



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113025540 B

(45) 授权公告日 2021. 10. 01

(21) 申请号 202110588126.5
 (22) 申请日 2021.05.28
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 113025540 A
 (43) 申请公布日 2021.06.25
 (73) 专利权人 中国食品发酵工业研究院有限公司
 地址 100015 北京市朝阳区酒仙桥中路24
 号院4号楼
 (72) 发明人 蔡木易 谷瑞增 潘兴昌 陈亮
 董哲 陆路 凌空 刘艳 魏颖
 王雨晴 张瑞雪 方磊 马永庆
 徐亚光 刘文颖 李国明 王雨辰
 张海欣 王憬 周明 毕园
 秦修远 薛晨 卢知浩

(51) Int. Cl.
 C12N 1/20 (2006.01)
 C12N 1/04 (2006.01)
 A23L 33/00 (2016.01)
 A23L 29/00 (2016.01)
 C12R 1/25 (2006.01)
 C12R 1/225 (2006.01)
 C12R 1/01 (2006.01)

审查员 刘俊

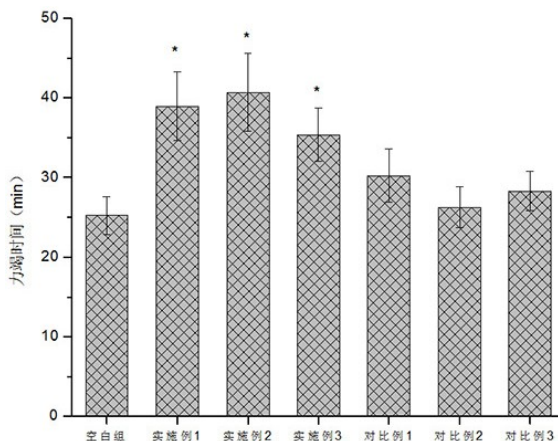
权利要求书1页 说明书9页 附图12页

(54) 发明名称

用于发酵大豆蛋白的乳酸菌菌剂、制备方法、发酵方法、具有增肌功能的发酵产物

(57) 摘要

本发明提供了一种用于发酵大豆蛋白的乳酸菌菌剂、制备方法、发酵方法、具有增肌功能的发酵产物。本发明第一方面提供了一种用于发酵大豆蛋白的乳酸菌菌剂的制备方法,通过选取六株乳酸菌中的至少两株并分别在含有水解大豆蛋白的培养基中进行预发酵,预发酵结束后按照活菌数收集菌体,并将所述菌体和保护剂混合并真空冷冻干燥后即可得到。本发明提供的制备方法制备得到的乳酸菌菌剂可用于发酵大豆蛋白,不仅可提高大豆蛋白发酵产物的营养价值和可食用性,而且发酵产物还具有增肌功能。



1. 一种用于发酵大豆蛋白的乳酸菌菌剂的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

将植物乳杆菌CGMCC No. 14812、戊糖片球菌CICC 22146、类干酪乳杆菌CICC 20241和发酵乳杆菌CICC 22537四种菌株分别在含有水解大豆蛋白的培养基中进行预发酵,预发酵结束后按照活菌数收集菌体,将所述菌体和保护剂混合并真空干燥后得到所述乳酸菌菌剂;

或者,将瑞士乳杆菌CICC 20289和唾液乳杆菌CICC 23175两种菌株分别在含有水解大豆蛋白的培养基中进行预发酵,预发酵结束后按照活菌数收集菌体,将所述菌体和保护剂混合并真空干燥后得到所述乳酸菌菌剂;

或者,将植物乳杆菌CGMCC No. 14812、瑞士乳杆菌CICC 20289和戊糖片球菌CICC 22146三种菌株分别在含有水解大豆蛋白的培养基中进行预发酵,预发酵结束后按照活菌数收集菌体,将所述菌体和保护剂混合并真空干燥后得到所述乳酸菌菌剂;

所述菌体中,植物乳杆菌、瑞士乳杆菌、戊糖片球菌、类干酪乳杆菌、发酵乳杆菌、唾液乳杆菌的活菌数的质量比为(1.0-2.5):(0.5-2.0):(0.5-1.5):(0.5-1.5):(0.5-1.5):(0-1.5)。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述水解大豆蛋白的制备方法包括:

将所述大豆蛋白与水混合进行调浆,随后加入水解酶在50-55℃下酶解1h后得到所述水解大豆蛋白;

所述水解酶为中性蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶中的一种。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述大豆蛋白和水的质量比为1:(4-8),所述水解酶的质量为所述大豆蛋白中蛋白含量的1-2%。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述培养基按照质量百分含量包括:水解大豆蛋白1-2%、蔗糖0.5-1%、硫酸镁0.05-0.2%、磷酸氢二钾0.05-0.2%、乙酸钠0.5-1%、碳酸钙1-1.5%。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述预发酵的温度为20-37℃,时间为18-24h。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述保护剂为脱脂乳粉、甘油、谷氨酸钠、蛋白肽粉、海藻糖中的一种或多种。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述菌体和所述保护剂的质量比为(1-1.5):(2-3)。

8. 根据权利要求1-7任一项所述制备方法制备得到的乳酸菌菌剂。

9. 一种大豆蛋白的发酵方法,其特征在于,按照1‰-5‰的质量比将权利要求8所述乳酸菌菌剂接种至大豆蛋白中,在30-37℃下发酵12-48h,得到发酵产物。

10. 使用权利要求9所述方法对大豆蛋白进行发酵后得到的具有增肌功能的发酵产物,其特征在于,所述发酵产物中至少包括肽段LT、IT和IL;

且基于大豆蛋白发酵产物的质量,所述LT的含量 $\geq 6.0 \mu\text{g/g}$,所述IT的含量 $\geq 1.5 \mu\text{g/g}$,所述IL的含量 $\geq 0.1 \mu\text{g/g}$ 。

用于发酵大豆蛋白的乳酸菌菌剂、制备方法、发酵方法、具有增肌功能的发酵产物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于发酵大豆蛋白的乳酸菌菌剂、制备方法、发酵方法、具有增肌功能的发酵产物,涉及食品深加工技术领域。

背景技术

[0002] 大豆蛋白作为一种植物蛋白,其氨基酸组成与牛奶蛋白质相近,必需氨基酸含量较为丰富,而且还不含胆固醇,是最具营养价值的植物蛋白质。然而,大豆蛋白中的大分子蛋白无法直接被人体吸收,同时由于大豆蛋白本身风味口感不佳,很大程度上限制了大豆蛋白的广泛应用。

[0003] 乳酸菌是一群能从可发酵性碳水化合物中产生乳酸的革兰氏阳性细菌的统称,由于乳酸菌可以提高食品的营养价值,改善食品风味,提高食品保藏性和附加价值,而被广泛应用于食品加工行业。通过乳酸菌对大豆蛋白进行发酵,可有效降低大豆蛋白中大分子蛋白的含量,产生游离氨基酸和肽段,使得发酵产物中的蛋白分子呈梯度分布,更有利于人体吸收;同时,发酵产物中还包括多种有机酸,例如乳酸,可有效改善大豆蛋白发酵产物的口感,提高大豆蛋白的可食用性和营养价值。

[0004] 随着研究的不断深入,越来越多的具有一定生理功能的肽段被报道,那么,如何利用乳酸菌对大豆蛋白进行发酵,在保证发酵产物的营养价值和可食用性的基础上,进一步提高其生理功能,成为了新的研究方向。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种用于发酵大豆蛋白的乳酸菌菌剂及制备方法,用于发酵大豆蛋白,在保证大豆蛋白发酵产物的营养价值和可食用性的基础上,进一步提高大豆蛋白发酵产物的增肌功能。

[0006] 本发明还提供了一种大豆蛋白的发酵方法及具有增肌功能的发酵产物,通过该方法对大豆蛋白进行发酵,在保证发酵产物的营养价值和可食用性的基础上,提高了发酵产物的增肌功能。

[0007] 本发明第一方面提供了一种用于发酵大豆蛋白的乳酸菌菌剂的制备方法,包括如下步骤:

[0008] 将植物乳杆菌、瑞士乳杆菌CICC 20289、戊糖片球菌CICC 22146、类干酪乳杆菌CICC 20241、发酵乳杆菌CICC 22537、唾液乳杆菌CICC 23175中的两种或两种以上菌株分别在含有水解大豆蛋白的培养基中进行预发酵,预发酵结束后按照活菌数收集菌体;

[0009] 其中,所述植物乳杆菌的保藏编号为CGMCC No. 14812;

[0010] 将所述菌体与保护剂混合并真空干燥后得到所述乳酸菌菌剂。

[0011] 本发明提供了一种用于发酵大豆蛋白的乳酸菌菌剂的制备方法,首先,本发明选取了六株可用于大豆蛋白发酵的乳酸菌,分别为植物乳杆菌(保藏编号为CGMCC No.

14812)、瑞士乳杆菌CICC 20289、戊糖片球菌CICC 22146、类干酪乳杆菌CICC 20241、发酵乳杆菌CICC 22537、唾液乳杆菌CICC 23175,其中,植物乳杆菌为自行分离得到,并经中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)鉴定,为已知菌株,其保藏编号为CGMCC No. 14812,其余五株菌株均可通过中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)购买得到,其编号分别为20289、22146、20241、22537、23175,需要说明的是,类干酪乳杆菌CICC 20241的拉丁学名为*Lactobacillus paracasei*,《细菌名称双解及分类词典》将其翻译为类干酪乳杆菌,而《可用于食品的菌种名单》又将其翻译为副干酪乳杆菌,本申请将该菌种的中文译名与《细菌名称双解及分类词典》保持一致,但实际上,副干酪乳杆菌在实质上与其相同;由于菌株无法直接用于大豆蛋白的发酵,需要对其进行驯化培养,使菌株适应以大豆蛋白作为主要碳源和氮源进行生长和代谢,具体地,将上述六株菌株中的至少两株分别在含有水解大豆蛋白的培养基中进行预发酵,其中,水解大豆蛋白是指以常规大豆蛋白为原料经酶解后的产物,更有利于乳酸菌吸收利用并保证后续菌剂的稳定性,预发酵结束后,按照活菌数收集菌体,最后,将收集得到的菌体与保护剂混合并真空干燥后即可得到该乳酸菌菌剂。经上述制备方法得到的乳酸菌菌剂可直接用于大豆蛋白的发酵,通过微生物的代谢作用,可有效降低大豆蛋白中大分子蛋白的含量,产生游离氨基酸和肽段,使得发酵产物中的蛋白分子呈梯度分布,更有利于人体吸收;同时,发酵产物中还包括多种有机酸,例如乳酸,可有效改善大豆蛋白发酵产物的口感,提高大豆蛋白的可食用性和营养价值;此外,本申请发明人研究发现,使用本发明提供的乳酸菌菌剂发酵大豆蛋白后发酵产物具有增肌功能。综上,本发明提供的制备方法制备得到的乳酸菌菌剂可用于发酵大豆蛋白,不仅可提高大豆蛋白发酵产物的营养价值和可食用性,而且发酵产物还具有增肌功能。

[0012] 在一种具体实施方式中,所述乳酸菌菌剂的制备方法具体包括如下步骤:

[0013] 首先,配制得到含有水解大豆蛋白的培养基,具体地,所述培养基按照质量百分含量包括:水解大豆蛋白1-2%、蔗糖0.5-1%、硫酸镁0.05-0.2%、磷酸氢二钾0.05-0.2%、乙酸钠0.5-1%、碳酸钙1-1.5%。

[0014] 其中,水解大豆蛋白是以大豆蛋白为原料,经水解酶酶解后得到的,具体地,将所述大豆蛋白与水混合进行调浆,随后加入水解酶在50-55℃下酶解1h后得到所述水解大豆蛋白;其中,所述水解酶为中性蛋白酶、酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶中的一种。

[0015] 进一步地,所述大豆蛋白和水的质量比为1:(4-8),所述水解酶的质量为所述大豆蛋白中蛋白含量的1-2%。

[0016] 其次,将所选菌株分别添加至培养基中进行预发酵,为了进一步缩短菌株预发酵时间,提高乳酸菌菌剂的制备周期,本申请发明人对菌株预发酵时间进行进一步研究,经研究发现,当菌株在20-37℃下预发酵18-24h后,即可满足后续乳酸菌菌剂的使用要求,因此,本发明提供的菌株的预发酵时间较短,适合现代工业化生产,可提高乳酸菌菌剂的制备效率。

[0017] 预发酵结束后,对发酵液进行高速离心并按照活菌数收集菌体,具体地,所述菌体中,植物乳杆菌、瑞士乳杆菌、戊糖片球菌、类干酪乳杆菌、发酵乳杆菌、唾液乳杆菌的活菌数的质量比为(1.0-2.5):(0.5-2.0):(0.5-1.5):(0.5-1.5):(0.5-1.5):(0-1.5)。

[0018] 最后,将收集得到的菌体与保护剂混合得到乳酸菌菌剂,其中,保护剂主要用于渗入菌体细胞,抑制细胞过度脱水而受到损伤;同时对包裹和干燥后的菌体提供物理支撑,减

少损伤。

[0019] 具体地,所述保护剂为脱脂乳粉、甘油、谷氨酸钠、蛋白肽粉、海藻糖中的一种或多种。

[0020] 进一步地,所述菌体和所述保护剂的质量比为(1-1.5):(2-3)。

[0021] 为了便于乳酸菌菌剂的保存,还可以对菌体和保护剂的混合物进行真空冷冻干燥,具体地,冷阱温度为-80℃,冻干盘中样品厚度不超过10mm,真空度20Pa。

[0022] 综上,本发明提供的制备方法制备得到的乳酸菌菌剂可用于发酵大豆蛋白,不仅可提高大豆蛋白发酵产物的营养价值和可食用性,而且发酵产物还具有增肌功能。

[0023] 本发明第二方面提供了一种根据上述任一所述制备方法制备得到的乳酸菌菌剂。

[0024] 本发明提供了一种乳酸菌菌剂,其微生物组成包括上述植物乳杆菌、瑞士乳杆菌、戊糖片球菌、类干酪乳杆菌、发酵乳杆菌、唾液乳杆菌中的至少两种。本发明提供的乳酸菌菌剂可用于大豆蛋白的发酵,不仅可提高大豆蛋白发酵产物的营养价值和可食用性,而且发酵产物还具有增肌功能。

[0025] 本发明第三方面提供一种大豆蛋白的发酵方法,按照1%-5%的质量比将上述乳酸菌菌剂接种至大豆蛋白中,在30-37℃下发酵12-48h,得到发酵产物。

[0026] 本发明提供一种大豆蛋白的发酵方法,可使用上述制备方法制备得到的乳酸菌菌剂对大豆蛋白进行发酵,具体地,按照1%-5%的质量比将所述乳酸菌菌剂接种至大豆蛋白中,在30-37℃条件下发酵12-48h,得到所述发酵产物。本发明提供了一种大豆蛋白的发酵方法,通过使用特定的乳酸菌对大豆蛋白进行发酵,在保证大豆蛋白发酵产物的营养价值和可食用性的基础上,提高了大豆蛋白发酵产物的增肌功能。

[0027] 本发明第四方面提供了一种使用上述方法对大豆蛋白进行发酵后得到的具有增肌功能的发酵产物,所述发酵产物中至少包括肽段LT、IT和IL;

[0028] 且基于大豆蛋白发酵产物的质量,所述LT的含量 $\geq 6.0 \mu\text{g/g}$,所述IT的含量 $\geq 1.5 \mu\text{g/g}$,所述IL的含量 $\geq 0.1 \mu\text{g/g}$ 。

[0029] 根据对发酵产物中的成分进行分析,本申请发明人发现,发酵产物中肽段LT(Leu-Thr)、IT(Ile-Thr)以及IL(Ile-Leu)三种二肽的含量提高,结合有关报道,我们推测LT、IT和IL三种二肽含量的增加有助于提高发酵产物的增肌功能,但具体原因还需要进一步探索。

[0030] 本发明的实施,至少具有以下优势:

[0031] 1、本发明提供了一种乳酸菌菌剂的制备方法,经上述制备方法得到的乳酸菌菌剂可直接用于大豆蛋白的发酵,通过微生物的代谢作用,可有效降低大豆蛋白中大分子蛋白的含量,产生游离氨基酸和肽段,使得发酵产物中的蛋白分子呈梯度分布,更有利于人体吸收;同时,发酵产物中还包括多种有机酸,例如乳酸,可有效改善大豆蛋白发酵产物的口感,提高大豆蛋白发酵产物的可食用性和营养价值;此外,使用本发明提供的乳酸菌菌剂发酵大豆蛋白后发酵产物具有增肌功能。

[0032] 2、本发明提供了一种大豆蛋白的发酵方法,通过使用特定的乳酸菌对大豆蛋白进行发酵,在保证大豆蛋白发酵产物的营养价值和可食用性的基础上,提高了大豆蛋白发酵产物的增肌功能。

附图说明

- [0033] 图1为小鼠运动力竭时间测定结果；
- [0034] 图2为肌酸激酶水平测定结果；
- [0035] 图3为成肌分化抗原 (MyoD) 水平测定结果；
- [0036] 图4为500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准工作溶液中LT的色谱图；
- [0037] 图5为500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准工作溶液中IT的色谱图；
- [0038] 图6为500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准工作溶液中IL的色谱图；
- [0039] 图7为实施例1中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中LT的色谱图；
- [0040] 图8为实施例1中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IT的色谱图；
- [0041] 图9为实施例1中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IL的色谱图；
- [0042] 图10为实施例2中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中LT的色谱图；
- [0043] 图11为实施例2中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IT的色谱图；
- [0044] 图12为实施例2中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IL的色谱图；
- [0045] 图13为实施例3中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中LT的色谱图；
- [0046] 图14为实施例3中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IT的色谱图；
- [0047] 图15为实施例3中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IL的色谱图；
- [0048] 图16为对比例1中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中LT的色谱图；
- [0049] 图17为对比例1中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IT的色谱图；
- [0050] 图18为对比例1中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IL的色谱图；
- [0051] 图19为对比例2中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中LT的色谱图；
- [0052] 图20为对比例2中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IT的色谱图；
- [0053] 图21为对比例2中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IL的色谱图；
- [0054] 图22为对比例3中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中LT的色谱图；
- [0055] 图23为对比例3中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IT的色谱图；
- [0056] 图24为对比例3中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IL的色谱图。

具体实施方式

[0057] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明的实施例，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0058] 以下具体实施例中，所使用的植物乳杆菌为自行分离得到，并经中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 鉴定，其保藏编号为CGMCC No. 14812；

[0059] 瑞士乳杆菌购自中国工业微生物菌种保藏中心 (CICC)，编号为20289；

[0060] 戊糖片球菌购自中国工业微生物菌种保藏中心 (CICC)，编号为22146；

[0061] 类干酪乳杆菌购自中国工业微生物菌种保藏中心 (CICC)，编号为20241；

[0062] 发酵乳杆菌购自中国工业微生物菌种保藏中心 (CICC)，编号为22537；

[0063] 唾液乳杆菌购自中国工业微生物菌种保藏中心 (CICC)，编号为23175。

[0064] 实施例1

[0065] 步骤1、将大豆蛋白(西安浩天生物工程有限公司,蛋白质(以干基计) $\geq 90.0\text{g}/100\text{g}$)和水按照1:5的质量比混合调浆,添加1.5‰的木瓜蛋白酶,50℃下酶解1h,得到水解大豆蛋白;

[0066] 称取水解大豆蛋白20g、蔗糖10g、硫酸镁1.5g、磷酸氢二钾2g、乙酸钠7.5g、碳酸钙10g,配置得到1L的液体培养基;

[0067] 步骤2、将植物乳杆菌、戊糖片球菌、类干酪乳杆菌和发酵乳杆菌分别接种至上述液体培养基中,在37℃下发酵18h,发酵结束后按照活菌数质量比为1.0:1.0:1.5:0.5收集菌体;

[0068] 步骤3、称取5g的菌体与10g的保护剂混合均匀后真空冷冻干燥得到乳酸菌菌剂,其中,保护剂包括脱脂乳粉5%、甘油15%、谷氨酸钠15%、植物蛋白肽粉15%、海藻糖2%。

[0069] 本实施例提供的大豆蛋白的发酵方法包括如下步骤:

[0070] 将制备得到的乳酸菌菌剂按照2‰的质量比接种至大豆蛋白中,在36℃条件下发酵16h,发酵结束后,收集发酵产物。

[0071] 实施例2

[0072] 本实施例提供的乳酸菌菌剂的制备方法包括如下步骤:

[0073] 步骤1、将大豆蛋白(河南省鲲鹏生物公司,蛋白质(以干基计) $\geq 88.0\text{g}/100\text{g}$)和水按照1:6的质量比混合调浆,添加1.0‰的中性蛋白酶,52℃下酶解1h,得到水解大豆蛋白;

[0074] 称取水解大豆蛋白20g、蔗糖10g、硫酸镁1.5g、磷酸氢二钾2g、乙酸钠7.5g、碳酸钙10g,配置得到1L的液体培养基;

[0075] 步骤2、将瑞士乳杆菌和唾液乳杆菌分别接种至上述液体培养基中,在37℃下发酵20h,发酵结束后按照活菌数质量比为1.0:1.5收集菌体;

[0076] 步骤3、称取5g的菌体与10g的保护剂混合均匀后真空冷冻干燥得到乳酸菌菌剂,其中,保护剂包括脱脂乳粉5%、甘油15%、谷氨酸钠15%、植物蛋白肽粉15%、海藻糖2%。

[0077] 本实施例提供的大豆蛋白的发酵方法包括如下步骤:

[0078] 将制备得到的乳酸菌菌剂按照2‰的质量比接种至大豆蛋白中,在36℃条件下发酵16h,发酵结束后,收集发酵产物。

[0079] 实施例3

[0080] 本实施例提供的乳酸菌菌剂的制备方法包括如下步骤:

[0081] 步骤1、将大豆蛋白(山东金锣企业集团总公司,蛋白质(以干基计) $\geq 85.0\text{g}/100\text{g}$)和水按照1:4的质量比混合调浆,添加1.5‰的酸性蛋白酶,53℃下酶解1h,得到水解大豆蛋白;

[0082] 称取水解大豆蛋白20g、蔗糖10g、硫酸镁1.5g、磷酸氢二钾2g、乙酸钠7.5g、碳酸钙10g,配置得到1L的液体培养基;

[0083] 步骤2、将植物乳杆菌、瑞士乳杆菌和戊糖片球菌分别接种至上述液体培养基中,在37℃下发酵18h,发酵结束后按照活菌数质量比为1.0:1.5:0.5收集菌体;

[0084] 步骤3、称取5g的菌体与10g的保护剂混合均匀后真空冷冻干燥得到乳酸菌菌剂,其中,保护剂包括脱脂乳粉5%、甘油15%、谷氨酸钠15%、植物蛋白肽粉15%、海藻糖2%。

[0085] 本实施例提供的大豆蛋白的发酵方法包括如下步骤:

[0086] 将制备得到的乳酸菌菌剂按照2‰的质量比接种至大豆蛋白中,在36℃条件下发

酵16h,发酵结束后,收集发酵产物。

[0087] 对比例1

[0088] 本对比例提供的乳酸菌菌剂的制备方法以及大豆蛋白发酵方法可参考实施例1,区别在于,植物乳杆菌为ATCC 14917、戊糖片球菌为ATCC 14917、类干酪乳杆菌为ATCC 8041、发酵乳杆菌为ATCC 14931。

[0089] 对比例2

[0090] 本对比例提供的乳酸菌菌剂的制备方法以及大豆蛋白发酵方法可参考实施例2,区别在于,瑞士乳杆菌为ATCC 15009,唾液乳杆菌为DSM 20555。

[0091] 对比例3

[0092] 本对比例提供的乳酸菌菌剂的制备方法以及大豆蛋白发酵方法可参考实施例3,区别在于,植物乳杆菌为ATCC 14917、瑞士乳杆菌为ATCC 15009、戊糖片球菌为ATCC 14917。

[0093] 收集实施例1-3以及对比例1-3的大豆蛋白发酵产物,按照国标GB5009.5-2016食品安全国家标准食品中蛋白质的测定(第一法 凯氏定氮法)、GB5009.124-2016食品安全国家标准食品中氨基酸的测定、GB/T 22492-2008 大豆肽粉和GB5009.157-2016食品安全国家标准食品中有机酸的测定对发酵产物进行分析,分析结果如表1:

[0094] 表1 实施例1-3以及对比例1-3中发酵产物成分分析结果

	成分 (g/100g)					
	肽含量	可溶性大蛋白	不溶性蛋白	游离氨基酸	有机酸	乳酸
实施例1	22.06	18.84	42.74	1.04	1.5	1
对比例1	13.15	10.63	60.78	1.21	2.3	2
实施例2	22.12	12.96	45.51	1.06	1.2	0.8
对比例2	11.87	7.66	61.47	1.09	2.5	1.8
实施例3	23.75	15.09	41.62	1.03	1.6	1.2
对比例3	14.146	8.28	62.45	1.26	2	1.7

[0095] 如表1所示,相比于对比例1-3,实施例1-3的发酵产物中不溶蛋白含量不大于50%,肽含量不小于18%,说明本发明提供的乳酸菌菌剂能有效对大豆蛋白进行发酵,且发酵产物更有利于人体吸收,同时,发酵产物中的有机酸有助于提高大豆蛋白的可食用性。

[0097] 本申请进一步提供以下实验说明本申请得到的发酵产物具有增肌功效,具体实验方法包括:

[0098] 将56只5周龄雄性昆明小鼠称重后随机分为空白组、实施例1、实施例2、实施例3、对比例1、对比例2、对比例3共7组,每组8只。空白组小鼠每天自由摄取正常饲料,实施例1-3以及对比例1-3组的小鼠每天自由摄取包括实施例1-3以及对比例1-3得到的大豆蛋白发酵产物的饲料,其中,饲料中除蛋白质不同外,其余组分均相同。

[0099] 实验期间每组小鼠每周进行5天的运动训练,跑步训练强度依次为15m/min、

10min;15m/min、20min;20m/min、20min;20m/min、30min;4周后测定以下指标:

[0100] a. 运动力竭时间测定

[0101] 最后一天,小鼠进行跑步力竭实验,预运动15m/min、30min后,速度提高至20m/min,直至力竭,记录20m/min的跑步力竭时间。

[0102] 运动力竭时间可反应小鼠运动能力,而运动能力的高低和肌肉成分及功能密不可分。肌肉组织结构致密、含量高,力量越大,跑步力竭时间会更长,反之跑步时间会越短。图1为小鼠运动力竭时间测定结果,如图1所示,实施例1-3中小鼠的力竭时间明显高于空白组和对比例1-3,其中,实施例2中小鼠的力竭时间最长,是空白组的1.8倍。

[0103] b. 肌酸激酶水平测定

[0104] 小鼠力竭后,立即处死取后肢肌肉,加入PBS混合均匀后3000 r / min 离心20min,收集上清,使用比色法测定上清液中肌酸激酶的活性。

[0105] 肌酸激酶主要存在于骨骼肌、心肌、平滑肌中,参与肌肉收缩、细胞内能量运转、三磷酸腺苷再生等生理过程。运动后机体内肌酸激酶活性会明显增高,造成肌肉受损,且运动越剧烈、时间越长,肌酸激酶活性升高越明显。通过降低肌酸激酶的活性可以保护肌肉的正常生理功能。

[0106] 图2为肌酸激酶水平测定结果,如图2所示,实施例1-3组小鼠的肌酸激酶活力低于空白组和对比例1-3,其中,实施例2中小鼠的肌酸激酶活力最低,是空白组的0.8倍,因此,实施例1-3提供的大豆蛋白发酵产物有利于保护肌肉的正常生理功能,其中实施例2效果最好。

[0107] c. 成肌分化抗原(MyoD)水平测定

[0108] 将步骤b得到的上清使用双抗体夹心法测定MyoD水平。

[0109] 成肌分化抗原(MyoD)是肌生成过程中重要的生肌因子,在肌母细胞中表达,参与肌卫星细胞激活和分化过程,能把多种类型细胞(成纤维细胞、脂肪细胞等)转化为成肌细胞,并可促进成肌细胞进一步融和、分化为成熟的肌纤维。在肌肉形成的特异基因转录调控中,起着总开关的作用。

[0110] 图3为成肌分化抗原(MyoD)水平测定结果,如图3所示,实施例1-3中小鼠的MyoD相对含量显著提高,其中,实施例2中小鼠的MyoD相对含量最高,是空白组的1.3倍,说明本申请提供的大豆蛋白发酵产物可以通过调节MyoD的水平促进肌细胞的形成。

[0111] 为了进一步分析发挥增肌功能的关键性肽段,本申请对大豆蛋白发酵产物中的成分进行分析,具体地:利用超高效液相色谱仪Nexera X2与三重四极杆质谱仪联用系统(岛津,日本)对实施例1-3以及对比例1-3提供的大豆蛋白发酵产物中三种二肽进行鉴定分析。

[0112] 其中,液相色谱条件包括:色谱柱:Inertsil ODS-3(5 μ m,2.1*250 mm);流动相A为0.1%甲酸水溶液,流动相B为0.1%甲酸乙腈溶液;二元梯度洗脱程序:第0-15 min,流动相B为0-50%;第15-20 min,流动相B为50-100%;第20-25 min,流动相B为100%;第25-35 min,流动相B为0%;流速:0.2 mL/min;进样体积:5 μ L;柱温:40 $^{\circ}$ C。

[0113] 质谱条件包括:离子化模式:ESI,正离子模式;离子喷雾电压:+4.5 kV;雾化气流速:氮气 3.0 L/min;加热气流速:氮气10 L/min;干燥气流速:氮气10 L/min;DL温度:250 $^{\circ}$ C;加热模块温度:400 $^{\circ}$ C;离子源温度:300 $^{\circ}$ C;扫描模式:多反应监测(MRM);滞留时间:100 ms;延迟时间:3 ms;MRM参数:见表2。

[0114] 表2 质谱中MRM参数

序列	前体离子	产物离子	Q1 偏转电压 (V)	CE 碰撞能 (V)	Q3 偏转电压 (V)
LT	233.20	74.20*	-13.0	-22.0	-15.0
		86.20	-12.0	-14.0	-19.0
IT	233.20	74.20*	-12.0	-27.0	-29.0
		86.20	-11.0	-14.0	-18.0
IL	245.30	44.10*	-12.0	-38.0	-18.0
		86.10	-12.0	-15.0	-17.0

[0115] *表示定量离子

[0116] 肽段标准品配制:分别准确称取LT、IT以及IL标准品粉末2.0 mg,加水溶解,涡旋混匀,定容至100 mL,即为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。分别取500 μL 上述标准储备液,定容至10 mL,即得混合标准母液1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。将上述混合标准母液用纯水逐级稀释至1.95、3.91、7.81、15.63、31.25、62.5、125、250、500和1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列标准工作溶液。

[0117] 对上述十种不同浓度的标准工作溶液进行超高效液相色谱-质谱分析,分析条件如上所述。图4为500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准工作溶液中LT的色谱图,图5为500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准工作溶液中IT的色谱图,图6为500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准工作溶液中IL的色谱图,用于LT、IT和IL的定性分析;其次,根据标准工作溶液的分析结果,以标准品的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线,根据该标准工作曲线对LT、IT和IL进行定量分析,分析结果如下:

[0118] 图7为实施例1中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中LT的色谱图,图8为实施例1中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IT的色谱图,图9为实施例1中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IL的色谱图,通过与图4-6的对比可知,实施例1得到的大豆蛋白发酵产物中同时存在LT、IT和IL三种二肽,并根据标准工作曲线计算得到LT含量为6.9 $\mu\text{g}/\text{g}$,IT含量为1.81 $\mu\text{g}/\text{g}$,IL含量为0.11 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

[0119] 图10为实施例2中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中LT的色谱图,图11为实施例2中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IT的色谱图,图12为实施例2中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IL的色谱图,通过与图4-6的对比可知,实施例2得到的大豆蛋白发酵产物中同时存在LT、IT和IL三种二肽,并根据标准工作曲线计算得到LT含量为7.06 $\mu\text{g}/\text{g}$,IT含量为1.89 $\mu\text{g}/\text{g}$,IL含量为0.13 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

[0120] 图13为实施例3中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中LT的色谱图,图14为实施例3中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IT的色谱图,图15为实施例3中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IL的色谱图,通过与图4-6的对比可知,实施例3得到的大豆蛋白发酵产物中同时存在LT、IT和IL三种二肽,并根据标准工作曲线计算得到LT含量为6.75 $\mu\text{g}/\text{g}$,IT含量为1.76 $\mu\text{g}/\text{g}$,IL含量为0.11 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

[0121] 图16为对比例1中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中LT的色谱图,图17为对比例1中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IT的色谱图,图18为对比例1中20 mg/mL 大豆蛋白发酵产物中IL的色谱图,通过与图4-6的对比可知,对比例1得到的大豆蛋白发酵产物中同时存在LT、IT和

IL三种二肽,并根据标准工作曲线计算得到LT含量为3.8 $\mu\text{g/g}$,IT含量为0.59 $\mu\text{g/g}$,IL含量为0.03 $\mu\text{g/g}$ 。

[0123] 图19为对比例2中20 mg/mL大豆蛋白发酵产物中LT的色谱图,图20为对比例2中20 mg/mL大豆蛋白发酵产物中IT的色谱图,图21为对比例2中20 mg/mL大豆蛋白发酵产物中IL的色谱图,通过与图4-6的对比可知,对比例2得到的大豆蛋白发酵产物中存在LT和IT,而不存在IL,并根据标准工作曲线计算得到LT含量为2.84 $\mu\text{g/g}$,IT含量为0.68 $\mu\text{g/g}$ 。

[0124] 图22为对比例3中20 mg/mL大豆蛋白发酵产物中LT的色谱图,图23为对比例3中20 mg/mL大豆蛋白发酵产物中IT的色谱图,图24为对比例3中20 mg/mL大豆蛋白发酵产物中IL的色谱图,通过与图4-6的对比可知,对比例3得到的大豆蛋白发酵产物中同时存在LT、IT和IL三种二肽,并根据标准工作曲线计算得到LT含量为3.07 $\mu\text{g/g}$,IT含量为0.46 $\mu\text{g/g}$,IL含量为0.04 $\mu\text{g/g}$ 。

[0125] 由此可知,本申请实施例1-3提供的发酵产物中三种二肽的含量相比于对比例1-3明显提高,我们推测LT、IT和IL三种二肽含量的增加有助于提高发酵产物的增肌功能,但具体原因还需要进一步探索。

[0126] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

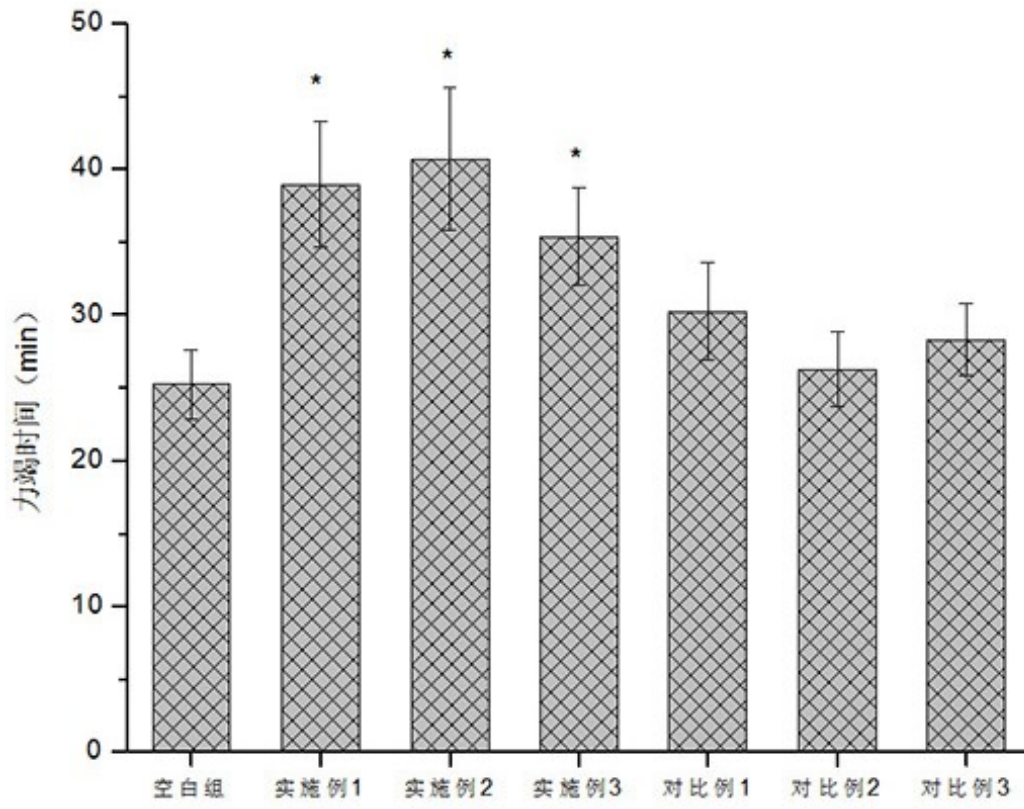


图1

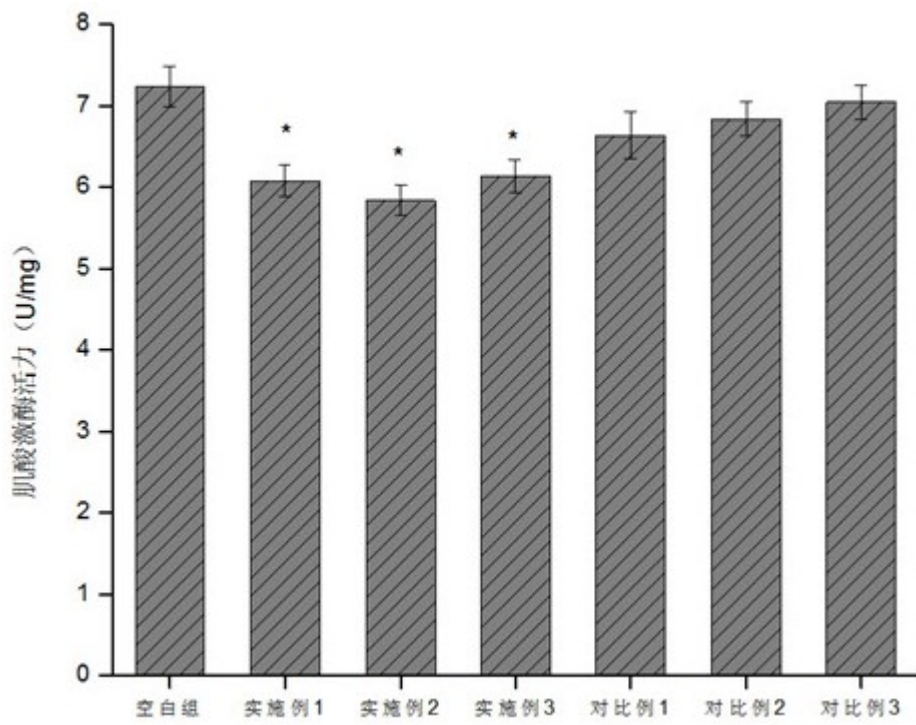


图2

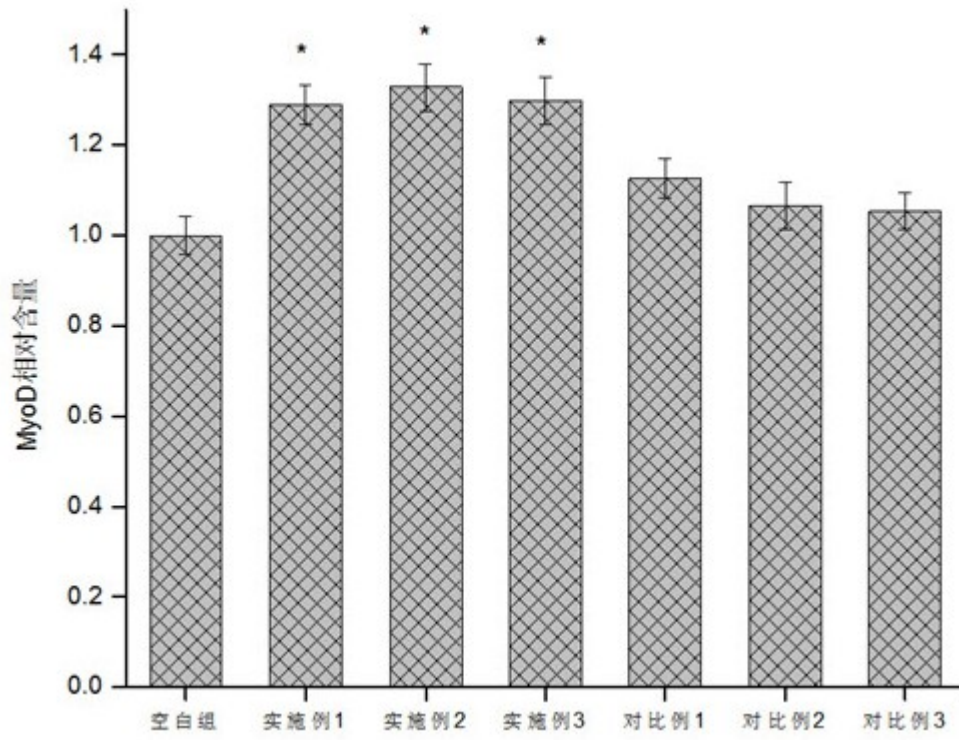


图3

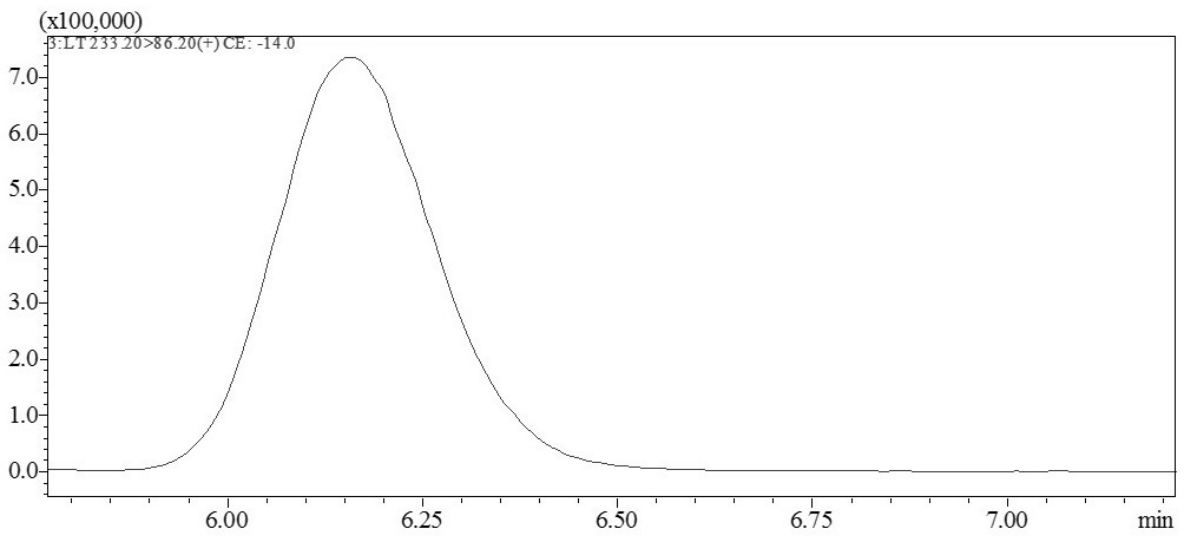


图4

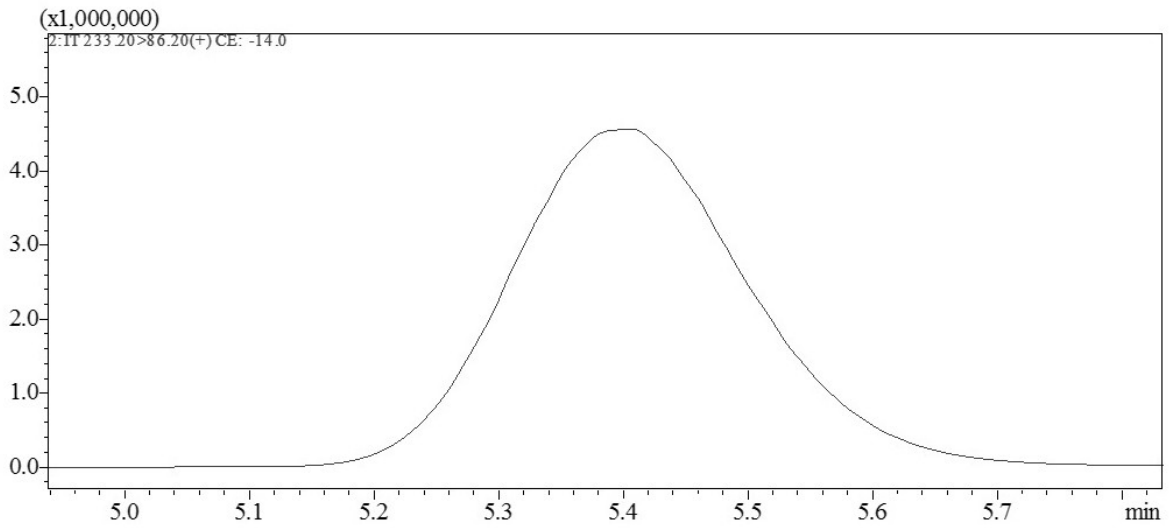


图5

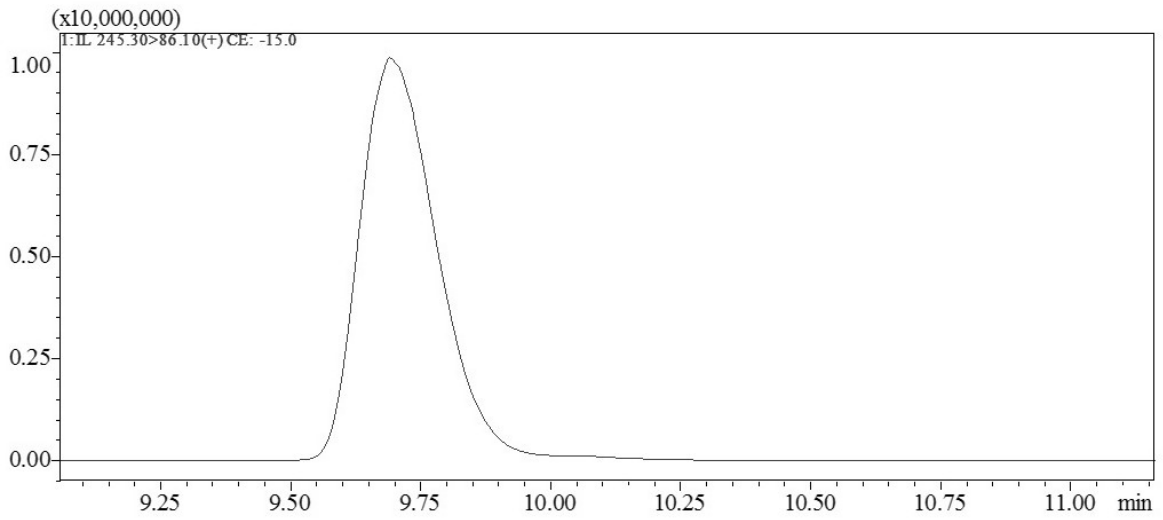


图6

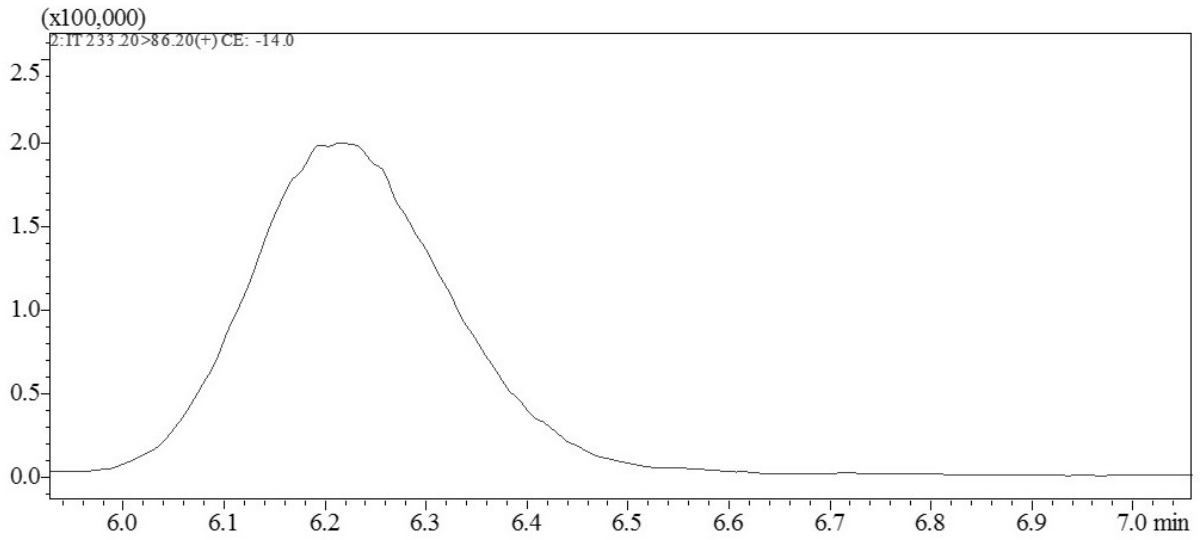


图7

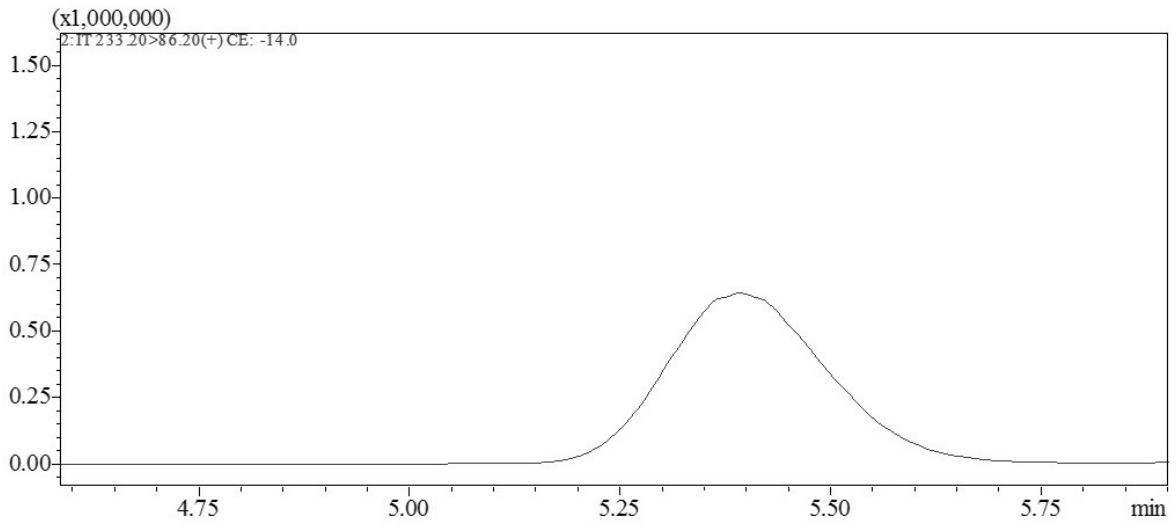


图8

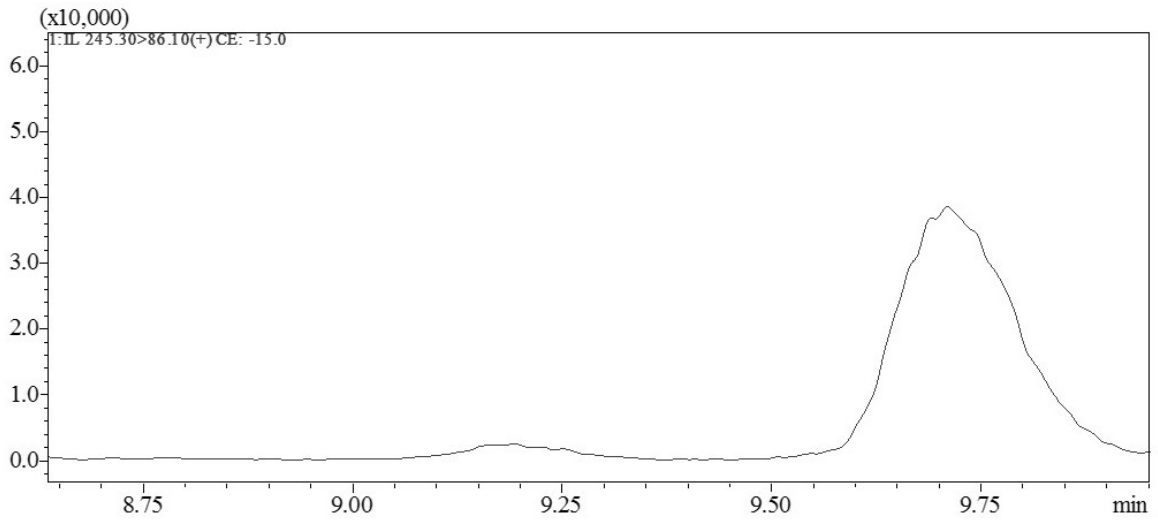


图9

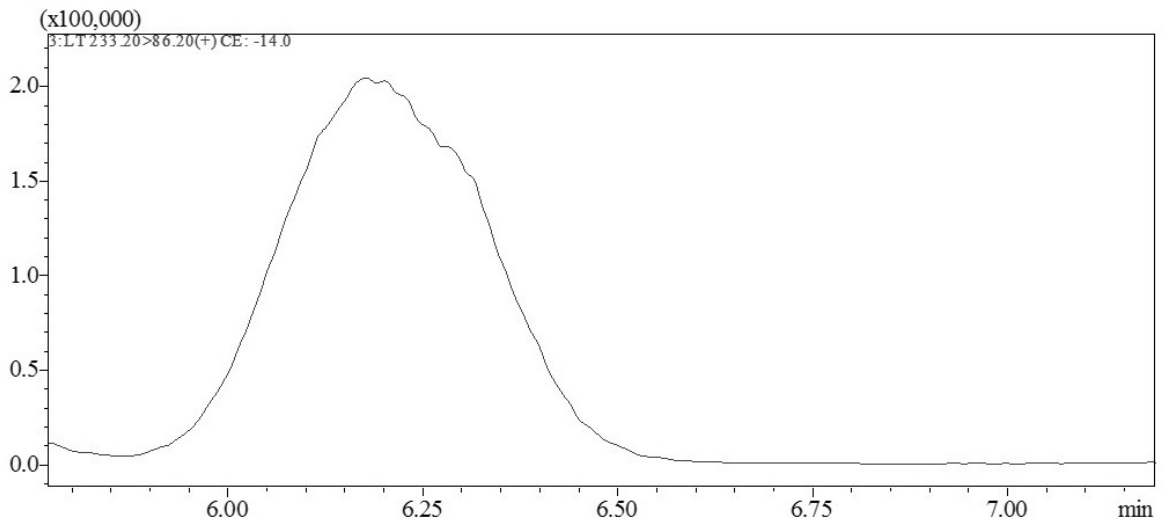


图10

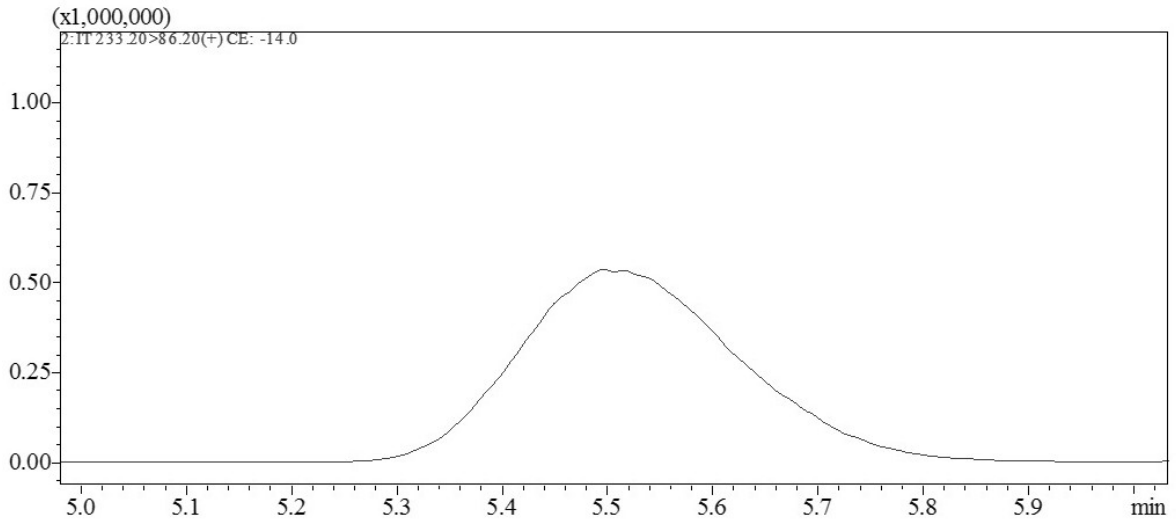


图11

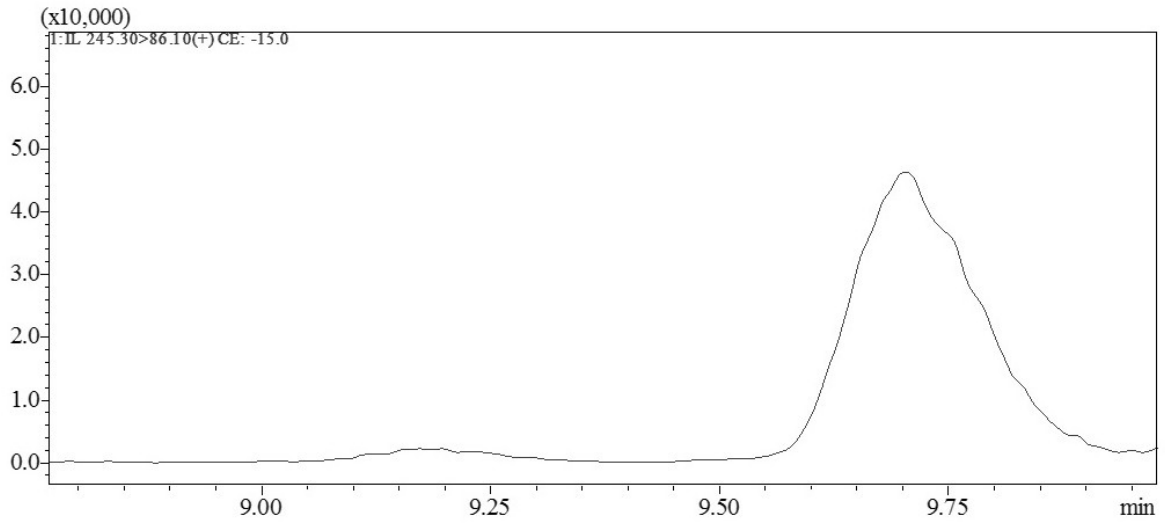


图12

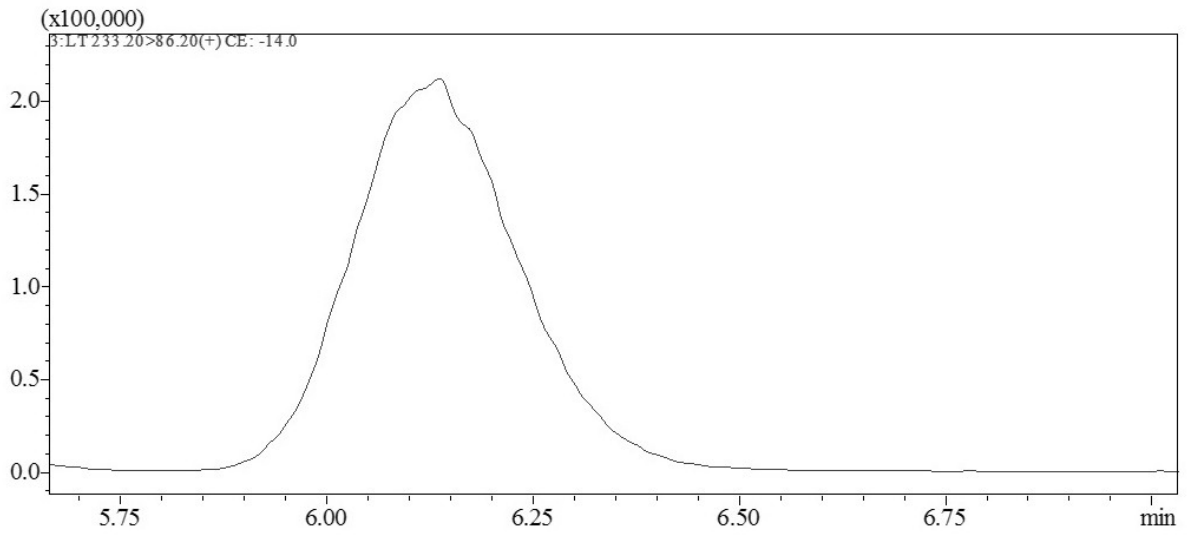


图13

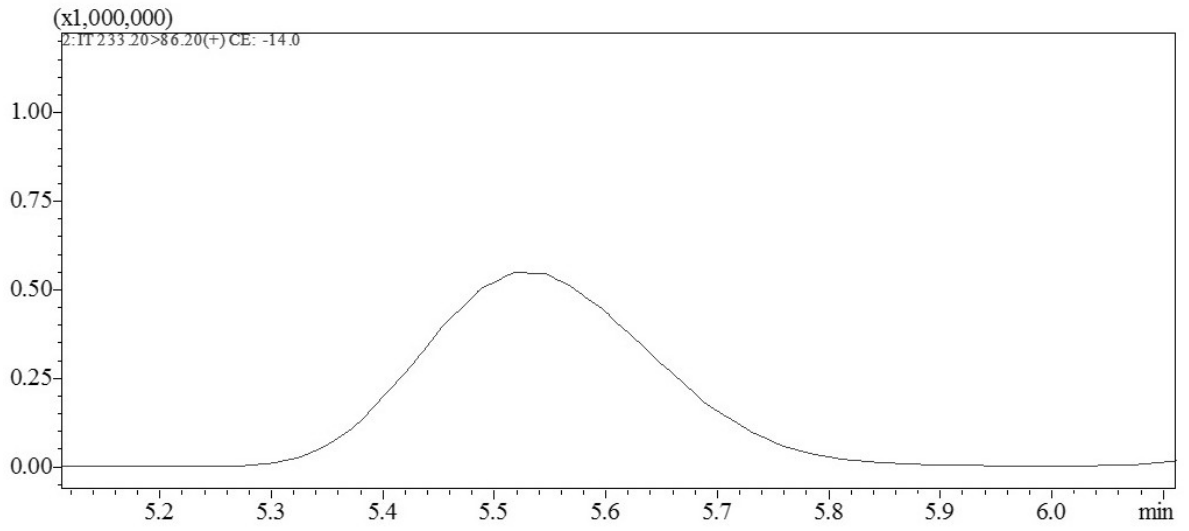


图14

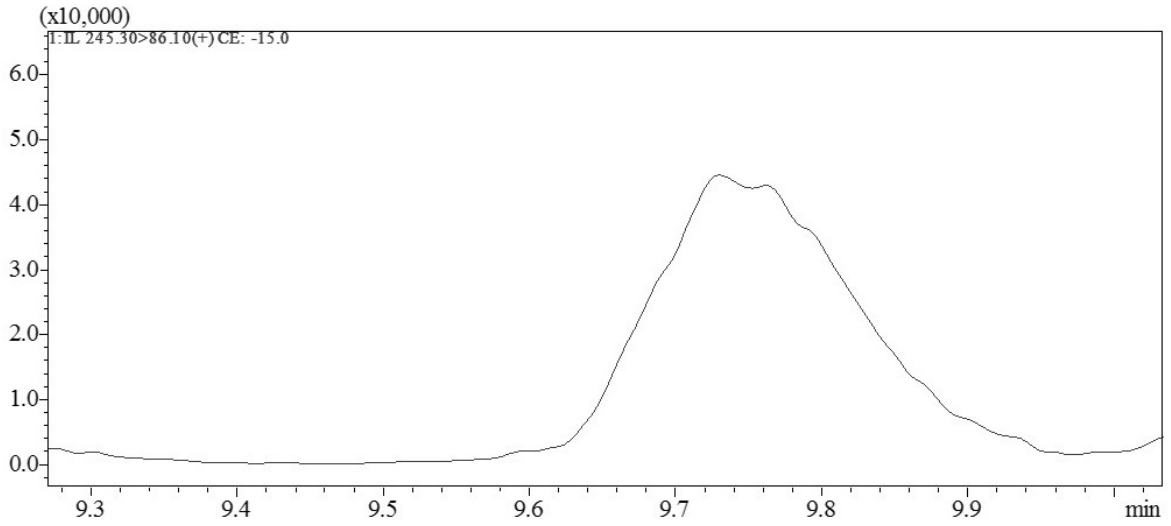


图15

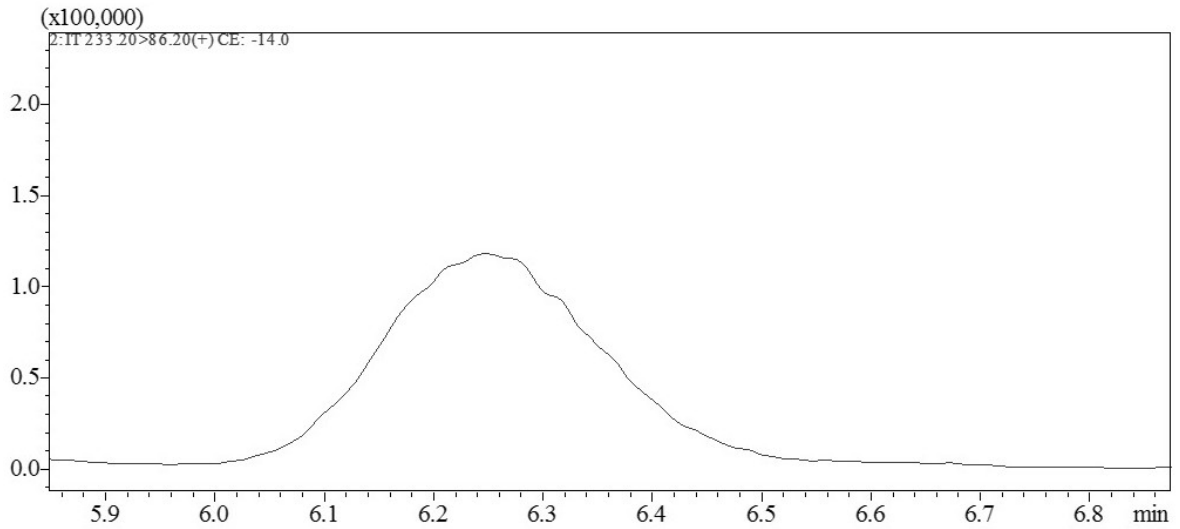


图16

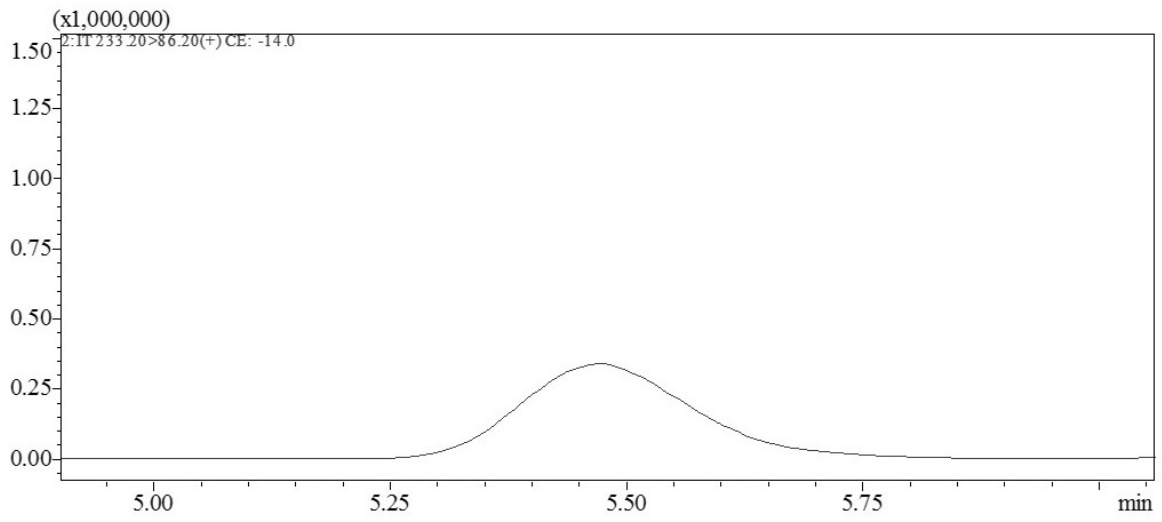


图17

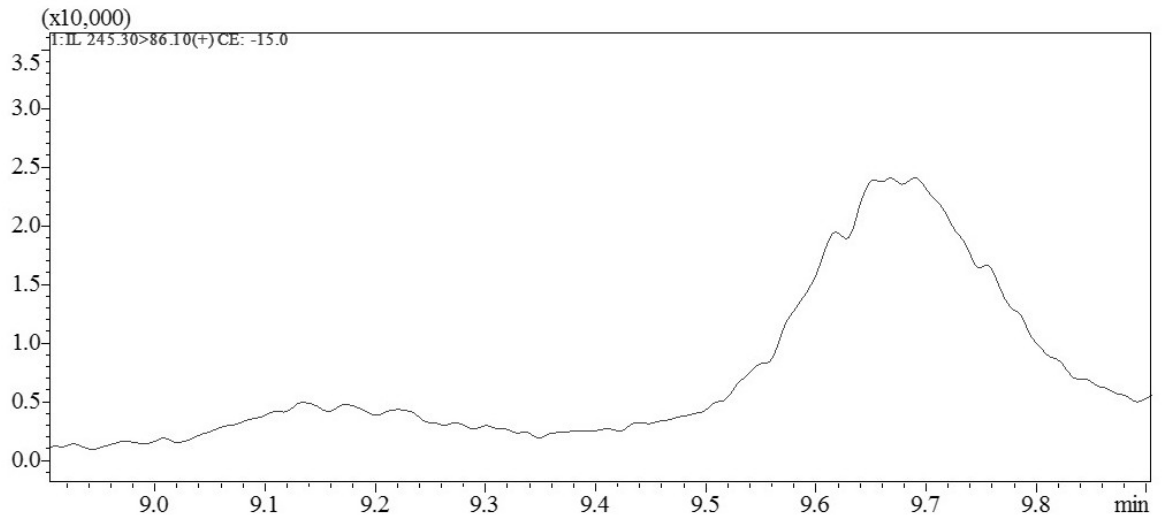


图18

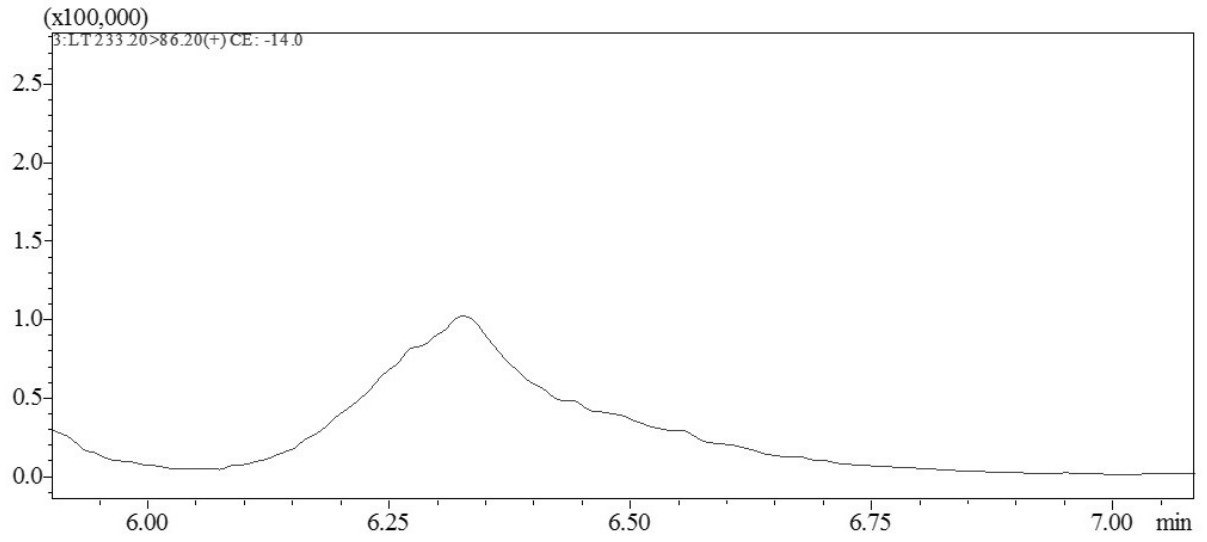


图19

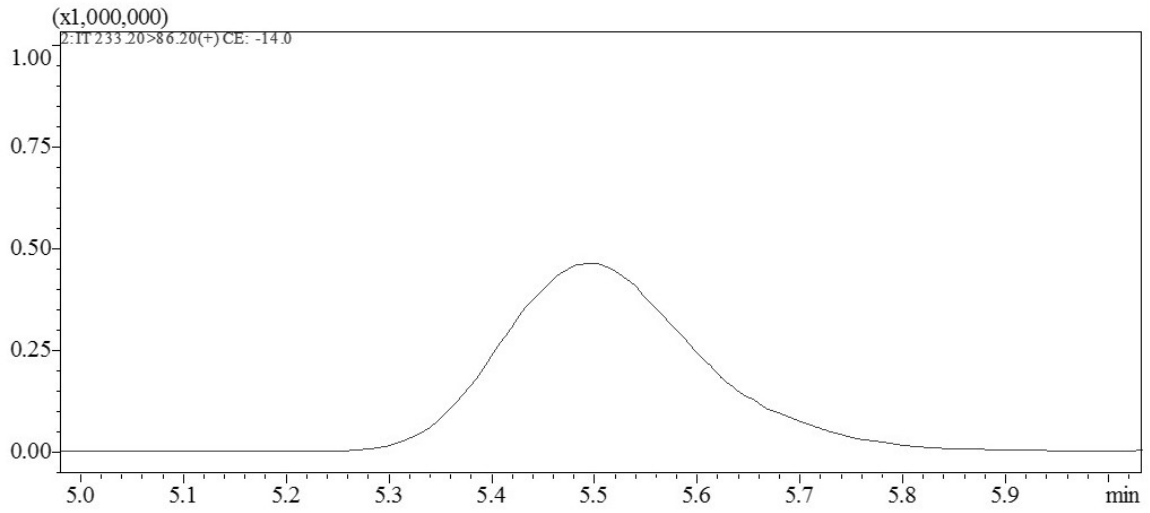


图20

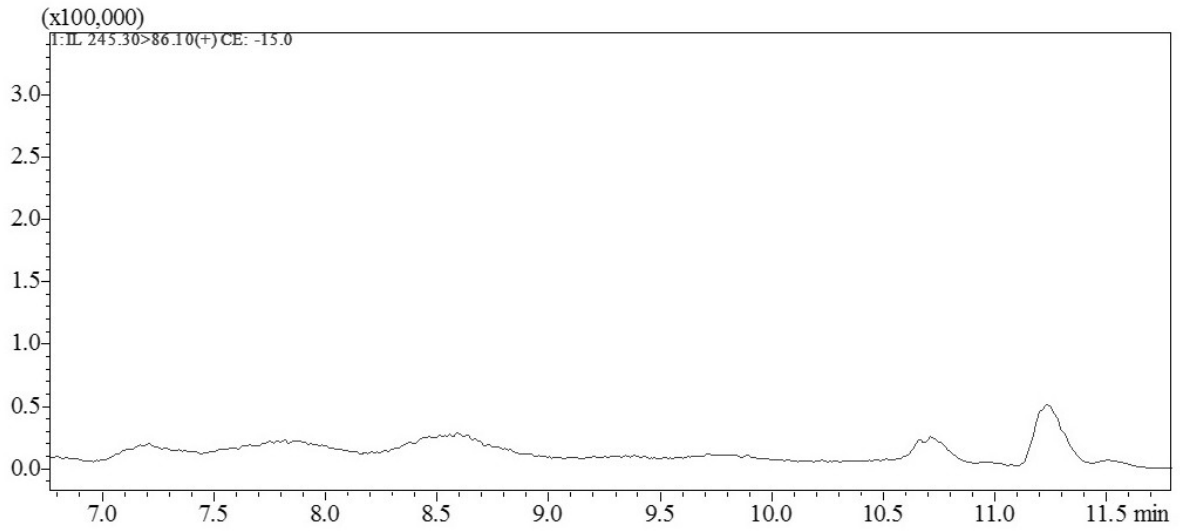


图21

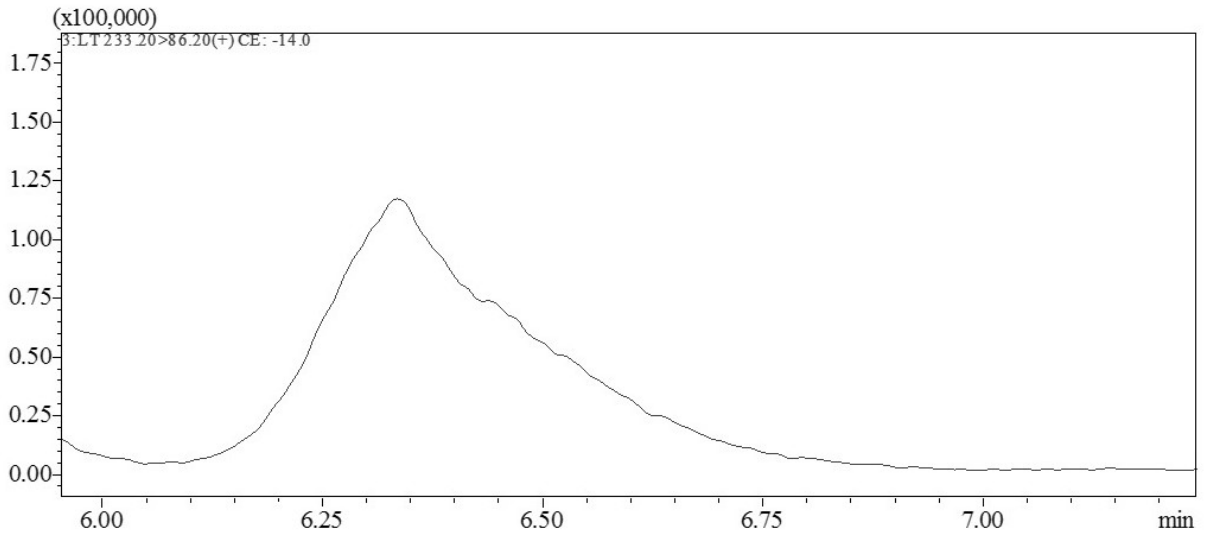


图22

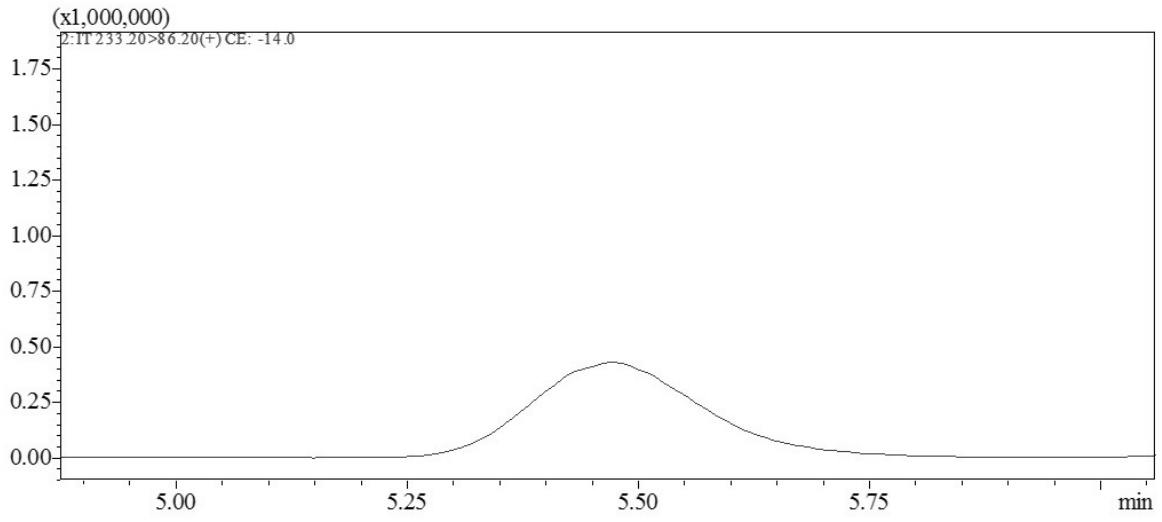


图23

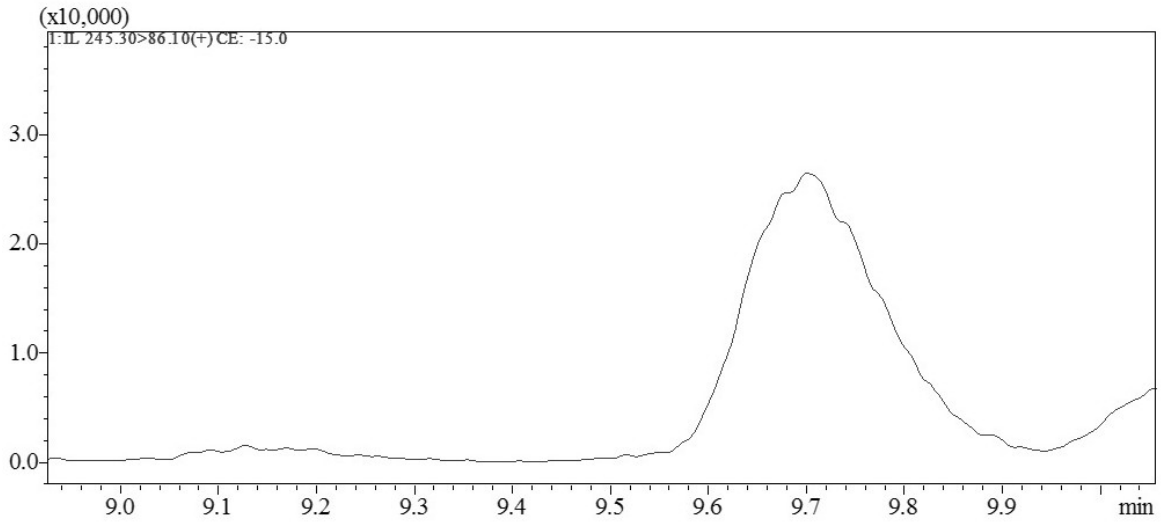


图24