



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112126599 B

(45) 授权公告日 2022.05.27

(21) 申请号 202010953553.4

(22) 申请日 2020.09.11

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112126599 A

(43) 申请公布日 2020.12.25

(73) 专利权人 杭州娃哈哈科技有限公司  
地址 310016 浙江省杭州市江干区杭州经  
济技术开发区14号大街5号5层

(72) 发明人 陈丽娥 陈苏 陈彩玲 任学良  
翁璐激 郑志瑶 李言郡 林国栋  
陈作国 赵越 李理

(74) 专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公  
司 33109  
专利代理师 尉伟敏

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

审查员 何春征

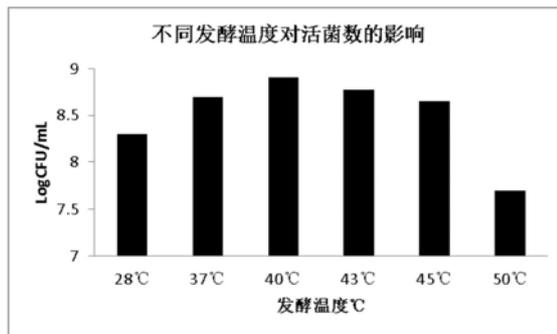
权利要求书1页 说明书9页 附图3页

(54) 发明名称

一种瑞士乳杆菌的高密度培养方法、高活力菌粉的制备及其应用

(57) 摘要

本发明涉及微生物培养与应用技术领域,针对现有技术的乳酸菌菌体活力低及培养周期长的问题,公开了一种瑞士乳杆菌的高密度培养方法、高活力菌粉的制备及其应用,包括以下步骤:(1)将瑞士乳杆菌菌株接种于所述活化用种子培养基中,培养得到种子液;(2)将种子液接种于瑞士杆菌高密度发酵培养基中,于35~43℃条件下,厌氧搅拌条件下进行发酵培养,发酵完成后得到活菌发酵液。上述方法所得的发酵液,在高活力瑞士乳杆菌菌粉制备中的应用。提供一种高密度乳清增殖培养基,并对瑞士乳杆菌WHH2580进行高密度培养,可获得数量较多的菌体;采用优化的冻干保护剂大大提高了菌体的存活率,制备高活力瑞士乳杆菌菌粉,延长冻干菌粉保藏期。



1. 一种瑞士乳杆菌的高密度培养方法,其特征是,包括以下步骤:

(1) 将瑞士乳杆菌菌株接种于所述活化用种子培养基中,培养得到种子液;

(2) 将种子液接种于瑞士乳杆菌高密度发酵培养基中,于37~43℃条件下,通入CO<sub>2</sub>厌氧搅拌条件下进行发酵培养,发酵完成后得到活菌发酵液,pH控制在4.5~5.5;

所述瑞士乳杆菌为瑞士乳杆菌WHH2580 其保藏编号为:CGMCC No.18730,所述培养基包括活化用种子培养基和高密度发酵培养基,每升瑞士乳杆菌活化用种子培养基的组成为:乳糖10~30g,大豆蛋白胨1~10g,胰蛋白胨1~10g,吐温0.5~2g,牛肉抽提物1~20g,酵母粉,硫酸镁,硫酸锰,磷酸氢二钾和乙酸钠;每升所述瑞士乳杆菌高密度发酵培养基的组成为:乳清粉10~50g,乳清浓缩蛋白1~10g,大豆胨20~60g,浓缩番茄汁5~50g,酵母粉1~15g,硫酸锰0.28~0.3g,硫酸镁0.58~0.6g,磷酸氢二钾1~5g和柠檬酸钠1~10g;

所述瑞士乳杆菌高密度发酵培养基的pH为6.0~7.0;

步骤(2)中,所述种子液在瑞士乳杆菌高密度发酵培养基中的接种量为1~10% (v/v);发酵培养工艺条件为:厌氧,搅拌速度控制在100~180rpm,pH控制在4.5~5.5;

发酵过程中,所述瑞士乳杆菌高密度发酵培养基的初始pH值为6.0~7.0,发酵过程中pH控制在4.5~5.5。

2. 一种利用权利要求1所述方法所得的活菌发酵液制备高活力瑞士乳杆菌菌粉的方法,其特征是,所述高活力瑞士乳杆菌菌粉的制备步骤如下:

a. 将瑞士乳杆菌活菌发酵液的pH调整为6.0~7.0;

b. 离心收集菌体,得到瑞士乳杆菌的菌体浓缩液;

c. 将步骤b制备所得的瑞士乳杆菌菌体浓缩液与冻干保护剂水溶液按照体积比1:1-1:3混合,搅拌混匀得到瑞士乳杆菌菌体悬液;

d. 将步骤c中的瑞士乳杆菌菌体悬液进行真空冷冻干燥,得到活菌数为(3.0~4.0) × 10<sup>11</sup>CFU/g的瑞士乳杆菌冻干菌粉;

步骤c中冻干保护剂水溶液:脱脂乳20~150g/L,糖类30~100g/L,甘油5~45g/L,甘露醇0.05-0.5g/L,氯化钙0.1-1g/L,谷胱甘肽0.1-1g/L,其余含量为水;糖类选自蔗糖、乳糖及海藻糖中的至少一种;所述冻干保护剂水溶液的pH 为5.5~7.0。

3. 根据权利要求2所述制备高活力瑞士乳杆菌菌粉的方法,其特征是,步骤d所述真空冷冻干燥过程为:-50~-20℃预冻2~4h,真空度0.10~0.25mbar,冷阱温度-100~-50℃进行真空冷冻干燥。

4. 一种瑞士乳杆菌生物制品,其特征是,含有如权利要求2-3任一所述的方法制备得到的高活力瑞士乳杆菌菌粉。

## 一种瑞士乳杆菌的高密度培养方法、高活力菌粉的制备及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物培养与应用技术领域,尤其是涉及一种瑞士乳杆菌的高密度培养方法、高活力菌粉的制备及其应用。

### 背景技术

[0002] 益生菌(Probiotics)是一类对宿主有益的活性微生物,是定植于人体肠道、生殖系统内,能产生确切健康功效从而改善宿主微生态平衡、发挥对肠道有益作用的活性有益微生物的总称。已经发现的益生菌大多数可分为三类,即乳杆菌、双歧杆菌和革兰氏阳性球菌。瑞士乳杆菌是乳杆菌属的一种,在我国卫生部认可的可用于食品的益生菌菌种名单中。该菌种最早从西方奶酪中分离出来,具有较强的蛋白水解能力,调节肠道菌群能力,增强免疫力及抗高血压的功效,还具有产生细菌素或生物活性肽的潜能,并且可与发酵乳制品中的益生元结合产生合生素,因此被认为是一种具有广泛发展前景的益生菌。然而限制瑞士乳杆菌广泛应用的一个重要原因是如何在控制成本的同时获得大量的菌体和高活力的菌粉。

[0003] 随着发酵的商业化应用日益增加,高密度培养技术和真空冷冻干燥技术被逐渐关注。陈卫等人向蛋白酶预水解的10%脱脂乳中添加1.5%胰蛋白胨,0.5%葡萄糖和0.3%酵母提取物,高密度培养干酪乳杆菌Lc~15,发酵液活菌数可达到 $8.80 \times 10^9$ CFU/mL。

[0004] CN201110087083.9涉及一种乳酸菌的高密度培养方法,发酵培养基的组成为:大豆肽0.5%~1.5%,复合果蔬汁3%~5%,余量为原料乳,得到的植物乳杆菌和干酪乳杆菌发酵液中乳酸菌活菌数可达到 $8.9 \times 10^{10} \sim 2.7 \times 10^{11}$ CFU/mL;CN201611239872.9公开了一种高密度培养副干酪乳杆菌N1115的方法,用副干酪乳杆菌N1115培养基培养副干酪乳杆菌N1115获得的发酵液中的活菌浓度为 $9.6 \times 10^{10}$ cfu/mL;CN200810175856.7可以得到 $10^{11}$ cfu/mL以上活菌数的干酪Zhang乳杆菌的冻干菌粉。

[0005] 其不足之处在于,所培养出来的发酵液菌体活力较低、培养周期较长。

### 发明内容

[0006] 本发明所述的瑞士乳杆菌是具有增强免疫力功能的高黏附性能瑞士乳杆菌WHH2580,于2019年10月23日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物菌种保藏中心保藏,其微生物保藏编号为:CGMCC No.18730。保藏单位地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,该菌株是发明人在前期工作中从新疆那拉提红山沟采集的酸奶中筛选得到。

[0007] 本发明是为了克服现有技术的乳酸菌菌体活力低及培养周期长的问题,提供一种瑞士乳杆菌的高密度培养方法、高活力菌粉的制备及其应用,发明目的:提供一种高密度乳清增殖培养基,并对瑞士乳杆菌WHH2580进行高密度培养,可获得数量较多的菌体;发明目的二:制备高活力瑞士乳杆菌菌粉,后续对常见的冻干保护剂和冻干工艺进行了优化,采用冻干保护剂大大提高了菌体的存活率,并对所得菌粉的稳定性进行追踪,发现冻干菌粉

保藏期较长,存活率不易降低,实现了工业化应用。

[0008] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 一种瑞士乳杆菌的高密度发酵培养基,所述瑞士乳杆菌为瑞士乳杆菌WHH2580其保藏编号为:CGMCC No.18730,所述培养基包括活化用种子培养基和高密度发酵培养基,每升瑞士乳杆菌活化用种子培养基中包括:乳糖10~30g,大豆蛋白胨1~10g,胰蛋白胨1~10g和牛肉抽提物1~20g。

[0010] 上述种子培养基是在MRS培养基基础上重点优选碳源得到,得到的种子液比MRS培养基培养得到的发酵液活力高,接种后能在发酵罐中迅速生长。然而益生菌功效的发挥具有菌株特异性,益生菌的培养和冻干也具有菌株特异性。瑞士乳杆菌属于同型发酵、兼性厌氧乳酸菌,对培养基营养成分要求很苛刻,基本的碳氮源无法获得大量菌体。关于瑞士乳杆菌高密度培养和冻干优化的报道非常少,本发明则对这两方面进行了深入研究和优化;脱脂乳培养基得到的瑞士乳杆菌菌数优于常见MRS培养基,但瑞士乳杆菌菌数长到一定程度就会发生凝乳,菌体无法与脱脂乳分离,不能进行大规模生产;本发明对两种培养基进行了有效的结合和转化,提供一种高密度乳清增殖培养基,可获得大量菌体。

[0011] 作为优选,每升所述乳杆菌高密度发酵培养基中包括:乳清粉10~50g,乳清浓缩蛋白1~10g,大豆胨20~60g,浓缩番茄汁5~50g,酵母粉1~15g,硫酸锰0.28~0.3g,硫酸镁0.58~0.6g,磷酸氢二钾1~5g和柠檬酸钠1~10g。

[0012] 作为优选,所述瑞士乳杆菌高密度发酵培养基的pH为6.0~7.0。

[0013] 一种所述发酵培养基对进行瑞士乳杆菌进行高密度发酵培养的方法,包括以下步骤:

[0014] (1) 将瑞士乳杆菌菌株接种于所述活化用种子培养基中,培养得到种子液;

[0015] (2) 将种子液接种于瑞士杆菌高密度发酵培养基中,于37~43℃条件下,厌氧搅拌条件下进行发酵培养,发酵完成后得到活菌发酵液。

[0016] 作为优选,步骤(2)中,所述种子液在瑞士乳杆菌高密度发酵培养基中的接种量为1~10% (v/v);发酵培养工艺条件为:通入CO<sub>2</sub>,搅拌速度控制在100~180rpm,pH控制在4.5~5.5,发酵时间控制在5~6h。

[0017] 作为优选,发酵过程中,所述瑞士乳杆菌高密度发酵培养基的初始pH值为6.0~7.0,发酵过程中pH控制在4.5~5.5,进一步的,发酵过程中pH控制在5.0~5.2。

[0018] 最终制备出来的活菌发酵液中活菌数为(4.5~5.5) × 10<sup>9</sup> cfu/ml,乳酸菌发酵过程中培养液的pH值是在一定环境条件下代谢活动的综合指标,是一项重要的发酵参数。培养开始时发酵液pH的影响不是很大,控制培养过程中的最适pH是使菌种发挥最大生产能力的保证。该发明使用氨水使发酵过程中的pH控制在5.0~5.2可使菌体生长达到最大值。

[0019] 一种所述方法所得的发酵液在高活力瑞士乳杆菌菌粉制备中的应用,所述高活力瑞士乳杆菌菌粉的制备步骤如下:

[0020] a. 将瑞士乳杆菌活菌发酵液的pH调整为6.0~7.0;

[0021] b. 将步骤a中的瑞士乳杆菌发酵液于室温4000~4200rpm离心10~15min,得到瑞士乳杆菌的菌体浓缩液;

[0022] c. 在步骤b中的瑞士乳杆菌菌体浓缩液按照体积比1:1-1:3添加冻干保护剂水溶液,搅拌20~25min得到瑞士乳杆菌菌体悬液;

[0023] d. 将步骤c中的瑞士乳杆菌菌体悬液进行真空冷冻干燥,得到活菌数为 $(3.0\sim 4.0)\times 10^{11}$ CFU/g的瑞士乳杆菌冻干菌粉。

[0024] 作为优选,步骤c中冻干保护剂水溶液:脱脂乳20~150g/L,糖类30~100g/L,甘油5~45g/L,甘露醇0.05-0.5g/L,氯化钙0.1-1g/L,谷胱甘肽0.1-1g/L,其余含量为水;糖类选自蔗糖、乳糖及海藻糖中的至少一种。

[0025] 作为优选,步骤d所述真空冷冻干燥过程为:~50~20℃预冻2~4h,真空度0.10~0.25mbar,冷阱温度~100~50℃进行真空冷冻干燥。

[0026] 本发明采用真空冷冻干燥技术来制备瑞士乳杆菌冻干菌粉,对常见的冻干保护剂和冻干工艺进行了优化,在制备过程中加入了冻干保护剂,采用本发明中的保护剂和冻干工艺大大提高了菌体的存活率,制备得到的瑞士乳杆菌冻干菌粉活力较高,保藏期较长,存活率持续性较好。

[0027] 一种瑞士乳杆菌发酵生物制品,含有所述的高活力瑞士乳杆菌菌粉,添加量为0.001~0.020% (w/v)。通过发酵、再配料、均质等得到的该发酵生物制品色泽均匀一致,有光泽,成乳白色,组织细腻,质地均匀,入口时表现出较好的稠厚感。

[0028] 因此,本发明具有如下有益效果:

[0029] (1) 本发明的瑞士乳杆菌WHH2580具有提高免疫力的益生功能,同时有优良的黏附性能,为其发挥益生功能提供基础。

[0030] (2) 本发明的高密度发酵培养基可以获得 $(4.5\sim 5.5)\times 10^9$ cfu/mL的瑞士乳杆菌WHH2580发酵液活菌数,较优化前的MRS培养基中培养的活菌数 $(1.00\times 10^8)$ CFU/mL提高50倍以上,且发酵时间较短仅为5~6h,较优化前的MRS培养基中培养时间缩短了6~8h,发酵风味有了较大改善,降低了发酵成本;

[0031] (3) 本发明将高密度发酵液pH调整为6.0~7.0,提高了菌体的存活率,利于后期冷冻干燥;同时对冻干保护剂的成分和pH进行了优化,确定特定冻干保护剂,并将特定冻干保护剂的pH调整至5.5~7.0,真空冷冻干燥后可获得 $(3.0\sim 4.0)\times 10^{11}$ CFU/g高活力菌粉,为瑞士乳杆菌WHH2580固体饮料、片剂、乳制品和食品相关产品的开发提供了基础。

[0032] (4) 高活力瑞士乳杆菌WHH2580冻干菌粉在4℃或更低温度条件下存放6个月后,菌数数量级未发生改变,保藏期较长,存活率不易降低。

[0033] (5) 高活力瑞士乳杆菌冻干菌粉发酵性能优良,可作为发酵剂直接应用。

## 附图说明

[0034] 图1为总实施例中不同发酵温度对瑞士乳杆菌发酵液活菌数的影响数值图;

[0035] 图2为总实施例中不同发酵pH对瑞士乳杆菌发酵液活菌数的影响数值图;

[0036] 图3为总实施例中不同发酵时间对瑞士乳杆菌发酵液活菌数的影响数值图;

[0037] 图4为总实施例中不同温度下冻干菌粉稳定性数值图;

[0038] 图5为总实施例中功能性酸奶和某市售酸奶旋转扫描测试结果图。

## 具体实施方式

[0039] 下面结合具体实施方式对本发明做进一步的描述。

[0040] 总实施例

[0041] 1. 菌株的来源与活化

[0042] a. 一株具有增强免疫力功能的高黏附性瑞士乳杆菌WHH2580, 该菌株是发明人在前期工作中从新疆那拉提红山沟采集的酸奶中筛选得到。于2019年10月23日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物菌种保藏中心保藏, 其微生物保藏编号为: CGMCC No. 18730。该菌株的生物学性质如下:

[0043] 形态学特征: 在MRS琼脂培养基中生长状态为: 在MRS琼脂培养基中生长形态为浅乳白色菌落, 半透明、圆形、表面粗糙、边缘不整齐、平展。革兰氏染色呈典型阳性, 显微镜下观察细胞呈长杆状, 无鞭毛, 不产芽孢, 不运动。

[0044] b. 活化用种子培养基的配制和接种: 将乳糖10~30g, 大豆蛋白胨1~10g, 胰蛋白胨1~10g, 吐温0.5~2g, 牛肉抽提物1~20g, 酵母粉, 硫酸镁, 硫酸锰, 磷酸氢二钾, 乙酸钠和吐温溶于1L纯水中, 搅拌均匀, 121℃高压灭菌15min。冷却至室温后, 将-80度甘油保存的瑞士乳杆菌WHH2580按3%~10%接种量接至活化用种子培养基中, 于37℃条件下24h。如此传代培养2~3次即得瑞士乳杆菌种子液。

[0045] 2. 发酵条件的优化: 本发明用1L发酵罐依次对发酵温度、发酵pH和发酵时间等条件进行优化实验, 发酵液活菌数是主要参考指标, 所以附图中只给出了发酵液活菌数值。

[0046] a. 研究了六种发酵温度对发酵液OD600和活菌数的影响。

[0047] 将乳清粉60~300g, 乳清浓缩蛋白6~60g, 大豆胨120~360g, 浓缩番茄汁30~300g, 酵母粉60g, 硫酸锰1.68g, 硫酸镁3.48g, 磷酸氢二钾6~30g和柠檬酸钠6~60g溶于5L温纯水中, 剪切20~30min后定容至6L, 600mL/1L罐, 121℃高压灭菌15min后冷却。将传代培养2~3次得到的瑞士乳杆菌种子液按1%~10% (v/v) 接种量接至高密度培养基中, 其余条件一致, 研究不同发酵温度(分别设置为28℃、37℃、40℃、43℃、45℃和50℃)对瑞士乳杆菌生长的影响, 结果见附图1。可见, 40℃是瑞士乳杆菌WHH2580最适宜的生长温度, 37℃~43℃是其较适宜的生长温度。

[0048] b. 研究了八种发酵pH对发酵液OD600和活菌数的影响。

[0049] 同上述a配制高密度培养基和接种操作。研究不同发酵pH(分别设置为不同pH、4.2、4.6、4.8、5.0、5.2、5.6和6.0)对瑞士乳杆菌生长的影响, 结果见附图2。可见, pH控制在5.0~5.2是瑞士乳杆菌WHH2580最适宜的生长pH。

[0050] c. 研究了八种发酵时间对发酵液OD600和活菌数的影响。

[0051] 同上述a配制高密度培养基和接种操作。研究不同发酵时间(2h、3h、4h、5h、6h、7h、8h和9h)对瑞士乳杆菌生长的影响, 结果见附图3。可见, 发酵时间5h~6h, 瑞士乳杆菌WHH2580发酵液活菌数已达到最高。

[0052] 3. 高密度发酵:

[0053] 瑞士乳杆菌高密度发酵培养基的配制: 将乳清粉60~300g, 乳清浓缩蛋白6~60g, 大豆胨120~360g, 浓缩番茄汁30~300g, 酵母粉60g, 硫酸锰1.68g, 硫酸镁3.48g, 磷酸氢二钾6~30g和柠檬酸钠6~60g溶于5L温纯水中, 剪切20~30min后定容至6L, 倒入10L发酵罐中。121℃高压灭菌10min。冷却至室温后, 将实施例1b中获得的瑞士乳杆菌种子液按3%~10% (v/v) 接种量接至10L发酵罐中。发酵温度40℃, 通入CO<sub>2</sub>, 搅拌速度控制在100~180rpm, 发酵时pH控制在4.5~5.5, 发酵时间控制在6h。此时得到的活菌发酵液中活菌数为(4.5~5.5) × 10<sup>9</sup>cfu/ml。

[0054] 4. 冻干菌粉的制备:对菌泥的收集方法、冻干保护剂和冻干工艺等进行了优化。

[0055] a. 菌泥的收集:用氨水将上述步骤3中得到的发酵液pH调整至6.0~7.0,室温4000rpm离心10~20min后,收集菌泥,将菌泥含水量调整至70%~80%。

[0056] b. 保护剂的添加:

[0057] 以实验室通用保护剂配方(包括乳糖、脱脂乳、甘油或谷氨酸钠)为基础,研究不同糖的种类和浓度、不同脱脂乳浓度、不同甘油浓度和不同谷氨酸钠浓度、添加抗坏血酸、氯化钙、酵母抽提物或谷胱甘肽的浓度、冻干保护剂的pH等对冻干菌粉活菌数的影响,最终提供了一种瑞士乳杆菌WHH2580冻干保护剂,其组成为:脱脂乳20~150g/L,蔗糖、乳糖或海藻糖30~100g/L,甘油5~45g/L,甘露醇0.05~0.5g/L,氯化钙0.1~1g/L,谷胱甘肽0.1~1g/L,用20%氢氧化钾将冻干保护剂的pH调整至5.5~7.0。将上述步骤a乳酸菌湿菌体和冻干保护剂以体积1:1~1:3比例混合,搅拌20min。将混合均匀的悬液平铺在冻干器皿中。

[0058] c. 将上述步骤b的冻干器皿放入冻干机中,设置优化后的冻干程序,即-20℃~-50℃预冻2~4h,真空度0.10~0.25mbar,冷阱温度-100℃~-50℃进行真空冷冻干燥。

[0059] d. 瑞士乳杆菌冻干菌粉活菌数可达 $3.0\sim 4.0\times 10^{11}$ CFU/g,存活率可达90%以上,得到了高活力瑞士乳杆菌菌粉。为瑞士乳杆菌WHH2580固体饮料、片剂、乳制品和食品相关产品的开发提供了基础。

[0060] 5. 冻干菌粉的稳定性:

[0061] 将步骤4中得到的冻干菌粉10g/袋分装,封口后分别放置室温、4℃和-20℃,每个温度18~20袋,每个月取出3袋计活菌数和水分活度。结果见附图4。4℃和-20℃存放6个月活菌数基本无变化,室温存放6个月活菌数下降0.5个数量级。水分活度在三个温度下稳定。

[0062] 6. 冻干菌粉的应用:

[0063] 上述得到的冻干菌粉可用于制备药品、食品、保健品或膳食补充剂。功能性酸奶是其应用之一,具体阐述如下:

[0064] a. 功能性酸奶配方:乳粉5~15%、糖醇0.5~5.0%、淀粉0.1~5.0%、稳定剂0.01~1.00%、甜味剂0.001~0.050%、WHH2580菌种0.001~0.020%。

[0065] b. 功能性酸奶制备方法:

[0066] 1) 奶液制备:称取200~400g超纯水加热至45~60℃,取配方量用量的乳粉,加入水中,搅拌或剪切15~30min后,静置水合20~40min。

[0067] 2) 均质及杀菌:对步骤1)中所得的奶液进行均质、杀菌并冷却,得杀菌冷却料液。所述的杀菌同本领域常规的杀菌条件,如巴氏杀菌处理。

[0068] 3) 接种发酵:向步骤2)中所得的杀菌冷却料液中加入益生菌WHH2580,搅拌混匀,置于恒温培养箱中35~45度左右静置发酵4~16h后冷却。

[0069] 4) 二次配料和均质:向步骤3)中所得的基料中加入适量稳定剂、糖醇和淀粉等,进行均质得功能性酸奶。

[0070] c. 功能性酸奶流变学性能测试:

[0071] 为评价酸奶的组织状态和质构特性,对上述功能性酸奶和某市售酸奶的流变学特性进行测试,即通过旋转扫描,测定不同剪切应变率下的黏度。这一指标可间接反映发酵乳在入口、留口和吞咽过程中的黏度变化趋势。扫描结果见附图5。同时对上述功能性酸奶和某市售酸奶进行了内部口味测试。结果表明,上述功能性酸奶呈现出较高的黏度,在入口时

表现出更好的稠厚感。

#### [0072] 实施例1

[0073] 将乳清粉204g,乳清浓缩蛋白28g,大豆胨144g,浓缩番茄汁68g,酵母粉60g,硫酸锰1.68g,硫酸镁3.48g,磷酸氢二钾18g和柠檬酸钠48g溶于5L温纯水中,剪切20~30min后定容至6L,倒入10L发酵罐中。121℃高压灭菌10min。冷却至室温后,将实施例1b中获得的瑞士乳杆菌种子液按5% (v/v) 接种量接至10L发酵罐中。发酵温度40℃,通入CO<sub>2</sub>,搅拌速度控制在150rpm,发酵时pH控制在5.2,发酵时间6h。此时得到的活菌发酵液中活菌数为 $5.50 \times 10^9$  cfu/mL。用氨水将发酵液pH调整至6.8,室温4000rpm离心15min后,收集菌泥,将菌泥含水量调整至80%。菌泥与配制好的冻干保护剂(脱脂乳60g/L,蔗糖、乳糖或海藻糖85g/L,甘油20g/L,甘露醇0.2g/L,氯化钙0.5g/L,谷胱甘肽0.36g/L,用20%氢氧化钾将冻干保护剂的pH调整至6.5) 1:1比例混合,搅拌20min。冻干后得到冻干菌粉,其活菌数可达 $4.0 \times 10^{11}$  CFU/g。

#### [0074] 实施例2

[0075] 将乳清粉60g,乳清浓缩蛋白28g,大豆胨144g,浓缩番茄汁68g,酵母粉60g,硫酸锰1.68g,硫酸镁3.48g,磷酸氢二钾18g和柠檬酸钠48g溶于5L温纯水中,剪切20~30min后定容至6L,倒入10L发酵罐中。121℃高压灭菌10min。冷却至室温后,将实施例1b中获得的瑞士乳杆菌种子液按5% (v/v) 接种量接至10L发酵罐中。发酵温度40℃,通入CO<sub>2</sub>,搅拌速度控制在150rpm,发酵时pH控制在5.2,发酵时间6h。此时得到的活菌发酵液中活菌数为 $4.65 \times 10^9$  cfu/mL。与实施例1的区别在于,该实施例的培养基中乳清粉的添加量有所减少,为60g/6L,仍得到了足够多的菌体量。

#### [0076] 实施例3

[0077] 将乳清粉204g,乳清浓缩蛋白28g,大豆胨144g,浓缩番茄汁68g,酵母粉60g,硫酸锰1.68g,硫酸镁3.48g,磷酸氢二钾18g和柠檬酸钠48g溶于5L温纯水中,剪切20~30min后定容至6L,倒入10L发酵罐中。121℃高压灭菌10min。冷却至室温后,将实施例1b中获得的瑞士乳杆菌种子液按5% (v/v) 接种量接至10L发酵罐中。发酵温度40℃,通入CO<sub>2</sub>,搅拌速度控制在150rpm,发酵时pH控制在5.2,发酵时间6h。此时得到的活菌发酵液中活菌数为 $4.90 \times 10^9$  cfu/mL。用氨水将发酵液pH调整至6.8,室温4000rpm离心15min后,收集菌泥,将菌泥含水量调整至80%。菌泥与配制好的冻干保护剂(脱脂乳60g/L,蔗糖、乳糖或海藻糖85g/L,甘油20g/L,甘露醇0.2g/L,氯化钙0.5g/L,谷胱甘肽0.1g/L,用20%氢氧化钾将冻干保护剂的pH调整至6.5) 1:1比例混合,搅拌20min。冻干后得到冻干菌粉,其活菌数可达 $3.22 \times 10^{11}$  CFU/g。与实施例1的区别在于,该实施例降低了冻干保护剂中谷胱甘肽的添加量,为0.1g/L,冻干菌粉的活菌数呈现了较高活力。谷胱甘肽作为一种抗氧化剂,可能是与保护剂中的其他成分起到协同保护作用,减少菌体的损伤。关于保护剂的作用机理,可能是相当复杂,仍然需要进一步深入研究。

#### [0078] 实施例4

[0079] 将乳清粉204g,乳清浓缩蛋白28g,大豆胨144g,浓缩番茄汁68g,酵母粉60g,硫酸锰1.68g,硫酸镁3.48g,磷酸氢二钾18g和柠檬酸钠48g溶于5L温纯水中,剪切20~30min后定容至6L,倒入10L发酵罐中。121℃高压灭菌10min。冷却至室温后,将实施例1b中获得的瑞士乳杆菌种子液按5% (v/v) 接种量接至10L发酵罐中。发酵温度40℃,通入CO<sub>2</sub>,搅拌速度控

制在150rpm,发酵时pH控制在5.2,发酵时间6h。此时得到的活菌发酵液中活菌数为 $4.90 \times 10^9$ cfu/mL。用氨水将发酵液pH调整至6.8,室温4000rpm离心15min后,收集菌泥,将菌泥含水量调整至80%。菌泥与配制好的冻干保护剂(脱脂乳60g/L,蔗糖、乳糖或海藻糖85g/L,甘油20g/L,甘露醇0.2g/L,氯化钙0.5g/L,谷胱甘肽0.1g/L,用20%氢氧化钾将冻干保护剂的pH调整至6.5)1:3比例混合,搅拌20min。冻干后得到冻干菌粉,其活菌数可达 $3.22 \times 10^{11}$ CFU/g。与实施例1的区别在于,该实施例中菌泥与冻干保护剂的混合比例为1:3,这时得到的冻干菌粉活力还是很高的。但是菌泥与冻干保护剂的混合比例要保持在一个合适的范围内,冻干保护剂过高的话,一是会起到稀释的作用,再一个可能会导致细胞的通透性下降,最后使菌粉的活力较低。

[0080] 对比例1(与实施例1的区别在于,培养基中未添加浓缩番茄汁。)

[0081] 将乳清粉204g,乳清浓缩蛋白28g,大豆胨144g,酵母粉60g,硫酸锰1.68g,硫酸镁3.48g,磷酸氢二钾18g和柠檬酸钠48g溶于5L温纯水中,剪切20~30min后定容至6L,倒入10L发酵罐中。121℃高压灭菌10min。冷却至室温后,将实施例1b中获得的瑞士乳杆菌种子液按5%(v/v)接种量接至10L发酵罐中。发酵温度40℃,通入CO<sub>2</sub>,搅拌速度控制在150rpm,发酵时pH控制在5.2,发酵时间6h。此时得到的活菌发酵液中活菌数为 $1.50 \times 10^9$ cfu/mL。

[0082] 对比例2(与实施例1的区别在于,发酵过程中未控制pH。)

[0083] 将乳清粉204g,乳清浓缩蛋白28g,大豆胨144g,浓缩番茄汁68g,酵母粉60g,硫酸锰1.68g,硫酸镁3.48g,磷酸氢二钾18g和柠檬酸钠48g溶于5L温纯水中,剪切20~30min后定容至6L,倒入10L发酵罐中。121℃高压灭菌10min。冷却至室温后,将实施例1b中获得的瑞士乳杆菌种子液按5%(v/v)接种量接至10L发酵罐中。发酵温度40℃,通入CO<sub>2</sub>,搅拌速度控制在150rpm,整个发酵过程不控制pH,发酵时间6h。此时得到的活菌发酵液中活菌数为 $1.14 \times 10^9$ cfu/mL。

[0084] 对比例3(与实施例1的区别在于,冻干保护剂未调节pH,实际pH4.80左右。)将乳清粉204g,乳清浓缩蛋白28g,大豆胨144g,浓缩番茄汁68g,酵母粉60g,硫酸锰1.68g,硫酸镁3.48g,磷酸氢二钾18g和柠檬酸钠48g溶于5L温纯水中,剪切20~30min后定容至6L,倒入10L发酵罐中。121℃高压灭菌10min。冷却至室温后,将实施例1b中获得的瑞士乳杆菌种子液按5%(v/v)接种量接至10L发酵罐中。发酵温度40℃,通入CO<sub>2</sub>,搅拌速度控制在150rpm,发酵时pH控制在5.2,发酵时间6h。此时得到的活菌发酵液中活菌数为 $5.00 \times 10^9$ cfu/mL。用氨水将发酵液pH调整至6.8,室温4000rpm离心15min后,收集菌泥,将菌泥含水量调整至80%。菌泥与配制好的冻干保护剂(脱脂乳60g/L,蔗糖、乳糖或海藻糖85g/L,甘油20g/L,甘露醇0.2g/L,氯化钙0.5g/L,谷胱甘肽0.36g/L)1:1比例混合,搅拌20min。冻干后得到冻干菌粉,其活菌数可达 $9.80 \times 10^{10}$ CFU/g。

[0085] 对比例4(与实施例1的区别在于,使用了另外一种冻干保护剂配方。)

[0086] 将乳清粉204g,乳清浓缩蛋白28g,大豆胨144g,浓缩番茄汁68g,酵母粉60g,硫酸锰1.68g,硫酸镁3.48g,磷酸氢二钾18g和柠檬酸钠48g溶于5L温纯水中,剪切20~30min后定容至6L,倒入10L发酵罐中。121℃高压灭菌10min。冷却至室温后,将实施例1b中获得的瑞士乳杆菌种子液按5%(v/v)接种量接至10L发酵罐中。发酵温度40℃,通入CO<sub>2</sub>,搅拌速度控制在150rpm,发酵时pH控制在5.2,发酵时间6h。此时得到的活菌发酵液中活菌数为 $4.50 \times 10^9$ cfu/mL。用氨水将发酵液pH调整至6.8,室温4000rpm离心15min后,收集菌泥,将菌泥含

水量调整至80%。菌泥与配制好的冻干保护剂(脱脂乳92g/L,海藻糖100g/L,甘油50g/L,用20%氢氧化钾将冻干保护剂的pH调整至6.5)1:1比例混合,搅拌20min。冻干后得到冻干菌粉,其活菌数可达 $3.50 \times 10^{11}$ CFU/g。

[0087] 表1各项目与制备高活力瑞士乳杆菌冻干菌粉的工艺相关性能评价指标

项目	活菌发酵液活菌数	冻干菌粉的活菌数	4度保存6个月后冻干菌粉的活菌数
实施例1	$5.50 \times 10^9$ cfu/mL	$4.00 \times 10^{11}$ CFU/g	$3.94 \times 10^{11}$ CFU/g
实施例2	$4.65 \times 10^9$ cfu/mL	$3.95 \times 10^{11}$ CFU/g	$3.18 \times 10^{11}$ CFU/g
实施例3	$4.90 \times 10^9$ cfu/mL	$3.22 \times 10^{11}$ CFU/g	$2.99 \times 10^{11}$ CFU/g
实施例4	$4.50 \times 10^9$ cfu/mL	$3.50 \times 10^{11}$ CFU/g	$3.14 \times 10^{11}$ CFU/g
对比例1	$1.50 \times 10^9$ cfu/mL	$5.66 \times 10^{10}$ CFU/g	$2.30 \times 10^{10}$ CFU/g
对比例2	$1.14 \times 10^9$ cfu/mL	$4.96 \times 10^{10}$ CFU/g	$3.35 \times 10^{10}$ CFU/g
对比例3	$5.00 \times 10^9$ cfu/mL	$9.80 \times 10^{10}$ CFU/g	$6.48 \times 10^{10}$ CFU/g
对比例4	$4.91 \times 10^9$ cfu/mL	$1.13 \times 10^{11}$ CFU/g	$9.66 \times 10^{10}$ CFU/g

[0089] 结论:由实施例1-4可以看出,本发明能够制备得到高活力瑞士乳杆菌菌粉,采用冻干保护剂大大提高了菌体的存活率,制备得到活力高、菌体活力维持性好的菌粉,保藏期较长,存活率不易降低,另外,高活力瑞士乳杆菌冻干菌粉发酵性能优良,可作为发酵剂直接应用。

[0090] 对比例1与实施例1的区别在于,该对比例的培养基中未添加浓缩番茄汁,导致得到的发酵液活菌数显著低于最优配方。分析原因为:本发明的高密度培养乳酸菌培养基添加的浓缩番茄汁中含有大量的乳酸菌所需的多种培养因子,以及浓缩番茄汁中所含的有机弱酸与培养基中的磷酸氢二钾所组成的缓冲体系有利于菌体生长。

[0091] 对比例2与实施例1的区别在于,该对比例在发酵过程中未控制pH,导致得到的发酵液活菌数显著低于最优配方。分析原因为:乳酸菌发酵过程中培养液的pH值是在一定环境条件下代谢活动的综合指标,是一项重要的发酵参数。培养开始时发酵液pH的影响不是很大,随着发酵过程的进行,瑞士乳杆菌在生长过程中产生乳酸,乳酸的不断积累使胞内外的pH下降,进而抑制瑞士乳杆菌的生长。

[0092] 对比例3与实施例1的区别在于,该对比例冻干保护剂未调节pH,实际pH4.80左右,导致得到的冻干菌粉的活菌数显著低于最优配方。分析原因为:较低的pH不利于菌体的冷冻干燥,具体影响可能还需展开更多的实验进行研究。

[0093] 对比例4与实施例1的区别在于,该对比例使用了另外一种冻干保护剂配方,导致得到的冻干菌粉的活菌数显著低于最优配方。分析原因为:实施例1的冻干保护剂中的各成分呈现了协同作用,减小冻干过程对菌体活力的损伤,对菌体起到了更好的保护效果,得到更高活力菌粉。

[0094] 由上述实施例1~4及对比例1~4相关的数据可知,只有在本发明权利要求范围内的方案,才能够在各方面均能满足上述要求,得出最优化的方案,得到最优的活性的瑞士乳杆菌冻干菌粉。而对于配比的改动、原料的替换/加减,或者加料顺序的改变,均会带来相应的负面影响。

[0095] 本发明中所用原料、设备,若无特别说明,均为本领域的常用原料、设备;本发明中所用方法,若无特别说明,均为本领域的常规方法。

[0096] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明作任何限制,凡是根据本发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效变换,均仍属于本发明技术方案的保护范围。

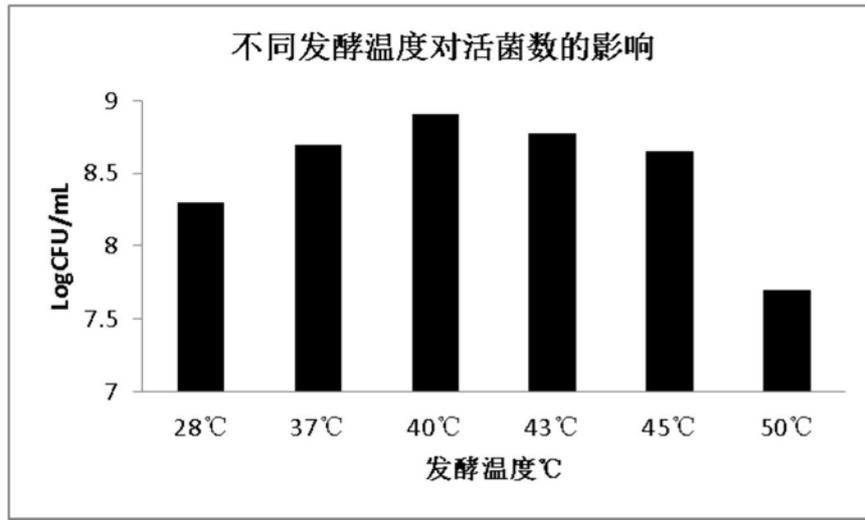


图1

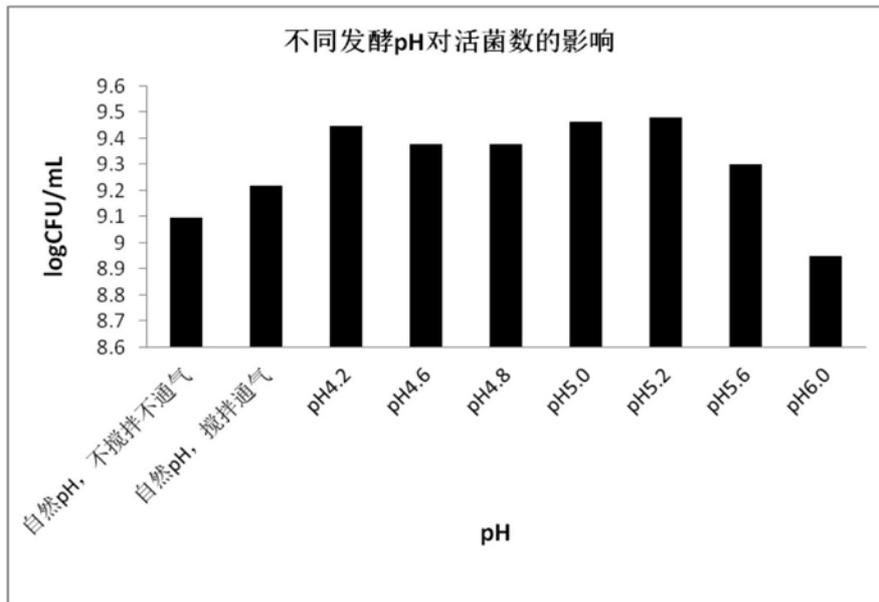


图2

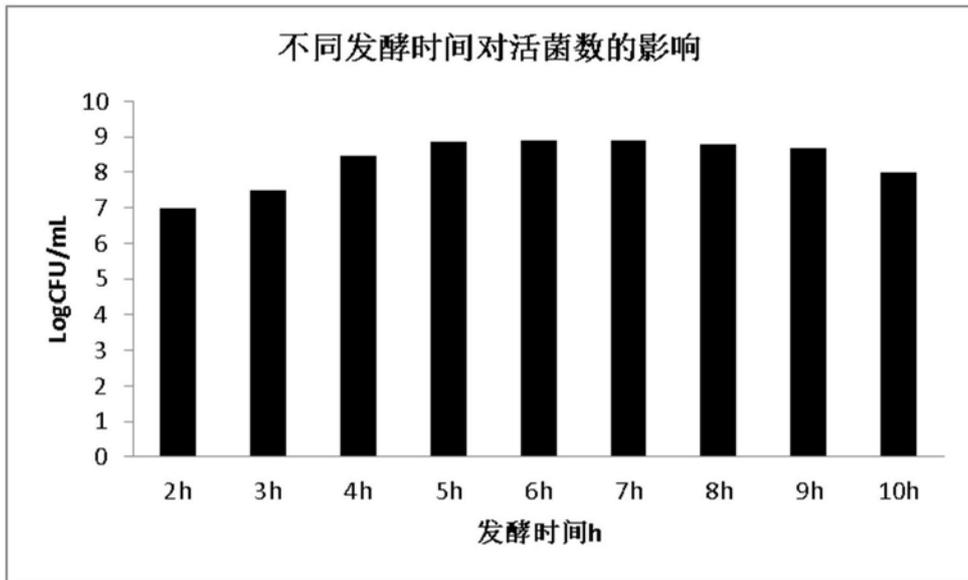


图3

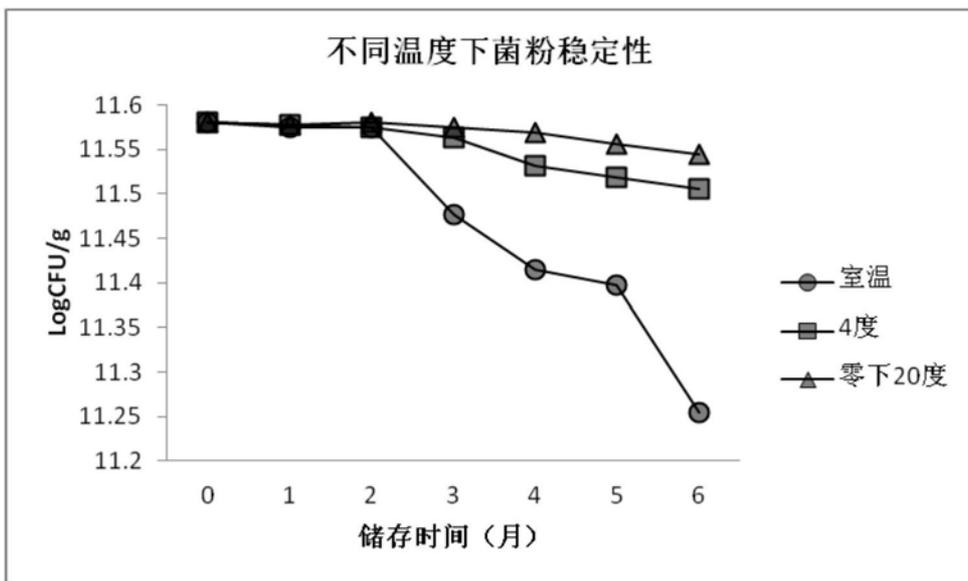


图4

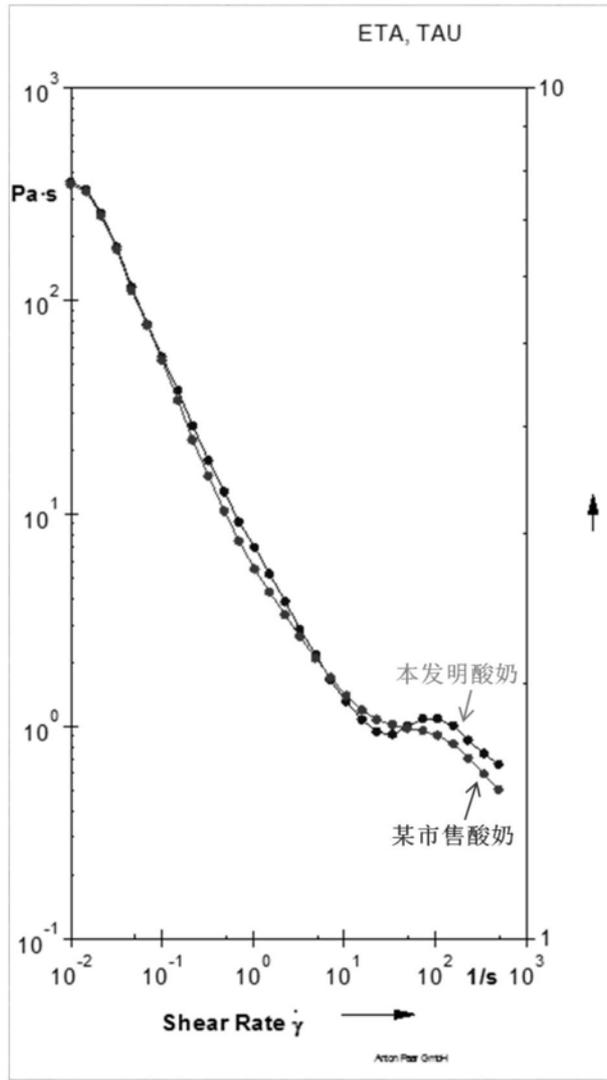


图5