



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110734884 A

(43)申请公布日 2020.01.31

(21)申请号 201911181325.3

(22)申请日 2019.11.27

(71)申请人 汉臣氏(沈阳)儿童制品有限公司
地址 110326 辽宁省沈阳市胡台新城振兴
八街35号

(72)发明人 余萍 闵祥博 张春宇 矫艳平

(74)专利代理机构 沈阳杰克知识产权代理有限
公司 21207

代理人 金春华

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12N 1/38(2006.01)

C12R 1/225(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

副干酪乳杆菌低盐培养基及培养方法

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及副干酪乳杆菌的低盐培养基及培养方法。副干酪乳杆菌低盐培养基,包括无盐基础培养基和低盐优化培养基;所述的无盐基础培养基的配方为:葡萄糖、酵母浸出物、酵母蛋白胨、柠檬酸、L-苹果酸、余量为纯化水。所述的低盐优化培养基的配方为:酵母浸出物、葡萄糖、酵母蛋白胨、乳糖、低聚异麦芽糖、柠檬酸、L-苹果酸、氯化钙、余量为纯化水。本发明中无机盐组分大幅降低,在既能够保证较高的活菌数和发酵收率的同时,又能够使副干酪乳杆菌的发酵终产物盐度极低,这不仅使副干酪乳杆菌作为食品添加剂可直接应用于发酵及益生菌粉等功能性食品、饲料和药品,还降低了排出的废液中的无机盐的含量,提高生物系统的净化效果。

1. 副干酪乳杆菌低盐培养基,其特征在於,包括无盐基础培养基和低盐优化培养基:

所述的无盐基础培养基的配方为:葡萄糖25.0~35.0g/L、酵母浸出物20.0~25.0g/L、酵母蛋白胨10.0~15.0g/L、柠檬酸2.0~6.0g/L、L-苹果酸2.0~6.0g/L、余量为纯化水;pH值6.70~6.90;

所述的低盐优化培养基的配方为:酵母浸出物30.0~35.0g/L、葡萄糖15.0~20.0g/L、酵母蛋白胨15.0~20.0g/L、乳糖10.0~15.0g/L、低聚异麦芽糖4.0~6.0g/L、柠檬酸4.0~6.0g/L、L-苹果酸4.0~6.0g/L、氯化钙0.4~0.6g/L、余量为纯化水;pH值6.70~6.90。

2. 根据权利要求1所述的副干酪乳杆菌低盐培养基,其特征在於,

所述的无盐基础培养基的配方为:葡萄糖25.0g/L、酵母浸出物20.0g/L、酵母蛋白胨15.0g/L、柠檬酸6.0g/L、L-苹果酸6.0g/L、余量为纯化水;pH值6.80;

所述的低盐优化培养基的配方为:酵母浸出物30.0g/L、葡萄糖20.0g/L、酵母蛋白胨15.0g/L、乳糖10.0g/L、低聚异麦芽糖6.0g/L、柠檬酸5.0g/L、L-苹果酸5.0g/L、氯化钙0.5g/L、余量为纯化水;pH值至6.80。

3. 根据权利要求1或2所述的副干酪乳杆菌低盐培养基,其特征在於,

所述的无盐基础培养基和低盐优化培养基制备方法如下:按照配方比例称量、加热溶解,用1mol/L食品级NaOH溶液调培养基pH值至6.70~6.90,115℃下灭菌30min。

4. 权利要求1-3所述的任一种副干酪乳杆菌低盐培养基的培养方法,其特征在於,包括如下步骤:

1) 冻存菌种复苏:取存于低温冰箱内的副干酪乳杆菌菌种冻存管,立即放入37℃水浴锅内进行菌种复苏,15~30s,至冻存管内的固体全部融化;

2) 菌种活化:将复苏好的菌种直接接种至装有10mL无盐基础培养基的三角瓶中,三角瓶密封,35℃培养箱恒温静置培养,培养16-20h;

3) 菌种扩培:将菌种活化结束的菌悬液接种至装有100mL无盐基础培养基的三角瓶中,三角瓶密封,35℃培养箱恒温静置培养,培养16-20h;

4) 一级发酵:将菌种扩培结束的菌悬液接种至装有10L低盐优化培养基的20L发酵罐中,开启搅拌桨,转速为100rpm,通气量为0,35℃恒温培养,发酵开始时,设定自动流加食品级NaOH以调控菌液pH值,发酵进行9.5h开始,每0.5h监控菌液OD值,当培养时间 \geq 11h或OD值 $>$ 9.00,每15min监控菌液OD值;当接连两次OD值增加值 $<$ 0.30,发酵结束;

5) 二级发酵:将一级发酵结束的菌悬液接种至装有140L低盐优化培养基的200L发酵罐中,开启搅拌桨,转速为60rpm,通气量为0,35℃恒温培养,在发酵开始时,通过流加食品级NaOH溶液以调控菌液pH值,发酵进行7h开始,每0.5h监控菌液OD值,当培养时间 \geq 8h或OD值 $>$ 9.00,每15min监控菌液OD值;当接连两次OD值增加值 $<$ 0.20,发酵结束,对发酵罐进行降温调控;

6) 发酵液离心:离心设备采用管式离心机,离心前对转鼓进行蒸汽灭菌30min,转速为12000~14000rpm,结束进料后,空转5min;

7) 离心结束后,收集菌泥。

5. 根据权利要求4所述的培养方法,其特征在於,步骤3)中,所述的接种量为3~7%。

6. 根据权利要求4所述的培养方法,其特征在於,步骤4)中,所述的接种量为3~7%。

7. 根据权利要求4所述的培养方法,其特征在於,步骤5)中,所述的接种量为3~7%。

8. 根据权利要求4所述的培养方法,其特征在于,步骤4)、步骤5)中,在恒温培养发酵开始时,通过流加食品级NaOH溶液以调控菌液pH值为5.4~5.6。

副干酪乳杆菌低盐培养基及培养方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及副干酪乳杆菌的低盐培养基及培养方法。

背景技术

[0002] 副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) 属于乳杆菌属,具有良好的生理功能,它不仅可以通过控制肠道内微生物菌落影响人体的消化系统、调节人体肠道菌群、增强免疫力,而且还具有良好的耐酸耐胆盐特性,在代谢过程中能够产生细菌素,抑制肠道中的有害菌。国家卫生部已于2010年将副干酪乳杆菌列入《可用于食品的菌种名单》。

[0003] 微生物生长繁殖的培养基大都含有碳源、氮源、促生长因子、无机盐类、水及其他能源。副干酪乳杆菌属于乳酸菌类,实验室大都使用MRS培养基进行培养发酵。但MRS培养基中包含了相对高的总盐含量,包括 Na^+ 、 Mg^+ 等,处理废液中含有较高含量的盐,废水的密度增加,活性污泥易上浮流失,从而严重影响生物处理系统的净化效果。本发明降低了副干酪乳杆菌培养基中的无机盐成分,仅在优化培养基中添加了氯化钙,不仅能够确保副干酪乳杆菌的活菌数和发酵产率,而且能够使副干酪乳杆菌的发酵终产物盐度降低,还可以降低废液中的盐的含量,提高生物系统的净化效果,利于环境保护。

发明内容

[0004] 为解决现有技术中副干酪乳杆菌培养基含盐高的问题,本发明提供了副干酪乳杆菌低盐培养基及培养方法,不仅能够获得活性高的副干酪乳杆菌,还有利于环境保护,从而实现大规模生产,有利于应用在乳制品、发酵蔬菜及冻干菌粉等领域。

[0005] 本发明采用的技术方案为:

[0006] 副干酪乳杆菌低盐培养基,包括无盐基础培养基和低盐优化培养基:

[0007] 所述的无盐基础培养基的配方为:葡萄糖25.0~35.0g/L、酵母浸出物20.0~25.0g/L、酵母蛋白胨10.0~15.0g/L、柠檬酸2.0~6.0g/L、L-苹果酸2.0~6.0g/L、余量为纯化水;pH值6.70~6.90;

[0008] 所述的低盐优化培养基的配方为:酵母浸出物30.0~35.0g/L、葡萄糖15.0~20.0g/L、酵母蛋白胨15.0~20.0g/L、乳糖10.0~15.0g/L、低聚异麦芽糖4.0~6.0g/L、柠檬酸4.0~6.0g/L、L-苹果酸4.0~6.0g/L、氯化钙0.4~0.6g/L、余量为纯化水;pH值6.70~6.90。

[0009] 优选地,上述的副干酪乳杆菌低盐培养基,

[0010] 所述的无盐基础培养基的配方为:葡萄糖25.0g/L、酵母浸出物20.0g/L、酵母蛋白胨15.0g/L、柠檬酸6.0g/L、L-苹果酸6.0g/L、余量为纯化水;pH值6.80;

[0011] 所述的低盐优化培养基的配方为:酵母浸出物30.0g/L、葡萄糖20.0g/L、酵母蛋白胨15.0g/L、乳糖10.0g/L、低聚异麦芽糖6.0g/L、柠檬酸5.0g/L、L-苹果酸5.0g/L、氯化钙0.5g/L、余量为纯化水;pH值至6.80。

[0012] 优选地,上述的副干酪乳杆菌低盐培养基,

[0013] 所述的无盐基础培养基和低盐优化培养基制备方法如下:按照配方比例称量、加热溶解,用1mol/L食品级NaOH溶液调培养基pH值至6.70~6.90,115℃下灭菌30min。

[0014] 上述的任一种副干酪乳杆菌低盐培养基的培养方法,包括如下步骤:

[0015] 1) 冻存菌种复苏:取存于低温冰箱内的副干酪乳杆菌菌种冻存管,立即放入37℃水浴锅内进行菌种复苏,15~30s,至冻存管内的固体全部融化;

[0016] 2) 菌种活化:将复苏好的菌种直接接种至装有10mL无盐基础培养基的三角瓶中,三角瓶密封,35℃培养箱恒温静置培养,培养16-20h;

[0017] 3) 菌种扩培:将菌种活化结束的菌悬液接种至装有100mL无盐基础培养基的三角瓶中,三角瓶密封,35℃培养箱恒温静置培养,培养16-20h;

[0018] 4) 一级发酵:将菌种扩培结束的菌悬液接种至装有10L低盐优化培养基的20L发酵罐中,开启搅拌桨,转速为100rpm,通气量为0,35℃恒温培养,发酵开始时,设定自动流加食品级NaOH以调控菌液pH值,发酵进行9.5h开始,每0.5h监控菌液OD值,当培养时间 \geq 11h或OD值 $>$ 9.00,每15min监控菌液OD值;当接连两次OD值增加值 $<$ 0.30,发酵结束;

[0019] 5) 二级发酵:将一级发酵结束的菌悬液接种至装有140L低盐优化培养基的200L发酵罐中,开启搅拌桨,转速为60rpm,通气量为0,35℃恒温培养,在发酵开始时,通过流加食品级NaOH溶液以调控菌液pH值,发酵进行7h开始,每0.5h监控菌液OD值,当培养时间 \geq 8h或OD值 $>$ 9.00,每15min监控菌液OD值;当接连两次OD值增加值 $<$ 0.20,发酵结束,对发酵罐进行降温调控;

[0020] 6) 发酵液离心:离心设备采用管式离心机,离心前对转鼓进行蒸汽灭菌30min,转速为12000~14000rpm,结束进料后,空转5min;

[0021] 7) 离心结束后,收集菌泥。

[0022] 优选地,上述的培养方法,步骤3)中,所述的接种量为3~7%。

[0023] 优选地,上述的培养方法,步骤4)中,所述的接种量为3~7%。

[0024] 优选地,上述的培养方法,步骤5)中,所述的接种量为3~7%。

[0025] 优选地,上述的培养方法,步骤4)、步骤5)中,在恒温培养发酵开始时,通过流加食品级NaOH溶液以调控菌液pH值为5.4~5.6。

[0026] 本发明与现有技术相比,具有以下有益效果:

[0027] 1、本发明针对副干酪乳杆菌纯化培养和菌种发酵分别采用了更适于菌体不同生长阶段的无盐基础培养基和低盐优化培养基,促进了副干酪乳杆菌的增殖培养。

[0028] 2、本发明中的无盐基础培养基和低盐优化培养基配方与现在普遍采用的MRS培养基相比,去掉了铵盐、钠盐、钾盐、镁盐和锰盐,无机盐组分大幅降低,在既能够保证较高的活菌数和发酵收率的同时,又能够使副干酪乳杆菌的发酵终产物盐度极低,这不仅使副干酪乳杆菌作为食品添加剂可直接应用于发酵及益生菌粉等功能性食品、饲料和药品,还降低了排出的废液中的无机盐的含量,提高生物系统的净化效果。

[0029] 3、本发明为实现副干酪乳杆菌的增殖培养、获得富集高活菌数的菌体,在低盐优化培养基中添加了促生长因子氯化钙,即培养基中唯一一种无机盐。它不仅能够促进副干酪乳杆菌的生长,缩短生长周期,提高活菌数,而且具有极易被处理成不溶或微溶盐而被去除掉的优点,所以对于废水处理不会造成困难。

[0030] 4、菌种纯化及发酵过程的培养基及中和剂采用的组分原料均为食品级,故菌株安

全性高,可应用于乳品发酵或冻干菌粉等应用。

[0031] 5、本发明技术制备副干酪乳杆菌菌泥具有高活菌数、高活力等优点,活菌数高达 10^9 cfu/mL以上。

具体实施方式

[0032] 实施例1副干酪乳杆菌培养基及培养方法

[0033] 1、副干酪乳杆菌培养基,包括无盐基础培养基及低盐优化培养基:

[0034] 副干酪乳杆菌无盐基础培养基配方及制备:葡萄糖25.0g/L、酵母浸出物20.0g/L、酵母蛋白胨15.0g/L、柠檬酸6.0g/L、L-苹果酸6.0g/L、余量为纯化水;按照配方比例称量、加热溶解,用1mol/L食品级NaOH溶液调培养基pH值至6.8,115℃下灭菌30min。

[0035] 副干酪乳杆菌低盐优化培养基配方及制备:酵母浸出物30.0g/L、葡萄糖20.0g/L、酵母蛋白胨15.0g/L、乳糖10.0g/L、低聚异麦芽糖6.0g/L、柠檬酸5.0g/L、L-苹果酸5.0g/L、氯化钙0.5g/L、余量为纯化水;按照配方比例称量、加热溶解,用1mol/L食品级NaOH溶液调培养基pH值至6.80,115℃下灭菌30min。

[0036] 2、副干酪乳杆菌的培养方法:

[0037] 1) 冻存菌种复苏:取存于低温冰箱内的副干酪乳杆菌菌种冻存管,立即放入37℃水浴锅内进行菌种复苏,15~30s,至冻存管内的固体全部融化;

[0038] 2) 菌种活化:将复苏好的菌种直接接种至装有10mL无盐基础培养基的三角瓶中,三角瓶密封,35℃培养箱恒温静置培养16-20h;

[0039] 3) 菌种扩培:按照7%接种量,将菌种活化结束的菌悬液接种至装有100mL无盐基础培养基的三角瓶中,三角瓶密封,35℃培养箱恒温静置培养16-20h;

[0040] 4) 一级发酵:按照7%接种量,将菌种扩培结束的菌悬液接种至装有10L低盐优化培养基的20L发酵罐中,开启搅拌桨,转速为100rpm,通气量为0,35℃恒温培养,发酵开始时,设定自动流加食品级NaOH以调控菌液pH值为5.4~5.6,发酵进行9.5h开始,每0.5h监控菌液OD值,当培养时间 ≥ 11 h或OD值 > 9.00 ,每15min监控菌液OD值;当接连两次OD值增加值 < 0.30 ,发酵结束;

[0041] 5) 二级发酵:按照7%接种量,将一级发酵结束的菌悬液接种至装有140L低盐优化培养基的200L发酵罐中,开启搅拌桨,转速为60rpm,通气量为0,35℃恒温培养,在发酵开始时,通过流加食品级NaOH溶液以调控菌液pH值为5.4~5.6,发酵进行7h开始,每0.5h监控菌液OD值,当培养时间 ≥ 8 h或OD值 > 9.00 ,每15min监控菌液OD值;当接连两次OD值增加值 < 0.20 ,发酵结束,对发酵罐进行降温调控;

[0042] 6) 发酵液离心:离心设备采用管式离心机,离心前对转鼓进行蒸汽灭菌30min,转速为13000rpm,结束进料后,空转5min;

[0043] 7) 离心结束后,收集菌泥。

[0044] 实施例2培养基方案筛选实验

[0045] 根据副干酪乳杆菌自身特性,本发明设计了如下特定原料和配比的培养基实验方案。其中酵母蛋白胨、酵母浸出物、葡萄糖、乳糖在培养基中作为基础营养物质提供碳源、氮源和其他生长因子满足细菌生长的需求;柠檬酸、L-苹果酸、乙酸钠、磷酸二氢钾、硫酸镁、氯化钙、低聚异麦芽糖等提供多种副干酪乳杆菌所需的生长因子,同时抑制除乳酸菌外其

他菌的生长。

[0046] 1、基础培养基筛选实验

[0047] 具体实验方案见表1。

[0048] 表1基础培养基筛选方案

方案名称	基础培养基方案
[0049] MRS 培	酵母蛋白胨 10g/L、酵母粉 5g/L、牛肉粉 10g/L、葡萄糖 20g/L、吐温 80 1.0mL/L、柠檬
培养基配方	酸铵 2g/L、碳酸钙 2g/L、乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、硫酸镁 0.5g/L、硫酸锰 0.5g/L
方案 1	酵母蛋白胨 15g/L、酵母浸出物 20g/L、葡萄糖 20g/L、乳糖 10g/L、柠檬酸 5g/L、L-苹果酸 3g/L
方案 2	酵母蛋白胨 15g/L、酵母浸出物 30g/L、葡萄糖 20g/L、乳糖 10g/L、柠檬酸 5g/L、L-苹果酸 3g/L
[0050] 方案 3	酵母蛋白胨 10g/L、酵母浸出物 5g/L、葡萄糖 20g/L、柠檬酸 5g/L
方案 4	酵母蛋白胨 10g/L、酵母浸出物 5g/L、葡萄糖 20g/L、柠檬酸 5g/L、乙酸钠 5g/L、磷酸二氢钾 2g/L、硫酸镁 0.5g/L
方案 5	酵母蛋白胨 25g/L、酵母浸出物 5g/L、葡萄糖 30g/L、柠檬酸 5g/L、L-苹果酸 3g/L
方案 6	酵母蛋白胨 15g/L、酵母浸出物 20g/L、葡萄糖 25g/L、柠檬酸 6g/L、L-苹果酸 6g/L

[0051] 实验步骤如下：

[0052] 1) 按照上述实验方案称取各原料，溶于余量的纯化水中，115℃灭菌30min，冷却至50℃以下，备用；

[0053] 2) 取存于低温冰箱内的副干酪乳杆菌菌种冻存管，立即放入37℃水浴锅内进行菌种复苏，15~30s，至冻存管内的固体全部融化，然后将复苏好的菌种按照10%接种量，直接接种至装有10mL基础培养基的三角瓶中，三角瓶密封，35℃培养箱恒温静置培养16±0.5h；

[0054] 3) 按照5%接种量，将第2)步操作后的菌悬液接种至装有100mL基础培养基的三角瓶中，三角瓶密封，35℃培养箱恒温静置培养16±0.5h，测定pH、OD值；菌悬液离心，收集菌泥，测定收率。

[0055] 优选基础培养基组份方案结果见表2。

[0056] 表2基础培养基筛选实验结果

实验方案	pH	OD值	收率/%
MRS	4.03	6.426	1.127
方案7	4.16	6.784	1.265
方案8	4.14	6.960	1.234
方案9	4.00	4.848	1.122
方案10	4.18	5.968	1.179
方案11	4.22	5.792	1.110
方案12	4.15	7.168	1.293

[0058] 根据表2实验结果，MRS培养基及方案7-12菌悬液pH值在4.00-4.22范围之内，相差

较小,而基础培养实验方案12的OD值和收率均最高,故确定方案12为优选基础培养基配方方案。

[0059] 2、优化培养基筛选实验

[0060] 按照实验方案称取各原料,溶于水中,115℃灭菌30min,冷却至50℃以下,备用。将复苏好的菌种按照15%接种量,直接接种装有10mL基础培养基的三角瓶中,三角瓶密封,35℃培养箱恒温静置培养16±0.5h;按照7%接种量,将上述菌悬液接种至装有100mL基础培养基的三角瓶中,三角瓶密封,35℃培养箱恒温静置培养16±0.5h;按照7%的接种量,将上述菌悬液接种至分别装有300mL各方案的优化培养基中,35℃摇瓶发酵11.5±0.5h;菌悬液离心,收集菌泥,测定收率和活菌数,优选基础培养基组份方案。

[0061] 其中,基础培养基组成及制备:葡萄糖25.0g/L、酵母浸出物20.0g/L、酵母蛋白胨15.0g/L、柠檬酸6.0g/L、L-苹果酸6.0g/L、余量为纯化水;按照配方比例称量、加热溶解,115℃下灭菌30min;

[0062] 2.1) 考察低聚异麦芽糖、乳糖和氯化钙在培养基中对菌株培养的影响。具体实验方案与结果见表3。

[0063] 表3优化培养基筛选实验方案与结果

方案名称	优化培养基方案	收率/%	活菌数 (cfu/mL)
MRS培养基配方	酵母蛋白胨 10g/L、酵母粉 5g/L、牛肉粉 10g/L、葡萄糖 20g/L、吐温 80 1.0mL/L、柠檬酸铵 2g/L、碳酸钙 2g/L、乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、硫酸镁 0.5g/L、硫酸锰 0.5g/L	1.06	1.7×10^9
方案 13	酵母蛋白胨 15g/L、酵母浸出物 30g/L、葡萄糖 20g/L、乳糖 10g/L、低聚异麦芽糖 5g/L、柠檬酸 5g/L、L-苹果酸 5g/L、氯化钙 0.5g/L	0.790	2.18×10^9
[0064] 方案 14	酵母蛋白胨 15g/L、酵母浸出物 30g/L、葡萄糖 20g/L、乳糖 10g/L、柠檬酸 5g/L、L-苹果酸 5g/L、氯化钙 0.5g/L	0.769	1.41×10^9
方案 15	酵母蛋白胨 15g/L、酵母浸出物 30g/L、葡萄糖 20g/L、乳糖 10g/L、柠檬酸 5g/L、L-苹果酸 5g/L	0.794	1.06×10^9
方案 16	酵母蛋白胨 15g/L、酵母浸出物 30g/L、葡萄糖 30g/L、低聚异麦芽糖 5g/L、柠檬酸 5g/L、L-苹果酸 5g/L、氯化钙 0.5g/L	0.757	2.05×10^9
方案 17	酵母蛋白胨 15g/L、酵母浸出物 30g/L、葡萄糖 30g/L、乳糖 10g/L、低聚异麦芽糖 5g/L、柠檬酸 5g/L、L-苹果酸 5g/L、	0.804	8.90×10^8
方案 18	酵母蛋白胨 20g/L、酵母浸出物 35g/L、葡萄糖 30g/L、柠檬酸 5g/L、L-苹果酸 10g/L	1.113	8.00×10^8
[0065] 方案 19	酵母蛋白胨 15g/L、酵母浸出物 30g/L、葡萄糖 20g/L、乳糖 10g/L、低聚异麦芽糖 5g/L、柠檬酸 5g/L、L-苹果酸 5g/L、牛肉粉 3g/L、吐温 80 0.6mL/L、氯化钙 0.5g/L	0.792	2.20×10^9

[0066] 通过表3实验方案,实验方案14~19分别与方案13对比考察在优化培养基中不添加低聚异麦芽糖、乳糖或氯化钙后的菌泥收率和活菌数,同时与MRS培养基进行对比。根据

实验结果,MRS配方的收率虽相对较高,但活菌数较低;不添加低聚异麦芽糖的方案14菌泥收率下降;不添加低聚异麦芽糖和氯化钙的方案15菌泥收率几乎没变,活菌数下降;不添加乳糖的方案16菌泥收率下降;不添加氯化钙的方案17菌泥收率相当,但活菌数下降显著;不添加低聚异麦芽糖、乳糖或氯化钙的方案18活菌数下降显著。方案19为方案13基础上添加了MRS培养基中除无机盐外的促生长因子牛肉粉和吐温80,但收率与活菌数相差不明显,考虑到节约成本,故暂选方案13为优化培养基配方。

[0067] 2.2) 促生长因子筛选实验

[0068] 在上述方案13的配方基础上,进行单因素实验,考察促生长因子低聚异麦芽糖、低聚果糖、大豆低聚糖、麦芽糖醇、棉子糖和低聚半乳糖对菌泥收率和活菌数的促进效果。具体实验方案与结果见表4与表5。

[0069] 表4促生长因子单因素实验

考察因素	水平					
[0070] 促生长因子	1	2	3	4	5	6
	低聚异麦芽糖	低聚果糖	大豆低聚糖	麦芽糖醇	棉子糖	低聚半乳糖

[0071] 表5促生长因子单因素实验结果

	实验结果					
	水平 1	水平 2	水平 3	水平 4	水平 5	水平 6
[0072] 收率/%	0.790	0.786	0.783	0.778	0.789	0.737
活菌数 (cfu/mL)	2.18×10^9	1.95×10^9	2.02×10^9	2.14×10^9	2.13×10^8	2.01×10^9

[0073] 通过表5实验结果,将低聚异麦芽糖替换为低聚果糖的水平2,与水平1对比收率相当,活菌数下降;将低聚异麦芽糖替换为大豆低聚糖的水平3,收率相当,活菌数下降;将低聚异麦芽糖替换为麦芽糖醇的水平4,收率和活菌数均下降;将低聚异麦芽糖替换为麦芽糖醇的水平5,收率相当,活菌数下降;将低聚异麦芽糖替换为麦芽糖醇的水平6,收率和活菌数均下降。

[0074] 2.3) 低聚异麦芽糖添加量的确定

[0075] 在上述方案1的配方基础上,考察低聚异麦芽糖添加量5g/L、6g/L和7g/L的菌泥收率及活菌数,优化最佳低聚异麦芽糖添加量。优化结果见表6。

[0076] 表6低聚异麦芽糖添加量实验结果

[0077] 低聚异麦芽糖添加量 (g/L)	收率/%	活菌数 (cfu/mL)
5	0.790	2.18×10^9
6	0.827	2.97×10^9
7	0.806	2.82×10^9

[0078] 通过表6实验结果,低聚异麦芽糖添加量为6g/L时,收率及活菌数最高,故确定低聚异麦芽糖添加量为6g/L。

[0079] 综合2.1)、2.2)及2.3)实验结果,确定最佳优化培养基配方为酵母蛋白胨15g/L、酵母浸出物30g/L、葡萄糖20g/L、乳糖10g/L、低聚异麦芽糖6g/L、柠檬酸5g/L、L-苹果酸5g/L、氯化钙0.5g/L。

[0080] 实施例3副干酪乳杆菌菌株培养条件实验

[0081] 1、菌株培养条件实验方法

[0082] 1.1) 冻存菌种复苏:取存于低温冰箱内的副干酪乳杆菌菌种冻存管,立即放入37℃水浴锅内进行菌种复苏,15~30s,至冻存管内固体全部融化;

[0083] 1.2) 菌种培养:按照10%的接种量将冻存管中的菌体转接到10mL基础培养基中,37℃静置培养16h,获得菌悬液。

[0084] 1.3) 培养条件实验:将上述菌悬液转接到100mL基础培养基中,于不同条件下培养16h,测定菌悬液的吸光度、pH、收率和活菌数。然后在较优条件下,将该菌悬液接种到300mL优化培养基中培养16h,测定菌悬液的吸光度、pH、收率和活菌数,验证需氧型和接种量,以考察不同培养温度、培养基初始pH、接种量和需氧型对菌体生长的影响。每组做两个平行试验。实验方案见下表。

[0085] 表7培养条件实验方案表

考察因素	f1	f2	f3	f4	f5	f6	f7	f8	f9	f10	f11	f12	f13
温度/℃	35	37	39	37	37	39	39	39	35	35	35	35	35
需氧型	静置	静置	静置	锡纸	振荡	静置	静置	静置	静置	静置	静置	静置	静置
接种量/%	4	4	4	4	4	3	4	5	5	5	5	5	5
初始 pH	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.4	6.4	6.4	6.40	6.60	6.80	7.00	7.20

[0088] 其中,基础培养基制备:酵母蛋白胨10.0~15.0g/L、酵母浸出物20.0~25.0g/L、葡萄糖25.0~30.0g/L、柠檬酸3.0~5.0g/L、L-苹果酸2.0~3.0g/L,pH 6.80。115℃灭菌30min。

[0089] 2、菌株培养条件实验结果:

[0090] 2.1) 培养温度对菌体生长的影响,见表8。

[0091] 表8培养温度对菌体生长的影响

实验方案	温度/℃	pH			OD			收率/%		
		1 [#]	2 [#]	均值	1 [#]	2 [#]	均值	1 [#]	2 [#]	均值
f1	35	4.23	4.23	4.23	0.456	0.459	0.458	1.230	1.337	1.284
f2	37	4.26	4.26	4.26	0.413	0.407	0.410	1.393	1.320	1.357
f3	39	4.26	4.25	4.26	0.412	0.424	0.418	1.350	1.360	1.355

[0093] 2.2) 需氧型对菌体生长的影响,见表9。

[0094] 表9需氧型对菌体生长的影响

实验方案	需氧型	pH			OD			收率/%		
		1 [#]	2 [#]	均值	1 [#]	2 [#]	均值	1 [#]	2 [#]	均值
f2	静置	4.26	4.26	4.26	0.413	0.407	0.410	1.393	1.320	1.357
f4	锡纸	4.27	4.27	4.27	0.394	0.404	0.399	1.270	1.387	1.329
f5	振荡	4.22	4.22	4.22	0.434	0.439	0.437	1.143	1.293	1.218

[0096] 2.3) 接种量对菌体生长的影响,见表10。

[0097] 表10接种量对菌体生长的影响

实验方案	接种量/%	pH			收率/%			活菌数/ $\times 10^9$ (cfu/mL)			
		1 [#]	2 [#]	均值	1 [#]	2 [#]	均值	1 [#]	2 [#]	均值	
[0098]	f6	3	4.39	4.39	4.39	0.763	0.793	0.778	20.0	25.9	1.00
	f7	4	4.39	4.39	4.39	0.763	0.793	0.778	1.10	0.99	1.05
	f8	5	4.38	4.36	4.37	0.763	0.773	0.768	3.02	2.91	2.97

[0099] 2.4) 初始pH对菌体生长的影响,见表11。

[0100] 表11初始pH对菌体生长的影响

实验方案	初始 pH	pH			OD			收率/%			
		1 [#]	2 [#]	均值	1 [#]	2 [#]	均值	1 [#]	2 [#]	均值	
[0101]	f9	6.40	4.11	4.09	4.10	0.428	0.414	0.421	1.283	1.133	1.208
	f10	6.60	4.11	4.11	4.11	0.441	0.460	0.451	1.240	1.137	1.189
	f11	6.80	4.14	4.13	4.14	0.433	0.430	0.432	1.220	1.243	1.232
[0102]	f12	7.00	4.14	4.14	4.14	0.457	0.466	0.462	1.263	1.150	1.207
	f13	7.20	4.14	4.14	4.14	0.449	0.455	0.452	1.287	1.207	1.247

[0103] 根据表8、表9、表10、表11实验结果,初步确定菌株的较优条件为:培养基初始pH为6.80,接种量为5%,培养温度35℃,静置培养。

[0104] 2.5) 需氧型对菌体生长影响验证

[0105] 固定培养基初始pH为6.80,接种量为5%,培养温度35℃,验证静置培养与振荡培养对菌株生长的影响,结果见表12。

[0106] 表12需氧型对菌体生长影响验证

需氧型	pH			OD			收率/%			
	1 [#]	2 [#]	均值	1 [#]	2 [#]	均值	1 [#]	2 [#]	均值	
[0107]	静置	4.14	4.13	4.14	0.433	0.430	0.432	1.220	1.243	1.232
	振荡	4.11	4.12	4.12	0.453	0.446	0.450	1.190	1.210	1.200

[0108] 2.6) 接种量对菌体生长的影响验证

[0109] 固定培养基初始pH为6.80,培养温度35℃,静置培养,验证3%与5%的接种量对菌株生长的影响,结果见表13。

[0110] 表13接种量对菌体生长的影响

接种量/%	OD			收率/%			活菌数/ $\times 10^9$ (cfu/mL)			
	1 [#]	2 [#]	均值	1 [#]	2 [#]	均值	1 [#]	2 [#]	均值	
[0111]	3	0.607	0.631	0.619	1.527	1.543	1.535	2.00	2.14	2.07
	5	0.618	0.636	0.627	1.610	1.563	1.587	4.30	5.00	4.65

[0112] 通过考察不同培养温度、培养基初始pH、接种量和需氧型对菌体生长的影响及对需氧型和接种量的验证,确定菌株的适宜培养条件为:培养基初始pH为6.80,接种量为5%,培养温度35℃,静置培养。