



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106721797 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611109097.5
 (22)申请日 2016.12.06
 (83)生物保藏信息
 CCTCC NO: M 2016537 2016.09.29
 CCTCC NO:M 2016045 2016.01.18
 (71)申请人 上海应用技术大学
 地址 200235 上海市徐汇区漕宝路120号
 (72)发明人 田怀香 申永波 陈臣 于海燕
 何玉洁 张雅敬
 (74)专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司
 31001
 代理人 吴宝根 马文峰
 (51)Int.Cl.
 A23L 2/38(2006.01)
 A23L 33/135(2016.01)

A23L 33/14(2016.01)
 A61K 36/73(2006.01)
 A61P 17/10(2006.01)
 A61P 31/04(2006.01)
 A61K 8/99(2017.01)
 A61K 8/9728(2017.01)
 A61K 8/9789(2017.01)
 A61Q 19/08(2006.01)
 A61Q 17/00(2006.01)
 A61K 35/747(2015.01)
 A61K 35/741(2015.01)

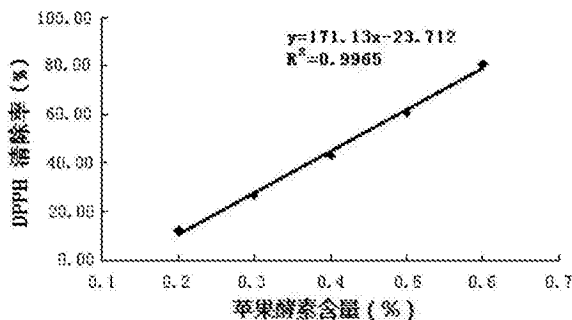
权利要求书3页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种苹果酵素及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开一种苹果酵素及制备方法,即将苹果将榨汁后与纯净水混匀,在所得苹果汁体积百分比为5-20%的原料混合物中加入为原料混合物总重量1-5%的葡萄糖,然后调pH值5.0-7.0,灭菌,所得发酵原料液采用由毕赤酵母菌种子液:植物乳杆菌种子液的体积比为1:1-5的组成混合菌种,控制温度25-35℃进行第一次发酵12h~48h,所得第一次发酵液采用醋酸菌种子液控制温度为25-35℃进行第二次发酵12-36h,然后灭菌,即得苹果酵素成品。所得苹果酵素成品与自然发酵相比,其对痤疮丙酸杆菌具有明显抑菌效果,其对DPPH清除率IC50为0.43%。



1. 一种苹果酵素的制备方法,其特征在于所述的制备方法即以新鲜成熟度好的苹果为主材料,以毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001和植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001为第一次发酵菌株、沪酿1.01醋酸菌为第二次发酵菌株通过两次发酵制备而成,该制备方法具体包括以下步骤:

(1)、菌种的选取

所用的植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001,是2016年1月18日于中国典型培养物保藏中心保藏的,其保藏编号为CCTCC NO: M 2016045的植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001冷冻干燥管;

所用的毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001,是2016年9月29日于中国典型培养物保藏中心保藏的,其保藏编号为CCTCC NO: M 2016537的毕赤酵母亚种*Pichia kudriavzevii* PKD 3001冷冻干燥管;

所用的沪酿1.01醋酸菌为巴氏醋酸杆菌巴氏亚种*Acetobacter pasteurianus* subsp. *Pasteurianus* De Ley et Frateur,购买自上海市酿造科学研究所;

(2)、发酵原料液的制备;

将新鲜、成熟度好的苹果用自来水清洗干净后经吹干、去核、用榨汁机进行榨汁、用100目纱布过滤得到苹果汁,然后与纯净水混合,得到原料混合物,其中苹果汁与纯净水的比例,按体积百分比计算,苹果汁:纯净水5-20%:80-95%;

在上述所得的原料混合物中再加入为原料混合物总重量1-5%的葡萄糖,经1mol/L食用碳酸钠水溶液调pH值为5.0-7.0,然后于105℃灭菌10min得到发酵原料液;

(3)、菌种活化

用接种环取无菌水溶解的冷冻干燥管保存的毕赤酵母亚种*Pichia kudriavzevii* PKD 3001菌种一环在马铃薯葡萄糖琼脂培养基培养皿上划线,在30℃培养箱中培养24h,得到平板活化毕赤酵母菌菌种;

用接种环取无菌水溶解的冷冻干燥管保存的植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001菌种一环在乳酸菌琼脂培养基培养皿上划线,在37℃培养箱中培养24h,得到平板活化植物乳杆菌菌种;

用接种环取无菌水溶解的沪酿1.01醋酸菌菌种一环在醋酸菌琼脂培养基培养皿上划线,在30℃培养箱中培养24h,得到平板活化醋酸菌菌种;

(4)、种子培养

用接种环取步骤(3)所得的平板活化毕赤酵母菌菌种一环接入装有50ml 麦芽浸粉肉汤液体培养基的250ml规格的三角瓶中,置于温度30℃的培养箱中,然后控制转速为120rpm,恒温培养36h,离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后,加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体,得到毕赤酵母菌种子液,每毫升毕赤酵母菌种子液中含毕赤酵母菌种 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^9$ cfu;

用接种环取步骤(3)所得的平板活化植物乳杆菌菌种一环接入装有50ml 乳酸菌肉汤培养基的250ml规格的三角瓶中,置于温度37℃的培养箱中,恒温培养36h,离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后,加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体,得到植物乳杆菌种子液,每毫升植物乳杆菌种子液中含植物乳杆菌种 $1 \times 10^7 - 1 \times 10^{10}$ cfu;

用接种环取步骤(3)所得的平板活化醋酸菌菌种一环接入装有50ml醋酸菌液体培养基的250ml规格的三角瓶中,置于温度30℃的培养箱中,然后控制转速为120rpm,恒温培养36h,离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后,加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体,得到醋酸菌种子液,每毫升醋酸菌种子液中含醋酸菌种 1×10^6 - 1×10^8 cfu;

(5)、发酵培养

首先,将毕赤酵母菌种子液和植物乳杆菌种子液按体积比,即毕赤酵母菌种子液:植物乳杆菌种子液1:1-5的比例进行混合,得到毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液;

然后,按步骤(2)所得的发酵原料液体积的1-5%的比例,在步骤(2)所得的发酵原料液中加入上述所得的毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液,控制温度为25-35℃、转速100-200rpm进行恒温发酵12-48h,得到第一次发酵液;

然后,按第一次发酵液体积的1-10%的比例,在第一次发酵液中加入醋酸菌种子液,控制温度25-35℃、转速100-200rpm进行第二次发酵12-36h,得到第二次发酵液;

(6)、灭菌

将步骤(5)所得的第二次发酵液于121℃下杀菌20min,然后灌装,即得到苹果酵素。

2.如权利要求1所述的一种苹果酵素的制备方法,其特征在于步骤(2)中发酵原料液的制备中,所述原料混合物,其中苹果汁与纯净水的比例,按体积百分比计算,苹果汁:纯净水为5%:95%;

在上述所得的原料混合物中再加入为原料混合物总重量3%的葡萄糖,经1mol/L食用碳酸钠水溶液调pH值为7.0,然后于105℃灭菌10min得到发酵原料液;

步骤(5)发酵培养中:

首先,将毕赤酵母菌种子液和植物乳杆菌种子液按体积比,即毕赤酵母菌种子液:植物乳杆菌种子液为1:1的比例进行混合,得到毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液;

然后,按步骤(2)所得的发酵原料液体积的2%的比例,在步骤(2)所得的发酵原料液中加入上述所得的毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液,控制温度为25℃、转速200rpm进行第一发酵24h,得到第一次发酵液;

然后,按第一次发酵液体积的5%的比例,在第一次发酵液中加入醋酸菌种子液,控制温度30℃、转速100rpm进行二次发酵12h,得到第二次发酵液。

3.如权利要求1所述的一种苹果酵素的制备方法,其特征在于步骤(2)发酵原料液的制备中:所述原料混合物,其中苹果汁与纯净水的比例,按体积百分比计算,苹果汁:纯净水为10%:90%;

在上述所得的原料混合物中再加入为原料混合物总重量1%的葡萄糖,经1mol/L食用碳酸钠水溶液调pH值为5.0,然后于105℃灭菌10min得到发酵原料液;

步骤(5)发酵培养中:

首先,将毕赤酵母菌种子液和植物乳杆菌种子液按体积比,即毕赤酵母菌种子液:植物乳杆菌种子液为1:2的比例进行混合,得到毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液;

然后,按步骤(2)所得的发酵原料液体积的1%的比例,在步骤(2)所得的发酵原料液中加入上述所得的毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液,控制温度为30℃、转速100rpm进行第一次发酵12h,得到第一次发酵液;

然后,按第一次发酵液体积的1%的比例,在第一次发酵液中加入醋酸菌种子液,控制温度25℃、转速150rpm进行第二次发酵24h,得到第二次发酵液。

4.如权利要求1所述的一种苹果酵素的制备方法,其特征在于步骤(2)发酵原料液的制备中:所述原料混合物,其中苹果汁与纯净水的比例,按体积百分比计算,苹果汁:纯净水为20%:80%;

在上述所得的原料混合物中再加入为原料混合物总重量5%的葡萄糖,经1mol/L食用碳酸钠水溶液调pH值为6.2,然后于105℃灭菌10min得到发酵原料液;

步骤(5)发酵培养中:

首先,将毕赤酵母菌种子液和植物乳杆菌种子液按体积比,即毕赤酵母菌种子液:植物乳杆菌种子液为1:5的比例进行混合,得到毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液;

然后,按步骤(2)所得的发酵原料液体积的5%的比例,在步骤(2)所得的发酵原料液中加入上述所得的毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液,控制温度为35℃、转速130rpm进行第一次发酵48h,得到第一次发酵液;

然后,按第一次发酵液体积的10%的比例,在第一次发酵液中加入醋酸菌种子液,控制温度35℃、转速200rpm进行第二次发酵36h,得到第二次发酵液。

5.如权利要求1、2、3或4的制备方法所得的一种苹果酵素。

6.如权利要求1、2、3或4的制备方法所得的一种苹果酵素在抑制痤疮丙酸杆菌中的应用。

一种苹果酵素及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种苹果酵素及其制备方法与应用,属于生物工程技术领域。

背景技术

[0002] 根据中国生物发酵产业协会的定义,酵素是指以果蔬或其他动、植物等为原料,采用自然或人工接种微生物发酵工艺,后经提取所制得的具有某些特定功能的发酵制品。酵素不仅保存了发酵原料中原有的营养物质,如多酚类、黄酮类、花青素等,而且通过有益菌的发酵代谢产生了一些新的生物活性成分,如有机酸,氨基酸等。与发酵前相比,微生物的转化使得这些小分子物质更易于人体吸收。

[0003] 近十年,微生物酵素功能性制品产业在全球开始大规模兴起,产业规模不断扩大。日本、台湾等地区开始采用纯种发酵进行生产。纯种发酵是在成分单一的发酵基质中,仅接入一种或几种微生物,通过对该微生物的培养,得到纯度较高的单一性产物。不同于自然发酵,其发酵时间短,易控制,十分适合酵素的产业化生产。但是为使发酵顺利进行,要求人工扩大的菌种不得被污染。因而对发酵设备和环境要求较高,要有严格的灭菌措施和空气净化系统。发酵用菌种也必须是经严格研究后筛选出的最适合生产的菌种。

[0004] 苹果酵素不仅保持了苹果原初营养和风味,还将赋予其益生菌所产生的抗氧化活性,为消费者提供新的功能性产品。但目前的水果酵素制作主要存在:发酵时间长,影响水果原料稳定性;发酵菌种性能和稳定性差,影响酵素中天然的活性物质等问题。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一是为了解决现有水果酵素生产过程中发酵时间过长影响酵素活性,菌种性能不稳定等问题而提供一种苹果酵素的制备方法,该苹果酵素的制备方法具有生产过程中发酵时间短的优点。

[0006] 本发明的目的之二是提供上述一种制备方法所得的苹果酵素,该苹果酵素具有抗氧化活性高,且能有效抑制痤疮丙酸杆菌生长等优点,适合应用于饮料和化妆品领域。

[0007] 本发明采用的技术方案

一种苹果酵素,即以新鲜成熟度好的苹果为主材料,以毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001和植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001为第一次发酵菌株、沪酿1.01醋酸菌为第二次发酵菌株通过两次发酵制备而成,该制备方法具体包括以下步骤:

(1)、菌种的选取

本发明所用的植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001,是2016年1月18日于中国典型培养物保藏中心保藏的,其保藏编号为CCTCC NO: M 2016045的植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001冷冻干燥管;

本发明所用的毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001,是2016年9月29日于中国典型培养物保藏中心保藏的,其保藏编号为CCTCC NO: M 2016537的毕赤酵母亚种*Pichia*

kudriavzevii PKD 3001冷冻干燥管;

本发明所用的沪酿1.01醋酸菌为巴氏醋酸杆菌巴氏亚种*Acetobacter pasteurianus subsp. Pasteurianus De Ley et Frateur*,购买自上海市酿造科学研究所;

(2)、发酵原料液的制备

将新鲜、成熟度好的苹果用自来水清洗干净后经吹干、去核、用榨汁机进行榨汁、用100目纱布过滤得到苹果汁,然后与纯净水混合,得到原料混合物,其中苹果汁与纯净水的比例,按体积百分比计算,苹果汁:纯净水为5-20%:80-95%;

在上述所得的原料混合物中再加入为原料混合物总重量1-5%的葡萄糖,经1mol/L食用碳酸钠水溶液调pH值为5.0-7.0,然后于105℃灭菌10min得到发酵原料液;

(3)、菌种活化

用接种环取无菌水溶解的冷冻干燥管保存的毕赤酵母亚种*Pichia kudriavzevii* PKD 3001菌种一环在马铃薯葡萄糖琼脂培养基培养皿上划线,在30℃培养箱中培养24h,得到平板活化毕赤酵母菌菌种;

用接种环取无菌水溶解的冷冻干燥管保存的植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001菌种一环在乳酸菌琼脂培养基培养皿上划线,在37℃培养箱中培养24h,得到平板活化植物乳杆菌菌种;

用接种环取无菌水溶解的沪酿1.01醋酸菌一环在醋酸菌琼脂培养基培养皿上划线,在30℃培养箱中培养24h,得到平板活化醋酸菌菌种;

(4)、种子培养

用接种环取步骤(3)所得的平板活化毕赤酵母菌菌种一环接入装有50ml 麦芽浸粉肉汤液体培养基的250ml规格的三角瓶中,置于温度30℃的培养箱中,然后控制转速为120rpm,恒温培养36h,离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后,加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体,得到毕赤酵母菌种子液,每毫升毕赤酵母菌种子液中含毕赤酵母菌种 1×10^6 - 1×10^9 cfu;

用接种环取步骤(3)所得的平板活化植物乳杆菌菌种一环接入装有50ml 乳酸菌肉汤培养基的250ml规格的三角瓶中,置于温度37℃的培养箱中,恒温培养36h,离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后,加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体,得到植物乳杆菌种子液,每毫升植物乳杆菌种子液中含植物乳杆菌种 1×10^7 - 1×10^{10} cfu;

用接种环取步骤(3)所得的平板活化醋酸菌菌种一环接入装有50ml醋酸菌液体培养基的250ml规格的三角瓶中,置于温度30℃的培养箱中,然后控制转速为120rpm,恒温培养36h,离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后,加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体,得到醋酸菌种子液,每毫升醋酸菌种子液中含醋酸菌种 1×10^6 - 1×10^8 cfu;

(5)、发酵培养

首先,将毕赤酵母菌种子液和植物乳杆菌种子液按体积比,即毕赤酵母菌种子液:植物乳杆菌种子液为1:1-5的比例进行混合,得到毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液;

然后,按步骤(2)所得的发酵原料液体积的1-5%的比例,在步骤(2)所得的发酵原料液中加入上述所得的毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液,控制温度为25-35℃、转速100-

200rpm进行第一次发酵12-48h,得到第一次发酵液;

然后,按第一次发酵液体积的1-10%的比例,在第一次发酵液中加入醋酸菌种子液,控制温度25-35℃、转速100-200rpm进行第二次发酵12-36h,得到第二次发酵液;

(6)、灭菌

将步骤(5)所得的第二次发酵液于121℃下杀菌20min,然后灌装,即得到苹果酵素。

[0008] 本发明的有益效果

本发明的一种苹果酵素,由于制备采用的原料苹果是纯天然的,利用低温杀菌、严格控制发酵温度,有效的降低了苹果酵素营养成分的损失,最大限度保留了苹果酵素活性。

[0009] 进一步,本发明的一种苹果酵素,由于制备过程所用的发酵时间控制在80h以内,从而避免了苹果本身含有的风味物质和酵素物质的损失。

[0010] 进一步,本发明的一种苹果酵素是以毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001和植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001组成混合菌种为第一次发酵菌株、沪酿1.01醋酸菌为第二次发酵菌株通过两次发酵制备而成,因此所得苹果酵素与自然发酵所得的苹果酵素相比,能显著抑制青春痘主要致病菌痤疮丙酸杆菌的生长,且其抗氧化活性指标提高75%以上,IC50浓度为0.43%,远低于在化妆品中可能的限量(6%以内),因此可广泛应用于饮料和化妆品领域。

附图说明

[0011] 图1、实施例1,2,3以毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001和植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001组成混合菌种为第一次发酵菌株、沪酿1.01醋酸菌为第二次发酵菌株通过两次发酵制备而成的苹果酵素和对照实施例1按自然发酵的方法所得的苹果酵素的清除率柱状图;

图2、实施例1中所得的苹果酵素在体积百分比浓度分别为0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%下,以苹果酵素的体积百分比浓度为横坐标,以清除率为纵坐标所得的苹果酵素的体积百分比浓度与清除率之间的关系曲线。

具体实施方式

[0012] 下面通过具体实施例对本发明进一步阐述,但并不限制本发明。凡在本发明的思路和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0013] 本发明的各实施例中所用的苹果购自上海联华超市。

[0014] 本发明各实施例中所用的植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001,是2016年1月18日于中国典型培养物保藏中心保藏的,其保藏编号为CCTCC NO: M 2016045的植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001冷冻干燥管,保藏机构地址:武汉市武昌珞珈山中国典型培养物保藏中心(武汉大学),邮编:430072;

所用的毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001,是2016年9月29日于中国典型培养物保藏中心保藏的,其保藏编号为CCTCC NO: M 2016537的毕赤酵母亚种*Pichia kudriavzevii* PKD 3001冷冻干燥管,保藏机构地址:武汉市武昌珞珈山中国典型培养物保藏中心(武汉大学),邮编:430072;

所用的沪酿1.01醋酸菌为巴氏醋酸杆菌巴氏亚种*Acetobacter pasteurianus* subsp.

Pasteurianus De Ley et Frateur, 购买自上海市酿造科学研究所。

[0015] 本发明各实施例中所用的各种培养基, 组成成份如下:

马铃薯葡萄糖琼脂培养基, 其组成成份为在每升蒸馏水中加入:

马铃薯浸粉5.0g, 葡萄糖20.0g, 琼脂20.0g, 氯霉素0.1g。

[0016] 乳酸菌琼脂培养基, 其组成成份为在每升蒸馏水中加入:

蛋白胨10.0g, 牛肉粉10.0g, 酵母粉4.0 g, 葡萄糖20.0 g, 吐温80 1mL, 磷酸氢二钾(7H₂O) 2.0 g, 乙酸钠(3H₂O) 5.0 g, 柠檬酸三铵2.0 g, 硫酸镁(7H₂O) 0.2 g, 硫酸锰(4H₂O) 0.05 g, 琼脂15.0 g。

[0017] 醋酸菌琼脂培养基, 其组成成份为在每升蒸馏水中加入:

葡萄糖10.0 g, 酵母膏10.0 g, 琼脂25.0 g, 灭菌后倒培养皿前加入培养基体积2%的95%乙醇。

[0018] 麦芽浸粉肉汤液体培养基, 其组成成份为在每升蒸馏水中加入:

麦芽浸粉20.0g。

[0019] 乳酸菌肉汤培养基, 其组成成份为在每升蒸馏水中加入:

蛋白胨10.0g, 牛肉粉10.0g, 酵母粉5.0g, 葡萄糖20.0g, 吐温80 1mL, 磷酸氢二钾2.0g, 乙酸钠5.0g, 柠檬酸三铵2.0g, 硫酸镁0.1g, 硫酸锰0.05g。

[0020] 醋酸菌液体培养基, 其组成成份为在每升蒸馏水中加入: 葡萄糖10.0g, 酵母膏10.0g, 使用时加入培养基体积4%的无水乙醇。

[0021] 实施例1

一种苹果酵素, 即以新鲜成熟度好的苹果为主材料, 以毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001和植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001为第一次发酵菌株、沪酿1.01醋酸菌为第二次发酵菌株通过两次发酵制备而成, 该制备方法具体包括以下步骤:

(1)、菌种的选取

植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001冷冻干燥管;

毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001冷冻干燥管;

沪酿1.01醋酸菌;

(2)、发酵原料液的制备;

将新鲜、成熟度好的苹果用自来水清洗干净后经吹干、去核、用榨汁机进行榨汁、用100目纱布过滤得到苹果汁, 然后与纯净水混合, 得到原料混合物, 其中苹果汁与纯净水的比例, 按体积百分比计算, 苹果汁: 纯净水为5%: 95%;

在上述所得的原料混合物中再加入为原料混合物总重量3%的葡萄糖, 经1mol/L食用碳酸钠水溶液调pH值为7.0, 然后于105℃灭菌10min得到发酵原料液;

(3)、菌种活化

用接种环取无菌水溶解的冷冻干燥管保存的毕赤酵母亚种*Pichia kudriavzevii* PKD 3001菌种一环在马铃薯葡萄糖琼脂培养基培养皿上划线, 在30℃培养箱中培养24h, 得到平板活化毕赤酵母菌菌种;

用接种环取无菌水溶解的冷冻干燥管保存的植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001菌种一环在乳酸菌琼脂培养基培养皿上划线, 在37℃培养箱中培养24h, 得到平板活

化植物乳杆菌菌种；

用接种环取无菌水溶解的沪酿1.01醋酸菌一环在醋酸菌琼脂培养基培养皿上划线，在30℃培养箱中培养24h，得到平板活化醋酸菌菌种；

(4)、种子培养

用接种环取步骤(3)所得的平板活化毕赤酵母菌菌种一环接入装有50ml 麦芽浸粉肉汤液体培养基的250ml规格的三角瓶中，置于温度30℃的培养箱中，然后控制转速为120rpm，恒温培养36h，离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后，加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体，得到毕赤酵母菌种子液，上述每毫升毕赤酵母菌种子液中含毕赤酵母菌种 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^9$ cfu；

用接种环取步骤(3)所得的平板活化植物乳杆菌菌种一环接入装有50ml 乳酸菌MRS肉汤培养基的250ml规格的三角瓶中，置于温度37℃的培养箱中，恒温培养36h，离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后，加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体，得到植物乳杆菌种子液，上述每毫升植物乳杆菌种子液中含植物乳杆菌种 $1 \times 10^7 - 1 \times 10^{10}$ cfu；

用接种环取步骤(3)所得的平板活化醋酸菌菌种一环接入装有50ml醋酸菌液体培养基的250ml规格的三角瓶中，置于温度30℃的培养箱中，然后控制转速为120rpm，恒温培养36h，离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后，加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体，得到醋酸菌种子液，上述每毫升醋酸菌种子液中含醋酸菌种 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ cfu；

(5)、发酵培养

首先，将毕赤酵母菌种子液和植物乳杆菌种子液按体积比，即毕赤酵母菌种子液：植物乳杆菌种子液为1:1的比例进行混合，得到毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液；

然后，按步骤(2)所得的发酵原料液体积的2%的比例，在步骤(2)所得的发酵原料液中加入上述所得的毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液，控制温度为25℃、转速200rpm进行第一次发酵24h，得到第一次发酵液；

然后，按第一次发酵液体积的5%的比例，在第一次发酵液中加入醋酸菌种子液，控制温度30℃、转速100rpm进行第二次发酵12h，得到第二次发酵液；

(6)、灭菌

将步骤(5)所得的第二次发酵液于121℃下杀菌20min，然后灌装，即得到苹果酵素。

[0022] 实施例2

一种苹果酵素，即以新鲜成熟度好的苹果为主材料，以毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001和植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001为第一次发酵菌株、沪酿1.01醋酸菌为第二次发酵菌株通过两次发酵制备而成，该制备方法具体包括以下步骤：

(1)、菌种的选取

植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001冷冻干燥管；

毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001冷冻干燥管；

沪酿1.01醋酸菌；

(2)、发酵原料液的制备；

将新鲜、成熟度好的苹果用自来水清洗干净后经吹干、去核、用榨汁机进行榨汁、用100目纱布过滤得到苹果汁,然后与纯净水混合,得到原料混合物,其中苹果汁与纯净水的比例,按体积百分比计算,苹果汁:纯净水为10%:90%;

在上述所得的原料混合物中再加入为原料混合物总重量1%的葡萄糖,经1mol/L食用碳酸钠水溶液调pH值为5.0,然后于105℃灭菌10min得到发酵原料液;

(3)、菌种活化

用接种环取无菌水溶解的冷冻干燥管保存的毕赤酵母亚种*Pichia kudriavzevii* PKD 3001菌种一环在马铃薯葡萄糖琼脂培养基培养皿上划线,在30℃培养箱中培养24h,得到平板活化毕赤酵母菌菌种;

用接种环取无菌水溶解的冷冻干燥管保存的植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001菌种一环在乳酸菌琼脂培养基培养皿上划线,在37℃培养箱中培养24h,得到平板活化植物乳杆菌菌种;

用接种环取无菌水溶解的沪酿1.01醋酸菌一环在醋酸菌琼脂培养基培养皿上划线,在30℃培养箱中培养24h,得到平板活化醋酸菌菌种;

(4)、种子培养

用接种环取步骤(3)所得的平板活化毕赤酵母菌菌种一环接入装有50ml 麦芽浸粉肉汤液体培养基的250ml规格的三角瓶中,置于温度30℃的培养箱中,然后控制转速为120rpm,恒温培养36h,离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后,加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体,得到毕赤酵母菌种子液,上述每毫升毕赤酵母菌种子液中含毕赤酵母菌种 1×10^6 - 1×10^9 cfu;

用接种环取步骤(3)所得的平板活化植物乳杆菌菌种一环接入装有50ml 乳酸菌MRS肉汤培养基的250ml规格的三角瓶中,置于温度37℃的培养箱中,恒温培养36h,离心后用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗,然后加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体,得到植物乳杆菌种子液,上述每毫升植物乳杆菌种子液中含植物乳杆菌种 1×10^7 - 1×10^{10} cfu;

用接种环取步骤(3)所得的平板活化醋酸菌菌种一环接入装有50ml醋酸菌液体培养基的250ml规格的三角瓶中,置于温度30℃的培养箱中,然后控制转速为120rpm,恒温培养36h,离心后用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗,然后加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体,得到醋酸菌种子液,上述每毫升醋酸菌种子液中含醋酸菌种 1×10^6 - 1×10^8 cfu;

(5)、发酵培养

首先,将毕赤酵母菌种子液和植物乳杆菌种子液按体积比,即毕赤酵母菌种子液:植物乳杆菌种子液为1:2的比例进行混合,得到毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液;

然后,按步骤(2)所得的发酵原料液体积的1%的比例,在步骤(2)所得的发酵原料液中加入上述所得的毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液,控制温度为30℃、转速100rpm进行第一次发酵12h,得到第一次发酵液;

然后,按第一次发酵液体积的1%的比例,在第一次发酵液中加入醋酸菌种子液,控制温度25℃、转速150rpm进行第二次发酵24h,得到第二次发酵液;

(6)、灭菌

将步骤(5)所得的第二次发酵液于121℃下杀菌20min,然后灌装,即得到苹果酵素。

[0023] 实施例3

一种苹果酵素,即以新鲜成熟度好的苹果为主材料,以毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001和植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001为第一次发酵菌株、沪酿1.01醋酸菌为第二次发酵菌株通过两次发酵制备而成,该制备方法具体包括以下步骤:

(1)、菌种的选取

植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001冷冻干燥管;

毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001冷冻干燥管;

沪酿1.01醋酸菌;

(2)、发酵原料液的制备;

将新鲜、成熟度好的苹果用自来水清洗干净后经吹干、去核、用榨汁机进行榨汁、用100目纱布过滤得到苹果汁,然后与纯净水混合,得到原料混合物,其中苹果汁与纯净水的比例,按体积百分比计算,苹果汁:纯净水为20%:80%;

在上述所得的原料混合物中再加入为原料混合物总重量5%的葡萄糖,经1mol/L食用碳酸钠水溶液调pH值为6.2,然后于105℃灭菌10min得到发酵原料液;

(3)、菌种活化

用接种环取无菌水溶解的冷冻干燥管保存的毕赤酵母亚种*Pichia kudriavzevii* PKD 3001菌种一环在马铃薯葡萄糖琼脂培养基培养皿上划线,在30℃培养箱中培养24h,得到平板活化毕赤酵母菌种;

用接种环取无菌水溶解的冷冻干燥管保存的植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001菌种一环在乳酸菌琼脂培养基培养皿上划线,在37℃培养箱中培养24h,得到平板活化植物乳杆菌菌种;

用接种环取无菌水溶解的沪酿1.01醋酸菌一环在醋酸菌琼脂培养基培养皿上划线,在30℃培养箱中培养24h,得到平板活化醋酸菌菌种;

(4)、种子培养

用接种环取步骤(3)所得的平板活化毕赤酵母菌菌种一环接入装有50ml 麦芽浸粉肉汤液体培养基的250ml规格的三角瓶中,置于温度30℃的培养箱中,然后控制转速为120rpm,恒温培养36h,离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后,加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体,得到毕赤酵母菌种子液,上述每毫升毕赤酵母菌种子液中含毕赤酵母菌种 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^9$ cfu;

用接种环取步骤(3)所得的平板活化植物乳杆菌菌种一环接入装有50ml 乳酸菌肉汤培养基的250ml规格的三角瓶中,置于温度37℃的培养箱中,恒温培养36h,离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后,加入50mL 0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体,得到植物乳杆菌种子液,上述每毫升植物乳杆菌种子液中含植物乳杆菌种 $1 \times 10^7 - 1 \times 10^{10}$ cfu;

用接种环取步骤(3)所得的平板活化醋酸菌菌种一环接入装有50ml醋酸菌液体培养基的250ml规格的三角瓶中,置于温度30℃的培养箱中,然后控制转速为120rpm,恒温培养36h,离心所得的沉淀用0.01mol/L无菌磷酸缓冲盐溶液清洗后,加入50mL 0.01mol/L无菌

磷酸缓冲盐溶液经500rpm下漩涡震荡重悬菌体,得到醋酸菌种子液,上述每毫升醋酸菌种子液中含醋酸菌种 1×10^6 - 1×10^8 cfu;

(5)、发酵培养

首先,将毕赤酵母菌种子液和植物乳杆菌种子液按体积比,即毕赤酵母菌种子液:植物乳杆菌种子液为1:5的比例进行混合,得到毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液;

然后,按步骤(2)所得的发酵原料液体积的5%的比例,在步骤(2)所得的发酵原料液中加入上述所得的毕赤酵母菌和植物乳杆菌混合种子液,控制温度为35℃、转速130rpm进行第一次发酵48h,得到第一次发酵液;

然后,按第一次发酵液体积的10%的比例,在第一次发酵液中加入醋酸菌种子液,控制温度35℃、转速200rpm进行第二次发酵36h,得到第二次发酵液;

(6)、灭菌

将步骤(5)所得的第二次发酵液于121℃下杀菌20min,然后灌装,即得到苹果酵素。

[0024] 对照实施例1

一种苹果酵素,即以新鲜成熟度好的苹果为主材料,通过自然发酵而成,其制备过程具体包括如下步骤:

(1)、发酵原料液的制备

将新鲜、成熟度好的苹果用自来水清洗干净后经吹干、去核、用榨汁机进行榨汁、用100目纱布过滤得到苹果汁,然后与纯净水混合,得到原料混合物,其中苹果汁与纯净水的比例,按体积百分比计算,苹果汁:纯净水5%:95%,即为发酵原料液;

(2)、发酵培养

将步骤(1)得到的发酵原料液装入到玻璃瓶中,加上专用透气盖子,室温放置20天,得到发酵液;

(3)、灌装

将步骤(2)所得的发酵液控制温度为121℃下杀菌20min,然后灌装得到自然发酵法制备而成的苹果酵素。

[0025] 效果例1

对青春痘主要致病菌的体外抑菌作用研究

试验方法

(1)培养基配制:

按常规方法配制痤疮丙酸杆菌固体培养基(1升蒸馏水中加入:胰蛋白胨10.0 g、牛肉膏10.0 g、葡萄糖5.0 g、氯化钠5.0 g、酵母膏3.0 g、乙酸钠3.0 g、可溶性淀粉1.0 g、L-半胱氨酸盐酸盐0.5 g、琼脂15.0 g),将培养基加入三角瓶中用纱布封口,经121℃灭菌20min后倒入培养皿中冷却后备用;

按常规方法配制痤疮丙酸杆菌液体培养基(1升蒸馏水中加入:胰蛋白胨10.0 g、牛肉膏10.0 g、葡萄糖5.0 g、氯化钠5.0 g、酵母膏3.0 g、乙酸钠3.0 g、可溶性淀粉1.0 g、L-半胱氨酸盐酸盐0.5 g),将培养基加入三角瓶中用纱布封口,经121℃灭菌20min后备用;

(2)痤疮丙酸杆菌活化:

用接种环挑去痤疮丙酸杆菌甘油冻存管保藏菌种一环在痤疮丙酸杆菌固体培养基划线,然后置于35℃培养箱中厌氧培养24h,得到培养皿上活化过的痤疮丙酸杆菌;

(3) 菌液制备:

取步骤(2)所得的培养皿上活化过的痤疮丙酸杆菌一环接种到痤疮丙酸杆菌液体培养基,35℃厌氧培养24h,得到痤疮丙酸杆菌菌液;

(4) 抑菌试验:

以无菌操作将0.1 mL步骤(3)痤疮丙酸杆菌菌液加入到步骤(1)所得的痤疮丙酸杆菌固体培养基上中央,用涂布棒涂布均匀,直到几乎完全涂干,然后在痤疮丙酸杆菌固体培养基表面直接垂直放上3个牛津杯(所述牛津杯为内径6mm、外径8mm、高10 mm的圆形小管,管的两端要光滑),轻轻加压,使其与痤疮丙酸杆菌培养基接触无空隙;

然后在4个牛津杯中分别加入240μL上述实施例1,2,3所得的苹果酵素成品和对照实施例1所得的苹果酵素,勿使苹果酵素外溢,加完后置35℃厌氧培养24h,测量抑菌圈的大小,结果见表1,

表1 不同实施例中酵素的抑菌圈大小

实施例	实施例1	实施例2	实施例3	对照实施例1
抑菌圈直径/mm	9.0	8.4	8.1	0

从上表中也可以看出,本发明的以新鲜成熟度好的苹果为主材料,以毕赤酵母菌

一种苹果酵素,即以新鲜成熟度好的苹果为主材料,以毕赤酵母菌*Pichia kudriavzevii* PKD 3001和植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* C2001为第一次发酵菌株、沪酿1.01醋酸菌为第二次发酵菌株通过两次发酵制备而成的苹果酵素其抑菌效果明显比自然发酵法所得的苹果酵素的抑菌效果要好的多。

[0026] 效果例2

采用DPPH法^[2]分别测定实施例1,2,3通过两次发酵法进行发酵所得的苹果酵素样品和对照实施例1按自然发酵的方法所得的苹果酵素样品的抗氧化活性,即以1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)清除活力为指标进行检测,其步骤如下:

在4个10 mL的试管中,分别加入2mL实施例1,2,3所得的苹果酵素样品和对照实施例1所得的苹果酵素样品,然后每个试管中分别加入 2mL 0.1mmol/L DPPH 溶液,摇匀,分别室温下暗处静置 30min,以无水乙醇为空白,分别测定各试管中样品在517nm下的吸光度,记作 A_{sample} 。同时测定 2mL DPPH溶液与 2mL乙醇混合后的吸光度,记作 A_{control} ,以及2mL发明样品溶液与2mL无水乙醇混合后的吸光度 A_{blank} 。然后计算实施例1,2,3,4所得的苹果酵素样品和对照实施例1所得的苹果酵素样品的自由基清除能力,即清除率,每个样品平行测定3次,其计算方法按以下公式:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100\%$$

清除率越大表明自由基的清除能力越强,由此表明其抗氧化能力越强。

[0027] 清除率和IC50常用来表征抗氧化能力,其中IC50为清除率为50%时的酵素浓度。以1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)清除活力为指标检测本发明样品的抗氧化活性,分别测定实施例1,2,3和对照实施例1中苹果酵素成品的抗氧化活性。

[0028] 上述测得的实验结果见附图1,从图1可以看出,通过本发明进行两次发酵所得的苹果酵素样品对DPPH自由基清除率比对照实施例1中采用自然发酵方法所得的苹果酵素提

高至少75%以上,表现出较好的抗氧化活力。

[0029] 效果例3

IC₅₀ (所述的IC₅₀为清除率为50%时的酵素浓度)测定

用蒸馏水稀释实施例1中所得的苹果酵素,使其体积百分比浓度分别为0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%。在5个10 mL的试管中,依次分别加入2mL上述稀释液,然后每个试管中分别加入 2mL 0.1mmol/L DPPH 溶液,摇匀,分别室温下暗处静置 30min,以无水乙醇为空白,测定其在517nm下的吸光度 A_{sample} ,同时测定 2mL DPPH溶液与 2mL 乙醇混合后的吸光度 A_{control} ,以及2mL稀释后的发明样品溶液与2mL无水乙醇混合后的吸光度 A_{blank} 。然后以苹果酵素的体积百分比浓度为横坐标,以清除率为纵坐标,作图,结果如附图2,然后拟合苹果酵素的体积百分比浓度与清除率之间的关系曲线方程,然后通过该方程计算出本发明实施例1所得的苹果酵素对DPPH的清除率IC₅₀的浓度为0.43%,其远低于在化妆品中可能的限量(6%以内),由此表明了酵素在运用到化妆品中有相当不错的抗氧化性,可以考虑作为抗衰老的添加成分。

[0030] 综上所述,本发明提供的一种苹果酵素,由于制备采用的原料苹果是纯天然的,利用低温杀菌、严格控制发酵温度,发酵时间控制在80h以内,有效的降低了苹果酵素营养成分的损失,最大限度保留了苹果酵素活性。进一步,由于本发明的苹果酵素制备过程中采用毕赤酵母菌和植物乳杆菌、醋酸杆菌进行两次发酵而成,所得苹果酵素与自然发酵所得的苹果酵素相比,能显著抑制青春痘主要致病菌痤疮丙酸杆菌的生长,且其抗氧化活性指标提高75%以上。

[0031] 以上所述仅是本发明的实施方式的举例,并不用以限制本发明,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和变型,这些改进和变型也应视为本发明的保护范围。

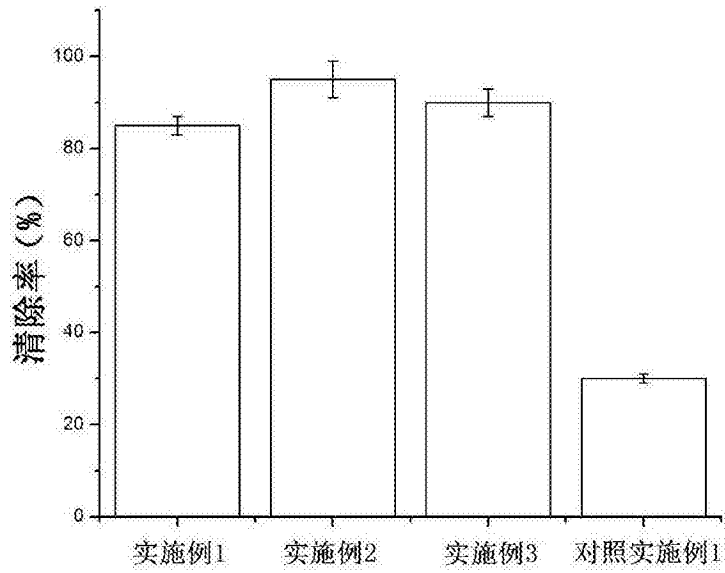


图1

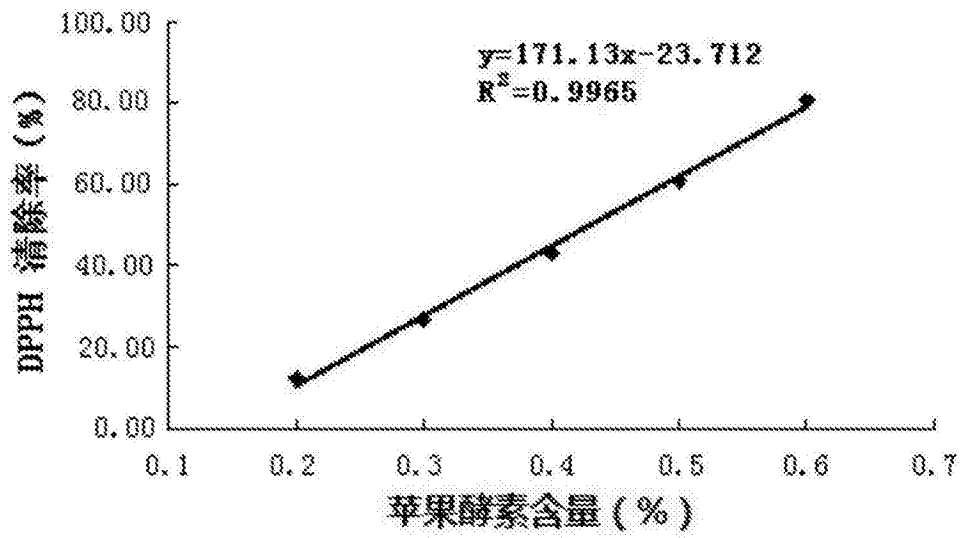


图2