



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107653196 A

(43)申请公布日 2018.02.02

(21)申请号 201710964616.4

(22)申请日 2017.10.17

(71)申请人 陕西科技大学

地址 710021 陕西省西安市未央区大学园
区陕西科技大学

(72)发明人 陈合 雷张腾 姚春旭 洪海平
舒国伟

(74)专利代理机构 西安智大知识产权代理事务
所 61215

代理人 张震国

(51)Int.Cl.

C12N 1/16(2006.01)

C12R 1/85(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种保拉迪酵母菌增菌培养基及其制备方法

(57)摘要

一种保拉迪酵母菌增菌培养基及其制备方法,以100mL无菌水所含的物质计包括:葡萄糖4-6g,酵母浸粉2-3g,低聚果糖0.2-0.6g,磷酸氢二钠0.2-0.5g,氯化钙0.1-0.5g,蛋白胨1-3g,玉米浆2-3g,大豆低聚糖0.2-0.5g,低聚木糖0.3-0.6g,pH值为6.2-6.5。本发明在常用培养基上添加了玉米浆和低聚糖(包括低聚果糖、大豆低聚糖和低聚木糖),以达到增菌的效果,而且这些成分来源方便,价格低廉,制作简单,能够起到明显的增菌效果。保拉迪酵母菌经活化后,以3%的接种量接入该增菌培养基中,置于37℃、180r/min的5L发酵罐中培养36h,活菌数可达到 $(6.7-8.9) \times 10^8$ CFU/mL以上,与相同处理的实验室常用的YPD培养基活菌数 $(1.8-2.5) \times 10^8$ CFU/mL相比,活菌数得到了提高,增菌效果显著。

1. 一种保拉迪酵母菌增菌培养基,其特征在于:以100mL无菌水所含的物质计包括:葡萄糖4-6g,酵母浸粉2-3g,低聚果糖0.2-0.6g,磷酸氢二钠0.2-0.5g,氯化钙0.1-0.5g,蛋白胍1-3g,玉米浆2-3g,大豆低聚糖0.2-0.5g,低聚木糖0.3-0.6g,pH值为6.2-6.5。

2. 一种保拉迪酵母菌增菌培养基的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 低聚果糖的制备:

将1kg的菊苣洗净并捣碎,然后加2-4L水搅拌均匀,调节pH为5-7,再加入果胶酶在30-40℃处理1-5h得到混合物,将得到的混合物煮沸,再加入菊糖内切酶在30-35℃,酶解30-36h后抽滤得到低聚果糖混合液,然后分别经过活性炭柱、非极性大孔树脂柱和纳滤膜处理得到纯度大于99%的低聚果糖溶液;

所述菊苣质量与果胶酶酶活的比例为1kg:100-300U;

所述菊糖内切酶的加入量为200-250U/L;

2) 低聚糖溶液的制备:

将低聚果糖溶液、大豆低聚糖、低聚木糖分别配制成质量分数为1-5%的溶液;

3) 保拉迪酵母菌增菌培养基的制备:

将葡萄糖、酵母浸粉、磷酸氢二钠、氯化钙、蛋白胍混合溶于水中调节其调pH至6.2-6.5,然后经118℃灭菌后,最后再加入玉米浆、低聚果糖溶液、大豆低聚糖溶液和低聚木糖溶液得保拉迪酵母菌增菌培养基;

所述保拉迪酵母菌增菌培养基以100mL无菌水所含的物质计,含葡萄糖4-6g,酵母浸粉2-3g,低聚果糖0.2-0.6g,磷酸氢二钠0.2-0.5g,氯化钙0.1-0.5g,蛋白胍1-3g,玉米浆2-3g,大豆低聚糖0.2-0.5g,低聚木糖0.3-0.6g。

3. 根据权利要求2所述的保拉迪酵母菌增菌培养基的制备方法,其特征在于,所述步骤1)的纳滤膜为0.3-0.8nm的纤维素膜。

4. 根据权利要求2所述的保拉迪酵母菌增菌培养基的制备方法,其特征在于,所述的玉米浆的制备为:选取整玉米放入其重量2-4倍的沸水中煮3-7min脱粒,将玉米粒倒入质量浓度为30-50%的糖水或盐水中,搅拌提取玉米胚芽,将提取的胚芽捞出用清水冲洗干净;

将脱去胚芽的玉米粒渣用清水冲洗干净后冷榨制浆,将制成的浆液用50-70目的筛网过滤,制得细浆;将细浆煮沸3-8min,向其中加入细浆量1%的黄原胶、1%的卡拉胶和2%的白砂糖制得悬浊液,最后将提取的玉米胚芽加入悬浊液,灭菌杀毒后制得玉米浆。

一种保拉迪酵母菌增菌培养基及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于益生菌培养技术领域,具体涉及一种保拉迪酵母菌增菌培养基及其制备方法。

背景技术

[0002] 抗生素的发现曾是人类医学史上的一个里程碑,但是近年来随着抗生素的广泛使用,使得耐药菌株不断增加,同时病原菌的抗药性也有所提高。此外,由于抗生素的广泛使用,动物肠道菌群的微生态平衡遭到了严重破坏,使得肠道菌群失调,进一步导致肠上皮细胞的生理功能和代谢调节水平紊乱,从而使肠道内的致病菌和病原菌因过度繁殖而造成肠道感染。因此,在抗击肠道感染的过程中,选择能够有效防治肠道菌群失调,并且无毒副作用的微生态制剂,将成为研究的热点。

[0003] 益生菌是一类对宿主有益的活性微生物,它能够定植在机体的肠道内,改善宿主肠内菌群的生态平衡。保拉迪酵母菌(*Saccharomyces boulardii*)是由法国科学家Henri Boulard于1920年从印尼荔枝等水果中分离得到的一种酵母菌类益生菌,它是一种非致病性酵母菌,对人和动物没有毒副作用,现已作为微生态制剂广泛用于抗生素和感染引起的腹泻。保拉迪酵母菌属于真菌类,而抗生素主要针对细菌类,所以它可以与常用抗生素共用,并且可以调节长期使用抗生素带来的肠道菌群失衡。保拉迪酵母菌进入人和动物肠道后,可以有效抑制致病菌的生长、提高有益菌的活性、调节肠道的微生态平衡、增强机体的免疫力。

[0004] 益生元(Prebiotics)是指那些人体不消化或难消化的成分(如低聚糖),通过选择性的刺激一种或多种益生菌的生长与活性而对寄主产生有益的影响,从而改善寄主健康的物质。具有益生元功能的物质主要是一些非消化性低聚糖,如低聚异麦芽糖、低聚果糖、低聚半乳糖、低聚木糖、大豆低聚糖、水苏糖、棉籽糖菊糖、低聚壳聚糖、甘露低聚糖等。低聚木糖又称木寡糖,是由2-7个木糖分子及 β -1,4糖苷键结合而成的功能性低聚糖,低聚木糖在促进益生菌增殖的同时会产生多种有机酸,降低肠道pH值,抑制有害菌生长,使有益菌大量增殖。大豆低聚糖是大豆中可溶性糖的总称,主要成分是水苏糖、棉籽糖和蔗糖等。大豆低聚糖能促进人体肠道内固有的有益细菌—双歧杆菌的增长繁殖、改善人体免疫力。

[0005] 目前国外已经利用保拉迪酵母菌开发了治疗腹泻的制剂,但国内尚未开展系统的研究,仅有少数临床应用的研究,有关保拉迪酵母菌高密度培养的报道也比较少。王子辉等对保拉迪酵母的培养基成分进行优化,得到优化培养基成分为:10%葡萄糖、0.7%柠檬酸三铵、1.5%玉米浆、0.2%磷酸氢二钾,在此条件下菌体的生物量比优化前提高了35.5%。胡小媛等利用响应面法优化保拉迪酵母菌的发酵培养基组分,得到最佳发酵培养基为:2%麦芽糖、2%蛋白胨、2.08%酵母浸提物,优化后的菌体湿重比优化前提高了54.1%。为了开发高活性耐贮存保拉迪酵母菌制剂,对其进行高密度培养就显得至关重要,而选择价格低廉且能保证保拉迪酵母菌大量生长增殖的培养基,更有利于实现工业化大规模生产。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种廉价且能保证保拉迪酵母菌大量生长,可应用于高效浓缩型直投式发酵剂的工业化大规模生产的保拉迪酵母菌增菌培养基及其制备方法。

[0007] 为达到上述目的,本发明的保拉迪酵母菌增菌培养基以100mL无菌水所含的物质计包括:葡萄糖4-6g,酵母浸粉2-3g,低聚果糖0.2-0.6g,磷酸氢二钠0.2-0.5g,氯化钙0.1-0.5g,蛋白胨1-3g,玉米浆2-3g,大豆低聚糖0.2-0.5g,低聚木糖0.3-0.6g,pH值为6.2-6.5。

[0008] 本发明的制备方法包括以下步骤:

[0009] 1) 低聚果糖的制备:

[0010] 将1kg的菊苣洗净并捣碎,然后加2-4L水搅拌均匀,调节pH为5-7,再加入果胶酶在30-40℃处理1-5h得到混合物,将得到的混合物煮沸,再加入菊糖内切酶在30-35℃,酶解30-36h后抽滤得到低聚果糖混合液,然后分别经过活性炭柱、非极性大孔树脂柱和纳滤膜处理得到纯度大于99%的低聚果糖溶液;

[0011] 所述菊苣质量与果胶酶酶活的比例为1kg:100-300U;

[0012] 所述菊糖内切酶的加入量为200-250U/L;

[0013] 2) 低聚糖溶液的制备:

[0014] 将低聚果糖溶液、大豆低聚糖、低聚木糖分别配制成质量分数为1-5%的溶液;

[0015] 3) 保拉迪酵母菌增菌培养基的制备:

[0016] 将葡萄糖、酵母浸粉、磷酸氢二钠、氯化钙、蛋白胨混合溶于水中调节其调pH至6.2-6.5,然后经118℃灭菌后,最后再加入玉米浆、低聚果糖溶液、大豆低聚糖溶液和低聚木糖溶液得保拉迪酵母菌增菌培养基;

[0017] 所述保拉迪酵母菌增菌培养基以100mL无菌水所含的物质计,含葡萄糖4-6g,酵母浸粉2-3g,低聚果糖0.2-0.6g,磷酸氢二钠0.2-0.5g,氯化钙0.1-0.5g,蛋白胨1-3g,玉米浆2-3g,大豆低聚糖0.2-0.5g,低聚木糖0.3-0.6g。

[0018] 所述步骤1)的纳滤膜为0.3-0.8nm的纤维素膜。

[0019] 所述的玉米浆的制备为:选取整玉米放入其重量2-4倍的沸水中煮3-7min脱粒,将玉米粒倒入质量浓度为30-50%的糖水或盐水中,搅拌提取玉米胚芽,将提取的胚芽捞出用清水冲洗干净;

[0020] 将脱去胚芽的玉米粒渣用清水冲洗干净后冷榨制浆,将制成的浆液用50-70目的筛网过滤,制得细浆;将细浆煮沸3-8min,向其中加入细浆量1%的黄原胶、1%的卡拉胶和2%的白砂糖制得悬浊液,最后将提取的玉米胚芽加入悬浊液,灭菌杀毒后制得玉米浆。

[0021] 与现有技术相比,本发明具有以下有益的技术效果:

[0022] 本发明在常用培养基上添加了玉米浆和低聚糖(包括低聚果糖、大豆低聚糖和低聚木糖),以达到增菌的效果,而且这些成分来源方便,价格低廉,制作简单,能够起到明显的增菌效果。

[0023] 保拉迪酵母菌经活化后,以3%的接种量接入该增菌培养基中,置于37℃、180r/min的5L发酵罐中培养36h,活菌数可达到 $(6.7-8.9) \times 10^8$ CFU/mL以上,与相同处理的实验室常用的YPD培养基活菌数 $(1.8-2.5) \times 10^8$ CFU/mL相比,活菌数得到了提高,增菌效果显著。

具体实施方式

[0024] 下面结合具体的实施例对本发明做进一步的详细说明。

[0025] 实施例1:

[0026] 本实施例的保拉迪酵母菌增菌培养基以100mL无菌水所含的物质计包括:葡萄糖4g,酵母浸粉2g,低聚果糖0.2g,磷酸氢二钠0.2g,氯化钙0.2g,蛋白胨1g,玉米浆2g,大豆低聚糖0.2g,低聚木糖0.3g,pH值为6.2。

[0027] 1) 低聚果糖的制备:

[0028] 将1kg的菊苣洗净并捣碎,然后加2L水搅拌均匀,调节pH为5.8,再加入200U果胶酶在30℃处理3h得到混合物,将得到的混合物煮沸,再加入150U/L菊糖内切酶在35℃,酶解36h后抽滤得到低聚果糖混合液,然后分别通过高径比为10:1的活性炭柱,流速控制在5BV/hr,收集流出液再通过高径比为12:1的大孔树脂,流速为3BV/hr,收集流出液过0.5nm纤维素膜,收集滤出液得到纯度大于99%的低聚果糖溶液;

[0029] 2) 低聚糖溶液的制备:

[0030] 将低聚果糖溶液、大豆低聚糖、低聚木糖分别配制成质量分数为1%的溶液,再经121℃高温灭菌后通过0.2μm的膜过滤;

[0031] 3) 玉米浆的制备为:选取整玉米放入其重量2倍的沸水中煮3min脱粒,将玉米粒倒入质量浓度为30%的糖水或盐水中,搅拌提取玉米胚芽,将提取的胚芽捞出用清水冲洗干净;

[0032] 将脱去胚芽的玉米粒渣用清水冲洗干净后冷榨制浆,将制成的浆液用50目的筛网过滤,制得细浆;将细浆煮沸3min,向其中加入细浆量1%的黄原胶、1%的卡拉胶和2%的白砂糖制得悬浊液,最后将提取的玉米胚芽加入悬浊液,灭菌杀毒后制得玉米浆;

[0033] 4) 保拉迪酵母菌增菌培养基的制备:

[0034] 将葡萄糖、酵母浸粉、磷酸氢二钠、氯化钙、蛋白胨混合溶于水中调节其调pH至6.2,然后经118℃灭菌后,最后再加入玉米浆、低聚果糖溶液、大豆低聚糖溶液和低聚木糖溶液得保拉迪酵母菌增菌培养基;

[0035] 所述保拉迪酵母菌增菌培养基以100mL无菌水所含的物质计,含葡萄糖4g,酵母浸粉2g,低聚果糖0.2g,磷酸氢二钠0.2g,氯化钙0.2g,蛋白胨1g,玉米浆2g,大豆低聚糖0.2g,低聚木糖0.3g,pH值为6.2。

[0036] 将保拉迪酵母菌经过YPD液体培养基活化后,以3%的接种量接入本实施例所得的增菌培养基中,置于37℃、180r/min的5L发酵罐中培养36h,活菌数可达到 6.78×10^8 CFU/mL,与相同处理的实验室常用的YPD培养基活菌数 1.82×10^8 CFU/mL相比,活菌数得到了提高,增菌效果显著。

[0037] 实施例2:

[0038] 本实施例的保拉迪酵母菌增菌培养基以100mL无菌水所含的物质计包括:葡萄糖5g,酵母浸粉2.5g,低聚果糖0.3g,磷酸氢二钠0.3g,氯化钙0.3g,蛋白胨2g,玉米浆2g,大豆低聚糖0.3g,低聚木糖0.4g,pH值为6.3。

[0039] 1) 低聚果糖的制备:

[0040] 将1kg的菊苣洗净并捣碎,然后加22L水搅拌均匀,调节pH为6,再加入300U果胶酶

在35℃处理2h得到混合物,将得到的混合物煮沸,再加入200U/L菊糖内切酶在32℃,酶解32h后抽滤得到低聚果糖混合液,然后分别通过高径比为10:1的活性炭柱,流速控制在5BV/hr,收集流出液再通过高径比为12:1的大孔树脂,流速为3BV/hr,收集流出液过0.3nm纤维素膜,收集滤出液得到纯度大于99%的低聚果糖溶液;

[0041] 2) 低聚糖溶液的制备:

[0042] 将低聚果糖溶液、大豆低聚糖、低聚木糖分别配制成质量分数为2%的溶液,再经121℃高温灭菌后通过0.2μm的膜过滤;

[0043] 3) 玉米浆的制备为:选取整玉米放入其重量4倍的沸水中煮7min脱粒,将玉米粒倒入质量浓度为50%的糖水或盐水中,搅拌提取玉米胚芽,将提取的胚芽捞出用清水冲洗干净;

[0044] 将脱去胚芽的玉米粒渣用清水冲洗干净后冷榨制浆,将制成的浆液用70目的筛网过滤,制得细浆;将细浆煮沸8min,向其中加入细浆量1%的黄原胶、1%的卡拉胶和2%的白砂糖制得悬浊液,最后将提取的玉米胚芽加入悬浊液,灭菌杀毒后制得玉米浆;

[0045] 4) 保拉迪酵母菌增菌培养基的制备:

[0046] 将葡萄糖、酵母浸粉、磷酸氢二钠、氯化钙、蛋白胨混合溶于水中调节其调pH至6.3,然后经118℃灭菌后,最后再加入玉米浆、低聚果糖溶液、大豆低聚糖溶液和低聚木糖溶液得保拉迪酵母菌增菌培养基;

[0047] 所述保拉迪酵母菌增菌培养基以100mL无菌水所含的物质计,含葡萄糖5g,酵母浸粉2.5g,低聚果糖0.3g,磷酸氢二钠0.3g,氯化钙0.3g,蛋白胨2g,玉米浆2g,大豆低聚糖0.3g,低聚木糖0.4g,pH值为6.3。

[0048] 将保拉迪酵母菌经过YPD液体培养基活化后,以3%的接种量接入本实施例所得的增菌培养基中,置于37℃、180r/min的5L发酵罐中培养36h,活菌数可达到 7.6×10^8 CFU/mL,相对照YPD培养基的活菌数 1.92×10^8 CFU/mL,活菌数得到了提高,增菌效果显著。

[0049] 实施例3:

[0050] 本实施例的保拉迪酵母菌增菌培养基以100mL无菌水所含的物质计包括:葡萄糖5g,酵母浸粉2.5g,低聚果糖0.4g,磷酸氢二钠0.4g,氯化钙0.5g,蛋白胨3g,玉米浆2.5g,大豆低聚糖0.4g,低聚木糖0.5g,pH值为6.4。

[0051] 1) 低聚果糖的制备:

[0052] 将1kg的菊苣洗净并捣碎,然后加3L水搅拌均匀,调节pH为7,再加入300U果胶酶在30℃处理5h得到混合物,将得到的混合物煮沸,再加入200U/L菊糖内切酶在35℃,酶解30h后抽滤得到低聚果糖混合液,然后分别通过高径比为10:1的活性炭柱,流速控制在5BV/hr,收集流出液再通过高径比为12:1的大孔树脂,流速为3BV/hr,收集流出液过0.5nm纤维素膜,收集滤出液得到纯度大于99%的低聚果糖溶液;

[0053] 2) 低聚糖溶液的制备:

[0054] 将低聚果糖溶液、大豆低聚糖、低聚木糖分别配制成质量分数为3%的溶液,再经121℃高温灭菌后通过0.2μm的膜过滤;

[0055] 3) 玉米浆的制备为:选取整玉米放入其重量4倍的沸水中煮5min脱粒,将玉米粒倒入质量浓度为40%的糖水或盐水中,搅拌提取玉米胚芽,将提取的胚芽捞出用清水冲洗干净;

[0056] 将脱去胚芽的玉米粒渣用清水冲洗干净后冷榨制浆,将制成的浆液用60目的筛网过滤,制得细浆;将细浆煮沸5min,向其中加入细浆量1%的黄原胶、1%的卡拉胶和2%的白砂糖制得悬浊液,最后将提取的玉米胚芽加入悬浊液,灭菌杀毒后制得玉米浆;

[0057] 4) 保拉迪酵母菌增菌培养基的制备:

[0058] 将葡萄糖、酵母浸粉、磷酸氢二钠、氯化钙、蛋白胨混合溶于水中调节其调pH至6.4,然后经118℃灭菌后,最后再加入玉米浆、低聚果糖溶液、大豆低聚糖溶液和低聚木糖溶液得保拉迪酵母菌增菌培养基;

[0059] 所述保拉迪酵母菌增菌培养基以100mL无菌水所含的物质计,含葡萄糖5g,酵母浸粉2.5g,低聚果糖0.4g,磷酸氢二钠0.4g,氯化钙0.5g,蛋白胨3g,玉米浆2.5g,大豆低聚糖0.4g,低聚木糖0.5g,pH值为6.4。

[0060] 将保拉迪酵母菌经过YPD液体培养基活化后,以3%的接种量接入本实施例所得的增菌培养基中,置于37℃、180r/min的5L发酵罐中培养36h,活菌数可达到 8.3×10^8 CFU/mL,相对对照YPD培养基的活菌数 2.34×10^8 CFU/mL,活菌数得到了提高,增菌效果显著。

[0061] 实施例4:

[0062] 本实施例的保拉迪酵母菌增菌培养基以100mL无菌水所含的物质计包括:葡萄糖6g,酵母浸粉3g,低聚果糖0.6g,磷酸氢二钠0.5g,氯化钙0.5g,蛋白胨3g,玉米浆3g,大豆低聚糖0.5g,低聚木糖0.6g,pH值为6.5。

[0063] 1) 低聚果糖的制备:

[0064] 将1kg的菊苣洗净并捣碎,然后加4L水搅拌均匀,调节pH为6.5,再加入100U果胶酶在40℃处理1h得到混合物,将得到的混合物煮沸,再加入250U/L菊糖内切酶在30℃,酶解35h后抽滤得到低聚果糖混合液,然后分别通过高径比为10:1的活性炭柱,流速控制在5BV/hr,收集流出液再通过高径比为12:1的大孔树脂,流速为3BV/hr,收集流出液过0.8nm纤维素膜,收集滤出液得到纯度大于99%的低聚果糖溶液;

[0065] 2) 低聚糖溶液的制备:

[0066] 将低聚果糖溶液、大豆低聚糖、低聚木糖分别配制成质量分数为5%的溶液,再经121℃高温灭菌后通过0.2μm的膜过滤;

[0067] 3) 玉米浆的制备为:选取整玉米放入其重量3倍的沸水中煮6min脱粒,将玉米粒倒入质量浓度为40%的糖水或盐水中,搅拌提取玉米胚芽,将提取的胚芽捞出用清水冲洗干净;

[0068] 将脱去胚芽的玉米粒渣用清水冲洗干净后冷榨制浆,将制成的浆液用60目的筛网过滤,制得细浆;将细浆煮沸5min,向其中加入细浆量1%的黄原胶、1%的卡拉胶和2%的白砂糖制得悬浊液,最后将提取的玉米胚芽加入悬浊液,灭菌杀毒后制得玉米浆;

[0069] 4) 保拉迪酵母菌增菌培养基的制备:

[0070] 将葡萄糖、酵母浸粉、磷酸氢二钠、氯化钙、蛋白胨混合溶于水中调节其调pH至6.5,然后经118℃灭菌后,最后再加入玉米浆、低聚果糖溶液、大豆低聚糖溶液和低聚木糖溶液得保拉迪酵母菌增菌培养基;

[0071] 所述保拉迪酵母菌增菌培养基以100mL无菌水所含的物质计,含葡萄糖6g,酵母浸粉3g,低聚果糖0.6g,磷酸氢二钠0.5g,氯化钙0.5g,蛋白胨3g,玉米浆3g,大豆低聚糖0.5g,低聚木糖0.6g,pH值为6.5。

[0072] 将保拉迪酵母菌经过YPD液体培养基活化后,以3%的接种量接入本实施例所得的增菌培养基中,置于37℃、180r/min的5L发酵罐中培养36h,活菌数可达到 8.9×10^8 CFU/mL,相比对照YPD培养基的活菌数 2.5×10^8 CFU/mL,活菌数得到了提高,增菌效果显著。