

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 9 月 10 日 (10.09.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/177421 A1

(51) 国际专利分类号:
A23L 2/38 (2006.01) *A23L 2/84* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/123518

(22) 国际申请日: 2019 年 12 月 6 日 (06.12.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910156395.7 2019年3月1日 (01.03.2019) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 张 慇 (ZHANG, Min); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 劳艳艳 (LAO, Yanyan); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 阳武雄 (YANG, Wuxiong); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 易思富 (YI, Sifu); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 侯丽华 (HOU, Lihua); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 郭小玲 (GUO, Xiaoling); 中国江苏省无锡蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) **Title:** METHOD FOR PREPARING CORDYCEPS MILITARIS FERMENT BY TWO-STAGE FERMENTATION AND COMPLEX ENZYMATIC HYDROLYSIS

(54) **发明名称:** 一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法

(57) **Abstract:** The present application belongs to the technical field of research and development of fermented beverages, and discloses a method for preparing Cordyceps militaris ferment by two-stage fermentation and complex enzymatic hydrolysis. The present application involves preparation of a Cordyceps militaris powder and a Cordyceps militaris slurry, preparation of a Cordyceps militaris fermentation substrate, lactic acid bacteria fermentation in combination with complex enzymatic hydrolysis, and yeast fermentation, followed by centrifugation, filtration, formulation, sterilization, and filling to obtain a product. By employing lactic acid bacteria fermentation in combination with complex enzymatic hydrolysis, and secondary fermentation by yeast, the present application can quickly finish a whole fermentation process in 2 to 3 days. The Cordyceps militaris ferment obtained is sweet and sour, has a good taste and a unique flavor, has a good suspension stability, and can preserve cordycepin well, which is an important active component. The cordycepin in Cordyceps militaris powder has a dissolution rate of up to 78.21%, and the dissolved cordycepin achieves a preservation rate of up to 97.78%. The obtained Cordyceps militaris ferment has antioxidant and immune-enhancing effects, and satisfies modern requirements for a healthy and delicious high-quality beverage.

(57) **摘要:** 一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法, 属于发酵饮料的研制与开发技术领域。本发明通过蛹虫草粉和蛹虫草浆的制备、蛹虫草发酵基质的制备、复合酶解协同乳酸菌发酵、酵母菌发酵等过程, 再经过离心、过滤、调配、杀菌、灌装制得产品。本发明利用复合酶解协同乳酸菌发酵, 再经过酵母菌的二次发酵, 可以在2~3天的时间内快速完成整个发酵过程, 得到的蛹虫草酵素酸甜可口、风味独特、悬浮稳定性好, 并能很好地保留虫草素这一重要活性成分: 虫草粉中虫草素的溶出量可达78.21%, 溶出虫草素的保存率最高达到了97.78%, 具有一定抗氧化性和提高免疫力的功能, 符合现代人们对健康、美味的高品质饮料的追求。

WO 2020/177421 A1

一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法，具体涉及一种以红糖为碳源，利用复合酶解促进乳酸菌发酵，然后再接种酵母菌进行二次发酵的快速发酵法，属于发酵饮料的研制与开发技术领域。

背景技术

[0002] 蛹虫草是一种寄生真菌，已在2009年被列为新资源食品，其含有多种营养成分，如蛋白质及氨基酸、虫草多糖、虫草酸（D-甘露醇）、虫草素和超氧化物歧化酶（SOD）等。古书记载和现代研究表明，蛹虫草的药用价值与冬虫夏草相似，并可与人参、鹿茸相媲美，其特有的虫草素可以作为一种核苷类似物打乱DNA和RNA的合成，从而使癌细胞凋亡，具有抗肿瘤、降血糖、免疫调节和抑菌消炎等多种生理功能。

[0003] 在我国，蛹虫草作为一种食用菌，以鲜食为主，如日常家庭饮食中，常常将其用于煲汤。新鲜蛹虫草不易保存，易长“白毛”，将其露置于空气中易发生褐变，若将鲜虫草子实体进行适当的干制或加工处理，既能延长蛹虫草的储存期，又能使营养成分得以保存，大大提升了其应用价值。目前，以蛹虫草为原料进行加工的产品多种多样，如蛹虫草含片、面包、罐头、肴肉、饮料、蛹虫草酒等，蛹虫草制品因其丰富的营养价值和独特的风味，发展前景广阔。

[0004] 随着经济的发展和生活水平的提高，人们的保健意识也慢慢增强，健康营养又美味的饮料也逐渐成为消费者的新宠。酵素是一种新型发酵饮料，最初起源于日本，一般是以蔬菜、水果、谷物、豆类、药食同源的食用菌和中药等为原料，经过乳酸菌、酵母菌、醋酸菌等益生菌发酵而成的，含有多种酶、维生素、微量元素、酯类和多酚等营养物质的微生物制剂。研究表明，酵素具有预防肥胖、抗氧化、抗衰老、促进细胞新生、增强免疫力等保健功能，如今在欧美、日本以及我国的台湾地区十分流行。尽管国内市场上也出现了少量的酵素产品，但发酵时间长、产品质量参差不齐，因此我国的酵素产业还有广阔的发展空

间。

- [0005] 郭红莲等（2018）以枸杞干果为原料，利用枸杞自身固有的多种有益菌常温密封自然发酵45d，得到了含有酯类、醛类、酮类、醇类、酸类、芳香杂环类等风味物质，并具有较强的抗氧化性的枸杞酵素。自然发酵虽使这一产品拥有良好的风味和较强的抗氧化性，但发酵时间长，对生产条件要求高，产品品质不易控制。与其相比，本发明采用接种发酵，大大提高了发酵效率，缩短了发酵时间，仅用2~3d就可以完成整个发酵过程，所得的蛹虫草酵素酸甜可口，并对蛹虫草特有的功能性成分虫草素也有较好的保留。
- [0006] 刘勤等公开了“一种枸杞柠檬柚子皮酵素的制备方法”（中国专利申请号201611136927.3），其将一定配比的枸杞、柠檬、柚子皮清洗、晾干后切丁放入发酵罐中，再加入一定量的红糖和蜂蜜淹没水果，搅拌均匀，在密封条件下进行自然发酵，发酵时间为30~40天。该方法中所用的柚子皮，柠檬等原料，纤维素和果胶含量高，难以被常见的益生菌分解利用，则用该法生产的酵素，发酵周期长，营养成分也难以有效溶出。与其相比，本发明采用酶解协同接种发酵的方法，能使蛹虫草中的大分子物质分解，促进益生菌的利用，并使蛹虫草中的营养成分充分溶出，提高了发酵效率，缩短了发酵时间，制得的产品风味优良，营养丰富。
- [0007] 刘忠诚等公开了“一种抗疲劳增强免疫力的蛹虫草复合酵素饮品制备方法”（中国专利申请号：201810158350.9），其先将人参、玛咖、黄精、枸杞、葛根等中药通过浸泡、煎煮、浓缩、灭菌、过滤等步骤得到营养液，再加入红糖混合均匀得培养液，最后加入蛹虫草粉，并接种根霉菌、红曲霉菌种密封发酵3~6个月即得产品。该法制得的蛹虫草复合酵素饮料营养丰富，具有多种保健功能，且其接种了根霉菌和红曲霉菌进行了复合发酵，使原料中的有毒有害物质得到了降解，然而其未使用酶解技术，降低了发酵的效率，增加了发酵时间。与其相比本发明不光采用了两步接种发酵技术，还利用复合酶解与乳酸菌发酵共同进行的方式，进一步提高了乳酸菌的发酵效率，使得能快速制得品质较高的蛹虫草酵素产品。
- [0008] 卢利群等公开了“一种麦苗酵素的快速发酵制备方法”（中国专利申请号201510

653100.9)，其通过人工接种酵母菌的方式对经过辅料调配和灭菌的大麦苗匀浆进行发酵，仅用12h就完成了整个发酵过程，并得到了高酶活、抗氧化性较强的麦苗酵素，然而其仅用酵母菌发酵，虽简化了工艺，但所得产品的口感欠佳。与其相比，本发明采用了先乳酸菌后酵母菌发酵的方式，利用简单的原料和简捷的工艺不但快速完成了整个发酵过程，还有效保留了营养成分，得到了口感好、营养佳的酵素产品。

[0009] 王勇等公开了“一种可以提高机体免疫力的蛹虫草饮料及其制备方法”（中国专利申请号：201610097996.1），其所用原料包括鲜观音柴叶、蛹虫草、月季花瓣粉、月季花粉、红参、枸杞子、酵母菌、蛋白酶等。该专利中虽也利用了酶解和接种发酵技术，但由于所用原料繁多，其发酵周期依旧较长，需要在28~30℃下发酵22~24d。与其相比，本发明采用简单的原料，并改进了工艺，先同时进行复合酶解和乳酸菌发酵，再进行酵母菌发酵，2~3d就完成了整个发酵过程，并得到风味独特，营养丰富的产品。

[0010] 江晓路等公开了“一种基于酶酵耦合生产蛹虫草酵素的方法”（中国专利申请号201711263212.9），其以蛹虫草菌丝体或菌粉为原料，采用先联合酶解2h，再接种植物乳杆菌耦合发酵12~48h的方式，获得了液体蛹虫草酵素产品。徐国华等公开了“一种蛹虫草果蔬酵素的制备方法”（中国专利申请号201810085470.0），其将蛹虫草粉溶于水，加入1~2%几丁质酶酶解后浓缩，然后将得到的蛹虫草浓缩液与加有麦芽糖醇和木糖醇的果蔬汁按1: 3~5的比例混合，并接种3.5~7%的青春双歧杆菌、干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌、嗜热链球菌、鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌和保加利亚乳杆菌这七种乳酸菌进行发酵，发酵4~6天即得产品。张芙蓉等公开了“一种发酵蛹虫草益生菌饮料及其制备方法”（中国专利申请号201810069589.9），其以蛹虫草菌粉为主要原料，并加入灵芝菌粉、富硒酵母粉，大豆蛋白粉、菊花提取物和枸杞提取物混合得到原液，然后利用 α -淀粉酶、糖化酶、纤维素酶、果胶酶和蛋白酶将原液酶解，得到预处理的原液之后，接种4~6%的青春双歧杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和嗜酸乳杆菌四种益生菌，并加入5~20%的木糖醇在37℃下进行恒温发酵40h即得产品。上述方法均采用了先酶解原液后发酵的工艺，而本发明中的第一步发酵采用酶解与发酵同时进行的方式，

能在保持产品品质的基础上最大程度节省加工时间。此外本发明虽然所用原料简单，但先接种乳酸菌后接种酵母菌进行了两步发酵，使酵素产品多了一份醇香，风味相比一步发酵所制得的酵素更为突出，同时也省去了制备其它中草药或果蔬处理液的工艺，节省了成本。

发明概述

技术问题

[0011] 本发明的目的是提供一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法，利用复合酶解协同乳酸菌发酵、酵母菌发酵等工艺，可以快速完成整个发酵过程，大大缩短发酵周期。该法所采用的原料和工艺都十分简单，仅以蛹虫草粉为原料，不添加额外的果蔬或中草药，又将红糖作为发酵过程中的碳源，成本较低，所得产品酸甜可口、风味独特、悬浮稳定性好，并能很好地保留虫草素这一重要功能成分，具有一定的推广价值。

问题的解决方案

技术解决方案

[0012] (1) 蛹虫草粉和蛹虫草浆的制备：将蛹虫草干样去杂后，利用电机转速为3400r/min的高速粉碎机粉碎，并过100目筛，得蛹虫草粉；蛹虫草粉与水按照1:10~15的质量比例互溶后，用转速为3000~3600r/min的高速匀浆机间歇搅拌1~2min混匀，每次持续时间不超过10s，得到蛹虫草浆；

[0013] (2) 蛹虫草发酵基质的制备：以蛹虫草发酵基质的总质量计，其中30~40%为步骤(1)所得的蛹虫草浆，10~20%为作为发酵碳源的红糖，其余为蒸馏水；对配制好的蛹虫草发酵基质进行巴氏杀菌处理；

[0014] (3) 复合酶解协同乳酸菌发酵：将杀完菌的蛹虫草发酵基质冷却到40~45℃，用柠檬酸溶液调pH至4.80~5.00，以蛹虫草发酵基质的总质量计，加入0.4~0.6%的纤维素酶和0.4~0.6%的果胶酶，并在发酵基质上接种0.1~0.2%的乳酸菌，使复合酶解和乳酸菌同时在40~45℃下酶解并发酵36~48h，然后在85~90℃的水浴锅中灭酶5~10min，获得发酵液；

[0015] (4) 果酒酵母菌发酵：将步骤(3)所得的发酵液降温至28~32℃，然后接种0.10~0.15% (w/w) 的果酒酵母菌，在26~30℃下恒温发酵6~18h；

- [0016] (5) 离心: 取经过乳酸菌、果酒酵母菌两步发酵的蛹虫草发酵液进行离心4200r/min, 10min, 离心后过滤得澄清液;
- [0017] (6) 调配: 在步骤(5)离心所得的澄清液中加入稳定剂;
- [0018] (7) 杀菌灌装: 调配完的发酵液进行95~100°C, 5~10min的杀菌; 冷却到85~90°C, 趁热灌入已预先灭菌的玻璃瓶内, 即得到蛹虫草酵素产品。
- [0019] 所述步骤(2)中的巴氏消毒温度为80~90°C, 时间为10~20min。
- [0020] 所述步骤(3)中, 柠檬酸溶液浓度为10% (w/w); 所述纤维素酶的酶活为5万U/g, 果胶酶的酶活为10万U/g, 适宜的酶解温度为40~50°C。
- [0021] 所述步骤(3)中, 所述乳酸菌的接种过程在超净台中完成; 所述乳酸菌为益生菌发酵菌粉, 其中含有植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、乳双歧杆菌、干酪乳杆菌和长双歧杆菌, 菌种量达80亿CFU/g, 适宜生长温度为37~45°C。
- [0022] 所述步骤(4)中, 果酒酵母菌的接种过程在超净台中完成; 所述果酒酵母菌为“葡萄酒果酒专用酵母粉”, 使用前需先用35~40°C温水进行活化, 再将其接种至温度为26~30°C的发酵液中。
- [0023] 所述的稳定剂为黄原胶和羧甲基纤维素钠CMC-Na的复配稳定剂, 其中稳定剂的总添加量为0.10~0.20% (w/w), 复配比为黄原胶: CMC-Na=2:1。

发明的有益效果

有益效果

- [0024] 1、与自然发酵相比, 本方法采用接种发酵, 大大提高了发酵效率, 缩短了发酵时间, 并得到了风味独特, 营养丰富的产品;
- [0025] 2、与先酶解后发酵相比, 本方法的酶解与第一步发酵同时进行, 在保证酶解效果和发酵品质的基础上, 最大限度地简化了工艺, 缩短了加工时间;
- [0026] 3、与一步发酵相比, 本方法采用先接种乳酸菌, 后接种酵母菌的两步发酵法, 丰富了产品的风味, 使蛹虫草酵素无需添加其它果蔬原料也能具有优良的口感;
- [0027] 4、综合来看, 采用本发酵工艺, 操作简单易行, 发酵周期短, 生产成本低, 适于大规模的推广生产。

发明实施例

本发明的实施方式

[0028] 下面将结合具体实施例对本发明的技术方案进行进一步的说明。

[0029] 实施例1：一种结合低比例纤维素酶/果胶酶复合酶解的蛹虫草酵素的快速发酵方法

[0030] 蛹虫草干样去杂后，利用高速粉碎机粉碎，并过100目筛，得蛹虫草粉；将蛹虫草粉与水1：10互溶，并用高速匀浆机搅拌均匀，得蛹虫草浆；取300g蛹虫草浆液，加入150g红糖，并加550g蒸馏水定量至1kg，充分搅拌，使红糖溶解完全，再经过85℃，10min的巴氏杀菌处理后，即得蛹虫草的发酵基质；等发酵基质冷却至40~45℃，调pH至4.80±0.10，加入0.4%的纤维素酶和0.6%的果胶酶，并接种1g复合乳酸菌粉，使复合酶解与乳酸菌发酵同时在40℃下进行48h，然后在90℃的水浴锅中灭酶5min；待乳酸菌发酵液冷却至30℃，加入1g用10倍温水活化后的果酒酵母，在28℃条件下发酵12h；发酵液进行离心过滤后，加入总量为1g的黄原胶和CMC-Na，两者复配比为黄原胶：CMC-Na=2:1；最后，将调配好的发酵液在100℃下杀菌10min后冷却至85℃进行热灌装，即得蛹虫草酵素。

[0031] 通过感官、电子鼻检测对产品的风味进行分析。所得产品红糖味浓郁，为清亮透明的红棕色，酸甜适口，并有一股淡淡的醇香味；利用电子鼻对产品发酵过程中风味成分的变化进行了分析，发现与仅接种乳酸菌的发酵液相比，经过乳酸菌和酵母菌两步发酵的发酵液，S1传感器（芳香族化合物类）响应值上升了约131%，S5传感器（萜类、酯类）响应值上升了约114%，可见利用两步发酵能使酵素风味更为突出。

[0032] 对产品的理化指标和功能性成分进行分析：所得终产品pH为3.60±0.02，可溶性固形物约为15.6%，酒精含量<0.5g/100g；虫草素含量为45.940±1.538g/mL，其保留率约为77.68%，说明该发酵工艺对虫草素的影响较小，对产品中的虫草素有较好的保留作用；所得产品的羟自由基清除率为79.27±0.94%，并利用了铁氰化钾法测定酵素还原力，结果显示产品在700nm的吸光值为0.7396±0.0083，说明所得产品还原力较强，具有一定的抗氧化性。

[0033] 实施例2：一种结合等比例纤维素酶/果胶酶复合酶解的蛹虫草酵素的快速发酵方法

- [0034] 蛹虫草干样去杂后，利用高速粉碎机粉碎，并过100目筛，得蛹虫草粉；将蛹虫草粉与水1: 10互溶，并用高速匀浆机搅拌均匀，得蛹虫草浆；取300g蛹虫草浆液，加入150g红糖，并加550g蒸馏水定量至1kg，充分搅拌，使红糖溶解完全，再经过85℃，10min的巴氏杀菌处理后，即得蛹虫草的发酵基质；等发酵基质冷却至40~45℃，调pH至4.80±0.10，加入0.5%的纤维素酶和0.5%的果胶酶，并接种1g复合乳酸菌粉，使复合酶解与乳酸菌发酵同时在40℃下进行48h，然后在90℃的水浴锅中灭酶5min；待乳酸菌发酵液冷却至30℃，加入1g用10倍温水活化后的果酒酵母，在28℃条件下发酵12h；发酵液进行离心过滤后，加入总量为1g的黄原胶和CMC-Na（两者复配比为黄原胶：CMC-Na=2:1）；最后，将调配好的发酵液在100℃下杀菌10min后冷却至85℃进行热灌装，即得蛹虫草酵素。
- [0035] 通过感官、电子鼻检测对产品的风味进行分析。所得产品红糖味浓郁，为清亮透明的红棕色，口感酸甜适中，并有一股淡淡的醇香味；利用电子鼻对产品发酵过程中风味成分的变化进行了分析，发现与仅接种乳酸菌的发酵液相比，经过乳酸菌和酵母菌两步发酵的发酵液，S1传感器（芳香族化合物类）响应值上升了约136%，S5传感器（萜类、酯类）响应值上升了约128%，可见利用两步发酵能使酵素风味更为突出。
- [0036] 对产品的理化指标和功能性成分进行分析：所得终产品pH为3.54±0.02，可溶性固形物约为14.5%，酒精含量<0.5g/100g；终产品的虫草素含量为58.808±0.116g/mL，其保留率约为97.87%，说明该发酵工艺对虫草素的影响很小，对产品中的虫草素有很好的保留作用；所得产品的羟自由基清除率为71.46±0.22%，利用铁氰化钾法测定酵素还原力，结果显示产品在700nm的吸光值为0.8478±0.0056，说明所得产品还原力较强，具有一定的抗氧化性。
- [0037] 实施例3：一种结合高比例纤维素酶/果胶酶复合酶解的蛹虫草酵素的快速发酵方法
- [0038] 蛹虫草干样去杂后，利用高速粉碎机粉碎，并过100目筛，得蛹虫草粉；将蛹虫草粉与水1: 10互溶，并用高速匀浆机搅拌均匀，得蛹虫草浆；取300g蛹虫草浆液，加入150g红糖，并加550g蒸馏水定量至1kg，充分搅拌，使红糖溶解完全，再经过85℃，10min的巴氏杀菌处理后，即得蛹虫草的发酵基质；等发酵基质

冷却至40~45℃，调pH至4.80±0.10，加入0.6%的纤维素酶和0.4%的果胶酶，并接种1g复合乳酸菌粉，使复合酶解与乳酸菌发酵同时在40℃下进行48h，然后在90℃的水浴锅中灭酶5min；待乳酸菌发酵液冷却至30℃，加入1g用10倍温水活化后的果酒酵母，在28℃条件下发酵12h；发酵液进行离心过滤后，加入总量为1g的黄原胶和CMC-Na（两者复配比为黄原胶：CMC-Na=2:1）；最后，将调配好的发酵液在100℃下杀菌10min后冷却至85℃进行热灌装，即得蛹虫草酵素。

[0039] 通过感官、电子鼻检测对产品的风味进行分析。所得产品红糖味浓郁，为清亮透明的红棕色，酸甜适口，并有一股淡淡的醇香味；利用电子鼻对产品发酵过程中风味成分的变化进行了分析，发现与仅接种乳酸菌的发酵液相比，经过乳酸菌和酵母菌两步发酵的发酵液，S1传感器（芳香族化合物类）响应值上升了约121%，S5传感器（萜类、酯类）响应值上升了约132%，可见利用两步发酵能使酵素风味更为突出。

[0040] 对产品的理化指标和功能性成分进行分析：所得终产品pH为3.53±0.01，可溶性固形物约为14.9%，酒精含量<0.5g/100g；终产品的虫草素含量为47.289±1.953g/mL，其保留率为79.95%，说明该发酵工艺对虫草素的影响较小，对产品中的虫草素有较好的保留作用；所得产品的羟自由基清除率为70.31±0.61%，并利用了铁氰化钾法测定酵素还原力，结果显示产品在700nm的吸光值为0.8072±0.0027，说明了所得产品还原力较强，具有一定的抗氧化性。

[0041] 为了更好地说明酶解与一次发酵同时进行的效果，增添以下对比例。

[0042] 对比例1：结合等比例的纤维素酶/果胶酶进行酶解协同一次发酵与先酶解后发酵的效果对比

[0043] 结合等比例的纤维素酶/果胶酶进行酶解协同一次发酵的方法参见实施例2。相对应的，采用先酶解后发酵的方式进行蛹虫草酵素制备的具体方式如下：蛹虫草干样去杂后，利用高速粉碎机粉碎，并过100目筛，得蛹虫草粉；将蛹虫草粉与水1:10互溶，并用高速匀浆机搅拌均匀，得蛹虫草浆；所得蛹虫草浆调pH至4.80±0.10，加入0.5%的纤维素酶和0.5%的果胶酶，在50℃的水浴锅中酶解4h，完成酶解后在温度为90℃的水浴锅中灭酶5min；取350g酶解后的蛹虫草浆液，加入150g红糖，并加500g蒸馏水定量至1kg，充分搅拌，使红糖溶解完全，再经过

85℃，10min的巴氏杀菌处理后，即得蛹虫草的发酵基质；待发酵基质冷却至45℃左右，接种1g复合乳酸菌粉，在40℃条件下发酵48h，然后加入1g用10倍温水活化后的果酒酵母，在28℃条件下发酵12h，即完成发酵；发酵液进行离心过滤后，加入总量为1.5g的黄原胶和CMC-Na，两者复配比为黄原胶：CMC-Na=2:1；最后，将调配好的发酵液在100℃下杀菌5min后冷却至85℃进行热灌装，即得先酶解后发酵的蛹虫草酵素。工艺方面，酶解协同一次发酵采用了低温长时酶解的方式，即在40℃下酶解48h，有别于先酶解后发酵中的高温短时酶解，即在50℃下酶解4h。

[0044] 采用酶解协同一次发酵所得酵素的风味更为丰富，电子鼻有更高的响应值。与先酶解后发酵相比，具有代表性的两个传感器S1（代表芳香族化合物类）响应值上升了约36%，S5（代表萜类、酯类）响应值上升了约33%。

[0045] 两者终产品的pH和可溶性固形物相差不大，酒精含量也同样小于0.5g/100g。而先酶解后发酵的酵素产品中，虫草素含量为 56.159 ± 0.014 mg/L，相比酶解协同一次发酵产品中的虫草素减少了约18%；其羟自由基清除率为 $59.58 \pm 0.69\%$ ，相比酶解协同一次发酵产品的清除率降低了约17%；利用铁氰化钾法测定酵素还原力，结果显示其在700nm的吸光值为 0.6177 ± 0.0086 ，相比酶解协同一次发酵产品的还原力降低了约18%。

[0046] 从以上结果可以看出，同时进行酶解和一步发酵，不但节省了前期酶解预处理的时间，还能增进酵素产品的风味，增加酵素中的虫草素含量，提高其抗氧化性。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法，其特征在于，步骤如下：
- (1) 蛹虫草粉和蛹虫草浆的制备：将蛹虫草干样去杂后，利用电机转速为34000r/min的高速粉碎机粉碎，并过100目筛，得蛹虫草粉；蛹虫草粉与水按照1:10~15的质量比例互溶后，用转速为3000~3600r/min的高速匀浆机间歇搅拌1~2min混匀，每次持续时间不超过10s，得到蛹虫草浆；
- (2) 蛹虫草发酵基质的制备：以蛹虫草发酵基质的总质量计，其中30~40%为步骤（1）所得的蛹虫草浆，10~20%为作为发酵碳源的红糖，其余为蒸馏水；对配制好的蛹虫草发酵基质进行巴氏杀菌处理；
- (3) 复合酶解协同乳酸菌发酵：将杀完菌的蛹虫草发酵基质冷却到40~45℃，用柠檬酸溶液调pH至4.80~5.00，以蛹虫草发酵基质的总质量计，加入0.4~0.6%的纤维素酶和0.4~0.6%的果胶酶，并在发酵基质上接种0.1~0.2%的乳酸菌，使复合酶解和乳酸菌同时在40~45℃下酶解并发酵36~48h，然后在85~90℃的水浴锅中灭酶5~10min，获得发酵液；
- (4) 果酒酵母菌发酵：将步骤（3）所得的发酵液降温至28~32℃，然后接种0.10~0.15%（w/w）的果酒酵母菌，在26~30℃下恒温发酵6~18h；
- (5) 离心：取经过乳酸菌、果酒酵母菌两步发酵的蛹虫草发酵液进行离心4200r/min，10min，离心后过滤得澄清液；
- (6) 调配：在步骤（5）离心所得的澄清液中加入稳定剂；
- (7) 杀菌灌装：调配完的发酵液进行95~100℃，5~10min的杀菌；冷却到85~90℃，趁热灌入已预先灭菌的玻璃瓶内，即得到蛹虫草酵素产品。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法，其特征在于，所述步骤（2）中的巴氏消毒温度为80~90℃

，时间为10~20min。

- [权利要求 3] 根据权利要求1或2所述的一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法，其特征在于，所述步骤（3）中，柠檬酸溶液浓度为10%（w/w）；所述纤维素酶的酶活为5万U/g，果胶酶的酶活为10万U/g，适宜的酶解温度为40~50℃。
- [权利要求 4] 根据权利要求1或2所述的一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法，其特征在于，所述步骤（3）中，所述乳酸菌的接种过程在超净台中完成；所述乳酸菌为益生菌发酵菌粉，其中含有植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、乳双歧杆菌、干酪乳杆菌和长双歧杆菌，菌种量达80亿CFU/g，适宜生长温度为37~45℃。
- [权利要求 5] 根据权利要求3所述的一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法，其特征在于，所述步骤（3）中，所述乳酸菌的接种过程在超净台中完成；所述乳酸菌为益生菌发酵菌粉，其中含有植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、乳双歧杆菌、干酪乳杆菌和长双歧杆菌，菌种量达80亿CFU/g，适宜生长温度为37~45℃。
- [权利要求 6] 根据权利要求1、2或5所述的一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法，其特征在于，所述步骤（4）中，果酒酵母菌的接种过程在超净台中完成；所述果酒酵母菌为“葡萄酒果酒专用酵母粉”，使用前需先用35~40℃温水进行活化，再将其接种至温度为26~30℃的发酵液中。
- [权利要求 7] 根据权利要求3所述的一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法，其特征在于，所述步骤（4）中，果酒酵母菌的接种过程在超净台中完成；所述果酒酵母菌为“葡萄酒果酒专用酵母粉”，使用前需先用35~40℃温水进行活化，再将其接种至温度为26~30℃的发酵液中。
- [权利要求 8] 根据权利要求4所述的一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法，其特征在于，所述步骤（4）中，果酒酵母菌的接种过程在超净台中完成；所述果酒酵母菌为“葡萄酒果酒专用酵母粉”，使用

前需先用35~40℃温水进行活化，再将其接种至温度为26~30℃的发酵液中。

[权利要求 9] 根据权利要求1、2、5、7或8所述的一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法，其特征在于，所述的稳定剂为黄原胶和羧甲基纤维素钠CMC-Na的复配稳定剂，其中稳定剂的总添加量为0.10~0.20%（w/w），复配比为黄原胶：CMC-Na=2:1。

[权利要求 10] 根据权利要求6所述的一种结合复合酶解的两步式蛹虫草酵素的发酵制备方法，其特征在于，所述的稳定剂为黄原胶和羧甲基纤维素钠CMC-Na的复配稳定剂，其中稳定剂的总添加量为0.10~0.20%（w/w），复配比为黄原胶：CMC-Na=2:1。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/123518

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L 2/38(2006.01)i; A23L 2/84(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI; CJFD; CATXT; GBXT; EPTXT; DWPI; USTXT; WOTXT; CNABS: 冬虫夏草, 虫草, 发酵, 酶解, 纤维素酶, 乳酸菌, 乳杆菌, 双歧杆菌, 果胶酶, 酵母, aweto, cordyceps, caterpillar, ferment+, enzymolysis, cellulase, Lactobacillus, Bifidobacterium, pectinase, yeast

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109717340 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 07 May 2019 (2019-05-07) claims 1-10	1-10
A	CN 107951011 A (OCEAN UNIVERSITY OF CHINA) 24 April 2018 (2018-04-24) claims 1-3	1-10
A	CN 107509901 A (DALIAN POLYTECHNIC UNIVERSITY) 26 December 2017 (2017-12-26) claims 1-4	1-10
A	CN 107927497 A (SHANDONG BEILONG DUZHONG BIOLOGICAL ENG CO., LTD.) 20 April 2018 (2018-04-20) claims 1-7	1-10
A	CN 107213194 A (XING, Duowei) 29 September 2017 (2017-09-29) claims 1-6	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 2020

Date of mailing of the international search report

09 March 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/123518

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	109717340	A	07 May 2019	None	
CN	107951011	A	24 April 2018	None	
CN	107509901	A	26 December 2017	None	
CN	107927497	A	20 April 2018	None	
CN	107213194	A	29 September 2017	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/123518

A. 主题的分类

A23L 2/38(2006.01)i; A23L 2/84(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A23L

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: CNKI;CJFD;CATXT;GBTXT;EPTXT;DWPI;USTXT;WOTXT;CNABS; 关键词: 冬虫夏草, 虫草, 发酵, 酶解, 纤维素酶, 乳酸菌, 乳杆菌, 双歧杆菌, 果胶酶, 酵母, aweto, cordyceps, caterpillar, ferment+, enzymolysis, cellulase, Lactobacillus, Bifidobacterium, pectinase, yeast

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 109717340 A (江南大学) 2019年 5月 7日 (2019 - 05 - 07) 权利要求1-10	1-10
A	CN 107951011 A (中国海洋大学) 2018年 4月 24日 (2018 - 04 - 24) 权利要求1-3	1-10
A	CN 107509901 A (大连工业大学) 2017年 12月 26日 (2017 - 12 - 26) 权利要求1-4	1-10
A	CN 107927497 A (山东贝隆杜仲生物工程有限公司) 2018年 4月 20日 (2018 - 04 - 20) 权利要求1-7	1-10
A	CN 107213194 A (邢夺伟) 2017年 9月 29日 (2017 - 09 - 29) 权利要求1-6	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 2月 17日

国际检索报告邮寄日期

2020年 3月 9日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

赵学武

电话号码 86-(10)-62411155

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/123518

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	109717340	A	2019年 5月 7日	无	
CN	107951011	A	2018年 4月 24日	无	
CN	107509901	A	2017年 12月 26日	无	
CN	107927497	A	2018年 4月 20日	无	
CN	107213194	A	2017年 9月 29日	无	