



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106190886 A

(43) 申请公布日 2016. 12. 07

(21) 申请号 201510230840. 1

(22) 申请日 2015. 05. 08

(71) 申请人 上海邦成生物工程有限公司

地址 201506 上海市金山区金山工业区金争
路 633 号、655 号、669 号

(72) 发明人 肖前青 郑云峰 陆克文

(74) 专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限
公司 31225

代理人 蒋亮珠

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12R 1/01(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

一种固态发酵制备粪肠球菌的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,该方法包括以下步骤:(1) 将粪肠球菌种子接种到一级种子培养基中,于 35 ~ 40℃、微氧条件下培养 16 ~ 25h,得到一级种子液;(2) 将步骤(1)得到的一级种子液接种到种子罐的二级种子培养基中扩大培养,在 35 ~ 40℃、微氧条件下培养 16 ~ 20h,得到二级种子液;(3) 将步骤(2)得到的二级种子液接种到发酵罐的发酵培养基中培养,在 35 ~ 40℃、微氧条件下发酵 16 ~ 30h,得到三级种子液;(4) 将步骤(3)得到的三级种子液与固态培养基混合均匀,装袋发酵培养 36 ~ 80h,制得发酵鲜料;(5) 将步骤(4)得到的发酵鲜料干燥后,即制得固态发酵粪肠球菌成品。与现有技术相比,本发明生产工艺简单、产品成本低、粪肠球菌活菌数高等。

1. 一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

(1) 将粪肠球菌种子接种到一级种子培养基中,于 35 ~ 40℃、微氧条件下培养 16 ~ 25h,得到一级种子液;

(2) 将步骤 (1) 得到的一级种子液接种到种子罐的二级种子培养基中扩大培养,在 35 ~ 40℃、微氧条件下培养 16 ~ 20h,得到二级种子液;

(3) 将步骤 (2) 得到的二级种子液接种到发酵罐的发酵培养基中培养,在 35 ~ 40℃、微氧条件下发酵 16 ~ 30h,得到三级种子液;

(4) 将步骤 (3) 得到的三级种子液与固态培养基混合均匀,装袋发酵培养 36 ~ 80h,制得发酵鲜料;

(5) 将步骤 (4) 得到的发酵鲜料干燥后,即制得固态发酵粪肠球菌成品。

2. 根据权利要求 1 所述的一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,其特征在于,步骤 (1) 所述的一级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

步骤 (2) 所述的二级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

步骤 (3) 所述的发酵培养基包括以下重量百分比的组分:豆粕粉 40g/L、麸皮 25g/L、西红柿粉 10g/L、磷酸二氢钾 2g/L、蔗糖 5g/L、硫酸镁 0.8g/L、硫酸锰 0.3g/L、无水乙酸钠 3g/L, pH7.0±0.2。

3. 根据权利要求 1 所述的一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,其特征在于,步骤 (1) 中所述的微氧条件为在转速 180 转/min 的条件下;步骤 (2) 中所述的微氧条件的含氧量为 0.15m³/min;步骤 (3) 中所述的微氧条件的含氧量为 0.2m³/min。

4. 根据权利要求 1 所述的一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,其特征在于,步骤 (4) 所述的固态培养基为豆粕与玉米的混合物,其中,豆粕与玉米的质量比为 1 ~ 10:1。

5. 根据权利要求 4 所述的一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,其特征在于,所述的固态培养基中豆粕与玉米的质量比为 5:1。

6. 根据权利要求 1 所述的一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,其特征在于,步骤 (4) 中固态培养基与三级种子液的质量比为 10:1 ~ 2。

7. 根据权利要求 1 所述的一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,其特征在于,步骤 (4) 中发酵温度为 20 ~ 30℃,发酵时间为 24 ~ 60h。

8. 根据权利要求 8 所述的一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,其特征在于,步骤 (5) 中发酵鲜料的干燥温度为 50 ~ 80℃,干燥时间为 2 ~ 4h。

9. 根据权利要求 1 所述的一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,其特征在于,所述的干燥温度为 50℃。

一种固态发酵制备粪肠球菌的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种乳酸菌的制备方法,具体涉及一种固态发酵制备粪肠球菌的方法。

背景技术

[0002] 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 是乳酸菌中的一类,属于链球菌科 (*Streptococcaceae*) 肠球菌属 (*Enterococcus*)。细胞球形,链状排列,无芽孢,兼性厌氧,革兰阳性球菌。粪肠球菌能发酵多种糖,产酸不产气,属于同型发酵。粪肠球菌能在 10℃ 和 45℃ 生长,化学耐性高,可生长于 6.5% NaCl 和 pH 9.6 的环境等,广泛分布于自然界中。粪肠球菌是人和动物肠道中的正常菌群,也是一种重要的乳酸菌,具有较好的肠道粘附能力,能产生乳酸及一些抗菌物质,抑制肠道腐败菌、致病菌的繁殖及肠道感染,降低腹泻率,促进营养物质的消化吸收,增强免疫力,提高采食量及饲料转化率,促进动物健康,是畜牧生产及食品工业首选使用的益生菌菌种之一。

[0003] 利用从健康人或动物分离的具有生理功能、无毒害的粪肠球菌及其他益生菌可制成动物微生态制剂,具有良好的防治消化道疾病和调节体内微生态平衡、提高机体免疫力、降低和中和毒素、促进康复等功能,并具有无毒、无害、无污染、无残留的优势。目前现有的粪肠球菌生产普遍采用液体深层发酵培养工艺,其存在发酵工艺生产投资大,原料及能源消耗量大,且生产出的产品保存性差,球菌活性不高,其含活菌量少。

[0004] 中国专利 CN102286417A 中公开了一种高密度粪肠球菌及其发酵培养工艺,该发明用高密度固体发酵培养工艺,分为以下几个步骤:1) 以米糠、麸皮、玉米粉、豆粕中任意一种或几种原料,和活性炭左固态培养基料;2) 于固态培养基料中加入营养液培养基作为固态发酵培养基;3) 将固态发酵培养基灭菌后,接种粪肠球菌种液,经培养,干燥,粉碎制得高密度粪肠球菌产品。该发明生产的粪肠球菌产品保存性好,含菌量较高,但是成本较高,蛋白含量低,综合性能较差。

发明内容

[0005] 本发明的目的就是为了克服上述现有技术存在的缺陷而提供一种生产工艺简单、产品成本低的固态发酵制备粪肠球菌的方法。

[0006] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现:

[0007] 一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,该方法包括以下步骤:

[0008] (1) 将粪肠球菌种子接种到一级种子培养基中,于 35 ~ 40℃、微氧条件下培养 16 ~ 25h,得到一级种子液;

[0009] (2) 将步骤 (1) 得到的一级种子液接种到种子罐的二级种子培养基中扩大培养,在 35 ~ 40℃、微氧条件下培养 16 ~ 20h,得到二级种子液;

[0010] (3) 将步骤 (2) 得到的二级种子液接种到发酵罐的发酵培养基中培养,在 35 ~ 40℃、微氧条件下发酵 16 ~ 30h,得到三级种子液;

[0011] (4) 将步骤 (3) 得到的三级种子液与固态培养基混合均匀,装袋发酵培养 36 ~ 80h,制得发酵鲜料;

[0012] (5) 将步骤 (4) 得到的发酵鲜料干燥后,即制得固态发酵粪肠球菌成品。

[0013] 步骤 (1) 所述的一级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0014] 步骤 (2) 所述的二级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0015] 步骤 (3) 所述的发酵培养基包括以下重量百分比的组分:豆粕粉 40g/L、麸皮 25g/L、西红柿粉 10g/L、磷酸二氢钾 2g/L、蔗糖 5g/L、硫酸镁 0.8g/L、硫酸锰 0.3g/L、无水乙酸钠 3g/L, pH7.0±0.2。

[0016] 步骤 (1) 中所述的微氧条件为在转速 180 转/min 的条件下;步骤 (2) 中所述的微氧条件的含氧量为 0.15m³/min;步骤 (3) 中所述的微氧条件的含氧量为 0.2m³/min。

[0017] 步骤 (4) 所述的固态培养基为豆粕与玉米的混合物,其中,豆粕与玉米的质量比为 1 ~ 10:1。

[0018] 所述的固态培养基中豆粕与玉米的质量比为 5:1。

[0019] 步骤 (4) 中固态培养基与三级种子液的质量比为 10:1 ~ 2。

[0020] 步骤 (4) 中发酵温度为 20 ~ 30℃,发酵时间为 24 ~ 60h。

[0021] 步骤 (5) 中发酵鲜料的干燥温度为 50 ~ 80℃,干燥时间为 2 ~ 4h。

[0022] 所述的干燥温度为 50℃。

[0023] 与现有技术相比,本发明的生产工艺简单、产品成本低,制备的粪肠球菌活菌数高,蛋白含量高,同时含有丰富的发酵代谢产物,能防治消化道疾病和调节体内微生态平衡、提高机体免疫力、降低和中和毒素、促进康复等功能。并具有无毒、无害、无污染、无残留的优势。

具体实施方式

[0024] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0025] 实施例 1

[0026] 一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,该方法包括以下步骤:

[0027] (1) 用 MRS 培养基为种子培养基,在 35℃,转速 180 转/min 的条件下培养粪肠球菌 20h,得到一级种子液;所述的一级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0028] (2) 将一级种子液接种到种子罐中进行扩大培养,MRS 培养基为种子培养基,在 35℃微氧条件下(含氧量为 0.15m³/min)培养 20h,得到二级种子液;所述的二级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾

2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0029] (3) 将二级种子液接种到发酵罐中进行扩大培养, MRS 培养基为发酵培养基, 在 35℃微氧条件下(含氧量为 0.2m³/min) 培养 30h, 得到三级种子液; 所述的发酵培养基包括以下重量百分比的组分: 豆粕粉 40g/L、麸皮 25g/L、西红柿粉 10g/L、磷酸二氢钾 2g/L、蔗糖 5g/L、硫酸镁 0.8g/L、硫酸锰 0.3g/L、无水乙酸钠 3g/L, pH7.0±0.2。

[0030] (4) 将豆粕、玉米按质量比 1:1 混合后制得固态培养基, 然后将固态培养基与三级种子液按质量比 10:1 均匀混合, 装袋, 并于 20℃下发酵培养 50h, 制得鲜料;

[0031] (5) 将鲜料 50℃干燥 4h, 制成固态发酵粪肠球菌成品。成品中粪肠球菌活菌数为 5.2×10¹⁰cfu/g, 水分含量 9.2%。

[0032] 实施例 2

[0033] 一种固态发酵制备粪肠球菌的方法, 该方法包括以下步骤:

[0034] (1) 用 MRS 培养基为种子培养基, 在 37℃微氧条件下(转速 180 转/min) 培养粪肠球菌 18h, 得到一级种子液; 所述的一级种子培养基包括以下重量百分比的组分: 蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0035] (2) 将一级种子液接种到种子罐中进行扩大培养, MRS 培养基为种子培养基, 在 37℃微氧条件下(含氧量为 0.15m³/min) 培养 18h, 得到二级种子液; 所述的二级种子培养基包括以下重量百分比的组分: 蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0036] (3) 将二级种子液接种到发酵罐中进行扩大培养, MRS 培养基为发酵培养基, 在 37℃微氧条件下(含氧量为 0.2m³/min) 培养 24h, 得到三级种子液; 所述的发酵培养基包括以下重量百分比的组分: 豆粕粉 40g/L、麸皮 25g/L、西红柿粉 10g/L、磷酸二氢钾 2g/L、蔗糖 5g/L、硫酸镁 0.8g/L、硫酸锰 0.3g/L、无水乙酸钠 3g/L, pH7.0±0.2。

[0037] (4) 将豆粕、玉米按 8:1 混合后制得固态培养基, 然后将固态培养基与三级种子液按质量比 5:1 均匀混合, 装袋, 并于 30℃下发酵培养 48h, 制得鲜料;

[0038] (5) 将鲜料 50℃干燥 3.5h, 制成固态发酵粪肠球菌成品。成品中粪肠球菌活菌数为 5.3×10¹¹cfu/g, 水分含量 9.5%。

[0039] 实施例 3

[0040] 一种固态发酵制备粪肠球菌的方法, 该方法包括以下步骤:

[0041] (1) 用 MRS 培养基为种子培养基, 在 40℃微氧条件下(转速 180 转/min) 培养粪肠球菌 16h, 得到一级种子液; 所述的一级种子培养基包括以下重量百分比的组分: 蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0042] (2) 将一级种子液接种到种子罐中进行扩大培养, MRS 培养基为种子培养基, 在 40℃微氧条件下(含氧量为 0.15m³/min) 培养 16h, 得到二级种子液; 所述的二级种子培养基包括以下重量百分比的组分: 蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0043] (3) 将二级种子液接种到发酵罐中进行扩大培养, MRS 培养基为发酵培养基, 在 40℃微氧条件下(含氧量为 0.2m³/min) 培养 16h, 得到三级种子液; 所述的发酵培养基包括

以下重量百分比的组分：豆粕粉 40g/L、麸皮 25g/L、西红柿粉 10g/L、磷酸二氢钾 2g/L、蔗糖 5g/L、硫酸镁 0.8g/L、硫酸锰 0.3g/L、无水乙酸钠 3g/L, pH7.0±0.2。

[0044] (4) 将豆粕、玉米按 10:1 混合后制得固态培养基,然后将固态培养基与三级种子液按质量比 10:1 均匀混合,装袋,并于 25℃下发酵培养 50h,制得鲜料;

[0045] (5) 将鲜料 80℃干燥 2h,制成固态发酵粪肠球菌成品。成品中粪肠球菌活菌数为 8.3×10^{10} cfu/g,水分含量 9.1%。

[0046] 实施例 4

[0047] 一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,该方法包括以下步骤:

[0048] (1) 用 MRS 培养基为种子培养基,在 37℃微氧条件下(转速 180 转/min)培养粪肠球菌 18h,得到一级种子液;所述的一级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0049] (2) 将一级种子液接种到种子罐中进行扩大培养, MRS 培养基为种子培养基,在 37℃微氧条件下(含氧量为 $0.15\text{m}^3/\text{min}$)培养 18h,得到二级种子液;所述的二级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0050] (3) 将二级种子液接种到发酵罐中进行扩大培养, MRS 培养基为发酵培养基,在 37℃微氧条件下(含氧量为 $0.2\text{m}^3/\text{min}$)培养 18h,得到三级种子液;所述的发酵培养基包括以下重量百分比的组分:豆粕粉 40g/L、麸皮 25g/L、西红柿粉 10g/L、磷酸二氢钾 2g/L、蔗糖 5g/L、硫酸镁 0.8g/L、硫酸锰 0.3g/L、无水乙酸钠 3g/L, pH7.0±0.2。

[0051] (4) 将豆粕、玉米按 5:1 混合后制得固态培养基,然后将固态培养基与三级种子液按质量比 8:1 均匀混合,装袋,并于 20℃下发酵培养 80h,制得鲜料;

[0052] (5) 将鲜料 60℃干燥 2h,制成固态发酵粪肠球菌成品。成品中粪肠球菌活菌数为 5.7×10^{10} cfu/g,水分含量 9.1%。

[0053] 实施例 5

[0054] 一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,该方法包括以下步骤:

[0055] (1) 将粪肠球菌种子接种到一级种子培养基中,于 35℃、微氧条件(转速 180 转/min)下培养 25h,得到一级种子液;所述的一级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0056] (2) 将步骤(1)得到的一级种子液接种到种子罐的二级种子培养基中扩大培养,在 40℃、微氧条件(含氧量为 $0.15\text{m}^3/\text{min}$)下培养 16h,得到二级种子液;所述的二级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0057] (3) 将步骤(2)得到的二级种子液接种到发酵罐的发酵培养基中培养,在 35℃、微氧条件(含氧量为 $0.2\text{m}^3/\text{min}$)下发酵 25h,得到三级种子液;所述的发酵培养基包括以下重量百分比的组分:豆粕粉 40g/L、麸皮 25g/L、西红柿粉 10g/L、磷酸二氢钾 2g/L、蔗糖 5g/L、硫酸镁 0.8g/L、硫酸锰 0.3g/L、无水乙酸钠 3g/L, pH7.0±0.2。

[0058] (4) 将步骤(3)得到的三级种子液与固态培养基按质量比为 10:1 混合均匀,固态

培养基由豆粕与玉米以质量比 1:1 混合而成,于 20℃下装袋发酵培养 36h,制得发酵鲜料;

[0059] (5) 将步骤(4)得到的发酵鲜料在 50℃下干燥 4h,即制得固态发酵粪肠球菌成品。

[0060] 测得本实施例中成品活菌数为 7.2×10^{10} cfu/g,水分含量 8.8%。

[0061] 实施例 6

[0062] 一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,该方法包括以下步骤:

[0063] (1) 将粪肠球菌种子接种到一级种子培养基中,于 40℃、微氧条件(转速 180 转/min)下培养 18h,得到一级种子液;所述的一级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0064] (2) 将步骤(1)得到的一级种子液接种到种子罐的二级种子培养基中扩大培养,在 35℃、微氧条件(含氧量为 $0.15\text{m}^3/\text{min}$)下培养 19h,得到二级种子液;所述的二级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0065] (3) 将步骤(2)得到的二级种子液接种到发酵罐的发酵培养基中培养,在 40℃、微氧条件(含氧量为 $0.2\text{m}^3/\text{min}$)下发酵 16h,得到三级种子液;所述的发酵培养基包括以下重量百分比的组分:豆粕粉 40g/L、麸皮 25g/L、西红柿粉 10g/L、磷酸二氢钾 2g/L、蔗糖 5g/L、硫酸镁 0.8g/L、硫酸锰 0.3g/L、无水乙酸钠 3g/L, pH7.0±0.2。

[0066] (4) 将步骤(3)得到的三级种子液与固态培养基按质量比为 10:2 混合均匀,固态培养基由豆粕与玉米以质量比 10:1 混合而成,于 30℃下装袋发酵培养 80h,制得发酵鲜料;

[0067] (5) 将步骤(4)得到的发酵鲜料在 70℃下干燥 2h,即制得固态发酵粪肠球菌成品。

[0068] 测得本实施例中成品活菌数为 6.8×10^{10} cfu/g,水分含量 9.3%。

[0069] 实施例 7

[0070] 一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,该方法包括以下步骤:

[0071] (1) 将粪肠球菌种子接种到一级种子培养基中,于 36℃、微氧条件(转速 180 转/min)下培养 16h,得到一级种子液;所述的一级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0072] (2) 将步骤(1)得到的一级种子液接种到种子罐的二级种子培养基中扩大培养,在 38℃、微氧条件(含氧量为 $0.15\text{m}^3/\text{min}$)下培养 20h,得到二级种子液;所述的二级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨 10g/L、酵母膏 15g/L、无水乙酸钠 5g/L、磷酸氢二钾 2g/L、柠檬酸铵 2g/L、硫酸镁 0.58g/L、硫酸锰 0.25g/L、葡萄糖 20g/L, pH7.0±0.2;

[0073] (3) 将步骤(2)得到的二级种子液接种到发酵罐的发酵培养基中培养,在 37℃、微氧条件(含氧量为 $0.2\text{m}^3/\text{min}$)下发酵 30h,得到三级种子液;所述的发酵培养基包括以下重量百分比的组分:豆粕粉 40g/L、麸皮 25g/L、西红柿粉 10g/L、磷酸二氢钾 2g/L、蔗糖 5g/L、硫酸镁 0.8g/L、硫酸锰 0.3g/L、无水乙酸钠 3g/L, pH7.0±0.2。

[0074] (4) 将步骤(3)得到的三级种子液与固态培养基按质量比为 10:1.5 混合均匀,固态培养基由豆粕与玉米以质量比 5:1 混合而成,于 25℃下装袋发酵培养 48h,制得发酵鲜料;

[0075] (5) 将步骤(4)得到的发酵鲜料在80℃下干燥3h,即制得固态发酵粪肠球菌成品。

[0076] 测得本实施例中成品活菌数为 8.1×10^{10} cfu/g,水分含量7.9%。

[0077] 实施例8

[0078] 一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,该方法包括以下步骤:

[0079] (1) 将粪肠球菌种子接种到一级种子培养基中,于36℃、微氧条件(转速180转/min)下培养16h,得到一级种子液;所述的一级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨10g/L、酵母膏15g/L、无水乙酸钠5g/L、磷酸氢二钾2g/L、柠檬酸铵2g/L、硫酸镁0.58g/L、硫酸锰0.25g/L、葡萄糖20g/L, pH7.0±0.2;

[0080] (2) 将步骤(1)得到的一级种子液接种到种子罐的二级种子培养基中扩大培养,在38℃、微氧条件(含氧量为 $0.15\text{m}^3/\text{min}$)下培养20h,得到二级种子液;所述的二级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨10g/L、酵母膏15g/L、无水乙酸钠5g/L、磷酸氢二钾2g/L、柠檬酸铵2g/L、硫酸镁0.58g/L、硫酸锰0.25g/L、葡萄糖20g/L, pH7.0±0.2;

[0081] (3) 将步骤(2)得到的二级种子液接种到发酵罐的发酵培养基中培养,在37℃、微氧条件(含氧量为 $0.2\text{m}^3/\text{min}$)下发酵30h,得到三级种子液;所述的发酵培养基包括以下重量百分比的组分:豆粕粉40g/L、麸皮25g/L、西红柿粉10g/L、磷酸二氢钾2g/L、蔗糖5g/L、硫酸镁0.8g/L、硫酸锰0.3g/L、无水乙酸钠3g/L, pH7.0±0.2。

[0082] (4) 将步骤(3)得到的三级种子液与固态培养基按质量比为10:1.5混合均匀,固态培养基由豆粕与玉米以质量比5:1混合而成,于30℃下装袋发酵培养24h,制得发酵鲜料;

[0083] (5) 将步骤(4)得到的发酵鲜料在60℃下干燥3h,即制得固态发酵粪肠球菌成品。

[0084] 测得本实施例中成品活菌数为 7.5×10^{10} cfu/g,水分含量9.2%。

[0085] 实施例9

[0086] 一种固态发酵制备粪肠球菌的方法,该方法包括以下步骤:

[0087] (1) 将粪肠球菌种子接种到一级种子培养基中,于35℃、微氧条件(转速180转/min)下培养20h,得到一级种子液;所述的一级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨10g/L、酵母膏15g/L、无水乙酸钠5g/L、磷酸氢二钾2g/L、柠檬酸铵2g/L、硫酸镁0.58g/L、硫酸锰0.25g/L、葡萄糖20g/L, pH7.0±0.2;

[0088] (2) 将步骤(1)得到的一级种子液接种到种子罐的二级种子培养基中扩大培养,在35℃、微氧条件(含氧量为 $0.15\text{m}^3/\text{min}$)下培养16h,得到二级种子液;所述的二级种子培养基包括以下重量百分比的组分:蛋白胨10g/L、酵母膏15g/L、无水乙酸钠5g/L、磷酸氢二钾2g/L、柠檬酸铵2g/L、硫酸镁0.58g/L、硫酸锰0.25g/L、葡萄糖20g/L, pH7.0±0.2;

[0089] (3) 将步骤(2)得到的二级种子液接种到发酵罐的发酵培养基中培养,在40℃、微氧条件(含氧量为 $0.2\text{m}^3/\text{min}$)下发酵20h,得到三级种子液;所述的发酵培养基包括以下重量百分比的组分:豆粕粉40g/L、麸皮25g/L、西红柿粉10g/L、磷酸二氢钾2g/L、蔗糖5g/L、硫酸镁0.8g/L、硫酸锰0.3g/L、无水乙酸钠3g/L, pH7.0±0.2。

[0090] (4) 将步骤(3)得到的三级种子液与固态培养基按质量比为10:1混合均匀,固态培养基由豆粕与玉米以质量比10:1混合而成,于20℃下装袋发酵培养60h,制得发酵鲜料;

[0091] (5) 将步骤(4)得到的发酵鲜料在80℃下干燥3h,即制得固态发酵粪肠球菌成品。

[0092] 测得本实施例中成品活菌数为 5.8×10^{10} cfu/g, 水分含量 8.5%。