

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102936573 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 20

(21) 申请号 201210469031. 2

(22) 申请日 2012. 11. 20

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 6647 2012. 10. 08

(71) 申请人 黑龙江省科学院大庆分院

地址 163319 黑龙江省大庆市大庆高新区博
学大街 11 号

(72) 发明人 刘宇峰 石杰 姬妍茹 王月明

刘玉 张正海 高媛 董艳

于宗玄 杨庆丽

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006. 01)

A23L 1/212 (2006. 01)

A23L 1/29 (2006. 01)

C12R 1/125 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

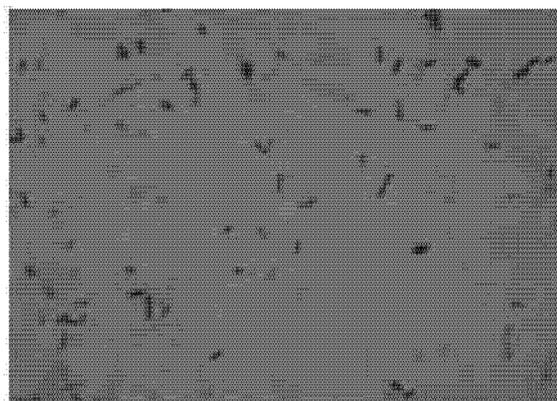
序列表 1 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌及其在黑蒜发酵中的用途

(57) 摘要

一种用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌及其在黑蒜发酵中的用途, 它涉及一种大蒜内生菌及其在黑蒜发酵中的用途。用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1, 保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号为 CGMCC No. 6647。本发明用于大蒜发酵黑蒜领域。



1. 一种用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌,其特征在於所述菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC No. 6647。

2. 如权利要求 1 所述的用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌在黑蒜发酵中的用途,其特征在於黑蒜发酵步骤如下:

将枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 配制成活菌数在 $10^9 \sim 10^{10}$ cfu/L 的高活性发酵剂,然后将高活性发酵剂喷涂在脱皮的生蒜表面,在 $28 \sim 93$ °C 的条件下发酵 $120 \sim 168$ h,即获得黑蒜。

3. 根据权利要求 2 所述的用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌在黑蒜发酵中的用途,其特征在於枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 用马铃薯培养基进行培养。

一种用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌及其在黑蒜发酵中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种大蒜内生菌及其在黑蒜发酵中的用途。

背景技术

[0002] 黑蒜是自二十一世纪才刚刚兴起的一种新型的大蒜深加工产品。黑蒜的加工方法最早始于日本的青森县。截止到 2009 年 3 月 2 日,国内共有六、七家企业引进日本技术进行发酵大蒜——黑蒜的生产开发。全国总产量仅约 2800 吨,并几乎均将黑蒜产品返销回日本、韩国等国家。因此黑蒜作为一种新兴的多功能健康食品,在国内存在巨大的市场潜力。2005 年经日本政府食品分析开发中心检测,黑蒜含有 18 种人体所需要的氨基酸、还含有含糖、蛋白质、钙、钾、磷、硫、碘和硅以及丰富的维生素 A、B₁、B₂、B₃ 和维生素 C 等。数据表明,黑蒜的综合活性力是普通大蒜的 10 倍以上,抗氧化力是普通大蒜的 15 倍以上。发酵黑蒜显著提高了大蒜的有效成份,具有抗氧化功能,可防衰老,防止细胞氧化,壮阳美容的功效。还能促使人体内的有毒物质排出体外,起到预防和治疗疾病的效果。

[0003] 现有黑蒜发酵过程是纯天然的,无任何添加剂的过程。因为大蒜本身有一种活性酶,在特定的环境下,处于休眠状态,达到一定的温度和湿度要求以后,它会被激活,自我发酵。通过发酵大蒜里面的蒜素、蛋白质,转化为氨基酸,碳水化合物转化为果糖。目前的黑蒜的生产工艺,依靠的是“酶促反应”的工作原理。实际上,酶促反应原理在食品工业生产中应用非常广泛,像我们生活中常用的酱油、醋、豆腐乳、啤酒,甚至面包、馒头,都是通过酶促反应原理生产出来的。“酶”指具有生物催化功能的高分子物质。一般情况下,酶在生物体中是不活泼的,一旦达到一定的温度、湿度和 pH 值,酶就开始变得活泼起来,在酶的作用下大蒜中的碳水化合物被分解成酸酸甜甜的果糖,蛋白质被分解成氨基酸,有刺激性气味的大蒜素,也转化成没有蒜臭味儿的 α -丙氨酸等物质。在酶促反应过程中,碳水化合物分解出来的果糖,蛋白质分解成的氨基酸相结合,又产生褐变反应,白色的蒜瓣儿就慢慢变成了黑色。一系列的生物化学反应所产生的鲜味、甜味、酸味和酯香混合在一起,最后形成了黑蒜独有的醇厚香味儿。由于目前都是采用大蒜内的酶促反应进行发酵,因此需要高温发酵 20~30 天即 480~720h;而且发酵条件要求的比较苛刻,由于酶素发酵期每一批大蒜的含水量、蒜瓣儿的大小、大蒜中的 pH 值都不一样,所以在生产中每一个阶段温度控制到多少,需要发酵多少个小时,还要有经验的技术人员来确定,因此增加了操作的难度,不便于大规模产业化生产,黑蒜的质量也难以保持稳定。

发明内容

[0004] 本发明要解决目前黑蒜发酵时间长,发酵工艺难控制、质量不稳定的问题,而提供一种用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌及其在黑蒜发酵中的用途。

[0005] 用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC

No. 6647。

[0006] 用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌在黑蒜发酵中的用途,黑蒜发酵步骤如下:

[0007] 将枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 配制成活菌数在 $10^9 \sim 10^{10}$ cfu/L 的高活性发酵剂,然后将高活性发酵剂喷涂在脱皮的生蒜表面,在 $28 \sim 93^\circ\text{C}$ 的条件下发酵 $120 \sim 168\text{h}$,即获得黑蒜。

[0008] 本发明枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 可加快黑蒜发酵进程,将黑蒜发酵周期降为 $120 \sim 168\text{h}$ 。

[0009] 本发明采用微生物发酵的手段发酵黑蒜,由于微生物能够适应更宽的发酵条件,所以操作更为容易,质量更易控制和稳定;而且可以明显降低发酵周期,降低发酵成本。

[0010] 用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1,属于芽孢杆菌属(*Bacillus* Cohn, 1872),已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏号为CGMCC No. 6647,保藏日期为2012年10月8日。

附图说明

[0011] 图1是具体实施方式一枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 镜检照片。图2是具体实施方式一中枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 发酵生蒜汁微生物显微镜照片。图3是具体实施方式一中枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 发酵熟蒜汁微生物显微镜照片。

具体实施方式

[0012] 本发明技术方案不局限于以下所列举具体实施方式,还包括各具体实施方式间的任意组合。

[0013] 具体实施方式一:本实施方式用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC No. 6647。

[0014] 本实施方式枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 是从黑蒜发酵过程中第五天的黑蒜蒜瓣内部组织中分离的一株大蒜内生菌。

[0015] 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 在厌氧环境下培养,培养基中层和表层生长,菌落边缘不规则、表面略有皱褶、褐色菌苔,为革兰氏阳性细菌,杆菌,有大量芽孢,兼性厌氧。本实施方式枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 镜检照片如图1所示。

[0016] 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 接入已灭菌的装有100ml的马铃薯液体培养基;然后置于 50°C 的空气浴震荡培养箱中培养24h。观察枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 种子液的生长情况,并测定OD值、pH值和活菌数,数据如表1所示。马铃薯液体培养基每升由200g马铃薯、20g葡萄糖和1000mL水制成(pH值自然)。

[0017] 表1

[0018]

微生物	650nm 处 OD 值	活菌数 cfu/L	马铃薯液体培养基发酵液状态	最终 pH 值	备注
第一代枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>) S8nyzx-1	1.2830	$9.1 \times 10^9 \pm 0.22$	发酵液颜色变化不大, 愉悦的酒香气味。	7.62	初始 pH 值 为 7.37
第二代枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>) S8nyzx-1	1.2098	$3.3 \times 10^9 \pm 0.22$	发酵液颜色变化不大, 愉悦的酒香气味。	7.58	初始 pH 值 为 7.37

[0019] 选用马铃薯液体培养基培养本实施方式枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 可保证发酵液的颜色不变和产生愉悦酒香气味。

[0020] 第一代和第二代枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 都能产生 10^9 cfu/L 以上的活菌数,且在马铃薯液体培养基发酵都不改变发酵液的颜色,并均能产生愉悦酒香气味,说明枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 具有良好的遗传稳定性和稳定的发酵性状。

[0021] 本实施方式枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 采用 16S rDNA 测序方法进行生物学鉴定, DNA 序列如 SEQ ID NO:1 所示。经鉴定本实施方式枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 为枯草芽孢杆菌深黑色亚种。

[0022] 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 发酵实验:

[0023] 生蒜汁的制法:称量生大蒜 600g 加入 600ml 无菌水置入已消毒处理过的料理机中打成匀浆液,定容到 1200ml。平均分成 6 分,作为空白样和试验样,各 3 个平行样,分别装入 500ml 无菌三角瓶中备用。

[0024] 熟蒜汁的制法:称量生大蒜 600g 于 $80 \sim 100^\circ\text{C}$ 热水中灭酶处理 15 分钟后,加入 600ml 无菌水置入已消毒处理过的料理机中达成匀浆液,定容到 1200ml。平均分成 6 分,作为空白样和试验样,各 3 个平行样,分别装入 500ml 无菌三角瓶中备用。

[0025] 生蒜瓣的制法:将新鲜蒜瓣去皮后用无菌水清洗一次,分别置入 250ml 烧杯中,备用。

[0026] 将枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 以 3% 的接种量接种于生蒜汁、熟蒜汁和生蒜瓣中,扎好瓶口,生蒜汁和熟蒜汁瓶置于 42°C 振荡培养箱培养 4h 后,调到 50°C 培养 48h。蒜汁发酵液的颜色、气味、状态的变化情况及各样品的活菌数见表 2。

[0027] 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 发酵生蒜汁微生物显微镜照片如图 2 所示。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) S8nyzx-1 发酵熟蒜汁微生物显微镜照片如图 3 所示。

[0028] 表 2

[0029]

试样	指标	试验样	空白样
生蒜汁	颜色	白→绿→草黄色	白→绿→浅草黄色
	气味	辣味消失	有蒜辣味
	味道	淡甜味, 无辣味	无甜味, 有些辣味
	状态	粘度降低, 液化趋势	粘度没变, 液化趋势
	活菌数	$6.36 \times 10^7 \pm 0.19$ cfu/L	$3.0 \times 10^4 \pm 0.11$ cfu/L
熟蒜汁	颜色	白→乳白→粉色	白→乳白→浅粉色
	气味	无辣味	无蒜辣味
	味道	淡甜味, 无辣味	无甜味, 有些辣味
	状态	粘度降低, 液化趋势	粘度没变, 液化趋势
	活菌数	$3.45 \times 10^9 \pm 0.12$ cfu/L	$5.95 \times 10^7 \pm 0.12$ cfu/L
生蒜瓣	颜色	由黑褐色菌斑向蒜瓣蔓延成褐黑色	蒜瓣熟化色, 淡黄色
	气味	稍有成熟黑蒜的酒香气味	没有成熟黑蒜的酒香气味
	味道	淡甜味, 无辣味, 后经 93℃ 处理 15h 后变甜。	有辣味, 后经 93℃ 处理 15h 后未变甜。
	状态	变软, 变黑	变熟软状, 变黄褐色

[0030] 对比发酵实验数据证明枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)S8nyzx-1 是黑蒜发酵过程中的有效菌剂, 能够加快黑蒜的发酵, 缩短黑蒜发酵时间, 降低发酵能耗。

[0031] 本实施方式枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)S8nyzx-1 将现有黑蒜发酵时间由 17 天以上减少到 10 天以内。

[0032] 本实施方式枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)S8nyzx-1 委托哈尔滨医科大学公共卫生学院进行了急性毒性的权威性试验; 实验表明本项目黑蒜产品无任何毒副作用, 食用安全。进行了自检(黑龙江省科学院)的基础上, 又委托了黑龙江出入境检验检疫局检验检疫技术中心进行了黑蒜发酵剂的活力——活菌数的检验。检测结果表明本发酵剂活菌数为 1.28×10^9 cfu/L, 达到了要求的指标, 可以应用到黑蒜发酵生产中。

[0033] 具体实施方式二: 本实施方式用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌在黑蒜发酵中的用途, 黑蒜发酵步骤如下:

[0034] 将枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)S8nyzx-1 配制成活菌数在 $10^9 \sim 10^{10}$ cfu/L 的高活性发酵剂, 然后将高活性发酵剂按照 1%~10% 的接种量喷涂在脱皮的生蒜表面, 在 28~93℃ 的条件下发酵 120~168h, 即获得黑蒜。

[0035] 本发明枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)S8nyzx-1 可加快黑蒜发酵进程, 将黑蒜发酵周期降为 120~168h。

[0036] 本实施方式方法黑蒜发酵周期仅为 120~168h, 比现有技术缩短了 360~552h, 加快了黑蒜发酵, 缩短了生产周期, 降低了能耗。采用微生物发酵, 发酵条件更宽, 更易操作, 从而提高了黑蒜发酵生产的可操作性, 产品质量的稳定性也大幅提升。

[0037] 分 20 组进行本实施方式黑蒜发酵, 120h 发酵结束后均得到黑褐色蒜瓣、具有酒香气味、口味甜酸、质地软; 同时采用现有酶促发酵法对同产地、同批次大蒜进行发酵(酶促发

酵时间为 25 天), 发酵结果见表 3。发酵结果说明该本实施方式方法可操作性强、可控性好, 工艺稳定性好。

[0038] 表 3

[0039]

处理		口感	质地	成分		颜色	气味
				干基多酚含量%	蒜酶含量%		
本实施方式	1	甜酸	软	0.3170	1.31	黑褐色	酒香气
	2	甜酸	软	0.3220	1.32	黑褐色	酒香气
	3	甜酸	软	0.3370	1.30	黑褐色	酒香气
	4	甜酸	软	0.3001	1.30	黑褐色	酒香气
	5	甜酸	软	0.3054	1.31	黑褐色	酒香气
	6	甜酸	软	0.3121	1.30	黑褐色	酒香气
	7	甜酸	软	0.3300	1.30	黑褐色	酒香气
	8	甜酸	软	0.2921	1.32	黑褐色	酒香气
	9	甜酸	软	0.3288	1.29	黑褐色	酒香气
	10	甜酸	软	0.3179	1.31	黑褐色	酒香气
	11	甜酸	软	0.3130	1.31	黑褐色	酒香气
	12	甜酸	软	0.3040	1.32	黑褐色	酒香气
	13	甜酸	软	0.3321	1.30	黑褐色	酒香气
	14	甜酸	软	0.3170	1.30	黑褐色	酒香气
	15	甜酸	软	0.3059	1.28	黑褐色	酒香气
	16	甜酸	软	0.3210	1.29	黑褐色	酒香气
	17	甜酸	软	0.3092	1.30	黑褐色	酒香气
	18	甜酸	软	0.3121	1.29	黑褐色	酒香气
	19	甜酸	软	0.3288	1.29	黑褐色	酒香气
	20	甜酸	软	0.3066	1.29	黑褐色	酒香气
酶促发酵一		甜酸微苦	硬	0.2846	1.12	黑色	香甜气
酶促发酵二		甜酸微苦	软	0.2298	1.03	棕黑色	果味
酶促发酵三		甜酸微辣	熟软	0.1983	0.98	棕色	蒜辣味

[0040]

[0041] 具体实施方式三: 本实施方式与具体实施方式二的不同点是: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)S8nyzx-1 用马铃薯培养基进行培养。其它步骤及参数与实施方式二相同。

[0001]

序列表

<110> 黑龙江省科学院大庆分院

<120> 一种用于加快黑蒜发酵进程的大蒜内生菌及其在黑蒜发酵中的用途

<160> 1

<210> 1

<211> 1419

<212> DNA

<213> 芽孢杆菌属 (*Bacillus Cohn*, 1872)

<400> 1

```

TGCAAGTCGA GCGGACAGAT GGGAGCTTGC TCCCTGATGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA 60
ACACGTGGGT AACCTGCCTG TAAGACTGGG ATAACTCCGG GAAACCGGGG CTAATACCGG 120
ATGGTTGTTT GAACCGCATG GTTCAAACAT AAAAGGTGGC TTCGGCTACC ACTTACAGAT 180
GGACCCGCGG CGCATTAGCT AGTTGGTGAG GTAACGGCTC ACCAAGGCAA CGATGCGTAG 240
CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCACACTGG GACTGAGACA CGGCCAGAC TCCTACGGGA 300
GGCAGCAGTA GGGAACTCTC CGCAATGGAC GAAAGTCTGA CGGAGCAACG CCGCGTGAGT 360
GATGAAGGTT TTCGGATCGT AAAGCTCTGT TGTTAGGGAA GAACAAGTAC CGTTCGAATA 420
GGGCGGTACC TTGACGGTAC CTAACCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC 480
GGTAATACGT AGGTGGCAAG CGTTGTCCGG AATTATTGGG CGTAAAGGGC TCGCAGGCGG 540
TTTCTTAAGT CTGATGTGAA AGCCCCCGGC TCAACCGGGG AGGGTCATTG GAAACTGGGG 600
AACTTGAGTG CAGAAGAGGA GAGTGGAATT CCACGTGTAG CGGTGAAAAT GCGTAGAGAT 660
GTGGAGGAAC ACCAGTGGCG AAGGCGACTC TCTGGTCTGT AACTGACGCT GAGGAGCGAA 720
AGCGTGGGGA GCGAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCGTAAAC GATGAGTGCT 780
AAGTGTTAGG GGGTTTCCGC CCCTTAGTGC TGCAGCTAAC GCATTAAGCA CTCCGCCTGG 840
GGAGTACGGT CGCAAGACTG AAACCTCAAAG GAATTGACGG GGGCCCCGAC AAGCGGTGGA 900
GCATGTGGTT TAATTCGAAG CAACGCGAAG AACCTTACCA GGTCTTGACA TCCTCTGACA 960
ATCCTAGAGA TAGGACGTCC CCTTCGGGGG CAGAGTGACA GGTGGTGCAT GGTTGTGCTC 1020
AGCTCGTGTC GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCTT GATCTTAGTT 1080
GCCAGCATTG AGTTGGGCAC TCTAAGGTGA CTGCCGGTGA CAAACCGGAG GAAGGTGGGG 1140
ATGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTATGAC CTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGACAGA 1200
ACAAAGGGCA GCGAAACCGC GAGGTTAAGC CAATCCCACA AATCTGTTCT CAGTTCGGAT 1260
CGCAGTCTGC AACTCGACTG CGTGAAGCTG GAATCGCTAG TAATCGCGGA TCAGCATGCC 1320
GCGGTGAATA CGTTCCCGGG CCTTGTACAC ACCGCCCGTC ACACCACGAG AGTTTGTAAC 1380
ACCCGAAGTC GGTGAGGTAA CCTTTTAGGA GCCAGCCGC 1419

```

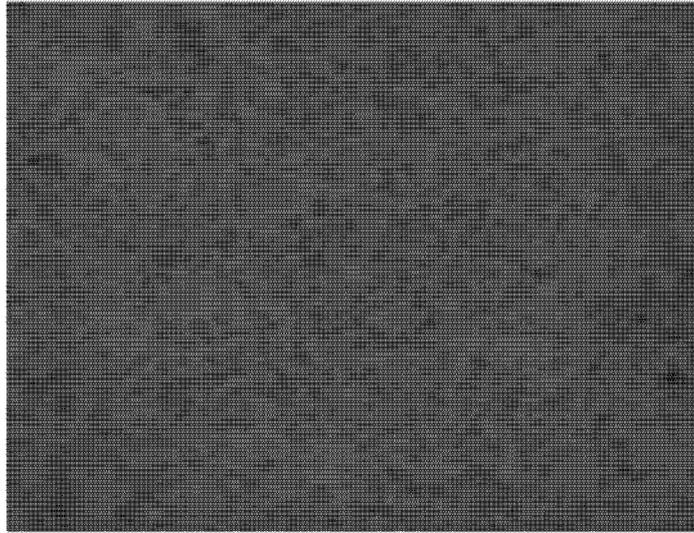


图 1

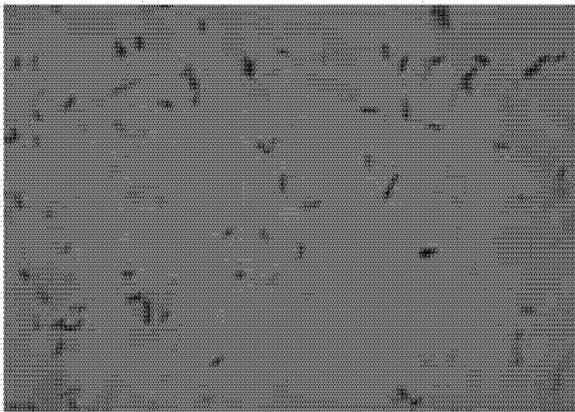


图 2

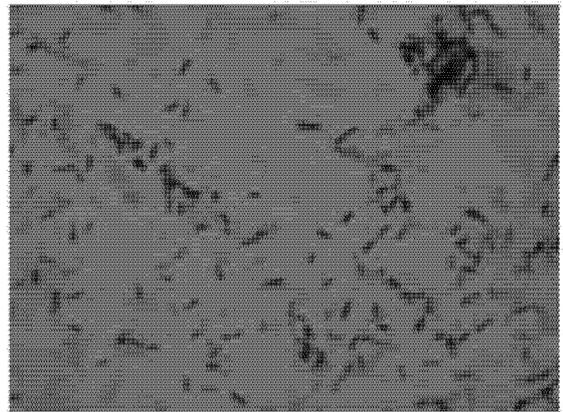


图 3