



(21) 申请号 202410369730.2

(22) 申请日 2024.03.29

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 117965397 A

(43) 申请公布日 2024.05.03

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO.27527 2023.06.02

(73) 专利权人 烟台欣和企业食品有限公司

地址 264006 山东省烟台市经济技术开发区成都大街15号

(72) 发明人 勇倩倩 刘进昌 邵丹丹 马雪琪
姜政飞

(74) 专利代理机构 北京中创博腾知识产权代理
事务所(普通合伙) 11636

专利代理师 初晓玮

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 27/50 (2016.01)

A23L 11/50 (2021.01)

C12P 13/00 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102429207 A, 2012.05.02

CN 115003789 A, 2022.09.02

JP 2005192553 A, 2005.07.21

US 2023024099 A1, 2023.01.26

丁娟芳等.扬州稀甜酱中乳酸菌的分离鉴定及抑菌活性初探.《中国酿造》.2020,第39卷(第09期),86-90.

Kai Zhou等.Citrulline Accumulation Mechanism of *Pediococcus acidilactici* and *Weissella confusa* in Soy Sauce and the Effects of Phenolic Compound on Citrulline Accumulation.《Front Microbiol.》.2021,第12卷757542.

梁恒宇;邓立康;林海龙.传统发酵大豆食品中乳酸菌的分布、功能和应用.食品科学.2013,(19),381-385.

孙莉;胡文康;黄瑶;付彩霞;李冬生;徐宁.非耐盐乳酸菌与米曲霉共生酿造酱油的研究.中国调味品.2020,(05),13-18.

审查员 赵秋歌

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一株乳酸片球菌及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一株乳酸片球菌及其应用,属于微生物发酵技术领域。本发明所提供的乳酸片球菌SP136保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.27527,保藏日期为2023年06月02日,保藏地址为中国北京,分类命名为乳酸片球菌*Pediococcus acidilactici*。本发明所提供的乳酸片球菌SP136具有耐盐性高、谷氨酸脱羧酶酶活高、 γ -氨基丁酸合成量高的优点;将该乳酸片球菌应用于豆酱及酱油的发酵过程,既能显著提高豆酱、酱油产品中的 γ -氨基丁酸含量,还能克服目前大多数产GABA乳酸菌食盐耐受性弱的问题,应用

价值更高。



1. 一株乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*) SP136, 其特征在于,
所述乳酸片球菌保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为 CGMCC No. 27527, 保藏日期为2023年06月02日, 保藏地址为中国北京。
2. 含有权利要求1所述乳酸片球菌的酱醪。
3. 含有权利要求1所述乳酸片球菌或权利要求2所述酱醪的产品, 所述产品为微生物菌剂、发酵制剂。
4. 权利要求1所述的乳酸片球菌、或权利要求2所述的酱醪、或权利要求3所述的产品在制备豆酱或酱油中的应用。
5. 一种豆酱的制备方法, 其特征在于, 所述制备方法包括: 在发酵过程中接种权利要求1所述的乳酸片球菌。
6. 一种酱油的制备方法, 其特征在于, 所述制备方法包括: 在发酵过程中接种权利要求1所述的乳酸片球菌。

一株乳酸片球菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物发酵技术领域,具体为一株乳酸片球菌及其应用。

背景技术

[0002] γ -氨基丁酸(GABA)又叫4-氨基丁酸,是一种四碳非蛋白质氨基酸,主要以兼性离子存在于水溶液中。GABA作为一种神经递质,有众多生理功能,如降低血压、调节激素分泌、促进生殖、镇定安神等,对多种疾病具有辅助治疗和预防效果,在食品、医药、化工、农业等行业均有应用案例。

[0003] GABA的制备方法主要有化学合成法和生物合成法(植物富集法、微生物转化法、酶法),植物富集法是将富含谷氨酸脱羧酶(GAD, EC 4.1.1.15)的植物组织作为酶原直接催化谷氨酸(Glu)生成GABA。微生物转化法是制备GABA最主要的方法,即利用大肠杆菌和乳酸菌等耐酸细菌发酵制备GABA。酶法是利用GAD直接催化Glu制备GABA。谷氨酸脱羧酶能专一性地催化谷氨酸脱羧生成GABA和 CO_2 ,大多数GAD在pH4.0~6.0范围内起催化作用,催化过程不断消耗 H^+ ,导致反应过程的pH不断升高,当pH>6时,GAD催化活力显著下降,甚至完全丧失活性。

[0004] 现在食品行业中的GABA通常作为食品添加剂人为添加,其食用安全性需要严格把控,相较于外源添加,微生物转化法具有条件温和、安全、耗能低、成本低、技术含量高等优点。乳酸菌是利用微生物发酵法制备GABA的优势微生物,近年来国内外均有报道乳酸菌具有合成GABA的能力,其中包括短乳杆菌、乳酸链球菌、嗜热链球菌、植物乳杆菌、瑞士乳杆菌、副干酪乳杆菌等。利用食品级安全乳酸菌发酵制备GABA,并不断优化发酵条件以提高其产量,为功能性调味品的开发提供了思路,具有安全、产量高、成本低等优点,是调味品行业的发展趋势。

[0005] 目前,乳酸菌最高可在8-12%的食盐条件下生产 γ -氨基丁酸。但目前除极少数减盐酱油的盐浓度在12%及以下,大部分酱油的盐浓度均在15-18 g/100mL,如果结合传统调味品中豆瓣酱和酱油生产的发酵工艺,筛选出自然界天然存在的、高产GABA、且耐受豆瓣酱(10-12 g/100 g)和酱油(15-18 g/100 mL)生产高盐环境的乳酸菌,对于制备发酵类GABA调味品如豆瓣酱、酱油等具有不可替代的优势。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一株能够高产 γ -氨基丁酸的乳酸片球菌。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一株乳酸片球菌,所述乳酸片球菌保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址为中国北京,保藏编号为CGMCC No. 27527,保藏日期为2023年06月02日,分类命名为乳酸片球菌*Pediococcus acidilactici*。

[0008] 本发明还提供一种含有所述乳酸片球菌的酱醪。

[0009] 作为优选方案,所述酱醪中,乳酸片球菌的接种比例为0.1%-5%。

- [0010] 本发明还提供一种含有所述乳酸片球菌或所述酱醪的产品。
- [0011] 作为优选方案,所述产品包括微生物菌剂、发酵制剂。
- [0012] 本发明还提供所述乳酸片球菌、或所述酱醪、或所述产品在制备豆酱、酱油中的应用。
- [0013] 本发明还提供一种高 γ -氨基丁酸含量豆酱的制备方法,所述制备方法包括:在发酵过程中接种所述乳酸片球菌。
- [0014] 本发明还提供一种高 γ -氨基丁酸含量酱油的制备方法,所述制备方法包括:在发酵过程中接种所述乳酸片球菌。
- [0015] 本发明还提供一种提高产品中 γ -氨基丁酸含量的方法,将所述乳酸片球菌接种于产品原料中,并进行发酵。
- [0016] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明从酱油酱醪中分离出一株乳酸片球菌,该菌株具有耐盐性高、谷氨酸脱羧酶酶活高、 γ -氨基丁酸合成量高的优点;将该乳酸片球菌应用于豆酱及酱油的发酵过程,既能显著提高豆酱、酱油产品中的 γ -氨基丁酸含量,还能克服目前大多数产GABA乳酸菌食盐耐受性弱的问题,应用价值更高。

附图说明

- [0017] 图1为实施例1中筛选菌株薄层层析法谱图;
- [0018] 图2为实施例5中乳酸菌菌落形态图。

具体实施方式

[0019] 下面将结合附图,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0020] 下述实施例中,涉及的相关名词、实验方法及标准介绍如下:

[0021] 菌株分离源:豆瓣酱酱醪、酱油酱醪。

[0022] 筛选培养基:

[0023] 改良MRS培养基:添加5%谷氨酸钠、10%氯化钠的MRS培养基(pH5.5)。

[0024] 原汁筛选培养基:添加50%原汁酱油,并调整NaCl终浓度为10%、谷氨酸钠终浓度为2%的液体培养基(pH5.0)。

[0025] 薄层层析法:用铅笔在离薄层硅胶板底部1cm处画一条直线,点样点间距1cm,样品8000rpm离心10min,取0.5-1 μ L上清液分三次点样于薄层硅胶板上,展开剂是体积比为4:1:3的正丁醇、冰醋酸和水,加入0.4%的茚三酮作为显色剂,当层析到硅胶板上端2 cm左右停止层析,然后放在60℃烘箱中显色30min。以1 g/L的GABA、1 g/L的谷氨酸钠作为对照,观察是否存在GABA相应斑点。

[0026] 高效液相色谱法:取离心处理后的发酵液和GABA标准品各250 μ L,加入250 μ L碳酸氢钠-碳酸钠缓冲液(pH11.2)和500 μ L 9 g/L丹磺酰氯溶液,充分混匀,30℃反应30 min,过0.22 μ m滤膜;高效液相色谱条件为C18色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m),流动相A为0.3%甲酸水,流动相B为甲醇,流速为0.8mL/min,梯度洗脱,柱温30℃,进样量20 μ L,检测波

长331 nm。

[0027] GAD粗酶液提取:在改良MRS培养基中活化乳酸片球菌24 h,然后以1%的接种量再次接入200 mL原汁筛选培养基中放大培养,起始pH为5.0,36℃静置培养5 d,发酵结束后8000rpm离心收集菌体,置于4℃冷藏备用。将收集的细胞先用20 mM磷酸盐缓冲液(pH7.2)洗涤两次,再用含1 mM巯基乙醇和0.2 mg/mL溶菌酶的20 mM磷酸盐缓冲液(pH7.2)复溶,37℃水浴孵育1 h,反应结束后置于冰浴中,冰浴超声破碎40 min,4℃下,10000 r/min离心30 min,取上清,即得粗酶液。

[0028] GAD酶活测定:200μL底物溶液(0.1M谷氨酸钠,pH5.0、0.1 mol/L磷酸盐缓冲液)和100μL酶液在37℃反应1h后,迅速放入沸水浴10 min终止反应,然后离心取上清液,采用高效液相色谱法测定生成的GABA含量。一个酶活力单位定义为:在测定条件下,每分钟产生1μmol GABA所需的酶量。

[0029] 酱油中全氮利用率=(酱油全氮含量*酱油产量)/(脱脂大豆全氮含量*脱脂大豆重量+小麦全氮含量*小麦重量)

[0030] 酱中全氮利用率=(酱全氮含量*酱产量)/(大豆全氮含量*大豆重量+小麦粉全氮含量*小麦粉重量)

[0031] 其中,全氮检测方法参考《GB 5009.5-2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》。

[0032] 氨基酸态氮检测方法参考《GB 5009.235-2016 食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定》。

[0033] 实施例1 高产谷氨酸脱羧酶乳酸菌菌株初筛

[0034] 梯度稀释酱醪(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5})样品,倾注法倒入改良MRS培养基,36℃厌氧条件下培养5d。

[0035] 从平板上挑选不同形态的菌株至改良MRS液体试管中活化2-3d,以1%接种量接入加有杜氏导管的原汁筛选培养基,观察菌株产气情况,若菌株产气且pH>5.0,则初步证明该菌株能产生谷氨酸脱羧酶,利用谷氨酸产生γ-氨基丁酸和CO₂,此过程利用H⁺,pH升高。将筛选出的乳酸菌在改良MRS试管中活化,利用薄层层析法定性测定所筛菌株是否高产γ-氨基丁酸。本实施例初筛筛选出6株高产GABA的菌株,层析法检测结果如图1所示。

[0036] 实施例2 高产谷氨酸脱羧酶乳酸菌菌株复筛

[0037] 将初筛得到的6株菌株进行复筛,分别接种至原汁筛选培养基,30℃活化培养3d,8000rpm离心10min后取上清,检测谷氨酸脱羧酶活性高、谷氨酸转化率高、GABA产量多的菌株,复筛检测结果如表1所示,经检测SP136在原汁筛选培养基中GAD酶活为0.36 U/mL、谷氨酸转化率为85.36%、GABA产量为10.41 g/L,且菌落数在原汁培养基中可达10⁸CFU/mL以上,整体表现较好。

[0038] 表1高产GABA菌株复筛结果

[0039]

菌株编号	菌落总数/1g CFU/mL	GABA产量/g/L	谷氨酸转化率/%	GAD酶活/U/mL
SP016	7.85	7.75	63.54	0.26
SP075	7.98	9.81	80.47	0.31
SP098	8.13	9.53	78.13	0.31
SP112	8.21	9.70	79.51	0.34
SP136	8.33	10.41	85.36	0.36
SP178	8.34	10.17	83.42	0.35

[0040] 实施例3 用于酱油发酵的小试实验

[0041] 将脱脂大豆、小麦按照1:1.5的比例混合,加水,调整水分在22%,分装到500mL三角瓶中115℃ 15min灭菌,冷却后,以重量份数计,按照0.5%的接种比例接种米曲霉进行制曲小试实验;制曲结束后,按照重量比1:1的比例混合加入20°Be的食盐水,以体积份数计,按照1%的比例添加初筛得到的6株菌,进行发酵实验;对照组不添加上述菌株。发酵结束后,检测发酵原油的GABA、氨基酸态氮、全氮利用率提高比例,结果见表2,SP136在酱油发酵小试中,GABA产量达到10.11g/L,氨基酸态氮达到1.24 g/100mL,全氮利用比例相比对照提高25%,综合复筛和小试结果,后续选用SP136作为GABA发酵菌株。

[0042] 表2 高产GABA菌株小试结果

[0043]

菌株编号	GABA产量 (g/L)	氨基酸态氮(g/100mL)	全氮利用率相当于对照比例
SP016	7.42	1.18	1.13
SP075	9.52	1.15	1.16
SP098	9.58	1.21	1.18
SP112	9.64	1.20	1.21
SP136	10.11	1.24	1.25
SP178	9.87	1.23	1.23
对照	0.33	1.13	/

[0044] 实施例4 高产GABA菌株性质研究

[0045] 菌株活化:将SP136单菌落接种至改良MRS试管中,一次活化5d左右,培养至菌含量为 10^8 CFU/mL以上;从一次活化试管中按1%接种量加菌液至200mL改良MRS液体培养基二次活化5d,同样培养至菌含量达 10^8 CFU/mL以上。

[0046] 菌株二次活化后,以改良MRS为基础培养基,探究氯化钠含量为4%、8%、12%、16%、20%的条件下,接种量1%、发酵温度36℃、发酵时间5d的发酵条件下,SP136对氯化钠的耐受

情况,结果见表3,SP136能耐受16%的氯化钠,证明其可以在豆酱、酱油发酵的高盐环境下生长。

[0047] 表3 SP136对不同NaCl含量的耐受情况

[0048]

NaCl 含量	SP136的生长情况
4%	+
8%	+
12%	+
16%	+
20%	-

[0049] 备注:+表示能够在培养基中生长,-表示不能在培养基中生长。

[0050] 实施例5 SP136的鉴定

[0051] 该菌株在改良MRS固体培养基中进行分离纯化,菌落形态呈乳白色、菌落较小、圆形、表面光滑湿润、边缘整齐,易挑起,如图2所示,兼性厌氧,厌氧条件下长势更好。

[0052] 16S rDNA分子生物学鉴定:将上述菌株活化后使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取DNA,以通用引物24F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TACGACTTAACCCCAATCGC-3')进行PCR扩增。PCR反应体系为:10 μ mol/L上下游引物各2 μ L,1 μ L DNA模板,25 μ L Taq酶,加ddH₂O补足至50 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性3 min,94 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸40s,共30个循环,72 $^{\circ}$ C终止延伸10 min。通过琼脂糖核酸电泳对PCR产物进行验证后将PCR产物测序,测序结果与NCBI数据库比对,鉴定菌种为乳酸片球菌。

[0053] 实施例6 乳酸片球菌用于酱油发酵的中试实验

[0054] 将脱脂大豆进行蒸煮预处理,压力控制于0.15MPa,温度为120 $^{\circ}$ C,保持时间为8分钟;将小麦进行烘焙,压力控制于0.05MPa,温度控制在300 $^{\circ}$ C,然后粉碎,颗粒大小为80目左右,得到炒麦粉。将预处理完毕的脱脂大豆、炒麦粉按照重量比1:1混合后,待温度降低到28 $^{\circ}$ C时,按照0.1%的比例接入米曲霉进行制曲;制曲温度30 $^{\circ}$ C,制曲时间38h。制曲结束后,将制好的曲料与23 $^{\circ}$ Bé食盐水按重量比1:2混合,混匀后,将最终筛选获得的SP136菌株,以体积份数计,按照0.1%的接种量接种到发酵过程中,对照组不添加SP136菌株,待发酵结束后,检测发酵原油的GABA、氨基酸态氮、全氮利用率相当于对照比例,检测结果见表4,通过检测结果可以看出SP136能显著提高发酵酱油中的GABA含量,以及提高整体的全氮利用率。

[0055] 表4 发酵原油的指标检测结果

[0056]

菌株	GABA产量 (g/L)	氨基酸态氮 (g/100mL)	全氮利用率相当于对照比例
对照	0.32	1.12	/
SP136	10.02	1.21	1.26

[0057] 实施例7 乳酸片球菌用于豆酱发酵的中试实验

[0058] 大豆清洗后,在温度100℃下,蒸煮10分钟;小麦粉在温度100℃下,蒸煮30s,水分控制在22%,将预处理后大豆与小麦按照重量比1:1.5的比例混合,待温度降低到28℃时,按照0.1%的比例接入米曲霉进行制曲;制曲温度40℃,制曲时间48h。制曲结束后,将制好的曲料与20°Be食盐水按重量比1:1.5混合,混匀后,将最终筛选获得的SP136菌株,以体积份数计,按照5%的接种量接种到发酵过程中,对照组不添加SP136菌株,待发酵结束后,检测发酵原酱的GABA、氨基酸态氮、全氮利用率相当于对照比例,检测结果见表5,通过检测结果可以看出SP136能显著提高发酵酱中的GABA含量,以及提高整体的全氮利用率。

[0059] 表5 发酵原酱的指标检测结果

[0060]

菌株	GABA产量 (g/L)	氨基酸态氮 (g/100g)	全氮利用率相当于对照比例
对照	0.26	0.95	/
SP136	10.36	1.06	1.23

[0061] 综合上述各实施例可知,本发明所提供的乳酸片球菌SP136能显著提高发酵酱或发酵酱油中的GABA含量以及整体的全氮利用率,另一方面,该菌株耐盐性高,还能克服目前大多数产GABA乳酸菌食盐耐受性弱的问题。

[0062] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的仅为本发明的优选例,并不用来限制本发明,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的范围内。本发明保护范围由所附权利要求书及其等效物界定。

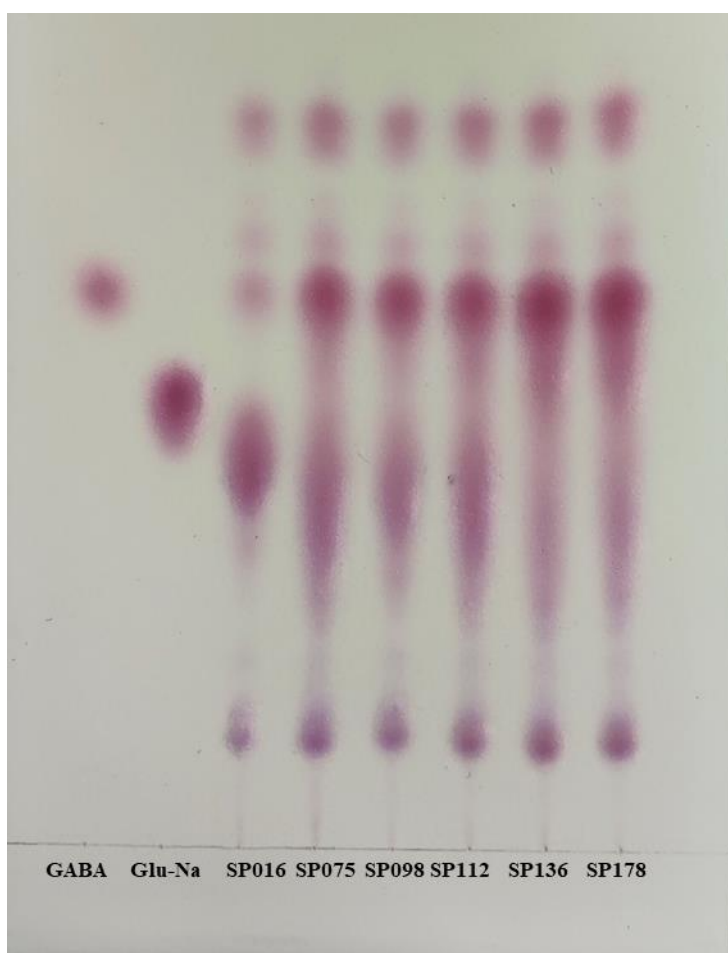


图1



图2