

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710034296.9

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A61K 36/064 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年7月23日

[11] 公开号 CN 101225365A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 3/00 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/23 (2006.01)
C12R 1/245 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

[22] 申请日 2007.1.18

[21] 申请号 200710034296.9

[71] 申请人 马小明

地址 330096 江西省南昌市高新开发区高新
七路999号万科四季花城百合苑82号
G302

[72] 发明人 马小明

[74] 专利代理机构 南昌佳诚专利事务所
代理人 闵蓉 刘守正

权利要求书2页 说明书7页

[54] 发明名称

一种复合菌种发酵剂及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种复合菌种发酵剂及其制备方法,属于微生物发酵领域其主要是由等量的德氏乳杆菌保加利亚亚种、乳酸乳球菌、肠膜明串珠菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、克鲁维酵母和酒香酵母制成;本发酵剂的制备方法,主要是对上述菌种优化培养,分别发酵,离机处理,浓缩后加入细胞保护剂,真空冷冻。本发酵剂由多种功能菌复合组成,由此发酵剂制成的酸奶,风味独特,其功能指标和开菲尔粒子发酵的酸奶接近,可作为优良的直投式开菲尔发酵剂,其发酵酸奶对病原微生物有较强的抑制作用;对胃肠道疾病、代谢疾病、高血压、心脏病等也都具有良好的疗效。

1、一种复合菌种发酵剂，其特征在于它主要是由下列等量重量比原料制成：德氏乳杆菌保加利亚亚种、乳酸乳球菌、肠膜明串珠菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、克鲁维酵母、酿酒酵母，进行高密度培养后真空冷冻干燥，制成直投式单菌发酵剂再以等量细胞数目复合成复合菌种发酵剂。

2、根据权利要求1所述的一种复合菌种发酵剂的制备方法如下：

(1) 对菌种德氏乳杆菌保加利亚亚种、乳酸乳球菌、肠膜明串珠菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、克鲁维酵母和酒香酵母，进行高密度培养，方法和步骤如下；各菌以3~5%培养基的量接种到优化培养基中，全自动发酵罐培养，流加无菌30%Na₂CO₃溶液控制发酵过程中的pH值，培养3~6小时后添加培养基量的0.1~20%增殖因子，培养3~6小时后流加相同体积的优化培养基继续培养，继续培养4~10小时后收集发酵液；

(2) 对各菌种培养基再分别发酵；

① 德氏乳杆菌保加利亚亚种：以12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，以3~5%麦芽汁+3~5%酵母粉+5~10%番茄汁为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的10~20%，控制pH值为6.5，在半连续培养装置中30℃连续培养16~24小时，搅拌速度是200~250rpm，不通气发酵；

② 乳酸乳球菌：以12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，以5~10%麦芽汁+1~3%酵母粉+15~20mg/L Vc为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的10~20%，控制pH值为6.0，在半连续培养装置中32℃连续培养16~24小时，搅拌速度是200~250rpm，不通气发酵；

③ 肠膜明串珠菌：以蛋白胨0.5%+酵母膏0.5%+葡萄糖1%+柠檬酸钠0.15%+磷酸二氢钾0.1%为优化培养基，以0.005~0.11%Mg²⁺+0.005~0.01%Mn²⁺+3~5%酵母粉为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的5~10%，控制pH值为6.5，在半连续培养装置中32℃连续培养16~24小时，搅拌速度200~250rpm，通气量为1~2vol/vol/min；

④ 嗜酸乳杆菌：以12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，以3~5%麦芽汁+3~5%酵母粉+15~20%番茄汁为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的10~20%，控制pH值为6.5，在半连续培养装置中35℃连续培养12~14小时，搅拌速度200~250rpm，通气量为1~2vol/vol/min发酵；

⑤ 干酪乳杆菌：以12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，以5~10%麦芽汁+2~3%酵母粉+5~15%番茄汁为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的10~20%，pH值为6.5，在半连续培养装置中30℃连续培养16~24小时，搅拌速度200~250rpm，不通气发酵；

⑥克鲁维酵母：以 2%酵母膏+1%蛋白胨+2%葡萄糖+0.1% KH_2PO_4 为优化培养基，以 0.15~0.35mg/mL Zn^{2+} +45~60 $\mu\text{g/mL}$ 生物素+45~60 $\mu\text{g/mL}$ 肌醇为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的 0.30~1%，控制 pH 值为 6.5，在半连续培养装置中 28℃连续培养 16~24 小时，搅拌速度是 280~300rpm，通氧气量为 10~20vol/vol/min 发酵；

⑦酒香酵母：以 2%酵母膏+1%蛋白胨+2%葡萄糖+0.1% KH_2PO_4 为优化培养基，以 0.25~0.35mg/mL Zn^{2+} + 60~80 $\mu\text{g/mL}$ 生物素+35~55 $\mu\text{g/mL}$ 肌醇为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的 0.25~1%，控制 pH 值为 6.5，在半连续培养装置中 28℃连续培养 16~24 小时，搅拌速度是 250~280rpm，通氧气量为 10~20vol/vol/min 发酵；

(3) 分别将以上各单菌发酵液在 0~5℃条件下，转速为 8000~15000 转/分钟由高速冷冻离心机进行处理，离心后的浓缩菌体在无菌条件下加入细胞保护剂，各种浓缩菌体加入如下细胞的保护剂；

(4) 将以上各单菌分别冻干：在 -60~-40℃预冻 24 小时后真空冷冻，冷冻干燥温度 -60℃，真空度为 3~6pa，真空冷冻干燥 24~36 小时得到单菌冻干制品，各单菌冻干制品等细胞数目均匀混合后用锡箔密封真空包装即为复合菌种发酵剂成品。

3、根据权利要求 2 所述的一种复合菌种发酵剂的制备方法，其特征在于：所述的细胞保护剂由如下表组成：

菌种	细胞保护剂
德氏保加利亚乳杆菌	5~10%海藻糖+5~10%山梨醇+5~10%甘油+5~10%低聚异麦芽糖；
乳酸乳球菌	40~60g/kg蔗糖+10~20g/kg甘油+1~3g/kg L-cys +1~3g/kg Vc；
肠膜明串珠菌	5~10%蔗糖+5~7.5%聚乙二醇+5~10%甘油；
嗜酸乳杆菌	5~10%低聚异麦芽糖+5~10%甘油+0.05~0.1%Vc+10~20%脱脂乳；
干酪乳杆菌	5~10%低聚异麦芽糖+5~10%甘露醇+10~20%脱脂奶；
克鲁维酵母	10~20%脱脂乳粉+5~10%甘油+2~5%海藻糖溶液；
酒香酵母	3~5%海藻糖+5~10%乙二醇+10~15%甘油+5~10%低聚异麦芽糖。

一种复合菌种发酵剂及其制备方法

技术领域

本发明属于生物工程微生物发酵领域，具体涉及一种乳酸菌——酵母菌复合发酵剂及其制备方法。

背景技术

Kefir（开菲尔）起源于高加索山区，它是用开菲尔粒子发酵牛奶而产生的一种乳酸——酒精性发酵饮料，由于其复杂的菌系、特殊的营养作用和保健功能，引起人们对它广泛的研究，但由于在不使用原粒子的情况下无法生成新粒，因此产业化难于发酵出和粒子发酵产物一致或功能相近的饮料。

发明内容

本发明的目的在于模仿原始开菲尔的特性，用纯发酵剂复合和优化培养研制一种复合菌种发酵剂，进而研制开菲尔饮料，该法制成的开菲尔可解决用开菲尔粒子直接发酵难于产业化的问题，并能保持菌种在乳生产中的稳定性。本发明的另一个目的是提供了该复合菌种发酵剂的制备方法。

本发明的目的是这样实现的：利用公知菌种德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*L.delbrueckii* subsp.bulgaricus) ATCC No.33409*，乳酸乳球菌 (*L.lactis*)CGMCC No.12030，肠膜明串珠菌 (*L.mesenteroides*) CCIC No.6055，嗜酸乳杆菌 (*L.acidophilus*) ATCC No.43121，干酪乳杆菌 (*L.casei*)ATCC No.393，克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*)CCIC No.1772 和酿酒酵母 (*saccharomyces cerevi*)ATCC No.15248 进行高密度培养后真空冷冻干燥，制成直投式单菌发酵剂再以等量细胞数目复合成复合菌种发酵剂。

该复合菌种发酵剂的制备方法如下：1、首先，对菌种德氏乳杆菌保加利亚亚种、乳酸乳球菌、肠膜明串珠菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、克鲁维酵母和酒香酵母，进行高密度培养，方法和步骤如下。

各菌以 3~5%培养基的量接种到优化培养基中，全自动发酵罐培养，流加无菌 30%Na₂CO₃ 溶液控制发酵过程中的 pH 值，培养 3~6 小时后添加培养基量的 0.1~20%增殖因子，培养 3~6 小时后流加相同体积的优化培养基继续培养，继续培养 4~10 小时后收集发酵液。2、其次对各菌种培养基再分别发酵。①德氏乳杆菌保加利亚亚种：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，以 3~5%麦芽汁+3~5%酵母粉+5~10%番茄汁为增殖因子，增殖因子添加量为培养基

的 10~20%，控制 pH 值为 6.5，在半连续培养装置中 30℃连续培养 16~24 小时，搅拌速度是 200~250rpm，不通气发酵。

②乳酸乳球菌：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，以 5~10%麦芽汁+1~3%酵母粉+15~20mg/L Vc 为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的 10~20%，控制 pH 值为 6.0，在半连续培养装置中 32℃连续培养 16~24 小时，搅拌速度是 200~250rpm，不通气发酵。

③肠膜明串珠菌：以蛋白胨 0.5%+酵母膏 0.5%+葡萄糖 1%+柠檬酸钠 0.15%+磷酸二氢钾 0.1%为优化培养基，以 0.005~0.11% Mg^{2+} +0.005~0.01% Mn^{2+} +3~5%酵母粉为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的 5~10%，控制 pH 值为 6.5，在半连续培养装置中 32℃连续培养 16~24 小时，搅拌速度 200~250rpm，通气量为 1~2vol/vol/min。

④嗜酸乳杆菌：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，以 3~5%麦芽汁+3~5%酵母粉+15~20%番茄汁为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的 10~20%，控制 pH 值为 6.5，在半连续培养装置中 35℃连续培养 12~14 小时，搅拌速度 200~250rpm，通气量为 1~2vol/vol/min 发酵。

⑤干酪乳杆菌：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，以 5~10%麦芽汁+2~3%酵母粉+5~15%番茄汁为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的 10~20%，pH 值为 6.5，在半连续培养装置中 30℃连续培养 16-24 小时，搅拌速度 200~250rpm，不通气发酵。

⑥克鲁维酵母：以 2%酵母膏+1%蛋白胨+2%葡萄糖+0.1% KH_2PO_4 为优化培养基，以 0.15~0.35mg/mL Zn^{2+} +45~60 μ g/mL 生物素+45~60 μ g/mL 肌醇为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的 0.30~1%，控制 pH 值为 6.5，在半连续培养装置中 28℃连续培养 16~24 小时，搅拌速度是 280~300rpm，通氧气量为 10~20vol/vol/min 发酵。

⑦酒香酵母：以 2%酵母膏+1%蛋白胨+2%葡萄糖+0.1% KH_2PO_4 为优化培养基，以 0.25~0.35mg/mL Zn^{2+} + 60~80 μ g/mL 生物素+35~55 μ g/mL 肌醇为增殖因子，增殖因子添加量为培养基的 0.25~1%，控制 pH 值为 6.5，在半连续培养装置中 28℃连续培养 16~24 小时，搅拌速度是 250~280rpm，通氧气量为 10~20vol/vol/min 发酵。

3、分别将以上各单菌发酵液在 0~5℃条件下，转速为 8000~15000 转/分钟由高速冷冻离心机进行处理，离心后的浓缩菌体在无菌条件下加入细胞保护剂，各种浓缩菌体加入如下细胞保护剂。

菌种	细胞保护剂
德氏保加利亚乳杆菌	5~10%海藻糖+5~10%山梨醇+5~10%甘油+5~10%低聚异麦芽糖；

乳酸乳球菌	40~60g/kg蔗糖+10~20g/kg甘油+1~3g/kg L-cys +1~3g/kg Vc;
肠膜明串珠菌	5~10%蔗糖+5~7.5%聚乙二醇+5~10%甘油;
嗜酸乳杆菌	5~10%低聚异麦芽糖+5~10%甘油+0.05~0.1%Vc+10~20%脱脂乳;
干酪乳杆菌	5~10%低聚异麦芽糖+5~10%甘露醇+10~20%脱脂奶;
克鲁维酵母	10~20%脱脂乳粉+5~10%甘油+2~5%海藻糖溶液;
酒香酵母	3~5%海藻糖+5~10%乙二醇+10~15%甘油+5~10%低聚异麦芽糖。

4、将以上各单菌分别冻干：在-60~-40℃预冻 24 小时后真空冷冻，冷冻干燥温度-60℃，真空度为 3~6pa，真空冷冻干燥 24~36 小时得到单菌冻干制品，各单菌冻干制品等细胞数目均匀混合后用锡箔密封真空包装即为复合菌种发酵剂成品。

本发明的优点在于：

1、本发明综合考虑各增殖方法后利用分离耦合生物反应器对几种乳酸菌和酵母菌进行了高密度连续培养。培养液中乳酸菌的浓度可达到 10^{10} /mL 以上，酵母菌浓度达到 10^8 /mL 以上；

2、该发酵剂含菌量达到 10^{11} 个/mL 以上，性能稳定，使用方便，可作为直投式发酵剂使用；

3、本发酵剂由多种功能菌复合组成，风味独特，其功能指标和开菲尔粒子发酵的酸奶接近，可作为优良的直投式开菲尔发酵剂；

4、其发酵酸奶对病原微生物有较强的抑制作用；对胃肠道疾病、代谢疾病、高血压、心脏病等也都具有良好的疗效；产品中含有的多糖对抗肿瘤有良好的效果，B 族维生素含量较普通酸乳多；经常饮用可加速人体尿液的稀释，排泄。

具体实施方式

实施例 1

用等细胞数量的德式乳杆菌保加利亚亚种；乳酸乳球菌；肠膜明串珠菌；嗜酸乳杆菌；干酪乳杆菌；克鲁维酵母和酿酒酵母分别在全自动发酵罐中进行半连续高密度培养，各菌的增菌培养条件如下：德氏乳杆菌保加利亚亚种：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，德氏乳杆菌保加利亚亚种以 5%的量接种到优化培养基中，pH 值 6.5，搅拌速度 250rpm，30℃不通气连续培养 6 小时，流加增殖因子 5%麦芽汁+3%酵母粉+10%番茄汁，流加量为培养基的 20%，继续培养，培养 6 小时后流加相同体积的优化培养基，再培养 6 小时后收集发酵液。乳酸乳球

菌：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，以 5%的量接种到优化培养基中，控制 pH 值 6.0，32℃，搅拌速度 250rpm 不通气培养 6 小时后，流加增殖因子 10%麦芽汁+3%酵母粉+20mg/L Vc 继续培养，流加量为培养基的 20%，培养 4 小时后再流加相同体积的优化培养基培养 10 小时后收集发酵液。肠膜明串珠菌：优化培养基由蛋白胨 0.5%，酵母膏 0.5%，葡萄糖 1%，柠檬酸钠 0.15%，磷酸二氢钾 0.1%组成，菌株接种量为 5%，pH 值 6.5，32℃培养，搅拌速度为 200rpm，通氧气量为 1vol/vol/min 发酵培养 4 小时后，流加 10%培养基量的增殖因子 0.01%Mg²⁺+0.01%Mn²⁺+3%酵母粉，培养 4 小时后再流加相同体积的优化培养基继续培养 6 小时后收集培养液。嗜酸乳杆菌：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，嗜酸乳杆菌以 5%的量接种到优化培养基中，控制 pH 值为 6.5，35℃，搅拌 200rpm，通氧气量为 2vol/vol/min 培养 3 小时后流加增殖因子 5%麦芽汁+3%酵母粉+15%番茄汁，流加量为培养基的 20%，在半连续培养装置中连续培养 3 小时后再流加相同体积的优化培养基继续培养 5 小时后收集菌液。干酪乳杆菌：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，干酪乳杆菌以 5%的量接种到优化培养基中控制 pH 值为 6.5，30℃，搅拌 200rpm 不通气连续培养 6 小时，以 10%麦芽汁+2%酵母粉+5%番茄汁为增殖因子，流加量为培养基的 20%，再培养 6 小时，流加相同体积的优化培养基继续培养 10 小时后收集发酵液。克鲁维酵母：以 2%酵母膏+1%蛋白胨+2%葡萄糖+0.1% KH₂PO₄ 为优化培养基，克鲁维酵母菌以 5%的量接种到优化培养基中，控制 pH 值为 6.5，28℃，280rpm 搅拌，通氧气量为 20vol/vol/min 发酵培养 4 小时后流加培养基量 0.25%的增殖因子 0.15mg/mL Zn²⁺ +45 μg/mL 生物素+60 μg/mL 肌醇，再培养 4 小时后流加相同体积的培养基继续培养 6 小时，收集发酵液。酒香酵母：以 2%酵母膏+1%蛋白胨+2%葡萄糖+0.1% KH₂PO₄ 为优化培养基，酒香酵母以 5%的量接种到优化培养基中，用 30% Na₂CO₃控制 pH 值为 6.5，在半连续培养装置中 28℃，搅拌速度为 280rpm，通氧气量为 20vol/vol/min 连续培养 4 小时后流加培养基量的 0.30% 的增殖因子 0.25mg/mL Zn²⁺ + 60 μg/mL 生物素+55 μg/mL 肌醇，培养 4 小时后流加相同体积的优化培养基继续培养 6 小时后收集发酵液。

分别将以上各单菌发酵液在-5℃条件下，转速为 10000 转/分钟由高速冷冻离心机进行处理，离心后的浓缩菌体在无菌条件下加入和菌体等质量的细胞保护剂混合，各种浓缩菌体加入的细胞保护剂如下：德氏乳杆菌保加利亚亚种：10%海藻糖+5%山梨醇+10%甘油+5%低聚异麦芽糖；乳酸乳球菌：40g/kg 蔗糖+10g/kg 甘油+1g/kg L-cys +1g/kg Vc；肠膜明串珠菌：5%蔗糖+5%聚乙二醇+10%甘油；嗜酸乳杆菌：5%低聚异麦芽糖+5%甘油+0.05%Vc+10%脱脂乳；干酪乳杆菌：5%低聚异麦芽糖+5%甘露醇+10%脱脂奶；克鲁维酵母：脱脂乳粉 10%+甘油 8%+2%海藻糖溶液；酒香酵母：3%海藻糖+5%乙二醇+10%甘油+5%低聚异麦芽糖。将以上各混合液

置于-60℃下预冻 24 小时再进行冻干，在-60℃，真空度为 3pa 下真空冷冻干燥 36 小时后得冻干制品，各单菌冻干制品再以等细胞数目均匀混合后用锡箔密封包装即为复合菌种发酵剂成品。

实施例 2

用等细胞数量的德氏乳杆菌保加利亚亚种；乳酸乳球菌；肠膜明串珠菌；嗜酸乳杆菌；干酪乳杆菌；克鲁维酵母和酿酒酵母分别在全自动发酵罐中进行半连续高密度培养，各菌的增菌培养条件如下：德氏乳杆菌保加利亚亚种：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，德氏乳杆菌保加利亚亚种以 5%的量接种到优化培养基中，pH 值 6.5，搅拌速度 250rpm，30℃不通气连续培养 4 小时，流加增殖因子 3%麦芽汁+5%酵母粉+10%番茄汁，流加量为培养基的 15%，继续培养，培养 4 小时后流加相同体积的优化培养基，再培养 8 小时后收集发酵液。乳酸乳球菌：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，以 5%的量接种到优化培养基中，控制 pH 值 6.0，32℃，搅拌速度 250rpm 不通气培养 4 小时后，流加增殖因子 5%麦芽汁+1%酵母粉+15mg/L Vc 继续培养，流加量为培养基的 15%，培养 6 小时后再流加相同体积的优化培养基培养 10 小时后收集发酵液。肠膜明串珠菌：优化培养基由蛋白胨 0.5%，酵母膏 0.5%，葡萄糖 1%，柠檬酸钠 0.15%，磷酸二氢钾 0.1%组成，菌株接种量为 5%，pH 值 6.5，32℃培养，搅拌速度为 200rpm，通氧气量为 1vol/vol/min 发酵培养 6 小时后，流加 10%培养基量的增殖因子 0.0075%Mg²⁺+0.01%Mn²⁺+5%酵母粉，培养 4 小时后再流加相同体积的优化培养基继续培养 6 小时后收集培养液。嗜酸乳杆菌：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，嗜酸乳杆菌以 5%的量接种到优化培养基中，控制 pH 值为 6.5，35℃，搅拌 200rpm，通氧气量为 2vol/vol/min 培养 3 小时后流加增殖因子 5%麦芽汁+5%酵母粉+15%番茄汁，流加量为培养基的 20%，在半连续培养装置中连续培养 4 小时后再流加相同体积的优化培养基继续培养 5 小时后收集菌液。干酪乳杆菌：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，干酪乳杆菌以 5%的量接种到优化培养基中控制 pH 值为 6.5，30℃，搅拌 200rpm 不通气连续培养 6 小时，以 5%麦芽汁+3%酵母粉+10%番茄汁为增殖因子，流加量为培养基的 20%，再培养 6 小时，流加相同体积的优化培养基继续培养 10 小时后收集发酵液。克鲁维酵母：以 2%酵母膏+1%蛋白胨+2%葡萄糖+0.1% KH₂PO₄ 为优化培养基，克鲁维酵母菌以 5%的量接种到优化培养基中，控制 pH 值为 6.5，28℃，280rpm 搅拌，通氧气量为 20vol/vol/min 发酵培养 4 小时后流加培养基量 0.25%的增殖因子 0.35mg/mL Zn²⁺ +45 μg/mL 生物素+45 μg/mL 肌醇，再培养 4 小时后流加相同体积的培养基继续培养 6 小时，收集发酵液。酒香酵母：以 2%酵母膏+1%蛋白胨+2%葡萄糖+0.1% KH₂PO₄ 为优化培养基，酒香酵母以 5%的量接种到优化培养基中，用 30% Na₂CO₃ 控制 pH 值为 6.5，在半连续

培养装置中 28℃, 搅拌速度为 280rpm, 通氧气量为 20vol/vol/min 连续培养 4 小时后流加培养基量的 0.30% 的增殖因子 0.35mg/mL Zn^{2+} + 75 μ g/mL 生物素+45 μ g/mL 肌醇, 培养 4 小时后流加相同体积的优化培养基继续培养 6 小时后收集发酵液。

分别将以上各单菌发酵液在-5℃条件下, 转速为 10000 转/分钟由高速冷冻离心机进行处理, 离心后的浓缩菌体在无菌条件下加入和菌体等质量的细胞保护剂混合, 各种浓缩菌体加入的细胞保护剂如下: 德氏乳杆菌保加利亚亚种: 5%海藻糖+10%山梨醇+5%甘油+5%低聚异麦芽糖; 乳酸乳球菌: 60g/kg 蔗糖+15g/kg 甘油+2g/kg L-cys +1g/kg Vc; 肠膜明串珠菌: 10%蔗糖+5%聚乙二醇+5%甘油; 嗜酸乳杆菌: 10%低聚异麦芽糖+5%甘油+0.075%Vc+15%脱脂乳; 干酪乳杆菌: 5%低聚异麦芽糖+10%甘露醇+20%脱脂奶; 克鲁维酵母: 15%脱脂乳粉+5%甘油+5%海藻糖溶液; 酒香酵母: 3%海藻糖+10%乙二醇+5%甘油+7%低聚异麦芽糖。将以上各混合液置于-60℃下预冻 24 小时再进行冻干, 在-60℃, 真空度为 3pa 下真空冷冻干燥 32 小时后得冻干制品, 各单菌冻干制品再以等细胞数目均匀混合后用锡箔密封包装即为复合菌种发酵剂成品。

实施例 3

用等细胞数量的德氏乳杆菌保加利亚亚种; 乳酸乳球菌; 肠膜明串珠菌; 嗜酸乳杆菌; 干酪乳杆菌; 克鲁维酵母和酿酒酵母分别在全自动发酵罐中进行半连续高密度培养, 各菌的增菌培养条件如下: 德氏乳杆菌保加利亚亚种: 以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基, 德氏乳杆菌保加利亚亚种以 5%的量接种到优化培养基中, pH 值 6.5, 搅拌速度 200rpm, 30℃不通气连续培养 6 小时, 流加增殖因子 3.5%麦芽汁+3.5%酵母粉+10%番茄汁, 流加量为培养基的 15%, 继续培养, 培养 6 小时后流加相同体积的优化培养基, 再培养 6 小时后收集发酵液。乳酸乳球菌: 以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基, 以 3%的量接种到优化培养基中, 控制 pH 值 6.0, 32℃, 搅拌速度 200rpm 不通气培养 6 小时后, 流加增殖因子 7.5%麦芽汁+2%酵母粉+15mg/L Vc 继续培养, 流加量为培养基的 20%, 培养 5 小时后再流加相同体积的优化培养基培养 8 小时后收集发酵液。肠膜明串珠菌: 优化培养基由蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.5%, 葡萄糖 1%, 柠檬酸钠 0.15%, 磷酸二氢钾 0.1%组成, 菌株接种量为 5%, pH 值 6.5, 32℃培养, 搅拌速度为 200rpm, 通氧气量为 1vol/vol/min 发酵培养 4 小时后, 流加 10%培养基量的增殖因子 0.0075%Mg²⁺+0.0075%Mn²⁺+4%酵母粉, 培养 4 小时后再流加相同体积的优化培养基继续培养 6 小时后收集培养液。嗜酸乳杆菌: 以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基, 嗜酸乳杆菌以 5%的量接种到优化培养基中, 控制 pH 值为 6.5, 35℃, 搅拌 250rpm, 通氧气量为 1vol/vol/min 培养 3 小时后流加增殖因子 4.5%麦芽汁+3.5%酵母粉+10%番茄汁, 流加量为培养基的 15%, 在

半连续培养装置中连续培养 3 小时后再流加相同体积的优化培养基继续培养 5 小时后收集菌液。干酪乳杆菌：以 12%脱脂奶+蛋白水解酶为优化培养基，干酪乳杆菌以 5%的量接种到优化培养基中控制 pH 值为 6.5，30℃，搅拌 200rpm 不通气连续培养 6 小时，以 7.5%麦芽汁+2.5%酵母粉+10%番茄汁为增殖因子，流加量为培养基的 10%，再培养 6 小时，流加相同体积的优化培养基继续培养 9 小时后收集发酵液。克鲁维酵母：以 2%酵母膏+1%蛋白胨+2%葡萄糖+0.1% KH_2PO_4 为优化培养基，克鲁维酵母菌以 5%的量接种到优化培养基中，控制 pH 值为 6.5，28℃，280rpm 搅拌，通氧气量为 20vol/vol/min 发酵培养 4 小时后流加培养基量 0.25%的增殖因子 0.30mg/mL Zn^{2+} +55 $\mu\text{g/mL}$ 生物素+60 $\mu\text{g/mL}$ 肌醇，再培养 4 小时后流加相同体积的培养基继续培养 6 小时，收集发酵液。酒香酵母：以 2%酵母膏+1%蛋白胨+2%葡萄糖+0.1% KH_2PO_4 为优化培养基，酒香酵母以 5%的量接种到优化培养基中，用 30% Na_2CO_3 控制 pH 值为 6.5，在半连续培养装置中 28℃，搅拌速度为 280rpm，通氧气量为 20vol/vol/min 连续培养 4 小时后流加培养基量的 0.30% 的增殖因子 0.25mg/mL Zn^{2+} + 55 $\mu\text{g/mL}$ 生物素+45 $\mu\text{g/mL}$ 肌醇，培养 4 小时后流加相同体积的优化培养基继续培养 6 小时后收集发酵液。

分别将以上各单菌发酵液在 0℃条件下，转速为 8000 转/分钟由高速冷冻离心机进行处理，离心后的浓缩菌体在无菌条件下加入和菌体等质量的细胞保护剂混合，各种浓缩菌体加入的细胞保护剂如下：德氏乳杆菌保加利亚亚种：5%海藻糖+5%山梨醇+5%甘油+10%低聚异麦芽糖；乳酸乳球菌：50g/kg 蔗糖+10g/kg 甘油+2g/kg L-cys +1g/kg Vc；肠膜明串珠菌：5%蔗糖+5%聚乙二醇+10%甘油；嗜酸乳杆菌：10%低聚异麦芽糖+5%甘油+0.05%Vc+10%脱脂乳；干酪乳杆菌：5%低聚异麦芽糖+7.5%甘露醇+10%脱脂奶；克鲁维酵母：10%脱脂乳粉+10%甘油+2%海藻糖溶液；酒香酵母：5%海藻糖+7.5%乙二醇+10%甘油+5%低聚异麦芽糖。将以上各混合液置于-60℃下预冻 24 小时再进行冻干，在-60℃，真空度为 5pa 下真空冷冻干燥 36 小时后得冻干制品，各单菌冻干制品再以等细胞数目均匀混合后用锡箔密封包装即为复合菌种发酵剂成品。