002] 双歧杆菌属细菌 (下文中还称作“双歧杆菌 (*bifidobacteria*)”) 例如长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) 构成形成于人类肠道中的肠道菌群的一类优势菌种。已知双歧杆菌具有恢复肠道菌平衡的肠道功能控制作用、免疫增强作用和致癌抑制作用等。因此, 近年来随着消费者健康意识的提高, 对于含有双歧杆菌活菌的食品 (如, 双歧杆菌发酵乳) 的需求日益增长。

[0003] 双歧杆菌在乳性培养基 (lactic medium) 中显示较差的增殖。因此, 例如, 为了获得 1×10^7 CFU (菌落形成单位) /ml 的双歧杆菌含量, 通常向发酵乳中添加一定量的各种生长促进物质。

[0004] 然而, 生长促进物质通常很昂贵, 并还可使食品的风味劣化。此外, 难以在酸性条件下保存双歧杆菌, 并且在此条件下它们容易被杀死。为此, 即使双歧杆菌在发酵乳制品等制造期间一旦增殖, 发酵乳制品等中的双歧杆菌活菌的量也会在乳制品等分配期间加速降低。

[0005] 因此, 目前研究的课题为改善双歧杆菌的生存力 (viability) 和保存存活性 (storage survivability), 由此生产含有大量双歧杆菌活菌的发酵乳, 特别是在消费者摄入时以类似于其制造后立即观察到的水平富含双歧杆菌活菌的发酵乳。

[0006] 已公开了在不添加如上所述的生长促进物质等的情况下, 通过使用双歧杆菌和另一种乳酸菌进行混合发酵来改善双歧杆菌的生存力和保存存活性的各种方法。

[0007] 关于在发酵乳的制造中改善双歧杆菌的生存力的方法, 已公开了例如含有乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、乳酸乳球菌乳脂亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) 和双歧杆菌的酸乳, 及其生产方法 (参照例如专利文献 1)。

[0008] 另外, 关于改善发酵乳中双歧杆菌的保存存活性的方法, 已公开了例如以下方法: 在主要由乳构成的培养基中生产包括短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) 和不产生丁二酮和乙偶姻的乳酸乳球菌乳酸亚种的混合培养物 (culture) 的双歧杆菌发酵乳的方法 (参照例如专利文献 2)。

[0009] 此外, 已公开了例如生产发酵乳的方法, 所述方法包括用具有细胞壁定位的蛋白酶 (cell wall-enveloped proteinase, PrtP) 的乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌使发酵培养基 (fermentation base) 发酵 (参照例如专利文献 3); 生产含有双歧杆菌属细菌的组合物方法, 所述方法包括将双歧杆菌属细菌接种至含有乳蛋白质的培养基, 所述培养基中添加有具有细胞壁定位的蛋白酶的乳酸菌的破碎细胞或从乳酸菌的细胞中分离的酶组分 (参照例如专利文献 4); 生产发酵乳的方法以及由该生产方法生产的发酵乳, 所述方法

的特征在于,使用在 10% 还原脱脂奶粉 (reduced skim milk powder) 培养基中具有发酵能力、并且具有对长双歧杆菌的增殖促进效果和存活性改善效果的乳球菌细菌 (参照例如专利文献 5)。

[0010] 现有技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献 1 :日本专利 3364491 号

[0013] 专利文献 2 :日本专利 3068484 号

[0014] 专利文献 3 :日本专利 4448896 号

[0015] 专利文献 4 :日本专利特开 (KOKAI) 2009-296910 号

[0016] 专利文献 5 :国际专利公布 W02008/099543

发明内容

[0017] 发明要解决的问题

[0018] 尽管如上所述已公开了各种用于改善双歧杆菌的生存力和保存存活性的方法,它们仍留有进一步改进的空间。例如,在上述专利文献 1 的方法中,促进了双歧杆菌的生长,从而可缩短发酵时间,但专利文献 1 根本未涉及双歧杆菌的保存存活性。

[0019] 在上述专利文献 2 的方法中,由特定双歧杆菌和特定乳酸菌构成的混合细菌的使用既提供增殖促进效果,又提供存活性改善效果,但专利文献 2 根本未涉及除短双歧杆菌以外的双歧杆菌,例如目前广泛用于食品的长双歧杆菌。事实上,如下文所述,在使用专利文献 2 中所提及的菌株 (FERM BP-6224) 的实验中,不能获得长双歧杆菌充分的存活性。

[0020] 另外,在上述专利文献 3 描述的方法中,具有细胞壁定位的蛋白酶 (PrtP) 的乳酸乳球菌的使用提供促进双歧杆菌增殖的效果,但 PrtP 产生许多源自蛋白质的寡肽和氨基酸,从而产生苦味和鲜味 (umami),因此可影响发酵乳的风味 (例如, Pillidge, C. J. 等, Int. Dairy Journal, 2003, 13:345-354)。专利文献 4 中描述的方法具有相同的问题。

[0021] 此外,根据 Yonezawa S. 等人, J. Dairy Sci., 2010, 93:1815-23, 以及专利文献 3, 在脱脂奶粉培养基中具有发酵能力的乳酸乳球菌具有 PrtP, 因此专利文献 5 的方法还具有与专利文献 3 相同的问题,即, PrtP 可影响发酵乳的风味。

[0022] 另一方面,由于不具有 PrtP 的乳酸乳球菌不能从脱脂奶粉培养基吸收充分的营养,因此基本上其所有菌株均不能在脱脂奶粉培养基上生长,并且未观察到其对双歧杆菌的增殖促进效果和存活性改善效果。

[0023] 本发明的目的为提供通过使用可改善双歧杆菌属细菌的保存存活性的乳酸菌来生产具有良好风味的发酵食品的方法,由此生产方法生产的发酵食品,以及用于发酵含有双歧杆菌属细菌和上述乳酸菌的乳原料的起子 (starter)。

[0024] 用于解决问题的方案

[0025] 本发明的发明人进行了各种研究以实现前述目的,结果发现,存在不具有细胞壁定位的蛋白酶 PrtP 的乳酸乳球菌菌株,所述菌株在其与双歧杆菌属细菌的混合发酵中改善了双歧杆菌属细菌的保存性质,因此完成了本发明。

[0026] 因此,本发明涉及发酵食品的生产方法,所述方法包括通过使用不具有细胞壁定位蛋白酶的乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌来发酵乳原料。

[0027] 本发明还提供由所述方法生产的发酵食品。

[0028] 本发明还提供用于发酵含有双歧杆菌属细菌的乳原料的起子,所述起子包括不具有细胞壁定位蛋白酶的乳酸乳球菌。

[0029] 在本发明的发酵食品的生产方法和用于发酵含有双歧杆菌属细菌的乳原料的起子的优选实施方案中,所述乳酸乳球菌具有如下性质:当基于每 1ml 含有 1%(W/W) 葡萄糖和 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基以 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU 的量将所述细菌接种至培养基,并在 37°C 下培养 4 至 24 小时,所述培养基不凝固。

[0030] 在本发明的优选实施方案中,所述乳酸乳球菌具有如下性质:当基于每 1ml 含有 1%(W/W) 葡萄糖和 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基分别以 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU 和 1.0×10^7 至 3.0×10^9 CFU 的量将所述细菌和所述双歧杆菌属细菌接种至培养基培养,并且当所述培养基的 pH 变为 4.6 至 5.5 时将所述培养基从培养温度迅速冷却至 10°C,并在 10°C 下保存 2 周时,在所述培养基中的溶解氧浓度 (dissolved oxygen concentration) 保持在 2ppm 以下。

[0031] 在本发明的优选实施方案中,所述乳酸乳球菌具有如下性质:当基于每 1ml 含有 1%(W/W) 葡萄糖和 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基分别以 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU 和 1.0×10^7 至 3.0×10^9 CFU 的量将所述细菌和所述双歧杆菌属细菌接种至培养基培养,并当所述培养基的 pH 变为 4.6 至 5.5 时将所述培养基从培养温度迅速冷却至 10°C,并在 10°C 下保存 2 周时,所述双歧杆菌属细菌的存活率保持在 30% 以上。

[0032] 在本发明的优选实施方案中,所述乳酸乳球菌具有如下性质:当基于每 1ml 含有 1%(W/W) 葡萄糖和 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基分别以 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU、 1.0×10^7 至 3.0×10^9 CFU、 2.0×10^5 至 9.0×10^7 CFU 和 2.0×10^5 至 9.0×10^7 CFU 的量将所述细菌、所述双歧杆菌属细菌、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 和德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 接种至培养基,并在 37°C 下培养 3 至 24 小时,所述培养基凝固。

[0033] 在本发明的优选实施方案中,所述乳酸乳球菌选自自由乳酸乳球菌乳酸亚种和乳酸乳球菌乳脂亚种组成的组。

[0034] 在本发明的优选实施方案中,所述乳酸乳球菌选自自由乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL13 (FERM BP-11276)、乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL26 (FERM BP-11277) 和乳酸乳球菌乳脂亚种 LcC46 (FERMBP-11275) 组成的组。

[0035] 在本发明的优选实施方案中,所述双歧杆菌属细菌为长双歧杆菌。

[0036] 在本发明的优选实施方案中,所述长双歧杆菌为长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株。

[0037] 在本发明的优选实施方案中,将选自嗜热链球菌和德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*) 组成的组的乳酸菌用于发酵。

[0038] 本发明还提供选自自由乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL13 (FERM BP-11276)、乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL26 (FERM BP-11277) 和乳酸乳球菌乳脂亚种 LcC46 (FERM BP-11275) 组成的组的细菌菌株。

附图说明

[0039] 图 1 示出通过本发明方法生产的酸乳的口感评价结果。

具体实施方式

[0040] 下文中,将详细解释本发明。

[0041] 用于本发明的细菌为不具有细胞壁定位蛋白酶的乳酸乳球菌。该细胞壁定位蛋白酶 (EC 3.4.21.96,也称为“PrtP”)是一种存在于细胞膜、其活性部位暴露在细胞表面上的酶。作为乳酸乳球菌的 PrtP 酶,已知 PI 型(该型酶几乎不分解 α -酪蛋白,但很好地从 C 末端附近分解 β -酪蛋白)、PIII 型(该型酶很好地从 C 末端和 N 末端分解 α -酪蛋白和 β -酪蛋白二者)以及它们的中间型(PI/PIII 型)的那些(例如,Reid, J. R. 等, Applied and Environmental Microbiology, 1994, 第 60 卷, 第 3 期, 第 801-806 页)。PrtP 的具体实例,作为乳酸乳球菌的 PrtP 包括其基因序列在 NCBI 注册登录号为 AY542690、AY542691 等的 PrtP 及其同系物。同系物的实例包括具有由任意前述基因序列编码的氨基酸序列的蛋白质,但包括一个或多个氨基酸残基的取代、缺失、插入或添加,并具有 PrtP 活性。一个或多个所表达的意思是数量优选 1 至 20、更优选 1 至 10、还更优选 1 至 5、特别优选 1 至 3。同系物的实例进一步包括与登录号为 AY542690 或 AY542691 的核苷酸序列所编码的氨基酸序列显示 80% 以上、优选 90% 以上、更优选 95% 以上的同源性,并具有 PrtP 活性的蛋白质。

[0042] “不具有 PrtP”的细菌所表达的意思是该细菌不具有 PrtP 的酶活性,该状态包括细菌不具有任何 PrtP 蛋白质的状态,以及细菌具有 PrtP 蛋白质,但该 PrtP 蛋白质不具有酶活性的状态。此外,细菌具有 PrtP 蛋白质,但 PrtP 蛋白质的量或活性显著低于具有 PrtP 的细菌的量或活性的状态也包括在“不具有 PrtP”的状态内。

[0043] 尽管乳酸乳球菌的亚种(subsp.)不特别限定,但优选包括具有 PrtP 的菌株和不具有 PrtP 的菌株的亚种。具体实例包括,例如乳酸乳球菌乳酸亚种和乳酸乳球菌乳脂亚种。可通过从自然界筛选不具有 PrtP 活性的菌株或不具有编码 PrtP 的基因的菌株来获得不具有 PrtP 的乳酸乳球菌菌株。

[0044] 由于 PrtP 在细胞外具有酶活性部位,因此具有 PrtP 的菌株可分解培养基中的蛋白质,并将蛋白质用于菌株自身的生长。然而,不具有 PrtP 的菌株不能使用培养基中的蛋白质用于菌株生长。因此,可在观察含有蛋白质的培养基,例如包含 10%(W/W)还原脱脂奶粉的培养基中的生长的基础上可筛选不具有 PrtP 的菌株。

[0045] 另外,例如如实施例中所所述,在通过 PCR 检测 PrtP 基因或其部分的基础上可筛选不具有编码 PrtP 的基因的菌株。用于扩增 PrtP 基因的引物的实例包括 SEQ ID NOS :1 和 2 的引物组和 SEQID NOS :3 和 4 的引物组。

[0046] 不具有 PrtP 的菌株还可通过使用突变或基因重组使 PrtP 基因失活、破坏或缺失而从具有 PrtP 的菌株获得。由要失活、破坏或缺失的 PrtP 基因所编码的 PrtP 可为 PI 型、PIII 型或 PI/PIII 型的酶。

[0047] 不具有 PrtP 的乳酸乳球菌的一个实施方案为具有如下性质的菌株:当基于每 1ml 含有 1%(W/W)葡萄糖和 10%(W/W)还原脱脂奶粉的培养基以 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU 的量将该细菌接种至培养基,并在 37°C 下培养 4 至 24 小时(例如 16 小时)时,该培养基不凝固。

[0048] 含有 1%(W/W)葡萄糖和 10%(W/W)还原脱脂奶粉的培养基可通过将 1%(W/W)葡萄糖和 10%(W/W)还原脱脂奶粉溶解在水中并灭菌溶液来制备。可通过例如在 80 至 122°C 下

热处理 40 至 5 分钟、优选在 85 至 95°C 下热处理 35 至 5 分钟来进行灭菌。

[0049] 细菌的细胞计数 (CFU) 可通过以下步骤来测量:在适当的琼脂培养基例如添加 BCP 的平板计数琼脂培养基(由 EIKEN CHEMICAL CO., LTD. 生产)上涂布适当稀释的细菌悬浮液以进行培养,并计算出现的菌落。

[0050] 培养基凝固与否可通过例如使用试管等进行培养来测定。具体地,当将含有培养基的试管倒置时,如果培养基不显示流动性,则判定培养基凝固,如果培养基显示流动性,则判定培养基未凝固。

[0051] 另外,不具有 PrtP 的乳酸乳球菌优选具有如下性质:当向含有 1%(W/W) 葡萄糖和 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基以每 1ml 培养基 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU 的量接种该细菌,以每 1ml 培养基 1.0×10^7 至 3.0×10^9 CFU、优选 1.0×10^7 至 5.0×10^7 CFU 的量接种双歧杆菌属细菌,将它们培养,并当所述培养基的 pH 变为 4.6 至 5.5 时将培养基从培养温度迅速冷却至 10°C,并在 10°C 下保存 2 周时,培养基中的溶解氧浓度保持在 2ppm 以下、优选 1ppm 以下、更优选 0.5ppm 以下。如果培养基中的溶解氧浓度高时,双歧杆菌属细菌很难生长。因此,当使用乳酸乳球菌与双歧杆菌属细菌一起来发酵乳原料时,乳酸乳球菌优选不使培养基中的溶解氧浓度增加的乳酸乳球菌。

[0052] 至 10°C 的迅速冷却期望优选在 1 小时以内、更优选在 30 分钟以内、特别优选在 10 分钟以内进行。培养温度优选 30 至 40°C、更优选 36 至 38°C、特别优选 37°C。以下描述中应同样适用。

[0053] 另外,在本发明的另一实施方案中,不具有 PrtP 的乳酸乳球菌优选具有如下性质:当向含有 1%(W/W) 葡萄糖和 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基以每 1ml 培养基 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU 的量接种该细菌,以每 1ml 培养基 1.0×10^7 至 3.0×10^9 CFU、优选 1.0×10^7 至 5.0×10^7 CFU 的量接种双歧杆菌属细菌,将它们培养,并当所述培养基的 pH 变为 4.6 至 5.5 时将培养基从培养温度迅速冷却至 10°C,并在 10°C 下保存 2 周时,双歧杆菌属细菌的存活率保持在 30% 以上、优选 50% 以上、更优选 80% 以上。存活率是指保存后的活细胞计数与保存开始时活细胞计数的比率。尽管乳酸乳球菌可独立地具备该性质和前述不使培养基中的溶解氧浓度增加的性质,但优选乳酸乳球菌具有两种性质。

[0054] 另外,在本发明的另一实施方案中,不具有 PrtP 的乳酸乳球菌优选具有如下性质:当向含有 1%(W/W) 葡萄糖和 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基以每 1ml 培养基 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU 的量接种该细菌,以每 1ml 培养基 1.0×10^7 至 3.0×10^9 CFU、优选 1.0×10^7 至 5.0×10^7 CFU 的量接种双歧杆菌属细菌,以每 1ml 培养基 2.0×10^5 至 9.0×10^7 CFU 的量各自接种嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种,将它们 37°C 下培养 4 至 24 小时(例如 8 小时)时,培养基凝固。

[0055] 尽管不具有 PrtP 的乳酸乳球菌不使含有还原脱脂奶粉的培养基凝固的事实意味着该细菌本身在培养基中不具有发酵能力,但当将该细菌与双歧杆菌属细菌在培养基中培养时,培养基中的溶解氧浓度降低,培养基凝固,即培养基的 pH 降低,以及发酵后双歧杆菌属细菌的存活率增加的事实意味着本发明的乳酸乳球菌适于从乳原料中生产含有双歧杆菌属细菌的发酵食品。因此,不具有 PrtP 的乳酸乳球菌,特别是其具有前述性质的菌株,适于作为用于生产含有双歧杆菌属细菌的发酵食品的起子。本发明的“用于发酵含有双歧杆菌属细菌的乳原料的起子”是指用于生产此类含有双歧杆菌属细菌的发酵食品的起子,即,

要与双歧杆菌属细菌一起接种至乳原料以生产发酵食品的细菌。

[0056] 用于本发明的乳酸乳球菌的具体实例包括乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL13 (FERM BP-11276)、乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL26 (FERM BP-11277) 和乳酸乳球菌乳脂亚种 LcC46 (FERM BP-11275)。

[0057] 作为布达佩斯条约规定下的国际保藏, 这些菌株在 2010 年 8 月 11 日保藏在独立行政法人, 国立先进产业科技研究所 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 国际专利生物保藏中心 (International Patent Organism Depository) (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan), 登录号分别在括号中提及。

[0058] 本发明的方法为发酵食品的生产方法, 所述方法包括使用不具有 PrtP 的乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌来发酵乳原料。

[0059] 双歧杆菌属细菌不特别限定, 实例包括长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)、两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)、短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*)、青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) 和婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*) (该物种被重新分类为长双歧杆菌婴儿亚种)。这些中, 优选长双歧杆菌。长双歧杆菌的具体实例包括长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株。该菌株可购自例如美国模式培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) (地址: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, United States of America)。

[0060] 乳原料不特别限定, 只要选择源自乳的材料即可, 可通过使用不具有 PrtP 的乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌、以及根据需要的另一种乳酸菌发酵来从所述乳中生产发酵食品。实例包括, 例如乳及其分离产物和加工产物, 如牛乳、脱脂乳、鲜奶油、黄油、全脂奶粉 (dry whole milk)、脱脂奶粉, 以及通过用水或在水中混合、溶解或悬浮前述材料所获得的那些。乳原料可以根据需要含有甜味剂如蔗糖、果胶、果实、果汁、琼脂、明胶、油脂 (fat or oil)、香料、着色剂、稳定剂和还原剂等。在发酵中, 乳原料可以在使用前以常规方式进行灭菌、均质化或冷却等。

[0061] 尽管要接种至乳原料的不具有 PrtP 的乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌的量不特别限定, 但优选以 10^4 至 10^8 CFU/ml 乳原料的量、更优选 10^6 至 10^7 CFU/ml 乳原料的量接种乳酸乳球菌, 优选以 10^5 至 10^9 CFU/ml 乳原料的量、更优选 10^7 至 10^8 CFU/ml 乳原料的量接种双歧杆菌属细菌。另外, 尽管不具有 PrtP 的乳酸乳球菌与双歧杆菌属细菌的接种量的比 (细菌计数比) 也不特别限定, 但优选 1000:1 至 1:10, 更优选 10:1 至 1:1。

[0062] 要接种至乳原料的不具有 PrtP 的乳酸乳球菌可由一种菌株, 或两种或更多种菌株构成。双歧杆菌属细菌也可由一种菌株, 或两种或更多种菌株构成。

[0063] 要接种至乳原料的乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌以及根据需要使用的另一乳酸菌优选预先在另一培养基中培养, 作为种子培养物 (seed culture) 或预培养物。尽管培养基不特别限定, 只要使用适于培养乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌以及根据需要使用的另一乳酸菌的培养基即可, 但实例包括例如含有还原脱脂奶粉的培养基。还原脱脂奶粉的浓度优选 3% (W/W) 以上、特别优选 8% (W/W) 以上。用于种子培养物或预培养物的培养基可含有生长促进物质如酵母提取物和还原剂如 L-半胱氨酸等。特别地, 由于双歧杆菌细菌在含有还原脱脂奶粉的培养基中显示低增殖, 因此可优选使用含有生长促进物质, 例如 0.1 至 1% (W/

W) 酵母提取物的培养基。培养基的灭菌条件与以上提及的那些相同。

[0064] 除不具有 PrtP 的乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌以外,可根据需要通过将另一乳酸菌添加至乳原料来进行发酵。另一乳酸菌不特别限定,只要使用可用于制造食品并且不抑制乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌的生长的乳酸菌即可。实例包括,以发酵食品为酸乳为例,例如嗜热链球菌和德式乳杆菌等。乳酸菌可由一种菌株构成,或可由两种或更多种菌株构成。

[0065] 当使用不具有 PrtP 的乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌来发酵乳时,培养物的 pH 通常约为 5,通常获得可饮用酸乳。如果通过进一步使用乳酸菌如嗜热链球菌或德式乳杆菌进行发酵,则 pH 会降低,可生产具有较强结构的酸乳(可用勺服用的酸乳)。

[0066] 尽管乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌的接种量与其它乳酸菌的接种量的比(细菌计数比)不特别限定,但优选 1000:1 至 10:1。

[0067] 乳酸乳球菌、双歧杆菌属细菌与其它乳酸菌向乳原料接种的顺序不特别限定,它们可同时接种。另外,这些细菌中的任一种或多种细菌可两次或多次接种。

[0068] 发酵条件如培养温度和培养时间可与通常由乳原料制造发酵食品所使用的发酵条件相同。例如,培养温度优选 30 至 40℃,更优选 36 至 38℃。培养时间可根据要生产的发酵食品的类型而适当地确定,通常优选 3 至 18 个小时。

[0069] 所获得的发酵食品可适当地像由乳原料获得的常规发酵食品一样加工。例如,发酵食品本身在发酵后可用作食品,或者可将其均质化并液化。此外,可添加甜味剂如蔗糖、果胶、果实、果汁、琼脂、明胶、油脂、香料、着色剂、稳定剂和还原剂等。根据需要可将发酵食品装入容器中。

[0070] 如上所述生产的发酵食品显示较低的由蛋白质分解所产生的苦味和鲜味,并且其显示优异的双歧杆菌属细菌的保存存活性。

[0071] 实施例

[0072] 下文中,还将参考试验例和实施例更具体地说明本发明。

[0073] 试验例 1:乳酸乳球菌菌株的获得

[0074] 为了从自然界获得不具有 PrtP 酶的乳酸乳球菌的菌株,使用厌氧菌用稀释液将从日本自然界所采集的样品稀释(Mitsuoka T.,“World of Enteric Bacteria”, Soubunsha, 第 322 页,1980),将稀释样品涂布至具有以下组成的布里格斯肝肉汤(Briggs liver broth)(含有 15g/L 琼脂,出处同上,第 319 页)的平板上,并在厌氧条件、30℃下进行培养。

[0075] [厌氧菌用稀释液]

[0076]

盐溶液I (0.78%K ₂ HPO ₄ 溶液)	37.5ml
盐溶液II (含有0.47%KH ₂ PO ₄ 、 1.18%NaCl、1.20%(NH ₄) ₂ SO ₄ 、 0.12%CaCl ₂ 和0.25% MgSO ₄ ·H ₂ O的溶液)	37.5 ml
刃天青 (0.1%水溶液)	1 ml
L-半胱氨酸HCl·H ₂ O	0.5 g
L-抗坏血酸(25%水溶液)	2 ml
[0077]	
Na ₂ CO ₃ (8%溶液)	50 ml
琼脂	0.5 g
纯水	860 ml
[布里格斯肝肉汤]	
番茄汁渗出液	400 ml
新胨蛋白胨(Neopeptone) (Difco)	15 g
酵母提取物(Difco)	6 g
肝提取物	75 ml
葡萄糖	20 g
可溶性淀粉	0.5 g
NaCl	5 g
吐温(Tween)80	1 g
L-半胱氨酸HCl·H ₂ O	0.2 g
纯水	525 ml
pH 6.8	

[0078] 然后,从所获得的菌落中筛选显示链球菌形态并且基于涂片的显微镜观察测定为革兰氏阳性菌的细菌。将这些细菌在具有以下组成的BL琼脂培养基上划线,并与与上述相同的方式重复厌氧培养,从而获得纯分离菌株。

[0079] [BL琼脂培养基]

[0080]

Lab-Lemco浸粉(Oxoid)	2.4 g
豚蛋白胨(Proteose peptone)3号 (Difco)	10 g
胰酶解酪蛋白 (BBL)	5 g
植胨(Phytone)	3 g
酵母提取物(Difco)	5 g
肝提取物	150 ml
葡萄糖	10 g
[0081]	
可溶性淀粉	0.5 g
溶液A	10 ml
东丽硅酮(Toray silicone) SH5535 (10%溶液)	5 ml
吐温80	1 g
琼脂	15 g
L-半胱氨酸HCl·H ₂ O	0.5 g
马血	50 ml
pH 7.2	

[0082] 肝提取物：在 50 至 60℃ 下的温水浴上用 170ml 纯水提取肝浸粉 (10g, Kyokuto) 约 1 小时，然后在 100℃ 下加热提取物几分钟，调整至 pH7.2，并通过滤纸过滤。

[0083] 溶液 A：将 15g MgSO₄ · 7H₂O、0.5g FeSO₄ · 7H₂O、0.5g NaCl 和 0.337g MnSO₄ 溶解在 250ml 纯水中。

[0084] 在水浴上将除 L-半胱氨酸和马血以外的成分溶解，调整溶液的 pH，在 115℃ 下使溶液进行灭菌 20 分钟，然后冷却至 50℃，将 L-半胱氨酸和马血添加到溶液，并将混合物注入培养皿 (Petri dish)，从而获得平板培养基。

[0085] 以常规方式测定这些菌株的基因组 DNA 的核苷酸序列。在 NCBI (美国国立生物技术信息中心, National Center for Biotechnology Information) 的国际核酸序列数据库 (international nucleotide sequence database, GenBank) 中通过使用 BLAST (基础局部比对检索工具 Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对 16S 核糖体 RNA 基因序列的全长进行同源性检索 (homology search)，结果，对于各型菌株鉴定出 280 株显示 98% 以上同源性的乳球菌属细菌的菌株。在 242 株相对于乳酸乳球菌显示 98% 以上同源性的菌株中，将同化乳糖并显示与乳酸乳球菌亚种模式株 (type strain) 中的乳酸乳球菌亚种同源性最高的组的菌株鉴定为乳酸乳球菌亚种。另外，将显示与乳酸乳球菌亚种模式株中的乳酸乳球菌乳脂亚种同源性最高的组的菌株鉴定为乳酸乳球菌乳脂亚种。所有获得的菌株为无芽孢和非移动性 (non-motile) 兼性

厌氧革兰氏阳性球菌,并且对于过氧化氢酶和生成气体为阴性。

[0086] 然后,证实所获得的乳酸乳球菌菌株是否具有 PrtP 酶。具体地,用铂环(platinum loop)将各菌株在 BL 琼脂培养基上的菌落接种至含有乳糖和葡萄糖各 0.5% 的 Difco(注册商标)M17Broth(由 Becton, Dickinson and Company 生产),并在 30℃ 下培养 16 小时。将所获得的培养肉汤(culture broth)以 3% 的浓度接种至相同的培养基,并在 30℃ 下进行培养 16 小时。通过离心获得细胞,通过使用 DNeasy 血液和组织试剂盒(DNeasy Blood and Tissue Kit,由 QIAGEN K. K. 生产)提取 DNA,通过 PCR 证实 PrtP 基因是否包含在 DNA 中。

[0087] 根据 Journal of Applied Microbiology, 2006, 第 100 卷,第 1307-1317 页中记载的方法进行 PCR。作为引物,使用正向引物 GBf(GCAAATACGGTGACGGCTGCCA, SEQ ID NO:1)和反向引物 GB2r(TGAGCATTATAATAGGTCTTCTCC, SEQ ID NO:2)的引物组,或正向引物 GHf(CAAATACGGTGACGGCTGCTAA, SEQ ID NO:3)和反向引物 GH2r(TAGCATTATAATAGGTCTTCGTCA, SEQ ID NO:4)的引物组。结果,证实 242 株乳酸乳球菌中的 128 株具有 PrtP 基因。另一方面,发现剩余的 114 株菌株不具有 PrtP 基因。

[0088] 试验例 2:乳性培养基中乳酸乳球菌菌株的发酵能力试验

[0089] 将试验例 1 中获得的菌株和表 1 中提及的菌株的各培养肉汤以 3% 的浓度接种至含有乳糖和葡萄糖各 0.5% 的 Difco(注册商标)M17 Broth(由 Becton, Dickinson and Company 生产),并在 30℃ 下培养 16 小时。通过离心收集细胞、洗涤、然后在与原始培养基相同体积的乳性培养基(1%(W/W)葡萄糖、10%(W/W)还原脱脂奶粉(由 Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)生产)中悬浮,从而获得种子培养物。NBRC12007 和 NBRC100676 菌株可从独立行政法人,国立技术与评价研究所(2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japan)获得。另外, JCM20101 菌株可从独立行政法人,物理化学研究所微生物日本保藏中心(Japan Collection of Microorganisms, JCM)(2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama-ken, 351-0198, Japan)获得。ATCC 9625 菌株可从美国模式培养物保藏中心(地址:12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, United States of America)获得。

[0090] 然后,将各前述菌株的种子培养物以每 1ml 培养基 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU 的量接种至具有与上述相同组成的乳性培养基(95℃ 下灭菌 30 分钟),并在 37℃ 下进行培养 16 小时。将所获得的培养肉汤迅速冷却至 10℃,观察或测量凝固状态、pH 和所含乳酸菌的数量。在商购可得的添加 BCP 的平板计数琼脂平板(由 EIKEN CHEMICAL CO., LTD. 生产)上测量乳酸菌的数量。结果示于表 1。在该表中,“E+N”是指“ $\times 10^n$ ”。

[0091] 表 1

菌株	菌株	PrtP	细胞计数 (CFU/g)	pH	凝固
[0092] 乳酸乳球菌乳酸亚种 (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	JCM20101	+	1.1E+09	4.65	+
	NBRC 12007	-	3.0E+07	5.92	-
	JCM 20128	-	4.4E+07	5.81	-
	LcL 13	-	3.1E+08	5.75	-
	LcL 26	-	1.8E+08	5.72	-
	LcL 49	-	1.0E+08	5.59	-
乳酸乳球菌乳脂亚种 (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>)	NBRC 100676	+	3.5E+08	4.78	+
	ATCC 9625	-	4.2E+07	5.66	-
	LcC 46	-	2.8E+08	5.41	-
	LcC 53	-	3.1E+08	5.48	-

[0093] 如 Yonezawa S. 等, J. Dairy Sci., 2010, 93:1815-23 中所记载的, 不具有 PrtP 的乳酸乳球菌亚种菌株不使乳性培养基凝固。

[0094] 试验例 3: 不具有 PrtP 的乳酸乳球菌和双歧杆菌属细菌的混合培养试验

[0095] 首先, 基于每 1ml 含有 0.6% (W/W) 酵母提取物和 11% (W/W) 还原脱脂奶粉的培养基以 1.0×10^6 至 5.0×10^7 CFU 的量将长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株接种至培养基, 并在 37°C 下培养 16 小时, 从而获得种子培养物。

[0096] 另外, 将试验例 1 中获得的乳酸乳球菌各菌株的培养基以 3% 的量接种至含有乳糖和葡萄糖各 0.5% 的 Difco (注册商标) M17 Broth (由 Becton, Dickinson and Company 生产), 并在 30°C 下进行培养 16 小时。通过离心收集各菌株的培养细胞, 洗涤, 并在与原始培养基相同体积的、具有与上述相同组成的乳性培养基中悬浮, 从而获得种子培养物。

[0097] 向具有与上述相同组成的乳性培养基 (90°C 下灭菌 10 分钟), 分别以每 1ml 培养基 5.0×10^6 至 2.0×10^8 CFU 和 1.0×10^7 至 5.0×10^7 CFU 的量接种乳酸乳球菌各菌株和长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株的种子培养物, 并在 37°C 下培养 16 小时, 从而获得发酵乳。

[0098] 将所获得的发酵乳迅速冷却至 10°C, 测量 pH、所含双歧杆菌的数量以及溶解氧。在 TOS 丙酸盐琼脂培养基 (由 Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd. 生产) 平板上测量双歧杆菌的数量。另外, 在将发酵乳的温度保持在 10°C 的情况下, 使用荧光式氧分析仪 FO-960S (由 ASR 生产) 测量溶解氧。测量结果示于表 2。

[0099] 表 2

[0100]

菌株	菌株	PrpP	双歧杆菌数量 (CFU/g)		双歧杆菌 的存活率 (%)	pH		溶解氧浓度 (ppm)	
			培养结束 后的即刻	两周后		培养结束 后的即刻	培养结束 后的即刻	两周后	
乳酸乳球菌 乳酸亚种 (<i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	JCM20101	+	2.4E+08	1.3E+08	54.2	4.93	0.5以下	1.67	
	NBRC 12007	-	7.0E+06	ND	-	5.59	0.5以下	5.53	
	JCM 20128	-	1.7E+07	ND	-	5.57	0.5以下	6.68	
	LcL 13	-	5.30E+07	2.90E+07	54.7	4.90	0.5以下	0.5以下	
	LcL 26	-	1.43E+08	9.80E+07	68.7	4.86	0.5以下	0.5以下	
	LcL 49	-	1.8E+08	1.4E+08	77.6	5.00	0.5以下	0.87	
乳酸乳球菌 乳脂亚种 (<i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>)	NBRC 100676	+	2.8E+08	1.8E+08	64.3	4.98	0.5以下	1.88	
	ATCC 9625	-	1.5E+07	ND	-	5.59	0.5以下	6.80	
	FERM BP-6224	-	6.3E+07	8.4E+06	13.3	5.12	0.5以下	5.24	
	LcC 46	-	1.28E+08	1.14E+08	89.0	4.88	0.5以下	1.27	
	LcC 53	-	4.93E+07	4.70E+07	95.3	4.98	0.5以下	1.77	

[0101] ND: 低于检测极限

[0102] 存在不具有 PrpP, 但与具有 PrpP 的菌株 (JCM20101, NBRC100676) 类似地使双歧杆菌存活的菌株。在这些菌株保存两周后所观察到的发酵乳中的溶解氧浓度为 2.0 ppm 以下。

[0103] 试验例 4

[0104] 由于大部分试验例 3 中获得的含有双歧杆菌的发酵乳显示约 5 的 pH, 它们为可饮用酸乳的形式。为了生产具有较强结构的发酵乳 (可用勺服用的普通酸乳), 以与试验例 3 相同的方式来发酵乳性培养基, 但还向培养基加入嗜热链球菌和德式乳杆菌保加利亚亚种。

[0105] 与试验例 3 一样, 将乳酸乳球菌各菌株和长双歧杆菌 ATCCBAA-999 菌株的种子培养物以与试验例 3 中所使用的相同的接种量接种至含有 1% (W/W) 葡萄糖和 10% (W/W) 还原脱脂奶粉的乳性培养基, 进一步将含有嗜热链球菌和德式乳杆菌保加利亚亚种的酸乳起子 (由 Danisco 生产) 以嗜热链球菌和德式乳杆菌保加利亚亚种分别为每 1ml 培养基 2.0×10^6 CFU 和 2.0×10^5 CFU 的量添加到乳性培养基, 并在 37°C 下培养 8 小时, 从而获得发酵乳。将发酵乳迅速冷却至 10°C, 并测量或观察 pH 和凝固状态。结果示于表 3。

[0106] 表 3

[0107]

菌株	菌株	PrtP	pH	凝固
无乳球菌属细菌	无乳球菌属细菌		4.87	+
乳酸乳球菌乳酸亚种 (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	JCM20101	+	4.87	+
	LcL 13	-	4.86	+
	LcL 26	-	4.85	+
	LcL 49	-	5.47	-
乳酸乳球菌乳脂亚种 (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>)	NBRC 100676T	+	4.88	+
	LcC 46	-	4.84	+
	LcC 53	-	5.58	-

[0108] 尽管普通发酵乳可在不含乳酸乳球菌的体系和含有具有 PrtP 的菌株的体系中生产,但用乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL49 和乳酸乳球菌乳脂亚种 LcC53 生产的发酵乳中 pH 不降低,并且它们不凝固。

[0109] 试验例 5:发酵乳的评价

[0110] 通过下述实施例 3 中所述的方法来生产发酵乳(酸乳),通过五名受试者(panelist)以 10 个级别评价鲜味和苦味。得分越高表示味道越强。超过 5 的得分表示发酵乳具有过强的发酵乳味道。结果示于图 1。

[0111] 结果,使用具有 PrtP 的菌株所生产的发酵乳感觉到强鲜味和苦味,但对于使用不具有 PrtP 的菌株所生产的发酵乳,几乎未感觉到鲜味和苦味,并且不影响发酵乳的原始风味。

[0112] 实施例 1:使用乳酸乳球菌乳酸亚种生产可饮用酸乳

[0113] 向 1000mL 含有 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基(90℃下灭菌 30 分钟)接种 30mL 乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL26 菌株的种子培养物,并在 25℃下进行培养 16 小时。另外,向 1000mL 含有 0.2%(W/W) 酵母提取物和 11%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基(90℃下灭菌 30 分钟)接种 100mL 长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株的种子培养物,并在 37℃下进行培养 4 小时。

[0114] 通过将 1.0×10^6 至 5.0×10^7 CFU 的长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株接种至含有 0.6%(W/W) 酵母提取物和 11%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基并在 37℃下进行培养 16 小时来获得长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株的种子培养物。

[0115] 分别地,将作为原料的脱脂奶粉、全脂奶粉、蔗糖和果胶混合并溶解,从而制备 50L 含有 0.5%(W/W) 乳脂、8.0%(W/W) 无脂乳固成分、8.0%(W/W) 蔗糖和 0.2%(W/W) 果胶的乳原料,并在 90℃下将所获得的乳原料灭菌 10 分钟,并冷却至 40℃。向该灭菌的乳原料接种如上所述进行了预培养的乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL26 菌株的 500mL 培养物和长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株的 500mL 培养物,并在 37℃下进行培养 16 小时,从而获得发酵乳。

[0116] 将所获得的发酵乳在 15MPa 的压力下均质化,装入 200mL 体积的玻璃容器中,冷却直至发酵乳的温度变为 10℃,并密封,从而获得可饮用酸乳。所获得的可饮用酸乳显示 0.64% 的乳酸酸度和 4.9 的 pH,并包含 1.6×10^8 CFU/ml 双歧杆菌。在 10℃下保存 14 天后,该可饮用酸乳包含 1.1×10^8 CFU/ml 双歧杆菌,其存活率为 68%。另外,此时的溶解氧浓度为 0.93ppm。

[0117] 实施例 2:使用乳酸乳球菌乳脂亚种生产可饮用酸乳

[0118] 向 1000mL 含有 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基(90℃下灭菌 30 分钟)接种 30mL

乳酸乳球菌乳脂亚种 LcC46 菌株的种子培养物,并在 25℃ 下进行培养 16 小时。另外,向 1000mL 含有 0.2%(W/W) 酵母提取物和 11%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基 (90℃ 下灭菌 30 分钟) 接种 100mL 长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株的种子培养物,并在 37℃ 下进行培养 4 小时。

[0119] 通过将 1.0×10^6 至 5.0×10^7 CFU 的长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株接种至含有 0.6%(W/W) 酵母提取物和 11%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基并在 37℃ 下进行培养 16 小时来获得长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株的种子培养物。

[0120] 分别地,将作为原料的脱脂奶粉、全脂奶粉、蔗糖和果胶混合并溶解,从而制备 50L 含有 0.5%(W/W) 乳脂、8.0%(W/W) 无脂乳固成分、8.0%(W/W) 蔗糖和 0.2%(W/W) 果胶的乳原料,并在 90℃ 下将所获得的乳原料灭菌 10 分钟,并冷却至 40℃。向该灭菌的乳原料接种如上所述进行了预培养的乳酸乳球菌乳脂亚种 LcC46 菌株的 500mL 培养物和长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株的 500mL 培养物,并在 37℃ 下进行培养 16 小时,从而获得发酵乳。

[0121] 将所获得的发酵乳在 15MPa 的压力下均质化,装入 200mL 体积的玻璃容器中,冷却直至发酵乳的温度变为 10℃,并密封,从而获得可饮用酸乳。所获得的可饮用酸乳显示 0.66% 的乳酸酸度和 4.8 的 pH,并包含 9.6×10^7 CFU/ml 双歧杆菌。在 10℃ 下保存 14 天后,该可饮用酸乳包含 6.9×10^7 CFU/ml 双歧杆菌,其存活率为 71%。另外,此时的溶解氧浓度为 0.88ppm。

[0122] 实施例 3:使用乳酸乳球菌乳酸亚种生产酸乳 (I)

[0123] 向 1000mL 含有 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基 (115℃ 下灭菌 20 分钟) 接种 30mL 德式乳杆菌乳酸亚种 FERM BP-10758 菌株的种子培养物,并在 37℃ 下进行培养 16 小时。另外,向 1000mL 含有 0.1%(W/W) 酵母提取物和 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基 (90℃ 下灭菌 30 分钟) 接种 30mL 嗜热链球菌 FERM P-17216 菌株的种子培养物,并在 37℃ 下进行培养 5 小时。

[0124] 通过将 1.0×10^5 至 1.0×10^7 CFU 的菌株接种至含有 0.1%(W/W) 酵母提取物和 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基来获得德式乳杆菌乳酸亚种 FERM BP-10758 菌株的种子培养物,并在 37℃ 下进行培养 16 小时。

[0125] 通过将 1.0×10^5 至 1.0×10^7 CFU 的菌株接种至含有 0.1%(W/W) 酵母提取物和 10%(W/W) 还原脱脂奶粉的培养基来获得嗜热链球菌 FERM P-17216 菌株的种子培养物,并在 37℃ 下进行培养 16 小时。

[0126] 将由脱脂奶粉、奶油和乳蛋白等构成的原料混合并溶解,从而制备 50L 含有 3.0%(W/W) 乳脂和 12.0%(W/W) 无脂乳固成分的乳原料,并使所获得的乳原料升温至 70℃,在 15MPa 的压力下均质化,在 90℃ 下灭菌 10 分钟,并冷却至 40℃。

[0127] 向该灭菌的乳原料接种如上所述进行了预培养的 50mL 德式乳杆菌乳酸亚种 FERM BP-10758 菌株的培养物和 450mL 嗜热链球菌 FERM P-17216 菌株的培养物,以及以与实施例 1 中用于 LcL26 菌株的相同的方式进行预培养所获得的乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL13 菌株的 500mL 培养物和长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株的 500mL 培养物,并在 37℃ 下进行培养 4 小时,从而获得发酵乳。将所获得的发酵乳立即搅拌并冷却直至发酵乳的温度变为 10℃,然后装入 100mL 体积的纸杯容器中,并密封,从而获得酸乳。

[0128] 所获得的酸乳显示 0.74% 的乳酸酸度和 4.69 的 pH,并包含 1.0×10^8 CFU/ml 双歧

杆菌。在 10℃ 下保存 14 天后,该酸乳包含 9.3×10^7 CFU/ml 双歧杆菌,其存活率为 93%。另外,此时的溶解氧浓度为 0.5ppm 以下。

[0129] 实施例 4:使用乳酸乳球菌乳酸亚种生产酸乳 (II)

[0130] 将脱脂奶粉、奶油和乳蛋白混合并溶解,从而制备 50L 含有 3.0%(W/W) 乳脂和 12.0%(W/W) 无脂乳固成分的乳原料,并使所获得的乳原料升温至 70℃,在 15MPa 的压力下均质化,在 90℃ 下灭菌 10 分钟,并冷却至 40℃。

[0131] 向该灭菌的乳原料接种以与实施例 1 相同的方式所获得的 500mL 乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL26 菌株的培养物和 500mL 长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株的培养物,以及包含嗜热链球菌和德式乳杆菌保加利亚亚种的 0.002% 酸乳起子(由 Danisco 生产),并在 37℃ 下进行培养 8 小时,从而获得发酵乳。将所获得的发酵乳立即搅拌并冷却直至发酵乳的温度变为 10℃,然后装入 100mL 体积的纸杯容器中,并密封,从而获得酸乳。

[0132] 所获得的酸乳显示 0.65% 的乳酸酸度和 4.84 的 pH,并包含 1.2×10^8 CFU/ml 双歧杆菌。在 10℃ 下保存 14 天后,该酸乳包含 1.0×10^8 CFU/ml 双歧杆菌,其存活率为 83%。另外,此时的溶解氧浓度为 0.5ppm。

[0133] 实施例 5:使用乳酸乳球菌乳酸亚种生产酸乳 (III)

[0134] 将脱脂奶粉、奶油和乳蛋白混合并溶解,从而制备 50L 含有 3.0%(W/W) 乳脂和 12.0%(W/W) 无脂乳固成分的乳原料,并使所获得的乳原料升温至 70℃,在 15MPa 的压力下均质化,在 90℃ 下灭菌 10 分钟,并冷却至 40℃。

[0135] 向该灭菌的乳原料接种以与实施例 1 相同的方式所获得的 500mL 乳酸乳球菌乳酸亚种 LcL26 菌株的培养物、 1.5×10^{14} CFU(菌落形成单位)长双歧杆菌 ATCC BAA-999 菌株的冷冻细胞(由 Morinaga Milk Industry Co., Ltd. 生产)和包含嗜热链球菌和德式乳杆菌保加利亚亚种的 0.002% 酸乳起子(由 Danisco 生产),并在 37℃ 下进行培养 4 小时,从而获得发酵乳。将所获得的发酵乳立即搅拌并冷却直至发酵乳的温度变为 10℃,然后装入 100mL 体积的纸杯容器中,并密封,从而获得酸乳。

[0136] 所获得的酸乳显示 0.70% 的乳酸酸度和 4.74 的 pH,并包含 4.2×10^9 CFU/ml 双歧杆菌。在 10℃ 下保存 14 天后,该酸乳包含 2.0×10^9 CFU/ml 双歧杆菌,其存活率为 47.6%。另外,此时的溶解氧浓度为 1.47ppm。

[0137] 产业上的可利用性

[0138] 根据本发明的发酵食品的生产方法,可有效生产含有大量双歧杆菌属细菌、特别是长双歧杆菌的发酵食品。另外,通过本发明的发酵食品的生产方法所生产的发酵食品当然对于健康保健是有用的,并且为显示优异风味的优选发酵食品。

[0139] 另外,本发明的用于发酵含有双歧杆菌属细菌的乳原料的起子可用于发酵食品的生产。

[0001]

序列表

<I10> 森永乳业株式会社

<I20> 含有双歧杆菌属细菌的发酵食品的生产方法

<I30> FP218-11174

<I50> JP2010-194521

<I51> 2010-08-31

<I60> 4

<I70> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 GBf

<400> 1

gcaaatacgg tgacggetgc ga

22

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 GB2r

<400> 2

tgagcattat aataggtctt ctcc

25

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 引物 GHf

<400> 3

caaatacggg gacggctgct aa

22

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 GH2r

<400> 4

tagcattata ataggtcttc gtca

24

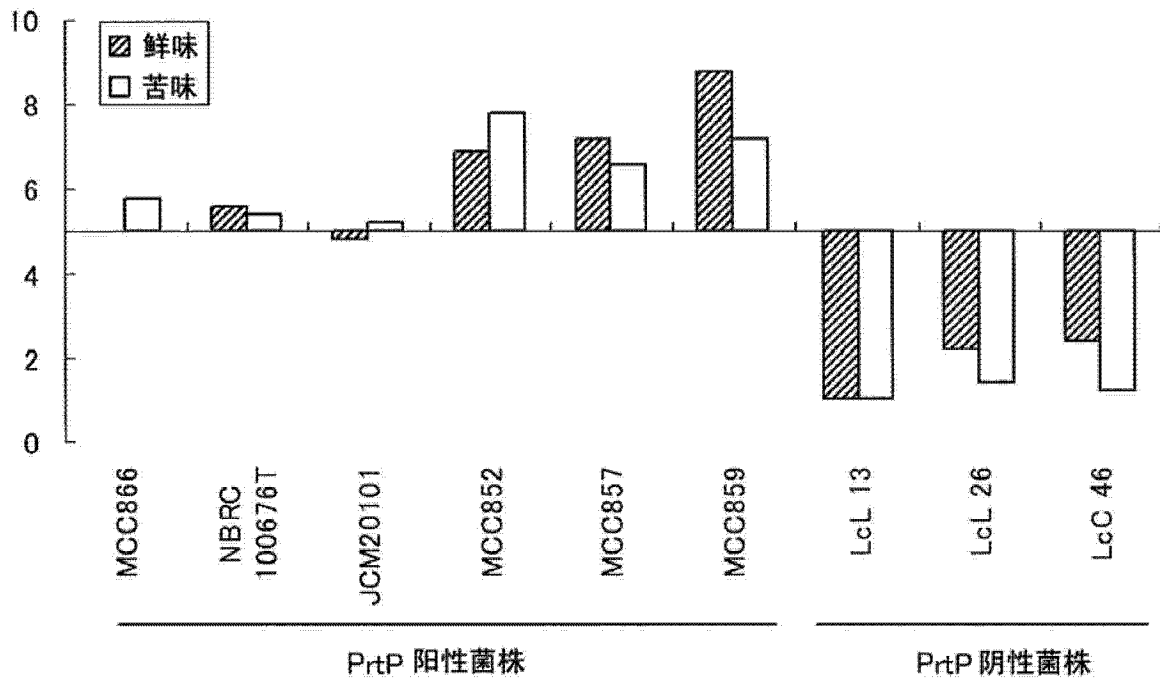


图 1