



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114847358 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 05

(21) 申请号 202210672636.5

(22) 申请日 2014.01.13

(30) 优先权数据

61/751,818 2013.01.11 US

(62) 分案原申请数据

201480014349.9 2014.01.13

(71) 申请人 非凡食品有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 西莱斯特·霍尔茨-席廷格尔

休·克莱普霍尔茨

兰亚尼·瓦拉丹 蒙特·卡西诺

帕特里克·奥赖利·布朗

迈克尔·艾森 艾丽西亚·科恩

让·普雷福特

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司  
11287

专利代理师 沈锦华

(51) Int. Cl.

A23C 20/02 (2021.01)

A23J 3/16 (2006.01)

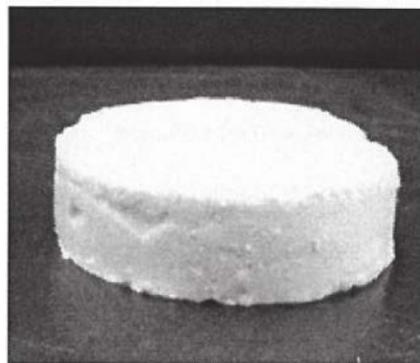
权利要求书2页 说明书69页 附图14页

(54) 发明名称

包含凝聚物的非乳制干酪仿品

(57) 摘要

本申请涉及包含凝聚物的非乳制干酪仿品。本文提供用于生产干酪仿品的方法和组合物。一般来说,所述干酪仿品通过诱使非乳制奶的酶促凝结而生产。



1. 一种非乳制干酪仿品,其包含一或多种经分离和提纯的来自非动物源的蛋白质和一或多种经分离的植物源脂质的凝固混合物,

其中所述干酪仿品包括选自由以下组成的群组的一种或多种微生物:戊糖小球菌、丁酸梭菌、德氏乳杆菌乳酸亚种、德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、木糖葡萄球菌和亚麻短杆菌,

其中所述干酪仿品包括熔融盐、二价阳离子或经分离的酶中的一种或多种,且

其中所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、熔融盐、二价阳离子、经分离的酶、植物源的脂质或其组合的相应干酪仿品,具有以下中的一者或两者:改良的熔融特征和增加的拉伸能力。

2. 根据权利要求1所述的非乳制干酪仿品,其中所述仿品进一步包含一或多种选自由以下组成的群组的微生物:罗克福尔青霉、汉逊德巴利酵母、白地霉、白青霉、棒状杆菌属、嗜热链球菌、沙门柏干酪青霉、纳地青霉、蜡蚧轮枝菌、乳酸克鲁维酵母、酿酒酵母、产朊假丝酵母、英佛红冬孢酵母、棒状杆菌属、微球菌属、乳杆菌属、乳球菌属、乳酸乳球菌乳酸亚种LLL、肠膜明串珠菌乳脂亚种LM、乳酸乳球菌乳脂亚种LLC、葡萄球菌属、盐单胞菌属、短杆菌属、嗜冷杆菌属、明串珠菌属、小球菌属、肠膜明串珠菌、乳酸乳球菌丁二酮变种LLBD和丙酸杆菌属。

3. 根据权利要求1或2所述的非乳制干酪仿品,其中所述仿品包含LLL、LLC和LLBD中的两者或包含SX和TA61。

4. 根据权利要求1到3中任一权利要求所述的非乳制干酪仿品,其中所述一或多种来自非动物源的蛋白质为植物蛋白质。

5. 根据权利要求4所述的非乳制干酪仿品,其中所述植物蛋白选自由以下组成的群组:种子贮藏蛋白和油体蛋白质。

6. 根据权利要求5所述的非乳制干酪仿品,其中所述种子贮藏蛋白是白蛋白、大豆球蛋白、伴大豆球蛋白、球蛋白、豆球蛋白、豌豆球蛋白、伴白蛋白、麦醇溶蛋白、谷蛋白、麦谷蛋白、大麦醇溶蛋白、醇溶谷蛋白、菜豆球蛋白、蛋白质体、黑麦醇溶蛋白、小麦麸质或玉米蛋白。

7. 根据权利要求5所述的非乳制干酪仿品,其中所述油体蛋白质是油体蛋白、油体钙蛋白或油体固醇蛋白。

8. 根据权利要求4所述的非乳制干酪仿品,其中所述植物蛋白选自由以下组成的群组:核糖体蛋白、肌动蛋白、己糖激酶、乳酸脱氢酶、果糖二磷酸醛缩酶、磷酸果糖激酶、丙糖磷酸异构酶、磷酸甘油酸激酶、磷酸甘油酸变位酶、烯醇酶、丙酮酸激酶、蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、糖蛋白、凝集素、粘蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、丙酮酸脱羧酶、肌动蛋白、翻译延长因子、组蛋白、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶加氧酶(rubisco)、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶加氧酶活化酶(rubisco活化酶)、胶原蛋白、高粱醇溶蛋白、燕麦蛋白、脱水蛋白、亲水蛋白和天然未折叠蛋白。

9. 根据权利要求1到8中任一权利要求所述的非乳制干酪仿品,其中所述仿品进一步包含一或多种糖。

10. 根据权利要求1所述的非乳制干酪仿品,其中所述经分离的酶是脂肪酶、蛋白酶和/或淀粉酶。

11. 根据权利要求1所述的非乳制干酪仿品,其中所述熔融盐是柠檬酸钠、焦磷酸三钠、六偏磷酸钠、磷酸二钠或其任何组合。

12. 根据权利要求1所述的非乳制干酪仿品,其中所述二价阳离子是 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 或 $\text{Ca}^{2+}$ 。

13. 根据权利要求1到12中任一权利要求所述的非乳制干酪仿品,其进一步包含经分离的氨基酸或选自由以下组成的群组的其它添加剂:食物产品、酵母提取物、味噌、糖蜜、核碱基、有机酸、维生素、水果提取物、椰子奶和麦芽提取物。

14. 根据权利要求13所述的非乳制干酪仿品,其中所述经分离的氨基酸是甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸或丙氨酸。

15. 根据权利要求1到14中任一权利要求所述的非乳制干酪仿品,其中所述非乳制干酪仿品包含一或多种植物来源的脂质、一或多来源于藻类、真菌或细菌的油或一或多种游离脂肪酸。

16. 根据权利要求15所述的非乳制干酪仿品,其中所述一或多种植物来源的脂质包含玉米油、橄榄油、大豆油、花生油、胡桃油、杏仁油、芝麻油、棉籽油、芥花油、红花油、葵花油、亚麻籽油、棕榈油、棕榈仁油、棕榈果油、椰子油、巴巴苏油、牛油树脂、芒果脂、可可脂、小麦胚芽油或米糠油。

17. 根据权利要求1到16中任一权利要求所述的非乳制干酪仿品,其中所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、熔融盐、二价阳离子、经分离的酶、植物源的脂质或其组合的相应干酪仿品,具有甲硫基丙醛和/或二甲基三硫的增加。

18. 根据权利要求1到17中任一权利要求所述的非乳制干酪仿品,其中所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、熔融盐、二价阳离子、经分离的酶、植物源的脂质或其组合的相应干酪仿品,具有以下中的一或多者的增加:丁酸、丙酸、己酸、辛酸或癸酸。

19. 根据权利要求1到18中任一权利要求所述的非乳制干酪仿品,其中所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、熔融盐、二价阳离子、经分离的酶、植物源的脂质或其组合的相应干酪仿品,具有以下中的一或多者的增加:2-庚酮、2-十一烷酮、2-壬酮、2-丁酮、2-甲基丙酸、2-甲基丁酸或3-甲基丁酸。

20. 根据权利要求1到19中任一权利要求所述的非乳制干酪仿品,其中所述改良的熔融性以加热时减少的粒化、增加的粘度和增加的表面积膨胀为表征。

## 包含凝聚物的非乳制干酪仿品

[0001] 本申请是申请日为2014年1月13日、申请号为201480014349.9、发明名称为“包含凝聚物的非乳制干酪仿品”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请案的交叉引用

[0003] 本申请案要求2013年1月11日提交的美国申请案第61/751,818号的优先权,并且与2012年7月12日提交的共同未决的申请案第PCT/US12/46552号相关,其全部以引用的方式并入本文中。

### 技术领域

[0004] 本申请涉及包含凝聚物的非乳制干酪仿品。

### 背景技术

[0005] 干酪制作依赖乳制奶作为主要成份已经超过4000年。乳酪通常由乳制奶形成的凝乳制成。可以通过使乳制奶在弱酸性pH下与凝乳酶(一种分解κ-酪蛋白的天冬氨酸蛋白酶)接触来容易地使乳制奶形成适用于制作干酪的凝乳。一些干酪(例如奶油干酪、村舍式干酪(cottage cheese)和印度奶酪(paneer))在不含凝乳酶的情况下制作。在不存在凝乳酶的情况下,可以用酸(例如柠檬汁、醋等)或热与酸的组合来诱使乳酪凝结。酸性凝结还可以由发酵剂培养物发酵作用自然地发生。凝乳的强度取决于凝结的类型。大部分商业上生产的干酪在其生产中使用一些类型的凝乳酶(动物、植物或微生物来源的)。商品干酪或“经加工的干酪”,例如大块切达干酪、食品供应马苏里拉干酪批萨和“干酪产品”或“干酪食品”,例如美国干酪(American cheese)、美国单干酪(American singles)、味维他(Velveeta)和干酪神器(Cheese Whiz)典型地使用有时有点类似传统干酪制作的工业工艺由乳品来源的成分和其它添加剂生产。

[0006] 据估算,全球乳品业为全球人为温室气体总排放贡献4%。生产1kg切达干酪(cheddar cheese)需要平均10,000L淡水。另外,许多个体无法消化和代谢乳糖。在这些个体中,肠道细菌使乳糖发酵,导致各种腹部症状,所述腹部症状可以包括腹痛、腹胀、肠胃气胀、腹泻、恶心和反酸。另外,乳糖和其发酵产物的存在使结肠内容物的渗透压升高。据报道,在美国3.4%的儿童对乳制奶过敏。许多个体出于道德或宗教原因而选择避食奶类。

[0007] 非乳制奶(包括植物来源的奶)避免许多与乳制奶相关的环境、食品敏感性、道德和宗教问题,并且其可以被制作成不含乳糖,使得使用植物来源的奶来生成乳品替代物具有吸引力。然而,凝乳酶并非诱使非乳蛋白或乳液(包括植物来源的奶,例如杏仁奶、栗子奶、长山核桃奶、榛子奶、腰果奶、松仁奶或胡桃奶)凝结的有效试剂。因此,传统的干酪制作技术尚未成功地用以生产非乳干酪仿品。

[0008] 乳酪中的风味和气味部分源于通过催熟剂进行的乳糖、蛋白质和脂肪的降解,所述催熟剂包括:奶中的细菌和酶、在干酪制作过程期间添加的细菌培养物、凝乳酶、其它蛋白酶、脂肪酶、所添加的在催熟和老化期间使干酪随机定殖的霉菌和/或酵母以及细菌和真菌。另外,传统乳酪制作中所用的细菌培养物和真菌使用适于生长和在乳制奶中产生风味

的微生物。因此,传统的干酪培养技术尚未成功地用以生产非乳制干酪仿品。

[0009] 主要由非乳成分制成的干酪仿品是可商购的。这些干酪仿品中的许多包括一些乳制成分,例如酪蛋白。一些可商购的干酪仿品不含动物产品。这些干酪仿品包括由坚果奶制成的发酵干酪仿品,不溶性碳水化合物尚未从这些发酵干酪仿品中有效去除,并且这些发酵干酪仿品在不使用蛋白质交联剂和淀粉为主要成分或含有琼脂、角叉菜胶和豆腐的若干产品以提供所要质地的情况下制成。极少发酵产品含有嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*),一种通常用于乳制酸奶中的微生物。大部分品尝者认为,目前可获得的干酪仿品中无一者能充分地模仿乳酪的味道、气味和口感。

[0010] 目前可获得的由坚果奶制成的干酪仿品中的复合碳水化合物对质地有不利影响,产生具有颗粒口感并且缺乏乳酪的奶油性的产品。

[0011] 许多目前可获得的干酪仿品中包含主要胶凝剂的淀粉导致相对较高的碳水化合物含量,这对于例如希望限制碳水化合物摄入的那些消费者来说可能是不希望的。

[0012] 因为这些缺陷,目前尚无大部分消费者都可接受的作为传统乳酪的替代物的干酪仿品。

[0013] 因此,显而易见的是,本领域中存在对用于生产非乳干酪仿品同时避免消费者先前可获得的干酪仿品的缺点和缺陷的改良方法和系统的巨大需求。

## 发明内容

[0014] 本发明涉及用于生产非乳制奶和干酪产品的方法和组合物,所述非乳制奶和干酪产品包括但不限于植物来源的奶和干酪产品,其作为乳制产品的替代物供人类食用。

[0015] 在一个方面,本文档提供一种非乳制干酪仿品,其包括包含一或多种来自非动物源的经分离和提纯的蛋白质的凝聚物。所述一或多种经分离和提纯的蛋白质可以是植物蛋白,例如种子贮藏蛋白、豌豆蛋白、羽扇豆蛋白、来自豆科植物的蛋白质、鹰嘴豆蛋白或小扁豆蛋白。所述豌豆蛋白可以包括豌豆豌豆球蛋白和/或豌豆豆球蛋白。所述非乳制干酪仿品可以包括一或多种选自以下的微生物:细菌、霉菌和酵母。

[0016] 本文档还提供一种非乳制干酪仿品,其包括包含一或多种来自非动物源的经分离和提纯的蛋白质和盐的冷固式凝胶。所述非乳制干酪仿品可以包括一或多种热不稳定成分,例如一或多种脂肪、微生物、挥发性化合物或酶。所述非乳制干酪仿品可以包括一或多种选自以下的微生物:细菌、霉菌和酵母。

[0017] 所述非乳制干酪仿品中的所述一或多种微生物可以选自由以下组成的群组:青霉属 (*Penicillium species*)、德巴利酵母属 (*Debaryomyces species*)、地霉属 (*Geotrichum species*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium species*)、链球菌属 (*Streptococcus species*)、轮枝菌属 (*Verticillium species*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces species*)、酵母属 (*Saccharomyces species*)、假丝酵母属 (*Candida species*)、红冬孢酵母属 (*Rhodospiridium species*)、棒状杆菌属 (*Cornybacteria species*)、微球菌属 (*Micrococcus species*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus species*)、乳球菌属 (*Lactococcus species*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus species*)、盐单胞菌属 (*Halomonas species*)、短杆菌属 (*Brevibacterium species*)、嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter species*)、明串珠菌属 (*Leuconostocaceae species*)、小球菌属 (*Pediococcus species*)、丙酸杆菌属

(*Propionibacterium* species) 和乳酸菌。

[0018] 在一些实施例中,所述一或多种微生物选自自由以下组成的群组:乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis lactis*, LLL)、肠膜明串珠菌乳脂亚种 (*Leuconostoc mesenteroides cremoris*, LM)、乳酸乳球菌乳脂亚种 (*Lactococcus lactis cremoris*, LLC)、戊糖小球菌 (*Pediococcus pentosaceus*)、丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum*)、德氏乳杆菌乳酸亚种 (*Lactobacillus delbrueckii lactis*)、德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*)、瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、鼠李糖乳杆菌 (鼠李糖乳杆菌)、木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*, SX)、乳酸乳球菌丁二酮变种 (*Lactococcus lactis biovar diacetylactis*, LLBD)、罗克福尔青霉 (*Penicillium roqueforti*)、白青霉 (*Penicillium candidum*)、沙门柏干酪青霉 (*Penicillium camemberti*)、纳地青霉 (*Penicillium nalgiovensis*)、汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*)、白地霉 (*Geotrichum candidum*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophiles*, TA61)、蜡蚧轮枝菌 (*Verticillium lecanii*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*)、英佛红冬孢酵母 (*Rhodospiridium infirmominiatum*) 和亚麻短杆菌 (*Brevibacterium linens*)。

[0019] 本文档还提供一种非乳制干酪仿品,其包含一或多种来自非动物源的经分离和提纯的蛋白质和一或多种经分离的植物类脂质的凝固混合物,所述干酪仿品包含一或多种选自自由以下组成的群组的微生物:戊糖小球菌、丁酸梭菌、德氏乳杆菌乳酸亚种、德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、木糖葡萄球菌和亚麻短杆菌。

[0020] 在另一个方面,本文档提供一种非乳制干酪仿品,其包括凝固的非乳制奶、坚果奶和一或多种选自自由以下组成的群组的微生物:戊糖小球菌、丁酸梭菌、德氏乳杆菌乳酸亚种、德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、木糖葡萄球菌和亚麻短杆菌,其中所述非乳制奶的至少85%不溶性固体已经被去除,其中所述非乳制奶是坚果奶、豆奶或谷物奶。这种非乳制仿品进一步包括一或多种选自自由以下组成的群组的微生物:罗克福尔青霉、汉逊德巴利酵母、白地霉、白青霉、棒状杆菌属、嗜热链球菌、沙门柏干酪青霉、纳地青霉、蜡蚧轮枝菌、乳酸克鲁维酵母、酿酒酵母、产朊假丝酵母、英佛红冬孢酵母、棒状杆菌属、微球菌属、乳杆菌属、乳球菌属、乳酸乳球菌乳酸亚种 (LLL)、肠膜明串珠菌乳脂亚种 (LM)、乳酸乳球菌乳脂亚种 (LLC)、葡萄球菌属、盐单胞菌属、短杆菌属、嗜冷杆菌属、明串珠菌属、小球菌属、肠膜明串珠菌、乳酸乳球菌丁二酮变种 (LLBD) 或丙酸杆菌属。

[0021] 在另一个方面,本文档提供一种非乳制干酪仿品,其包括经分离和凝固的非乳制奶油部分和一或多种选自自由以下组成的群组的微生物:戊糖小球菌、丁酸梭菌、德氏乳杆菌乳酸亚种、德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、木糖葡萄球菌和亚麻短杆菌。这种非乳制仿品进一步包括一或多种选自自由以下组成的群组的微生物:罗克福尔青霉、汉逊德巴利酵母、白地霉、白青霉、棒状杆菌属、嗜热链球菌、沙门柏干酪青霉、纳地青霉、蜡蚧轮枝菌、乳酸克鲁维酵母、酿酒酵母、产朊假丝酵母、英佛红冬孢酵母、棒状杆菌属、微球菌属、乳杆菌属、乳球菌属、乳酸乳球菌乳酸亚种 (LLL)、肠膜

明串珠菌乳脂亚种 (LM)、乳酸乳球菌乳脂亚种 (LLC)、葡萄球菌属、盐单胞菌属、短杆菌属、嗜冷杆菌属、明串珠菌属、小球菌属、肠膜明串珠菌、乳酸乳球菌丁二酮变种 (LLBD) 或丙酸杆菌属。

[0022] 在本文所描述的任一非乳制仿品中,所述仿品可以包括LLL、LLC和LLBD中的两者(例如LLC和LLL、LLL和LLBD或LLL、LLC和LLBD)或可以包括SX和TA61。所述非乳制干酪仿品进一步可以包括罗克福尔青霉和汉逊德巴利酵母。

[0023] 所述一或多种非动物类蛋白质可以是植物蛋白(例如种子贮藏蛋白或油体蛋白质)。所述种子贮藏蛋白可以是白蛋白、大豆球蛋白、伴大豆球蛋白、球蛋白、豆球蛋白、豌豆球蛋白、伴白蛋白、麦醇溶蛋白、谷蛋白、麦谷蛋白、大麦醇溶蛋白、醇溶谷蛋白、菜豆球蛋白、蛋白质体、黑麦醇溶蛋白、小麦麸质或玉米蛋白。所述油体蛋白质可以是油体蛋白、油体钙蛋白或油体固醇蛋白。所述植物蛋白可以选自由以下组成的群组:核糖体蛋白、肌动蛋白、己糖激酶、乳酸脱氢酶、果糖二磷酸醛缩酶、磷酸果糖激酶、丙糖磷酸异构酶、磷酸甘油酸激酶、磷酸甘油酸变位酶、烯醇酶、丙酮酸激酶、蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、糖蛋白、凝集素、粘蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、丙酮酸脱羧酶、肌动蛋白、翻译延长因子、组蛋白、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶加氧酶(RuBisCo)、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶活化酶(RuBisCo活化酶)、胶原蛋白、高粱醇溶蛋白、燕麦蛋白、脱水蛋白、亲水蛋白和天然未折叠蛋白。

[0024] 在本文所描述的任一非乳制仿品中,所述仿品进一步可以包括一或多种糖(例如蔗糖、葡萄糖、果糖和/或麦芽糖);一或多种经提纯的酶(脂肪酶、蛋白酶和/或淀粉酶);熔融盐(例如柠檬酸钠、焦磷酸三钠、六偏磷酸钠、磷酸二钠或其任何组合);二价阳离子(例如 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 或 $\text{Ca}^{2+}$ );经分离的氨基酸(例如甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸或丙氨酸);或选自由以下组成的群组的其它添加剂:食物产品、酵母提取物、味噌、糖蜜、核碱基、有机酸、维生素、水果提取物、椰子奶和麦芽提取物;一或多种植物来源的脂质;一或多种来源于藻类、真菌或细菌的油;或一或多种游离脂肪酸。所述植物来源的脂质可以包括玉米油、橄榄油、大豆油、花生油、胡桃油、杏仁油、芝麻油、棉籽油、芥花油、红花油、葵花油、亚麻籽油、棕榈油、棕榈仁油、棕榈果油、椰子油、巴巴苏油、牛油树脂、芒果脂、可可脂、小麦胚芽油或米糠油(例如芥花油、可可脂和/或椰子油)。

[0025] 在本文所描述的任一非乳制干酪仿品中,所述仿品进一步可以包括交联酶(例如转谷氨酰胺酶或赖氨酰氧化酶)。

[0026] 在本文所描述的任一非乳制干酪仿品中,所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、糖、二价阳离子、经分离的酶、经分离的氨基酸或其它添加剂、植物来源的脂质或其组合的相应干酪仿品可以具有以下中的一或多者:1)增加的奶油味、奶味、黄油味、果味、干酪味、游离脂肪酸、硫磺味、多脂、酸、花香或蘑菇风味或气味特色;2)减少的坚果味、植物味、豆味、大豆、绿色、蔬菜味、脏或酸味风味或气味特色;3)增加的奶油状质地;4)改良的熔融特征;和5)增加的拉伸能力。

[0027] 举例来说,干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、糖、二价阳离子、经分离的酶、经分离的氨基酸或其它添加剂、植物来源的脂质或其组合的相应干酪仿品可以具有以下中的一或多者的增加:乙偶姻、丁二酮、2,3-己二酮或5-羟基-4-辛酮,或以下中的一或多者的减少:苯甲醛、1-己醇、1-己醛、呋喃、苯甲醛或2-甲基-2-丙醇、吡嗪或庚醛。

[0028] 举例来说,所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、糖、二价阳离子、经

分离的酶、经分离的氨基酸或其它添加剂、植物来源的脂质或其组合的相应干酪仿品可以具有甲硫基丙醛和/或二甲基三硫的增加。

[0029] 举例来说,所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、糖、二价阳离子、经分离的酶、经分离的氨基酸或其它添加剂、植物来源的脂质或其组合的相应干酪仿品可以具有以下中的一或多者的增加:丁酸、丙酸、己酸、辛酸或癸酸。

[0030] 举例来说,所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、糖、二价阳离子、经分离的酶、经分离的氨基酸或其它添加剂、植物来源的脂质或其组合的相应干酪仿品可以具有以下中的一或多者的增加:2-庚酮、2-十一烷酮、2-壬酮、2-丁酮、2-甲基丙酸、2-甲基丁酸或3-甲基丁酸。

[0031] 举例来说,所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、糖、二价阳离子、经分离的酶、经分离的氨基酸或其它添加剂、植物来源的脂质或其组合的相应干酪仿品可以具有以下中的一或多者的增加:丁酸乙酯或己酸甲酯。

[0032] 举例来说,所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、糖、二价阳离子、经分离的酶、经分离的氨基酸或其它添加剂、植物来源的脂质或其组合的相应干酪仿品可以具有(i)辛酸乙酯和/或2-乙基-1-己醇的增加或(ii)2-甲基丁醛和/或3-甲基丁醛的增加。

[0033] 举例来说,所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、糖、二价阳离子、经分离的酶、经分离的氨基酸或其它添加剂、植物来源的脂质或其组合的相应干酪仿品可以具有乙酸的增加。

[0034] 举例来说,所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、糖、二价阳离子、经分离的酶、经分离的氨基酸、酵母提取物、植物来源的脂质或其组合的相应干酪仿品可以具有以下中的一或多者的增加: $\beta$ -辛内酯、 $\delta$ -辛内酯、 $\gamma$ -壬内酯、丁内酯或甲基异丁基酮。

[0035] 举例来说,所述干酪仿品相对于不具有所述一或多种微生物、糖、二价阳离子、经分离的酶、经分离的氨基酸、酵母提取物、植物来源的脂质或其组合的相应干酪仿品可以具有以下中的一或多者的增加:壬醇或1-辛烯-3-醇。

[0036] 本文档还提供一种制作非乳制干酪仿品的方法。所述方法包括使一或多种来自非动物源的经分离和提纯的蛋白质和一或多种经分离的脂肪的混合物凝固,所述混合物包含一或多种选自由以下组成的群组的微生物:戊糖小球菌、丁酸梭菌、德氏乳杆菌乳酸亚种、德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、木糖葡萄球菌和亚麻短杆菌。所述凝固可以包括使用转谷氨酰胺酶或赖氨酰氧化酶使所述蛋白质交联,使所述混合物经历加热/冷却循环,形成冷固式凝胶,形成包含一或多种来自非动物源的经分离和提纯的蛋白质的凝聚物。所述方法进一步可以包括添加以下中的一者或多者:所述仿品进一步可以包括一或多种糖(例如蔗糖、葡萄糖、果糖和/或麦芽糖);一或多种经提纯的酶(脂肪酶、蛋白酶和/或淀粉酶);熔融盐(例如柠檬酸钠、焦磷酸三钠、六偏磷酸钠、磷酸二钠或其任何组合);二价阳离子(例如 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 或 $\text{Ca}^{2+}$ );经分离的氨基酸(例如甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸或丙氨酸);或选自由以下组成的群组的其它添加剂:食物产品、酵母提取物、味噌、糖蜜、核碱基、有机酸、维生素、水果提取物、椰子奶和麦芽提取物;一或多种植物来源的脂质;一或多种来源于藻类、真菌或细菌的油;或一或多种游离脂肪酸。所述方法进一步可以包括使所述混合物通气。所述方法可以包括将所述混合物与一种微生物一起孵育一段时间,和然后添加第二微生物到所述混合物中。

[0037] 本文档还提供一种制作冷固式凝胶的方法。所述方法包括：使包含至少一种经分离和提纯的植物蛋白的溶液在其中所述经分离和提纯的蛋白质不从所述溶液沉淀出的条件下变性；任选地添加任何热不稳定组分到所述变性蛋白溶液中；通过增加离子强度使所述变性蛋白溶液在4℃与25℃之间胶凝；和任选地使所述冷固式凝胶经历高压加工。所述一或多种经分离和提纯的蛋白质可以是植物蛋白，例如种子贮藏蛋白、豌豆蛋白、羽扇豆蛋白、来自豆科植物的蛋白质、鹰嘴豆蛋白或小扁豆蛋白。所述豌豆蛋白可以包括豌豆豌豆球蛋白和/或豌豆豆球蛋白。所述热不稳定组分可以包括一或多种微生物。胶凝可以使用5到100mM氯化钠或氯化钙诱导。

[0038] 本文档还提供一种制作凝聚物的方法。所述方法包括：使一或多种来自非动物源的经分离和提纯的蛋白质的溶液酸化到3.5与5.5之间的pH(例如pH 4-5)，其中所述溶液包含100mM或更少的盐；和将所述凝聚物从所述溶液分离；和任选地使所述凝聚物经历高压加工。所述经分离和提纯的蛋白质可以是植物蛋白(例如种子贮藏蛋白、鹰嘴豆蛋白、小扁豆蛋白、豌豆蛋白或羽扇豆蛋白)。所述豌豆蛋白可以包括豌豆豌豆球蛋白和/或豌豆豆球蛋白。所述豌豆豌豆球蛋白可以包括伴豌豆球蛋白。所述酸化步骤可以在植物类油存在下进行。

[0039] 本文档还提供一种最小化含有植物蛋白的组合物中的一或多种非所要气味的方法。所述方法包括使所述组合物与对于脂肪加氧酶具有结合亲和力的配体接触。所述配体可以结合到固体底物。所述组合物可以是食品组合物(例如干酪仿品)。

[0040] 在另一个方面，本文档还提供一种最小化含有植物蛋白的组合物中的一或多种非所要气味的方法。所述方法包括使所述组合物与活性碳接触，然后将所述活性碳从所述组合物去除。所述组合物可以是食品组合物(例如干酪仿品)。

[0041] 本文档还提供一种最小化含有植物蛋白的组合物中的一或多种非所要气味的方法。所述方法包括使所述组合物与脂肪加氧酶抑制剂和/或抗氧化剂接触。所述组合物可以是食品组合物(例如干酪仿品)。

[0042] 本文档还提供一种调节培养的非乳制产品的风味特征和/或气味特征的方法。所述方法包括添加一或多种微生物到选自以下组成的群组的非乳制奶源中：坚果奶、谷奶或豆奶，和培养所述含微生物的非乳制奶，和调节1) 在所述培养期间的通气速率和/或通气时序；2) 添加所述微生物到混合物中的时序；3) 添加所述一或多种微生物的次序；4) 所述接触的微生物在添加到所述混合物中之前或之后的细胞密度；或5) 所述微生物在添加到所述混合物中之前或之后的微生物生长期，由此调节所述非乳制奶的所述风味特征和/或气味特征。所述方法进一步可以包括在所述培养步骤期间添加一或多种糖、二价阳离子、经分离的酶、经分离的氨基酸或其它添加剂、植物来源的脂质、藻油或来源于细菌的油、来源于真菌的油或游离脂肪酸到所述混合物中。所述方法进一步可以包括使所述含有微生物的混合物凝固。所述产品可以是干酪仿品、酸奶或酸奶油、法式鲜奶油(*crème fraîche*)或克菲尔(*kefir*)。

[0043] 本文档还提供一种非乳制干酪仿品，其包含包括一或多种来自非动物源的经分离的蛋白质的凝聚物。所述一或多种经分离和提纯的蛋白质可以是植物蛋白，例如种子贮藏蛋白、豌豆蛋白、羽扇豆蛋白、来自豆科植物的蛋白质、鹰嘴豆蛋白或小扁豆蛋白。所述豌豆蛋白可以包括豌豆豌豆球蛋白和/或豌豆豆球蛋白。

[0044] 在另一个方面,本文档提供一种非乳制干酪仿品,其包含(i)一或多种来自非动物源的经分离和提纯的蛋白质和一或多种经分离的植物类脂质的凝固混合物,或(ii)凝固的非乳制奶、坚果奶和一或多种微生物;其中所述非乳制干酪仿品具有a)增加的奶油状质地;b)改良的熔融特征;或增加的拉伸能力。

[0045] 本文档还提供一种制作非乳制干酪仿品的方法。所述方法包括使用高压加工使一或多种来自非动物源的经分离和提纯的蛋白质和一或多种经分离的脂肪的混合物凝固。所述混合物可以包括一或多种选自由以下组成的群组的微生物:青霉菌属、德巴利酵母属、地霉菌属、棒状杆菌属、链球菌属、轮枝菌属、克鲁维酵母属、酵母属、假丝酵母属、红冬孢酵母属、棒状杆菌属、微球菌属、乳杆菌属、乳球菌属、葡萄球菌属、盐单胞菌属、短杆菌属、嗜冷杆菌属、明串珠菌属、小球菌属、丙酸杆菌属和乳酸菌。

[0046] 本文档还提供一种意大利乳清干酪仿品,其包含凝固的坚果奶、乳酸乳球菌乳酸亚种和乳酸乳球菌乳脂亚种。所述意大利乳清干酪进一步可以包括转谷氨酰胺酶。所述坚果奶可以用杏仁奶制作。在一些实施例中,其用杏仁奶和澳洲坚果奶的混合物制作。所述意大利乳清干酪仿品具有白色并且奶油状的外观,具有黄油外观。其可以是光滑并且甜的,具有烤杏仁泛光。所述意大利乳清干酪仿品可以是起泡沫的或坚硬的。所述起泡沫的意大利乳清干酪具有光滑质地,并且具有比所述坚硬的意大利乳清干酪更高的水分含量。所述起泡沫的意大利乳清干酪仿品可以用作马斯卡彭(mascarpone)的替代物。所述坚硬的意大利乳清干酪可以用作村舍式干酪的替代物。

[0047] 在另一个方面,本文档提供一种蓝干酪仿品,其包含凝固的坚果奶、乳酸乳球菌乳脂亚种、乳酸乳球菌丁二酮变种、乳酸乳球菌乳酸亚种、罗克福尔青霉和汉逊德巴利酵母。所述蓝干酪进一步可以包括转谷氨酰胺酶。所述坚果奶可以包括杏仁奶和澳洲坚果奶的混合物。

[0048] 在另一个方面,本文档提供一种创建用于对非乳制干酪仿品进行调味的经分离的微生物菌株的库的方法,所述方法包含:获得包含微生物菌株的异源群体的发酵剂培养物;将一或多种个别微生物菌株从所述异源群体分离;和确定所述个别微生物菌株中的每一者对非乳制干酪仿品的风味贡献。

[0049] 在实践本发明中,在一些实施例中,所述干酪仿品包含少于5%复合碳水化合物。

[0050] 在实践本发明中,在一些实施例中,所述干酪仿品包含少于5%多糖。

[0051] 在实践本发明中,在一些实施例中,所述干酪展现流畅熔融。

[0052] 在一些实施例中,本发明提供一种硬干酪仿品和制作其的方法。在一些实施例中,将非乳制奶在形成凝胶之前用嗜热性培养物接种。任选地使硬干酪仿品老化。

[0053] 在另一个方面,本发明提供一种蓝干酪仿品和制作其的方法。在一些实施例中,所述蓝干酪仿品由坚果奶制备。在一些实施例中,所述坚果奶由杏仁和澳洲坚果制备。在一些实施例中,所述坚果奶是杏仁和澳洲坚果奶的50:50组合物。在一些实施例中,所述坚果奶具有28%奶油。在一些实施例中,将所述坚果奶巴氏灭菌。在一些实施例中,将所述坚果奶加热到例如 $83 \pm 3^{\circ}\text{F}$ 。在一些实施例中,然后添加微生物培养物到所述坚果奶中。在一些实施例中,所述微生物培养物包含MA11和罗克福尔青霉。在特定实施例中,使所述微生物培养物在将其搅拌到奶中之前将奶的顶部水合约5分钟。在一些实施例中,添加蛋白酶或脂肪酶。在一些实施例中,将所述蛋白酶或脂肪酶在添加到所述奶中之前溶解于水中。

[0054] 在另一个方面,本发明提供一种洗浸干酪仿品和制作其的方法。在一些实施例中,所述洗浸干酪仿品由坚果奶制备。在一些实施例中,所述坚果奶由杏仁和澳洲坚果制备。在一些实施例中,所述坚果奶是杏仁和澳洲坚果奶的50:50组合物。在一些实施例中,所述坚果奶具有28%奶油。

[0055] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管类似或等效于本文所述方法和材料的方法和材料可以用以实践本发明,但适合的方法和材料描述如下。本文提及的所有公开案、专利申请案、专利和其它参考文献都以全文引用的方式并入。如果有矛盾,则将以本说明书(包括定义)为准。另外,材料、方法和实例仅仅是说明性的并且不打算限制性的。

[0056] 在附图和以下描述中阐述本发明的一或多个实施例的细节。本发明的其它特征、目标和优势将从所述描述和图式以及权利要求书而显而易见。权利要求书中的词语“包含”根据专利法中的标准惯例可以经“基本上由……组成”或“由……组成”替代。

### 附图说明

[0057] 本发明的新颖特征在所附权利要求书中细致阐述。将参考阐述其中利用本发明原理的说明性实施例和其附图的以下详细描述来获得对本发明特征和优势的更佳理解:

[0058] 图1是添加有蛋白酶和脂肪酶的软的成熟干酪仿品中的每一者如由味道测试者所测定的平均质地分数的条形图。

[0059] 图2是添加有蛋白酶的软的成熟干酪中的每一者如通过质地分析所测定的平均坚硬度的条形图。

[0060] 图3A和图3B分别是通过改变添加的蛋白酶和蛋白酶添加时间制作的干酪仿品如由味道测试者所测定的平均偏好分数和风味分数的条形图。

[0061] 图4是通过改变添加的蛋白酶和蛋白酶添加时间制作的干酪仿品如由味道测试者所测定的平均黄油度分数的条形图。误差条是味道测试者分数的标准差。

[0062] 图5是通过改变添加的蛋白酶和蛋白酶添加时间制作的干酪仿品如由味道测试者所测定的平均酸度分数的条形图。

[0063] 图6是描绘个别LF2和LF5细菌菌株对经过滤的坚果培养基的pH的作用的线图。

[0064] 图7是描绘个别LM和LLBD样品的黄油味和酸味风味分数的条形图。

[0065] 图8是描绘LM和LLBD样品的组合黄油味和酸味风味分数的条形图。

[0066] 图9是描绘个别LM和LLBD样品的坚果味和甜味风味分数的条形图。

[0067] 图10是描绘LM和LLBD样品的组合坚果味和甜味风味分数的条形图。

[0068] 图11描绘使用交联的经分离的蛋白质制备的干酪仿品。

[0069] 图12是描绘具有10mM、50mM或200mM葡萄糖和增加浓度的柠檬酸盐的每种样品中检测到的2,3-丁二酮的浓度的线图。

[0070] 图13是描绘具有10mM、50mM或200mM葡萄糖和增加浓度的柠檬酸盐的每种样品中检测到的乙偶姻的浓度的线图。

[0071] 图14是描绘具有10mM、50mM或200mM葡萄糖和增加浓度的柠檬酸盐的每种样品中检测到的2,3-己二酮的浓度的线图。

[0072] 图15是描绘与SX一起培养的样品中游离脂肪酸如通过GCMS所检测的信号强度的

条形图。

[0073] 图16是描绘与SX一起培养样品中2-甲基和3-甲基丁酸如通过GCMS所检测的信号强度的条形图。

[0074] 图17是描绘具有额外底物(柠檬酸盐、草酸或丙酮酸盐)的短杆菌属培养的酵母提取物培养基中干酪酸(丁酸、丙酸、3-甲基丁酸和2-甲基丙酸)如通过GCMS所检测的信号强度的条形图。

[0075] 图18是描绘与MD88一起培养的豆奶样品中“黄油味”化合物(乙偶姻和2,3-丁二酮)如通过GCMS所检测的信号强度的条形图。

[0076] 图19是描绘与TA61一起培养的豆奶样品中“黄油味”化合物(乙偶姻和2,3-丁二酮)如通过GCMS所检测的信号强度的条形图。

[0077] 图20是描绘补充有各种支链氨基酸的豆奶中通过SX产生的3-甲基-丁酸如通过GCMS所检测的信号强度的条形图。

[0078] 图21是描绘补充有各种支链氨基酸的豆奶中通过SX产生的2-甲基-丁酸如通过GCMS所检测的信号强度的条形图。

[0079] 图22是描绘补充有各种支链氨基酸的豆奶中通过SX产生的2-甲基-丙酸如通过GCMS所检测的信号强度的条形图。

[0080] 图23是描绘与不同浓度的亮氨酸一起培养的豆奶样品中3-甲基-丁酸如通过GCMS所检测的信号强度的条形图。

[0081] 图24是描绘短杆菌属培养样品中二甲基三硫如通过GCMS所检测的信号强度的条形图。

[0082] 图25是描绘与椰子奶一起培养PV中乙偶姻如通过GCMS所检测的信号强度的条形图。

[0083] 图26是描绘与椰子奶一起培养PV中2,3-丁二酮如通过GCMS所检测的信号强度的条形图。

[0084] 图27是描绘与椰子奶一起培养PV中游离脂肪酸如通过GCMS所检测的信号强度的条形图。

### 具体实施方式

[0085] 本发明公开用于在由非乳源制作的干酪中产生所要风味和质地的方法和组合物。本领域的技术人员将认识到,本文所描述的实施例的任何组合都在本发明的范围内。广泛地,本发明提供通过使用多种技术使非乳制干酪源凝固来制作非乳制干酪的方法,所述多种技术包括交联、使用加热/冷却循环、形成冷固式凝胶、形成凝聚物或使用高压加工。凝固过程可以允许将交联的蛋白质和相关脂肪分离成固体凝乳,其可以与“乳清”(例如在凝结之后剩余的液体)分离。凝固的蛋白质可以保持脂肪乳液,并且具有按压、培养和催熟来源于非乳制奶的干酪仿品所需要的基本物理特征。

[0086] 如本文所述,干酪仿品的质地和/或风味以及干酪仿品的熔融特征或可拉伸性可以通过添加一或多种特异性酶(例如脂肪酶和/或蛋白酶)、糖、蛋白质、氨基酸、二价阳离子、熔融盐、酵母提取物、食物产品、味噌、糖蜜、核碱基、有机酸、维生素、水果提取物、椰子奶、麦芽提取物、植物类脂质、游离脂肪酸和一或多种微生物来进行调整。另外,可以调节培

养物参数以改变干酪仿品的风味、质地、熔融特征和拉伸性。举例来说,可以调节在培养期间的通气速率和/或通气时序;添加微生物到混合物中的时序;添加两种或两种以上微生物的次序,例如一起或依序;两种或两种以上微生物的相对量;接种的微生物的绝对数;或微生物在添加到混合物中之前或之后的微生物生长期。

[0087] 在一些实施例中,一或多种特异性酶(例如脂肪酶和/或蛋白酶)、糖、蛋白质、氨基酸、二价阳离子、熔融盐、酵母提取物、食物产品、味噌、糖蜜、核碱基、有机酸、维生素、水果提取物、椰子奶、麦芽提取物、植物类脂质、游离脂肪酸可以用以影响用于制作干酪仿品、酸奶仿品或培养的乳制产品的其它食品仿品中的微生物培养物的乳液稳定性、蛋白质溶解度、悬浮液稳定性或支持生长的能力。

[0088] 在各种实施例中,本发明包括主要、完全或部分由来源于非动物源的成分组成的干酪仿品。在其它实施例中,本发明包括由非动物源制作干酪仿品的方法。在各种实施例中,这些结果通过使用转谷氨酰胺酶来模仿非乳制奶中干酪制作的凝结过程而实现。

[0089] 定义。

[0090] 如本文所用,术语“经分离的蛋白质”是指如下制剂,其中蛋白质或蛋白质群体实质上从来源分离,其中非蛋白质组分在所述制剂中已经实质上减少。非蛋白质组分相对于蛋白质已经从其分离出的源材料可以减少3或3以上、5或5以上的倍数或10或10以上的倍数。蛋白质群体可以是异源的,或蛋白质群体可以是同源的。包含异源蛋白质群体的经分离的蛋白质制剂的一个非限制性实例是分离大豆蛋白。

[0091] 术语“经分离和提纯的蛋白质”是指如下制剂,其中相对于指定蛋白质据称从其提纯的源材料,除指定蛋白质(其可以是单一单体或多聚体蛋白质种类)外,蛋白质组分的以质量计累计丰度减少2或2以上、3或3以上、5或5以上、10或10以上、20或20以上、50或50以上、100或100以上或1000或1000以上的倍数。为了清楚起见,经分离和提纯的蛋白质描述为相对于其起始材料(例如植物或其它非动物源)经分离和提纯。在一些实施例中,术语“经分离和提纯的”可以表明,蛋白质制剂是至少60%纯,例如超过65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%纯。组合物可以包括除了经分离和提纯的蛋白质之外的材料的事实不改变蛋白质的经分离和提纯的性质,因为这个定义典型地应用于添加到组合物中之前的蛋白质。

[0092] 术语“均质的”可以意指单一蛋白质组分构成超过90质量%的制剂总蛋白质组分。

[0093] 术语“类似”可以意指一种如下组合物,其具有普通人类观察者可识别地类似于另一种组合物的特征。

[0094] 术语“不可区别的”可以意指普通人类观察者将不能基于一或多种特征来区分两种组合物。有可能两种组合物基于一个特征不可区别但基于另一个特征并非不可区别,举例来说,两种组合物可以具有不可区别的味道但具有不同的颜色。不可区别的还可以意指产品提供其所替代的产品的等效功能或起到其所替代的产品的等效作用。

[0095] 术语干酪“替代物”或“仿品”可以是起到传统乳酪所通常起到的任何作用的任何非乳制产品。干酪“替代物”或“仿品”可以是如下产品,其享有干酪的视觉、嗅觉、质地或味觉特征,从而诱使产品的普通人类观察者想到传统乳酪。

[0096] 术语“受控的(controlled)”、“控制(controlling)”和“限定的”在本文中可互换地用以指操纵一种方法或组合物组分来实现所要特征或将所述所要特征保持在由用户限

定的某些范围内。仅作为实例,受控的脂肪特征是指如下脂肪特征,其中脂肪含量或特定脂肪类别(例如饱和或不饱和)的含量保持在用户限定的界限值内。仅作为其它实例,受控的量是指保持于由用户限定的某些范围内的量。举例来说,添加受控量的细菌可以指添加包含已知群体和/或已知量的细菌菌株的细菌培养物。相比之下,回春水(Rejuvelac)是包含不受控量的例如细菌的例示性组合物。回春水通过将含有细菌食品源的液体于有助于细菌生长的环境中孵育而制备,但在所述环境中生长的细菌的量或细菌的类型并不保持在用户限定的范围内,例如不受控。

[0097] 非乳制奶

[0098] 在一个方面,本发明提供一种非乳制干酪源,其可以用作制备非乳制干酪的起始材料。术语“非乳制干酪源”是指包含蛋白质和脂肪的乳液,其中所述蛋白质和脂肪由非乳源制备。在一些实施例中,非乳制干酪源可以是获自坚果或种子的非乳制奶。在其它实施例中,一或多种来自非动物源的经分离的蛋白质用作非乳制干酪源。

[0099] 在一些实施例中,植物源包含一或多种坚果或种子。在一些实施例中,植物源是由一或多种坚果或种子(例如杏仁和澳洲坚果)混合的粉。术语“坚果”一般来说是指任何硬壁的食用果仁。坚果可以是硬壳果实和种子的复合物,其中硬壳果实并不打开来释放种子。例示性坚果包括但不限于杏仁、灰胡桃、山核桃坚果、枫杨(枫杨属(*Pterocarya*))、山毛榉坚果、橡坚果、欧洲榛、鹅耳枥坚果、大豆坚果、腰果、巴西坚果、栗子、椰子、榛子、澳洲坚果、蒙刚果(mongogo)(曼杰提树坚果(*Schinziophyton rautanenii*))、花生、长山核桃、松仁、开心果或胡桃。见于壳内并且用于食品中的任何大含油仁可以被视为坚果。植物种子可以包括任何封闭于种皮中的胚胎植物。例示性植物种子包括例如豆科植物,例如苜蓿、三叶草、豌豆、豆子、小扁豆、羽扇豆、牧豆、角豆、大豆、花生;谷物,例如玉米、水稻、小麦、大麦、高粱、粟、燕麦、黑小麦、黑麦、荞麦、福尼奥米(fonio)、画眉草、苋菜、斯佩耳特小麦、藜麦;被子植物(例如开花植物,例如葵花)和裸子植物。“裸子植物”一般来说是指产生一般来说不封闭于坚果或果实中的种子的植物物种。例示性裸子植物包括针叶树,例如松树、云杉树和冷杉树。在一些实施例中,非乳制奶不是豆奶。

[0100] 非乳制产品或组合物包括其中构成蛋白质、脂肪和/或小分子可以从以下各者中分离或由以下各者分泌的产品或组合物:植物、细菌、病毒、古细菌、真菌或藻类。非乳蛋白还可以使用多肽表达技术(例如异源表达技术,使用细菌细胞、昆虫细胞、真菌细胞(例如酵母细胞)、植物细胞)重组地生产。在一些情况下,标准多肽合成技术(例如液相多肽合成技术或固相多肽合成技术)可以用以合成地生产蛋白质。在一些情况下,体外转录/转译反应用以生产蛋白质。非乳制产品一般说来不来源于奶牛、山羊、水牛、绵羊、马、骆驼或其它哺乳动物。在一些实施例中,非乳制产品不含乳蛋白。在一些实施例中,非乳制产品不含乳脂肪。

[0101] 非乳制奶可以通过一种包含用加工步骤制备坚果或植物种子的方法来制作,所述加工步骤是例如灭菌、漂白、振荡、分解、离心或洗涤。坚果或种子可以通过例如将坚果于包含水的溶液中研磨或掺合或碾磨而分解。分解坚果或干燥种子的替代方法可以包括对坚果或植物种子进行压碎、滚磨、粉碎、雾化、削刮、磨粉、研磨、碾磨、水侵蚀(例如用水刀(water jet))或细斩。在一些实施例中,分解步骤在掺合机、连续流动研磨机或连续流动碾磨机中进行。可以在分解后进行分选、过滤、筛选、空气分级或分离步骤。在一些实施例中,可以在

形成非乳制奶之前储存经分解的坚果或种子。可以在分解之前、期间或之后添加水溶液。

[0102] 本发明的一些实施例中用以制作非乳制奶的坚果或种子可以在表面上有污染物，这将使非乳制奶不安全或不好喝。因此，可以在使用之前洗涤或烫漂坚果或种子。还可以对坚果或种子进行灭菌，以去除、减少或杀死坚果或种子表面上的任何污染物。灭菌步骤可以是照射步骤、加热步骤（例如蒸汽灭菌、火焰或干式加热）或化学灭菌（例如暴露于臭氧）。在一些实施例中，灭菌步骤杀死坚果或种子上超过95%或超过99%的微生物。

[0103] 在一些实施例中，将非乳制奶离心以去除不溶性固体。非乳制奶可以具有少于1%、5%、10%、20%、30%、40%或50%的在离心之前见于非乳制奶中的不溶性固体。非乳制奶可以有99%、95%、90%、80%、70%、60%或50%的不溶性固体通过离心而去除。非乳制奶的离心描述于本文中。

[0104] 在一些实施例中，非乳制奶经巴氏灭菌或灭菌。巴氏灭菌可以是高温短时（HTST）、“延长货架期”（ESL）的处理，或超高温（UHT或经超热处理）。在一些实施例中，巴氏灭菌程序包括使非乳制奶在164°F-167°F下巴氏灭菌10到20秒（例如10、12、14、16、18或20）秒。在一些实施例中，非乳制奶中的微生物负荷通过暴露于紫外光或高压巴氏灭菌而降低。受控的冷却系统可以用以快速使非乳制奶温度快速降低并且将其储存在36°F下的冰箱中。

[0105] 在一些实施例中，非乳制奶是非乳制奶油部分。

[0106] 在一些实施例中，非乳制奶是包含一或多种经分离和提纯的蛋白质和一或多种经分离的脂肪的乳液。在一些实施例中，经分离和提纯的蛋白质含于蛋白质溶液中。溶液可以包含EDTA（0-0.1M）、NaCl（0-1M）、KCl（0-1M）、NaSO<sub>4</sub>（0-0.2M）、磷酸钾（0-1M）、柠檬酸钠（0-1M）、碳酸钠（0-1M）、蔗糖（0-50%）、脲（0-2M）或其任何组合。溶液的pH可以是3到11。在一些实施例中，一或多种经分离和提纯的蛋白质占所述蛋白质溶液的蛋白质内容物的0.1%、0.2%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或99%以上。在一些实施例中，一或多种经分离和提纯的蛋白质占所述蛋白质溶液的蛋白质内容物的0.1-5%、1-10%、5-20%、10-40%、30-60%、40-80%、50-90%、60-95%或70-100%。在一些实施例中，蛋白质溶液的总蛋白含量是约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.75%、1%、1.5%、2%、5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%或超过20%重量/体积。在一些实施例中，蛋白质溶液的总蛋白含量是0.1-5%、1-10%、5-20%或超过20%重量/体积。在一些实施例中，蛋白质溶液的蛋白质内容物含有1-3种经分离和提纯的蛋白质、2-5种经分离和提纯的蛋白质、4-10种经分离和提纯的蛋白质、5-20种经分离和提纯的蛋白质或超过20种经分离和提纯的蛋白质。

[0107] 在一些实施例中，一或多种经分离、提纯的蛋白质来源于非动物源。在一些实施例中，非乳制奶从非乳源（例如植物）中分离。植物源的非限制性实例包括谷物作物，例如玉米、燕麦、水稻、小麦、大麦、黑麦、黑小麦（小麦黑麦杂交物）、画眉草（荻，*Eragrostis tef*）；油籽作物，包括棉籽、葵花籽、红花籽、两节芥属（*Crambe*）、亚麻芥属（*Camelina*）、芥子、油菜籽（甘蓝型油菜（*Brassica napus*））；绿叶菜，例如莴苣、菠菜、羽衣甘蓝、绿甘蓝、青萝卜、君达菜、芥菜、蒲公英嫩叶、椰菜或卷心菜；或一般不能被人类食用的绿色物质，包括生物质作物，例如柳枝稷（switchgrass/*Panicum virgatum*）、芒草（*Miscanthus*）、芦竹（*Arundo donax*）、能源甘蔗、高粱属（*Sorghum*）或其它禾草、苜蓿、玉米秸秆、海带或其它海

藻；一般被从所收获的植物中丢弃的绿色物质、甘蔗叶、树叶；根块作物，例如木薯、甘薯、马铃薯、胡萝卜、甜菜或芜菁；来自豆科的植物，例如三叶草、笔花豆属 (*Stylosanthes*)、田菁属 (*Sesbania*)、野豌豆 (野豌豆属 (*Vicia*))、花生属 (*Arachis*)、木蓝属 (*Indigofera*)、银合欢属 (*Leucaena*)、瓜儿豆属 (*Cyamopsis*)、豌豆 (例如豇豆、英国豌豆、黄色豌豆或绿色豌豆) 或豆子 (例如大豆、蚕豆、利马豆、菜豆、鹰嘴豆、绿豆、黑白斑豆、小扁豆、羽扇豆、牧豆、角豆、大豆和花生 (落花生 (*Arachis hypogaea*)))；椰子；或阿拉伯胶 (*Acacia*)。本领域的技术人员将理解，可以从植物界中任何生物体中分离的蛋白质可以用于本发明。在一些实施例中，植物源不是大豆。

[0108] 富于植物中的蛋白质可以从一或多种来源植物中大量分离，并且因此是适用于干酪产品中任一者的经济选择。因此，在一些实施例中，一或多种经分离和提纯的蛋白质包含以高含量见于植物中并且能够经大量分离和提纯的丰富蛋白质。在一些实施例中，丰富蛋白质构成来源植物的总蛋白质内容物的约0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%。在一些实施例中，丰富蛋白质构成来源植物的总蛋白质内容物的约0.5-10%、约5-40%、约10-50%、约20-60%或约30-70%。在一些实施例中，丰富蛋白质构成来源植物的干物质总重量的约0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在一些实施例中，丰富蛋白质构成来源植物的干物质总重量的约0.5-5%、约1-10%、约5-20%、约10-30%、约15-40%或约20-50%。

[0109] 在特定实施例中，一或多种经分离的蛋白质包含以高含量见于植物叶子中的丰富蛋白质。在一些实施例中，丰富蛋白质构成来源植物的叶子的总蛋白质内容物的约0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%。在一些实施例中，丰富蛋白质构成来源植物的叶子的总蛋白质内容物的约0.5-10%、约5%-40%、约10%-60%、约20%-60%或约30-70%。在特定实施例中，一或多种经分离的蛋白质包含核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶加氧酶 (RuBisCo)。RuBisCo由于其高溶解度和接近对于人类营养最优的必需氨基酸比例的氨基酸组成而是特别适用于干酪仿品的蛋白质。在特定实施例中，一或多种经分离的蛋白质包含核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶加氧酶活化酶 (RuBisCo活化酶)。在特定实施例中，一或多种经分离的蛋白质包含营养贮藏蛋白 (VSP)。

[0110] 在一些实施例中，一或多种经分离的蛋白质包含以高含量见于植物种子中的丰富蛋白质。在一些实施例中，丰富蛋白质构成来源植物的种子的总蛋白质内容物的约0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%或90%以上。在一些实施例中，丰富蛋白质构成来源植物的种子的总蛋白质内容物的约0.5-10%、约5%-40%、约10%-60%、约20%-60%或约30-70%或>70%。以高含量见于植物种子中的蛋白质的非限制性实例是种子贮藏蛋白，例如白蛋白、大豆球蛋白、伴大豆球蛋白、球蛋白、豌豆球蛋白、伴豌豆球蛋白、豆球蛋白、伴白蛋白、麦醇溶蛋白、谷蛋白、麦谷蛋白、大麦醇溶蛋白、醇溶谷蛋白、菜豆球蛋白 (蛋白质)、蛋白质体、黑麦醇溶蛋白、小麦麸质、玉米蛋白，或油体蛋白质，例如油体蛋白、油体钙蛋白或油体固醇蛋白。

[0111] 在一些实施例中，一或多种经分离的蛋白质包含在一种结构中脂质相互作用并

且帮助使脂质稳定化的蛋白质。不希望受特定理论束缚,所述蛋白质可以改良脂质和/或脂肪仿品与干酪产品的其它组分的整合,导致最终产品的口感和质地改良。脂质相互作用植物蛋白的非限制性实例是油体蛋白家族的蛋白质。油体蛋白是见于植物的油体中的与脂质相互作用的蛋白质。可以稳定化乳液的植物蛋白的其它非限制性实例包括来自大北方豆(Great Northern bean)的种子贮藏蛋白、来自豌豆的白蛋白、来自豌豆的球蛋白、来自绿豆的8S球蛋白和来自菜豆的8S球蛋白。

[0112] 在一些实施例中,一或多种经分离和提纯的蛋白质选自由以下组成的群组:核糖体蛋白、肌动蛋白、己糖激酶、乳酸脱氢酶、果糖二磷酸醛缩酶、磷酸果糖激酶、丙糖磷酸异构酶、磷酸甘油酸激酶、磷酸甘油酸变位酶、烯醇酶、丙酮酸激酶、蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、糖蛋白、凝集素、粘蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、丙酮酸脱羧酶、肌动蛋白、翻译延长因子、组蛋白、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶加氧酶(RuBisCo)、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶加氧酶活化酶(RuBisCo活化酶)、白蛋白、大豆球蛋白、伴大豆球蛋白、球蛋白、豌豆球蛋白、伴白蛋白、麦醇溶蛋白、谷蛋白、麸质、麦谷蛋白、大麦醇溶蛋白、醇溶谷蛋白、菜豆球蛋白(蛋白质)、蛋白质体、黑麦醇溶蛋白、伸展蛋白、小麦麸质、胶原蛋白、玉米蛋白、高粱醇溶蛋白、燕麦蛋白、脱水蛋白、亲水蛋白、晚期胚胎富集蛋白、天然未折叠蛋白、任何种子贮藏蛋白、油体蛋白、油体钙蛋白、油体固醇蛋白或其它油体蛋白质、营养贮藏蛋白A、营养贮藏蛋白B、绿豆种子贮藏8S球蛋白、豌豆球蛋白、豌豆白蛋白或本文所描述的任何其它蛋白酶。

[0113] 在一些实施例中,经分离和提纯的蛋白质使用本领域中已知的任何方法来浓缩。蛋白质可以被浓缩2倍、五倍、10倍或高达100倍。蛋白质可以被浓缩到0.001-1%、0.05-2%、0.1-5%、1-10%、2-15%、4-20%或超过20%的最终浓度。例示性方法包括例如超滤(或切向流过滤)、冻干、喷雾干燥或薄膜蒸发。

[0114] 用于制备乳液的脂肪可以来自多种来源。在一些实施例中,来源是非动物源(例如获自植物、藻类、真菌(例如酵母或丝状真菌)、海藻、细菌、古细菌的油),包括基因工程化细菌、藻类、古细菌或真菌。油可以是氢化(例如氢化植物油)或非氢化的。植物油的非限制性实例包括玉米油、橄榄油、大豆油、花生油、胡桃油、杏仁油、芝麻油、棉籽油、油菜籽油、芥花油、红花油、葵花油、亚麻籽油、棕榈油、棕榈仁油、椰子油、巴巴苏油、牛油树脂、芒果脂、可可脂、小麦胚芽油或米糠油;或人造奶油。

[0115] 在一些实施例中,脂肪可以是三酸甘油酯、单酸甘油酯、二酸甘油酯、神经鞘糖脂、糖脂、卵磷脂、溶血卵磷脂,磷脂,例如磷脂酸、溶血磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺或磷脂酰丝氨酸;鞘脂,例如鞘磷脂或神经酰胺;固醇,例如豆固醇、谷固醇、菜油固醇、菜籽固醇、谷固醇、菜油固醇、麦角固醇、酵母固醇、粪固醇、甲藻固醇、羊毛固醇、胆固醇或表固醇;游离脂肪酸,例如棕榈油酸、棕榈酸、肉豆蔻酸、月桂酸、肉豆蔻脑酸、羊油酸、羊蜡酸、羊脂酸、天竺葵酸、十一烷酸、亚油酸(C18:2)、二十烷酸(C22:0)、花生四烯酸(C20:4)、二十碳五烯酸(C20:5)、二十二碳五烯酸(C22:5)、二十二碳六烯酸(C22:6)、芥酸(C22:1)、共轭亚油酸、亚麻酸(C18:3)、油酸(C18:1)、反油酸(油酸的反式异构体)、反-异油酸(C18:1反11)或共轭油酸;或所述脂肪酸的酯,包括所述脂肪酸的单酰基甘油酯、二酰基甘油酯和三酰基甘油酯。

[0116] 脂肪可以包含磷脂、固醇或脂质。磷脂可以包含多个包含脂肪酸(例如参看以上)、甘油和极性基团的两亲性分子。在一些实施例中,极性基团是例如胆碱、乙醇胺、丝氨酸、磷

酸盐、甘油-3-磷酸盐、肌醇或肌醇磷酸盐。在一些实施例中，脂质是例如鞘脂、神经酰胺、鞘磷脂、脑苷脂、神经节苷脂、醚脂质、缩醛磷脂或PEG化脂质。

[0117] 在一些实施例中，脂肪是由籽、坚果和豆科植物产生的奶油部分，所述籽、坚果和豆科植物包括但不限于葵花籽、红花籽、芝麻籽、油菜籽、杏仁、澳洲坚果、葡萄柚、柠檬、橙子、西瓜、南瓜、可可、椰子、芒果、冬南瓜、腰果、巴西坚果、栗子、榛子、花生、长山核桃、胡桃和开心果。制备奶油部分的方法描述于本文中。

[0118] 受控量的一或多种脂肪的添加可以产生不同于酪性质，包括但不限于坚硬度、保水性、油渗漏、熔融能力、拉伸、颜色和奶油性。脂肪可以呈不饱和油、饱和油、洗过的奶油部分和/或未洗的奶油部分形式。不饱和油可以包括例如橄榄油、棕榈油、大豆油、芥花油（油菜籽油）、南瓜籽油、玉米油、葵花油、红花油、鳄梨油、其它坚果油、花生油、葡萄籽油、芝麻油、摩洛哥坚果油和米糠油。饱和油可以包括例如椰子油、棕榈油、可可脂、棉籽油、芒果油等。奶油部分可以由葵花籽、红花、芝麻籽、油菜籽、杏仁、澳洲坚果和开心果（仅作为实例）制成。奶油部分的制备和分离描述于本文中。

[0119] 在一些实施例中，乳液通过以下方式来制备：分离和提纯一或多种蛋白质，制备包含一或多种经分离和提纯的蛋白质的溶液，将所述溶液与一或多种脂肪混合，由此产生所述乳液。蛋白质溶液比脂肪的比率可以是约1:10、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1或10:1。蛋白质溶液比脂肪的比率可以是约10:1-1:2、1:4-2:1、1:1-4:1或2:1-10:1。乳液可以用作制备非乳制干酪的非乳制奶。仅作为实例，可以添加以重量/重量或重量/体积计0%-50%脂肪到蛋白质溶液中。

[0120] 分离和混合奶油和脱脂部分的方法

[0121] 在一些实施例中，非乳制奶可以进一步分离成奶油部分和脱脂部分。在一些实施例中，可以将限定量的奶油部分与限定量的脱脂部分混合以产生具有受控的脂肪特征的非乳制奶。在一个方面，本发明提供一种产生具有受控的脂肪特征的非乳制干酪仿品的方法。在一些实施例中，所述方法包含从非乳制奶分离奶油和脱脂部分，和将限定量的所述奶油和任选地所述脱脂部分混合以产生具有受控的脂肪特征的混合物。在一些实施例中，所述分离包含将非乳制奶分离成奶油和脱脂部分。在一些实施例中，奶油部分相对于脱脂部分富含脂肪。奶油部分可以含有所述非乳制奶在分离之前的脂肪含量的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或95%以上。奶油部分可以包含大于脱脂部分的脂肪含量的脂肪含量。奶油部分可以包含与脱脂部分相比增加了10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或100%以上的脂肪含量。奶油部分可以包含比脱脂部分的脂肪含量大0.2倍、大0.5倍、大0.75倍、大1倍、大1.2倍、大1.3倍、大1.4倍、大1.5倍、大2倍、大3倍、大4倍、大5倍、大7.5倍、大10倍、大15倍、大20倍或大超过20倍的脂肪含量。

[0122] 奶油和脱脂部分可以例如通过重力或通过离心分离。离心一般来说是指使用离心力分离组合物中的组分的过程。离心速率由以转/分(RPM)为单位测量的角速度或表示为g的加速度规定。术语“g”一般来说是指由地球表面处的重力产生的加速度。在一些实施例中，奶油和脱脂部分通过在500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500或10,000RPM下离心而分离。在一些实施例中，奶油和脱脂部分通过在约500-2000、1000-5000、2000-7000、4000-10,000或大于10,

000RPM下离心而分离。在一些实施例中,奶油和脱脂部分通过离心约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60或大于60分钟而分离。在一些实施例中,奶油和脱脂部分通过离心1-10、5-30、10-45、30-60或大于60分钟而分离。在一个实施例中,使奶油和脱脂部分在JS-5.0转子中在5000RPM下离心30分钟。在一些实施例中,奶油部分和脱脂部分通过在Flotwegg ac1500或GEA ME55中离心分离而分离。

[0123] 在一些实施例中,奶油部分和脱脂部分不完全分离。脱脂部分和奶油部分可以在分离过程中与不溶性固体分离。在一些实施例中,脱脂部分和奶油部分分开储存。

[0124] 在一些实施例中,奶油部分可以用作非乳制干酪源。

[0125] 在一些实施例中,可以将蛋白质溶液与奶油部分混合以产生非乳制干酪源。例示性蛋白质溶液描述于本文中。

[0126] 在一些实施例中,所述方法进一步包含将蛋白质溶液与从植物源分离的奶油部分混合。如本文所用,术语“奶油部分”是指与初始乳液(即非乳制奶)相比富含脂肪的包含脂肪、蛋白质和水的乳液。例示性奶油部分和制备其的方法描述于本文中。在一些实施例中,奶油部分从植物源,例如籽、坚果或豆科植物,例如葵花、红花、芝麻籽、油菜籽、杏仁、澳洲坚果和开心果提纯。在一些实施例中,奶油部分通过以下方式提纯:将籽或坚果掺合于水或溶液中,以产生浆液。一些实施例包括掺合籽、坚果或豆科植物1分钟到达30分钟,其可以包括通过经4分钟将速度逐渐增加到最大速度和在最大速度下掺合1分钟的掺合方法。溶液可以包含EDTA(0-0.1M)、NaCl(0-1M)、KCl(0-1M)、NaSO<sub>4</sub>(0-0.2M)、磷酸钾(0-1M)、柠檬酸钠(0-1M)、碳酸钠(0-1M)、蔗糖(0-50%)、脲(0-2M)或其任何组合。溶液的pH可以是3到11。参看实例11。可以通过本领域中已知或如本文所述的任何方法对浆液进行离心。

[0127] 离心可以导致液体层与不溶性固体球粒的分离。顶层可以用作奶油部分。底层可以用作乳清,并且去除球粒。奶油部分然后可以在离心之后即刻原样使用,或可以用上文所述的溶液进一步洗涤或在溶液中进行加热。洗涤和加热去除不合需要的颜色和风味分子或不合需要的粒状粒子以改良口感。具体来说,用高pH缓冲液(例如高于pH 9)洗涤可以去除苦味化合物并且改良口感,用脲洗涤可以去除贮藏蛋白,在低于pH 9下洗涤、随后用高于pH 9的pH洗涤可以去除不合需要的颜色分子,和/或用盐洗涤可以减少味觉化合物。加热增加粒状粒子、颜色和风味化合物的去除。加热可以在25°C到80°C下0-24小时。洗涤和加热可以去除不合需要的颜色和风味特色,并且可以去除不合需要的颗粒状粒子。在一些实施例中,洗涤和加热改良口感。在一些实施例中,所得奶油状部分包含种子贮藏蛋白。在一些实施例中,将种子贮藏蛋白从所得奶油状部分中实质上去除。

[0128] 在一些实施例中,将限定量的奶油部分和限定量的脱脂部分混合以产生混合物。奶油和/或脱脂部分可以经巴氏灭菌或不经巴氏灭菌。在一些实施例中,限量由用户限定以产生具有受控的脂肪特征的混合物。在一些实施例中,将奶油和脱脂部分以限定比率混合以产生具有受控的脂肪特征的混合物。在一些实施例中,非乳制奶中的奶油层比脱脂层的比率是约100:1、90:1、80:1、70:1、60:1、50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50或1:60。在一些实施例中,本文所描述的方法包含测量添加到非乳制奶中的脱脂层和奶油层的量。

[0129] 混合物然后可以用作非乳制干酪源以制备干酪仿品。应理解,当实践本文所描述

的方法时,如本文所述的任何非乳制干酪源都可以个别地或以其任何组合使用。

#### [0130] 调味组分/方法

[0131] 在另一个方面,本发明提供对培养的非乳制产品进行调味的的方法,所述培养的非乳制产品包括酸奶油、法式鲜奶油、酸奶或干酪仿品。在一些实施例中,所述方法包含将具有本文所描述的一或多种风味添加剂和/或一或多种个别微生物菌株的测试非乳制产品的风味特色特征与不具有添加剂和/或个别微生物菌株的对照非乳制产品的风味特色特征比较。非乳制产品(例如干酪仿品)的质地和风味特征可以通过本领域中已知或本文所描述的任何方法来确定。确定风味和质地的例示性方法可以是味道测试,例如盲法味道测试,或使用气相色谱-质谱分析(GCMS)。

[0132] GCMS是一种将气相-液相色谱和质谱分析的特征组合以鉴别测试样品内的不同物质的方法。GCMS在一些实施例中可以用以评价乳酪和干酪仿品的性质。举例来说,可以从乳酪或干酪仿品周围的顶部空间中检测到挥发性化学物质。这些化学物质可以使用GCMS来鉴别。由此得到干酪周围的顶部空间中的挥发性化学物质的一个特征。在一些情况下,可以对GCMS的每个峰进行进一步评价。举例来说,人类可以对造成某一峰的化学物质的嗅觉体验进行评分。这一信息可以用以进一步优化所述特征。GCMS可以然后用以评价干酪仿品的性质。GCMS可以用于优化干酪仿品。在一些实施例中,干酪仿品具有类似于乳酪的GCMS特征。在一些实施例中,干酪仿品具有与乳酪相同的GCMS特征。

[0133] 风味特征可以由一或多种风味特色的存在和/或强度表征。例示性风味特色包括但不限于黄油度、水果度、坚果味、乳味、奶味、干酪味、多脂、果味、菠萝、蜡味、黄油味、香豆属、暗色水果、橘、酸、像香蕉的、甜味、苦味、霉味、花香、膻味、汗味、木味、泥土味、蘑菇、麦芽味、辛辣、梨、绿色、香脂味、刺激性、油的、玫瑰、多脂、奶油硬糖、橙子、松树、康乃馨、甜瓜、菠萝、香草、大蒜、草本的、木味、肉桂、芸香、酸奶、桃、香草、山楂和草本的。风味特色可以与一或多种挥发性化合物的释放相关。风味特征可以由一或多种风味特色的不存在或强度降低表征。例示性风味特色包括:植物味、豆味、大豆、绿色、蔬菜味、坚果味、脏和酸。

[0134] 例示性挥发性化合物包括例如 $\gamma$ -壬酸内酯、 $\gamma$ -十一内酯、 $\gamma$ -癸内酯、 $\delta$ -十四内酯、硫代丙酸S-甲酯、 $\delta$ -十三内酯、 $\delta$ -十四内酯、 $\delta$ -十四内酯、丁酰乳酸丁酯、2,3-己二酮、己酸甲酯、丁内酯、丙酸、2-甲基丙酸、甲基异丁基酮、 $\gamma$ 辛内酯、 $\delta$ 辛内酯、 $\gamma$ 壬内酯、5-羟基-4-辛酮、2-乙基-1-己醇、辛烷、乙醇、2,3-丁二酮、2庚酮、1-丁醇、乙偶姻、丁酸、壬醛、乙酸、1,3丁二醇、甲基-3-丁烯-1-醇、甲醇、己醇、二甲基-苯、乙基-苯、吡啶、柠檬烯、甲苯、苯乙酮、戊-2,3-二酮、2-戊酮、2-庚酮、2-壬酮、丙酮、丁酮、2-甲基丙酸、丁酸、2-甲基丁酸、3-甲基丁酸、戊酸、4-甲基戊酸、己酸、辛酸、癸酸、十一烷酸、十二烷酸、十四烷酸、十六烷酸、十八烷酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、丙醇、丁醇、戊醇、己醇、庚醇、辛醇、丙-2-醇、丁-2-醇、戊-2-醇、己-2-醇、庚-2-醇、壬-2-醇、十一烷-2-醇、辛烯-3-醇、辛-1,5-二烯-3-醇、3-甲基-2-环己烯醇、2-甲基丙醇、2-甲基丁醇、3-甲基丁醇、3-甲基戊醇、苯甲醇、2-苯乙醇、2-苯基-乙-2-醇、丙-2-酮、丁-2-酮、戊-2-酮、己-2-酮、庚-2-酮、辛-2-酮、壬-2-酮、癸-2-酮、十一烷-2-酮、十二烷-2-酮、十三烷-2-酮、十五烷-2-酮、戊-3-酮、辛-3-酮、3-甲基戊-2-酮、4-甲基戊-2-酮、甲基己-2-酮、羟基丙-2-酮、庚-5-烯-2-酮、4-甲基戊-3-烯-2-酮、辛烯-3-酮、辛-1,5-二烯-3-酮、壬烯-2-酮、十一烯-2-酮、甲基咪喃基酮、苯基丙-2-酮、苯丙酮、丁酸甲酯、己酸甲酯、辛酸甲酯、癸酸甲酯、十四烷酸甲酯、十六烷酸甲酯、肉桂酸甲酯、甲酸乙酯、乙酸

乙酯、丙酸乙酯、丁酸乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、十二烷酸乙酯、十四烷酸乙酯、丁酸乙基-3-甲酯、乙酸丙酯、丁酸丙酯、甲酸丁酯、乙酸丁酯、乙酸戊酯、甲酸异戊酯、乙酸异戊酯、丙酸异戊酯、丁酸异戊酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二甲酯、乙酸2-苯基乙酯、丙酸2-苯基乙酯、丁酸2-苯基乙酯、3-甲硫基丙醇、甲硫醇、硫化氢、二甲基二硫、二甲基三硫、二甲基四硫、甲基乙基二硫、二乙基二硫、2,4-二硫杂戊烷、甲硫基丙醛、3-甲硫基-2,4-二硫杂戊烷、2,4,5-三硫杂己烷、1,1-双-甲硫基二硫、甲硫醇乙酸酯、硫代丙酸甲酯、硫代苯甲酸甲酯、噻吩-2-醛、甲基吡啶、对乙基苯酚、对甲酚、乙醛、丁醛、2-甲基丁醛、3-甲基丁醛、2-甲基丙醛、己醛、庚醛、壬醛、2-甲基丁烯-2-醛、苯甲醛、乙酸3-甲基庚酯、1-丁醇、1-丁醇、3-甲基、1-庚醇、甲酸、1-己醇-2-乙基、1-辛醇、2-丁酮、2-庚-1-醇、2-己酮、庚醛、2-辛烯-1-醇、1-辛烯-3-醇、2-戊酮、2,3-丁二酮、3-丁烯-1-醇、5-庚烯-2-酮、辛烷、乙醇、2,3-丁二酮、2庚酮、1-丁醇、丁酸、壬醛、乙酸、1,3丁二醇、甲基-3-丁烯苯乙基醇、甲苯、1-戊醇、3-辛烯-1-醇、2辛烯-1-醇、2-十一烷酮、1-辛醇、苯甲醛、1-庚醇、2-庚酮、4-甲基-2-壬酮、2-甲基-2-壬醇、1-己醇、2-甲基2-丙醇、乙醇、3甲基1-丁醇、1-己醇、2-甲基2-壬醇、2-壬酮、2-庚酮、4-甲基、1-庚醇、1-辛醇、2辛烯-1-醇、3-辛烯-1-醇、1-辛醇、1-庚醇、2-庚酮、4-甲基-2-壬酮、2-十二烷醇、2-十二烷酮、3-癸烯1-醇乙酸酯、苯甲醇、苯乙醇、2-甲氧基4-乙基苯酚、3-癸烯1-醇乙酸酯、2-十二烷酮、2-十二烷醇或2-甲氧基4-乙基苯酚。

[0135] 在一些实施例中,改良的风味归因于挥发性风味化合物的含量减少,例如苯甲醛、2-甲基-2-丙醇、苯乙酮、辛烷、乙醇、2-戊酮、戊醛、2庚酮、1-丁醇、1-己醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-2-壬醇、2-壬酮、1-辛醇、2-十一烷酮、2-辛烯-1-醇(Z)、1-辛烯-3-醇、苯乙酮、4-甲基-2庚酮、壬醛、乙酸、3-甲基呋喃、2-甲基呋喃、1-己醛、呋喃、2-甲基-2-丙醇、吡嗪、1-庚醛、2-乙基呋喃、2-戊基呋喃或1,3丁二醇。

[0136] 在一些实施例中,所述方法进一步包含制备一种具有受控的风味特征的培养的非乳制产品(例如干酪仿品、酸奶、酸奶油或法式鲜奶油),其通过在仿品制作过程的任何时间点受控添加本文所描述的风味添加剂的限定组合到非乳源中来进行。例示性添加剂和特定组合描述于本文中。

[0137] 风味生成剂

[0138] 通过添加细菌/微生物控制风味

[0139] 风味化合物可以由用于生产本文所描述的许多不同非乳制产品(包括干酪仿品)的非动物来源的材料中的微生物生成。调味方法一般来说包括使非乳制奶或蛋白质溶液与一或多种微生物接触,和从非乳制奶制备培养的非乳制产品。微生物(例如细菌、酵母或霉菌)可以用以产生具有所要风味特征的产品,或用作产品中的风味的组分,如细菌可以在中性、植物味或豆味产品中产生所需风味(例如黄油味、奶油味、乳味或干酪味)。

[0140] 例示性非乳制奶描述于本文中。可以使任何非乳制干酪奶或其组合与一或多种微生物(例如受控量的细菌)接触以控制所得培养的非乳制产品(例如干酪仿品)的风味。微生物可以选自细菌、酵母或霉菌。细菌可以包含嗜温性和/或嗜热性细菌。细菌可以包含来自商业发酵剂的细菌。例示性商业发酵剂描述于本文中。

[0141] 仿品中的风味产生可以通过使用一或多种微生物来控制,所述微生物例如一或多种细菌、酵母或霉菌,包括但不限于乳球菌属,例如乳酸乳球菌乳酸亚种(LLL,单独或作为商业混合物MA11的组分使用)、乳酸乳球菌乳脂亚种(LLC,单独或作为商业混合物MA11的组

分使用)或乳酸乳球菌丁二酮变种(LLBD,通常以商业培养物MD88形式使用);乳杆菌属,例如德氏乳杆菌乳酸亚种、德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌或鼠李糖乳杆菌;明串珠菌属,例如肠膜明串珠菌乳脂亚种(LM);链球菌属,例如嗜热链球菌(ST,通常以商业培养物TA61形式使用);小球菌属,例如戊糖小球菌;梭菌属,例如丁酸梭菌;葡萄球菌属,例如木糖葡萄球菌(SX);短杆菌属,例如亚麻短杆菌;丙酸杆菌属(*Propionibacteria species*);青霉菌属,例如白青霉、沙门柏干酪青霉或罗克福尔青霉;德巴利酵母属,例如汉逊德巴利酵母;地霉属,例如白地霉;棒状杆菌属;轮枝菌属,例如蜡蚧轮枝菌;克鲁维酵母属,例如乳酸克鲁维酵母;酵母属,例如酿酒酵母;假丝酵母属,例如杰法尔假丝酵母(*Candida jefer*)或产朊假丝酵母;红冬孢酵母属,例如英佛红冬孢酵母;微球菌属;盐单胞菌属;嗜冷杆菌属。在一些实施例中,使用乳酸菌,例如乳杆菌属、明串珠菌属、小球菌属、乳球菌属或链球菌属。在一些实施例中,细菌不包含嗜酸乳杆菌菌株。在一些实施例中,可以使用酵母,例如酿酒酵母、乳酸克鲁维酵母和/或汉逊德巴利酵母。在一些实施例中,霉菌可以是白青霉、沙门柏干酪青霉、罗克福尔青霉、白地霉或其组合。

[0142] 在一些实施例中,使用以下微生物中的一或多者:戊糖小球菌、丁酸梭菌、德氏乳杆菌乳酸亚种、德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、木糖葡萄球菌和亚麻短杆菌。

[0143] 一或多种微生物可以单独(例如细菌、酵母或霉菌单独)或以与两种或两种以上微生物的组合(例如两种不同细菌、两种不同酵母、两种不同霉菌、一种细菌和一种酵母、一种细菌和一种霉菌或一种酵母和一种霉菌)培养。当使用两种或两种以上微生物时,可以对微生物进行共同培养或依序培养,即可以培养一种微生物一段时间、随后添加另一种微生物。将用于仿品中的风味生成的特定制品组合用SX预培养,接着用TA61或MD88或与MA11共同培养的MD88培养。

[0144] 微生物的生长条件也可以控制仿品中的风味生成。 $4^{\circ}\text{C}$ 到 $45^{\circ}\text{C}$ 范围内的微生物生长温度可以控制仿品中产生的风味化合物的量和类型。通过振荡进行的通气的量(例如0到300rpm)改变非乳培养基中的许多不同细菌的风味产生。在通过SX、TA61或MD88任一者培养期间的通气越大,产生越多所要干酪和黄油味化合物。通气还减少非所要风味化合物。当SX、MD88或TA61在通气的环境下培养时,所要干酪化合物(例如2-庚酮)增加。干酪仿品中己酸甲酯的MD88产生还通过通气来调节。在于豆奶中培养期间SX的通气的增加在干酪仿品中极大地增加3-甲基和2-甲基丁酸产生,并且减少非所要气味化合物(例如2-乙基呋喃或2-戊基呋喃)的量。

[0145] 培养一或多种微生物的时间量也可以调节风味化合物的量和类型。培养可以在1小时到多天范围内。在一些实施例中,将一或多种微生物和非乳制奶一起孵育1分钟-60分钟、0.5-5小时、3-10小时、6-15小时、10-20小时或超过20小时的范围内的一段时间。大部分黄油味化合物在前10小时内产生,而其它干酪化合物典型地需要24-48小时或48以上。丁内酯,一种奶油状奶味特色的化合物在非乳培养基中通过MD88和MA11在于豆奶中仅20小时培养之后产生。

[0146] 一或多种微生物还可以按不同接种菌量,例如 $10^2$ - $10^9$ cfu/mL或甚至更大来添加。细菌培养物的生长期(即静止期对比指数期)和细胞密度影响培养基的风味化合物特征。较高接种菌量的发酵剂培养物可以保护仿品免受不合需要的微生物污染(例如细菌污染)。因

此,通常使用 $10^6$ - $10^9$ cfu/mL的接种菌量。

[0147] 通过一或多种微生物的风味产生还可以通过引导代谢路径,例如通过调节其氮源、碳源、其它可用营养素和生长条件来调节。可以使用的添加剂的非限制性实例展示于表A中。添加剂可以与细菌同时或在仿品产生期间的任何时间添加到培养基中。当进行连续培养时,其它添加剂可以在接种其它菌株的同时进行添加。

[0148] 表A

[0149] 用以控制非乳制仿品中借助微生物的风味产生的添加剂

[0150]	FeCl <sub>2</sub>	Asp	C8:0, 羊脂酸
	MgCl <sub>2</sub>	Cys	C10:0, 羊蜡酸
	CaCl <sub>2</sub>	谷氨酰胺	C12:0, 月桂酸
	MnSO <sub>4</sub>	谷氨酸盐	C14:0, 肉豆蔻酸
[0151]	CoCl <sub>2</sub>	Gly	C16:0, 棕榈酸
	CuSO <sub>4</sub>	His	C18:0, 硬脂酸
	ZnSO <sub>4</sub>	Ile	C16:1, 棕榈油酸
	腺嘌呤	Lue	椰子油
	鸟嘌呤	Lys	蓖麻油
	肌苷	Met	棕榈油
	尿嘧啶	Phe	棕榈果油
	黄嘌呤	Pro	荷荷巴油
	吡哆胺	Ser	葵花油
	吡哆醇	The	芒果脂
	D-山梨糖醇	Trp	Ala
	柠檬酸	Tyr	Arg
	乳酸	Val	Asn
	$\alpha$ -酮戊二酸盐	核黄素	FAD
	丙酮酸	硫胺素	NAD
	乳清酸	硫辛酸	生物素
	草酸	烟酸	泛酸盐
	抗坏血酸	CoA 水合物	B12
	琥珀酸	丙酸	叶酸
	对氨基苯甲酸	C4:0, 丁酸	
DL-苹果酸盐	C6:0, 羊油酸		

[0152] 糖的量和类型是产生的风味(包括黄油味化合物)的类型的大驱动因素。在一些实施例中,糖天然存在于非乳制奶中。仅作为实例,蔗糖存在于多种坚果(例如杏仁)中,其可以用以提供用于制备干酪仿品的非乳制奶。在一些实施例中,添加受控量的一或多种糖到非乳制奶或非乳制干酪源中。

[0153] 在一些实施例中,糖是单糖,包括但不限于葡萄糖(右旋糖)、果糖(左旋糖)、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖(D-或L-木糖)和核糖;二糖,包括但不限于蔗糖、乳糖、蜜二糖、海藻糖、纤维二糖和麦芽糖;糖醇,例如阿拉伯糖醇、甘露糖醇、半乳糖醇或山梨糖醇;糖酸,例如半乳糖醛酸盐、葡萄糖醛酸盐或葡萄糖酸盐;寡糖和多糖,例如葡聚糖;淀粉,例如玉米淀

粉、马铃薯淀粉；果胶，例如苹果果胶或橙子果胶；棉籽糖、水苏糖和葡聚糖；植物细胞壁降解产物， $\beta$ -半乳糖苷、 $\beta$ -葡萄糖苷，例如水杨苷；和/或糖衍生物，例如N-乙酰葡萄糖胺。在特定实施例中，糖选自以下组成的群组蔗糖、麦芽糖、葡萄糖和果糖。

[0154] 可以通过添加所述一或多种糖来控制每种经分离的菌株的相对生长。添加所述一或多种糖可以产生具有显著改良的质地和风味的非乳制干酪仿品。实践本发明的一个用户，例如一个个体或多个个体可以选择特定经分离的菌株，并且添加受控量的所选菌株以产生具有所要风味和质地特征的非乳制干酪仿品。一个用户可以另外选择特定糖，并且将受控量的所选糖与受控量的特定经分离的菌株一起添加以产生具有所要风味和质地特征的非乳制干酪仿品。表B提供了产生在非乳制干酪或其它非乳制产品中产生的乳味风味特色的细菌培养条件的非限制性实例。

[0155] 表B

属	种	亚种	生长温度	通气	糖偏好(基于生成时间)
乳球菌属	乳酸	乳脂	30C (25-40C)	是	葡萄糖=果糖 >麦芽糖 >蔗糖*
乳球菌属	乳酸	乳酸	30C (25-40C)	是	葡萄糖=果糖=蔗糖 >麦芽糖*
明串珠菌属	肠膜	乳脂	30C (25-35C)*	是	葡萄糖=果糖=麦芽糖 >蔗糖
乳球菌属	乳酸	丁二酮变种	30C (25-40C)	是	葡萄糖 >果糖=蔗糖=麦芽糖
链球菌属	嗜热		37C	否	葡萄糖 >麦芽糖
乳杆菌属	德氏	乳酸	37C	否	葡萄糖 >麦芽糖
乳杆菌属	德氏	保加利亚	37C	否	葡萄糖 >麦芽糖
[0156] 乳杆菌属	瑞士		37C	否	葡萄糖 >麦芽糖
乳杆菌属	植物		37C	否	葡萄糖=麦芽糖
乳杆菌属	干酪		37C	否	葡萄糖 >麦芽糖
乳杆菌属	鼠李糖		37C	否	葡萄糖 >麦芽糖
葡萄球菌属	木糖		30C	是	葡萄糖 >麦芽糖
小球菌属	戊糖		30C		麦芽糖 >葡萄糖
梭菌属	丁酸		37C	否	葡萄糖 >麦芽糖

[0157] \*这个亚种的不同菌株的大变化

[0158] 不同糖和微生物对风味产生的作用还取决于起始材料的类型和组成(例如起始材料可以包括任何非动物来源的材料,包括但不限于豆奶、豌豆蛋白、绿豆蛋白、大豆蛋白、椰子奶、酵母提取物、蛋白水解物、衍生培养基和合成培养基);和起始材料中的蛋白质的氨基酸组成;所包括的糖和碳水化合物的类型;和所存在的脂肪、三酸甘油酯和/或游离脂肪酸的类型。蛋白质的氨基酸组成可以通过酶分解,例如由微生物产生的那些和作为配方的一部分添加的那些,并且所得氨基酸或肽可以充当特定风味分子的前驱体。合成培养基是指使用铵作为氮源和限定糖作为碳源,具有任何其它添加剂。起始材料可以包含经分离提纯的蛋白质或粗植物提取物。

[0159] 在添加有麦芽糖的酵母提取物培养基中MD88 (LLBD) 以最大丰度产生乙偶姻和丁二酮(“黄油味”化合物)。另一个方面,在添加有葡萄糖的豆奶中MD88产生更多的这些黄油味化合物。在添加柠檬酸盐或丙酮酸盐的情况下MD88和TA61 (ST) 以更高量产生乙偶姻和丁二酮。乙偶姻/丁二酮和2,3-己二酮浓度都响应于用菌株MD88制作的干酪仿品中柠檬酸盐浓度的增加而增加。

[0160] 添加氨基酸(参看表A)可以直接控制非乳制仿品中的特定风味化合物的产生。这些风味化合物的产生有助于仿品的总风味特征。可以添加甲硫氨酸到干酪仿品或培养基中通过SX产生甲硫基丙醛或通过短杆菌属产生二甲基三硫。甲硫基丙醛和二甲基三硫是见于许多乳酪中并且促成切达干酪的老化特征的两种硫化物。添加到豆奶、酵母提取物培养基或豌豆蛋白中的亮氨酸显著增加借助SX细菌的3-甲基丁酸产生,添加干酪味特色。添加多种化合物可以进一步控制借助细菌的风味产生,例如 $\alpha$ -酮戊二酸盐与亮氨酸一起增加借助SX细菌的3-甲基丁酸产生。3-甲基丁酸具有干酪味气味和味道,其类似于丁酸,其是美国干酪和切达干酪中的关键风味。有机酸也可以控制非乳制仿品中借助细菌的风味产生。添加到酵母提取物培养基中并且通过短杆菌属培养的草酸盐产生干酪化合物丁酸、3-甲基丁酸和2,6-壬二烯醛,并且生成的风味被描述为“老化干酪”。当添加到TA61的培养物中时,黄油味化合物的产生可以通过添加柠檬酸盐、黄嘌呤和丙酮酸盐来控制。添加柠檬酸、丙酮酸盐、核黄素和铜可以影响借助MD88的干酪和黄油味风味产生。当添加异亮氨酸、脯氨酸、丙氨酸、苹果酸盐、肌苷、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、丝氨酸和硫胺素到仿品中时,产生其它重要气味化合物,如丁酸衍生物和2-庚酮。另外, $\text{ZnSO}_4$ 、柠檬酸、乳酸、丙酮酸、琥珀酸、苹果酸、天冬氨酸、赖氨酸、酪氨酸、缬氨酸和荷荷巴油允许在仿品中借助TA61产生所要干酪风味化合物。每种添加剂的作用取决于其它陈述材料的组成。

[0161] 可以在细菌培养之前或在培养之后添加其它添加剂。这些添加剂包括但不限于水果提取物(0.0001%-0.2%wt/vol)、果泥(桃、菠萝、草莓、芒果、番木瓜、李子等)(0.001%-2%wt/vol)、蔬菜泥(马铃薯、甘薯、洋葱、大蒜或椰菜)(0.001%-2%wt/vol)、糖蜜(0.001%-2%wt/vol)、酵母提取物(0.001%-2%wt/vol)、蛋白水解物(0.01%-10%wt/vol)、红或白味噌(0.01%-2%wt/vol)、椰子奶(0.5%-60%)、麦芽提取物(0.01%-2%wt/vol)或椰子奶油(0.5%-60%)和其组合。麦芽提取物和糖蜜可以添加干酪风味分子,如3-甲基丁醛、2-甲基丁醛、2-庚酮、丁酸或丁内酯。添加有桃提取物或果泥的仿品由经训练的风味科学家描述为具有更多奶油风味。添加有番木瓜的仿品由经训练的风味科学家描述为更多干酪味,并且通过GCMS可知3-甲基丁酸有所增加。添加到MD88培养物中的红味噌和添加到TA61培养物中的白味噌导致风味复杂性改良并且由经训练的风味科学家感知的涩味减少。

[0162] 酵母提取物可以控制细菌生长和风味生成,并且促成不同起始风味。酵母提取物中存在许多改良仿品中的TA61的生长的维生素。所有酵母提取物都是不相同的。与其它酵母提取物相比,在风味之家(Flavor House) Flavor Spark和BioSpringer酵母提取物2020的情况下TA61生长更大。针对MD88和TA61,BioSpringer酵母提取物2020支持制品生长和合宜的风味开发。酵母提取物可以在培养基的0.01%-2%wt/vol之间添加以改良细菌的生长和风味产生。酵母提取物可以按0.02%-0.1%添加,改良细菌的生长和风味产生。酵母提取物本身还可以向产品提供某些风味,包括肉汤味、乳清、坚果味、香薄荷、烘烤、麦芽味、焦糖、煮熟的奶、淡硫磺味和微像干酪的。酵母提取物还支持风味化合物借助TA61、MA88和SX

的产生,所述风味化合物导致仿品具有更多干酪味和复杂风味。

[0163] 在一些实施例中,将可以用以改变风味的一或多种微生物、非乳制干酪源和一或多种任选的组分(例如糖、脂肪、碳水化合物、维生素、有机酸、核苷酸或食物产品)一起孵育一段充足时间以实现所要pH。pH可以在pH 3-5、4-6或4.3-5.7范围内。所要pH可以是pH 6或更低、pH 5或更低或pH 4或更低。在一些情况下,通过细菌培养材料将pH降低到6.5、6、5.5、5、4.5、4或3.5,而在其它情况下,在pH无改变的情况下生成风味。用乳球菌属、乳杆菌属、明串珠菌属、小球菌属和/或链球菌属培养典型地导致大部分起始材料的pH降低,而用葡萄球菌属、短杆菌属和/或梭菌属培养典型地对pH具有极少或无作用。

[0164] 在一些实施例中,所述方法进一步包含使所述非乳制干酪源凝固。凝固方法描述于本文中。

[0165] 在一些实施例中,所述方法包含从异源群体,例如商业发酵剂或益生菌(例如回春水)分离多种微生物菌株。在一些实施例中,经分离的微生物菌株各自根据限定准则表征。限定准则可以包括例如包含添加于其中的不同糖的非乳制干酪源中的生长速率。限定准则可以包括每种经分离的菌株对风味选项板的贡献,通过表征有经分离的菌株添加于其中的干酪仿品与无经分离的菌株添加于其中的对照干酪仿品相比的风味特色。经分离的微生物菌株可以通过遗传测序和/或测定每种经分离的菌株所特有的序列来表征。

[0166] 在一些实施例中,所述方法进一步包含制备具有受控的风味特征的干酪仿品,其通过受控添加经分离的菌株的特定组合以向干酪仿品提供一批所要风味特色。

[0167] 在另一个方面,本发明提供一种经分离的微生物菌株的库。在一些实施例中,选择库中的经分离的菌株以向非乳制干酪提供风味特征选项板。在一些实施例中,经分离的微生物菌株是细菌菌株。在一些实施例中,经分离的菌株从商业发酵剂培养物(例如可商购的细菌培养物)分离。在一些实施例中,商业发酵剂培养物是嗜温性细菌培养物。在一些实施例中,商业发酵剂培养物是嗜热性细菌培养物。例示性商业发酵剂包括例如MA11、MA14、MA19、LM57、MA4002、MM100、TA061、LH100、MD88和Flora Danica。

[0168] 可以通过将商业混合物涂到选择性或非选择性生长培养基(例如雷迪(Reddy's)选择性琼脂、LB琼脂)上来分离菌株。在一些实施例中,个别菌株的单一细菌细胞将在所述生长培养基上生长成离散菌落。在一些实施例中,可以通过PCR筛选个别菌落。在一些实施例中,PCR可以包括使用含有微生物物种的所有菌株所共有的序列的通用引物,或可以包括使用包含微生物群体的特定亚种所特有的序列的引物。可以对PCR产物测序,并且将序列与例如基因库(Gen Bank)中的已知序列以及彼此相比较。可以进行pH特征、糖发酵、雷迪选择性琼脂上的表型和更广泛测序以帮助进一步鉴别和表征个别菌株。

[0169] 在一些实施例中,选择细菌菌株以向非乳制奶干酪提供一批风味和质地或其它限定特征。在乳制奶中,LLL菌株典型地更快速生长并且快速酸化奶,而LLC菌株更缓慢生长并且提供更多风味。在乳制奶中,LLBD和LM两者都提供其它风味化合物,尤其丁二酮,其向干酪提供黄油味味道。可以选择一或多种经分离的细菌菌株(例如LLL)以快速酸化非乳制奶,例如pH在一小时内下降,或pH在少于15小时中从6.3到4.3的总下降。为了较慢生长特征,可以选择一或多种经分离的细菌菌株(例如LLC),其中风味化合物的产生更大,并且pH的降低不太显著,例如在15小时中从6.3仅到5.4。这种减缓的生长速率可以用以例如提供干酪制作者对调味过程的更大控制,并且更紧密地调节非乳制干酪仿品的所得味道特征。一或多

种经分离的细菌菌株可以用以向非乳制干酪提供不同风味特征。不同风味特征可以通过特定挥发性化学物质从仿品的释放来表征。举例来说,一些细菌菌株(例如LLBD和LM)当与非乳制奶或蛋白质溶液接触时可以用以产生丁二酮。丁二酮可以在所得非乳制干酪中产生黄油味风味。

[0170] 发现单一使用直投型培养物,例如MA11和Flora Danica (FD),当用以制作软新鲜(SF,使用MA11)和软成熟(SR,使用MA11和FD)干酪时,提供相当均一但受限的特征风味和质地特征。为了允许一批大得多的风味和质地能力,将个别细菌菌株从商业制剂(例如Flora Danica和MA11)分离和表征。可以将这些经分离的菌株以新的并且变化的组合并且以各种比例组合以产生范围大得多的风味和质地可能性。

[0171] 一般来说,乳制奶中的主要糖是乳糖,其不存在于非乳制奶中。当将受控量的细菌(例如受控量的一或多种本发明的经分离的菌株)并入包含一或多种糖的非乳制干酪仿品中时,糖和细菌菌株的特定组合可能会以出乎意料的方式改变所得非乳制干酪仿品的味道和质地特征。所述特定组合可以用以制备具有受控的风味特征的干酪仿品,例如用以制备精确模拟特定乳酪的风味的干酪仿品,例如仅作为非限制性实例,所述乳酪是加工干酪、瑞士干酪、手撕干酪、意大利乳清干酪、波萝伏洛干酪、帕尔马干酪、门斯特干酪、马苏里拉干酪、杰克干酪、曼彻格干酪、蓝干酪、芳提娜干酪、菲达干酪、伊顿干酪、双层格罗斯特干酪(double Gloucester)、卡门贝尔奶酪、切达干酪、布里干酪、阿齐亚戈干酪和哈瓦蒂干酪(Havarti)。

[0172] 可以选择所要风味和质地特征以模拟特定乳酪的风味和质地。仅作为实例,通过选择和添加受控量的一或多种本发明的经分离的细菌菌株和任选地选择和添加受控量的一或多种糖,用户可以形成模拟例如以下各者的风味和质地特征的非乳制干酪仿品:加工干酪、瑞士干酪、手撕干酪、意大利乳清干酪、波萝伏洛干酪、帕尔马干酪、门斯特干酪、马苏里拉干酪、杰克干酪、曼彻格干酪、蓝干酪、芳提娜干酪、菲达干酪、伊顿干酪、双层格罗斯特干酪、卡门贝尔奶酪、切达干酪、布里干酪、阿齐亚戈干酪和哈瓦蒂干酪。

[0173] 非乳制干酪的质地和风味特征可以通过本领域中已知或本文所描述的任何方法来确定。

[0174] 为了在仿品或其它非乳制产品或添加到非乳制产品中的调味溶液/糊状物中生成乳样风味,可以使用特定菌株以生成干酪味、黄油味、奶油味、奶味或其它所要风味化合物。关于可以产生的乳味风味化合物的非限制性实例,参看表C。表C还提供在非乳制仿品中如何产生指定风味化合物的实例。

[0175] 表C

[0176]

化合物	嗅觉类型	用以形成的细菌	添加剂, 起始材料
2-甲基丁醛	可可、咖啡、坚果味	TA61	钙离子、脯氨酸于酵母提取物培养基中
3-甲基丁醛	巧克力、桃味、多脂	SX 与 MD88	豌豆豌豆球蛋白与椰子奶和酵母提取物
乙偶姻	甜味黄油味、奶油味、乳奶味、多脂	MD88 或 TA61	豆奶(加丙酮酸盐)
		MD88	酵母提取物培养基加麦芽糖
		MD88 或 TA61	黄嘌呤、柠檬酸盐、丙酮酸盐于酵母提取物培养基中
丁二酮	黄油味、奶油味、奶味	MD88 或 TA61	黄嘌呤、柠檬酸盐、丙酮酸盐酵母

[0177]

			提取物培养基
		TA61 或 MD88	豆奶(加丙酮酸盐)
2,3-己二酮	奶油味、黄油味、果味、焦糖味	MD88	柠檬酸盐与<50 mM 葡萄糖于酵母提取物培养基中
己酸甲酯	果味菠萝	MD88	酵母提取物培养基
2-甲基丁酸	果味、酸味, 具有乳黄油味和干酪味细微差别	SX	缬氨酸+ >20 mM 葡萄糖
3-甲基丁酸	干酪味、乳味、奶油味、发酵、甜味、蜡味	SX	亮氨酸+ >20 mM 葡萄糖( $\alpha$ -酮戊二酸盐提供进一步增加)
		短杆菌属	草酸盐+酵母提取物培养基
丁内酯	奶味、奶油味, 具有果味像桃的后特色	MD88 或 TA61	>20 小时培养豆奶
甲硫基丙醛	霉味西红柿、马铃薯、霉成熟干酪	MD88	甲硫氨酸, 添加到豆奶、豌豆豌豆球蛋白或酵母提取物中
二甲基三硫	硫磺味、香薄荷	短杆菌属	甲硫氨酸
丁酸	干酪味、乳味、奶油味、浓郁	丁酸梭菌	淀粉、玉米浆(厌氧培养)
		短杆菌属	草酸盐+酵母提取物培养基
		SX	豌豆豌豆球蛋白+椰子奶+酵母提取物
2-庚酮	干酪、果味、椰子	MD88 或 TA61	豆奶未添加糖, 振荡
2-十一烷酮	蜡味、果味, 具有奶油味像干酪的特色	MD88	甲硫氨酸或亮氨酸, 添加到酵母提取物培养基中
2-壬酮	绿色、草药味、干酪味、新鲜	MA11	CuSO <sub>4</sub> 或丙氨酸于酵母提取物培养基中
丙酸	酸味和乳样	短杆菌属	草酸盐+酵母提取物培养基
2-甲基丙酸	腐臭黄油	短杆菌属	草酸盐+酵母提取物培养基
		SX	缬氨酸+酵母提取物培养基
己酸	酸味多脂汗味干酪	SX	> 5 mM 葡萄糖于具有椰子油的酵母提取物培养基中
辛酸	多脂蜡味腐臭油性蔬菜干酪味	SX	> 5 mM 葡萄糖于具有椰子油的酵母提取物培养基中
丁酸乙酯	果味、甜味		
2-丁酮	像丙酮的、果味、奶油硬糖	TA61	Ile、硫胺素、镁离子或抗坏血酸于酵母提取物培养基中
乙酸	酸味	SX	<葡萄糖于所有系统中
癸酸	腐臭酸味多脂膻味	SX 接着是 MD88 或 TA61	豌豆豌豆球蛋白+椰子奶(具有酵母提取物)
甲基异丁基酮	草药味、果味和乳味细微差别	SX 接着是 MD88	豌豆豌豆球蛋白+椰子奶(具有酵母提取物)
$\gamma$ -辛内酯	甜味、椰子、蜡味、奶油味、香豆属、乳味、多脂	SX+TA61	豌豆豌豆球蛋白+椰子奶(具有酵母提取物)
$\delta$ -辛内酯	甜味、多脂、椰子、香豆属、热带乳味	SX+TA61	豌豆豌豆球蛋白+椰子奶(具有酵母提取物)
$\gamma$ -壬内酯	椰子、奶油味、蜡味、多脂	SX + MD88	豌豆豌豆球蛋白+椰子奶(具有酵母

	奶味		提取物)
[0178]	5-羟基-4-辛酮	黄油味	SX 接着是 TA61 豆奶
	辛酸乙酯	甜味、蜡味、果味和菠萝与奶油味和多脂	SX + MD88 酵母提取物培养基与椰子奶
	2-乙基-1-己醇	甜味、果味、多脂	TA61 维生素 B12、核黄素、硫胺素、辅酶 A 或酮戊二酸盐于酵母提取物中

[0179] 应了解,许多不同类型的细菌可以制作黄油味化合物。MD88和TA61都非常善于在非乳制培养基和干酪仿品中产生黄油味化合物。它们两者都可以在豆奶、经提纯的豌豆蛋白、经提纯的大豆蛋白、经提纯的绿豆蛋白和酵母提取物培养基中产生黄油味化合物2,3-丁二酮、乙偶姻和2,3-己二酮。另外,LLC、LLL和SX也可以在仿品中产生黄油味化合物。另外,风味的更大优化可以来自对黄油化合物的每个浓度的控制;在豆奶中,MD88产生更多乙偶姻,而TA61产生更多丁二酮。

[0180] 在一些实施例中,黄油味特色可以通过选择特定菌株(例如LLBD、LM、LF2、LF5和嗜热链球菌)和/或选择特定糖(例如葡萄糖、果糖或蔗糖)以使用而增强。在一些实施例中,黄油味特色与挥发性风味化合物的含量增加相关。挥发性风味化合物可以是例如乙偶姻、2,3-丁二酮和丁酸。在一些实施例中,挥发性风味化合物可以是例如2-庚酮、壬醛、丁醇、1-己醇、2-庚酮、4-甲基、乙酸乙酯或2-壬酮。

[0181] 在一些实施例中,黄油味特色可以通过选择和添加受控量的LM而减少。

[0182] 在一些实施例中,所述黄油味风味可以通过从由以下组成的群组选择一或多种糖而减少:葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽糖。

[0183] SX和短杆菌属特别善于生成干酪味化合物,包括3-甲基-丁酸、2-甲基丁酸和2-甲基丙酸。SX和短杆菌属当在脂肪存在下培养时还可以用以生成游离脂肪酸,包括丁酸、丙酸、十二烷酸、十一烷酸、壬酸、辛酸和己酸。当SX在椰子油存在下培养时,产生短和中等链长的游离脂肪酸。TA61还可以在非乳制仿品中产生其它类型的干酪风味化合物,包括2-庚酸和2,4-庚二烯醛。存在在向特定干酪提供特征风味方面重要的硫化物,包括但不限于二甲基三硫和甲硫基丙醛,其可以在非乳制培养基中通过SX和短杆菌属生成。

[0184] 其它细菌培养物(包括LR)可以驱动花香风味产生,并且奶油味特色可以在仿品中通过LBB产生。在一些实施例中,果味特色通过从由以下组成的群组选择菌株而增强:LLBD、LM、LLL、LLC、LF2、LF5和嗜热链球菌菌株。在一些实施例中,果味特色通过从由以下组成的群组选择糖而增强:葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽糖。

[0185] 在一些实施例中,酸味特色通过从由以下组成的群组选择菌株而增强:LLBD和LM菌株。在一些实施例中,酸味特色通过从由以下组成的群组选择糖而增强:葡萄糖、麦芽糖和蔗糖。在一些实施例中,酸味特色与挥发性风味化合物的含量增加相关。挥发性风味化合物可以是例如乙酸、2-甲基丁酸、己酸、丙酸和辛醇。

[0186] 在其它实施例中,酸味特色通过从由以下组成的群组选择菌株而增强:LLL、LLC和LM。在特定实施例中,酸味特色通过从由以下组成的群组选择糖而增强:葡萄糖和蔗糖。在一些实施例中,酸味特色由挥发性风味化合物的含量增加表征。挥发性风味化合物可以是例如壬醛或丁酸。

[0187] 在一些实施例中,花香特色可以通过从由以下组成的群组选择菌株而增强:LLL、

LLC和LM。在一些实施例中，花香特色可以通过从由以下组成的群组选择糖而增强：葡萄糖、果糖、麦芽糖和蔗糖。在一些实施例中，花香特色归因于挥发性风味化合物（例如壬醇）的含量增加。

[0188] 在一些实施例中，甜味特色通过选择LLBD菌株而增强。在特定实施例中，甜味特色通过添加糖而增强。在一些实施例中，添加糖到0-150mM的最终浓度。在一些实施例中，添加糖到约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140或150mM的最终浓度。在一些实施例中，糖是葡萄糖、麦芽糖、果糖或蔗糖。

[0189] 在一些实施例中，包含LLC、LLL、LM和LLBD的非乳制干酪的甜味风味可以通过添加糖而增强。糖可以是例如葡萄糖、麦芽糖、果糖、蔗糖或其任何组合。在一些实施例中，增加的甜味风味归因于挥发性风味化合物的含量增加。在一些实施例中，挥发性风味化合物是丁酸。

[0190] 在一些实施例中，可以选择菌株以增强非乳制干酪的橘风味特色。在一些实施例中，增强的橘风味特色归因于挥发性风味化合物（例如壬醛、柠檬烯和1-辛醇）的含量增加。

[0191] 在一些实施例中，可以选择菌株以增强非乳制干酪的蘑菇风味特色。在一些实施例中，增强的蘑菇风味特色归因于挥发性风味化合物（例如1-辛烯-3-醇、1-己醇和1-庚醇）的含量增加。

[0192] 在一些实施例中，添加细菌减少和或遮蔽非所要风味，包括大豆风味、豆味风味、植物味风味、草味风味和涩味。如本文所述，添加SX减少或遮蔽仿品的“大豆”和“绿色”风味和气味；添加亮氨酸到SX培养物中造成“大豆”特色的甚至更大幅减少。仿品中MD88的生长快速减少苯甲醛，豆奶中的一种不正味道。豆奶和其它植物来源的材料中所存在的大豆（绿色、谷物）气味随培养的材料中椰子奶百分比的增加而减少。特征非所要气味：戊烯醇、戊醇、2-戊基-呋喃和1-己醇也随椰子奶百分比的增加而减少。由2-6名成员的训练的感官小组评价和比较样品。

[0193] 当前可获得的坚果奶类干酪的限制是在干酪中存在非所要坚果味风味。坚果味风味可能会减损干酪的味道特征并且使干酪似乎非乳样的。因此，在一个方面，本发明提供一种具有减少或不可检测的坚果味风味的坚果奶类干酪仿品，和制作其的方法。在一些实施例中，所述方法包含使坚果奶与受控量的乳球菌属细菌和受控量的糖接触。在一些实施例中，坚果味风味通过选择一或多种本文所描述的经分离的菌株而减少。在一些实施例中，坚果味风味通过选择一或多种选自由以下组成的群组的经分离的菌株而减少：LLL、LLC、LM和LLBD。在一些实施例中，坚果味风味通过从由以下组成的群组选择糖而减少：葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽糖。在一些实施例中，减少的坚果味风味与挥发性风味化合物的含量减少相关。在一些实施例中，所述风味化合物是苯甲醛或2-甲基-2-丙醇。

[0194] 非乳制干酪培养物可以由包括但不限于以下的不同糖源制作：葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖和或半乳糖。培养的材料可以制作成固体样干酪或以液体培养材料形式使用。

[0195] 还可以通过添加呈单一化合物形式或呈复杂产品混合物形式的人造或天然风味对仿品进行调味。可以添加脂肪酸（0.001%-0.5%之间）到仿品中，并且这些仿品由经训练的风味科学家描述为在添加脂肪酸的情况下具有更多干酪味。添加到仿品干酪中的化合物包括但不限于2,3丁二酮、乙偶姻、丁酸、5,6癸烯酸、 $\gamma$ -庚内酯、 $\gamma$ -己内酯、 $\gamma$ -辛内酯、 $\gamma$ -癸内酯、 $\gamma$ -壬内酯、 $\gamma$ -十一内酯、 $\delta$ -癸内酯、 $\delta$ -十二内酯、 $\delta$ -壬内酯、 $\delta$ -辛内酯、 $\beta$ -壬内酯、 $\beta$ -十一

内酯、 $\beta$ -癸内酯、 $\delta$ -十四内酯、硫代丙酸S-甲酯、 $\delta$ -十三内酯、 $\delta$ -十四内酯、 $\delta$ -十四内酯、丁酰乳酸丁酯、异戊酸、2-十一烷酮、戊酸、2-庚酮、2-甲基丁醛、2-壬酮、2-甲基丁酸、癸酸、甲硫基丙醛、辛酸、2-甲基丁醛、3-甲基丁醛、乙基-丁酸酯、己酸和辛酸。复杂混合物包括但不限于椰子奶油、酵母提取物、糖蜜、水果提取物、遮蔽剂、奶油风味促进剂和味噌。风味化合物可以增加干酪味、黄油味、麦芽味、奶油味、椰子、奶味、乳清和果味味道。当存在于干酪仿品中时,这些化合物增加干酪仿品的偏好,并且可以由经训练的风味科学家描述为具有更多干酪味、更多黄油味、更多奶油味、更复合,并且由经训练的风味科学家描述为乳味特色增加。添加风味化合物还可以减少仿品中的不正特色,包括但不限于植物味、豆味、坚果味和酸味特色。添加到仿品中的风味化合物的浓度可以是最终干酪仿品的0.1%到0.000001% vol/wt。复杂风味混合物可以按10%到0.01%添加。风味化合物可以添加到由细菌培养的奶或其它起始材料或酸性凝结的奶或其它起始材料制成的干酪仿品中。添加到仿品中的风味化合物可以与由微生物生成的风味互补。风味化合物还可以在凝结之前添加到非乳制奶中,因此细菌可以使用风味化合物来产生其它化合物。

[0196] 使用酶控制风味和质地

[0197] 一或多种酶可以单独或与任一种描述的培养方法和添加剂组合使用,以帮助调节风味、质地和/或熔融特征,包含使非乳制干酪源与一或多种经分离和提纯的酶接触。酶可以在凝固之前、在凝固之后但在沥出乳清之前或在沥出乳清之后添加。出人意料地,如通过盲法味道测试或通过由例如GCMS对挥发性气味剂的检测所测定,添加痕量的一或多种经分离和提纯的酶(例如蛋白酶、脂肪酶和/或淀粉酶)极大地增强所得非乳制干酪仿品的质地、风味和/或熔融性。使用所述酶还控制借助微生物培养物的风味产生(例如当用淀粉酶预处理豆奶时,TA61产生多得多的丁二酮)。

[0198] 在坚果奶干酪或其它非乳制干酪仿品中,如已经通过盲法品尝者测试者和GCMS所测定,蛋白酶的存在、类型、量和添加时序可以控制风味特征。仅作为实例,具有蛋白酶的植物类干酪仿品被判定为具有更受喜爱的风味特征、更复杂的风味特征、品尝起来更像乳酪的风味特征,并且在一些情况下无法与乳酪区别。在一些情况下,具有脂肪酶的植物类干酪仿品被判定为具有更受喜爱的风味特征、更复杂的风味特征和品尝起来更像乳酪的风味特征。在一些情况下,具有脂肪酶和蛋白酶的植物类干酪仿品被判定为具有更受喜爱的风味特征、更复杂的风味特征和品尝起来更像乳酪的风味特征。

[0199] 特定蛋白酶或蛋白酶与脂肪酶的组合产生被品尝者描述为特定类型的乳制产品的独特风味特征。添加蛋白酶还控制特定风味特色,包括但不限于黄油味、甜味、果味、花香、坚果味和酸味。在干酪仿品中,如通过盲法味道测试者和GCMS所测定,蛋白酶的存在、类型、量和添加时序可以控制黄油味风味。如由盲法味道测试者所测定,添加蛋白酶、特别是木瓜蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶到非乳制干酪仿品中比不具有任何蛋白酶的相同非乳制干酪具有显著更多黄油味。这得到GCMS数据的支持,所述GCMS数据显示,添加蛋白酶可以极大地增加在乳制干酪中产生黄油味风味的化合物(包括丁二酮和乙偶姻)的产生。添加的特定蛋白酶和/或脂肪酶对非乳制干酪仿品的风味特色特征的贡献可以使用本文所描述的任何方法(例如味道测试和/或GCMS)来确定。

[0200] 在一些实施例中,酶是天冬氨酸蛋白酶。在一些实施例中,酶是木瓜蛋白酶。在一些实施例中,酶不是凝乳酶。在一些实施例中,酶是蛋白酶或肽酶。一般来说,蛋白酶或肽酶

是引导蛋白水解、即催化将氨基酸一起连接成肽链的肽键的水解的酶。蛋白酶可以是丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、天冬酰胺蛋白酶、混合蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。蛋白酶可以是外肽酶,例如氨基肽酶或羧基肽酶,或蛋白酶可以是内肽酶,例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、组织蛋白酶G或弹性蛋白酶。蛋白酶可以是选自以下组成的群组的任何蛋白酶:胃蛋白酶A、猪笼草蛋白酶、大眼梭鲈皮肤肉瘤病毒反转录肽酶、Ty3转座子肽酶、Gypsy转座子肽酶、Osva1do逆转录转座子肽酶、逆转录转座子肽酶、花椰菜花叶病毒型肽酶、杆状病毒肽酶、耐热素、信号肽酶II、泡沫胃蛋白酶(spumapepsin)、Copia转座子肽酶、Ty1转座子肽酶、早老素1、impas 1肽酶、4型前菌毛蛋白肽酶1、前鞭毛蛋白肽酶、gpr肽酶、omptin、DNA损伤诱导型蛋白1、HybD肽酶、PerP肽酶、皮肤SASP酶、孢子形成因子SpoIIGA、木瓜蛋白酶、博莱霉素水解酶、钙蛋白酶-2、脊髓灰质炎病毒型细小核糖核酸病毒内肽酶(picornain)3C、肠病毒细小核糖核酸病毒内肽酶2A、口蹄疫病毒细小核糖核酸病毒内肽酶3C、豇豆花叶病豇豆花叶病毒型细小核糖核酸病毒内肽酶3C、甲型肝炎病毒型细小核糖核酸病毒内肽酶3C、双埃柯病毒细小核糖核酸病毒内肽酶3C、水稻东格鲁球状病毒型肽酶、核包涵体a肽酶、adenain、马铃薯病毒Y型辅助组分肽酶、栗疫病真菌病毒p29肽酶、栗疫病真菌病毒p48肽酶、辛德毕斯病毒型nsP2肽酶、链球菌蛋白酶、梭菌蛋白酶、泛素基水解酶-L1、豆荚蛋白、卡斯蛋白酶-1、偏卡斯蛋白酶Yca1、焦谷氨酰-肽酶I、鼠类肝炎冠状病毒木瓜蛋白酶样肽酶1、鼠类肝炎冠状病毒木瓜蛋白酶样肽酶2、丙型肝炎病毒肽酶2、泛素特异性肽酶14、芜菁黄花叶病毒肽酶、香石竹潜病毒肽酶、兔出血性疾病病毒3C样肽酶、牙龈菌蛋白酶R、 $\gamma$ -谷氨酰水解酶、风疹病毒肽酶、口蹄疫病毒L-肽酶、猪传染性胃肠炎病毒型主肽酶、猪繁殖与呼吸综合征动脉炎病毒型半胱氨酸肽酶 $\alpha$ 、马动脉炎病毒型半胱氨酸肽酶、马动脉炎病毒Nsp2型半胱氨酸肽酶、甜菜坏死黄脉真菌传杆状病毒型木瓜蛋白酶样肽酶、萼状病毒素、细菌素加工肽酶、二肽基-肽酶VI、甜菜黄化病毒型木瓜蛋白酶样肽酶、磷酸核糖氨基转移酶前驱体、酰基-辅酶A:6-氨基青霉烷酸酰基-转移酶前驱体、刺猬蛋白、葡萄球菌蛋白酶A、Ulp1肽酶、分离酶、D-丙氨酰基-甘氨酰基肽酶、瘟病毒Npro肽酶、自噬蛋白酶-1、YopJ蛋白、PfpI肽酶、牛痘病毒17L加工肽酶、YopT肽酶、HopN1肽酶、青霉素V酰化酶前驱体、分选酶A、分选酶B、gill1相关病毒3C样肽酶、非洲猪瘟病毒加工肽酶、Cezanne去泛素化肽酶、otubain-1、IdeS肽酶、CylD肽酶、二肽酶A、AvrRpt2肽酶、假肽聚糖内异肽酶Pei、瘟病毒NS2肽酶、AgrB肽酶、病毒间层蛋白去泛素化肽酶、UfSP1肽酶、ElaD肽酶、RTX自裂解毒素、L,D-转肽酶、 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸二肽基转肽酶、prtH肽酶、OTLD1去泛素化酶、OTU1肽酶、ataxin-3、内罗毕病毒去泛素化肽酶、酸神经酰胺酶前驱体、LapG肽酶、溶酶体66.3kDa蛋白、MciB肽酶、DeSI-1肽酶、USPL1肽酶、柱顶孢谷氨酸肽酶、前颈附件蛋白、氨基肽酶N、血管紧张素转化酶肽酶单位1、thimet寡肽酶、寡肽酶F、嗜热菌蛋白酶、真菌蛋白酶、免疫抑制剂A肽酶、斯纳帕溶素(snapalysin)、利什曼溶素、细菌胶原酶V、细菌胶原酶H、基质金属肽酶-1、粘质沙雷氏菌酶、弗拉吉溶素(fragilysin)、配子溶素、虾红素、蛇毒蛋白酶、脑啡肽酶、羧基肽酶A1、羧基肽酶E、 $\gamma$ -D-谷氨酰基--内消旋-二氨基庚二酸肽酶I、胞质羧基肽酶6、锌D-Ala-D-Ala羧基肽酶、vanY D-Ala-D-Ala羧基肽酶、Ply118L-Ala-D-Glu肽酶、vanX D-Ala-D-Ala二肽酶、皮特里溶素(pitriylisin)、线粒体加工肽酶 $\beta$ -亚单位、尤皮特里溶素(eupitriylisin)、白氨酰基氨基肽酶、氨基肽酶I、膜二肽酶、谷氨酸羧基肽酶、肽酶T、Xaa-His二肽酶、羧基肽酶Ss1、肌肽二肽酶II、O-唾液酸糖蛋白肽

酶、 $\beta$ -溶解金属肽酶、溶葡萄菌素、甲硫氨酰基氨基肽酶1、氨基肽酶P、IgA1特异性金属肽酶、胰毒素溶素、氨基肽酶S、谷氨酸羧基肽酶II、IAP氨基肽酶、氨基肽酶Ap1、氨基肽酶T、海科溶素 (hyicolysin)、羧基肽酶Taq、炭疽热致死因子、氛溶素、真菌溶素、异天冬氨酰基二肽酶、FtsH肽酶、谷氨酰基氨基肽酶、噬纤维菌溶素、冠毛素-1、痘病毒金属肽酶、Ste24肽酶、HtpX肽酶、Oma1肽酶、二肽基-肽酶III、S2P肽酶、孢子形成因子SpoIVFB、古细菌溶素、D-氨基肽酶DppA、BlaR1肽酶、prtB g.P.、增效蛋白、甘氨酰基氨基肽酶、IgA肽酶、StcE肽酶、PSMD14肽酶、JAMM样蛋白、AMSH去泛素化肽酶、肽基-Asp金属肽酶、卡梅溶素 (camelysin)、胞壁质内肽酶、伊梅溶素 (imelysin)、Atp23肽酶、色氨酰基氨基肽酶7-DMATS型肽酶、ImmA肽酶、异戊二烯基肽酶2、Wss1肽酶、微囊藻毒素酶MlrC、PrsW肽酶、mpriBi肽酶、NleC肽酶、PghP  $\gamma$ -聚谷氨酸水解酶、氯离子通道附属蛋白3、IMP $\alpha$ 肽酶、MtfA肽酶、NleD肽酶、TYPE酶、野田村病毒肽裂解酶、四病毒外壳蛋白、Tsh相关自裂解域、小双节RNA病毒自裂解蛋白、YscU蛋白、呼肠孤病毒1型外壳蛋白、脊髓灰质炎病毒衣壳VP0型自裂解蛋白、含内含肽V型质子ATP酶催化亚单位A、含内含肽复制型DNA解旋酶前驱体、含内含肽叶绿体ATP相关肽裂解酶、DmpA氨基肽酶、胰凝乳蛋白酶A、谷氨酰基肽酶I、DegP肽酶、赖氨酰基肽酶、灰色链霉菌蛋白酶A、星状病毒丝氨酸肽酶、批膜病毒素、IgA1特异性丝氨酸肽酶、黄病毒素、枯草杆菌蛋白酶嘉士伯、kexin、脯氨酰基寡肽酶、二肽基-肽酶IV、酰氨基酰基-肽酶、谷氨酰基内肽酶C、羧基肽酶Y、D-Ala-D-Ala羧基肽酶A、D-Ala-D-Ala羧基肽酶B、D-Ala-D-Ala肽酶C、肽酶Clp、Xaa-Pro二肽基-肽酶、Lon-A肽酶、巨细胞病毒次晶蛋白、阻遏蛋白LexA、信号肽酶I、信号酶21 kDa组分、TraF肽酶、溶酶体Pro-Xaa羧基肽酶、肝炎病毒素、马铃薯Y病毒P1肽酶、瘟病毒NS3多蛋白肽酶、马动脉炎病毒丝氨酸肽酶、脯氨酰基氨基肽酶、PS-10肽酶、南方菜豆花叶病毒肽酶、黄矮病毒肽酶、C末端加工肽酶-1、三角核心肽酶、青霉素G酰化酶前驱体、二肽基-肽酶7、HetR肽酶、信号肽肽酶A、蛋白C、太古信号肽肽酶1、传染性胰腺坏死双RNA病毒Vp4肽酶、二肽酶E、sedolisin、扁菱形蛋白-1、SpoIVB肽酶、核孔蛋白145、乳铁蛋白、流感A PA肽酶、含EGF样模块粘蛋白样激素受体样2、Ssy5肽酶、细小核糖核酸病毒内肽酶样半胱氨酸肽酶、胞壁质四肽酶LD-羧基肽酶、PIDD自加工蛋白单位1、Tellina病毒1 VP4肽酶、MUC1自裂解粘蛋白、营养不良聚糖、gp0肽酶、{大肠杆菌 (*Escherichia coli*)}噬菌体K1F内唾液酸酶CIMCD自裂解蛋白、白鲷病毒丝氨酸肽酶、前头肽酶gp21、前头肽酶、CARD8自裂解蛋白、前头肽酶gp175、失稳酶、太古蛋白酶体、Hs1UV肽酶的 $\beta$ 组分、Hs1V组分、糖基天冬酰胺酶前驱体、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶1、鸟氨酸乙酰转移酶前驱体、多囊素-1、胶原蛋白酶、蛋白P5胞壁质内肽酶、Lit肽酶、均多聚体肽酶、yabG蛋白、小菌素加工肽酶1、AIDA-I自裂解自转运体蛋白和Dop异肽酶。

[0201] 在特定实施例中，蛋白酶是木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、A0蛋白酶、figin、凝乳酶、来自灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 的XXI型蛋白酶、来自地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的蛋白酶、来自米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的蛋白酶、来自解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的蛋白酶、来自佐氏曲霉 (*Aspergillus saitoi*) 的蛋白酶、来自嗜热溶蛋白芽孢杆菌罗科 (*Bacillus thermoproteolyticus rokko*) 的嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶A、X型蛋白酶或XIII型真菌蛋白酶。

[0202] 在一些实施例中，酶是脂肪酶。脂肪酶可以是催化脂质的水解的任何酶。脂肪酶可以分解脂肪并且释放脂肪酸。脂肪酸的释放可以调节所得非乳制干酪仿品的气味、风味特

征和质地特征。脂肪酶可以来源于动物源,或可以来源于非动物源。动物源可以是例如小牛、小山羊(山羊)或羔羊。非动物源可以是植物源,或可以是细菌源、酵母源或真菌。举例来说,来源可以来自乳球菌属;假单胞菌属(*Pseudomonas species*);曲霉属(*Aspergillus species*);青霉属,例如罗克福尔青霉;根霉属(*Rhizopus*);乳杆菌属;球马拉色氏霉菌属(*Malassezia globosa species*);米黑毛霉属(*Mucor miehei species*);或假丝酵母属,例如皱假丝酵母(*Candida rugosa*)。非动物源可以是表达脂肪酶的经基因修饰的生物体。

[0203] 脂肪酶可以是胆汁盐相关脂肪酶、胰腺脂肪酶、溶酶体脂肪酶、肝脂肪酶、脂蛋白脂肪酶、激素敏感脂肪酶、胃脂肪酶、内皮脂肪酶、胰腺脂肪酶相关蛋白2、磷脂酶、前胃酯酶或胰腺脂肪酶相关蛋白。例示性脂肪酶描述于美国专利第3973042号、第7622290号、第7666618号、第8012732号、第7931925号、第7407786号、第7052879号和WIPO专利申请案第W0/2004/113543号中,其特此全部以引用的方式并入。其它例示性脂肪酶包括例如AK、脂肪酶G、脂肪酶PS、脂肪酶A、PC脂肪酶和WG脂肪酶。

[0204] 脂肪酶可以是可商购的脂肪酶。可商购的例示性脂肪酶包括Italase,其通常用以制作淡味的干酪,例如马苏里拉干酪、阿齐亚戈干酪、菲达干酪、波萝伏洛干酪、蓝干酪和墨西哥奶酪(*queso fresco*);和Capilase,其通常用以制作浓味的干酪,例如波萝伏洛干酪、罗马诺干酪和帕尔马干酪。

[0205] 添加的酶以重量或体积计可以占非乳制干酪源的0.00001-0.005%、0.001-0.01%、0.01-0.1%、0.05-1%、0.1-2%或0.5-5%。优选地,添加的酶以重量或体积计可以占非乳制干酪源的0.00001-0.1%。

[0206] 在一些实施例中,蛋白酶是木瓜蛋白酶。在一些实施例中,添加0.001-0.01%的木瓜蛋白酶到非乳制干酪源中。在特定实施例中,非乳制干酪源是包含经提纯的绿豆蛋白的蛋白质溶液。在更特定实施例中,通过加热/冷却方法使添加有蛋白酶的蛋白质溶液凝固。在一些实施例中,添加木瓜蛋白酶改良所得非乳制干酪仿品的柔软度和奶油性。

[0207] 在一些实施例中,添加一或多种蛋白酶通过改良奶油性而改良质地,同时维持干酪仿品形状的稳定性的稳定性,例如干酪仿品保持足够坚硬而可切割。在一些实施例中,在添加蛋白酶或脂肪酶的情况下制备的非乳制干酪仿品在盲法味道测试中评定为比在无蛋白酶或脂肪酶的情况下制作的相当非乳制干酪仿品显著更佳。在一些情况下,归因于干酪的奶油性的增加,如由盲法味道测试者所判断,蛋白酶显著改良干酪的质地。在一些情况下,如通过质地分析所测定,蛋白酶降低干酪的坚硬度。在一些情况下,蛋白酶增加干酪的奶油性而不降低坚硬度。在一些情况下,非乳制干酪仿品包含一或多种添加的脂肪酶但不添加蛋白酶,而在其它实施例中,仿品包含一或多种添加的脂肪酶和一或多种添加的蛋白酶。

[0208] 一或多种酶可以在凝固之前或在凝固之后(在沥出乳清之前,或在沥出乳清之后)与非乳制干酪源接触。在一些实施例中,风味和/或质地特征取决于酶在凝固之前还是之后添加而改变。在一些实施例中,酶在凝固过程期间添加。在一些实施例中,在凝固过程期间添加酶产生质地比通过在干酪制作过程中的另一个步骤添加酶而制备的相当非乳制干酪仿品更软的非乳制干酪仿品。在一些实施例中,酶在凝固之后并且在将乳清从凝乳去除之后添加。在一些实施例中,非乳制干酪源是与受控量的细菌接触的坚果奶,并且一或多种脂肪酶和/或蛋白酶在凝固之后但在沥出乳清之前添加。仅作为实例,在交联步骤之后在凝乳于用具有0.47%转谷氨酰胺酶和0.03%MA11培养物的杏仁和澳洲坚果奶制作的软的新鲜

干酪仿品中形成时添加酶导致质地与在凝结已经开始之前或在将乳清从凝乳沥出之后添加酶相比更软。仅作为其它实例,在非乳制干酪源凝结为凝胶之前或在将乳清从凝乳沥出之后添加0.004%凝乳酶或0.02%木瓜蛋白酶到非乳制干酪源中导致质地比当在非乳制奶凝结时添加酶时更坚硬。

[0209] 在一些实施例中,添加一或多种蛋白酶和/或一或多种脂肪酶可以用以增强所得非乳制干酪仿品中的风味特色。可以调节在干酪制作过程的任何步骤(例如在凝固之前、在凝固之后但在沥出乳清之前或在沥出乳清之后)添加蛋白酶和或脂肪酶的时序以增强所得干酪仿品的所要风味特色。本文所描述的任何风味特色都可以通过选择个别蛋白酶和/或脂肪酶和通过控制添加蛋白酶和/或脂肪酶的时序而增强。增强的风味特色可以归因于如本文所述的特定挥发性化合物的释放增加。在一些情况下,非乳制干酪的风味特征变化而干酪的质地不变化。

[0210] 仅作为实例,有0.02%木瓜蛋白酶在凝固之后(在沥出乳清之前或之后)添加而产生的干酪仿品被显著评定为比在无蛋白酶的情况下产生的干酪仿品或当蛋白酶在凝固之前添加时产生的干酪仿品具有更多黄油味。相比之下,在凝固之前添加的天冬氨酸蛋白酶产生最多黄油风味,但在所有情况下,黄油风味的量都大于不具有蛋白酶的对照。参看实例2。如通过GCMS所确定,添加蛋白酶可以极大地增加在乳酪中产生黄油味风味的化合物(包括丁二酮和乙偶姻)的产生。

[0211] 在一些实施例中,使蛋白质溶液与受控量的如本文所述的微生物接触。在一些实施例中,使蛋白质溶液与非乳制奶、或奶油部分、或脱脂部分、或包含经分离的奶油和脱脂部分的混合物混合。例示性非乳制奶、奶油部分、脱脂部分和制作方法描述于本文中。在一些实施例中,使蛋白质溶液与一或多种酶接触。在一些实施例中,一或多种酶包含蛋白酶和/或脂肪酶。例示性蛋白酶和脂肪酶描述于本文中。

[0212] 在另一个方面,本发明提供一种非乳制干酪仿品和制备其的方法,其包含分离奶油部分,和使奶油部分凝固。在一些实施例中,干酪仿品可以由约0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.75%、1%、2%、3%、4%、5%、7.5%、10%、12.5%、15%、17.5%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、90%以上或100%奶油部分制成。在一些实施例中,干酪仿品可以由约0.1-1%、0.5-5%、2-10%、5-15%或10-20%、15-30%、20-50%、30-60%、50-80%、60-90%或80-100%奶油部分制成。

[0213] 所述方法可以进一步包含添加受控量的一或多种脂肪到非乳制干酪源中以产生乳液。

[0214] 仅作为实例,一些非乳制干酪仿品通过以下方式来制备:添加0%-50%脂肪到非乳制干酪源中以产生乳液,然后通过蛋白质变性、例如通过加热使乳液凝固。在一些实施例中,受控量的一或多种脂肪在凝固之前或在凝固之后添加。在一些实施例中,受控量的一或多种脂肪在凝固之后并且在沥出乳清之后添加。仅作为其它实例,通过蛋白质变性制作的一些干酪仿品在通过变性凝固之后添加0%到50%脂肪,或在沥出乳清之后添加0%到50%脂肪。在形成蛋白质变性或交联的凝胶之后,可以沥出乳清以增加干酪仿品中的总脂肪,对干酪进一步沥干和使其老化可以减少水分含量以增加干酪仿品的总脂肪。

[0215] 在一些实施例中,添加5-20%不饱和脂肪到酶交联的凝胶中增加凝胶的坚硬度。

[0216] 在一些实施例中,添加5%-50%的饱和脂肪增加干酪仿品的坚硬度。

[0217] 在一些实施例中,与在无任何脂肪的情况下或添加不饱和或饱和油而制作的干酪仿品相比,用奶油部分制作的干酪仿品具有改良的质地特征,由增加的坚硬度、显著增强的奶油性表征。使用脂肪减少干酪的水分含量。

[0218] 在一些实施例中,添加到干酪仿品中的脂肪的类型也决定加热冷却干酪和交联干酪中的脂肪保留。可以通过使用不同脂肪类型和不同脂肪形式、通过老化和加热将干酪仿品制作得具有受控的脂肪保留。脂肪保留的量还取决于干酪凝胶中的蛋白质的类型,例如豌豆-球蛋白比相同量的大豆蛋白具有更大的脂肪保留。

[0219] 在一些实施例中,在添加脂肪的情况下制作的干酪仿品还可以调节干酪的熔融能力。添加脂肪可以导致当加热非乳制干酪时粘度有更大变化。

[0220] 通过添加盐或二价阳离子调节味道/质地/熔融特征

[0221] 在乳酪中,钙离子与酪蛋白分子的相互作用控制干酪的物理性质。然而,在非乳制干酪中,不存在酪蛋白,因此添加二价阳离子到非乳制干酪中的影响和添加熔融盐的影响是未知的。发现干酪仿品的物理性质可以通过添加单或二价阳离子(例如 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 或 $\text{Ca}^{2+}$ (例如 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CaSO}_4$ ))、添加熔融盐(例如柠檬酸钠、磷酸三钠、六偏磷酸钠或磷酸二钠)或其任何组合而进一步控制。阳离子可以在干酪制作过程的任何阶段(例如在凝固之前、在凝固之后或在沥出乳清之后)添加到非乳制干酪源中。阳离子可以与熔融盐同时或在不同时间添加。

[0222] 在加热/冷却凝胶中,可以添加0.01%到5%浓度的二价阳离子(例如 $\text{CaCl}_2$ 和/或 $\text{CaSO}_4$ )到非乳制干酪源中。例示性非乳制干酪源包括例如非乳制奶油部分、经提纯的蛋白质、非乳制奶(例如坚果奶)、蛋白质脂肪乳液或其任何组合。与在不添加二价阳离子和/或熔融盐的情况下制作的相当干酪仿品相比,所得干酪仿品在加热时展现改良的熔融性。改良的熔融性由加热时减少的粒化、增加的粘度和增加的表面积膨胀表征。举例来说,由6%大豆(7S和11S)、0.03%MA11和1%葡萄糖制成的加热冷却干酪仿品不熔融。然而,在沥出乳清之后添加1%熔融盐(柠檬酸钠、磷酸三钠、六偏磷酸钠和/或磷酸二钠)导致所得干酪仿品熔融。对于以上实例,添加六偏磷酸钠具有最大作用。另外,甚至更大熔融可以在添加在加热冷却之前添加到乳液中的二价阳离子(如 $\text{CaCl}_2$ )的情况下看到。

[0223] 二价阳离子对奶油性的影响

[0224] 添加二价阳离子还可以改良干酪仿品的质地特征。举例来说,与在不添加 $\text{CaSO}_4$ 的情况下制作的相当干酪仿品相比,在用0.5%-2%转谷氨酰胺酶交联之前添加1mM  $\text{CaSO}_4$ 到由豌豆球蛋白的蛋白质溶液制备的干酪仿品中改良奶油性。 $\text{CaSO}_4$ 对奶油性的这种作用还在坚果奶类干酪和由RuBisCo蛋白质溶液制成的干酪的情况下观察到。

[0225] 添加到非乳制干酪中的熔融盐还可以调节所得干酪仿品的坚硬度。在通过加热冷却凝固之前或之后添加的熔融盐增加所得干酪仿品的坚硬度。在一些情况下,添加熔融盐可以导致已经熔融的干酪仿品在室温下变为固体。添加到非乳制干酪仿品中的熔融盐因此可以用以改良较坚硬的干酪仿品的熔融特征。举例来说,用4%绿豆蛋白、30%棕榈油、1%葡萄糖和0.03%MA11制作的蛋白质变性干酪仿品产生在室温下的软凝胶,其在加热时变为液体。当添加3%柠檬酸钠到这种干酪中并且加热时,干酪展示出粘度变化的增加,指示熔融的增加,并且在冷却时形成在室温下更坚硬的干酪。

[0226] 应理解,本发明提供通过选择以下如本文所述的组合物和方法的特定组合来控制

非乳制干酪仿品的风味特征、质地特征、熔融特征和/或拉伸特征的方法：非乳制干酪源、凝固方法、添加一或多种微生物、添加一或多种蛋白酶和或脂肪酶、添加一或多种脂肪、添加一或多种熔融盐和/或阳离子以及改变在干酪制作过程的特定阶段添加微生物、脂肪、熔融盐、蛋白酶、脂肪酶或阳离子的时序。特定实施例和实例描述于本文中。

[0227] 凝固方法

[0228] 在另一个方面，本发明提供干酪仿品和制作其的方法。在一些实施例中，所述方法包含使非乳制干酪源（例如非乳制奶）凝固（例如形成凝胶）。在一些实施例中，非乳制奶能够在所述凝固之后保持形状。存在许多可以使非乳制干酪源凝固的方式，包括使用酶、热变性、形成冷凝胶、形成凝聚物、液体分离、酸、改变离子强度、高压加工、溶剂、分散剂或二硫键还原剂，如这个章节中所描述。

[0229] 酶（或化学物质）可以用以使有或无乳化脂肪或油、糖和培养物的非动物（例如植物类）蛋白质或非乳制奶油部分交联。所得交联的干酪仿品可以添加有或不添加细菌培养物，并且添加时序可以是在交联步骤之前或之后。在一些实施例中，凝固包括使非乳制干酪源中的组分（例如多肽，本文中也称为蛋白质）交联的过程。在一些实施例中，交联包含使非乳制干酪源与交联酶接触，由此在多肽链之间产生交联。交联酶可以是转谷氨酰胺酶、酪氨酸酶、脂肪加氧酶、蛋白质二硫键还原酶、蛋白质二硫键异构酶、巯基氧化酶、过氧化酶、己糖氧化酶、赖氨酰氧化酶或胺氧化酶。

[0230] 在一些实施例中，交联酶是转谷氨酰胺酶。转谷氨酰胺酶是催化在游离胺与谷氨酰胺的  $\gamma$ -羧基之间形成共价键，由此将蛋白质连接在一起的酶家族。举例来说，转谷氨酰胺酶催化例如蛋白质或肽中的赖氨酸与蛋白质的谷氨酰胺残基或肽的谷氨酰胺残基的  $\gamma$ -甲酰胺基的交联。通过转谷氨酰胺酶形成的共价键可以展现对蛋白水解具有高抗性。

[0231] 许多类型的转谷氨酰胺酶可以用于本发明的各种实施例。对于交联可接受的转谷氨酰胺酶包括但不限于茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*) 转谷氨酰胺酶、类似于来自茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶的酶、其它微生物转谷氨酰胺酶、由经基因工程化的细菌、真菌或藻类产生的转谷氨酰胺酶、因子XIII (纤维蛋白稳定因子)、角化细胞转谷氨酰胺酶 (TGM1)、组织转谷氨酰胺酶 (TGM2)、表皮转谷氨酰胺酶 (TGM3)、前列腺转谷氨酰胺酶 (TGM4)、TGM X (TGM5)、TGM Y (TGM6)、TGM Z (TGM7) 或赖氨酰氧化酶。

[0232] 添加培养物的时序、培养物的类型和培养物的量改变乳液的pH值，并且因此改变转谷氨酰胺酶的活性和干酪的最终质地。另外，通过添加酸或碱改变溶液的pH值和乳液的总缓冲能力改变交联能力和干酪仿品的最终质地。

[0233] 在一些实施例中，本发明提供一种组合物，其包含非乳制奶和茂原链轮丝菌转谷氨酰胺酶、类似于来自茂原链轮丝菌的转谷氨酰胺酶的酶、其它微生物转谷氨酰胺酶、由经基因工程化的细菌、真菌或藻类产生的转谷氨酰胺酶、因子XIII (纤维蛋白稳定因子)、角化细胞转谷氨酰胺酶 (TGM1)、组织转谷氨酰胺酶 (TGM2)、表皮转谷氨酰胺酶 (TGM3)、前列腺转谷氨酰胺酶 (TGM4)、TGM X (TGM5)、TGM Y (TGM6) 和/或TGM Z (TGM7)。在一些实施例中，用于交联的酶不是因子XIII (纤维蛋白稳定因子)、角化细胞转谷氨酰胺酶 (TGM1)、组织转谷氨酰胺酶 (TGM2)、表皮转谷氨酰胺酶 (TGM3)、前列腺转谷氨酰胺酶 (TGM4)、TGM X (TGM5)、TGM Y (TGM6)、TGM Z (TGM7) 或赖氨酰氧化酶。

[0234] 转谷氨酰胺酶可以通过茂原链轮丝菌发酵作用以商业量生产或从动物组织中提

取。另外,本发明的转谷氨酰胺酶(TGM)可以从细菌或真菌中分离、于细菌或真菌中由合成或克隆基因表达。在一些特定实施例中,转谷氨酰胺酶获自商业来源,例如由味之素食品成分有限责任公司(Ajinmoto Food Ingredients LLC)以Activa™形式获得。

[0235] 在一些实施例中,转谷氨酰胺酶以重量/体积计以0.0000001-0.001%、0.0001-0.1%、0.001-0.05%、0.1-2%、0.5-4%之间或大于4%的量添加。在一些实施例中,转谷氨酰胺酶以大于0.1%并且至多10%的量添加。

[0236] 在一些实施例中,通过转谷氨酰胺酶的交联可以在10-30℃、20-60℃、30-70℃或50-100℃范围内的温度下进行。转谷氨酰胺酶交联可以进行10分钟-24小时。

[0237] 在一些实施例中,每1mL非乳制奶添加0.1与20单位(U)之间的转谷氨酰胺酶。在一些实施例中,每1mL非乳制奶添加约0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、5、7、10、15或20U的转谷氨酰胺酶。在一些实施例中,在添加转谷氨酰胺酶之后,例如在100°F水浴中进行热孵育。热孵育可以在对于酶功能的最优的温度下。在一些实施例中,温度是约65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120或125°F。在一些实施例中,酶促交联并不包含使非乳制干酪源与谷氨酸胺酶和转谷氨酰胺酶接触。转谷氨酰胺酶交联已经在室温并且至多65℃下进行10分钟到24小时。

[0238] 在一些实施例中,凝固包含诱导蛋白质变性。在一些实施例中,变性是通过加热混合物、接着冷却混合物诱导的。在一些实施例中,变性是通过将混合物加热到30-35、32-40、37-45、40-50、45-55、50-60、55-65、60-70、65-75、70-80、75-85、80-95、90-100℃之间或高于100℃的温度诱导的。在一些实施例中,变性是通过加热混合物约10-20、15-30、25-40、30-50、40-70秒或约1-3、2-5、3-8或5-20分钟诱导的。在一些实施例中,在加热之后使混合物冷却。举例来说,可以使优选地浓度>1%的蛋白质(例如经提纯或分级分离的植物蛋白,例如来自豌豆、绿豆、大豆、RuBisCO等)与0.1-60%浓度的油(例如芥花油、葵花油、棕榈油或来自例如葵花的籽的油体)一起均质化。可以使乳液经历加热-冷却循环,其中将其加热到45-100℃的温度5-60分钟并且然后冷却到小于30℃(例如20-25℃)。可以将所得凝胶在≤30℃的温度下孵育优选地2-16小时,并且然后通过干酪布沥干。经沥干的凝乳准备好成形和老化或通过加热或按压进一步加工。

[0239] 在一些实施例中,凝固包含使用一或多种植物蛋白形成凝聚物。凝聚是在其期间馈入的聚合物的均质溶液经历相分离以产生富含聚合物的稠密相(‘凝聚物’)和富含溶剂的相(上清液)的过程。蛋白质-多糖凝聚物已经用于开发生物材料。参看例如博拉尔(Boral)和波海达尔(Bohidar)(2010)物理化学杂志B辑Journal of Physical ChemistryB.)第114(37)卷:12027-35;和刘(Liu)等人,(2010)农业与食品化学杂志Journal of Agricultural and Food Chemistry),第58卷:552-556。所述凝聚物的形成通过相对馈入的聚合物之间的缔合相互作用而驱动。然而,如本文所述,凝聚物可以使用蛋白质(例如植物蛋白包含一或多种豌豆蛋白、鹰嘴豆蛋白、小扁豆蛋白、羽扇豆蛋白、其它豆科植物蛋白或其混合物)形成。一般来说,凝聚物可以通过将低离子强度溶液(例如100mM或低于100mM氯化钠的缓冲溶液)酸化到3.5到5.5的pH(例如pH 4到5)而形成,所述低离子强度溶液包含一或多种经分离和提纯的植物蛋白,例如豌豆球蛋白或豌豆球蛋白(例如包含伴豌豆球蛋白的豌豆球蛋白部分)、豌豆球蛋白与球蛋白两者的组合或未经分级分离的豌豆蛋白。在这些条件下,蛋白质从溶液中分离出并且混合物可以经离心以干净地分离出

凝聚物。不同于沉淀物,这种凝聚物是可以通过牵引而拉伸并且在加热时熔融的粘性材料。所述过程可以在油(多达40%,例如棕榈或其它油)存在下进行,以形成奶油状材料。通过改变溶液的组成(豌豆球蛋白:豆球蛋白的比率、所用油的类型和量),凝聚物的性质(例如熔融和流变)可以按需要来进行调节。此外,乳化盐,例如磷酸二钠或焦磷酸三钠可以在酸化之前包括于初始混合物中,以改良凝聚物的流动特征(使其粘性不太大,可能归因于凝聚物中的保水性增加)。所得凝聚物可以原样使用或用于干酪仿品中或通过使蛋白质交联而进一步加工,或经历加热-冷却循环或高压加工以获得较坚硬的干酪仿品,并且用以例如制备具有拉伸性质的干酪仿品或制备坚硬的干酪仿品。

[0240] 在一些实施例中,凝固包含形成冷固式凝胶以避免使任何热不稳定组分变性或分解(例如挥发性风味分子(例如丁二酮)在加热时可能会从食品基质失去;常用以在干酪老化时使奶凝结和/或赋予风味的乳酸细菌培养物将无法经受住加热步骤)。因此,可以在不加热所述不稳定组分的情况下诱导胶凝的工艺在干酪的开发中是重要的。关于形成冷固式凝胶的一般方法,参看居(Ju)和凯拉拉A.(Kilara A.)(1998)食品科学杂志(J.Food Science),第63(2)卷:288-292;和马尔泰斯(Maltais)等人,(2005)食品科学杂志,第70(1)卷:C67-C73)。一般来说,冷固式凝胶通过以下方式形成:首先使低于其最小胶凝浓度(取决于pH和蛋白质的类型,典型地在pH 6-9下对于球状植物蛋白(例如豌豆蛋白)是<8%(w/v))的蛋白质溶液热变性。可以在其中蛋白质不从溶液沉淀析出的条件(0-500mM氯化钠,pH 6-9)下将蛋白质溶液加热到高于蛋白质的变性温度的温度。可以将溶液冷却回到室温或低于室温,并且可以临在添加盐之前添加需要并入到凝胶中的任何热不稳定组分(包括0-50%(v/v)的脂肪,风味化合物、酶和细菌培养物)。可以通过使用例如氯化钙或氯化钠(例如5-100mM)增加离子强度来诱导胶凝,并且在室温下或低于室温下孵育以允许凝胶形成(典型地数分钟-数小时)。诱导凝胶形成所需要的盐的浓度取决于蛋白质的性质、其浓度以及溶液的pH和离子强度。所得凝胶是具有酸奶样质地的软材料,其可以原样用作干酪仿品或经进一步加工以获得其它干酪仿品。

[0241] 本发明的其它实施例中可能有其它变性程序。可以使用酸、离子强度变化、高压加工、溶剂、分散剂或二硫键还原剂使非乳制干酪源中的蛋白质变性。在一个实施例中,添加脲到非乳制干酪源中以形成凝乳。

[0242] 在一些实施例中,凝固导致形成固体凝乳和乳清(在形成凝乳之后保持的所得液体)。在一些实施例中,将凝乳与乳清分离。

[0243] 在一些实施例中,凝固包含两种或两种以上方法的组合。举例来说,凝固可以包括使蛋白质交联和通过加热接着冷却而变性。举例来说,可以用转谷氨酰胺酶使冷固式凝胶交联以产生较坚硬的凝胶,或将其与其它蛋白质(例如大豆、豌豆-豆球蛋白、豌豆-白蛋白、来自鹰嘴豆和小扁豆的粗蛋白质部分)或材料(例如脂肪或豌豆蛋白凝聚物)组合以增加硬度和/或熔融性。

[0244] 在一些实施例中,可以在所述凝固期间使非乳制干酪源经历剪切力。所述剪切力可以用以使所述非乳制干酪源中的蛋白质组分排列,形成各向异性纤维。各向异性纤维的所述形成可以适用于产生拉伸干酪。

[0245] 通过使蛋白质交联来形成凝胶

[0246] 在一些实施例中,干酪仿品包含交联酶。在一些实施例中,交联酶用以使非乳制干

酪源凝固成等效于干酪凝乳的凝胶。关于使凝胶凝固,参看以上章节。

[0247] 举例来说,提供一种制备非乳制干酪仿品的方法,其包含分离和提纯大豆蛋白(7S和11S)、绿豆、豌豆-球蛋白、豌豆白蛋白、豌豆豌豆球蛋白、豌豆豆球蛋白、晚期胚胎富集蛋白(例如脱水蛋白)、小扁豆蛋白、鹰嘴豆蛋白、油体蛋白、RuBisCo、醇溶谷蛋白(包括但不限于豌豆、玉米和高粱)、有或无脂肪乳液的蛋白质和产生交联凝胶(其是干酪仿品)的非乳制奶油部分或其任何组合;制备包含所述经分离和提纯的蛋白质的任何组合的蛋白质溶液;和使用转谷氨酰胺酶使蛋白质在溶液中交联。在一些实施例中,大豆蛋白以经分离的部分形式使用,例如2S球蛋白、7S球蛋白或11S球蛋白。在一些实施例中,仅7S球蛋白用作大豆蛋白。

[0248] 举例来说,交联的非乳制干酪仿品可以使用包含0.65%或更高重量/体积范围内的单独大豆蛋白、使用单独豌豆-球蛋白、单独绿豆蛋白、豌豆-醇溶谷蛋白或1%或任何更高重量/体积范围内的单独RuBisCo蛋白的蛋白质溶液来产生。

[0249] 作为另一个实例,交联的非乳制干酪仿品可以使用包含一种以上经分离和提纯的蛋白质的蛋白质溶液来产生。举例来说,交联的非乳制干酪仿品可以使用大豆(7S和11S)加豌豆球蛋白(豌豆-G)或大豆(2S、7S和11S)加RuBisCo制作。在一些实施例中,大豆(2S、7S和11S)/豌豆-球蛋白或大豆(2S、7S和11S)/RuBisCo的比率可以是约1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1。交联的非乳制干酪仿品可以按两种蛋白质的所有可能比率以大于1%的蛋白质总量制作,所述可能比率包括但不限于1%大豆:4%豌豆-G、2%大豆:4%豌豆-G、2%大豆:6%豌豆-G、4%大豆:2%豌豆-G。交联的非乳制干酪仿品可以用大豆(2S、7S和11S)加RuBisCo,以两种蛋白质的所有可能比率以大于1%的蛋白质质量总制作。在一些实施例中,绿豆球蛋白/大豆(7S和11S)的比率可以是约1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1。交联的非乳制干酪仿品可以用绿豆球蛋白加大豆(2S、7S和11S),以两种蛋白质的所有可能比率以大于1%的蛋白质总量制作,所述可能比率包括但不限于4%绿豆:1%大豆、4%绿豆:2%大豆、2%绿豆:4%大豆、6%绿豆:1%大豆、6%绿豆:2%大豆、8%绿豆:1%大豆、8%绿豆:2%大豆和10%绿豆:1%大豆。交联的非乳制干酪仿品可以用绿豆蛋白加豌豆球蛋白制作。在一些实施例中,绿豆蛋白/豌豆-G的比率可以是约1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1。在一些实施例中,非乳制干酪仿品可以按两种蛋白质的所有可能比率以大于1%的蛋白质总量制作,所述可能比率包括但不限于2%绿豆:4%豌豆、4%绿豆:2%豌豆、4%绿豆:4%豌豆、6%绿豆:2%豌豆。交联的非乳制干酪仿品可以用植物类蛋白质(包括总经分离的蛋白质和经分级分离的蛋白质)的任何组合以1%或更大的蛋白质总浓度制作。用以制作干酪仿品的蛋白质的其它实例(包括醇溶谷蛋白、晚期胚胎富集蛋白)可以单独或与以上蛋白质组合使用。

[0250] 在一些实施例中,干酪仿品使用奶油部分作为非乳制干酪源来制作,所述非乳制干酪源通过酶促交联或通过变性而交联。举例来说,交联的非乳制干酪仿品已经用5%到100%的单独奶油部分制作。由使奶油部分交联而制成的干酪仿品可以通过对奶油部分的提纯方法来调节。举例来说,用高pH洗液提纯的葵花奶油部分交联得非常好,形成白色的坚硬凝乳。在其它情况下,从脲洗液提纯葵花奶油部分并不很好地交联,并且凝乳形成需要更多交联酶或更多奶油部分。在另一个情况下,仅在pH 7下洗涤的葵花奶油部分可以产生绿

色/褐色的干酪。

[0251] 在一些实施例中,干酪仿品使用包含奶油部分和包含一或多种经分离和提纯的蛋白质的蛋白质溶液的非乳制干酪源制作。交联的非乳制干酪仿品可以用经提纯的蛋白质和奶油部分制作。交联的非乳制干酪仿品可以用大豆加葵花奶油部分以包括但不限于以下的量制作:0.6%大豆(7S和11S):20%奶油、2%大豆(7S和11S):20%奶油、4%大豆(7S和11S):20%奶油、2%大豆(7S和11S):10%奶油、4%大豆(7S和11S):10%奶油和4%大豆(7S和11S):30%奶油。交联的非乳制干酪仿品可以用豌豆球蛋白加奶油以包括但不限于以下的量制作:4%豌豆球蛋白:20%奶油、7%豌豆球蛋白:20%奶油、7%豌豆球蛋白:10%奶油、4%豌豆球蛋白:10%奶油、10%豌豆球蛋白:20%奶油。交联的非乳制干酪仿品可以用绿豆加葵花奶油、以包括但不限于以下的量制作:4%绿豆:20%奶油、6%绿豆:20%奶油、8%绿豆:20%奶油、8%绿豆:10%奶油。交联的非乳制干酪仿品可以用例如以下的多种经提纯的蛋白质加奶油部分制作:2.5%豌豆球蛋白:3%大豆(7S和11S):20%葵花奶油、2%豌豆球蛋白:4%大豆(7S和11S):20%葵花奶油、6%豌豆:2%大豆(7S和11S):10%葵花奶油部分。与用单独经提纯的蛋白质制作或用单独奶油部分制作的干酪仿品相比,用经提纯的蛋白质加添加奶油部分制作的干酪仿品可以具有改良的奶油状质地。举例来说,与仅用经提纯的蛋白质或单独奶油部分产生的相当非乳制干酪仿品(其两者都产生更颗粒状的干酪仿品)相比,用4-8%豌豆球蛋白加10-20%奶油部分制作、通过转谷氨酰胺酶交联的干酪仿品产生坚硬但奶油状的非乳制干酪仿品。用经提纯的蛋白质加添加奶油部分制作的干酪仿品还可以很好地在通过老化时保持住油。所述仿品在持续一周或一周以上的老化研究中可以展现最小到无油渗漏。相比之下,由单独的交联经洗涤的奶油部分制备的干酪仿品是坚硬的并且保持干酪形式,能够被切割,但在老化时可能会展现油渗漏。出人意料地,发现与使用单独奶油部分制作的干酪仿品相比,添加一或多种经分离和提纯的蛋白质、即使是小于1%的量的经分离和提纯的蛋白质显著最小化从所得干酪仿品的油渗漏。与不包含经分离和提纯的蛋白质的仿品相比,添加0.65%重量/体积或更多的经分离和提纯的蛋白质到干酪仿品中可以显著最小化油渗漏。

[0252] 本发明还提供产生具有改良的熔融特征的非乳制干酪仿品的方法。一些当前可获得的非乳制干酪展现不良熔融能力。代替展现流畅熔融,非乳制干酪通常在加热期间凝结并且不能够流畅地熔融。在一些实施例中,所述方法包含通过变性使非乳制干酪源凝固。仅作为实例,可以将熔融性的性质赋予给通过将一或多种脂肪混合的蛋白质溶液混合成乳液而制备的干酪仿品,然后通过变性使乳液凝固。例示性变性方法描述于本文中。在一些实施例中,使优选地浓度是>5%蛋白质的蛋白质溶液与浓度在0.1-60%之间的一或多种油一起均质化。可以使所得乳液经历加热-冷却循环,其中将其加热到45-100C的温度后持续5-60分钟,并且然后冷却。可以将凝胶在<=25C的温度下孵育优选地2-16小时,并且然后任选地通过干酪布沥干。在一些实施例中,经沥干的凝乳准备好成形和老化或通过加热或按压进一步加工。

[0253] 如本文所述,未经分级分离的豌豆球蛋白在pH4-9和NaCl浓度0-1M之间不形成可逆凝胶。然而,在分级分离(如通过凝胶电泳所判断,达到>90%纯度)成豌豆球蛋白(+伴豌豆球蛋白)和豆球蛋白后,这些蛋白质可以在某些条件下形成可逆凝胶。在提纯(如通过凝胶电泳所测定,达到>90%纯度)后,可以使用来自豌豆的7S和11S蛋白以在某些pH和NaCl

条件下获得可熔凝胶。可以诱导经提纯的豌豆-7S蛋白在pH 7, 100mM NaCl下形成可熔凝胶。另一个方面, 当NaCl浓度是300mM时, 经提纯的豌豆-11S蛋白在pH 7-9之间形成可熔凝胶。

[0254] 在一些情况下, 可以诱导包含来自除大豆以外的植物源的蛋白质(例如绿豆球蛋白、豌豆蛋白等)的干酪仿品通过将其与大豆(7S和11S)组合使用而形成可熔凝胶。然后可以使优选地总蛋白质浓度是>5%(包含>0.2%大豆蛋白)的混合物与各种油或油体一起乳化, 并且然后使其通过上文所述的加热-冷却循环(例如加热到95°C并且冷却回到25°C)以形成可熔凝胶。熔融盐适用于帮助形成可熔凝胶, 以及保持特定蛋白质+油混合物(取决于蛋白质而非油)的熔融性。

[0255] 在一些实施例中, 可以将凝胶用微生物培养物接种以改良干酪仿品的风味、质地和/或外观。可以添加0-1%浓度的微生物, 例如细菌培养物(例如乳球菌属、乳杆菌属、链球菌属和丙酸菌属(*Propionii*)细菌)或霉菌(例如青霉属或地霉属)到非乳制干酪源中。可以将微生物在干酪制作过程期间的任一点与0.5-3%糖(例如葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖等)组合。在一些实施例中, 在加热-冷却循环的冷却阶段期间, 优选地当混合物在40C下或低于40C下时, 添加微生物和任选地糖到蛋白质-脂肪乳液中。可以将混合物保持在此温度下1小时, 并且然后进一步冷却, 随后沥干和成形。

[0256] 通过变性、例如通过加热/冷却循环形成的凝乳的熔融性还可以通过调节蛋白质混合物的pH和/或离子强度来调节。举例来说, 可以通过加热-冷却循环(加热到45-100C并且然后冷却到<=30C)通过将溶液的pH维持在3-9之间并且将离子强度维持在0-0.5M氯化钠之间, 诱导优选地浓度>5%的蛋白质溶液形成可熔凝胶。

[0257] 通过加热-冷却方法形成的凝乳的外观还可以通过溶液的pH和离子强度来调节。仅作为实例, 包含200mM氯化钠并且保持在pH8-9下的绿豆8S球蛋白溶液形成浅灰色的不透明凝乳。然而, 当降低溶液的离子强度(50mM氯化钠)时, 凝胶的外观变为半透明的白-淡灰色。

[0258] 在一些实施例中, 使用加热-冷却方法和交联(TG)的各种组合来调节干酪仿品的外观、质地和熔融性。举例来说, 可以使6%大豆(7S和11S)的溶液经历加热-冷却方法以获得容易并且可逆地熔融的凝乳。另外, 如果在冷却阶段期间、优选地在40C下添加转谷氨酰胺酶(0.1%)到凝乳中, 那么所得凝乳的外观更颗粒状并且更可控地熔融。

[0259] 拉伸:

[0260] 在一些实施例中, 使干酪仿品在加热时形成拉伸性串(“拉伸性干酪仿品”)。拉伸性干酪仿品可以例如通过使用包含经分离和提纯的植物蛋白的混合物制作, 所述经分离和提纯的植物蛋白例如豌豆、绿豆和大豆球蛋白、白蛋白、醇溶谷蛋白(玉米蛋白、豌豆醇溶谷蛋白)和晚期胚胎阶段富集蛋白(LEA)。仅作为实例, 这些蛋白质的来源包括谷类谷物, 包括例如大麦、小麦; 豆科植物, 例如绿豆; 来自芥菜属(*Arabidopsis*)的植物; 和酿酒酵母。这些蛋白质可以在溶液中在优选地>5%的变化浓度下使用。可以使蛋白质溶液与0-60%脂肪混合以产生乳液。在一些实施例中, 蛋白质溶液包含经分离和提纯的醇溶谷蛋白。在一些实施例中, 醇溶谷蛋白是从豌豆中分离的。添加这些醇溶谷蛋白增加拉伸性。

[0261] 可以通过交联或通过加热-冷却或交联与加热-冷却两者的组合使乳液凝固。在一些情况下, 使用0-2%熔融盐以改良凝胶的熔融性。在一些情况下, 可以添加0-1%微生物培

养物以改良干酪仿品的质地和风味。

[0262] 拉伸性干酪仿品可以使用多种非乳制干酪源制备,所述非乳制干酪源包括但不限于非乳制奶油部分、经提纯的蛋白质、非乳制奶(例如坚果奶)、包含一或多种经分离和提纯的蛋白质的蛋白质溶液、经分离的蛋白质和经分离的脂肪的乳液或其任何组合。在一些实施例中,非乳制干酪源是有经分离和提纯的豌豆醇溶谷蛋白蛋白质、玉米蛋白(经提纯的玉米醇溶谷蛋白)添加于其中的从植物源分离的非乳制奶。在一些实施例中,添加豌豆醇溶谷蛋白以实现0.1-10%或0.5-8%的浓度。与仅用非乳制奶制作的干酪仿品相比,添加豌豆醇溶谷蛋白或玉米蛋白到非乳制奶中可以改良所得干酪仿品的可拉伸性。

[0263] 在一些实施例中,干酪仿品的拉伸性可以通过并入凝聚物而改良。凝聚物可以原样用以形成可拉伸干酪,或与其它蛋白质在使用/不使用交联酶(例如转谷氨酰胺酶)的情况下组合以形成具有拉伸性质的干酪仿品。

[0264] 拉伸性还可以通过添加淀粉而增加,所述淀粉包括但不限于黄原胶、角叉菜胶、肉桂胶、蒟蒻胶、甲基纤维素和羟丙基甲基纤维素、羟丙基、海藻酸盐、瓜尔胶、刺槐豆胶、果胶和阿拉伯胶。可以添加胶以获得0.01-4%或0.05-2%的最终浓度。在一些实施例中,胶是黄原胶。添加黄原胶到非乳制干酪源中可以增加凝乳在凝固之后的粘性,其因此可以增加所得干酪仿品的可拉伸性。以0.05%到2%添加到植物类乳液(包括但不限于非乳制奶油部分、经提纯的蛋白质、坚果奶、蛋白质脂肪乳液或这些组分的混合物)中的黄原胶增加凝乳的粘性,使得干酪可拉伸。添加黄原胶可以增加否则的话非拉伸性干酪仿品的拉伸性,或可以增加拉伸性干酪仿品的拉伸性。

[0265] 硬干酪

[0266] 在另一个方面,本发明提供一种制备坚硬干酪仿品的方法,所述坚硬干酪仿品模拟硬干酪(例如帕尔马干酪或切达干酪)的质地、风味和坚硬度。在一些实施例中,将非乳制奶在凝固成凝胶之前用嗜热性细菌培养物接种。可以在凝固期间升高温度以允许凝乳释放更多乳清。可以将凝乳切成较小块片,例如1/2英寸正方形。可以使较小块片酸化。可以使较小块片在仍悬浮于其自身乳清中时凝固10分钟。在酸化之后,可以通过例如搅拌使凝乳破碎成较小块片,例如豌豆大小的块片。可以每五分钟升高乳清/凝结物的温度2度直到达到所要凝乳温度。所要内部温度可以是50-200°F。可以例如每10分钟搅拌凝乳以防止再积聚。可以使温度升高到125-130°F。可以分离凝乳并且对其沥干以形成硬干酪仿品。可以任选地使硬干酪仿品老化。

[0267] 干酪仿品可以按类似于传统干酪的方式被催熟。举例来说,可以使表面霉菌生长以产生外层。为了产生外层或颜色,所述过程可以在催熟过程中将某些细菌引入干酪仿品中。仅作为实例,可以引入亚麻短杆菌以使干酪仿品产生橙色和刺激性气味。

[0268] 在一些实施例中,干酪仿品可以有食用材料(例如香草、胡椒、香料)添加在其表面上以增强产品的风味或增加视觉吸引力。在一些实施例中,食用材料包埋于干酪仿品中。

[0269] 干酪仿品可以经改性以具有或不具有外层,可以在蜡中被涂布,并且可以具有蓝干酪典型的裂口和纹路。干酪仿品可以是可涂开的,例如奶油干酪。干酪仿品可以含有风味添加剂,例如:松露、蘑菇、坚果、香草、细香葱和其它风味。

[0270] 在一些实施例中,干酪仿品可以是成形的。举例来说,可以在篮子或模具中使干酪仿品成形。在一些实施例中,例如用一重物按压干酪仿品。按压可以帮助将任何额外液体从

干酪仿品中赶出。

[0271] 在一些实施例中,干酪仿品的生产包括上蜡步骤。在一个实施例中,上蜡程序如下:将食品级固体石蜡切割成1/2英寸的块片。放在双层蒸锅中并且将蜡加热到210°F。将干酪仿品放在标准冷冻机中持续十五分钟,以将干酪仿品的温度降到33°F。每片使用3克的熔融蜡,一次将蜡刷到干酪仿品一侧上。将上蜡的干酪仿品放到老化架上的洁净蜡纸上。使上蜡的干酪仿品在36°F、湿度75%的老化室中老化,例如持续六个月。在一些实施例中,老化室在33-70°F之间。在一些实施例中,改变老化室的湿度以辅助外层形成。在一些实施例中,使上蜡的干酪储存若干年,例如持续2年或2年以上。

[0272] 在一些实施例中,干酪仿品的生产包括烟熏步骤。在一些实施例中,将干酪仿品冷烟熏。在一些实施例中,在凝乳阶段或在凝乳阶段前将干酪仿品烟熏。在一些实施例中,在干酪仿品形成后将干酪仿品烟熏。在一些实施例中,烟熏程序如下:浸泡木屑六小时。将木屑的所有水沥干,并且放在烟熏单元中。点燃烟熏器,并且一旦木屑完全燃烧,则熄灭火焰以产生填充有烟雾的单元。将干酪仿品放在烟熏器中的架子上,每侧持续五分钟。从烟熏器中移出,并且放在冷却架上。将干酪仿品放在冷却室中,在36°F下24小时。在各种实施例中,将根据特定干酪仿品和特定所要味道特征来调节烟熏时间和冷却时间和温度。

[0273] 实例

[0274] 实例1:使用酶改良非乳制干酪仿品质地

[0275] 在不同时间点添加蛋白酶和脂肪酶的情况下产生软的成熟(SR)干酪仿品,并且评价蛋白酶和脂肪酶调节仿品的质地的能力。用经巴氏灭菌的杏仁和澳洲坚果奶制作十八个干酪仿品(参看实例20)。将坚果奶与0.03%MA11、0.15%Flora Danica、0.0045%白地霉、0.009%白青霉和0.007%汉逊德巴利酵母培养物一起培养,然后用0.5%转谷氨酰胺酶(ACTIVA TI,来自味之素)交联。检查如下的蛋白酶和/或脂肪酶的五种不同组合以及不具有蛋白酶或脂肪酶的三个对照:A=木瓜蛋白酶0.02%,B=Fromase™(来自根毛霉属(Rizomucor)的天冬氨酸蛋白酶,具有类似于来自凝乳酶(rennet)的凝乳酶(chymosin)的特异性)0.004%,C=木瓜蛋白酶0.01%+Fromase™ 0.002%,D=木瓜蛋白酶0.02%+脂肪酶G 0.001%,E=木瓜蛋白酶0.01%、PC脂肪酶0.0001%,和F=对照。在这三个时间添加蛋白酶和脂肪酶:(i)与培养物一起,(ii)在交联已经开始之后(在TG小时之后),和(iii)在沥出乳清之后。

[0276] 由盲法味道测试者和通过质地分析来评价干酪仿品(参看图1和图2)。品尝者如下将干酪仿品评定为1-5:1:太软;2:奶油状,但保持完整(例如楔形保持完整);3:有点太坚硬;4:实在太坚硬;和5:橡胶状并且易破。图1描绘以上干酪仿品如由味道测试者所测定的平均质地分数。如图1中所示,添加有蛋白酶的干酪仿品(样品A-E,在图1中称为1-5)大部分被评定为“奶油状并且楔形保持完整”,并且比不具有任何蛋白酶的干酪仿品显著更奶油状并且更软。无蛋白酶的对照仿品大部分被评定为“实在太坚硬”。数据表明,添加蛋白酶可以增加干酪仿品的奶油性。

[0277] 还使用质地分析仪(质地技术(texture Technologies)XT plus)测试干酪仿品的坚硬度。图2描绘添加有蛋白酶的软的成熟干酪仿品中的每一者如通过质地分析所测定的坚硬度。如图2中所示,具有蛋白酶的干酪仿品的质地比不具有蛋白酶的干酪仿品软得多。数据表明,添加蛋白酶可以降低干酪仿品的坚硬度。来自质地分析仪的数据支持由味道测

试者收集的数据。

[0278] 实例2:使用酶改良非乳制干酪仿品风味(以产生无法与相当乳酪区别的风味)。

[0279] 针对蛋白酶和脂肪酶调节非乳制干酪仿品的风味的能力,来评价在产生干酪仿品期间不同时间添加蛋白酶和脂肪酶而产生的软的新鲜(SF)干酪仿品(实例21)。如实例1中详述,用经巴氏灭菌的杏仁和澳洲坚果奶制作十八个干酪仿品。检查如下的蛋白酶和/或脂肪酶混合物的五种不同组合以及不具有蛋白酶或脂肪酶的三个对照:A=Fromase™0.004%;B=木瓜蛋白酶0.02%+脂肪酶G 0.001%;C=对照(无蛋白酶或脂肪酶);D=木瓜蛋白酶0.02%;E=木瓜蛋白酶0.01%+Fromase™ 0.002%;和F=木瓜蛋白酶0.01%+PC脂肪酶0.0001%。在这三个时间添加蛋白酶和脂肪酶:与培养物一起,在交联已经开始之后,和在沥出乳清之后。

[0280] 使用盲法味道测试者和GCMS来评价干酪仿品的多种风味。图3A描绘12名盲法味道测试者的偏好分数的总和。每名测试测试者将干酪仿品评定为1-3,1是最爱,2是所有其它,和3是最不爱。图3B描绘12名盲法味道测试者的风味分数的总和。每名味道测试者将干酪仿品评定为1-5,1是最佳风味(甜味、发酵、新鲜、几乎不浓、盐),5是最差风味(不正风味:坚果味、塑料味、金属味)。

[0281] 品尝者还将仿品评定为以下:其喜爱风味的程度、其总体优选的干酪仿品、酸度的量和黄油味风味的量。等级是1-5,1是对于风味最喜爱或整体最爱,或1是对于酸度或黄油味风味最少量。

[0282] 总体偏好:最少优选的干酪仿品是三个对照,其不添加有蛋白酶和脂肪酶;这些对照不如含有蛋白酶和/或脂肪酶的所有干酪仿品受喜爱,并且显著( $p < 0.05$ ,双尾T测试)不如含有木瓜蛋白酶0.02%或木瓜蛋白酶0.01%和Fromase™ 0.002%的干酪仿品受喜爱。最优选的干酪仿品在沥出乳清之后添加0.02%的木瓜蛋白酶。

[0283] 风味偏好:对于风味最不受喜爱的干酪仿品是三个对照,其不添加有蛋白酶或脂肪酶。这些对照不如含有蛋白酶和/或脂肪酶的所有干酪仿品受喜爱,并且显著( $p < 0.05$ ,双尾T测试)不如含有木瓜蛋白酶0.02%的干酪仿品和具有木瓜蛋白酶0.01%和Fromase™ 0.002%的干酪仿品受喜爱。最优选的干酪仿品含有0.02%的木瓜蛋白酶、0.01%的木瓜蛋白酶或0.01%的木瓜蛋白酶加0.002%Fromase™,在沥出乳清之后添加。

[0284] 黄油味风味:图4描绘干酪仿品如由味道测试者所测定的黄油度分数。每名测试测试者将干酪仿品评定为1-5,1是最少黄油味(无黄油味道),3(良好量的黄油味道),和5(太多黄油味道)。最少黄油味的干酪仿品是三个对照,其不添加有蛋白酶或脂肪酶。这些对照不如含有蛋白酶和/或脂肪酶的干酪仿品的黄油味大,并且显著( $p < 0.05$ ,双尾T测试)不如含有木瓜蛋白酶0.02%和木瓜蛋白酶0.01%和Fromase™0.002%的干酪仿品的黄油味大。最多黄油味的干酪仿品通过在沥出乳清之后添加0.02%的木瓜蛋白酶、0.01%木瓜蛋白酶或0.01%木瓜蛋白酶加0.002%Fromase™而产生。

[0285] 酸度:图5描绘干酪仿品的酸度分数。每名测试测试者将干酪仿品评定为1-5,1是最小酸度(无酸度),3(良好量的酸度),和5(太多酸度)。酸度的量在样品之间几乎不变化。

[0286] 还使用GCMS评价干酪仿品。将挥发性化学物质从于400mM NaCl中均质化的干酪仿品周围的顶部空间中分离。使用GCMS鉴别这些气味化学物质,并且进一步评价峰值以鉴别每种干酪仿品样品中的化合物。针对每种样品中的化学化合物,比较这组具有和不具有蛋

白酶和脂肪酶的干酪仿品,以鉴别因蛋白酶和/或脂肪酶的存在产生的化合物。发现不具有任何蛋白酶或脂肪酶的对照干酪仿品具有最少量的两种已知黄油味化合物:2,3,丁二酮和乙偶姻。与所有其它样品相比,在沥出乳清之后添加0.02%木瓜蛋白酶的样品具有最大量的2,3,丁二酮和乙偶姻两者。这种样品中2,3丁二酮的量比其不添加蛋白酶或脂肪酶的对照高30倍,并且与对照相比,在含有在沥出乳清之后添加的木瓜蛋白酶的样品中乙偶姻高超过10倍。GCMS结果与品尝结果一致,其显示,在沥出乳清之后添加0.02%的木瓜蛋白酶产生品尝起来最多黄油味的干酪仿品。表1描绘通过GCMS鉴别的黄油味化合物的相对量,其在具有不同蛋白酶和脂肪酶的样品之间变化,并且其还根据在干酪仿品制作过程中何时添加蛋白酶和脂肪酶而变化。使用定性等级展示每种风味组分的量。在无标志时,所存在的分子低于检测水平。+符号的数目表示在实验中检测到的目标分子的相对量,其中++++大于+++并且显著大于+。

[0287] 表1

	添加蛋白酶和脂肪酶的时序		
	与培养物一起	在 TG 之后	在沥干之后
<b>2,3,丁二酮</b>			
A = Fromase™ 0.004%(样品: 1、7、13)	+	+++	++
B =木瓜蛋白酶 0.02% +脂肪酶 G 0.001%(样品: 2、8、14)	+++	+	+
C =对照(无蛋白酶或脂肪酶)(样品: 3、9、15)			
D =木瓜蛋白酶 0.02%(样品: 4、10、16)	+++	++	+++++
E =木瓜蛋白酶 0.01% + Fromase™ 0.002%(样品: 5、11、17)	+++	+++	+++
F =木瓜蛋白酶 0.01% + PC 脂肪酶 0.0001%(样品: 6、12、18)	++++	+++	++++
<b>乙偶姻</b>			
A = Fromase™ 0.004%(样品: 1、7、13)	+	++++	++
B =木瓜蛋白酶 0.02% +脂肪酶 G 0.001%(样品 2、8、14)	++	+	+
C =对照(无蛋白酶或脂肪酶)(样品 3、9、15)			
D =木瓜蛋白酶 0.02%(样品: 4、10、16)	++	++	+++++
E =木瓜蛋白酶 0.01% + Fromase™ 0.002%(样品: 5、11、17)	++	+++	+++
F =木瓜蛋白酶 0.01% + PC 脂肪酶 0.0001%(样品: 6、12、18)	+++	++	++++

## [0288] 实例3-选择所要乳酸菌

[0290] 从商业产品MA11、MA14、MA19和Flora Danica中分离二十一(21)种个别细菌菌株。将这些混合直投型培养物涂在非选择性培养基上,并且通过用专门设计以在各种菌株(表2,其中LLL是指乳酸乳球菌乳酸亚种,LLC是指乳酸乳球菌乳脂亚种,LM是指肠膜明串珠菌,并且LLBD是指乳酸乳球菌丁二酮变种)之间区别的引物(表3)进行PCR来筛选。表2描绘来自发酵剂培养物的个别经分离的菌株。第一列鉴别经分离的菌株的来源,并且第一行描绘个别菌株的细菌亚种分类。在一些情况下,据利用,某些菌株(例如LLC)不良生长于某些培养基(例如LB+葡萄糖)上,并且选择最小菌落用于PCR分析。

[0291] 表2

[0292] 经分离的细菌菌株的清单.

	来源	LLL	LLC	LM	LLBD	其它
	MA11	LF5 LF7	LF2			
[0293]	MA14	LF24LF27 LF40	LF43			
	MA19	LF28	LF33			
	Flora Danica	LF16 LF50 LF17	LF15 LF54LF55	LF21LF53	LF13 LF14 LF49	LF51 乳球菌属的不确定的种

[0294] 表3描绘用于对经分离的菌株进行序列分析的引物。将引物组1-3(引物对1, SEQ ID NO:1-2; 引物对2, SEQ ID NO:3-4; 引物对3, SEQ ID NO.5-6)用于初步鉴别LLL、LLC和LLBD菌株。将引物对4(SEQ ID NO.5和6)用以鉴别LM菌株。

[0295] 表3

[0296] 引物的清单。

[0297]	引物	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
	引物1	TATGAAAGGACTTATCTTAAAGTT	ATTTTCAATCTCCATTTTTTAGAGT
	引物2	ATTCTTGATTTCAAAAAACCTGATT	AAATTGATTGAAGTCGGTCAAAAGT
	引物3	CAAAGTTCTTTGACATTATGTTG	CTAATGATGATTTAGATATGATGAC
	引物4	CCGACTCCTACGGGAGGCAGC	CTTGTGCGGGCCCCGTCATTC

[0298] 通过对PCR产物测序并且通过执行更广泛全基因组序列分析来进一步鉴别菌株。表型分析包括:雷迪选择性培养基上的生长、坚果培养基中的pH特征、糖发酵、GCMS以及品尝用个别菌株生产的凝乳和干酪仿品。干酪仿品品尝对于品尝者是不知情的并且进行多次。针对统计显著性评价品尝结果。

[0299] 还测试所选菌株对经过滤的坚果培养基的pH的作用。将坚果培养基与LF2、LF5或1:1比率的LF2和LF5菌株一起孵育至少17小时,并且在不同时间点进行pH取样。图6描绘LF2和LF5菌株对经过滤的坚果培养基的pH的作用。LF2(一种从MA11分离的LLC)在T17小时将经过滤的坚果培养基的pH从6.25降低到5.35,而LF5(一种从相同商业混合物分离的LLL)在相同时间段中将pH降低到4.23。

[0300] 实例4-使用特定乳酸菌产生所要风味

[0301] 将实例3中鉴别的个别菌株用以制作SF干酪仿品(参看实例21)。LF2、LF5和LF7的组合(包括1/3每一者)以及LF2和LF5的组合(包括1/2每一者)与盲法凝乳和干酪仿品品尝中的MA11同样受喜爱或更受喜爱。

[0302] 在细菌细胞浓度的4倍范围内每菌株从 $1.5 \times 10^8$ cfu/ml- $3.8 \times 10^7$ cfu/ml测试LF2:LF5的50:50混合物,并且发现产生与MA11(在 $3 \times 10^8$ cfu/ml的接种物浓度下)相同的最终pH(4.3)。品尝者发现在这个接种物范围中样品之间无显著风味差异。

[0303] 在盲法味道测试中,用LLL、LLC、LLBD和LM(例如LF2、LF5、LF21和LF14的混合物)的经分离的菌株制作的SR干酪仿品(参看实例20)与用Flora Danica(FD)制作的样品同样受喜爱或比其更被喜欢。

[0304] 还使用个别菌株制备SF干酪仿品(实例21)以更佳表征由每种菌株贡献的风味和质地特征。味道测试/质地偏好测试的结果描绘于表4中。

[0305] 表4

[0306] 用各种发酵剂培养物和经分离的细菌菌株制作的干酪仿品的质地和风味

[0307]	菌株	平均质地分数	主要风味	较少显性风味
	LLBD (MD88)	2	黄油味=坚果味	酸味
	LM (LM57)	1.11	黄油味=酸味	坚果味=甜味>花香=木味
	LF2 (LLC)	1.44	酸味>黄油味>坚果味	苦味=甜味
	LF5 (LLL)	1.67	酸味>黄油味=坚果味	甜味

[0308] 主要=超过50%的品尝者将风味记为存在;较少显性=三分之一或更多的品尝者将风味记为存在。将质地按1-5的等级记分,其中1=最软,并且2=对于SF干酪仿品理想的质地。

[0309] 品尝研究中的一些观察结果包括:

[0310] 用单独LM制作的干酪仿品的质地比用单独LLBD制作的干酪仿品软得多。

[0311] 用单独LM制作的干酪仿品具有主要酸味风味。样品还具有相当黄油味,但不如用单独LLBD制作的样品那么大。用单独LM制作的干酪仿品中的其它突出风味包括坚果味、甜味、花香和木味。

[0312] 用单独LLBD制作的干酪仿品具有主要黄油味味道。其还具有酸味,但不如用LM制作的样品大。LLBD样品还具有比用LM制作的干酪仿品坚果味更大并且更甜的风味。其它突出LLBD风味包括果味和花香。

[0313] 用LLC制作的干酪仿品可以具有比用单独LLL制作的干酪仿品苦味更大并且酸味更大的风味。

[0314] 实例5:添加的糖对SF干酪仿品中的风味产生的作用

[0315] 使用标准SF配方(参看实例21)制备SF干酪仿品。将每种凝结用LM57(LM,商业产品)或MD88(LLBD,商业产品)接种。添加20mM最终浓度的糖(葡萄糖、果糖、蔗糖或麦芽糖)到每种样品中,不添加糖的对照除外。坚果奶配方是约55mM蔗糖与可忽略量的葡萄糖、果糖和麦芽糖。由10名对干酪仿品的身份不知情的个体对SF干酪仿品进行味道测试。

[0316] 表5描绘干酪仿品样品和其对应细菌/糖实验条件的清单。

[0317] 表5

[0318] 干酪仿品样品和描述的清单。

[0319]	样品	描述
	A	LM57未添加糖
	B	LM57+20mM葡萄糖
	C	LM57+20mM果糖
	D	LM57+20mM蔗糖
	E	LM57+20mM麦芽糖
	F	MD88未添加糖
	G	MD88+20mM葡萄糖
	H	MD88+20mM果糖
	I	MD88+20mM蔗糖
	J	MD88+20mM麦芽糖

[0320] 要求品尝者对从以下类别品尝的每种风味记分一分:黄油味、坚果味、甜味、酸味、果味、花香、苦味、泥土味和坚果味。举例来说,由所有十名品尝者都判定为黄油味的干酪仿

品将得到分数10。每种样品的风味分数概述于表6A与6B中。每种菌株的组合风味分数(无关于添加的糖)展示于表6C中。

[0321] 表6A

[0322] 添加的糖对由LM产生的风味的作用

风味	未添加糖	葡萄糖	果糖	蔗糖	麦芽糖
黄油味	8	7	4	6	4
坚果味	4	2	3	4	2
甜味	4	1	1	2	4
酸味	8	8	9	7	8
果味	0	1	1	1	2

花香	3	1	1	2	2
苦味	1	1	0	1	0
泥土味	2	2	0	1	0
木味	3	1	2	2	0

[0325] 表6B

[0326] 添加的糖对由LLBD产生的风味的作用

风味	未添加糖	葡萄糖	果糖	蔗糖	麦芽糖
黄油味	6	9	9	8	9
坚果味	6	5	6	5	3
甜味	2	6	3	5	3
酸味	4	4	4	3	4
果味	2	2	1	1	2
花香	2	3	1	1	0
苦味	1	1	1	1	0
泥土味	1	1	1	0	2
木味	0	0	0	1	1

[0328] 表6C

[0329] 由LM(LM57)和LLBD(MD88)产生的风味,无关于添加的糖

风味	LM	LLBD
黄油味	29	41
坚果味	15	25
甜味	12	19
酸味	40	19
果味	5	8
花香	9	7
苦味	3	4
泥土味	5	5
木味	8	2

[0331] 品尝者检测到的主要风味是黄油味、酸味、坚果味和甜味。在LM与LLBD样品之间观察到多种差异。两个样品组对于黄油味风味都记高分,但添加的糖的存在不同地影响黄油度,在LLBD样品中均匀地增加这种风味,但在LM样品中倾向于减少其(图7,关于每种样品的描述,参看表5)。与LM一起培养的样品被评定为比用LLBD制作的样品酸味更大,并且酸度相对不受添加的糖的存在影响。图8展示组合黄油味和酸度分数(无关于添加的糖)。

[0332] 在两种菌株之间对于坚果性和甜度观察到同样差异。总的来说,用LM制作的样品比用LLBD制作的样品坚果味更小并且甜味更小(参看图9与10)。

[0333] 使每种干酪仿品经历通过GC-MS的分析。结果概述于表7中。

[0334] 表7

[0335]

挥发性风味化合物	糖	LLBD	LM
辛烷	所有条件	-	-
乙醇	+麦芽糖	+++	++
乙醇	未添加糖	++	+
2,3-丁二酮	所有条件	+	++
乙偶姻	无糖或+蔗糖	+++	++
乙偶姻	+其它糖	+++	+
丁酸	所有条件	+++	++
2-庚酮	未添加糖	-	-
2-庚酮	+葡萄糖	+++	+
壬醇	未添加糖	-	+
壬醇	+葡萄糖	-	++
乙酸	+蔗糖或+麦芽糖	++++	+++
乙酸	未添加糖	-++++	++
乙酸	+葡萄糖	-++++	+
乙酸	+果糖	-++++	+
1,3-丁二醇	所有条件	-+++	++

[0336] 根据这些数据,得到以下结论:

[0337] 酸度:用单独LM制作的干酪仿品具有主要酸味风味。用LLBD制作的样品也是酸味的,但不如用LM制作的样品那么大。乙酸通过LLBD和LM产生:更多通过LLBD比通过LM产生。尽管蔗糖和麦芽糖增加借助LM的乙酸产生并且葡萄糖和果糖减少其,但糖似乎不影响品尝者对酸味风味的感知。很可能乙酸不是借助这些菌株产生的唯一酸味风味化合物。

[0338] 黄油度:LM和LLBD样品两者都具有突出黄油味风味,LLBD总的来说比LM黄油味更大。借助两种菌株产生三种黄油味风味化合物:2,3-丁二酮、乙偶姻和丁酸。LM产生更多2,3-丁二酮,并且LLBD产生更多乙偶姻和丁酸。葡萄糖、果糖和麦芽糖减少借助LM产生的乙偶姻的量,并且品尝者同样发现用果糖和麦芽糖制作的样品黄油味最少。总的来说,添加的糖似乎增加LLBD样品的黄油度。

[0339] LLBD样品还具有比用LM制作的干酪仿品坚果味更大并且更甜的风味。在LLBD的情况下可以添加糖来增加甜度。

[0340] 实例7-滴定坚果奶奶油和脱脂部分以制作干酪仿品

[0341] 典型地,坚果奶由杏仁奶比澳洲坚果奶的55:45混合物按以下配方制备:

[0342] 49.45%杏仁脱脂

[0343] 22.40%澳洲坚果脱脂

[0344] 5.12%杏仁奶油(其是约59%脂肪)(参看WO 2013/010037的实例1)

[0345] 23.02%澳洲坚果奶油(其是约63%脂肪)

[0346] 这个配方含有28%奶油(5.12%杏仁奶油加23.02%澳洲坚果奶油)。这个配方中的脂肪百分比是约17.5g脂肪/100g配方。

[0347] 使杏仁比澳洲坚果的比率变为78:22(23.6%杏仁脱脂、7%杏仁奶油、4.7%澳洲坚果脱脂、4%澳洲坚果奶油),维持28%奶油,并且进行盲法品尝。用这个配方制作的SF干酪仿品与45:55混合物一样多地受喜爱,并且在风味和质地方面不可区别。

[0348] 实例8控制脂肪保留

[0349] 用不同类型和不同量的脂肪制作干酪仿品,并且比较其保留脂肪的能力。干酪仿品都用4%绿豆8S蛋白溶液制作,与以下中的每一者一起均质化:5-40%的葵花奶油部分、5-40%的葵花油或5-40%的棕榈油,将每种乳液加热到95°C并且然后冷却回到30°C。在30°C下,添加0.03%MA11和1%葡萄糖到两种样品中。然后将混合物在25°C下孵育过夜,接着将未胶凝的液体通过干酪布沥干。

[0350] 比较所有干酪仿品凝胶在室温下和在加热达到100°C时保留脂肪的能力。具有4%绿豆蛋白和葵花奶油部分(5%到40%的所有测试量)的非乳制干酪仿品在室温下无脂肪渗漏,并且在加热到100°C时无脂肪渗漏。用4%绿豆蛋白和10%到40%葵花油制作的干酪仿品凝胶在室温下都具有脂肪渗漏,并且在加热时具有甚至更大油渗漏。对于用4%绿豆蛋白和5%葵花油制作的干酪仿品凝胶在加热时可见油渗漏。用4%绿豆蛋白和20%到40%棕榈油制作的干酪仿品凝胶在室温下都具有脂肪渗漏,并且在加热时具有甚至更大油渗漏。对于用4%绿豆蛋白和10%棕榈油制作的干酪凝胶在加热时可见油渗漏。

[0351] 实例9:提纯所要蛋白质

[0352] 所有步骤都在4°C或室温下进行。离心步骤在8000g下在4°C或室温下持续20分钟。将粉悬浮于特定缓冲液中,将悬浮液离心,并且将上清液通过0.2微米PES膜微滤,并且然后通过Spectrum Labs KrosFlo中空纤维切向流过滤系统上在3kDa、5kDa或10kDa分子量截断PES膜上超滤而浓缩。

[0353] 一旦分级分离,则将所有关注的硫酸铵沉淀物部分储存于-20°C下直到进一步使用。在其用于实验之前,将沉淀物再悬浮于10体积的50mM磷酸钾缓冲液(pH 7.4),+0.5M NaCl中。将悬浮液离心,并且将上清液通过0.2微米PES膜微滤,并且然后通过Spectrum Labs KrosFlo中空纤维切向流过滤系统上在3kDa、5kDa或10kDa分子量截断PES膜上超滤而浓缩。通过SDS-PAGE来监测个别分级分离步骤处的蛋白质组合物,并且通过标准紫外可见法测量蛋白质浓度。

[0354] (i) 豌豆白蛋白:干绿色或黄色豌豆粉用作豌豆白蛋白的来源。将粉悬浮于10体积的50mM乙酸钠缓冲液(pH 5)中,并且搅拌1小时。通过离心(8000g,20分钟)或通过5微米过滤器过滤,将溶解的蛋白质与未提取的蛋白质和豌豆籽碎屑分离。分别收集上清液或滤液。向这一粗蛋白提取物中添加固体硫酸铵到50%wt/v饱和度。将溶液搅拌1小时,并且然后进行离心。向来自这一步骤的上清液中添加硫酸铵以达到90%wt/v饱和度。将溶液搅拌1小

时,并且然后离心以收集呈球粒的豌豆白蛋白蛋白质。将球粒储存于-20℃下直到进一步使用。将蛋白质从球粒回收并且如上文所述而制备供使用,例外之处在于,最终缓冲液可以含有0-500mM氯化钠。

[0355] 在一些实施例中,将粉悬浮于10体积的50mM NaCl (pH 3.8)中,并且搅拌1小时。通过离心(8000g,20分钟),将溶解的蛋白质与未提取的蛋白质和豌豆籽碎屑分离。将上清液收集,并且通过0.2微米膜过滤,并且使用10kD分子量截断PES膜浓缩。

[0356] (ii) 豌豆球蛋白:干绿色豌豆粉用以提取豌豆球蛋白蛋白质。将粉悬浮于10体积的50mM磷酸钾缓冲液(pH 8)和0.4M氯化钠中,并且搅拌1小时。通过离心将溶解的蛋白质与豌豆籽碎屑分离。使上清液在两个步骤中经历50%和80%饱和度下的硫酸铵分级分离。将含有所关注的球蛋白的80%球粒储存于-20℃下直到进一步使用。将蛋白质从球粒回收并且如上文所述而制备供使用。

[0357] iii) 大豆7S和11S球蛋白:通过以下方式分离来自大豆粉的球蛋白:首先将低脂/脱脂大豆粉悬浮于4-15体积的10(或20)mM磷酸钾(pH 7.4)中。将浆液在8000rcf下离心20分钟,或通过5微米过滤进行澄清,并且收集上清液。粗蛋白提取物含有7S和11S球蛋白两者。然后将溶液进行0.2微米过滤,并且在Spectrum Labs KrosFlo中空纤维切向流过滤系统上使用10kDa分子量截断PES膜或借助通过阴离子交换树脂而浓缩,随后用于实验中。通过等电沉淀将11S球蛋白与7S蛋白分离。用稀HCl将粗蛋白提取物的pH调节到6.4,搅拌30分钟-1小时,并且然后进行离心以收集11S沉淀物和上清液中的7S蛋白。将11S部分用10mM磷酸钾(pH 7.4)再悬浮,并且将蛋白质部分在使用之前微滤并且浓缩。

[0358] 还可以通过以下方式提取大豆蛋白:将脱脂大豆粉悬浮于4-15体积(例如5体积)的20mM碳酸钠(pH 9)(或水,在添加粉之后pH调节到9)或20mM磷酸钾缓冲液(pH 7.4)和100mM氯化钠中,以减少经提纯的蛋白质中的不正风味。将浆液搅拌一小时,并且在8000×g下离心20分钟。将提取的蛋白质超滤并且然后如上所述进行加工,或者,将上清液收集并且通过0.2微米膜过滤并且使用10KDa截断PES膜浓缩。

[0359] (iv) 绿豆8S球蛋白:绿豆粉用以通过以下方式提取8S球蛋白:首先将粉悬浮于4体积的50mM磷酸钾缓冲液(pH 7)(对于实验室等级提纯,+0.5M NaCl)中。在离心之后,通过分别在2个步骤中以50%和90%饱和度添加硫酸铵来分级分离上清液中的蛋白质。来自90%部分的沉淀物含有8S球蛋白,并且将其保存于-20℃下直到进一步使用。将蛋白质从球粒回收并且如上文所述而制备供使用。

[0360] 还可以通过以下方式提取绿豆球蛋白:将粉悬浮于4体积的20mM碳酸钠缓冲液(pH 9)(或水,在添加绿豆粉之后调节到pH 9)中,以减少经提纯的蛋白质部分中的不正风味。将浆液离心(或过滤)以去除固体,对其进行超滤,并且然后如上文所述进行加工。

[0361] (v) 晚期胚胎富集蛋白:将粉(包括但不限于绿豆和大豆粉)悬浮于20mM Tris-HCl(pH 8.0)、10mM NaCl中,并且在室温下搅拌1小时,然后离心。添加酸(HCl或乙酸)到上清液中到5%浓度(v/v),在室温下搅拌,然后离心。将上清液加热到95℃后持续15分钟,并且然后离心。将上清液通过添加三氯乙酸到25%而沉淀,离心,然后用丙酮洗涤。同样可以按相反方向进行加热和酸洗步骤。

[0362] (vi) 豌豆醇溶谷蛋白:将干绿色豌豆粉悬浮于5×(w/v)60%乙醇中,在室温下搅拌一小时,然后离心(7000g,20分钟),并且收集上清液。通过将溶液加热到85℃并且然后冷

却到室温来使上清液中的乙醇蒸发。添加冰冷的丙酮(1:4 v/v)以使蛋白质沉淀。然后将溶液离心(4000g,20分钟),并且回收呈淡米色球粒形式的蛋白质。

[0363] (vii) 玉米蛋白-醇溶谷蛋白:将玉米蛋白浓缩物或粉悬浮于 $5 \times (w/v)$  60%乙醇中,在室温下搅拌一小时,然后离心。将上清液中的乙醇通过加热蒸发,并且然后对溶液进行离心,并且回收球粒形式的蛋白质。

[0364] (viii) 通过以下方式从苜蓿绿分级分离RuBisCO:首先在掺合机中将叶子与4体积的冷50mM磷酸钾缓冲液(pH 7.4缓冲液)(0.5M NaCl+2mM DTT+1mM EDTA)一起研磨。将所得浆液离心以去除碎屑,并且使用上清液(粗溶解物)进行进一步提纯步骤。通过添加硫酸铵到30% (wt/v) 饱和度来分级分离粗溶解物中的蛋白质。将溶液搅拌1小时,并且然后离心。弃去来自这一步骤的球粒,并且添加额外硫酸铵到上清液中达到50% (wt/v) 硫酸铵饱和度。在搅拌1小时之后再次对溶液进行离心。来自这一步骤的球粒含有RuBisCO,并且使所述球粒保持在-20℃下直到使用。将蛋白质从球粒回收并且如上文所述而制备供使用。

[0365] 还可以通过将粗溶解物调节到0.1M NaCl并且施用到阴离子交换树脂来提纯RuBisCO。将弱结合蛋白质污染物用50mM磷酸钾缓冲液(pH 7.4缓冲液)+0.1M NaCl洗涤。然后将RuBisCO用高离子强度缓冲液(0.5M NaCl)洗脱。

[0366] 借助通过装有活性炭的柱使RuBisCO溶液脱色(pH 7-9)。着色剂结合到柱,同时Rubisco在滤液中被分离。

[0367] 或者还通过将溶液用装于柱中的FPX66(陶氏化学(Dow Chemicals))树脂(或分批模式)孵育,来使RuBisCO溶液脱色。将浆液孵育30分钟,并且然后将液体与树脂分离。着色剂结合到树脂,并且收集在柱流过物中的RuBisCO。

[0368] 在一些实施例中,通过以下方式从菠菜叶分离RuBisCO:首先在掺合机中将叶子与4体积的20mM磷酸钾缓冲液(pH 7.4缓冲液+150mM NaCl+0.5mM EDTA)一起研磨。将所得浆液离心以去除碎屑,并且将上清液(粗溶解物)通过0.2微米膜过滤,并且使用10KDa截断PES膜浓缩。

[0369] 在一些实施例中,通过以下方式从苜蓿或小麦草汁粉提取RuBisCO:将粉与4体积的20mM磷酸钾缓冲液(pH 7.4缓冲液+150mM NaCl+0.5mM EDTA)于掺合机中混合。将所得浆液离心以去除碎屑,并且将上清液(粗溶解物)通过0.2微米膜过滤,并且使用10KDa截断PES膜浓缩。

[0370] (xi) 油体蛋白.从葵花籽提纯葵花油体。将葵花籽以1:3 wt/v掺合于100mM磷酸钠缓冲液(pH 7.4)、50mM氯化钠、1mM EDTA中。通过离心(5000g,20分钟)收集油体,并且将其以1:5 (wt/v)再悬浮于50mM氯化钠、2M脲中,并且4℃下搅拌30分钟。重复2M脲洗涤和离心步骤。将通过离心收集的油体再悬浮于100mM磷酸钠缓冲液(pH 7.4)、50mM氯化钠中。再次重复离心和洗涤步骤,并且从最后一次离心步骤获得最终经洗涤的油体部分。将油体以10% wt/w再悬浮于100mM磷酸钠缓冲液(pH7.4)、50mM氯化钠、2%wt/v植物油脂脂肪酸盐中,在5000psi下均质化,并且在4℃下孵育12小时。将溶液离心(8000g,30分钟),去除顶层,并且收集溶解的部分。SDS-PAGE分析表明,油体蛋白是溶解的部分中所存在的主要蛋白质。油体蛋白浓度是2.8mg/ml。

[0371] (ix) 豌豆总蛋白:干绿色或黄色豌豆粉用以提取总豌豆蛋白。将粉悬浮于10体积的20mM磷酸钾缓冲液(pH 8)和100mM氯化钠中,并且搅拌1小时。通过离心将溶解的蛋白质

与豌豆籽碎屑分离。将上清液收集,并且通过0.2微米膜过滤,并且使用10kDa截断PES膜浓缩。

[0372] (x) 豌豆豌豆球蛋白和豌豆豆球蛋白:干绿色或黄色豌豆粉用以如上文所述提取总豌豆蛋白。使用离子交换色谱将获得的其粗豌豆混合物分级分离成豌豆豌豆球蛋白和豌豆豆球蛋白。将材料装载于Q琼脂糖速流树脂上,并且在盐浓度从100mM变成500mM NaCl时,收集洗脱份。在350mM氯化钠下收集豌豆豌豆球蛋白,而在460mM氯化钠下收集豌豆豆球蛋白。将收集的洗脱份使用10KDa截断PES膜浓缩。

[0373] (xi) 苜蓿粉脱水蛋白:将苜蓿粉悬浮于5体积的0.5M氯化钠(pH 4.0)中,并且搅拌1小时。通过离心(8000g,20分钟),将溶解的蛋白质与未提取的蛋白质和小扁豆籽碎屑分离。将上清液收集,并且通过0.2微米膜过滤,并且使用3kDa截断PES膜浓缩。通过以下方式来获得脱水蛋白从这一部分的进一步增浓:使浓蛋白材料沸腾,在8000g下旋转10分钟,和收集上清液。

[0374] 实例10:添加细菌培养物到包含经提纯的蛋白质的可熔凝胶中

[0375] 用细菌培养物通过使包含2%豌豆球蛋白和4%大豆蛋白的混合物经历均质化,来制作可熔凝胶。将乳液加热到95°C,保持在95°C下15分钟,并且然后冷却回到室温,然后在冷却阶段期间在30°C下添加0.03%乳酸乳球菌培养物和1%葡萄糖。使凝胶在25°C下孵育过夜,并且沥干以获得凝胶,其在70°C下可逆地熔融。

[0376] 实例11:制备用于干酪仿品中的奶油部分

[0377] 奶油部分通过以下方式产生:将葵花籽掺合到5倍重量比体积的具有400mM NaCl和1mM EDTA的40mM磷酸钾(pH 8)溶液中,然后冷却到20°C。对所得浆液(浆液1)离心。将顶部奶油层从浆液1移出并且掺合于相同缓冲液中,然后在40°C下加热1小时,下部水层是脱脂部分。将所得浆液(浆液2)冷却,然后离心;将奶油层从浆液2移出并且与5倍重量比体积的具有400mM NaCl的100mM碳酸钠(pH 10)混合,然后离心以获得浆液3。然后将来自浆液3的顶层与5倍重量比体积的水混合,并且再次离心。所得奶油是非常奶油状的白色,并且由味道测试者描述为不具有苦味、具有中性味道并且具有极佳口感。

[0378] 实例12-产生具有经分离的大豆蛋白的熔融干酪仿品

[0379] 将6%大豆蛋白(7S+11S球蛋白)溶液与20%葵花油一起均质化,并且将乳液加热到95°C,并且然后冷却回到25°C。将混合物在≤25°C的温度下孵育过夜,并且然后通过干酪布沥干。所得凝胶可逆地熔融,即在加热时熔融并且在再冷却时凝结。可以将凝胶倾入模具中以便成形。

[0380] 如果在凝胶形成之前,即在应用加热-冷却循环(加热到95°C,保持在95°C下15分钟,并且冷却回到25°C)之前添加0.6%的未经分级分离的大豆蛋白到混合物中,那么诱导包含4%绿豆球蛋白的凝胶在加热时熔融。

[0381] 如果在如上文所述用加热-冷却循环形成凝胶之前添加4%浓度的大豆蛋白到混合物中,那么诱导包含2%豌豆球蛋白的凝胶在加热时熔融。

[0382] 实例13-包含经分离的蛋白质、不具有大豆蛋白的可熔凝胶

[0383] 当氯化钠的浓度维持在80mM下并且溶液经历加热-冷却循环(加热到95°C并且冷却回到25°C)时,不含大豆的可熔凝胶由在pH 8下以7%浓度于溶液中的绿豆8S球蛋白制成。凝胶可逆地熔融。

[0384] 在pH 7.4和50mM氯化钠下的绿豆8S球蛋白溶液还形成凝胶,其在应用加热-冷却循环(加热到95℃并且冷却回到25℃)之后可逆地熔融。

[0385] 实例14:非乳制熔融干酪仿品,通过添加熔融盐和阳离子

[0386] 在这个实例中,将4%绿豆8S蛋白溶液与20%棕榈油一起均质化,并且将乳液加热到95℃并且然后冷却回到30℃,并且添加0.03%MA11和1%葡萄糖。将混合物在25℃下孵育过夜,并且然后将胶凝和未胶凝的液体(即乳清)借助通过干酪布沥干而分离。所得干酪仿品凝胶在室温下非常软,并且在加热时不熔融,如粘度无可逆变化所指示。在沥出乳清之后添加3%柠檬酸钠导致干酪仿品凝胶熔融,干酪仿品凝胶在加热时变成液体并且在冷却到室温时坚硬度增加。可以将所得干酪仿品凝胶倾入模具中以便成形。

[0387] 在这个实例中,具有和不具有CaCl<sub>2</sub>的比较两种样品;一种样品是与1mM CaCl<sub>2</sub>混合的6%大豆蛋白(7S和11S)溶液,并且另一者是不具有CaCl<sub>2</sub>的6%大豆蛋白(7S和11S)溶液。将两种样品加热到95℃并且然后冷却回到30℃。在30℃下,添加0.03%MA11和1%葡萄糖到两种样品中。然后将混合物在25℃下孵育过夜,接着借助通过干酪布对未胶凝的液体沥干而将胶凝的材料与未胶凝的液体分离。所得凝胶在室温下是固体,并且在加热时不熔融,即粘度无变化。添加1%熔融盐(柠檬酸钠、磷酸三钠、六偏磷酸钠或磷酸二钠)(在沥出乳清之后添加)导致两种干酪在加热时粘度有一定程度的变化,两种干酪仿品在室温下都是坚硬的。具有CaCl<sub>2</sub>具有熔融盐的干酪仿品凝胶的粘度有大的增加。具体来说,添加1%六偏磷酸盐到含有CaCl<sub>2</sub>的干酪仿品凝胶中导致凝胶变得可熔,因为其在加热时变为液体。在冷却时,所有干酪仿品凝胶在室温下都是坚硬的。

[0388] 实例15:非乳制非大豆熔融干酪仿品,通过添加脂肪

[0389] 在这个实例中,比较具有和不具有饱和脂肪的两种样品。一种样品是与20%棕榈油混合的6%rubisco溶液,并且另一者是不具有棕榈油的6%rubisco溶液。将两种样品加热到95℃并且然后冷却回到30℃。在30℃下,添加0.03%MA11和1%葡萄糖,并且然后将混合物在25℃下孵育过夜。比较干酪仿品凝胶的坚硬度和可熔融性。不具有棕榈油的所得凝胶非常软并且在加热时无粘度变化。具有6%rubisco和20%棕榈油的样品在室温下是凝胶,并且在加热时粘度增加以变为液体,并且然后在再次冷却后再凝固。添加饱和脂肪使非熔融凝胶被制作成熔融干酪仿品。这还在添加饱和脂肪到绿豆蛋白干酪仿品凝胶中时观察到。

[0390] 实例16:使用经分离的蛋白质产生非乳制拉伸性干酪仿品

[0391] 在这个实例中,比较具有和不具有从豌豆粉提纯的醇溶谷蛋白的两种样品;一种样品是与2%豌豆醇溶谷蛋白混合的4%大豆蛋白(7S和11S)溶液、2%豌豆-球蛋白,并且另一种样品是与2%豌豆-球蛋白混合的6%大豆蛋白(7S和11S)溶液;将两种样品加热到95℃并且然后冷却回到30℃。在30℃下,添加0.03%MA11和1%葡萄糖到两种样品中。然后将混合物在25℃下孵育过夜,接着借助通过干酪布对未胶凝的液体沥干而将胶凝的材料与未胶凝的液体分离。所得干酪仿品凝胶在室温下都是固体,含有醇溶谷蛋白的干酪仿品凝胶更坚硬。两种凝胶在加热时也熔融,如粘度增加所展示。在加热时样品的粘度并无明显不同,但醇溶谷蛋白样品在冷却时粘度的变化更大,因为其在室温下更坚硬。在加热时,具有醇溶谷蛋白的干酪仿品在分子之间的相互作用方面有所增加。在将具有醇溶谷蛋白的干酪仿品的一部分拉离样品的其余部分时,其显示拉伸性,归因于其余凝胶保持其分子间相互作用。

这些拉伸性质未见于不具有醇溶谷蛋白的样品中。

[0392] 实例17:使用多糖产生拉伸性非乳制干酪仿品

[0393] 比较具有和不具有0.5%黄原胶的干酪仿品。一种样品是与2%豌豆-醇溶谷蛋白和0.5%黄原胶混合的4%大豆蛋白(7S和11S)溶液、2%豌豆-球蛋白;另一种样品是4%大豆蛋白(7S和11S)溶液、2%豌豆-球蛋白并且与2%豌豆-醇溶谷蛋白混合;另一种样品是4%大豆蛋白(7S和11S)溶液、2%豌豆-球蛋白;最后一种样品是4%大豆蛋白(7S和11S)溶液、2%豌豆-球蛋白和0.5%黄原胶。将所有样品加热到95℃并且然后冷却回到25℃。然后将混合物在25℃下孵育过夜,然后通过干酪布沥干,以将胶凝材料与未胶凝的液体分离。所得干酪仿品凝胶都在室温下胶凝,含有醇溶谷蛋白和/或黄原胶的凝胶比其它凝胶更坚硬。所有凝胶在加热时都熔融,如粘度增加所展示。在加热时,还显示,具有黄原胶的两种干酪仿品在分子之间的相互作用方面有所增加,大于无黄原胶的干酪仿品。如在实例16中,具有醇溶谷蛋白的干酪仿品展现拉伸性质。

[0394] 实例18:使用交联的经分离的蛋白质产生干酪仿品

[0395] 干酪仿品由4%豌豆-球蛋白、20%葵花奶油部分和1%葡萄糖的乳液通过以下方式制作:加热到24℃,然后添加0.03%的MA11,并且孵育1小时。在孵育之后,将加热增加到38℃,并且添加0.6%转谷氨酰胺酶,并且将温度保持在38℃下1小时。将瓮/烧杯中的混合物保持在室温下12小时以使混合物凝结。在12小时之后,最终凝乳的pH是4.2。然后将乳清通过黄油平纹细布从凝乳沥出,并且然后将凝乳搅拌并且勺起到模巢中,并且保持在室温下1小时。在室温下24小时之后,将干酪仿品从模巢移出并且储存在4℃下。

[0396] 实例19-制作硬干酪仿品的方法

[0397] 将非乳制奶用嗜热性培养物接种,随后形成凝胶。在形成凝胶期间,缓慢升高温度以使凝乳释放更多乳清。将凝乳切成1/2英寸正方形,并且使其酸化10分钟,仍悬浮于其自身的乳清中。在10分钟之后,将凝乳用大搅拌器搅拌,使其破碎成豌豆大小的块片。在那时,通过于水浴中加热每五分钟升高乳清/凝结物的内部温度2度直到达到所要内部温度(130°F)。每10分钟搅拌凝乳以确保其不再积聚。然后分离凝乳并且对其沥干以形成硬干酪仿品。然后使硬干酪仿品老化。

[0398] 实例20-制作软的成熟干酪仿品的方法

[0399] 以下是贯穿实例所用以制作软的成熟(SR)干酪仿品的标准配方。所用的标准经巴氏灭菌的奶混合物具有28%奶油,由55%杏仁和45%澳洲坚果制成。将奶加热到90±3°F,然后使Florica Danica、嗜温性发酵剂(MA11、LF2、LF5、LF7、LF21、MD88或其它培养物)、白地霉、白青霉和汉逊德巴利酵母培养物在奶的顶部水合5分钟,随后将其搅拌到奶中。可以在这个步骤添加蛋白酶和/或脂肪酶(溶解于水中)。将含有培养物的奶保持在90±3°F下90分钟。在一小时之后,调配物的pH通常下降到5.6±0.2。在所述一小时之后,将循环器调节到110°F,并且添加转谷氨酰胺酶(在临使用之前溶解于水中)。将调配物搅拌直到完全并且均匀混合到奶中,并且在凝结的其余时间保持不搅拌。在调配物达到100°F后,关闭循环器,并且将调配物保持在水浴中10分钟。也可以在这个步骤添加蛋白酶和/或脂肪酶(溶解于水中)。在那时,将瓮/烧杯从水中取出,并且在室温下用塑料包裹膜覆盖12小时以凝结。

[0400] 在12小时之后,最终凝乳的pH是4.4。将凝乳切成1英寸正方形,并且使其静置5分钟。然后将乳清从凝乳通过黄油平纹细布沥出,通常产生50%凝乳和50%乳清。也可以在这

个步骤添加蛋白酶和/或脂肪酶(溶解于水中)到凝乳中。将凝乳搅拌5分钟,勺起到微穿孔模巢中到所要重量,并且然后使其在室温下静置1小时。在一小时之后,将覆盖层放在每个模巢上的凝乳上。使凝乳再在室温下在模巢中沥干1小时,并且然后将模巢中的凝乳在36°F下按压24小时。在按压时间之后,使干酪仿品在其模巢中盐渍(时间取决于块片的大小,6oz干酪仿品=20分钟)。

[0401] 将仍在其模巢中的干酪仿品在50°F下完全浸没于预加热的饱和盐水中。在盐渍之后,将模具放在沥干架上,并且返回到36°F后持续24小时。然后将每种干酪仿品从其模具移出并且放在沥干垫上,并且返回到36°F后持续24小时。在24小时之后,将干酪仿品从36°F转移到干燥酵母室中,在60°F、75%湿度下持续三天。在三天之后,将干酪仿品从沥干垫转移到老化垫。将垫子放在老化架上,并且移到50°F下、具有90%湿度和连续空气流的催熟室。每两天转动干酪仿品并且更换垫子。在七天之后,将干酪仿品直接转移到老化架上,使最大通气再持续七天,或直到模具覆盖完成。在模具覆盖完成之后,将干酪仿品移到36°F下,持续十六小时。然后将干酪仿品包裹于穿孔纸中。可以在两周后品尝干酪仿品。

[0402] 实例21-制作软的新鲜干酪仿品的方法

[0403] 以下是贯穿实例所用以制作软的新鲜(SF)干酪仿品的标准配方。用以制作SF干酪仿品的标准经巴氏灭菌的奶具有28%奶油,由55%杏仁和45%澳洲坚果制成。将奶加热到 $83 \pm 3^\circ\text{F}$ ,然后添加MA11或其它细菌培养物(使培养物在奶的顶部水合5分钟,随后将其搅拌到奶中)。可以在这个步骤添加蛋白酶和/或脂肪酶(溶解于水中)。将含有培养物的奶保持在 $83 \pm 3^\circ\text{F}$ 下1小时。在一小时之后,调配物的pH通常下降到 $5.6 \pm 0.2$ 。在所述一小时之后,将循环器调节到110°F,并且添加转谷氨酰胺酶(在临使用之前溶解于水中)。将调配物完全并且均匀搅拌到奶中,并且在凝结的其余时间保持不搅拌。在调配物达到100°F(其花费 $50 \pm 10$ 分钟来达到温度)后,关闭循环器,并且将调配物保持在水浴中10分钟。也可以在这个步骤添加蛋白酶和/或脂肪酶(溶解于水中)。在那时,将瓮/烧杯从水浴中移出,并且用塑料包裹膜覆盖,并且使其在室温下凝结12小时。在12小时之后,最终凝乳的pH是 $4.4 \pm 0.1$ (如果是正常配方的话)。将凝乳切成1英寸正方形,并且使其静置5分钟。然后将乳清从凝乳通过黄油平纹细布沥出,通常产生50%凝乳和50%乳清。也可以在这个步骤添加蛋白酶和/或脂肪酶(溶解于水中)到凝乳中。将凝乳搅拌5分钟,勺起到模巢中到所要重量,并且然后使其在室温下静置1小时。在一小时之后,将覆盖层放在凝乳上,并且在每个模巢上添加600g重物。使凝乳在室温下在模巢中再沥干1小时。然后将模巢中的凝乳在36°F下按压24小时。在按压时间之后,使干酪仿品在其模巢中盐渍(时间取决于块片的大小,8oz干酪仿品=10分钟)。将在其模具中的干酪仿品在有其覆盖层但无重物的情况下放回36°F下。在24小时之后,将干酪仿品从其模巢移出,并且放在沥干垫上36°F下。在再24小时之后,将干酪仿品放在干净托盘上,并且将整个托盘用塑料包裹膜包裹,并且维持在36°F下直到品尝。

[0404] 实例22:制备蓝干酪仿品

[0405] 标准经巴氏灭菌的坚果奶具有28%奶油,由55%杏仁和45%澳洲坚果制成。将奶加热到 $83 \pm 3^\circ\text{F}$ ,然后添加MA11或罗克福尔青霉(使培养物在奶的顶部水合5分钟,随后将其搅拌到奶中)。可以在这个步骤添加蛋白酶和/或脂肪酶(溶解于水中)。将含有培养物的奶保持在 $83 \pm 3^\circ\text{F}$ 下1小时。在一小时之后,调配物的pH通常下降到 $5.6 \pm 0.2$ 。在所述一小时之后,将循环器调节到110°F,并且添加转谷氨酰胺酶(在临使用之前溶解于水中)。将调配物

完全并且均匀搅拌到奶中,并且在凝结的其余时间保持不搅拌。在调配物达到100°F(其花费50±10分钟来达到温度)后,关闭循环器,并且调配物保持在水浴中10分钟。可以在这个步骤添加蛋白酶和/或脂肪酶(溶解于水中)。在那时,将瓮/烧杯从水中取出,并且用塑料包裹膜覆盖,并且使其在室温下凝结12小时。在12小时之后,最终凝乳的pH是4.4±0.1(如果是正常配方的话)。将凝乳切成1英寸正方形,并且使其静置5分钟。然后将乳清从凝乳通过黄油平纹细布沥出,通常产生50%凝乳和50%乳清。也可以在这个步骤添加蛋白酶和/或脂肪酶(溶解于水中)到凝乳中。将凝乳搅拌5分钟,勺起到模巢中到所要重量,并且然后使其在室温下静置1小时。在一小时之后,将衬圈放在凝乳上,并且在每个模巢上添加600g重物。使凝乳在室温下在模巢中再沥干1小时。然后将模巢中的凝乳在36°F下按压36小时。在按压时间之后,使干酪仿品在其模巢中盐渍(时间取决于块片的大小,8oz干酪仿品=10分钟)。将在其模巢中的干酪仿品在有其顶盖物但无重物的情况下放回36°F下。使干酪仿品模巢在36°F下老化2天,然后每天对干酪仿品的外部进行擦盐持续3天时间段。然后使干酪仿品在41°F下成熟20天。然后将干酪仿品用小针刺穿若干次到按压的干酪仿品中,以允许霉菌在这些孔中接种,并且遍布干酪仿品的内表面。在30天的成熟时重复这个过程。在那时,使干酪仿品在40°F下再老化5个月。将干燥室保持在46到53°F下,并且将催熟室保持在35到50°F下。

#### [0406] 实例23:制备蓝干酪仿品

[0407] 对由60%杏仁奶和40%澳洲坚果奶组成、具有14.2%的脂肪含量的坚果奶进行巴氏灭菌。奶在巴氏灭菌之后的pH是6.4。将奶加热到81°F,并且同时添加个别微生物培养物(LF2(LLC)、MD88传代培养物(LLBD)、LF5(LLL)、罗克福尔青霉和汉逊德巴利酵母)。在于81°F下孵育1小时之后,奶的pH范围在5.9到6.0内。将奶的温度升高到100°F,并且添加转谷氨酰胺酶(ACTIVA TI,来自味之素)到100°F奶中,所述转谷氨酰胺酶以2比1比率水比酶水合并且静置5分钟。温和地搅拌酶,并且在不搅拌下将奶保持在100°F下1小时。断开加热,并且使奶静置覆盖4小时以形成强凝结。在4小时之后,奶的pH是约5.8。有强弹性凝胶形成,随后将凝乳切成1/2英寸正方形,并且使其在pH 5.9的乳清中覆封15分钟。

[0408] 将凝乳用大搅拌器搅拌以刚好使凝乳破碎持续约60秒。然后每5分钟升高凝乳的温度2度直到约120°F,每10分钟搅拌以确保不出现凝乳的进一步缠结。在达到目标温度后,凝乳被分离并且是坚硬的,并且pH是约5.6。将凝乳放到紧密编织的亚麻沥干袋中并且在室温下悬挂8小时,然后放在灭菌的不锈钢碗中,并且添加1%犹太教规定允许的盐并且使其均匀分布。在对凝乳进行盐渍之后,将其舀取到塑料沥干垫上的圆柱形模具中,并且使其沥干12小时,每小时翻转一次持续6小时。这时,将模巢在所有侧上都轻轻地进行盐渍,并且放回到模具中,然后放到酵母室中42°F和75%相对湿度(RH)下5天,每天2次转动模巢。然后将模巢移到模制室中51°F和90%RH下,并且用不锈钢针刺穿多次以增加向中心的氧气流动。将干酪仿品维持在这些条件下3周以促进酵母和霉菌生长进行。在3周之后,将酵母和霉菌用5%盐溶液从模巢外部洗掉,并且包裹于穿孔箔中。将干酪仿品保持在冷老化室中38°F下最少30天以进行冷老化。在老化之后,可以将干酪仿品包裹于新箔片或塑料包裹膜中,以阻止霉菌在外部生长。

[0409] 蓝干酪仿品屑以类似方式形成,不同之处在于,将凝乳涂开在垫子上,并且放到51°F和90%RH老化环境中,以使酵母和霉菌生长并且稳定化天然微生物群。然后将凝乳在

模制室中老化3周,并且封装于气密容器中,以切断氧气流动并且终止上蓝过程。

[0410] 实例24:制备洗浸干酪仿品

[0411] 将奶(经巴氏灭菌的奶具有28%奶油,由55%杏仁和45%澳洲坚果制成)加热到 $83 \pm 3^\circ\text{F}$ ,然后添加MA11、酵母、微球菌属、棒状杆菌(Coryneform bacteria)和白地霉(使培养物在奶的顶部水合5分钟,随后将其搅拌到奶中)。可以在这个步骤添加蛋白酶或脂肪酶(溶解于水中)。将含有培养物的奶保持在 $83 \pm 3^\circ\text{F}$ 下1小时。在一小时之后,调配物的pH通常下降到 $5.6 \pm 0.2$ 。在所述一小时之后,将循环器调节到 $110^\circ\text{F}$ ,并且添加转谷氨酰胺酶(在临使用之前溶解于水中)。将调配物搅拌直到完全并且均匀混合到奶中,并且在凝结的其余时间保持不搅拌。在调配物达到 $100^\circ\text{F}$ 后,关闭循环器,并且将调配物留在水浴中10分钟。也可以在这个步骤添加蛋白酶或脂肪酶(溶解于水中)。在那时,将瓮/烧杯从水中取出,并且在室温下用塑料包裹膜覆盖12小时以凝结。在12小时之后,最终凝乳的pH是 $4.4 \pm 0.1$ (如果是正常配方的话)。将凝乳切成1英寸正方形,并且使其静置5分钟。然后将乳清从凝乳通过黄油平纹细布沥出,通常产生50%凝乳和50%乳清。也可以在这个步骤添加蛋白酶和脂肪酶(溶解于水中)到凝乳中。将凝乳搅拌5分钟,勺起到模巢中到所要重量,并且然后使其在室温下静置1小时。在一小时之后,将覆盖层放在凝乳上,并且在每个模巢上添加600g重物。使凝乳在室温下在模巢中再沥干1小时。然后将在模巢中的凝乳在 $36^\circ\text{F}$ 下按压36小时。在按压时间之后,使干酪仿品在其模巢中盐渍(时间取决于块片的大小,8oz干酪仿品=10分钟)。将在其模巢中的干酪仿品在有其覆盖层但无重物的情况下放回 $36^\circ\text{F}$ 下。使干酪仿品模巢在 $36^\circ\text{F}$ 下老化2天。将干酪仿品模巢盐渍于饱和盐水中,并且使其在 $36^\circ\text{F}$ 下沥干48小时。在48小时时间段之后,将干酪仿品用亚麻短杆菌溶液和5%盐溶液擦刷两周,每两天转动模巢。在那个时间之后,减少对模巢的洗涤。在亚麻短杆菌可见于外层上后,将洗涤减少到每周2次。在那个时间段之后,将外层用酵母和水的溶液擦刷,以在干酪仿品老化时帮助外层借助良好新鲜空气移动而变干。

[0412] 用于洗浸干酪仿品的干燥室温是 $57$ 到 $64^\circ\text{F}$ ,并且催熟室温是 $52$ 到 $57^\circ\text{F}$ 。将干酪仿品包裹于可透气纸中,并且在 $35^\circ\text{F}$ 或更高下再老化60天。

[0413] 实例25-在酵母提取物培养基中使用柠檬酸盐以产生“黄油味”风味

[0414] 用MD88(LLBD)设定葡萄糖浓度对比柠檬酸盐浓度的2维矩阵以评价柠檬酸盐和葡萄糖与“黄油味”化合物(例如乙偶姻和2,3-丁二酮)产生之间的关系。所用的酵母提取物培养基(YEM)由0.5%酵母提取物(风味之家公司,品目号X11020)和20mM磷酸钾缓冲液(pH 7.0)组成。将这种YEM用0.005% (w/v) MD88冻干物(丹尼斯克(Danisco) CH00ZIT,品目号MD088 LY0 50 DCU)接种。添加葡萄糖和柠檬酸盐储备液到9体积的具有MD88的YEM中,用这样一种方法产生[葡萄糖]对比[柠檬酸盐]的 $3 \times 3$ 矩阵。以200mM、50mM或10mM添加葡萄糖到这种培养基中,并且以50mM、10mM或2mM添加呈柠檬酸三钠水合物形式的柠檬酸盐。将所有培养基样品在 $30^\circ\text{C}$ 下在200rpm振荡下孵育17小时。

[0415] 将经培养样品由经训练的风味科学家嗅闻,并且通过GCMS进行分析。表8提供每种样品在17小时好氧孵育之后的记录的气味描述和GCMS数据。“黄油味”气味可以在低到2mM柠檬酸盐的所有样品中都闻得到,并且这种气味随葡萄糖浓度更高而更强。具有10mM葡萄糖的所有样品都具有非常温和的气味和更高pH,表明在这个葡萄糖浓度下的不良MD88生长。

[0416] 表8

[0417] 每种样品的气味和pH

[葡萄糖](mM)/[柠檬酸盐](mM)	pH	气味
200/2	4	酵母味、淡黄油
200/10	4	黄油味、刺激性/浓郁酸味
200/50	4.5	黄油味、强酸味
50/2	4	培养基、淡黄油
50/10	4	黄油味、酸味
50/50	7	黄油味、酸味、淡杏仁
10/2	5.5	面包味、淡黄油

[0418]

[0419]

10/10	6.5	面包味、酵母味
10/50	7.5	淡培养基

[0420] 使用含有聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 的固相微萃取 (SPME) 纤维从样品顶部空间吸附挥发性化合物, 将GCMS用以检测每种样品中所存在的不同挥发性化合物。密封玻璃GCMS小瓶中的五mL体积的每种样品, 并且在以500rpm搅动样品的同时在50°C下从顶部空间萃取挥发性化合物12分钟。“黄油味”气味化合物(2,3-丁二酮、乙偶姻和2,3-己二酮)的GCMS数据支持气味描述。所有三种化合物都随超过约25mM的柠檬酸盐浓度和葡萄糖浓度增加而增加。在10mM葡萄糖下, MD88长得不好, 并且因此可能不产生任何气味化合物。参看图12-14。

[0421] 实例26A: 在酵母提取物培养基中使用木糖葡萄球菌以产生“干酪味”风味

[0422] 将三种不同微生物于具有5%精制椰子油的YEM中在4个不同葡萄糖浓度下培养, 以确定低碳环境中的微生物生长是否可以促进脂质分解为游离脂肪酸。YEM由0.5%酵母提取物(风味之家公司, 品目号X11020)和20mM磷酸钾缓冲液(pH7.0)组成, 将其无菌过滤并且然后与温的椰子油组合。对整个混合物进行超声处理以产生均质乳液。将乳化的培养基混合物分布到玻璃小瓶中, 并且将各组外加不同葡萄糖浓度: 20mM、5mM、1mM或0mM。然后将每个葡萄糖梯度组用0.005% (w/v) MD88 (CHOOZIT, 品目号MD088 LYO 50 DCU)、0.005% (w/v) TA61 (CHOOZIT, 品目号TA 61 LYO 50 DCU) 或 $5 \times 10^7$ 个细胞/毫升木糖葡萄球菌(Sx) (内部分离) 接种。将用MD88或SX接种的样品在30°C下在200rpm振荡下孵育19小时。将用TA61接种的样品在37°C下在150rpm振荡下孵育19小时。然后将培养的样品由两名个体嗅闻, 进行pH测量, 并且通过GCMS分析(对顶部空间进行SPME纤维取样)。表9含有每种样品在19小时好氧孵育之后的记录的气味描述。用SX接种的样品最令人感兴趣。在较高葡萄糖浓度下, 样品闻起来是发酵的并且有果味, 而在较低葡萄糖浓度下, 样品闻起来有蜡味和塑料味, 表明存在游离脂肪酸。这些观察结果得到GCMS数据的支持, 所述GCMS数据检测具有0mM和1mM葡萄糖的样品中的C6:0、C8:0、C9:0和C11:0游离脂肪酸。参看图15。在20mM葡萄糖下, SX产生2-甲基-丁酸和3-甲基-丁酸, 其在文献中描述为具有发酵、果味和干酪味气味。参看图16。

[0423] 表9

[0424] 每种样品的气味和每种样品的最终pH

[0425]

培养基条件(SX)	pH	气味结果1	气味结果2
20mM葡萄糖	5.5	果味、发酵、肉汤味	汗味(丁酸样)、脚味-杏
5mM葡萄糖	7	肉汤味、微蜡味	面包味、马铃薯

1mM葡萄糖	5.5	干酪味、塑料味/蜡味	蜡味 (C10:0)
0mM葡萄糖	4.5	塑料味/蜡味	较淡蜡味、微果味被注意到

[0426] 实例26B:在酵母提取物培养基中使用短杆菌属以产生“干酪味”风味

[0427] 将短杆菌属于具有数种不同酮酸的YEM中培养,以确定短杆菌属是否将由酮酸合成游离脂肪酸。YEM由0.5%酵母提取物(风味之家公司,品目号X11020)、20mM磷酸钾缓冲液(pH 7.0)和50mM葡萄糖组成。将分别的体积外加10mM丙酮酸(西格玛(Sigma),目录号10736)、10mM柠檬酸三钠(QC无限有限责任公司(QC Unlimited,LLC))或10mM草酸(西格玛,品目号194131)。将所有样品用0.02% (w/v)短杆菌属/棒状杆菌属(CH00ZIT,品目号LR LY0 10D)接种,并且在30°C下在200rpm振荡下孵育22小时。然后对培养样品进行嗅闻、pH测量,并且然后通过GCMS分析(对顶部空间进行SPME纤维取样)。表10提供经训练的风味科学家对每种样品在22小时好氧孵育之后的记录的气味描述。添加有草酸的样品被描述为“膻味”和“蜡味”,其是短链游离脂肪酸的特征气味。这个观察结果得到GCMS数据的进一步支持,显示丁酸、丙酸、3-甲基丁酸和2-甲基丙酸(“干酪”酸)仅在具有草酸的样品中。

[0428] 表10

[0429] 短杆菌属样品的气味描述和测量的pH值

[0430]

样品名称	气味	pH
丙酮酸	肉汤味、腐败	6
柠檬酸盐	泥土味、霉味、蘑菇	7
草酸	肉汤味、蘑菇、膻味、蜡味(老化干酪样)	4.5
无	发酵、肉汤味、麦芽味	7

[0431] 实例27:在培养的豆奶中使用丙酮酸和TA61来增强“黄油味”风味

[0432] 将MD88和TA61于具有变化浓度的柠檬酸三钠和/或丙酮酸的豆奶中培养,以确定对“黄油味”气味化合物产生的影响。豆奶(西方豆(WestSoy),未加糖,有机)补充有20%椰子奶(斯普劳茨(Sprouts),优质)、50mM葡萄糖和50mM氯化钠。将两种分别体积的豆奶培养基用0.01% (w/v)MD88(CH00ZIT,品目号MD088 LY0 50 DCU)或0.01% (w/v)TA61(CH00ZIT,品目号TA 61 LY0 50 DCU)接种。将每组分成12个体积,并且外加:20mM、10mM、5mM或2mM的柠檬酸三钠(QC无限有限责任公司);20mM、10mM、5mM或2mM的丙酮酸(西格玛,目录号10736);和10mM与10mM、5mM与5mM、1mM与1mM的柠檬酸盐和丙酮酸盐;一种样品不外加两者。将用MD88接种的样品在30°C下孵育24小时,并且将用TA61接种的样品在37°C下孵育24小时。在孵育之后,将样品由经训练的风味科学家嗅闻、品尝,进行pH测量,并且然后通过GCMS分析(对顶部空间进行SPME纤维取样)。表11和12含有每种样品在24小时孵育之后的记录的气味和风味描述。与用MD88接种的样品相比,用TA61接种的豆奶样品具有更强黄油味气味。最多“黄油味”TA61样品是仅外加低浓度的丙酮酸盐或柠檬酸盐的样品;较高丙酮酸盐浓度产生较多“奶油味”气味。添加较高柠檬酸盐浓度还产生品尝起来更多酸味和涩的样品。每个样品组的GCMS结果显示,仅添加丙酮酸盐到与TA61一起培养的豆奶中增加乙偶姻产生。添加柠檬酸盐到豆奶中并不显著促进豆奶中的黄油味气味化合物借助MD88或TA61的产生。类似地,添加丙酮酸盐到豆奶中对乙偶姻或2,3-丁二酮借助MD88的产生不具有作用。

[0433] 表11

[0434] 每种MD88培养的样品的测量pH和气味和风味描述.

[0435]	具有MD88的样品	气味	pH	味道
	无添加	黄油、椰子、奶油、淡绿色	4.5	酸味、奶油味、豆奶
	2mM柠檬酸盐	黄油、酸味、奶油	4.5	酸味、奶油味、豆奶
	5mM柠檬酸盐	奶油味、黄油、淡谷物	4.5	酸味、奶油味、豆奶
	10mM柠檬酸盐	奶油味、小麦、淡黄油	4.5	酸味、涩、豆奶味道
	20mM柠檬酸盐	奶油味、淡黄油、小麦	4.5	酸味、涩、橘、豆奶
	2mM丙酮酸盐	黄油味、酸味、淡绿色	4.5	酸味、奶油味、豆奶
	5mM丙酮酸盐	麦芽味、小麦	4.5	酸味、豆奶
	10mM丙酮酸盐	酸味、淡黄油、小麦	4.5	酸味、豆奶
	20mM丙酮酸盐	酸味、奶油味、小麦	4.5	酸味、豆奶
	1mM丙酮酸盐、1mM柠檬酸盐	黄油、奶油味、小麦	4.5	淡酸味、豆奶
	5mM丙酮酸盐、5mM柠檬酸盐	黄油、奶油	4.5	酸味、豆奶
	10mM丙酮酸盐、10mM柠檬酸盐	酸味、微橘、淡黄油、小麦	4.5	酸味、豆奶

[0436] 表12

[0437] 每种TA61培养的样品的测量pH和气味和风味描述.

	具有 TA61 的样品	气味	pH	味道
[0438]	0 mM 柠檬酸盐或丙酮酸盐	黄油、大豆	4	酸味、奶油、豆奶
	2 mM 柠檬酸盐	黄油、大豆	4	酸味、豆奶

	5 mM 柠檬酸盐	黄油、奶油、小麦	4	酸味、豆奶
	10 mM 柠檬酸盐	奶油味、淡黄油、小麦	4	酸味、橘、豆奶
	20 mM 柠檬酸盐	奶油、小麦	4	酸味、橘、豆奶
	2 mM 丙酮酸盐	黄油、奶油味	4	酸味、豆奶
[0439]	5 mM 丙酮酸盐	黄油味、奶油、甜味、小麦	4	酸味、豆奶
	10 mM 丙酮酸盐	奶油味、淡黄油、小麦	4	酸味、豆奶
	20 mM 丙酮酸盐	奶油、甜味、小麦	4	酸味、豆奶
	1 mM 丙酮酸盐、1 mM 柠檬酸盐	黄油味、奶油味	4	酸味、豆奶
	5 mM 丙酮酸盐、5 mM 柠檬酸盐	奶油、黄油、甜味	4	很大酸味、豆奶
	10 mM 丙酮酸盐、10 mM 柠檬酸盐	甜味、奶油、小麦	4	很大酸味、橘、豆奶

[0440] 实例28A:在豆奶中使用木糖葡萄球菌以产生“干酪味”酸

[0441] 将SX于具有变化支链氨基酸的豆奶中培养,以确定补充的氨基酸对3-甲基-丁酸、2-甲基丁酸和2-甲基丙酸借助SX的产生的影响。豆奶(西方豆,未加糖,有机)补充有20%椰子奶(斯普劳茨,优质)、50mM葡萄糖和50mM氯化钠。将亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)和缬氨酸(Va1)以10mM补充到分别的样品中。使另一种样品外加6mM的所有3种氨基酸。最终样品包括0.5%酵母提取物(风味之家公司,品目号090656)作为支链氨基酸的来源。然后将所有样品用 $1 \times 10^8$ 个细胞/毫升的SX接种,并且在37°C下孵育24小时。通过GCMS分析培养的样品(对顶部空间进行SPME纤维取样)。图20-22描绘每种样品在24小时孵育之后检测到的3-甲基-丁酸、2-甲基丁酸和2-甲基丙酸的GCMS数据。添加亮氨酸增加3-甲基丁酸产生,而添加异亮氨酸增加2-甲基丁酸产生。类似地,添加缬氨酸增加2-甲基丙酸产生。

[0442] 实例28B:在豆奶中使用木糖葡萄球菌以产生3-甲基丁酸

[0443] 将SX于具有变化浓度的亮氨酸的豆奶中培养,以确定补充的亮氨酸对3-甲基-丁酸借助SX的产生的影响。豆奶(西方豆,未加糖,有机)补充有20%椰子奶(斯普劳茨,优质)、

50mM葡萄糖和50mM氯化钠。将亮氨酸以30mM、20mM、10mM、5mM、2mM和0mM补充到分别的样品中。另外,具有10mM亮氨酸的样品外加额外10mM的 $\alpha$ -酮戊二酸(aKG)。然后将所有样品用 $1 \times 10^8$ 个细胞/毫升的SX接种,并且在30°C下孵育24小时。将培养的样品由经训练的风味科学家嗅闻、品尝,进行pH测量,并且然后通过GCMS分析(对顶部空间进行SPME纤维取样)。表13含有每种样品在24小时孵育之后的记录的气味和风味描述。所有外加亮氨酸的样品都具有“干杏”气味,并且对于较低亮氨酸浓度具有甜味味道,并且对于较大亮氨酸浓度具有香薄荷味道。GCMS支持气味描述并且显示,所有具有额外亮氨酸的样品都具有显著更高3-甲基丁酸。如果大于比较样品的信号的3倍,那么将GCMS信号变化视为显著。在这种情况下,检测到具有2mM Leu的样品是不具有Leu(0mM)的样品的3-甲基丁酸的信号的28倍。

[0444] 表13

[0445] 每种SX培养的样品的测量pH、气味描述和风味描述

[亮氨酸] (mM)	气味	pH	味道
0	老干杏、酸味、微霉味	5.5	豆奶、微涩
2	干杏、焦糖	5.5	微甜味、酸奶样、小麦
5	干杏、焦糖	5.5	微甜味、香薄荷特色、小麦
10	干杏、麦芽味	5.5	香薄荷、干杏
20	干杏、麦芽味	5.5	香薄荷、淡令人作呕-甜味、杏
30	干杏、麦芽味、微辛烷	6	香薄荷、小麦、咸味、杏、霉味
10,加10mM aKG	干杏、麦芽味、微霉味	5.5	香薄荷、干杏

[0447] 实例29:使用短杆菌属和甲硫氨酸以产生二甲基三硫

[0448] 将短杆菌属在具有变化浓度的甲硫氨酸的豆奶和YEM中培养,以确定补充的甲硫氨酸对“干酪味”气味借助短杆菌属的产生的影响。豆奶(桑奥普塔(SunOpta),SoyBase)补充有50mM葡萄糖,并且YEM由0.5%酵母提取物(风味之家公司,品目号X11020)、20mM磷酸钾缓冲液(pH 7.0)和50mM葡萄糖组成。将两种培养基类型用0.02% (w/v) 短杆菌属/棒状杆菌属(CH00ZIT,品目号LR LY0 10D)接种,并且在30°C下在200rpm振荡下孵育22小时。然后对培养的样品进行嗅闻、pH测量,并且然后通过GCMS分析(对顶部空间进行SPME纤维取样)。表15含有每种样品在22小时孵育之后的记录的气味和风味描述。所有添加有甲硫氨酸的样品都具有“发酵”和“鱼味”气味。GCMS数据表明,这种强气味来自二甲基三硫。可以将甲硫氨酸脱胺以产生甲硫基丙醛,其是所要老化干酪/切达干酪气味化合物。另外,短杆菌属在干酪外部正常培养,并且将在老化过程期间产生甲硫基丙醛。

[0449] 表15

[0450] 在于具有变化甲硫氨酸浓度的SoyBase和酵母提取物培养基中进行22小时短杆菌属孵育之后的气味描述和样品pH

样品名称	气味	pH
SoyBase-10 mM Met	发酵、硫醇、马铃薯	7
SoyBase-5 mM Met	发酵、鱼味、马铃薯	7
SoyBase-1 mM Met	鱼味、发酵、强油炸马铃薯	7
SoyBase	豆奶、蘑菇、泥土味	7
YEM-10 mM Met	发酵、鱼味、马铃薯	7.5

[0451]

[0452]	YEM-5 mM Met	发酵、鱼味、马铃薯	7
	YEM-1 mM Met	较淡发酵、鱼味、马铃薯	7
	YEM	发酵、肉汤味、麦芽味	7

[0453] 实例30:在豌豆干酪仿品中产生微生物干酪风味

[0454] 将经分离的豌豆豌豆球蛋白(PV)蛋白质(经提纯到超过80%)的50mg/mL溶液加热到90°C后持续30分钟以使蛋白质变性,用作借助SX、TA61和MD88培养物的干酪风味产生的基础。变性的PV补充有20%椰子奶(Aray-D)、20mM葡萄糖和0.5% (w/v) 酵母提取物(思宾格(BioSpringer),品目号2020)。遵循四种不同培养程序:(i) SX培养物、接着MD88培养物(SX/MD88), (ii) SX和MD88共同培养物(SX+MD88), (iii) SX培养物、接着TA61培养物(SX/TA61), 和(iv) SX和TA61共同培养物(SX+TA61)。将所有样品用 $1 \times 10^8$ 个细胞/毫升SX接种,并且将规定样品用0.05% (v/w) MD88(CH00ZIT,品目号MD088 LYO 50 DCU)或0.05% (w/v) TA61(CH00ZIT,品目号TA 61 LYO 50 DCU)接种。对于依序培养样品,将SX在30°C下在200rpm振荡下培养24小时。然后将规定样品用MD88或TA61和额外底物(40mM葡萄糖、10mM柠檬酸三钠、2mM甲硫氨酸和3mM  $MgCl_2$ )接种。

[0455] 将所有样品在200rpm振荡下第二次孵育22小时;将MD88接种的样品在30°C下孵育并且TA61接种的样品在37°C下孵育。共同培养的样品含有SX、额外底物(40mM葡萄糖、10mM柠檬酸盐三钠、2mM甲硫氨酸和3mM  $MgCl_2$ )和MD88或TA61。将具有MD88的样品在30°C下孵育,而具有TA61的样品在37°C下孵育,但将所有样品在200rpm下振荡以进行24小时孵育。在培养所有样品后,将样品由经训练的风味科学家嗅闻和品尝,测量pH,并且然后通过GCMS分析样品(对顶部空间进行SPME纤维取样)。将样品通过添加20mM  $CaCl_2$ 使仿品凝固而产生为干酪仿品。表16含有与PV一起培养的所有样品的记录的气味和风味描述。大多数样品嗅闻起来“黄油味”和/或“奶油味”,并且这些描述得到GCMS数据的支持,显示乙偶姻和2,3-丁二酮的存在。参看图25和26。图27展示与椰子奶一起培养的PV中通过GCMS检测到的游离脂肪酸。

[0456] 表16

[0457] 与椰子奶一起培养的豌豆豌豆球蛋白的气味、风味和pH值描述。

样品名称	最终 pH	气味	风味
[0458] SX+MD88 A	5	黄油味、微烧味、淡奶油、椰子	烧味、黄油味、微涩
SX+MD88 B	4.5	黄油味、奶油味、微烧味	酸味、黄油味、微粒状
SX+TA61 A	5	黄油味、奶油味、坚果味	强烧味、豌豆、酸味

[0459] SX+TA61 B	4.5	黄油味、奶油味、豌豆蛋白	酸味、强香薄荷、烧味
SX/MD88 A	5	甜味、花香、黄油味、淡烧味	强香薄荷、酸味、烧味
SX/MD88 B	5	果味、酒	香薄荷、烧味
SX/TA61 A	4.75	麦芽味、焦糖、奶油	香薄荷、烧味
SX/TA61 B	4.75	果味、麦芽味	果味、香薄荷、淡烧味

[0460] 实例31-直接控制风味化合物借助细菌的产生

[0461] 为了控制通过细菌产生的不同气味化合物的风味产生,在低气味培养基(LOM)中测试MA11、MD88、TA61。使两种对照运行,一种仅用LOM+MA11并且一种仅用LOM。制作储备体积的LOM,将其无菌过滤,并且在整个研究中储存在4°C下。添加 $1 \times 10^8$ 个细胞/毫升的细菌浓度到储备液中。将这种具有细菌的LOM等分到所需数目的10mL GC小瓶中。向每个个别小瓶中添加预定量的添加剂。将所有小瓶用锡箔紧密地覆盖,储存在30°C下约24小时,并且然

后在4℃下约24小时。在培养之后,使小瓶升温到室温,用pH试纸检查最终反应pH。用6M HCl将每个小瓶的pH调节到3-3.5。将每个小瓶由经训练的风味科学家嗅闻,并且将气味记录下来。将所有小瓶加盖,并且运行GCMS。使用ChromoTOF库分析原始数据,然后针对每种添加剂类型进行排列。表17展示用于不同细菌中的每一者的LOM,TA61不能在其它培养基中生长。表18展示化合物产生或消除所借助的那些细菌和控制其产生的添加剂。

[0462] 表17

[0463] 用以确定添加剂如何控制借助不同细菌的风味生成的低气味培养基

	TA61	MD88、MA11
酵母提取物	0.50%	0
蛋白胨(来自豌豆)	0.10%	0.10%
K-phos缓冲液(pH7.15)	50	100
MgCl <sub>2</sub>	2	2
FeCl <sub>2</sub>	2	0
葡萄糖	50	25
NaCl		20

[0465] 表18

[0466] 通过不同细菌与添加剂控制的气味化合物产生

气味	化合物	为了增加化合物…	为了减少化合物…
[0467] 草药味、甜绿色	1-己醇	芒果+MD88	
	2-壬酮	Ala + MA11、(CoA、FAD、硫辛酸、	(叶酸、柠檬酸、丙酮酸盐) + MA11

[0468]

		硫胺素)+ MA11、CuSO <sub>4</sub> + MA11	
像丙酮的、果味、奶油硬糖	2-丁酮	Ile + TA61、硫胺素+ TA61、抗坏血酸+ TA61、Mg + TA61、核黄素+ MA11、抗坏血酸+ MA11、FeCl <sub>2</sub> + MA11、抗坏血酸+ MD88、C10:0-C16:1 + MD88、油+ MD88	Ca + TA61、C3:0 + MA11、C4:0 + MA11、C6:0 + MA11、C8:0 + MA11、氨基酸+ MD88、柠檬酸+ MD88、C3:0-C8:0 + MD88
甜味、果味、多脂	2-乙基-1-己醇	NAD、FAD、B12、叶酸、烟酸、核黄素、硫胺素、 <b>辅酶 A</b> 、硫辛酸、 $\alpha$ -酮戊二酸盐与 TA61	TA61 +氨基酸
干酪、果味、椰子	2-庚酮	Pro + TA61、Ser + TA61、硫胺素+ TA61、Mg + TA61、NAD + MA11、(CoCl <sub>2</sub> 、CuSO <sub>4</sub> ) + MA11、椰子油+ MD88、缬氨酸+ MD88	Asp + TA61、Glu + TA61、Met + TA61、Co + TA61、Ala + MA11、柠檬酸+ MA11、CaCl <sub>2</sub> + MA11、MNSO <sub>4</sub> + MD88、烟酸+ MD88
绿色、草药味、干酪味、新鲜	2-壬酮	Pro + TA61、Ser + TA61、柠檬酸+ TA61、苹果酸+ TA61、硫辛酸+ TA61、缬氨酸+ MD88	
果味、木味、发酵	2-戊酮	氨基酸+ MD88、金属+ MD88	大多数有机酸+ MD88
黄油味	2,3-丁二酮	Ala + TA61、Phe + TA61、Pro + TA61、吡哆醇+ TA61、 <b>柠檬酸+ TA61、丙酮酸盐+ TA61、黄嘌呤+ TA61</b> 、苹果酸盐+ TA61、肌苷+ TA61、Zn <sup>2+</sup> + TA61、丙酮酸盐+ MA11、CoCl <sub>2</sub> + MA11、柠檬酸+ MD88、丙酮酸盐+ MD88、核黄素+ MD88、C16:1 + MD88	Ile + TA61、Lue + (Ala、Asn、Glu) + MA11、烟酸+ MA11、C3:0 + MA11、C4:0、C6:0、C10:0、C12:0、C14:0、大多数油和脂肪酸
刺激性、果味、霉味	乙醛	Thr + TA61、核黄素、+ TA61、硫胺素+ TA61、抗坏血酸+ TA61、硫辛酸+ TA61、Mg + TA61、核黄素+ MA11、(CuSO <sub>4</sub> 、FeCl <sub>2</sub> ) + MA11、Thr + MD88、抗坏血酸+ MD88	Ala + TA61、Asp + TA61、Glu + TA61、Mn + TA61、Ala + MA11、(CaCl <sub>2</sub> 、CoCl <sub>2</sub> ) + MA11
酸味	乙酸	Ile + TA61、生物素+ TA61、对氨基苯甲酸+ TA61、柠檬酸+ TA61、苹果酸+ TA61、肌苷+ TA61、丙酮酸盐+ TA61、MA11、(核黄素+ CoA) + MA11、CuSo <sub>4</sub> + MA11、柠檬酸+ MD88、核黄素+ MD88	Asp + TA61、Glu + TA61、MA11 + Ala、NAD + MA11、FeCl <sub>2</sub> + MA11
黄油味	乙偶姻	Ile + TA61、生物素+ TA61、对氨基苯甲酸+ TA61、硫胺素+ TA61、 <b>柠檬酸+ TA61、肌苷+ TA61、丙酮酸盐+ TA61、苹果酸盐+ TA61、黄嘌呤+ TA61</b> 、Mg <sup>2+</sup> + TA61、Zn <sup>2+</sup> + TA61、Co + TA61、柠檬酸+ MD88、丙酮酸盐+ MA11、CoCl <sub>2</sub> + MA11 丙酮酸盐+ MD88、核黄素+ MD88、C16:1 +	Asp + TA61、Glu + TA61、(Ala、Asn、Glu) + MA11、烟酸+ MA11、C3:0、C4:0、C6:0、C10:0、C12:0、C14:0

		MD88、柠檬酸 + MD88、丙酮酸盐+ MD88、核黄素+ MD88、C16:1 + MD88	
	丙酮	Pro + TA61、抗坏血酸+ TA61、柠檬 酸+ TA61、(Ala、Asn、Met、Pro) + MA11、(NAD、核黄素、CoA、FAD、 硫辛酸、烟酸、硫胺素、B12、叶酸、 生物素) + MA11、CaCl <sub>2</sub> + MA11、草 酸+ MD88、抗坏血酸+ MD88、Met + MD88	核黄素+ MD88、柠檬酸+ MD88
苦杏仁、樱 桃	苯甲醛	核黄素+ TA61、抗坏血酸+ TA61、 Mn <sup>2+</sup> + TA61、MnSO <sub>4</sub> + MA11、 (C16:0、C18:0) + MA11、烟酸+ MD88	Ala + TA61、Pro + TA61、对氨 基苯甲酸 + TA61、肌苷+ TA61、苹果酸盐+ TA61、黄嘌 呤+ TA61、Ca <sup>2+</sup> + TA61、Mg <sup>2+</sup> + TA61、(Ala、Asn、Asp、Glu、 Ile、Leu、Lys、Met、Pro、Tyr) + MA11、(FAD、NAD、硫胺素、 核黄素、抗坏血酸) + MA11、 (CaCl <sub>2</sub> 、CuSO <sub>4</sub> 、FeCl <sub>2</sub> ) + MA11、(C10:0、C12:0) + MA11、FeCl <sub>2</sub> + MD88、CuSO <sub>4</sub> + MD88、抗坏血酸+ MD88
可可、绿 色、麦芽味	丁醛		TA61(一般来说)
椰子、咖 啡、坚果味	丁醛, 2- 甲基-	Pro + TA61、Ca <sup>2+</sup> + TA61、抗坏血酸+ MD88	氨基酸+ MD88
巧克力、桃 味、多脂	丁醛, 3- 甲基-	核黄素+ TA61、抗坏血酸+ MD88、对 氨基苯甲酸+ MD88	TA61(一般来说)、氨基酸+ MD88、烟酸+ MD88、核黄素+ MD88、硫胺素+ MD88
酸性、脏、 干酪细微 差别	丁酸和 衍生物	Ile + TA61、Ala + TA61、Pro + TA61、 肌苷+ TA61、苹果酸+ TA61、Fe <sup>2+</sup> + TA61、Mg <sup>2+</sup> + TA61	硫胺素+ TA61
	乙醇	Ile、生物素、对氨基苯甲酸、肌苷、 苹果酸盐、Mg <sup>2+</sup> 与 TA61、MA11、 (NAD、核黄素、CoA、FAD、硫辛酸、 烟酸、硫胺素、B12、叶酸、生物素)+ MA11、草酸+ MD88	
	乙酸乙 酯	Pro + MA11	
	甲基丁 醛	(CoA、硫辛酸、核黄素、烟酸、B12、 叶酸、生物素) + MA11	(Ala、Asn、Met、Pro) + MA11、 MA11(一般来说)、Ca <sup>2+</sup> +MA11、C3:0、C4:0、C6:0
辛辣特 色、花香	2-甲基- 丙醛	Pro + TA61、核黄素+ TA61、抗坏血 酸+ TA61、Mn <sup>2+</sup> + TA61、抗坏血酸+ MD88、MnSO <sub>4</sub> + MD88	Ala + TA61、Asn + TA61、Pro + TA61、对氨基苯甲酸+ TA61、 柠檬酸+ TA61、苹果酸盐+ TA61、Ca <sup>2+</sup> + TA61

[0470] 实例32-用于非乳制干酪仿品中的美国干酪型风味的培养条件

[0471] 为了制备具有美国干酪型风味的非乳制仿品,可以将表19中的成分在30℃下在具有顶部空间的密闭容器中培养24小时。可以将来自这个培养物的所得材料与表20中的成分一起在37℃下在具有顶部空间的密闭容器中培养24小时。

[0472] 表19

	组分	浓度
[0473]	豆奶或豌豆球蛋白	80 %
	椰子	20 %
	亮氨酸	2 mM
	酵母提取物 090656 或 X11020	0.5 %
	葡萄糖	50 mM
	经分离的 SX 培养物	$1 \times 10^8$ 个细胞/毫升

[0474] 表20

	组分	浓度
[0475]	来自‘第1培养物’的材料	100 %
	甲硫氨酸	5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	丙酮酸盐	15 mM
	葡萄糖	50 mM
	TA61	$1 \times 10^8$ 个细胞/毫升

[0476] 实例33A-含有由植物蛋白制成的凝聚物的干酪仿品

[0477] 干酪仿品通过以下方式来制作:首先制备豌豆豌豆球蛋白和豌豆豆球蛋白(豌豆球蛋白:豆球蛋白比率以重量计是3:1,经提纯到>90%)于20mM磷酸钾(pH7.4)+100mM氯化钠中的3% (w/v) 溶液。添加熔融棕榈油(来自杰德华兹国际(Jedwards International))到溶液中到5% (v/v) 的最终浓度,并且通过涡旋进行混合。然后将乳液在搅拌的同时通过添加盐酸酸化到pH 5。将所得浆液离心,并且将液体顶层倾析掉以获得凝聚物。这种材料的质地室温下是奶油状的,当在冷冻冰上时凝固,并且当加热时熔融。

[0478] 实例33B-含有通过使蛋白质交联而进一步加工的凝聚物的干酪仿品

[0479] 干酪仿品通过以下方式来制备:首先使用实例33A中描述的方法由3:1豌豆豌豆球蛋白:豆球蛋白比率的3% (w/v) 豌豆蛋白溶液和可可脂(来自杰德华兹国际)制作凝聚物。将凝聚物通过离心收集,并且通过使用1% (w/v) 最终浓度的转谷氨酰胺酶(味之素)使其组成蛋白质进行酶促交联来进一步加工。使材料在搅拌下在30℃下孵育过夜。所得干酪仿品在室温下是类似于老化干酪(例如切达干酪)的坚硬弹性材料。

[0480] 实例33C-含有通过加热-冷却循环而进一步加工的凝聚物的干酪仿品

[0481] 干酪仿品通过以下方式来制备:首先使用实例33A中描述的方法由3:1豌豆豌豆球蛋白:豆球蛋白比率的3% (w/v) 豌豆蛋白溶液和芥花油制作凝聚物。将凝聚物收集,并且在水浴中在密闭容器中加热到70℃后持续10分钟,然后从水浴移出以使其冷却回到室温。所得材料是类似于硬干酪的坚硬干酪仿品。

[0482] 实例33D-使用凝聚物使用高压加工制作可熔干酪仿品切片

[0483] 干酪切片仿品通过以下方式来制作:将12g豆奶凝乳(来自西方豆的豆奶,依序用干酪培养物TA61和MD88(TA61和MD88两者都来自丹尼斯克)培养,并且沥干以收集凝乳)与12g粗大豆蛋白混合物(蛋白质浓度是14%w/v)、6.7mL芥花油(最终浓度是20%v/v)和2.8g经冷冻干燥的豌豆豆球蛋白(最终豌豆豆球蛋白浓度是8%w/v)混合。将混合物在室温下使用柠檬汁酸化到pH 5,以产生干酪酱样稠度。将样品密封于可热封食品保存塑料袋中,并且

然后使其经历高压加工 (85k psi于阿维尔 (Avure) 2L等静食品压力机中持续5分钟)。将样品从袋中移出,并且然后评价其坚硬度和熔融性质。

[0484] 高压加工导致样品凝固成干酪切片仿品,其当在设定成350°F的烤箱中加热时熔融。在TA.XT2质地分析仪上使用压缩测试发现仿品的坚硬度与卡夫 (Kraft) 美国单干酪相当(将切片切成1cm直径圆片并且堆叠到约5mm的高度。将直径25mm的平圆筒探针用以将样品以0.5毫米/秒压缩速率压缩达到2mm的距离。卡夫美国单干酪的压缩力经测量为19.2g并且仿品的压缩力在7.3g-12.2g之间)。

[0485] 实例33E-通过改变豌豆球蛋白:豌豆球蛋白比率调节凝聚物的粘度

[0486] 凝聚物如实例33A中所描述使用以下各者制备:总蛋白质浓度是10% (w/v) 于20mM磷酸钾缓冲液 (pH 7.4)+100mM氯化钠中的1:1或1:3豌豆球蛋白:豆球蛋白混合物、10%芥花油 (v/v)+10%可可脂 (v/v) (来自杰德华兹国际)。将混合物使用1N盐酸酸化到pH 5,并且在5000×g下离心10分钟以收集凝聚物。来自1:1豌豆球蛋白:豆球蛋白混合物的凝聚物样品在室温下外观更多奶油状和酱样,并且当在冰上冷却时凝结。相比之下,由1:3豌豆球蛋白:豆球蛋白比率制备的样品粘性更大并且在室温下不流动。

[0487] 实例33F-通过改变油的类型调节凝聚物的粘度

[0488] 凝聚物如实例33A中所描述使用总蛋白质浓度是10% (w/v) 于20mM磷酸钾缓冲液 (pH 7.4)+100mM氯化钠中的1:1豌豆球蛋白:豆球蛋白混合物制备。添加脂肪,16%w/v的芥花油或可可脂或10%芥花油 (v/v)+10%可可脂 (v/v) (所有油都来自杰德华兹国际) 到蛋白质溶液中,并且将混合物通过超声处理而乳化,然后使用1N盐酸酸化到pH 5。将凝聚物(干酪仿品)通过在5000×g下离心10分钟而收集。使用可可脂制作的仿品是粘性的,在室温下不容易流动,并且在冰上凝固。相比之下,使用芥花油制作的仿品在室温下粘性不太大并且较少奶油状酱样,并且当在冰上冷却时变得更少流动。用8%芥花油+8%可可脂的混合物制作的仿品在室温下具有中等粘度,但当在冰上冷却时凝结。

[0489] 实例33G-使用乳化盐调节凝聚物的粘度

[0490] 凝聚物样品通过以下方式来制备:首先制作豌豆球蛋白:豆球蛋白(以重量计3:1比率,总蛋白质浓度是10%)以及芥花和棕榈油(各自10%v/v,来源于杰德华兹国际)的混合物的乳液。添加氯化钙(西格玛)到1mM的最终浓度,并且添加焦磷酸三钠十二水合物(TSP12,来自普莱昂(Prayon))到1% (w/v)。然后将混合物使用1N盐酸酸化,并且在5000×g下离心10分钟以收集凝聚物。在对照实验中,使用相同蛋白质和脂肪混合物但在不添加氯化钙和乳化盐的情况下形成凝聚物。尽管具有TSP12的凝聚物 and 对照样品两者在室温下性质上都是干酪酱样的,但与对照相比,由含有TSP12的混合物形成的凝聚物展示低得多的粘度并且更容易流动。

[0491] 实例34A-用脂肪和干酪发酵剂培养物形成冷凝胶

[0492] 干酪仿品通过以下方式来形成:首先在95°C下加热6% (w/v) 浓度于20mM磷酸钾缓冲液 (pH 7.4)+100mM氯化钠中的豌豆球蛋白(如通过凝胶电泳所判断,>90%纯度)的溶液30分钟。将溶液冷却回到室温。以0.02% (w/v) 添加棕榈果油(20%v/v,来自杰德华兹国际)、葡萄糖(1%w/v)和发酵剂培养物(乳酸乳球菌乳酸亚种丁二酮,来自丹尼斯克)到溶液中,并且将其混合。添加氯化钙到20mM的最终浓度,并且将溶液在30°C下孵育24小时以使乳球菌属培养物生长。所得凝胶是质地光滑的软的酸奶样材料。凝胶在加热时不熔融。

[0493] 实例34B-具有交联的蛋白质的冷凝胶

[0494] 干酪仿品通过以下方式来制作:在100℃下使6% (w/v) 浓度于20mM磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) +100mM氯化钠中的豌豆豌豆球蛋白 (如通过凝胶电泳所判断, >90%纯度) 的溶液热变性30分钟。将溶液冷却回到室温, 并且通过添加棕榈油 (到40% v/v, 来自杰德华兹国际) 和氯化钙到20mM而胶凝。将溶液转移到4℃以获得软的稠酸奶样凝胶。增加量的脂肪产生较稠凝胶。添加大豆蛋白 (未经分级分离) 到5% (w/v) 的最终浓度, 并且通过添加0.5% (w/v) 的转谷氨酰胺酶 (来自味之素) 起始交联。将材料在室温下搅拌1小时, 并且随后在混合同时酸化到pH 5 (通过添加1N盐酸), 以产生具有改良的质地 (增加的坚硬度, 类似于村舍式干酪) 和熔融性 (在设定成350°F的烤箱中熔融) 的干酪仿品。

[0495] 实例34C-与凝聚物组合以形成可熔干酪仿品的冷凝胶

[0496] 干酪仿品通过如下文所描述将冷凝胶与凝聚物组合而制备。冷凝胶组分首先通过以下方式来制备:在100℃下使6% (w/v) 浓度于20mM磷酸钾缓冲液 (pH7.4) +100mM氯化钠中的豌豆豌豆球蛋白 (如通过凝胶电泳所判断, >90%纯度) 的溶液热变性30分钟。将溶液冷却回到室温, 并且通过添加棕榈油 (到40% v/v, 来自杰德华兹国际) 和氯化钙到20mM而胶凝。将混合物在室温下孵育约10分钟以使凝胶形成。

[0497] 凝聚物组分由3:1豌豆豌豆球蛋白:豆球蛋白的混合物 (总蛋白质浓度是11% w/v) 和棕榈果油 (5% v/v) 形成。对混合物进行超声处理以形成乳液, 并且用1N盐酸酸化到pH5。然后将混合物在5000×g下离心10分钟以收集凝聚物 (底部的较重相)。

[0498] 将冷凝胶以重量计以2:1比例与凝聚物混合以形成干酪仿品, 其在室温下具有软的但稠凝乳样稠度。在于350°F下的烤箱中加热时, 仿品如干酪般熔融。

[0499] 实例35-形成具有经分级分离的蛋白质的可熔凝胶

[0500] 将7-9%蛋白质浓度的豌豆蛋白 (未经分级分离) 的溶液、50mM NaCl按需要使用酸 (HCl) 或碱 (NaOH) 调节到pH 3-9。通过以下方式使溶液经历加热-冷却循环:在水浴中加热到95℃, 保持在95℃下1小时, 并且然后断开加热, 并且使样品在于水浴中时缓慢冷却回到室温。然后将样品从容器移出, 并且评价凝胶的外观和熔融性。所有样品都展示形成不透明的白色沉淀物样凝乳, 其在加热时不熔融。

[0501] 为了评价豌豆中的包含球状蛋白质的豌豆蛋白部分的性质, 通过阴离子交换色谱将蛋白质分级分离。使粗豌豆蛋白 (0.5% w/v) 于20mM磷酸钾缓冲液 (pH 8) +50mM NaCl中的混合物通过Q-琼脂糖 (通用电气生命科学 (GE Life Sciences)) 收集未结合的蛋白质部分 (白蛋白), 并且在50-500mM NaCl的盐梯度内对结合的蛋白质分级分离。观察到蛋白质在2个主峰中洗脱 (峰1=豌豆球蛋白+伴豌豆球蛋白, 峰2=豆球蛋白), 将各洗脱份汇集并且然后冷冻直到使用。

[0502] 通过将蛋白质渗吸到NaCl浓度是50、100mM和300mM的缓冲溶液 (pH 4-9) (各自以20mM使用的缓冲剂: pH 4、5乙酸钠, pH 6-8磷酸钾, pH 9碳酸钠) 中, 针对可熔凝胶的形成, 测试豌豆蛋白部分 (豌豆球蛋白+伴豌豆球蛋白和豆球蛋白)。使在各个NaCl和pH下的7%蛋白质 (w/v) 溶液经历如上文所述的加热-胶凝。然后将样品从管子移出, 并且评价其外观和熔融特性。观察结果概述于表21中。

[0503] 表21

[0504] 在各种pH和NaCl浓度下获得的包含豌豆蛋白豆球蛋白和豌豆球蛋白的凝胶的类

## 型的概述

## [0505] 豌豆-豌豆球蛋白+伴豌豆球蛋白

	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
[0506] 100 mM NaCl	相分离		一定沉淀	半透明凝胶, 可熔		
300 mM NaCl	沉淀	不透明凝胶, 不熔融				

## [0507] 豌豆-豆球蛋白

	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
[0508] 100 mM NaCl	相分离		一定沉淀	不透明凝胶, 不熔融		
300 mM NaCl	不透明凝胶, 不熔融			半透明凝胶, 可熔		

[0509] 发现豌豆豌豆球蛋白(+伴豌豆球蛋白)和豆球蛋白在pH>7下形成可熔凝胶,但在不同NaCl浓度下这样。这很可能解释了豌豆-豆球蛋白和豌豆球蛋白(+伴豌豆球蛋白)的混合物为何在任何条件下都不形成可熔凝胶。

[0510] 进一步探索为了获得可熔凝胶需要豆球蛋白或豌豆球蛋白部分有多纯。将如上文所述进行分级分离的经分级分离的豌豆蛋白(豆球蛋白和豌豆球蛋白(+伴豌豆球蛋白))以豆球蛋白:豌豆球蛋白0:8、1:7、2:6、3:5、1:1、5:3、6:2、7:1和8:0比率混合(总蛋白质浓度是8%w/v,于20mM磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中在158mM和300mM NaCl浓度下)。通过以下方式使样品经历加热-冷却循环:在水浴中加热到95℃,保持在95℃下15分钟,并且以0.5C/min的速率冷却到30℃。然后评价样品的熔融性质。在预期豌豆球蛋白(+伴豌豆球蛋白)部分形成可熔凝胶的158mM NaCl下,仅2:6、1:7和8:0豆球蛋白:豌豆球蛋白比率的样品形成可熔凝胶。这表明,为形成可熔凝胶,豌豆球蛋白(+伴豌豆球蛋白)部分需要是至少75%纯。另一个方面,在预期豆球蛋白形成可熔凝胶的300mM NaCl下,仅7:1和8:0豆球蛋白:豌豆球蛋白比率的样品形成可熔凝胶。这表明,为形成可熔凝胶,豆球蛋白部分需要是至少87.5%纯。

## [0511] 实例36-将熔融盐用于蛋白质的胶凝乳液

[0512] 以7% (w/v) 于20mM磷酸钾缓冲液(pH 7.4)中在100mM NaCl(豌豆豆球蛋白除外,其在300mM NaCl下)下制备豌豆豆球蛋白、豌豆球蛋白(+伴豌豆球蛋白)、大豆蛋白和绿豆8S蛋白的溶液。添加20% (v/v) 的熔融棕榈油(来自杰德华兹国际)、1mM的氯化钙(来自西格玛),并且添加1% (w/v) 的熔融盐(磷酸二钠(DSP)、焦磷酸三钠十二水合物(TSP12)、六偏磷酸钠(SHMP)或柠檬酸三钠(TSC)),并且对混合物超声处理以形成乳液。针对每种基于蛋白质的乳液,测试每种盐。不添加熔融盐到对照样品中。将乳液转移到水浴中的密闭容器中,并且然后使其经历加热-冷却循环以诱导胶凝(加热到95℃后持续15分钟,保持在95℃下15分钟,并且以0.5-1C/min冷却到30℃)。然后将样品从容器移出,并且评价其熔融性。

[0513] 发现虽然此处描述的蛋白质溶液在pH7.4下在100mM NaCl(对于豌豆-豆球蛋白,是300mM NaCl)下容易形成可熔凝胶,但脂肪的存在似乎干扰凝胶的熔融性,即含有蛋白质+油+/-氯化钙的对照样品不形成可熔凝胶。然而,添加熔融盐使蛋白质凝胶保持熔融性,如表23中所概述。

## [0514] 表23

[0515] 熔融盐对于包含不同蛋白质的乳液的特异性的概述。(√)指示由乳液形成的热诱导凝胶是可熔的;(x)指示凝胶是不可熔的;(\*)指示在胶凝程序期间将样品加热到最大85C。

乳液中的蛋白质部分		DSP	TSP	SHMP	TSC
[0516]	豌豆-豌豆球蛋白(+伴豌豆球蛋白)	✓	✓	×	×
	豌豆-豆球蛋白	×	✓	✓	✓
	大豆(未经分级分离)	✓	×	×	×
	绿豆 8S 球蛋白	✓*	×	×	×

[0517] 实例37-制作坚果奶意大利乳清干酪

[0518] 将含有12-14%脂肪并且pH在6.0到6.3之间的经巴氏灭菌的坚果奶用以制备意大利乳清干酪仿品。将乳酸乳球菌乳酸亚种(0.02g/L)和乳酸乳球菌乳脂亚种(0.02g/L)接种到坚果奶中,保持在约80°F下,然后搅拌15分钟。添加水合的转谷氨酰胺酶(ACTIVA TI,来自味之素)到经接种的奶中,并且使其在12°C与25°C之间的温度下凝结10到14小时。当pH低于4.6时,将凝乳切成1"方块,并且沥干,并且在41°F下按压24小时,以获得水分在62到68%范围内的坚硬意大利乳清干酪。可以按需要对凝乳盐渍和使其起泡沫。

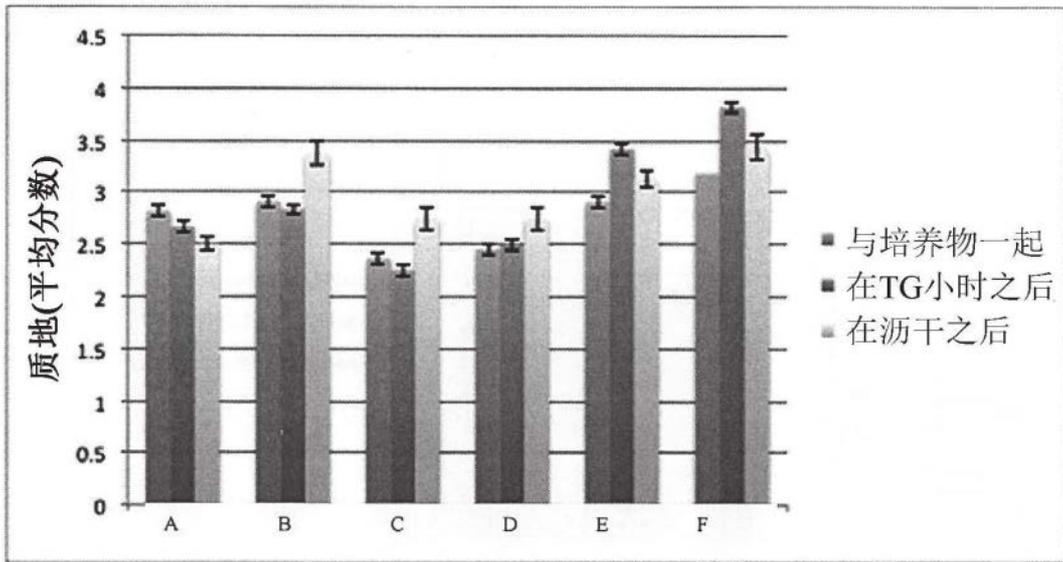


图1

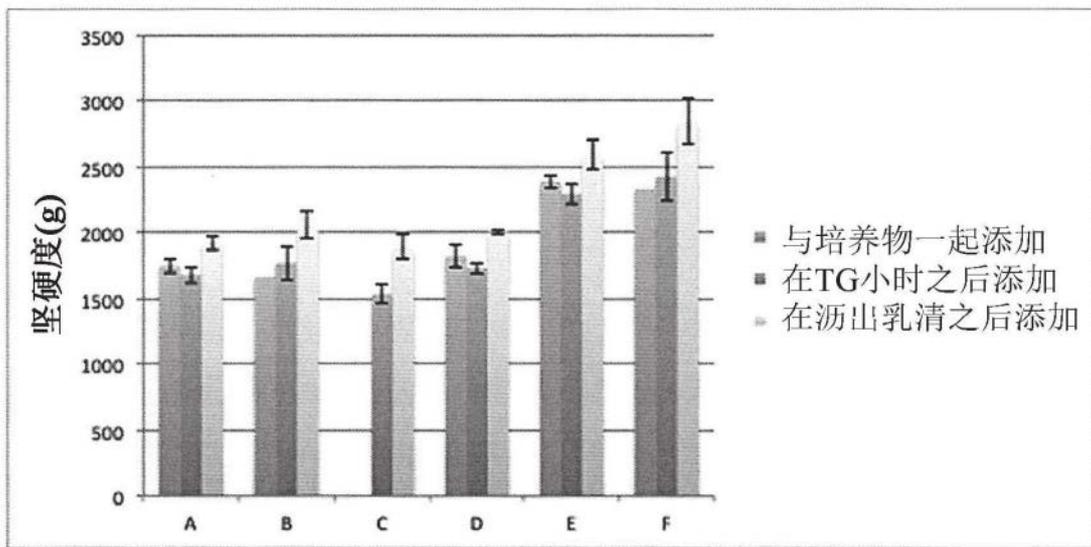


图2

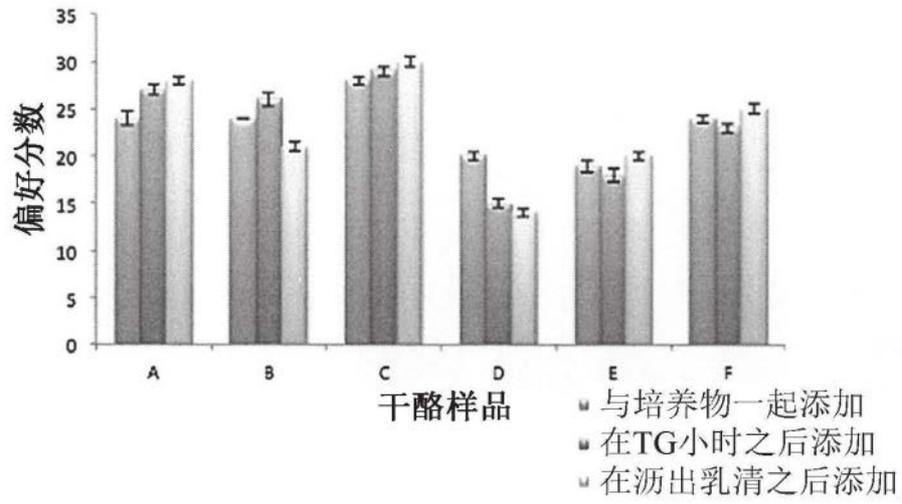


图3A

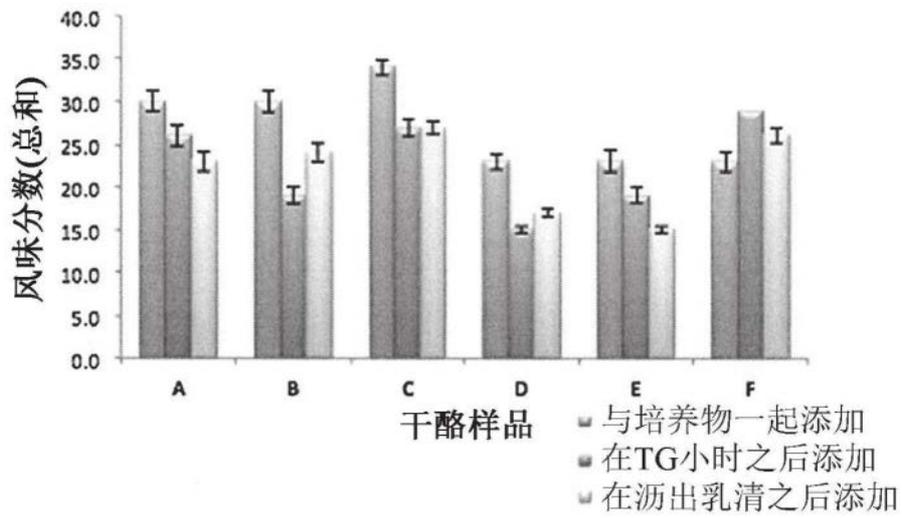


图3B

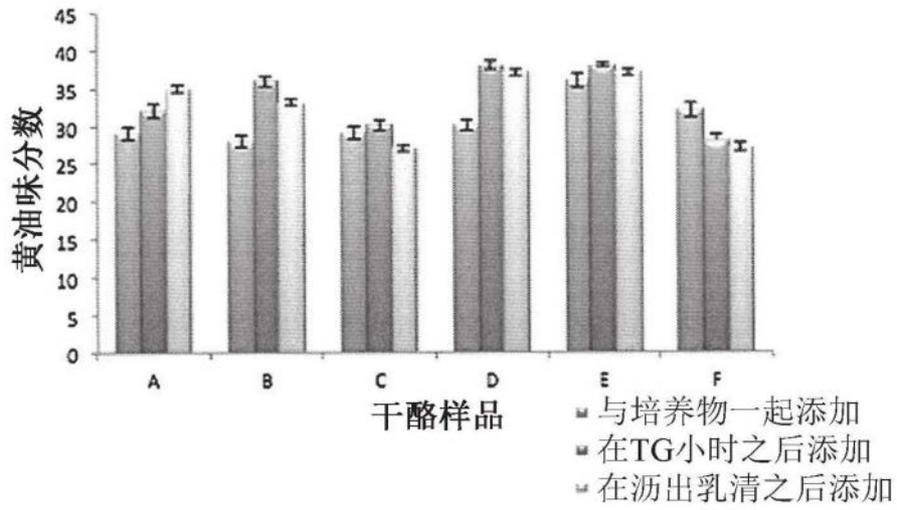


图4

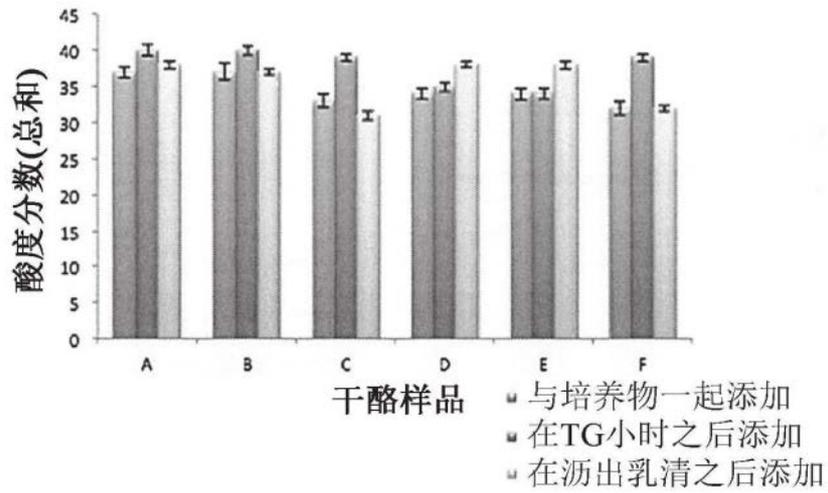


图5

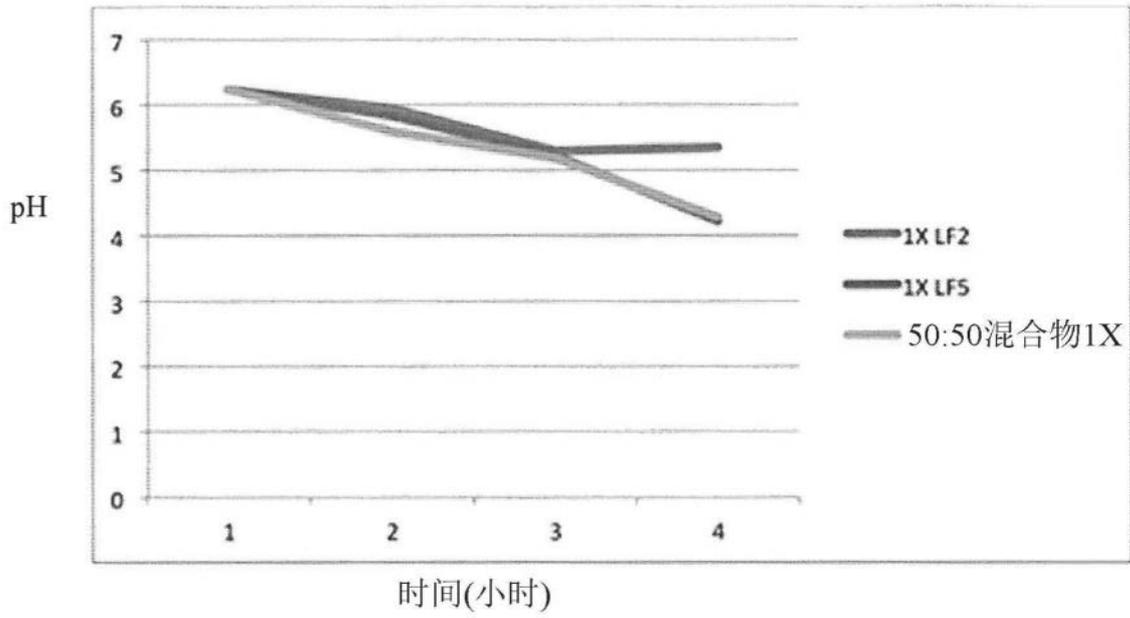
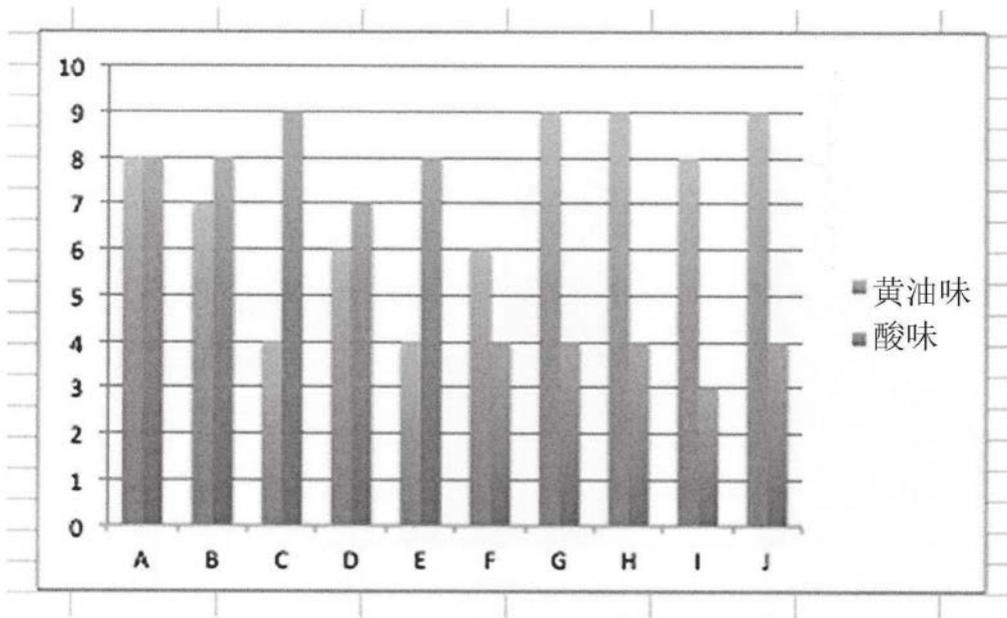


图6



肠膜明串珠菌      乳酸乳球菌丁二酮变种

图7

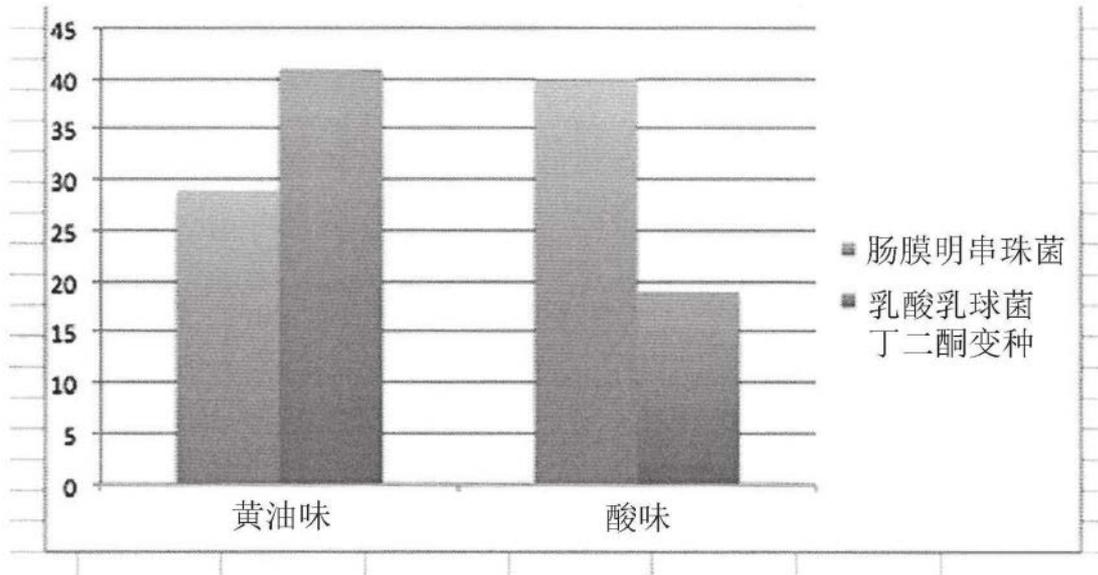


图8

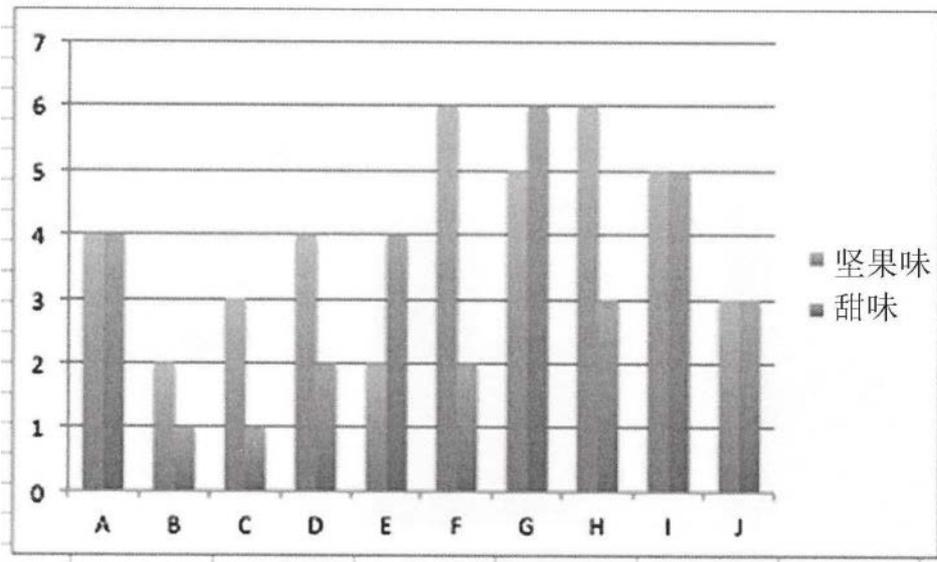


图9

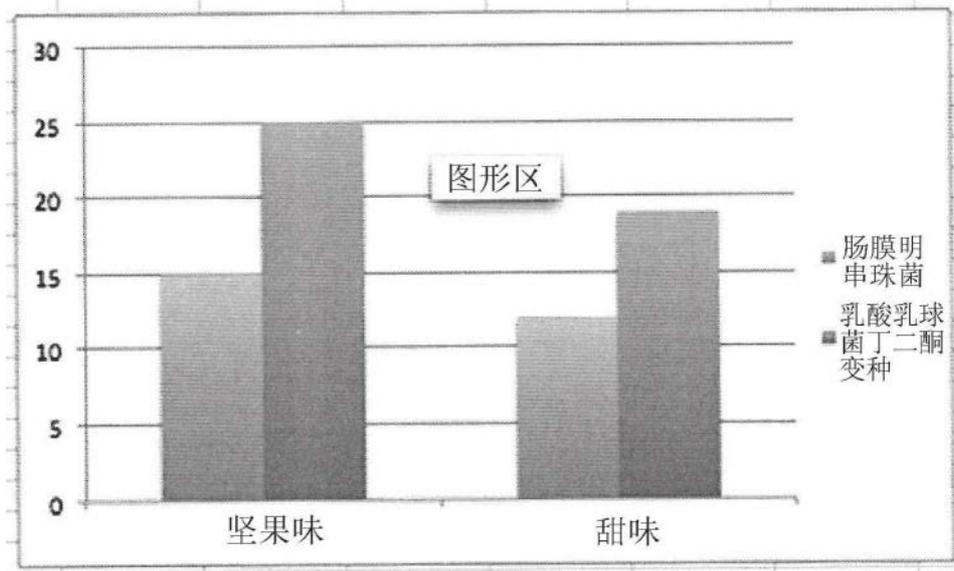


图10

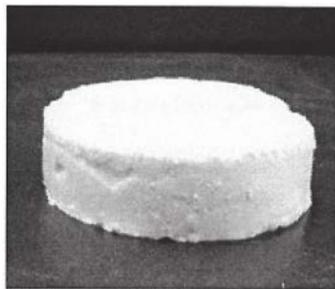


图11

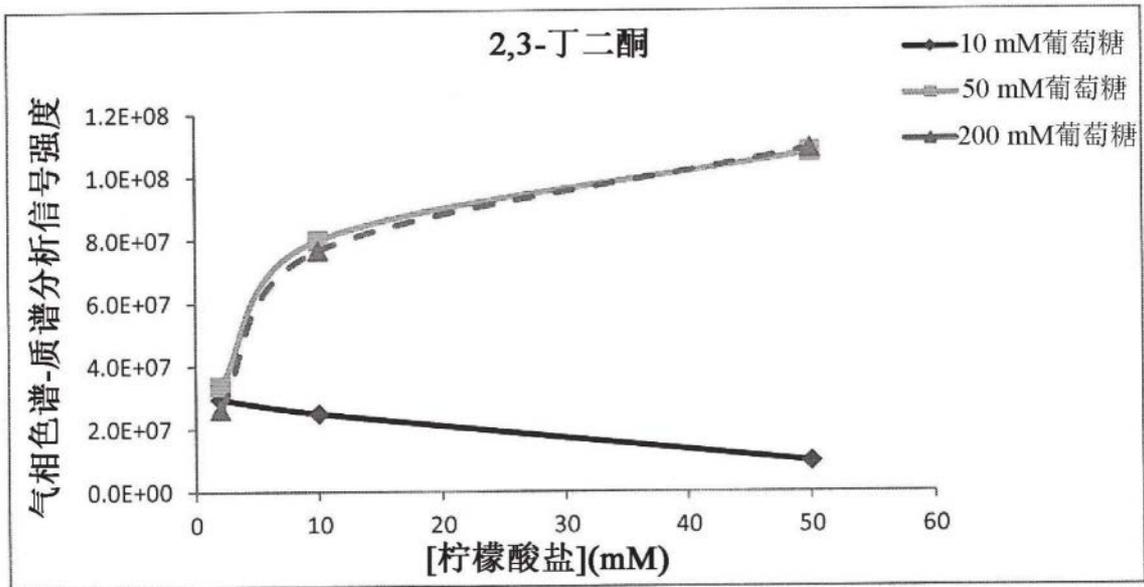


图12

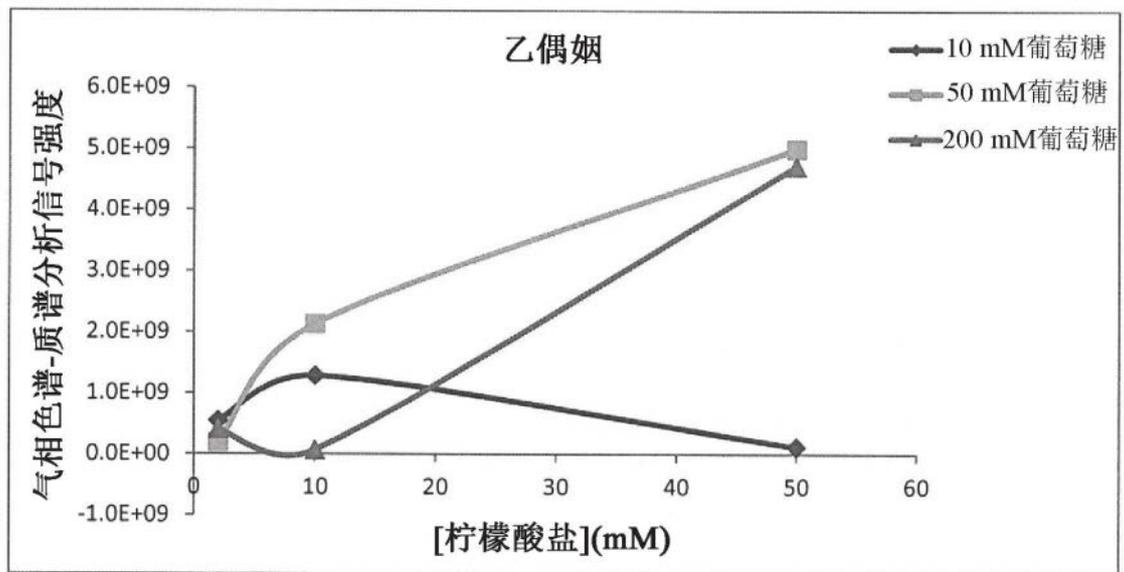


图13

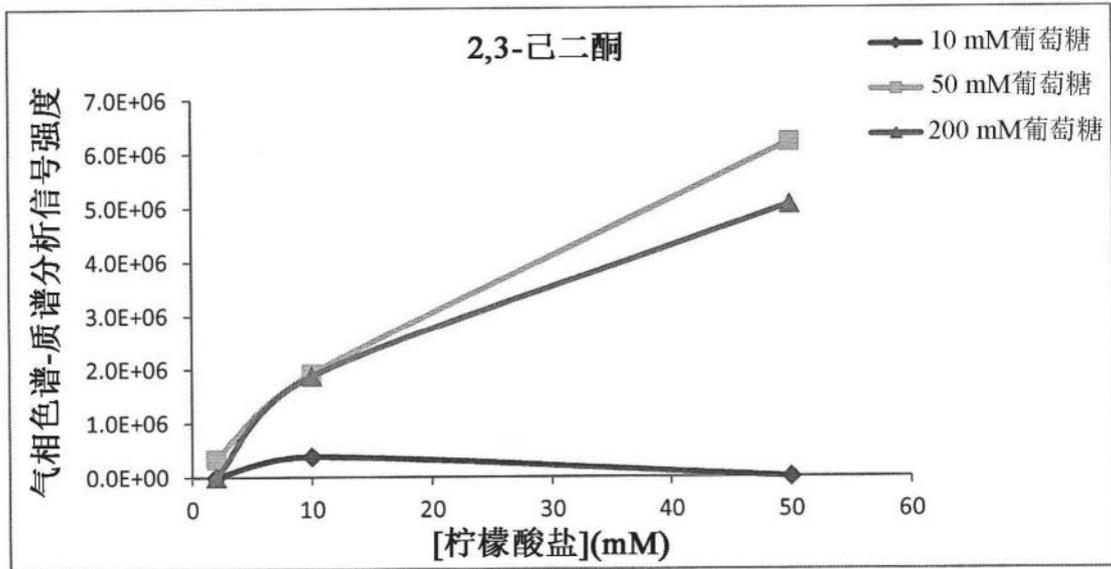


图14

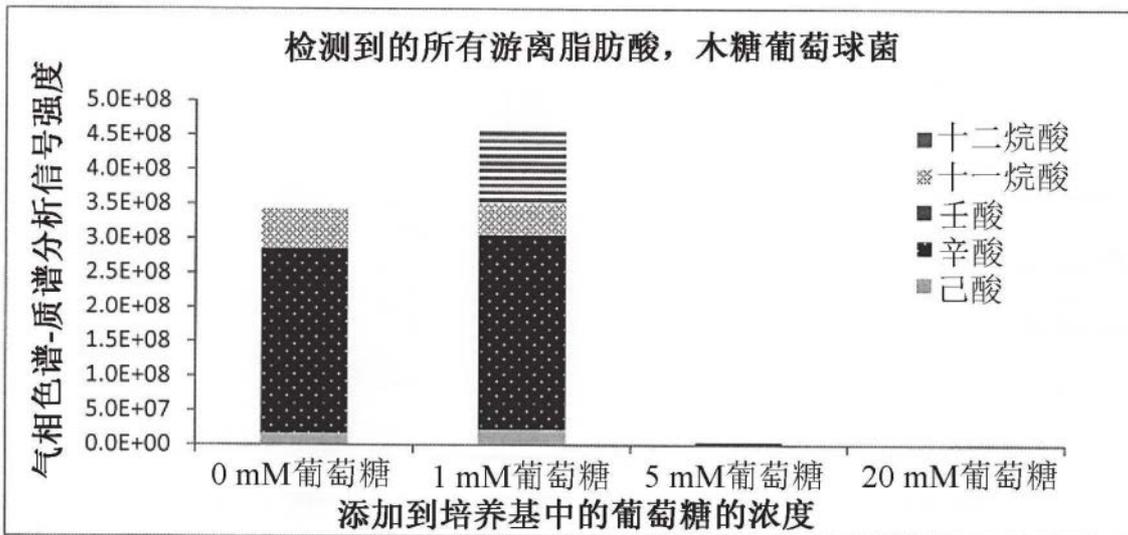


图15

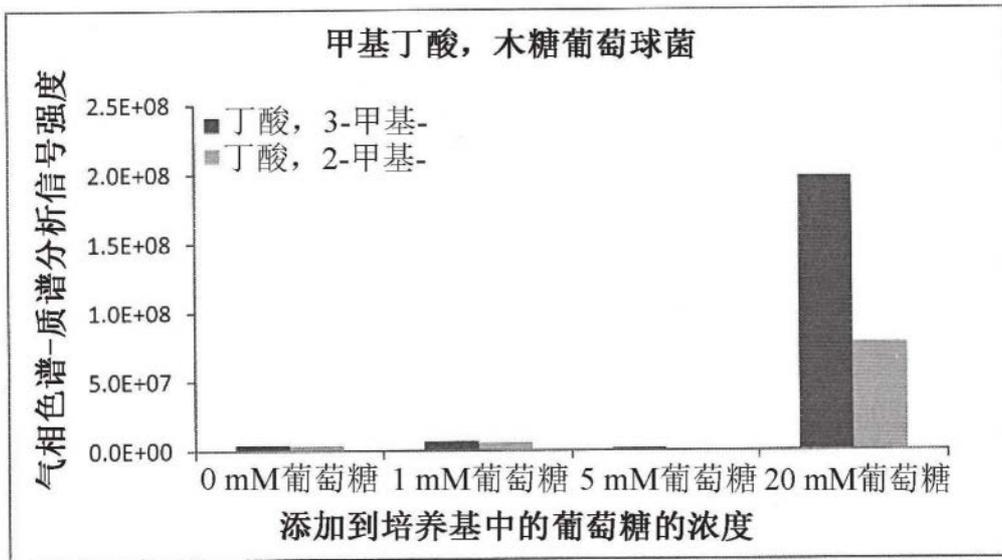


图16

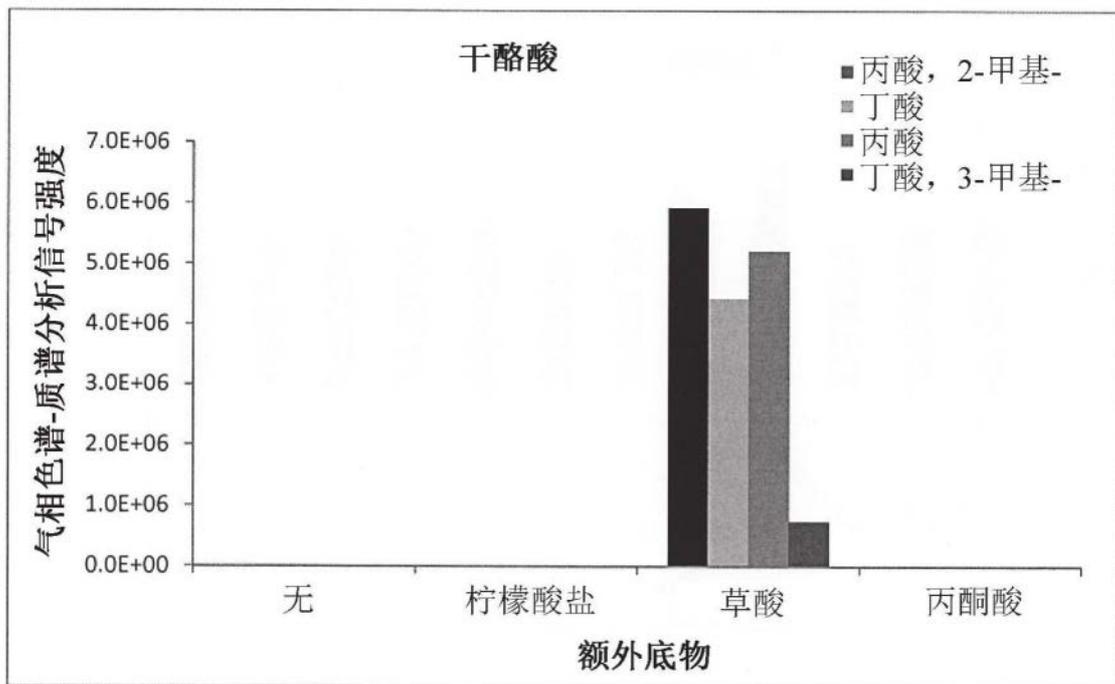


图17

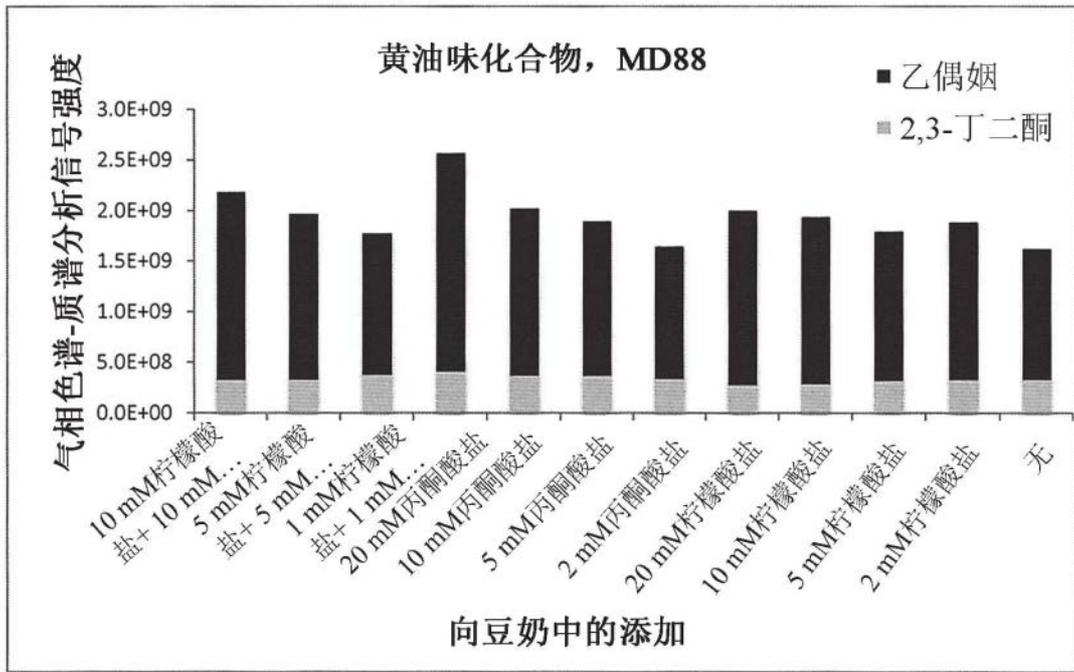


图18

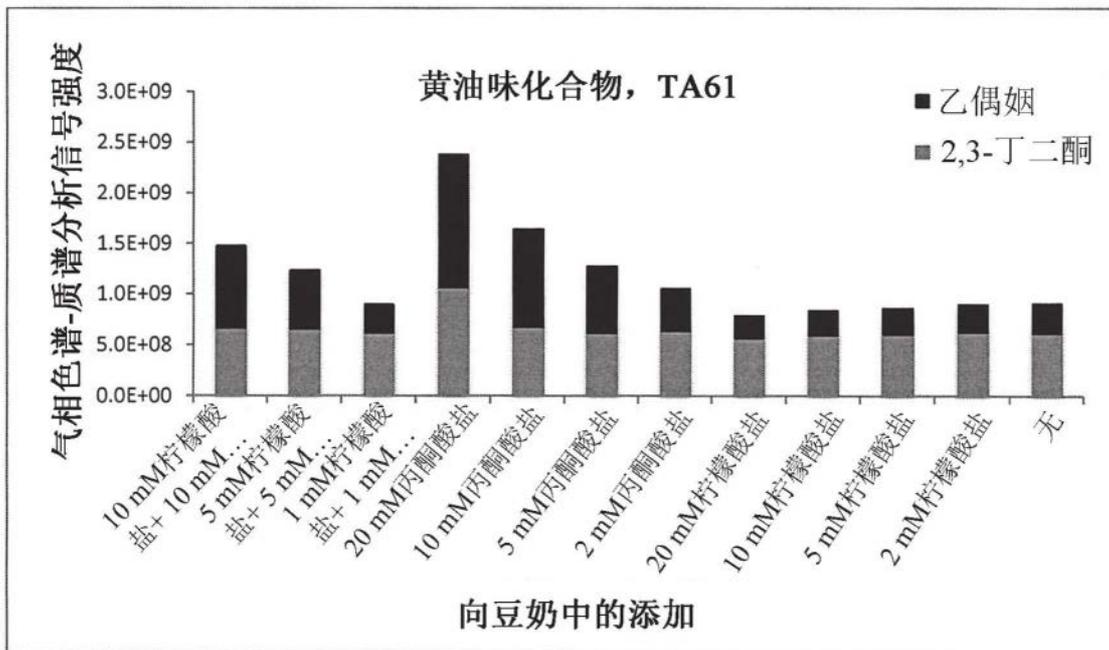


图19

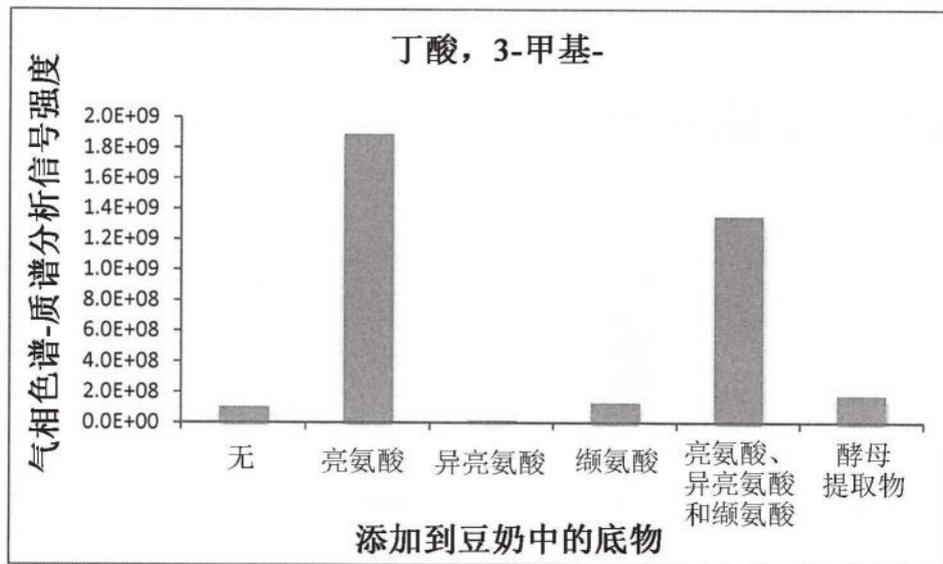


图20

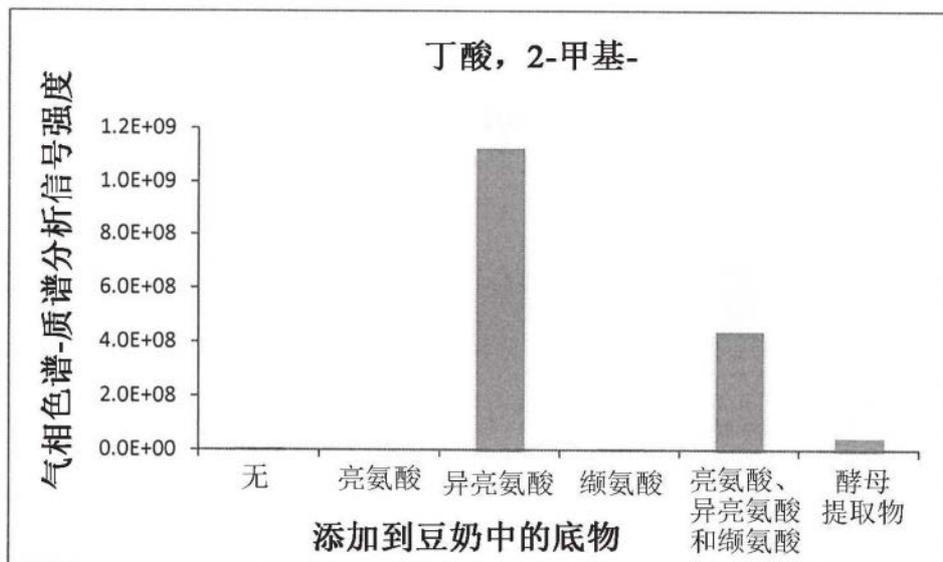


图21

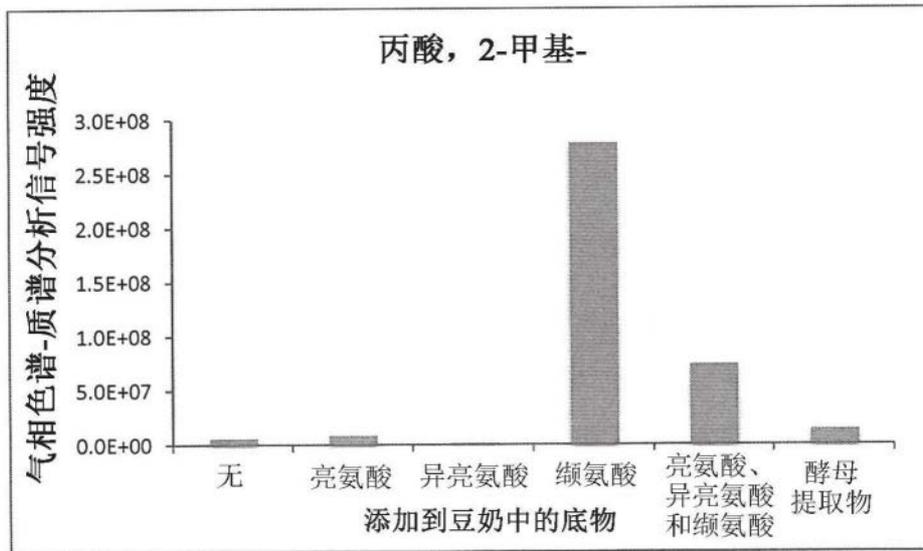


图22

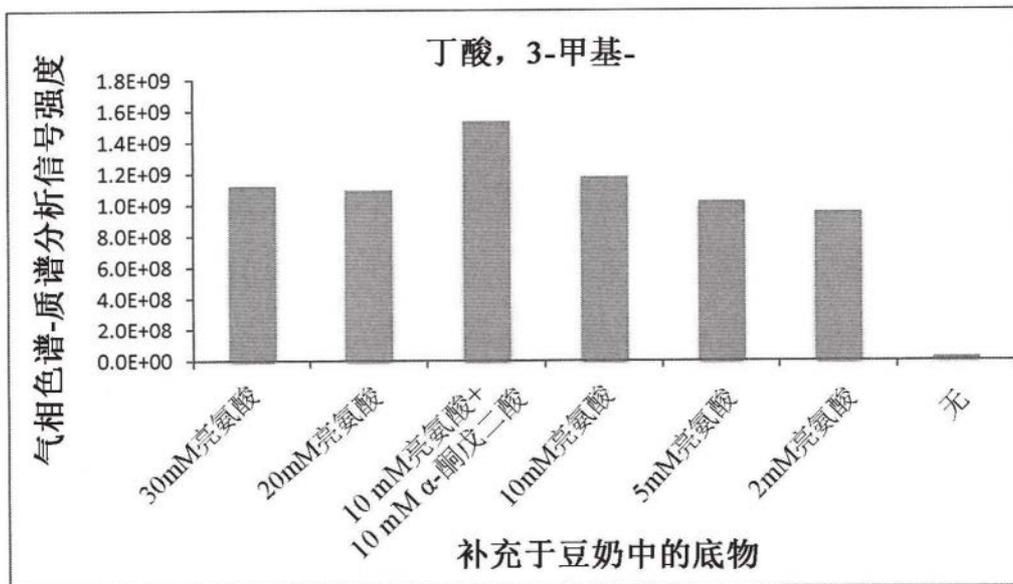


图23

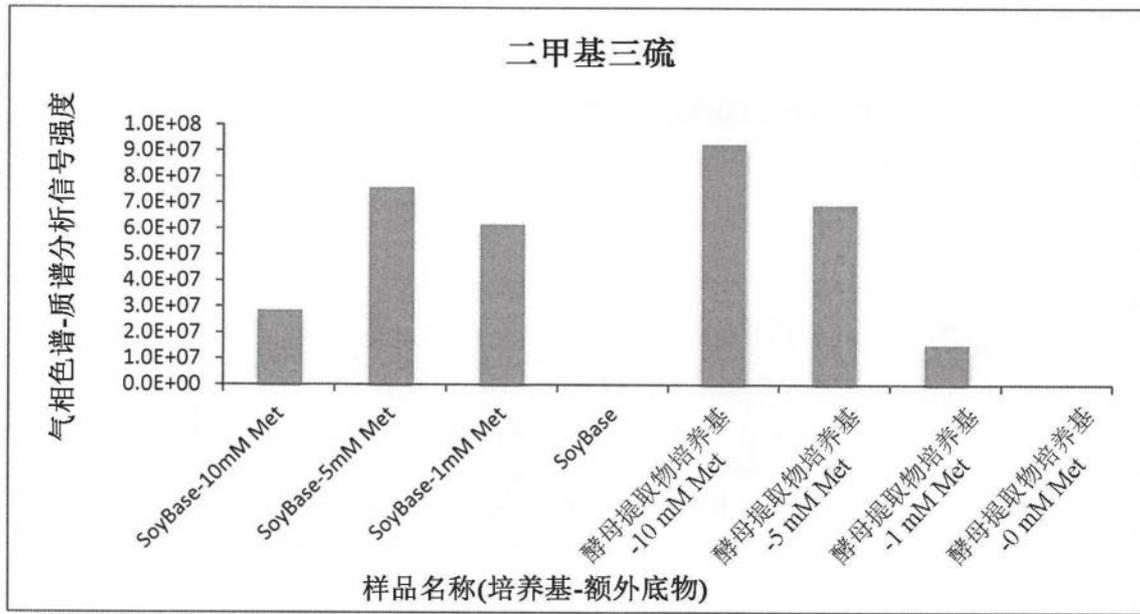


图24

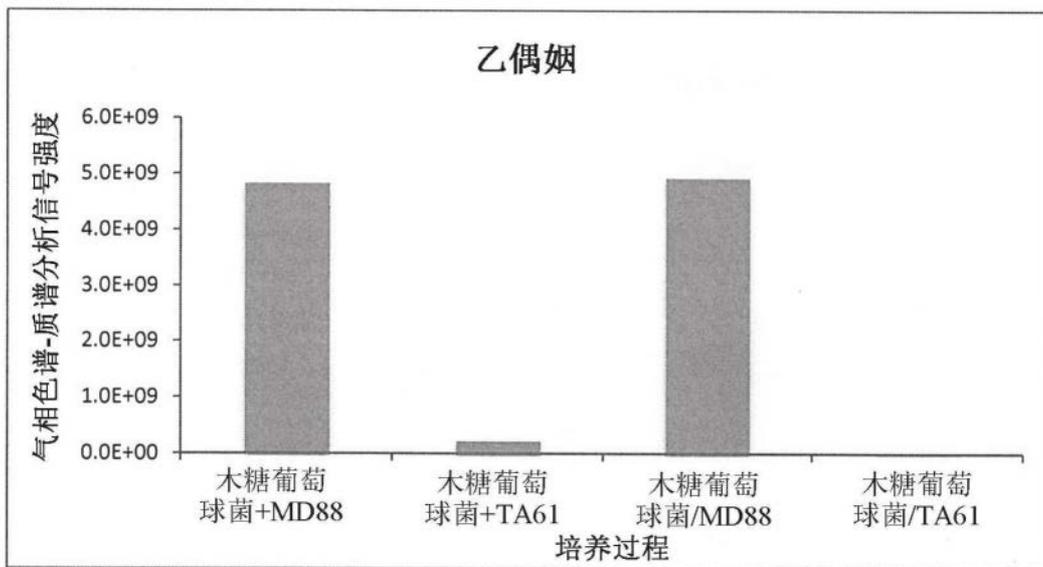


图25

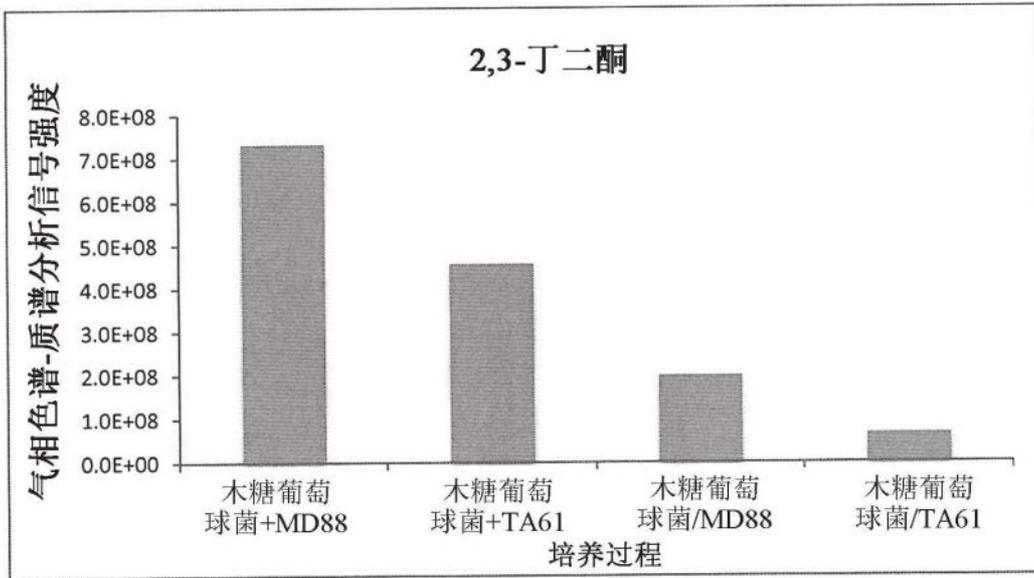


图26

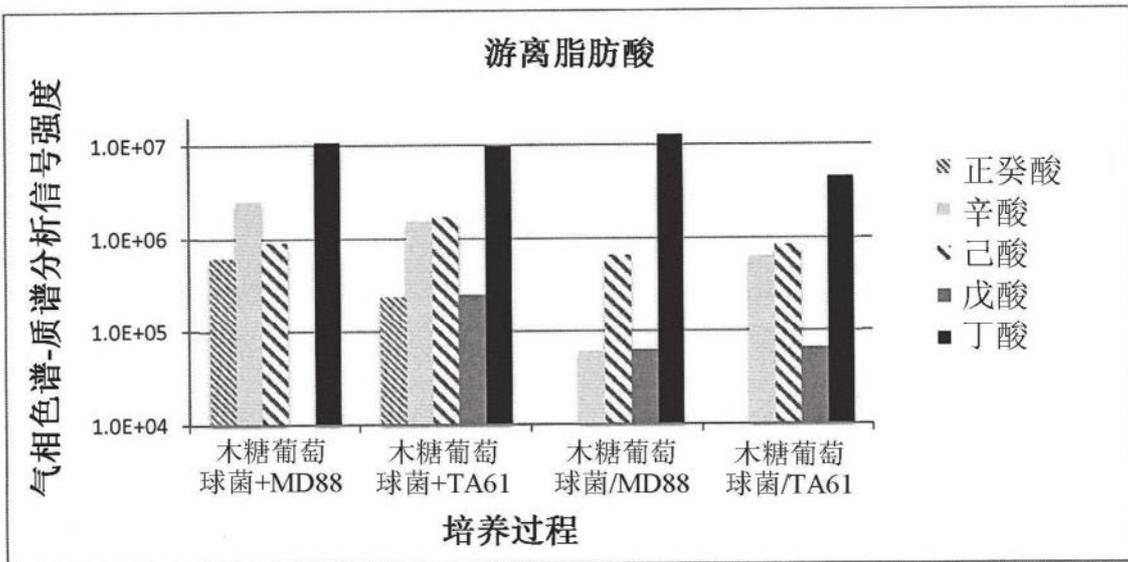


图27