



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105028636 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510393761. 2

(22) 申请日 2015. 07. 07

(71) 申请人 南京师范大学

地址 210046 江苏省南京市亚东新城区文苑路1号

(72) 发明人 潘道东 郭宇星 李桦 陶明煊  
刘琛 章金叶 张丹丹

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207  
代理人 卢亚丽

(51) Int. Cl.

A23C 9/123(2006. 01)

A23C 9/133(2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页

(54) 发明名称

一种薏米小米复合风味功能性酸奶及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种薏米小米复合风味功能性酸奶及其制备方法,特点是将小米薏米混合磨成乳状液,经风味蛋白酶和 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶酶解,枯草芽孢杆菌发酵剂发酵,过滤、超高压或超声波处理得小米薏米混合酶解发酵液,再按一定比例添加雨生红球藻酶解物、脱脂乳粉、白糖,经搅拌混合均匀、杀菌、冷却、添加乳酸菌发酵剂、混匀、灌装、发酵、冷却等工艺,得到成品,优点是含SOD、虾青素及多肽等功能因子,具有抗氧化及免疫调节功能并对ACE活性具有抑制作用。

1. 一种薏米小米复合风味功能性酸奶,其特征在于通过下述方法制得:将小米薏米混合磨成乳状液,经风味蛋白酶和 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶酶解,枯草芽孢杆菌发酵剂发酵,过滤、超高压或超声波处理得小米薏米混合酶解发酵液,再添加雨生红球藻酶解物、脱脂乳粉、白糖,经搅拌混合均匀、杀菌、冷却、添加乳酸菌发酵剂、混匀、灌装、发酵、冷却、后熟工艺,得到一种含SOD、虾青素及多肽等功能因子,具有抗氧化及免疫调节功能并对ACE活性具有抑制作用的特色风味酸奶制品。

2. 一种权利要求1所述的薏米小米复合风味功能性酸奶的制备方法,其特征包括以下步骤:

(1) 枯草芽孢杆菌发酵剂制备:将枯草芽孢杆菌菌种转接到斜面培养基上,37℃培养18-24h后,挑取6-10环接种到装有200-250ml基础种子培养基的500ml三角瓶中,37℃、180-220r/min振荡培养22-36h,即得枯草芽孢杆菌发酵剂;

(2) 乳酸菌菌株活化:在无菌操作条件下,将德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌和发酵乳杆菌中的任一菌种与嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌分别接种于MRS液体培养基中,分别在37-43℃的培养箱中培养20-36小时;

(3) 乳酸菌发酵剂的制备:将活化后的德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌和发酵乳杆菌中的任一菌种与嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌菌株在无菌操作条件下,分别接种在经巴氏杀菌后冷却至37-40℃的10-13.0wt%脱脂乳培养基中,在37-43℃保温箱中培养3-8小时,使其活菌数达到 $10^6$ - $10^8$ cfu/mL;

(4) 小米薏米混合乳浆酶解发酵液的制备:选择优质小米及薏米分别淘洗2~3遍,然后将小米与薏米按1:1的质量比例混合均匀,再加入小米质量10-15倍重的水,煮沸保持25-35min,用胶体磨磨浆3-4遍得到混合乳浆,加入混合乳浆质量0.03-0.09%活力为30-50U/mg的风味蛋白酶、0.01-0.05%活力为20000-40000U/g的 $\alpha$ -淀粉酶和0.01-0.05%活力为20000-40000U/g的糖化酶,在50-56℃,保温3-6小时后,冷却至30-38℃,加入混合乳浆质量3.0-6.0%的枯草芽孢杆菌发酵剂,在30-38℃、转速170-250rpm下振荡培养20-36小时后,150-200目筛过滤取滤液,将滤液加热到30-45℃,经450-600MPa超高压处理3-6次或输出功率为550-650W的超声波处理10-50min,即得到小米薏米混合乳浆酶解发酵液;

(5) 雨生红球藻酶解物的制备:收集雨生红球藻细胞藻泥,悬浮于水溶液中得到质量分数为10-15%的雨生红球藻溶液,将雨生红球藻溶液用输出功率为550-650W的超声波细胞破碎仪在冰浴中破碎细胞6-10min,调pH值至5-6,分别加入雨生红球藻溶液质量0.05-0.10%的活力为2000-4000U/g的纤维素酶及雨生红球藻溶液质量0.05-0.10%的活力为30-50U/mg的风味蛋白酶,在45-55℃下保温酶解3-8小时,冷却至15-25℃并调整pH至6.5-7.5,得到雨生红球藻酶解物;

(6) 配料:将小米薏米混合乳浆酶解发酵液与雨生红球藻酶解物按质量比2-5:1的比例混合得到混合液,再添加混合液质量10-15%的脱脂乳粉、4-6%的白糖,混合均匀再均质;

(7) 杀菌、冷却、接种:将均质后的混合液加热到65-70℃,保温10-20分钟后,冷却至40-43℃,在无菌操作的条件下,加入混合液质量1.0-2.0%的德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌和发酵乳杆菌中的任一种发酵剂、1.0-2.0%的嗜酸乳杆菌发酵剂,2.0-3.0%的嗜热链球菌发酵剂,搅拌混合均匀;

(8) 罐装、发酵 :用罐装机罐装至酸奶瓶或塑料杯,封口后,装入塑料框,移入发酵室,在 37-43℃保温发酵 3-8 小时 ;

(9) 冷却、后熟 :将上述发酵结束后的酸奶移入 0-4℃的冷库内冷却、后熟即得薏米小米复合风味功能性酸奶成品。

3. 根据权利要求 2 所述的一种薏米小米复合风味功能性酸奶的制备方法,其特征在于步骤(1)中所述的斜面培养基的配制方法如下 :牛肉膏 3g、NaCl 5g、蛋白胨 10g、琼脂 20g,溶于 1L 蒸馏水中,调 pH 至 7.0-7.2,121℃灭菌 20min 即可。

4. 根据权利要求 2 所述的一种薏米小米复合风味功能性酸奶的制备方法,其特征在于步骤(1)中所述的基础种子培养基的配制方法如下 :牛肉膏 3g、NaCl 5g、蛋白胨 10g,溶于 1L 蒸馏水中,调 pH 至 7.0-7.2,121℃灭菌 20min 即可。

5. 根据权利要求 2 所述的一种薏米小米复合风味功能性酸奶的制备方法,其特征在于步骤(2)中所述的 MRS 液体培养基的配制方法如下 :蛋白胨 10g,牛肉膏 10g,酵母提取物 5g,  $K_2HPO_4$  2g, 柠檬酸二铵 2g, 乙酸钠 5g, 葡萄糖 20g, 吐温 -80 1mL,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g,  $MnSO_4$  0.25g, 溶于 1L 蒸馏水,调 pH 至 6.2 ~ 6.4,121℃灭菌 20min 即可。

## 一种薏米小米复合风味功能性酸奶及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种酸奶,尤其是涉及一种薏米小米复合风味功能性酸奶及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 薏米又名薏苡仁或薏仁米,俗称“药玉米”、“回回米”、“六谷米”,自古以来就是一种声誉卓著的滋补食品。据化验分析,薏米含蛋白质高达 18-21%、脂肪 4-6%、碳水化合物 79.2%,还富含多种维生素(尤其是 B 族维生素)和人体所需的氨基酸及矿物质等,营养非常丰富。另外,薏米还具有消食、利尿、化脓、镇痛、消肿、润肤、美容、消除疲劳、预防高血压及促消化等功效,特别是其中含有的苡米脂能很好地抑制某些癌细胞的生长。所以薏米是很好的药食两用功能性食品原料,正日益成为人们理想的健康营养食品。

[0003] 小米(谷子)是我国北方一种主要的粮食作物,因其营养丰富,一向受到人们的喜爱。小米中含蛋白质 9.7%、脂肪 3.5%、碳水化合物 72.8%、纤维素 1.6%、VB10.57mg 100g、VB20.12mg 100g、Ca 29mg 100g、Mg 93.1mg 100g、Fe 4.7mg 100g。小米中蛋白质的含量略高于大米和玉米,且消化率高于小麦和玉米。与小麦和玉米相比,除赖氨酸之外的其余 7 种必需氨基酸均超过了小麦和玉米,尤其是色氨酸和蛋氨酸最为突出。小米还有很多药用价值。据《本草纲目》中记载,小米“治反胃热痢,煮粥食,益丹田,补虚损,开肠胃。”小米味甘咸,有清热解渴、健胃除湿、和胃安眠等功效。小米含有大量的碳水化合物,对缓解精神压力、紧张、乏力等有很大的功效。

[0004] 雨生红球藻是目前已知自然界中虾青素含量最高的生物。天然虾青素是迄今为止人类发现自然界最强的抗氧化剂,其抗氧化活性远远超过现有的抗氧化剂。虾青素在保护细胞膜磷酸酯和其他脂类的过氧化方面表现突出。虾青素能够通过降解自身分子来淬灭单线态氧,从而保护机体细胞或组织免受损伤,也能防止单不饱和脂肪酸降解产生的自由基链式反应。

[0005] 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase 简称 SOD, EC 1.15.1.1)为自由基清除剂,它广泛存在于生物体的各种组织中,能清除自由基  $O_2^-$  (超氧阴离子自由基),而  $O_2^-$  具有细胞毒性,可使脂质过氧化,损伤细胞膜,引起炎症,肿瘤和自身免疫性疾病,并可能促使机体衰老。SOD 是中国卫生部批准的具有抗衰老、免疫调节、调节血脂、抗辐射、美容功能的物质之一。目前国内外已有不少添加 SOD 的抗衰老保健品,被越来越多地应用于食品、日化产品等领域。目前商品 SOD 主要从动物血液及脏器中提取,容易受原料来源、产品质量不稳定及安全性等方面的限制。

[0006] 血管紧张素转化酶(Angiotensin-converting enzyme,简称 ACE)在人体血压调节过程中起重要作用,它存在于各组织的血管内皮细胞或上皮细胞及血浆等体液中。它在人体肾素-血管紧张素系统和激肽系统-激肽系统中,对血压调节起到重要作用,可同时作用于血管紧张素 I 和舒缓激肽,使血管紧张素 I 转换成血管紧张素 II,同时水解舒缓激肽,使其失活,从而导致血压上升。抗 ACE 肽是指一类具有抑制 ACE 活性的多肽物质,它们

通过抑制 ACE 的活性使血管紧张素 II 的产生和舒缓激肽的失活均减少,从而达到降低血压的目的。

[0007] 目前,国内外还没有公开任何关于利用薏米、小米和雨生红球藻等功能性食品原料及脱脂奶粉白糖等食品原料,开发出一种富含 SOD、虾青素及多肽等功能因子的薏米小米复合风味功能性酸奶及其制备方法。

## 发明内容

[0008] 本发明所要解决的技术问题是提供一种不仅风味独特,含 SOD、虾青素及多肽等功能因子,具有抗氧化及免疫调节功能并对 ACE 活性具有抑制作用的薏米小米复合风味功能性酸奶及其制备方法。

[0009] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种薏米小米复合风味功能性酸奶,将小米薏米混合磨成乳状液,经风味蛋白酶和  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶酶解,枯草芽孢杆菌发酵剂发酵,过滤、超高压或超声波处理得小米薏米混合酶解发酵液,再按一定比例添加雨生红球藻酶解物、脱脂乳粉、白糖,经搅拌混合均匀、杀菌、冷却、添加乳酸菌发酵剂、混匀、灌装、发酵、冷却等工艺,得到一种含 SOD、虾青素及多肽等功能因子,具有抗氧化及免疫调节功能并对 ACE 活性具有抑制作用的特色风味酸奶制品。

[0010] 上述薏米小米复合风味功能性酸奶的制备方法,包括以下步骤:

[0011] (1) 枯草芽孢杆菌发酵剂制备:将保存的枯草芽孢杆菌菌种转接到斜面培养基上,37℃培养 18-24h 后,挑取 6-10 环接种到装有 200-250ml 基础种子培养基的 500ml 三角瓶中,37℃、180-220r/min 振荡培养 22-36h,即得枯草芽孢杆菌发酵剂;

[0012] (2) 乳酸菌菌株活化:在无菌操作条件下,将德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌和发酵乳杆菌中的任一菌种与嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌分别接种于 MRS 液体培养基中,分别在 37-43℃的培养箱中培养 20-36 小时;

[0013] (3) 乳酸菌发酵剂的制备:将活化后的德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌和发酵乳杆菌中的任一菌种与嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌菌株在无菌操作条件下,分别接种在经巴氏杀菌后冷却至 37-40℃的 10-13.0wt%脱脂乳培养基中,在 37-43℃保温箱中培养 3-8 小时,使其活菌数达到  $10^6$ - $10^8$ cfu/mL;

[0014] (4) 小米薏米混合乳浆酶解发酵液的制备:选择优质小米及薏米分别淘洗 2~3 遍,然后将小米与薏米按 1:1 的质量比例混合均匀,再加入小米质量 10-15 倍重的水,煮沸保持 25-35min,用胶体磨磨浆 3-4 遍得到混合乳浆,加入混合乳浆质量 0.03-0.09%活力为 30-50U/mg 的风味蛋白酶、0.01-0.05%活力为 20000-40000U/g 的  $\alpha$ -淀粉酶和 0.01-0.05%活力为 20000-40000U/g 的糖化酶,在 50-56℃,保温 3-6 小时后,冷却至 30-38℃,加入混合乳浆质量 3.0-6.0%的枯草芽孢杆菌发酵剂,在 30-38℃、转速 170-250rpm 下振荡培养 20-36 小时后,150-200 目筛过滤取滤液,将滤液加热到 30-45℃,经 450-600MPa 超高压处理 3-6 次或输出功率为 550-650W 的超声波处理 10-50min,即得到小米薏米混合乳浆酶解发酵液;

[0015] (5) 雨生红球藻酶解物的制备:收集雨生红球藻细胞藻泥,悬浮于水溶液中得到质量分数为 10-15%的雨生红球藻溶液,将雨生红球藻溶液用输出功率为 550-650W 的超声波细胞破碎仪在冰浴中破碎细胞 6-10min,调 pH 值至 5-6,分别加入雨生红球藻溶液质量

0.05-0.10%的活力为2000-4000U/g的纤维素酶及雨生红球藻溶液质量0.05-0.10%的活力为30-50U/mg的风味蛋白酶,在45-55℃下保温酶解3-8小时,冷却至15-25℃并调整pH至6.5-7.5,得到雨生红球藻酶解物;

[0016] (6) 配料:将小米薏米混合乳浆酶解发酵液与雨生红球藻酶解物按质量比2-5:1的比例混合得到混合液,再添加混合液质量10-15%的脱脂乳粉、4-6%的白糖,混合均匀再均质;

[0017] (7) 杀菌、冷却、接种:将均质后的混合液加热到65-70℃,保温10-20分钟后,冷却至40-43℃,在无菌操作的条件下,加入混合液质量1.0-2.0%的德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌和发酵乳杆菌中的任一种发酵剂、1.0-2.0%的嗜酸乳杆菌发酵剂,2.0-3.0%的嗜热链球菌发酵剂,搅拌混合均匀;

[0018] (8) 罐装、发酵:用罐装机罐装至酸奶瓶或塑料杯,封口后,装入塑料框,移入发酵室,在37-43℃保温发酵3-8小时;

[0019] (9) 冷却、后熟:将上述发酵结束后的酸奶移入0-4℃的冷库内冷却、后熟即得薏米小米复合风味功能性酸奶成品。

[0020] 步骤(1)中所述的斜面培养基的配制方法如下:牛肉膏3g、NaCl 5g、蛋白胨10g、琼脂20g,溶于1L蒸馏水中,调pH至7.0-7.2,121℃灭菌20min即可。

[0021] 步骤(1)中所述的基础种子培养基的配制方法如下:牛肉膏3g、NaCl 5g、蛋白胨10g,溶于1L蒸馏水中,调pH至7.0-7.2,121℃灭菌20min即可。

[0022] 步骤(2)中所述的MRS液体培养基的配制方法如下:蛋白胨10g,牛肉膏10g,酵母提取物5g,  $K_2HPO_4$ 2g,柠檬酸二铵2g,乙酸钠5g,葡萄糖20g,吐温-80 1mL,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g,  $MnSO_4$  0.25g,溶于1L蒸馏水,调pH至6.2~6.4,121℃灭菌20min即可。

[0023] 与现有技术相比,本发明的优点在于:本发明首次公开了一种薏米小米复合风味功能性酸奶及其制备方法,包括发酵剂的制备,薏米小米混合乳浆酶解物的制备,雨生红球藻酶解物的制备,经混合料配制、灌装、发酵、冷却、后熟等工艺过程,得到一种含SOD、多肽、虾青素等活性因子,具有抗氧化和免疫调节功能并对ACE活性具有抑制作用的酸奶制品。该酸奶制品中添加小米薏米混合乳浆酶解发酵液、雨生红球藻酶解物等功能性配料,小米薏米混合乳浆酶解发酵液中含SOD、多肽等功能因子,雨生红球藻酶解物中含有虾青素、多肽等功能因子,它们具有降血脂、降血压、抗氧化、提高免疫力、防癌等多种保健功能。其中枯草芽孢杆菌是来自土壤的非致病性微生物,繁殖速度快,产量大,安全性高,通过枯草芽孢杆菌的发酵产生大量SOD等功能因子,通过超声波或超高压处理,使枯草芽孢杆菌细胞壁破碎,释放出SOD等功能因子;通过超声波处理及纤维素酶酶解的协同作用,促进雨生红球藻细胞细胞壁的破碎,释放出虾青素及蛋白质,提高了其利用价值和生物活性,通过风味蛋白酶的酶解以及枯草芽孢杆菌、嗜热链球菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种(或瑞士乳杆菌、植物乳杆菌、发酵乳杆菌)及嗜酸乳杆菌的发酵,在它们的协同作用下,促进配料中薏米蛋白、小米蛋白、雨生红球藻、乳蛋白的分解产生更多的游离氨基酸及多肽,与单一的乳酸菌发酵或酶解相比,产品中氨基酸与多肽的含量提高了30-40%,抗氧化及抗ACE活性分别提高了50-70%和20-23%,SOD含量达200-250U/mL,虾青素含量达到190-300  $\mu$ g/mL,提高了产品的风味和营养价值,增加了其功能特性;添加 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶,将薏米小米混合乳浆中的淀粉分解成葡萄糖,有利于枯草芽孢杆菌及乳酸菌的发酵。本发明制备得到

的功能性酸奶,不仅风味独特,营养丰富,而且具有抗氧化、抗 ACE 和免疫调节功能。

[0024] 综上所述,本发明利用薏米、小米和雨生红球藻等功能性食品原料及脱脂奶粉白糖等食品原料,通过枯草芽孢杆菌、乳酸菌发酵等工艺,开发出一种富含 SOD、虾青素及多肽等功能因子,具有抗氧化及免疫调节功能并对 ACE 活性具有抑制作用的薏米小米复合风味功能性酸奶及其制备方法,丰富酸奶制品的种类,提高酸奶制品的功能价值。

## 具体实施方式

[0025] 以下结合实施例对本发明作进一步详细描述。

### [0026] 一、实验测定方法

#### [0027] 1、SOD 含量的测定

[0028] 采用中华人民共和国国家标准《保健食品中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的测定》(GB/T5009.171-2003) 中的第二法化学发光法

#### [0029] 2、虾青素含量的测定 (高效液相色谱法)

[0030] (1) 检测条件选择: Nova-Pak C18 色谱柱 (150mm×3.9mm, 5 μm, 美国 Waters 公司); 流动相 A 为水, 流动相 B 为甲醇; 洗脱梯度: 10% A, 90% B(0min); 10% A, 90% B(1min); 0% A, 100% B(10min); 0% A, 100% B(20min). 流速 1mL·min<sup>-1</sup>; 检测器为 Waters 996 光电二极管阵列检测器; 光谱扫描波长范围 300 ~ 700nm, 检测波长为 476nm; 进样量为 10 μL。

[0031] (2) 标准曲线制作: 准确吸取一定体积的虾青素标准储备液, 配制成 6 份质量浓度不同的标准样品, 分别取 10 μL 进样. 由色谱工作站处理数据, 以虾青素质量浓度为横坐标, 相应峰面积为纵坐标, 绘制虾青素含量的标准曲线. 将一标准溶液平行测定 6 次, 计算各组分的峰面积和保留时间的相对标准偏差。

[0032] (3) 酸奶中虾青素的提取及测定: 取 100 克酸奶冷冻干燥得冻干酸奶粉, 取 1 克冻干酸奶粉, 加液氮后用研钵研磨 5min, 加入 10mL 丙酮, 涡旋震荡 15s, 置 50℃ 水浴 30min, 每隔 10min 震荡 15s, 3500rpm 离心 10min, 取上清液, 再加入 10mL 丙酮, 涡旋震荡 15s 后再次离心, 重复以上操作直到藻体变白色. 将虾青素丙酮提取液用氮气吹干, 用 25mL 甲醇定容后用于高效液相色谱分析, 并根据标准曲线计算出虾青素含量。

#### [0033] 3、多肽含量测定

[0034] (1) 标准曲线的制作: 取十个 10ml 的容量瓶用 5% 的 TCA 依次配制 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 和 1.8mg/ml 的 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准溶液然后分别取 6.0ml 标准溶液加入 4.0ml 双缩脲试剂于漩涡混合仪上混合均匀静置 10min 2000r/min 离心 10min 取上清液于 540nm 下测定 OD 值 (以第一管做空白对照) 以肽的浓度为横坐标 X(mg/ml) OD 值为纵坐标 Y 制作标准曲线, 得到回归方程  $y = 0.3681x + 0.0013$  ( $R^2 = 1$ )

[0035] (2) 多肽含量的测定: 取 5ml 酸奶浆加入 5ml 10% (W/V) 的三氯乙酸 (TCA) 水溶液于漩涡混合仪上混合均匀静置 10min 然后在 4000r/min 下离心 15min 将上清液全部转移到 50ml 容量瓶中并用 5% 的 TCA 定容至刻度摇匀然后取 6.0ml 上述溶液置另一试管中加入双缩脲试剂 4.0ml (样液: 双缩脲试剂 = 3:2) (V/V) 于漩涡混合仪上混合均匀静置 10min, 2000r/min 离心 10min, 取上清液于 540nm 下测定 OD 值对照标准曲线求得样品溶液中的多肽浓度 C(mg/ml) 进而可求得样品中多肽含量。

## [0036] 4、抗氧化能力指标测定

[0037] (1) 总抗氧化能力的测定:在氧化反应体系中添加香肚粗提物,利用 Fenton 反应体系产生羟自由基,以抗坏血酸作为阳性对照,反应结束后于 510nm 处测定吸光值;总抗氧化能力按下面的公式计算:

[0038]

$$\text{公式} = \frac{\text{测定管 OD} - \text{对照管 OD}}{0.01} \div 30 \times \frac{\text{反应液总体积 (mL)}}{\text{取样量 (mL)}} \times \text{样品测试前稀释倍数} \quad (2) \text{ 超氧}$$

阴离子自由基的测定:在反应系统中,每升样品在 37℃ 反应 40min 所抑制的超氧阴离子自由基相当于 1mg 的维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位。

[0039]

$$\text{活力单位 (U/L)} = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1 - OD_3} \times \text{标准浓度 (0.15mg/mL)} \times 1000 \text{mL} \times \text{样品测试前的稀释倍数}$$

[0040]  $OD_1$ :对照管的吸光度; $OD_2$ :测定管的吸光度; $OD_3$ :标准管的吸光度。

[0041] (3) 羟自由基的测定:Fenton 反应是最常见的产生羟自由基的化学反应, $H_2O_2$  的量和 Fenton 反应产生羟自由基成正比,当给予电子受体后,用 gress 试剂显色,形成红色物质,其呈色与羟自由基的多少成正比关系。

[0042]

$$\text{抑制羟自由基能力 (U/mL)} = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_3 - OD_4} \times \text{标准管浓度} \times \text{取样量} \times \text{样品测试前稀释倍数}$$

标准管浓度为 8.824mmol/L;取样量为 1mL; $OD_1$ :对照管的吸光度; $OD_2$ :测定管的吸光度; $OD_3$ :标准管的吸光度; $OD_4$ :空白管的吸光度

## [0043] 5、免疫指标测定

## [0044] (1) 实验动物分组及灌胃

[0045] 60 只小鼠随机分成 3 组,每组 20 只。分别为正常对照组、环磷酰胺 (CY) 对照组、CY+ 香肚粗提物组 (实验组)。在小鼠适应一周后,开始灌胃,正常对照组和 CY 对照组每天灌胃生理盐水 0.10ml/10g 体重,实验组每天灌胃酸奶粗提 0.10ml/10g 体重,连续 30 天。在灌胃的前 5 天,除正常对照组外,环磷酰胺 (CY) 对照组每日腹腔注射等容积的环磷酰胺 100mg/kg 体重。

## [0046] (2) 脏器指数计算公式

[0047] 各组小鼠在末次给药 24h 后称重,尾静脉取血,脱颈椎处死小鼠后,剖取肝脏、脾脏和胸腺。用滤纸吸干在电子天平上称重计算脾指数和胸腺指数。

[0048]

$$\text{胸腺 (脾) 指数} = \frac{\text{胸腺 (脾) 重量 (mg)}}{\text{小鼠体重 (g)}} \times 10$$

## [0049] (3) 吞噬指数测定

[0050]

$$\text{廓清指数 } K = \frac{\log OD_1 - \log OD_2}{t_2 - t_1}, \quad \text{吞噬指数 } \alpha = \frac{\sqrt[3]{K} \times \text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}}$$



[0051] K:未经校正吞噬的指数;OD<sub>1</sub>:2分钟时血标本OD值;OD<sub>2</sub>:20分钟时血标本OD值)

[0052] 6、ACE抑制活性测定

[0053] 用含有0.3mol/L NaCl的0.1mol/L硼酸盐缓冲液(pH8.3)将马尿酸-组氨酸-亮氨酸(Hip-His-Leu)配成5.0mmol/L的溶液。在10mL试管中加入200μL的5.0mmol/L Hip-His-Leu溶液和80μL的酸奶提取液,于37℃下保温3分钟后,再加入20μL ACE溶液(溶解于蒸馏水中,活力为0.1U/mL),混匀后在37℃下保温30分钟,再加入250μL的1.0mol/L的盐酸溶液以终止反应,再加入1.7mL醋酸乙酯,经15秒种振荡混匀后,静置5分钟,用移液管吸取1.0mL的醋酸乙酯层,冷冻干燥后,加入1.0mL蒸馏水,混匀后在228nm处测定吸光度。

[0054] ACE抑制率 =  $[(B-A)/B] \times 100\%$

[0055] IC<sub>50</sub>为抑制50%的ACE活性所需抑制剂的浓度。

[0056] 其中A为添加ACE抑制肽时,ACE和Hip-His-Leu反应的吸光度;B为不添加ACE抑制肽时,ACE和Hip-His-Leu反应的吸光度。

[0057] 二、具体实施例

[0058] 实施例1

[0059] 一种薏米小米复合风味功能性酸奶,将小米薏米混合磨成乳状液,经风味蛋白酶和α-淀粉酶和糖化酶酶解,枯草芽孢杆菌发酵剂发酵,过滤、超高压或超声波处理得小米薏米混合酶解发酵液,再按一定比例添加雨生红球藻酶解物、脱脂乳粉、白糖,经搅拌混合均匀、杀菌、冷却、添加乳酸菌发酵剂、混匀、灌装、发酵、冷却等工艺,得到一种含SOD、虾青素及多肽等功能因子,具有抗氧化及免疫调节功能并对ACE活性具有抑制作用的特色风味酸奶制品,其制备方法包括以下步骤:

[0060] (1) 枯草芽孢杆菌发酵剂制备:将保存的枯草芽孢杆菌菌种(中国普通微生物菌种保藏管理中心编号CGMCC1.2163)转接到斜面培养基上,37℃培养21h后,挑取8环接种到装有225ml基础种子培养基的500ml三角瓶中,37℃、200r/min振荡培养30h,即得枯草芽孢杆菌发酵剂;

[0061] (2) 乳酸菌菌株活化:在无菌操作条件下,将德氏乳杆菌保加利亚亚种(CGMC 1.1480或CGMC 1.1482或CGMC 1.1863或CGMC 1.2161)、瑞士乳杆菌(JCM 1004)、植物乳杆菌(CGMC No.8211或CGMC No.8212)和发酵乳杆菌(CGMC No.8214)中的任一菌种与嗜热链球菌(CGMC 1.1855或CGMC 1.2471或CGMC 1.1864或CGMC 1.1728)及嗜酸乳杆菌(CGMC 1.1854或CGMC 1.3342或CGMC 1.2919)分别接种于MRS液体培养基中,分别在37-43℃的培养箱中培养20-36小时;

[0062] (3) 乳酸菌发酵剂的制备:将活化后的德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌和发酵乳杆菌中的任一菌种与嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌菌株在无菌操作条件下,分别接种在经巴氏杀菌后冷却至40℃的11.50wt%脱脂乳培养基中,在40℃保温箱中培养5小时,使其活菌数达到10<sup>7</sup>cfu/mL;

[0063] (4) 小米薏米混合乳浆酶解发酵液的制备:选择优质小米及薏米分别淘洗2~3遍,然后将小米与薏米按1:1的质量比例混合均匀,再加入小米质量12倍重的水,煮沸保持30min,用胶体磨磨浆3-4遍得到混合乳浆,加入混合乳浆质量0.06%活力为40U/mg的风味蛋白酶、0.03%活力为30000U/g的α-淀粉酶和0.03%活力为30000U/g的糖化酶,在

53℃,保温 4.5 小时后,冷却至 34℃,加入混合乳浆质量 4.5%的枯草芽孢杆菌发酵剂,在 34℃、转速 200rpm 下振荡培养 28 小时后,150-200 目筛过滤取滤液,将滤液加热到 38℃,经 500MPa 超高压处理 4 次或输出功率为 600W 的超声波处理 30min,即得到小米薏米混合乳浆酶解发酵液;

[0064] (5) 雨生红球藻酶解物的制备:收集雨生红球藻细胞藻泥,悬浮于水溶液中得到质量分数为 12.5%的雨生红球藻溶液,将雨生红球藻溶液用输出功率为 600W 的超声波细胞破碎仪在冰浴中破碎细胞 8min,调 pH 值至 5.5,分别加入雨生红球藻溶液质量 0.08%的活力为 3000U/g 的纤维素酶及雨生红球藻溶液质量 0.08%的活力为 40U/mg 的风味蛋白酶,在 50℃下保温酶解 6 小时,冷却至 20℃并调整 pH 至 7,得到雨生红球藻酶解物;

[0065] (6) 配料:将小米薏米混合乳浆酶解发酵液与雨生红球藻酶解物按质量比 3.5:1 的比例混合得到混合液,再添加混合液质量 12%的脱脂乳粉、5%的白糖,混合均匀再均质;

[0066] (7) 杀菌、冷却、接种:将均质后的混合液加热到 68℃,保温 15 分钟后,冷却至 42℃,在无菌操作的条件下,加入混合液质量 1.5%的德氏乳杆菌保加利亚亚种、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌和发酵乳杆菌中的任一种发酵剂、1.5%的嗜酸乳杆菌发酵剂,2.5%的嗜热链球菌发酵剂,搅拌混合均匀;

[0067] (8) 罐装、发酵:用罐装机罐装至酸奶瓶或塑料杯,封口后,装入塑料框,移入发酵室,在 40℃保温发酵 6 小时;

[0068] (9) 冷却、后熟:将上述发酵结束后的酸奶移入 0-4℃的冷库内冷却、后熟即得薏米小米复合风味功能性酸奶成品。

[0069] 上述斜面培养基的配制方法如下:牛肉膏 3g、NaCl 5g、蛋白胨 10g、琼脂 20g,溶于 1L 蒸馏水中,调 pH 至 7.0-7.2,121℃灭菌 20min 即可。

[0070] 上述基础种子培养基的配制方法如下:牛肉膏 3g、NaCl 5g、蛋白胨 10g,溶于 1L 蒸馏水中,调 pH 至 7.0-7.2,121℃灭菌 20min 即可。

[0071] 上述 MRS 液体培养基的配制方法如下:蛋白胨 10g,牛肉膏 10g,酵母提取物 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2g,柠檬酸二铵 2g,乙酸钠 5g,葡萄糖 20g,吐温 -801mL, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, MnSO<sub>4</sub>0.25g,溶于 1L 蒸馏水,调 pH 至 6.2 ~ 6.4,121℃灭菌 20min 即可。

[0072] 实施例 2

[0073] 同上述实施例 1,其区别在于:

[0074] 步骤 (1) 枯草芽孢杆菌发酵剂制备中:将保存的枯草芽孢杆菌菌种转接到斜面培养基上,37℃培养 18h 后,挑取 6 环接种到装有 200ml 基础种子培养基的三角瓶中,37℃、180r/min 振荡培养 36h;

[0075] 步骤 (2) 乳酸菌菌株活化中:将德氏乳杆菌保加利亚亚种、嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌分别接种于 MRS 液体培养基中,分别在 37℃的培养箱中培养 36 小时;

[0076] 步骤 (3) 乳酸菌发酵剂的制备中:将活化后的德氏乳杆菌保加利亚亚种与嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌菌株,分别接种在经巴氏杀菌后冷却至 37℃的 10wt%脱脂乳培养基中,在 37℃保温箱中培养 8 小时,使其活菌数达到 10<sup>6</sup>cfu/mL;

[0077] 步骤 (4) 小米薏米混合乳浆酶解发酵液的制备中:将小米与薏米等量混合后加入小米质量 10 倍重的水,煮沸保持 25min;加入混合乳浆质量 0.03%活力为 50U/mg 的风味蛋

白酶、0.01%活力为 40000U/g 的  $\alpha$ -淀粉酶和 0.01%活力为 40000U/g 的糖化酶,在 50℃,保温 6 小时后,冷却至 30℃,加入混合乳浆质量 3.0%的枯草芽孢杆菌发酵剂,在 30℃、转速 170rpm 下振荡培养 36 小时后过滤取滤液,将滤液加热到 30℃,经 450MPa 超高压处理 6 次;

[0078] 步骤(5) 雨生红球藻酶解物的制备中:收集雨生红球藻细胞藻泥悬浮于水溶液中得到质量分数为 10%的雨生红球藻溶液,将雨生红球藻溶液用输出功率为 550W 的超声波细胞破碎仪在冰浴中破碎细胞 10min,调 pH 值至 5,分别加入雨生红球藻溶液质量 0.05%的活力为 4000U/g 的纤维素酶及雨生红球藻溶液质量 0.050%的活力为 50U/mg 的风味蛋白酶,在 45℃下保温酶解 8 小时,冷却至 15℃并调整 pH 至 6.5;

[0079] 步骤(6) 配料中:将小米薏米混合乳浆酶解发酵液与雨生红球藻酶解物按质量比 2:1 的比例混合得到混合液,再添加混合液质量 10%的脱脂乳粉、4%的白糖,混合均匀再均质;

[0080] 步骤(7) 杀菌、冷却、接种中:将均质后的混合液加热到 65℃,保温 20 分钟后,冷却至 40℃,加入混合液质量 1.0%的德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵剂、1.0%的嗜酸乳杆菌发酵剂,2.0%的嗜热链球菌发酵剂,搅拌混合均匀;

[0081] 步骤(8) 罐装、发酵中:用罐装机罐装至酸奶瓶或塑料杯,封口后,装入塑料框,移入发酵室,在 37℃保温发酵 8 小时。

[0082] 实施例 3

[0083] 同上述实施例 1,其区别在于:

[0084] 步骤(1) 枯草芽孢杆菌发酵剂制备中:将保存的枯草芽孢杆菌菌种转接到斜面培养基上,37℃培养 24h 后,挑取 10 环接种到装有 250ml 基础种子培养基的三角瓶中,37℃、220r/min 振荡培养 22h;

[0085] 步骤(2) 乳酸菌菌株活化中:将瑞士乳杆菌与嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌分别接种于 MRS 液体培养基中,分别在 43℃的培养箱中培养 20 小时;

[0086] 步骤(3) 乳酸菌发酵剂的制备中:将活化后的瑞士乳杆菌与嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌菌株分别接种在经巴氏杀菌后冷却至 40℃的 13.0wt%脱脂乳培养基中,在 43℃保温箱中培养 3 小时,使其活菌数达到  $10^8$ cfu/mL;

[0087] 步骤(4) 小米薏米混合乳浆酶解发酵液的制备中:将小米与薏米等量混合均匀,再加入小米质量 15 倍重的水,煮沸保持 35min;加入混合乳浆质量 0.09%活力为 30U/mg 的风味蛋白酶、0.05%活力为 20000U/g 的  $\alpha$ -淀粉酶和 0.05%活力为 20000U/g 的糖化酶,在 56℃,保温 3 小时后,冷却至 38℃,加入混合乳浆质量 6.0%的枯草芽孢杆菌发酵剂,在 30℃、转速 250rpm 下振荡培养 20 小时;将滤液加热到 45℃,输出功率为 650W 的超声波处理 10min;

[0088] 步骤(5) 雨生红球藻酶解物的制备中:收集雨生红球藻细胞藻泥,悬浮于水溶液中得到质量分数为 15%的雨生红球藻溶液,将雨生红球藻溶液用输出功率为 650W 的超声波细胞破碎仪在冰浴中破碎细胞 6min,调 pH 值至 6,分别加入雨生红球藻溶液质量 0.10%的活力为 2000U/g 的纤维素酶及雨生红球藻溶液质量 0.05%的活力为 30U/mg 的风味蛋白酶,在 55℃下保温酶解 3 小时,冷却至 25℃并调整 pH 至 7.5;

[0089] 步骤(6) 配料中:将小米薏米混合乳浆酶解发酵液与雨生红球藻酶解物按质量比

5:1 的比例混合得到混合液,再添加混合液质量 15%的脱脂乳粉、6%的白糖;

[0090] 步骤(7) 杀菌、冷却、接种中:将均质后的混合液加热到 70℃,保温 10 分钟后,冷却至 43℃,加入混合液质量 2.0%的瑞士乳杆菌发酵剂、2.0%的嗜酸乳杆菌发酵剂,3.0%的嗜热链球菌发酵剂;

[0091] 步骤(8) 罐装、发酵中:用罐装机罐装至酸奶瓶或塑料杯,封口后,装入塑料框,移入发酵室,在 43℃保温发酵 3 小时。

[0092] 实施例 4

[0093] 同上述实施例 1,其区别在于:

[0094] 步骤(2) 乳酸菌菌株活化中:将植物乳杆菌与嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌分别接种于 MRS 液体培养基中,分别在 42℃的培养箱中培养 24 小时;

[0095] 步骤(3) 乳酸菌发酵剂的制备中:将活化后的植物乳杆菌与嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌菌株分别接种在经巴氏杀菌后冷却至 40℃的 12.0wt%脱脂乳培养基中,在 40℃保温箱中培养 5 小时,使其活菌数达到  $10^8$ cfu/mL;

[0096] 步骤(4) 小米薏米混合乳浆酶解发酵液的制备中:将滤液加热到 40℃,输出功率为 550W 的超声波处理 50min;

[0097] 步骤(6) 配料中:将小米薏米混合乳浆酶解发酵液与雨生红球藻酶解物按质量比 4:1 的比例混合得到混合液,再添加混合液质量 14%的脱脂乳粉、5%的白糖;

[0098] 步骤(7) 杀菌、冷却、接种中:将均质后的混合液加热到 70℃,保温 10 分钟后,冷却至 43℃,加入混合液质量 2.0%的植物乳杆菌发酵剂、2.0%的嗜酸乳杆菌发酵剂,3.0%的嗜热链球菌发酵剂;

[0099] 步骤(8) 罐装、发酵中:用罐装机罐装至酸奶瓶或塑料杯,封口后,装入塑料框,移入发酵室,在 41℃保温发酵 5 小时。

[0100] 实施例 5

[0101] 同上述实施例 1,其区别在于:

[0102] 步骤(2) 乳酸菌菌株活化中:将发酵乳杆菌与嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌分别接种于 MRS 液体培养基中,分别在 42℃的培养箱中培养 24 小时;

[0103] 步骤(3) 乳酸菌发酵剂的制备中:将活化后的发酵乳杆菌与嗜热链球菌及嗜酸乳杆菌菌株分别接种在经巴氏杀菌后冷却至 39℃的 11.0wt%脱脂乳培养基中,在 40℃保温箱中培养 5 小时,使其活菌数达到  $10^8$ cfu/mL;

[0104] 步骤(4) 小米薏米混合乳浆酶解发酵液的制备中:将滤液加热到 35℃,经 600MPa 超高压处理 3 次;

[0105] 步骤(7) 杀菌、冷却、接种中:将均质后的混合液加热到 70℃,保温 10 分钟后,冷却至 43℃,加入混合液质量 2.0%的发酵乳杆菌发酵剂、2.0%的嗜酸乳杆菌发酵剂,3.0%的嗜热链球菌发酵剂。

[0106] 当然,上述说明并非对本发明的限制,所使用的具体菌株也是为了说明本方案,不应理解为对菌株的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在本发明的实质范围内做出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明保护范围。