



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110106112 B

(45) 授权公告日 2021.06.15

(21) 申请号 201910379386.4

(22) 申请日 2019.05.08

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110106112 A

(43) 申请公布日 2019.08.09

(83) 生物保藏信息
CGMCC No.16727 2018.11.12
CGMCC No.16728 2018.11.12

(73) 专利权人 北京农学院
地址 101000 北京市昌平区回龙观镇北农
路7号

(72) 发明人 高秀芝 康建依 易欣欣 范双喜
金君华 谢远红 刘慧 张红星

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 刘奇

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)
A23L 19/20 (2016.01)
A23L 33/00 (2016.01)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)

审查员 丁海

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种发酵蔬菜的混合益生菌、发酵蔬菜及其
制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种发酵蔬菜的混合益生菌、发
酵蔬菜及其制备方法,属于蔬菜发酵技术领域。
本发明所述发酵蔬菜的混合益生菌由
Lactobacillus diolivorans V73和植物乳杆菌
Lactobacillus plantarum V02组成。利用本发
明所述混合益生菌发酵得到的发酵蔬菜具有调
节肠道菌群的功能,预防心血管疾病,有利于人
体健康,并且人工接种发酵蔬菜可强化发酵,降
低亚硝酸盐含量,缩短发酵周期,提高产品质量,
降低生产成本。

1. 基于混合益生菌的发酵蔬菜的方法,包括以下步骤:

将混合益生菌接种于花椒水和食盐的混合溶液中,得到发酵溶液,将发酵溶液与蔬菜混合后在20~25℃,发酵3d~5d;

所述混合益生菌由*Lactobacillus diolivorans* V73和植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02组成;

所述*Lactobacillus diolivorans* V73的生物保藏编号为CGMCC No.16728;

所述植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02的生物保藏编号为CGMCC No.16727;

所述混合益生菌中,所述植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02的体积分数为30~35%,所述*Lactobacillus diolivorans* V73的体积分数为65~70%,所述植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02混合前的菌液浓度为 $(1.6\sim 2.5) \times 10^9$ CFU/mL,所述*Lactobacillus diolivorans* V73混合前的菌液浓度为 $(0.8\sim 1.5) \times 10^9$ CFU/mL;

所述接种的量为0.45~0.5%;

所述花椒水的制备方法包括:将0.3%~0.5%干花椒,0.1%~0.3%大料,0.2%~0.4%姜片 and 98.8%~99.4%水混合,加热煮沸两次,晾凉;

所述花椒水的质量占蔬菜质量的80~120%;

所述食盐的质量占蔬菜质量的2.5~3.5%。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述蔬菜是生菜、香芹和胡萝卜的组合;或生菜、圆白菜、香芹和胡萝卜的组合。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述蔬菜在发酵前进行切丝。

一种发酵蔬菜的混合益生菌、发酵蔬菜及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及蔬菜发酵技术领域,具体涉及一种发酵蔬菜的混合益生菌、发酵蔬菜及其制备方法。

背景技术

[0002] 发酵蔬菜是我国的一种传统的发酵食品,历史悠久,发酵蔬菜是指新鲜蔬菜在封闭的坛中经复杂的微生物体系(由原材料携带进入)由微生物和酶的变化,使最终产品的化学成分等方面发生较大变化发酵而成的蔬菜制品。发酵蔬菜可以延长生菜的贮藏期、利于运输、周年均衡供应、提高其附加值,还可以改进蔬菜风味,满足人们对蔬菜食品日益增长的需要。现有发酵蔬菜的方法有自然发酵和母水发酵,大多数传统发酵食品的生产仍然是依据经验,这使得发酵过程难以控制,同时发酵蔬菜的品质会受到发酵原料蔬菜种类、盐浓度、生产季节等诸多因素的影响。传统发酵方法生产的发酵蔬菜具有发酵周期较长、品质不稳定及高盐等不足。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种发酵蔬菜的混合益生菌、发酵蔬菜及其制备方法。本发明所述混合益生菌腌制出的泡菜具有调节肠道菌群的功能,预防心血管疾病,有利于人体健康,并且人工接种发酵蔬菜可强化发酵,降低亚硝酸盐含量,缩短发酵周期,提高产品质量,降低生产成本。

[0004] 本发明提供了一种发酵蔬菜的混合益生菌,所述混合益生菌由*Lactobacillus diolivorans* V73和植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02组成;

[0005] 所述*Lactobacillus diolivorans* V73的生物保藏编号为CGMCC No.16728;

[0006] 所述植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02的生物保藏编号为CGMCC No.16727。

[0007] 本发明还提供了基于上述技术方案所述混合益生菌的发酵蔬菜的方法,包括以下步骤:

[0008] 将上述技术方案所述混合益生菌接种于花椒水和食盐的混合溶液中,得到发酵溶液,将发酵溶液与蔬菜混合后在20~25℃,发酵3~5d。

[0009] 优选的是,所述接种的量为0.45~0.5%。

[0010] 优选的是,所述混合益生菌中,所述植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02的体积分数为30~35%,所述*Lactobacillus diolivorans* V73的体积分数为65~70%,所述植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02混合前的菌液浓度为 $(1.6\sim 2.5)\times 10^9$ CFU/mL,所述*Lactobacillus diolivorans* V73混合前的菌液浓度为 $(0.8\sim 1.5)\times 10^9$ CFU/mL。

[0011] 优选的是,所述花椒水的制备方法包括:将0.3%~0.5%干花椒,0.1%~0.3%大料,0.2%~0.4%姜片和98.8%~99.4%水混合,加热煮沸两次,晾凉。

[0012] 优选的是,所述花椒水的质量占蔬菜质量的80~120%。

[0013] 优选的是,所述食盐的质量占蔬菜质量的2.5~3.5%。

[0014] 优选的是,所述蔬菜包括生菜、香芹和胡萝卜的组合;或生菜、圆白菜、香芹和胡萝卜的组合。

[0015] 优选的是,所述蔬菜在发酵前进行切丝。

[0016] 本发明还提供了上述技术方案所述方法制备得到的发酵蔬菜。

[0017] 本发明提供了一种发酵蔬菜的混合益生菌。本发明将植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02和*Lactobacillus diolivorans* V73混合对蔬菜进行发酵,不仅可以抑制杂菌繁殖,保证产品品质,利用本发明所述混合益生菌得到的发酵蔬菜具有调节肠道菌群的功能,预防心血管疾病,有利于人体健康,并且人工接种发酵蔬菜可强化发酵,降低亚硝酸盐含量,缩短发酵周期,提高产品质量,降低生产成本。试验结果表明,利用本发明所述混合益生菌对蔬菜进行发酵,发酵时间仅需3~5d,亚硝酸盐含量0.20~0.27mg/kg,产品品质稳定,生产成本低。

[0018] 生物保藏说明

[0019] 植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02。本菌种保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,保藏编号为CGMCC No.16727,保藏时间为2018年11月12日。

[0020] *Lactobacillus diolivorans* V73。本菌种保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,保藏编号为CGMCC No.16728,保藏时间为2018年11月12日。

具体实施方式

[0021] 本发明提供了一种发酵蔬菜的混合益生菌,所述混合益生菌由*Lactobacillus diolivorans* V73和植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02组成;

[0022] 所述*Lactobacillus diolivorans* V73的生物保藏编号为CGMCC No.16728;

[0023] 所述植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02的生物保藏编号为CGMCC No.16727。

[0024] 在本发明中,两种乳酸菌均分离筛选于山西地方传统自然发酵蔬菜中,并已于2018年11月12日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,其保藏号分别为:CGMCC No.16727(菌株V02),CGMCC No.16728(菌株V73)。在MRS琼脂培养基上,V02菌株的菌落2~3mm,菌落表面光滑,边缘规则,圆形凸起,有光泽,乳白色;个体形态呈短杆状,短链状排列, G^+ 无芽孢杆菌。V73菌株的菌落1~1.5mm,菌落表面略平滑,边缘整齐,圆形稍凸起,无光泽,浅白色;个体形态呈短杆状, G^+ 无芽孢杆菌。两个菌株的发酵上清液做抑菌谱,其中V02对沙门氏菌、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌有抑制作用,V73对沙门氏菌和单增李斯特氏菌有抑制作用。

[0025] 本发明对两种乳酸菌菌液的制备方法没有特殊限定,采用本领域技术人员熟知的常规发酵方法进行培养即可。具体地,在本发明中,两种乳酸菌活化及发酵液的制备步骤优选如下:

[0026] 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) V02:将-80℃下甘油保藏的植物乳杆菌V02平板涂布,取单菌落转接入50mL MRS液体培养基的250ml锥形瓶中,37℃,150r/min~

180r/min的摇床上培养10h~14h;以2%~5%的接菌量扩大培养V02到50ml的MRS液体培养基中,培养时间10h~12h。

[0027] 乳杆菌(*Lactobacillus diolivorans*) V73:将-80℃下甘油保藏的乳杆菌V73平板涂布,取单菌落转接入50mL MRS液体培养基的250ml锥形瓶中,37℃,150r/min~180r/min的摇床上培养10h~14h;以2%~5%的接菌量扩大培养V73到50ml的MRS液体培养基中,培养时间22h~24h。

[0028] 在本发明中,两种菌株的组合发酵得到的蔬菜可以维持人体肠道菌群微生态平衡、提高机体免疫力、减少有害菌数量、预防腹泻、预防心血管疾病和胃肠道疾病等。

[0029] 本发明还提供了基于上述技术方案所述混合益生菌的发酵蔬菜的方法,包括以下步骤:

[0030] 将上述技术方案所述混合益生菌接种于花椒水和食盐的混合溶液中,得到发酵溶液,将发酵溶液与蔬菜混合后优选在20~25℃,发酵3~5d,更优选为22℃发酵4d。

[0031] 在本发明中,所述接种的量优选为0.45~0.5%。

[0032] 在本发明中,所述混合益生菌中,所述植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02的体积分数为30~35%,所述*Lactobacillus diolivorans* V73的体积分数为65~70%,优选的,本发明所述植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02和*Lactobacillus diolivorans* V73的混合体积比优选为1:2;所述植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum* V02混合前的菌液浓度为 $(1.6\sim2.5)\times10^9$ CFU/mL,所述*Lactobacillus diolivorans* V73混合前的菌液浓度为 $(0.8\sim1.5)\times10^9$ CFU/mL。

[0033] 在本发明中,所述花椒水的制备方法优选包括:将0.3%~0.5%干花椒,0.1%~0.3%大料,0.2%~0.4%姜片和98.8%~99.4%水混合,加热煮沸两次,晾凉。本发明对所述干花椒、大料和姜片的来源没有特殊限定,采用本领域技术人员熟知的常规干花椒、大料和姜片的常规市售产品即可。在本发明中,所述水优选为纯净水。在本发明中,所述晾凉优选为晾凉至30~40℃以下。

[0034] 在本发明中,所述花椒水的质量占蔬菜质量的80~120%,更优选的,所述花椒水与蔬菜的混合质量比为1:1。在本发明中,所述食盐的质量占蔬菜质量的2.5~3.5%,更优选为3.0%。

[0035] 本发明对所述蔬菜的种类没有特殊限定,采用本领域技术人员熟知的蔬菜即可。在本发明中,所述蔬菜优选包括生菜、香芹和胡萝卜;或生菜、圆白菜、香芹和胡萝卜。在本发明中,所述蔬菜优选在发酵前进行切丝。本发明对所述发酵用装置没有特殊限定,优选采用本领域技术人员熟知的常规容器即可,如泡菜坛子。在本发明中,发酵方式为厌氧发酵,所述发酵装置优选放置在阴凉通风处。

[0036] 本发明还提供了上述技术方案所述方法制备得到的发酵蔬菜。本发明得到的发酵蔬菜具有调节肠道菌群的功能,预防心血管疾病,有利于人体健康,产品品质高。

[0037] 下面结合具体实施例对本发明所述的一种发酵蔬菜的混合益生菌、发酵蔬菜及其制备方法做进一步详细的介绍,本发明的技术方案包括但不限于以下实施例。

[0038] 实施例1

[0039] 发酵蔬菜制作方法

[0040] (1)将来源于发酵蔬菜的6株乳酸菌V02、V22、V53、V66、V71和V73分别用于发酵蔬

菜实验中,根据发酵蔬菜的风味,筛选出发酵蔬菜效果较好的三株乳酸菌V71、V73和V02,并将其分别进行单一菌种和不同乳酸菌株等比例组合发酵蔬菜实验。

[0041] 根据发酵蔬菜的色泽、香气、滋味和口感进行感官评价和pH测定,评定小组为专业的评价人员所构成(即由受过专业感官评价培训的人员组成),共有10人,采用描述性的检测方法分别对样品的色泽、香气、滋味和口感进行细致的描述,以感官评价的结果作为益生菌发酵蔬菜的评定标准。益生菌发酵蔬菜的感官评定标准及评价指标见表1。

[0042] 根据表1感官评定标准作为评价益生菌发酵蔬菜感官品质的试验指标,通过感官评价结果和pH(酸度终点pH值<3.6),组合发酵V02和V73的感官评价结果最好,达到发酵酸度终点时间较快,最终筛选出其用于后续发酵。

[0043] 表1益生菌发酵蔬菜感官评价评定标准

评价项	评分标准	分值(100分)
色泽	颜色均匀,蔬菜清亮,有光泽,无霉斑	21-30
	颜色均匀,有少量光泽或无光泽	11-20
	颜色不均匀,无光泽,发黑有霉斑	1-10
香气	有浓郁泡菜香味,无刺激性气味	21-30
	香气适中,无异味	11-20
	气味差,无泡菜气味,有异味	1-10
滋味	味道爽口,酸度、咸度适中	16-20
	味道一般,过酸、过咸	11-15
	味道寡淡,有涩味、苦味、酸败味等不良味道	1-10
口感	口感清脆,咀嚼感好,无软化	11-20
	嫩脆度较差,咀嚼感一般,无软化	6-10
	嫩脆度差,咀嚼感差,软化	1-5

[0045] (2) 乳酸菌菌株的培养及活菌计数

[0046] 将-80℃下甘油保藏的V02和V73转接活化后,经灭菌MRS液体培养基扩大培养,各取1mL菌液于9mL灭菌生理盐水管,制成 10^{-1} 的均匀稀释液,做10倍递增稀释至 10^{-8} ;取 10^{-6} ~ 10^{-8} 的稀释液各1mL置于无菌平皿中,倒入溶化并冷却至44℃的灭菌MRS培养基约15mL,迅速轻轻旋动平皿,使培养基与菌液充分混匀,每个稀释度3次重复。同时将灭菌MRS培养基注入加有1mL无菌生理盐水的灭菌平皿内作空白对照。待培养基凝固后,倒置平板,置(36±1)℃温箱中培养(48±2)h,待菌落长出后即可计数。依据MRS平板计数结果,植物乳杆菌V02 *Lactobacillus plantarum*活菌数量为(1.7~2.3)× 10^9 CFU/ml,V73 *Lactobacillus diolivorans*活菌数量为(1~1.4)× 10^9 CFU/ml。

[0047] (3) 乳酸菌接种量的确定

[0048] 两种乳酸菌株等浓度发酵,选择以蔬菜总重量为百分比的接种量梯度0.35%、0.4%、0.45%、0.5%和0.55%分别用于发酵蔬菜实验中,根据发酵蔬菜的色泽、香气、滋味和口感评价结果,以较优接种量制作的益生菌发酵蔬菜产品,其颜色均匀,蔬菜有光泽,无霉斑,有浓郁香味,味道爽口、酸咸度适中、口感清脆,感官评定分数最高,最终选择接种量为0.45%~0.5%。

[0049] (4) 益生菌发酵蔬菜制作工艺

[0050] 1) 益生菌发酵蔬菜制作工艺:将新鲜生菜、香芹和胡萝卜(质量比为8:1:1)洗净切丝放入坛子中备用;制备花椒水(蔬菜总质量:花椒水=1:1),将0.3%~0.5%干花椒,0.1%~0.3%大料和0.2%~0.4%姜片等放于98.8%~99.4%纯净水中,加热煮沸两次,晾凉至40℃以下备用。将2.8%~3.2%(以下均以蔬菜总质量为百分比)食用盐融于花椒水中,并加入0.45%~0.5%的两种乳酸菌混合发酵液(体积比V02:V73=1:2),将蔬菜总质量和混合花椒水等比例,混匀于坛中,盖好放置于25℃阴凉通风地,发酵3d~5d。

[0051] 2) 配方2的制作方法将1)中原料蔬菜换为新鲜生菜、圆白菜、香芹和胡萝卜(质量比为4:4:1:1),其余方法一致。

[0052] (5) 益生菌发酵蔬菜中乳酸菌总数和pH值

[0053] 称取25g发酵蔬菜放入含有225mL灭菌生理盐水中,采用拍击式匀质器以8000~10000r/min的速度处理10s,充分振荡后,制成 10^{-1} 的均匀稀释液。再以9mL灭菌生理盐水做10倍递增稀释至 10^{-11} ,取 10^{-6} ~ 10^{-9} 的稀释液各1mL置于无菌平皿中,倒入溶化并冷却至46℃的改良MRS培养基约15mL,迅速轻轻旋动平皿,使培养基与菌液充分混匀,每个稀释度3次重复。同时将改良MRS培养基注入加有1mL无菌生理盐水的灭菌平皿内作空白对照。待培养基凝固后,倒置平板,置 (36 ± 1) ℃温箱中培养 (48 ± 2) h,待菌落长出后即可计数。取50mL混匀发酵液,用pH计测定pH值并记录。其平板菌落计数及pH值结果显示,发酵主要原料为生菜,乳酸菌数为 $(3.5 \sim 4.5) \times 10^8$ CFU/mL,发酵5d时pH为3.2~3.4;发酵主要原料为生菜和圆白菜,乳酸菌数为 $(5.5 \sim 6.6) \times 10^8$ CFU/mL,发酵5d时pH为3.2~3.4。

[0054] (6) 益生菌发酵蔬菜的亚硝酸盐测定

[0055] 称取5g(精确至0.001g)匀浆试样,置于250mL具塞锥形瓶中,加12.5mL50g/L饱和硼砂溶液,加入70℃左右的水约150mL,混匀,于沸水浴中加热15min,取出置冷水浴中冷却,并放置至室温。定量转移上述提取液至200mL容量瓶中,加入5mL106g/L亚铁氰化钾溶液,摇匀,再加入5mL220g/L乙酸锌溶液,以沉淀蛋白质。加水至刻度,摇匀,放置30min,除去上层脂肪,上清液用滤纸过滤,弃去初滤液30mL,滤液备用。

[0056] 吸取40.0mL上述滤液于50mL带塞比色管中,于标准管与试样管中分别加入2mL4g/L对氨基苯磺酸溶液,混匀,静置3min~5min后各加入1mL2g/L盐酸萘乙二胺溶液,加水至刻度,混匀,静置15min,用1cm比色杯,以零管调节零点,于波长538nm处测吸光度,绘制标准曲线比较。同时做试剂空白。亚硝酸盐标准曲线回归方程: $y=0.0477x$, $R^2=0.9986$,发酵主要原料为生菜,发酵5d时亚硝酸盐含量为0.20~0.27mg/kg;发酵主要原料为生菜和圆白菜,发酵5d时亚硝酸盐含量为0.20~0.27mg/kg。本发明接种发酵蔬菜0d~5d发酵过程中亚硝酸盐含量在0.10~0.27mg/kg范围内,发酵过程中未出现“亚硝峰”,亚硝酸盐含量较低且平稳;自然发酵蔬菜0d~5d发酵过程中亚硝酸盐含量在0.10~2.18mg/kg范围内,自然发酵蔬

菜的亚硝酸盐含量高于接种发酵蔬菜,自然发酵蔬菜1d时有“亚硝峰”达到2.18mg/kg,但其含量均在合理限量范围内(国家标准GB 2762-2017腌渍蔬菜亚硝酸盐含量低于20mg/kg)。

[0057] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。