



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109123647 B

(45) 授权公告日 2021.10.01

(21) 申请号 201811220405.0

A23L 7/104 (2016.01)

(22) 申请日 2018.10.19

A23L 11/50 (2021.01)

C12R 1/225 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109123647 A

(56) 对比文件

US 2010254948 A1, 2010.10.07

CN 105942084 A, 2016.09.21

(43) 申请公布日 2019.01.04

(73) 专利权人 上海交通大学

审查员 田淇

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72) 发明人 宋立华 蒋芮 管玓 丁信文

欧阳鹏凌 宋晨玮 吴佳怡

(74) 专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限公司

公司 31220

代理人 郑立

(51) Int. Cl.

C12P 1/04 (2006.01)

A23L 33/00 (2016.01)

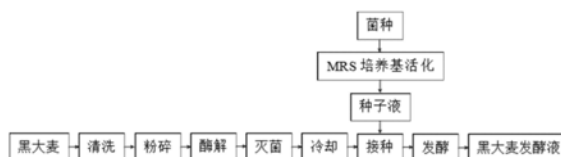
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种有效富集 γ -氨基丁酸及多酚的黑大麦
酵素制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种有效富集 γ -氨基丁酸及多酚的黑大麦酵素制备方法,包括以下步骤:1) 黑大麦酶解液培养基的制备:包括黑大麦清洗,粉碎,酶解,灭菌,冷却,得到所述黑大麦酶解液培养基;2) 产 γ -氨基丁酸的乳杆菌的菌种用培养基活化得到种子液;3) 将步骤2) 得到的种子液接种到步骤1) 得到的黑大麦酶解液培养基中,发酵,得到黑大麦发酵液。本发明筛选到可用于黑大麦发酵、有效富集 γ -氨基丁酸及多酚的乳杆菌,建立了黑大麦酵素加工的培养基制备工艺。本发明可为进一步开发以黑大麦为主要原料的功能性谷物酵素食品提供新的选择,因此具有较好的应用前景。



1. 一种有效富集 γ -氨基丁酸及多酚的黑大麦酵素制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

1) 黑大麦酶解液培养基的制备: 包括黑大麦清洗, 粉碎, 酶解, 灭菌, 冷却, 得到所述黑大麦酶解液培养基;

2) 产 γ -氨基丁酸的乳杆菌的菌种用培养基活化得到种子液; 所述产 γ -氨基丁酸的乳杆菌为希氏乳杆菌 (*Lactobacillus hilgardii*) DSMZ 20051、2002年分离得到的乳杆菌新种丘氏乳杆菌 (*Lactobacillus diolivorans*) DSMZ 14421或kisonensis乳杆菌 (*Lactobacillus kisonensis*) JCM15041;

3) 将所述步骤2) 得到的种子液接种到所述步骤1) 得到的黑大麦酶解液培养基中, 发酵, 得到黑大麦发酵液;

其中, 所述步骤1) 中的酶解条件为黑大麦与水的质量比, 即料液比为1:5-10; 所述步骤1) 中的酶解所用的酶为 α -高温淀粉酶; 所述步骤1) 中的酶解温度为65-75℃; 酶解时间为20-60min; 所述步骤3) 中的接种量为体积百分比3%-9%; 所述步骤3) 中的发酵时长是24-72h。

2. 如权利要求1所述的黑大麦酵素制备方法, 其特征在于, 所述步骤1) 中的粉碎后过40目筛后再进行酶解。

3. 如权利要求1所述的黑大麦酵素制备方法, 其特征在于, 所述步骤2) 中的培养基为MRS培养基。

4. 如权利要求1所述的黑大麦酵素制备方法, 其特征在于, 所述步骤1) 具体为: 将黑大麦清洗、粉碎后过40目筛后, 加入纯水, 糊化时料液质量比1:5, 加热升温并搅拌, 到达酶解温度70℃时, 按10U/g的添加量加入 α -高温淀粉酶, 酶解时间40min, 后迅速升温至100℃, 煮沸15min, 115℃、15min杀菌、冷却, 得到黑大麦酶解液培养基。

5. 如权利要求1所述的黑大麦酵素制备方法, 其特征在于, 所述步骤3) 具体为: 接种kisonensis乳杆菌 (*Lactobacillus kisonensis*) JCM15041到所述步骤1) 得到的黑大麦酶解液培养基中, 接种量为3%, 30℃下, 发酵24h。

一种有效富集 γ -氨基丁酸及多酚的黑大麦酵素制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及谷物及功能性食品加工技术领域,尤其涉及一种有效富集 γ -氨基丁酸及多酚的黑大麦酵素制备方法。

背景技术

[0002] 全谷物是谷物脱壳后由皮层、胚芽和胚乳组成。皮层中含有大量的膳食纤维和矿物质,胚芽中含有大量的营养物质,因此全谷物营养成分更丰富。已有研究表明全谷物食品能有效降低心脑血管疾病、糖尿病和恶性肿瘤等相关慢性疾病的风险。但由于全谷物皮层含有大量纤维素,作为主食直接食用不利于人体正常的消化吸收;另外全谷物吸水性和膨胀性较差,蒸煮所需时间长、且口感差,所以全谷物食品不易为人们所接受。而通过发酵获得的“全谷物酵素”,不仅可以充分利用其原有营养成分,改善发酵基质原有的一些不良风味,更重要的是发酵后可产生一些新的功能成分,可进一步增加全谷物的营养价值。

[0003] “全谷物酵素”是在全谷物中加入少量蜂蜜作为底物,采用活性面包干酵母、乳杆菌等益生菌发酵得到的营养混合物。目前,关于谷物酵素的研究在国内上市产品较少,且品质优劣不一,远未形成产业化生产。虽然日本在这方面做的比较超前,已生产出如大高糙米酵素等酵素产品,但以黑大麦为发酵底物的“黑大麦酵素”产品及其发明尚未见报道。

[0004] 现有研究结果显示,谷物酵素发酵工艺条件不同, γ -氨基丁酸及其他功能活性物质种类和含量差别很大,因此,如何通过培养基的优化、菌种及原料的筛选及发酵工艺的优化,获得 γ -氨基丁酸(GABA)、多酚等活性成分较高的全谷物酵素食品是值得深入研究的问题。

[0005] 因此,本领域的技术人员致力于开发一种有效富集 γ -氨基丁酸及多酚的黑大麦酵素制备方法。

发明内容

[0006] 有鉴于现有技术的上述缺陷,本发明所要解决的技术问题是提供一种从黑大麦中有效富集 γ -氨基丁酸及多酚等活性成分的方法。

[0007] 本发明公开了一种有效富集 γ -氨基丁酸及多酚的黑大麦酵素制备方法,包括以下步骤:

[0008] 1) 黑大麦酶解液培养基的制备:包括黑大麦清洗,粉碎,酶解,灭菌,冷却,得到所述黑大麦酶解液培养基;

[0009] 2) 产 γ -氨基丁酸的乳杆菌的菌种用培养基活化得到种子液;所述产 γ -氨基丁酸的乳杆菌为希氏乳杆菌(*Lactobacillus hilgardii*) DSMZ 20051、2002年分离得到的乳杆菌新种丘氏乳杆菌(*Lactobacillus diolivorans*) DSMZ 14421及kisonensis乳杆菌(*Lactobacillus kisonensis*) JCM15041;

[0010] 3) 将所述步骤2)得到的种子液接种到所述步骤1)得到的黑大麦酶解液培养基中,发酵,得到黑大麦发酵液。

[0011] 其中,kisonensis乳杆菌 (*Lactobacillus kisonensis*) 以其发现者Kisonensis的名字命名。

[0012] 进一步的,将黑大麦清洗、粉碎后过40目筛后再进行酶解。

[0013] 进一步的,酶解条件为:黑大麦与水的质量比,即料液比1:5-10,优选为1:5;酶解所用的酶为 α -高温淀粉酶,进一步地,该酶的添加量为10U/g;酶解温度65-75℃,优选为70℃;酶解时间20-60min,优先为40min。

[0014] 进一步的,酶解终止条件为:酶解完成后迅速升温至100℃,并煮沸15min。

[0015] 进一步的,酶解完成后对酶解液进行杀菌。

[0016] 优选的,酶解液杀菌条件为:115℃,15min,冷却后备用,即为黑大麦酶解液体培养基。

[0017] 进一步的,产 γ -氨基丁酸的乳杆菌的菌种用MRS培养基活化得到种子液。

[0018] 进一步的,将活化了的产 γ -氨基丁酸的乳杆菌种子液接种到黑大麦酶解液体培养基上,接种量为体积百分比3%-9%,优先为3%-5%。

[0019] 进一步的,发酵时长为24-72h,优选为48h。

[0020] 优选的,接种kisonensis乳杆菌 (*Lactobacillus kisonensis*) JCM15041到黑大麦酶解液培养基中。

[0021] 优选的,接种量体积百分比3%,发酵温度30℃,发酵24h。

[0022] 在一些具体实施例中,步骤1) 具体为:将黑大麦清洗、粉碎后过40目筛后,加入纯水,糊化时料液质量比1:5,加热升温并搅拌,到达酶解温度70℃时,按10U/g的添加量加入 α -高温淀粉酶,酶解时间40分钟,后迅速升温至100℃,煮沸15分钟,115℃、15分钟杀菌、冷却,得到黑大麦酶解液培养基;步骤3) 具体为:接种kisonensis乳杆菌 (*Lactobacillus kisonensis*) JCM15041到所述步骤1) 得到的黑大麦酶解液培养基中,接种量为3%,30℃下,发酵24小时。

[0023] 进一步的,筛选到的乳杆菌除适用于黑大麦,还可广泛应用于糙米、藜麦、豆类等食品的发酵工艺。

[0024] 进一步的,黑大麦酵素制备方法可使必需脂肪酸 γ -亚油酸等其他功能性成分的含量显著增加,并新增原花青素B₂等活性成分。

[0025] 本发明首先筛选到可用于黑大麦发酵、有效富集 γ -氨基丁酸及多酚的乳杆菌,建立了黑大麦酵素加工的培养基制备工艺及最优发酵工艺条件。在该发酵工艺条件下, γ -亚油酸、苹果酸及表儿茶素等活性成分显著增加,并且新增儿茶素、香豆酸、原花青素B₂等活性物质。本发明可为进一步开发以黑大麦为主要原料的功能性谷物酵素食品提供新的选择,具有较好的应用前景。

[0026] 以下将结合附图对本发明的构思、具体步骤及产生的技术效果作进一步说明,以充分地了解本发明的目的、特征和效果。

附图说明

[0027] 图1是本发明的一个较佳实施例的黑大麦酵素发酵工艺流程;

[0028] 图2是本发明的一个较佳实施例的纸层析定性检测 γ -氨基丁酸结果;

[0029] 图3是本发明的一个较佳实施例的氨基酸分析仪定量检测 γ -氨基丁酸结果;

[0030] 图4是本发明的一个较佳实施例的黑大麦发酵物中含量显著变化的活性成分;

[0031] 图5是本发明的一个较佳实施例的黑大麦发酵物中新增的活性成分种类及所占比例。

具体实施方式

[0032] 以下参考说明书附图介绍本发明的多个优选实施例,使其技术内容更加清楚和便于理解。本发明可以通过许多不同形式的实施例来得以体现,本发明的保护范围并非仅限于文中提到的实施例。

[0033] 实施例1

[0034] 本实施例为黑大麦酶解液培养基的制备:

[0035] 如表1所示,采用三因素三水平正交试验,考察糊化料液比、酶解温度、酶解时间对黑大麦酶解物中还原糖含量的影响,优化建立了黑大麦酶解液培养基的制备工艺条件为:将黑大麦粉碎后过40目筛后,依次按料液比1:5 (m/m) 加入纯水,加热升温并搅拌;到达70℃酶解温度时,加入 α -高温淀粉酶(添加量为10U/g,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司),酶解时间40min;酶解时间结束后迅速升温至100℃,煮沸15min;最后采用115℃、15min杀菌,冷却后备用。70℃和75℃对酶解结果影响差别不大,从节约成本的角度酶解温度可采用70℃。

[0036] 表1影响黑大麦酶解物还原糖含量因素正交试验 $L_9(3^4)$ 结果

[0037]	影响黑大麦酶解物还原糖含量的因素				试验结果
	组别	A 糊化比例	B 酶解温度	C 酶解时间	还原糖含量
		(m/m)	(℃)	(min)	(%)
	1	1: 5	65	20	8.02
	2	1: 5	70	60	11.97
	3	1: 5	75	40	11.87
	4	1: 8	65	60	6.89
	5	1: 8	70	40	7.12
	6	1: 8	75	20	5.14
	7	1: 10	65	40	5.04
[0038]	8	1: 10	70	20	2.35
	9	1: 10	75	60	4.97
	K_{1j}	31.86	19.95	15.51	—
	K_{2j}	19.15	21.44	24.03	—
	K_{3j}	12.36	21.98	23.83	—
	R_j	19.50	2.03	2.04	—

[0039] 实施例2

[0040] 本实施例为筛选产 γ -氨基丁酸的乳杆菌:

[0041] 以上述黑大麦酶解液为培养基,建立了黑大麦发酵工艺流程,如图1所示。将菌种用MRS培养基活化形成种子液,然后接种到冷却的黑大麦酶解液培养基中进行发酵,获得黑大麦发酵液。并以 γ -氨基丁酸为指标,以上述黑大麦酶解液为培养基,分别于黑大麦培养基中接种21株乳杆菌,其中有11株植物乳杆菌(编号分别为11、35、25、294、2519、34、3736、16、234、30、01)是由上海交通大学食品微生物学实验室茱萸中分离并保存(其中34号为干酪乳杆菌,其余皆为植物乳杆菌);另外10株的来源及出处见表2。

[0042] 表2本发明所用部分发酵菌的来源及出处

	编号	名称	来源	文献
	1*	<i>Lactobacillus rapi</i>	JCM15042	Watanabe et al
[0043]	2	<i>Lactobacillus farrduginis</i>	JCM14108	Endo and Okada
	3	<i>Lactobacillus casei</i>	CGMCC 1.8727	
	4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CGMCC 1.124	
	5	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	JCM 1155	Douglas and Cruess 1936
	6	<i>Lactobacillus senioris</i>	JCM 17472	Oki et al.2012
	7	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	DSMZ 20051	
[0044]	8	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSMZ 20052	
	9	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	DSMZ 14421	Krooneman et al.2002
	10	<i>Lactobacillus kisonensis</i>	JCM15041	Watanabe et al.2009

[0045] 注:此表中的编号1与由上海交通大学食品微生物学实验室茱萸中分离并保存的编号01不是同一菌株。

[0046] 实验结果表明其中的7号、9号及10号菌具有一定的富集 γ -氨基丁酸的能力,如图2和图3所示。图3中的“*”表示与空白(未发酵的黑大麦酶解物液体培养基)相比差异显著, $P < 0.05$ 。在此基础上通过正交实验,优化并确立可有效富集 γ -氨基丁酸的黑大麦发酵工艺条件。在黑大麦酶解物液体培养基中分别接种1%、3%和5%的已活化7、9、10号菌,在初始pH 6.5、30℃条件下培养24h后取样检测 γ -氨基丁酸,正交实验结果如表3所示。正交实验结果表明:最优发酵条件为菌种10号菌,发酵时长24h,接种量5%。在此条件下, γ -氨基丁酸的富集量为43.56mg/100g,较未发酵对照组(18.59mg/100g)提高了1.34倍。

[0047] 表3利用黑大麦液体培养基发酵富集 γ -氨基丁酸正交试验结果

	组别	因素			结果
		A 菌种	B 发酵时长 (h)	C 接种量 (%)	γ -氨基丁酸含量 (mg/L)
[0048]	1	7	24	5	37.996
	2	7	48	3	30.481
	3	7	72	1	28.314
	4	9	24	1	34.769
	5	9	48	5	35.938
	6	9	72	3	33.409
	7	10	24	3	36.332
	8	10	48	1	34.821
	9	10	72	5	37.537
[0049]	K _{1j}	96.791	109.097	97.904	—
	K _{2j}	104.116	101.24	100.222	—
	K _{3j}	108.69	99.26	111.471	—
	R _j	11.899	9.837	13.567	—

[0050] 实施例3

[0051] 本实施例为同时富集黑大麦发酵物中多酚和 γ -氨基丁酸工艺参数的建立与优化：

[0052] 以多酚为考察指标建立最优化发酵工艺正交实验，实验结果如表4所示。结果表明最佳富集黑大麦发酵物中多酚的工艺参数为：10号菌，接种量9%，料液比1:5，30℃下发酵24h。

[0053] 表4黑大麦液体培养基发酵富集多酚影响因素正交实验结果

组别	因素				结果	
	A 料液比	B 时间	C 接种量	D 菌种	多酚含量 (mg/100g)	
[0054]	1	1:5	12h	3%	7 号	61.27
	2	1:5	24h	6%	9 号	68.72
	3	1:5	48h	9%	10 号	69.69
	4	1:7.5	12h	6%	10 号	55.63
	5	1:7.5	24h	9%	7 号	59.73
	6	1:7.5	48h	3%	9 号	53.18
	7	1:10	12h	9%	10 号	48.35
	8	1:10	24h	3%	10 号	46.47
	9	1:10	48h	6%	7 号	49.37
K _{1j}	67.89	55.08	55.63	56.79		
K _{2j}	56.18	58.31	57.91	55.10		
K _{3j}	48.06	57.41	59.26	57.25		
R _j	19.83	3.23	3.63	2.15		
主次顺序		A>C>B>D				
优组合		A1	B2	C3	D3	
[0055]						

[0056] 综合考虑到前述 γ -氨基丁酸和本实验结果均是10号菌较好,进一步验证了10号菌分别在3%、6%、9%的接种量情况下多酚及 γ -氨基丁酸的富集情况,结果如表5和表6所示,3%接种量的富集效果高于6%、9%的接种量,3%接种量的富集效果为:多酚含量为88mg/100g,较未发酵组(43mg/100g)提高了1.05倍; γ -氨基丁酸也达到最高65.14mg/100g,较未发酵组(19.06mg/100g)提高了2.42倍。考虑到实际生产成本,采用10号菌,3%接种量。

[0057] 表5最优条件下黑大麦发酵物中多酚含量验证结果(10号菌)

	接种量	未发酵对照	3%	6%	9%
[0058]	多酚含量 (mg/100g)	43±0.02	88±0.02*	84±0.03*	82±0.01*

[0059] *p<0.0001vs未发酵对照组

[0060] 表6多酚产生最佳发酵工艺条件下 γ -氨基丁酸的含量(mg/100g)

	γ -氨基丁酸含量	γ -氨基丁酸含量	提高倍数
[0061]	空白	19.06	-
	10 号菌发酵	45.48	1.39
	最优条件验证	65.14	2.42

[0062] 综上所述,本发明以黑大麦酶解液为培养基,以乳杆菌为发酵菌种,有效富集 γ -氨基丁酸及多酚等活性成分的工艺条件如下:将黑大麦粉碎后过40目筛后,依次按设计比例加入纯水,糊化时料液比例1:5 (m/m),加热升温并搅拌,到达酶解温度70℃时,加入 α -高温淀粉酶(添加量为10U/g),酶解时间40min,后迅速升温至100℃,煮沸15min,115℃、15min 杀菌,冷却后接种10号菌,接种量3%,发酵时长24h,在此条件下 γ -氨基丁酸含量为65.14mg/100g,较未发酵对照组(19.06mg/100g)提高了2.42倍,多酚含量为88mg/100g,较对照组(43mg/100g)增加了1.05倍。

[0063] 除多酚含量的检测外,黑大麦发酵物的UPLC-MS分析结果显示,其他活性成分含量在发酵后发生变化,图4所示为发酵后含量变化较大的部分活性成分。从中可看出必需脂肪酸 γ -亚油酸、苹果酸、柑桔甙元及表儿茶素类等功能性活性成分在发酵后极显著增加。

[0064] 除上述活性成分外,UPLC-MS分析结果还发现黑大麦发酵后还可产生发酵前谷物中不含有的新的活性物质,如图5所示。主要是儿茶素、丹酚酸、香豆酸、原花青素B₂等。

[0065] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解,本领域的普通技术无需创造性劳动就可以根据本发明的构思作出诸多修改和变化。因此,凡本技术领域中技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案,皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

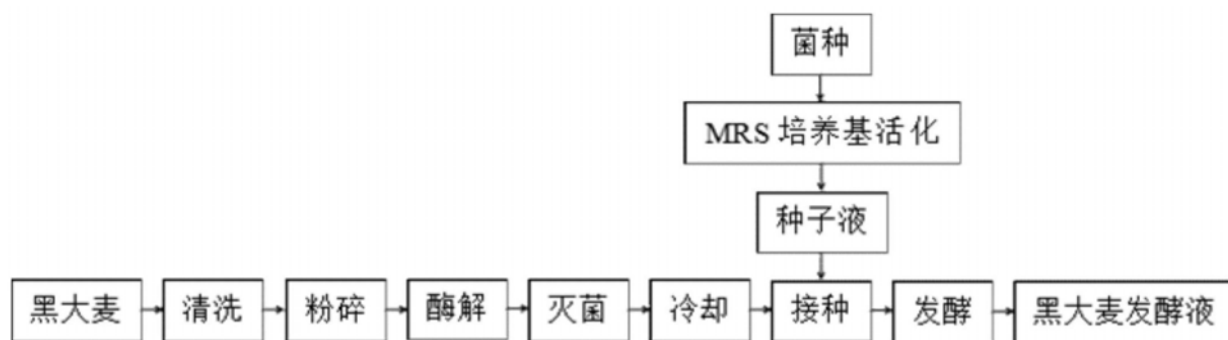


图1

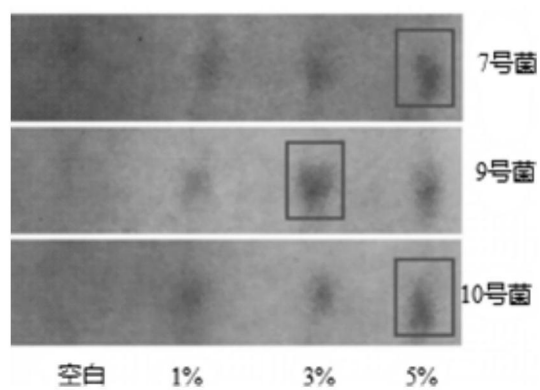


图2

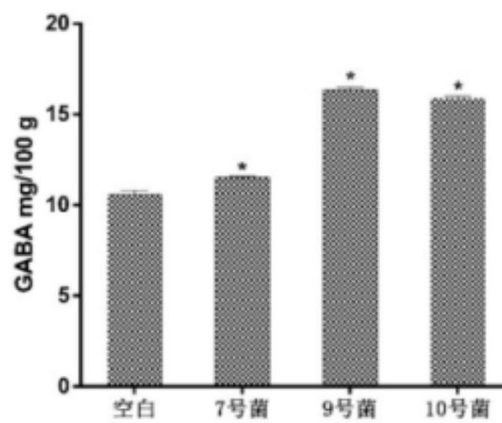


图3

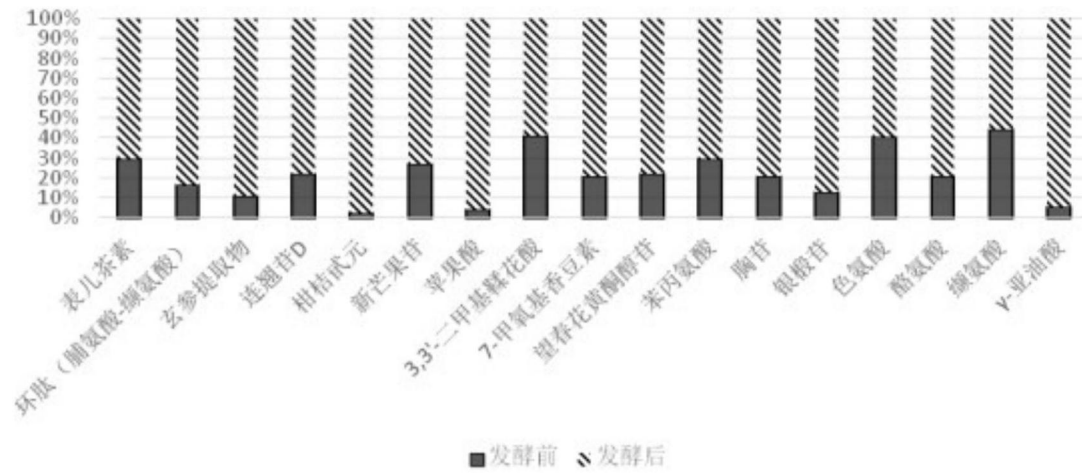


图4

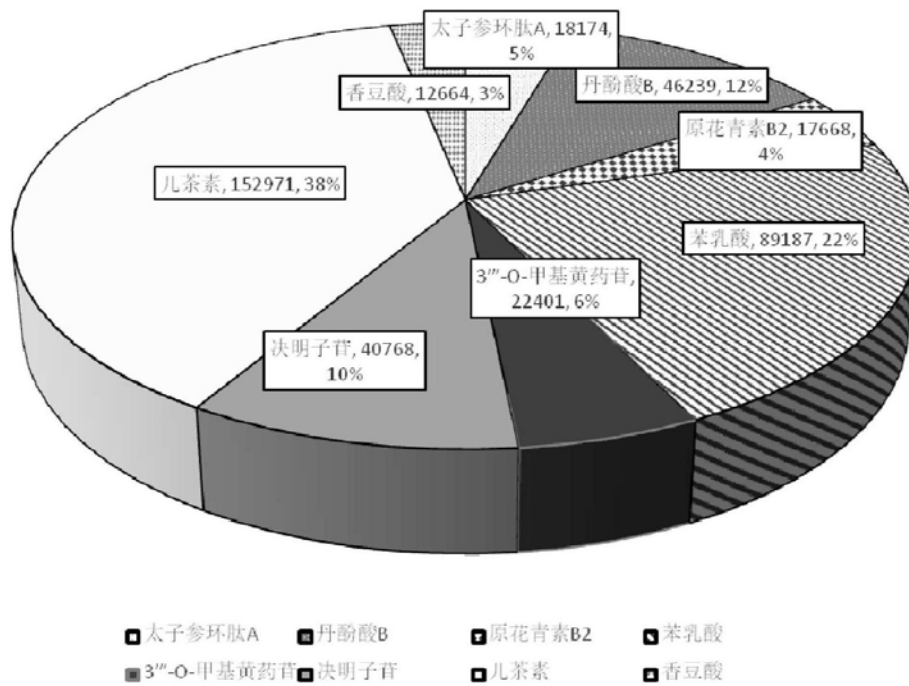


图5