

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

C12N 1/20 (2006.01)

A23C 9/12 (2006.01)

A23C 17/02 (2006.01)

A23C 19/00 (2006.01)

专利号 ZL 200410018684.4

[45] 授权公告日 2006年6月14日

[11] 授权公告号 CN 1259413C

[22] 申请日 2004.2.26

[21] 申请号 200410018684.4

[71] 专利权人 天津科技大学

地址 300222 天津市河西区大沽南路 1038

号

[72] 发明人 肖冬光 汪建明

审查员 葛永奇

[74] 专利代理机构 天津佳盟知识产权代理有限公司

代理人 侯力

权利要求书 2 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

益生乳酸菌发酵剂的制备方法及其在新鲜干酪中的应用

[57] 摘要

益生乳酸菌发酵剂的制备方法及其在新鲜干酪中的应用。本发明发酵剂的制备方法包括：培养基的配制、菌种培养、浓缩、添加保护剂及干燥等步骤完成。其应用是以脱脂乳、乳清、乳糖、生理盐水中的一种或多种为活化液，将干燥的固态发酵剂用活化液按进行活化，然后添加到以无抗鲜乳或复原乳为原料的酸奶、干酪等发酵乳制品的常规生产中，制得含有益生菌的发酵乳制品。本发明改变了目前常规酸奶发酵剂菌种单一、且不含益生菌的状况；并且将益生乳酸菌制成了高活性的固态制剂，减少了发酵乳制品生产过程中的发酵剂扩培工序，节省了资金、厂房、设备和人员的投入，并且使生产操作更易于控制和管理，产品的质量更加稳定。

1、一种益生乳酸菌发酵剂的制备方法，其特征是通过以下步骤实现的：

——a 培养基的配制：该培养基以去离子水为溶剂，按重量体积比 g/L 依次加入下列成分：蛋白胨 8~10、酵母膏 3~5、牛肉膏 1~3、葡萄糖 4~6、乙酸钠 2~6、吐温 80 1~2、硫酸铁 1~3、硫酸锰 1~2、柠檬酸三胺 1~2；

——b 菌种培养：将干酪乳杆菌，按接种量 2~5% 加入上述培养基中，培养温度为 30~37℃，培养过程中按重量体积比流加碳源 3-7g/L 和/或氮源 3-5 g/L，控制培养基的 pH 值为 5.0~6.5，培养时间 5~10 小时，至菌数达到 10^{9-10} /mL，得到干酪乳杆菌的高浓度培养物；

——c 浓缩：将上述高浓度培养物经转速 3000~5000rpm 离心浓缩 10~25min，得到活性干酪乳杆菌的浓缩物；

——d 添加保护剂：向上述干酪乳杆菌的浓缩物中加入保护剂，保护剂的用量为 b 步中离心前高浓度培养液体积的 10~20%，制成菌悬液；

——e 干燥：将添加保护剂的菌悬液干燥，得到固态发酵剂。

2、根据权利要求 1 所述的益生乳酸菌发酵剂的制备方法，其特征是培养基配制中，按重量体积比 g/L 加入以下物质：七水硫酸镁 1~3，磷酸氢二钾 1~3，柠檬酸钠 2~5，四水硫酸锰 2~4。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的益生乳酸菌发酵剂的制备方法，其特征是：

——所述的流加碳源为葡萄糖、乳糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖中的一种；

——所述的流加氮源为乳清、脱脂乳、酪蛋白、大豆蛋白、氨基酸中的一种。

4、根据权利要求 3 所述的益生乳酸菌发酵剂的制备方法，其特征是：

——按重量体积比流加胡萝卜汁和/或番茄汁各 10~20g/L，以促进菌体的生长。

5、根据权利要求 1 或 2 所述的益生乳酸菌发酵剂的制备方法，其特征是所述的保护剂为蔗糖、果胶、脱脂乳、乳清、血清白蛋白、海藻糖、甘油、维生素中的一

种或多种。

6、根据权利要求1或2所述的益生乳酸菌发酵剂的制备方法，其特征是所述的干燥步骤是冷冻干燥：

——将添加保护剂的菌悬液置于-60~30℃冰箱中，冷冻2.5~4小时后，取出放入冷冻干燥机中，调冷阱温度-50~40℃，经5℃/30min缓慢升温，3.5~6小时后取出菌粉，得到固态发酵剂。

7、根据权利要求1或2所述的益生乳酸菌发酵剂的制备方法，其特征是所述的干燥步骤是喷雾干燥：

——将添加保护剂的菌悬液送入喷雾干燥器中，进口温度50~60℃，出口温度150~160℃，流速0.1~0.3mL/s，取出菌粉，得到固态发酵剂。

益生乳酸菌发酵剂的制备方法及其在新鲜干酪中的应用

【技术领域】：本发明涉及一种微生物制剂，特别是固态高活性益生乳酸菌发酵剂的制备，和相应的新鲜干酪制品，以及在加工含有干酪乳杆菌活菌的新鲜干酪制品中的应用。

【背景技术】：乳品是最接近完善的食品，几乎含有生物活动所需的全部营养成分，是构成平衡膳食的重要成分。发酵乳是指在液体乳中加入发酵剂，通过微生物的发酵作用，将乳糖转化为乳酸，降低了乳制品的 pH 值和酸度，这不仅赋予了乳制品特殊的口感和质地，还减少或避免了食用者产生乳糖不耐反应的可能。新鲜干酪是发酵乳的一种，是经乳酸发酵而未经成熟的一类干酪产品。在发酵过程中，由于微生物的作用，乳中的蛋白质逐步被分解为肽、胨、氨基酸等，这些物质很容易被人体吸收，使发酵乳中的蛋白质消化率高达 96%~98%；大量的必需氨基酸和生物活性物质对促进机体的健康产生了积极的作用。

乳酸菌发酵剂的不同不但影响着发酵乳制品生产中的过程参数，还直接影响着终产品的口味、质量和营养价值。常规的酸奶发酵剂菌种为保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌，它们在乳制品中可以完成发酵产酸的作用，但它们相对于肠道中的正常菌群而言，是外来物质，不能在肠道中定殖。此外，就常规乳酸菌发酵剂的使用方式而言，多为液态菌种的多次传代，需要占用一定的资金、设备和人员，且传代过程中容易污染和退化，造成产品品质的不稳定。中国专利 CN1105521A 公布了一种干酸奶粉的制备方法，该方法生产的干酸奶粉可用做常规乳酸菌的发酵剂，可是由于采用的菌种和加工工艺的不同，其中仅含有常规的酸奶菌种，且菌活力为 10^7 /克。

就益生菌而言，人们对双歧杆菌在发酵乳中的应用有过研究，如中国专利 CN1240586A 公布了一种高含双歧杆菌的酸奶制备方法。该专利的不足在于作为发酵剂的菌种双歧杆菌虽然是人体肠道中的有益菌，但它本身厌氧等生理特性导致终产品中的益生菌数仅为 10^6 /克，很难保证其在发酵乳制品和人体消化道中保持较高的生物活性。

【发明内容】：本发明目的就是解决常规的酸奶发酵剂菌种不能在肠道中定殖，其使用需多次传代，占用一定的资金、设备和人员，且传代过程中容易污染和退化，造成产品品质的不稳定等问题，提供一种益生乳酸菌发酵剂的制备方法及其在新鲜干酪中的应用。

本发明提供的益生乳酸菌发酵剂的制备方法，是通过以下步骤实现的：

——a 培养基的配制：该培养基以去离子水为溶剂，按重量体积比 g/L 依次加入下列成分：蛋白胨 8~10、酵母膏 3~5、牛肉膏 1~3、葡萄糖 4~6、乙酸钠 2~6、吐温 80 1~2、硫酸铁 1~3、硫酸锰 1~2、柠檬酸三胺 1~2；

上述培养基配置中，还可按重量体积比 g/L 加入以下物质：七水硫酸镁 1~3，磷酸氢二钾 1~3，柠檬酸钠 2~5，四水硫酸锰 2~4。

——b 菌种培养：将干酪乳杆菌，按接种量 2~5% 加入上述培养基中，培养温度为 30~37℃，培养过程中按重量体积比流加碳源 3-7g/L 和/或氮源 3-5 g/L，控制培养基的 pH 值为 5.0~6.5，培养时间 5~10 小时，至菌数达到 10^{9-10} /mL，得到干酪乳杆菌的高浓度培养物；

所述的流加碳源为葡萄糖、乳糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖中的一种；

所述的流加氮源为乳清、脱脂乳、酪蛋白、大豆蛋白、氨基酸中的一种；

还可以按重量体积比流加胡萝卜汁和/或番茄汁各 10~20g/L，以促进菌体的生长。

——c 浓缩：将上述高浓度培养物经转速 3000~5000rpm 离心浓缩 10~25min，得到活性干酪乳杆菌的浓缩物；

——d 添加保护剂：向上述干酪乳杆菌的浓缩物中加入保护剂，保护剂的用量为 b 步中离心前高浓度培养液体积的 10~20%，制成菌悬液；

所述的保护剂为蔗糖、果胶、脱脂乳、乳清、血清白蛋白、海藻糖、甘油、维生素中的一种或多种。

——e 干燥：将添加保护剂的菌悬液干燥，得到固态发酵剂。

所述的干燥步骤可以是冷冻干燥：——将添加保护剂的菌悬液置于-60~30℃冰箱中，冷冻 2.5~4 小时后，取出放入冷冻干燥机中，调冷阱温度-50~40℃，经 5℃/30min 缓慢升温，3.5~6 小时后取出菌粉，得到固态发酵剂。

也可以是喷雾干燥：——将添加保护剂的菌悬液送入喷雾干燥器中，进口温度 50~60℃，出口温度 150~160℃，流速 0.1~0.3mL/s，取出菌粉，得到固态发酵剂。

一种益生乳酸菌发酵剂在新鲜干酪中的应用，其特征是以脱脂乳、乳清、乳糖、生理盐水中的一种或多种为活化液，将干燥的固态发酵剂用活化液按进行活化，活化液用量为每克干剂 150~400mL，活化后作为乳酸菌发酵剂，添加到以无抗鲜乳或复原乳为原料的酸奶、干酪等发酵乳制品的常规生产中，制得含有益生菌的发酵乳制品。

上述乳酸菌发酵剂中还可以加入与干酪乳杆菌发酵剂体积比为 2: 1~4 的保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、丁二酮链球菌中的一种或多种乳酸菌，和干酪乳杆菌一起作为乳酸菌发酵剂，发酵剂的添加总量占原料乳的 1%~5%，应用到以无抗鲜乳或复原乳为原料的酸奶、干酪等发酵乳制品的常规生产中，制得含有益生菌的发酵乳制品。

本发明的优点及效果：本发明由于采用了人体肠道中固有的益生菌——干酪乳杆菌作为发酵剂的出发菌株，改变了目前常规酸奶发酵剂菌种单一、且不含益生菌的状况；并且将益生乳酸菌制成了高活性

的固态制剂，减少了发酵乳制品生产过程中的发酵剂扩培工序，节省了资金、厂房、设备和人员的投入，并且使生产操作更易于控制和管理，产品的质量更加稳定。目前的固态酸奶发酵剂只是含有常规的酸奶发酵菌种，而用本发明的益生菌制成的固态乳酸菌发酵剂将使用的方便性和产品的保健性完美结合，用该发酵剂生产的发酵乳制品，更有利于调节机体的免疫力、促进机体的健康，在营养价值和保健功能方面远远高于常规酸奶发酵剂。由于在新鲜干酪的生产过程中采用的固态高活性益生乳酸菌剂，大大减少了发酵过程中对菌种的管理和操作，提高了生产效率和产品的营养价值。

【具体实施方式】：

实施例 1：

益生乳酸菌发酵剂的制备方法，该方法是通过以下步骤实现的：

——改良 MRS (de Man, Rogosa, Sharpe Agar) 培养基的配制：以去离子水为溶剂，按重量体积比 g/L 依次加入下列成分：蛋白胨 8、酵母膏 4、牛肉膏 2、葡萄糖 6、乙酸钠 6、吐温 80 1、硫酸铁 1、硫酸锰 2、柠檬酸三胺 2。

——接入干酪乳杆菌：接种量 5%，培养温度 30℃，在培养过程中添加乳清 5g/L，控制培养液的 pH 值范围为 5.5~6.0，培养时间 5~10 小时，使菌数达到 10^{9-10} /mL，得到干酪乳杆菌的高浓度培养物。

——将高浓度培养液离心浓缩（转速 4000rpm 离心 20min）。弃去上清液。

——用 2.0%甘油+12%脱脂乳配成的水溶液作为保护剂，用量相当于离心前高浓度培养液体积的 1/5（20%），与菌体沉淀物均匀混合制作成悬浮液。

——将添加保护剂的菌悬液置于-40℃冰箱中冷冻 3.5 小时后，取出放入冷冻干燥机中，调冷阱温度-45℃，缓慢升温（5℃/30min），5~5.5 小时后取出菌粉，活菌数可达到 700~1200 亿/克。该固态高活性益生乳酸菌菌粉可作为乳酸菌发酵剂用于乳制品的生产中，还可以作为免疫活性物质应用到饲料和保健食品中。

实施例 2:

改良 MRS 培养基的配方(g/L)为：蛋白胨 10、酵母膏 3、牛肉膏 1、葡萄糖 4、乙酸钠 2、吐温 80 1、硫酸铁 2、硫酸锰 1、柠檬酸三胺 2。接入干酪乳杆菌，接种量 2%，培养温度 35℃，在培养过程中添加乳糖 7g/L，控制培养液的 pH 值范围为 5.0~5.5，培养时间 5~10 小时。将高浓度培养液离心浓缩（转速 5000rpm 离心 10min）。弃去上清液。其它参数同实施例 1。

实施例 3:

在上述实施例 1、2 中的改良 MRS 培养基中接入干酪乳杆菌，接种量 3%，流加补料（补料为乳清或乳糖，用量同实施例 1 或 2），并控制培养基酸度得到高浓度培养液，离心，用 10%蔗糖-乳清溶液混合物作为保护剂，用量为离心前高浓度培养液体积的 1/7（14%），将保护剂与菌体沉淀物均匀混合制作成悬浮液。将添加保护剂的菌悬液置于-60℃冰箱中冷冻 2.5 小时后，取出放入冷冻干燥机中，调冷阱温度-50℃，缓慢升温（5℃/30min），5.5~6 小时后取出菌粉。其它参数同实施例 1 或 2。

实施例 4:

采用初始培养基，调节菌体的生长温度为 37℃，流加补料（同实施例 3），并控制培养基酸度得到高浓度培养液，离心，培养加入保护剂，进行喷雾干燥，进口温度 50~60℃，出口温度 150~160℃，流速 0.1mL/s，菌粉中的活菌数为 200~600 亿/克。其它参数同实施例 1、2 或 3。

实施例 5:

将实施例 1、2、3 或 4 中的菌粉用 4%的乳清活化，活化剂的用量 300mL/克干剂，活菌数达到 10~20 亿/毫升，作为乳酸菌工作发酵剂。以无抗新鲜脱脂牛乳为原料制作以干酪乳杆菌为乳酸发酵剂的保健型新鲜干酪。原料乳经巴氏杀菌 75℃/15s，添加 0.015%的氯化钙，接入活化后的干酪乳杆菌发酵剂 1~2%，31℃培养 30 分钟后，加入凝乳酶，当凝乳 pH 在 4.40~4.85 的范围内进行切割，静置 15~20 分钟后开始搅拌和二次加热，温度逐渐从 31℃~32℃提高到 50℃~55℃；排出乳清，加冷水洗涤凝乳粒，使凝乳粒的温度降至 8℃~10℃，洗涤重复三次。在滤出凝乳粒的水分后，添加 2%~4%的食盐，装入容器，密封，4℃冷藏，得到含有益生菌的保健型新鲜干酪。