



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102899262 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 15

(21) 申请号 201210180129. 6

(22) 申请日 2012. 05. 31

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 5570 2011. 12. 12

(73) 专利权人 浙江正味食品有限公司

地址 322000 浙江省金华市义乌市佛堂镇工业区

专利权人 江南大学

(72) 发明人 诸葛斌 李汉文 方慧英 孙进
龚星慧

(74) 专利代理机构 北京汇信合知识产权代理有限公司 11335

代理人 王秀丽

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

A23L 1/218(2006. 01)

C12R 1/25(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101326972 A, 2008. 12. 24,

韩梅 等. 降解亚硝酸盐乳酸菌的分离与鉴定. 《沈阳农业大学学报》. 2011, 第 42 卷 (第 2 期), 第 216-219 页.

韩梅 等. 降解亚硝酸盐乳酸菌的分离与鉴定. 《沈阳农业大学学报》. 2011, 第 42 卷 (第 2 期), 第 216-219 页.

李汉文 等. 利用 PCR-DGGE 技术筛选分离海南黄帝椒产品微生物. 《食品与发酵工业》. 2012, 第 38 卷 (第 3 期), 第 38 - 42 页.

审查员 马静

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种植物乳杆菌及其快速降解发酵过程中亚硝酸盐的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种接种乳酸菌快速降低黄帝椒发酵过程中亚硝酸盐含量的方法。它是在黄帝椒发酵过程中接入经活化、扩大培养后的乳酸菌种子液进行发酵,其特征在于:所述的辣椒是海南特产高辣度黄帝椒,所述的乳酸菌种子液是植物乳杆菌,所述的植物乳杆菌筛选至海南高辣度黄帝椒天然发酵微生物,所述的植物乳杆菌接种量是 3%-5%(体积比),发酵结束后加 12% 的高盐调味并杀死残余的微生物。利用此种方法发酵海南黄帝椒亚硝酸盐含量显著降低,也很好的保持了辣椒原有的风味及营养。本发明产品制作简便,极大的缩短了黄帝椒产品生产的周期并显著的提高产品的安全性,应用前景广阔。

1. 一种植物乳杆菌快速降解发酵过程中亚硝酸盐的方法,其特征在于在发酵过程中接入经活化、扩大培养后的植物乳杆菌种子液进行发酵,种子液的接种量体积百分比为3% -5%,发酵温度是30℃,发酵时间是20-24h,发酵结束后加12%的高盐调味并杀死残余的微生物;所述植物乳杆菌于2011年12月12日保藏于中国微生物菌种保藏中心,保藏编号为CGMCC NO. 5570;所述发酵是以黄帝椒发酵生产海南特产高辣度黄帝椒;

具体步骤为:

第一步,培养基的制备:

菌株活化培养基,即MRS培养基:牛肉膏10g/L,蛋白胨10g/L,酵母粉5g/L, K_2HPO_4 2g/L, 柠檬酸铵2g/L, 乙酸钠5g/L, 葡萄糖20g/L, 吐温801ml/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25g/L, pH = 6.2-6.4, 20g/L 琼脂;

液体种子培养基:MRS培养基不加琼脂即为液体种子培养基;

第二步,菌株的活化:将保存的植物乳杆菌在固体MRS培养基上划线活化;

第三步,种子液的制备:将第二步中活化好的菌株接种到液体种子培养基中,于37℃静置培养24-30h,离心收集菌体,用无菌的生理盐水洗涤菌体,稀释到浓度 10^9-10^{10} CFU/mL;

第四步,将新鲜的黄帝椒洗净、切碎,加入等质量的凉开水,并按质量体积比3% -5%的接种量接入制备好的种子液;

第五步,密封发酵:将调好的物料在密封的容器中30℃发酵20-24h,终止发酵;

第六步,高盐抑菌:发酵结束后按质量比12%加高盐抑制残余的微生物。

一种植物乳杆菌及其快速降解发酵过程中亚硝酸盐的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物乳杆菌及其应用,特别是一种可快速降解发酵过程中亚硝酸盐植物乳杆菌及其应用。

技术背景

[0002] 发酵蔬菜是我国的传统发酵食品之一,有着悠久的食用历史。传统的蔬菜发酵工艺主要是自然发酵。蔬菜在生长过程中很容易积累土壤中的氮元素而硝酸盐,蔬菜中的硝酸盐在厌氧发酵的过程中,会因为硝酸盐还原作用形成亚硝酸盐,自然发酵过程中的微生物种类杂乱,由其是发酵前期存在很多能还原硝酸盐的微生物,能大大增加产品中亚硝酸盐含量。亚硝酸盐对人体有很大的伤害。0.2-0.5g 的摄入量会使人中毒,3g 即致死。除此之外,亚硝酸盐还是强致癌物质亚硝胺的前体,它能与仲胺类物质在体内或体外合成亚硝胺;人体中的亚硝酸盐具有强氧化性,能结合 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} ,迫使血红蛋白失去携氧能力。

[0003] 大多数乳酸菌中缺乏氨基酸脱羧酶和细胞色素氧化酶系统,不能还原硝酸盐,不产生氨。在发酵过程中,乳酸菌能迅速的产酸降低环境 pH 值,抑制杂菌的生长,降低亚硝酸盐的生成,低的 pH 值也能是亚硝酸盐发生自我的降解。乳酸菌还能产生亚硝酸盐还原酶,降解亚硝酸盐,减低产品中亚硝酸盐含量。

[0004] 传统的发酵食品一般是通过延长发酵时间,待优势微生物形成之后在通过优势微生物作用减低产品中亚硝酸盐的含量,此过程中亚硝酸盐的生成量存在峰值,周期也相对较长。目前对发酵食品中亚硝酸盐的研究主要集中在亚硝酸盐含量的动态变化和硝酸盐还原酶活性等上,对直接降低亚硝酸盐含量技术方法的研究相对较少。在食品安全变得日益重要的今天,发明一种能快速降解产品中亚硝酸盐含量的发酵工艺具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种可快速降解黄帝椒产品中亚硝酸盐的乳酸菌,以降低黄帝椒中亚硝酸盐的含量,提高产品的安全性。

[0006] 本发明中所使用的乳酸菌是筛选至海南黄帝椒中的天然发酵微生物,菌株经生理生化实验和 16S rDNA 鉴定是植物乳杆菌。

[0007] 本发明快速降低黄帝椒亚硝酸盐含量的方法包括如下步骤:

[0008] 第一步,培养基的制备:

[0009] 菌株活化培养基:MRS 培养基(g/L)(牛肉膏 10,蛋白胨 10,酵母粉 5, K_2HPO_4 2,柠檬酸铵 2,乙酸钠 5,葡萄糖 20,吐温 80 1ml, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25,pH=6.2-6.4,20g 琼脂。)

[0010] 液体种子培养基:MRS 培养基,不加琼脂即为液体培养基。

[0011] 第二步,菌株的活化:将保存的植物乳杆菌在固体 MRS 培养基上划线活化。

[0012] 第三步,种子液的制备:将第二步中活化好的菌株接种到液体 MRS 培养基中,于 37℃ 静置培养 24-30h,离心收集菌体,用无菌的生理盐水洗涤菌体,稀释到浓度

10^9-10^{10} CFU/mL。

[0013] 第四步,将新鲜的黄帝椒洗净、切碎,加入等质量的凉开水,并按接种量 3%-5% (质量体积比) 接入制备好的种子液。

[0014] 第五步,密封发酵:将调好的物料在密封的容器中 30℃发酵 20-24h,终止发酵。

[0015] 第六步,高盐抑菌:发酵结束后加 12% (质量比) 的高盐抑制残余的微生物。

[0016] 本发明方法中发酵主体菌株明确,发酵过程和产品质量都以控制,生产周期短,工艺简单,亚硝酸盐能快速的降低。腌制出的黄帝椒既具备传统发酵蔬菜的特点,也很好的保持了辣椒原有的风味及营养,食用安全性也显著提高,货架期也明显延长。

[0017] 生物材料

[0018] 本发明使用的植物乳杆菌筛选至海南黄帝椒中的天然发酵微生物,于 2011 年 12 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,保藏单位地址为中国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,分类命名为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 保藏编号为 CGMCC NO. 5570。

[0019] 具体实施方案

[0020] 实施例 1:菌种的获得

[0021] 1) 取腌制成熟黄帝椒样、腌制半成熟黄帝椒样、新鲜黄帝椒样各适量加入到无菌的生理盐水中,摇匀后梯度稀释涂布到 MRS 固体培养基上,37℃培养 48 小时。

[0022] 2) 将长出的菌落在新鲜的 MRS 固体培养基上划线分离 3-5 次,得到纯化的菌株,对分离到的菌株做生理生化和 16S rDNA 鉴定,并分别做甘油管和斜面保存。

[0023] 3) 活化的到的菌株并接入 25mL 的液体 MRS 培养基中,于 37℃静置培养 24-30h,离心收集菌体,用无菌的生理盐水洗涤菌体,稀释到浓度 10^9-10^{10} CFU/mL。

[0024] 4) 将新鲜的黄帝椒洗净、切碎,加入等质量的凉开水,将 3) 中的植物乳杆菌种子液按接种量 3% 接入制备好的种子液。

[0025] 5) 密封发酵:将调好的物料在密封的容器中 30℃发酵 20-24h。终止发酵,并加入 12% (质量比) 的高盐杀菌。

[0026] 6) 按照 GB5009.33-2010《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中的分光光度法分别测定黄帝椒中的亚硝酸盐含量。一株植物乳杆菌降亚硝酸盐含量能力最大,发酵后残余的亚硝酸盐含量最低为 3.2 μ g/g。将该菌株保藏于中国微生物菌种保藏中心,保藏编号为 CGMCCNO. 5570。

[0027] 实施例 2 黄帝椒发酵生产

[0028] 1) 培养基的制备

[0029] 菌种活化培养基:MRS 固体培养基

[0030] 乳酸菌种子液培养基:MRS 液体培养基

[0031] 2) 菌株的活化:将分离、保存的植物乳杆菌在固体 MRS 培养基上划线活化。

[0032] 3) 种子液的制备:将 2) 中活化好的植物乳杆菌接入 25mL 的液体 MRS 培养基中,于 37℃静置培养 24-30h,离心收集菌体,用无菌的生理盐水洗涤菌体,稀释到浓度 10^9-10^{10} CFU/mL。

[0033] 4) 将新鲜的黄帝椒洗净、切碎,加入等质量的凉开水,将 3) 中的植物乳杆菌种子液按接种量 3% 接入制备好的种子液。

[0034] 5)密封发酵:将调好的物料在密封的容器中 30℃发酵 20-24h。终止发酵,并加入 12% (质量比)的高盐杀菌。

[0035] 6)发酵终止后按照 GB5009.33-2010《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中的分光光度法测定黄帝椒中的亚硝酸盐含量,黄帝椒中的亚硝酸盐含量是 5.2 μg/g。

[0036] 实施例 3:黄帝椒发酵生产

[0037] 1)培养基的制备

[0038] 菌种活化培养基:MRS 固体培养基

[0039] 乳酸菌种子液培养基:MRS 液体培养基

[0040] 2)菌株的活化:将分离、保存的植物乳杆菌在固体 MRS 培养基上划线活化。

[0041] 3)种子液的制备:将 2)中活化好的植物乳杆菌接入 25mL 的液体 MRS 培养基中,于 37℃静置培养 24-30h,离心收集菌体,用无菌的生理盐水洗涤菌体,稀释到浓度 10^9-10^{10} CFU/mL。

[0042] 4)将新鲜的黄帝椒洗净、切碎,加入等质量的凉开水,将 3)中的植物乳杆菌种子液按接种量 4% 接入制备好的种子液。

[0043] 5)密封发酵:将调好的物料在密封的容器中 30℃发酵 20-24h。终止发酵,并加入 12% (质量比)的高盐杀菌。

[0044] 6)发酵终止后按照 GB5009.33-2010《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中的分光光度法测定黄帝椒中的亚硝酸盐含量,黄帝椒中的亚硝酸盐含量是 4.2 μg/g。

[0045] 实施例 4:黄帝椒发酵生产

[0046] 1)培养基的制备

[0047] 菌种活化培养基:MRS 固体培养基

[0048] 乳酸菌种子液培养基:MRS 液体培养基

[0049] 2)菌株的活化:将分离、保存的植物乳杆菌在固体 MRS 培养基上划线活化。

[0050] 3)种子液的制备:将 2)中活化好的植物乳杆菌接入 25mL 的液体 MRS 培养基中,于 37℃静置培养 24-30h,离心收集菌体,用无菌的生理盐水洗涤菌体,稀释到浓度 10^9-10^{10} CFU/mL。

[0051] 4)将新鲜的黄帝椒洗净、切碎,加入等质量的凉开水,将 3)中的植物乳杆菌种子液按接种量 5% 接入制备好的种子液。

[0052] 5)密封发酵:将调好的物料在密封的容器中 30℃发酵 20-24h。终止发酵,并加入 12% (质量比)的高盐杀菌。

[0053] 6)发酵终止后按照 GB5009.33-2010《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中的分光光度法测定黄帝椒中的亚硝酸盐含量,黄帝椒中的亚硝酸盐含量是 4.8 μg/g。

[0054] 实施例 5 骨泥发酵生产

[0055] 1)培养基的制备

[0056] 菌种活化培养基:MRS 固体培养基

[0057] 乳酸菌种子液培养基:MRS 液体培养基

[0058] 2)菌株的活化:将分离、保存的植物乳杆菌在固体 MRS 培养基上划线活化。

[0059] 3)种子液的制备:将 2)中活化好的植物乳杆菌接入 25mL 的液体 MRS 培养基中,于 37℃静置培养 24-30h,离心收集菌体,用无菌的生理盐水洗涤菌体,稀释到浓度

10^9 - 10^{10} CFU/mL。

[0060] 4)将骨泥捣碎,按 1:5 的比例加入凉开水调节初始 pH 为 6.8,将 3)中的植物乳酸菌种子液按接种量 2.5% 接入制备好的种子液。

[0061] 5)发酵 :将调好的物料在密封的容器中 37℃发酵 20-24h。终止发酵。

[0062] 6)发酵终止后按照 GB5009.33-2010 《食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中的分光光度法测定骨泥中的亚硝酸盐含量,骨泥中的亚硝酸盐含量是 6.7 μ g/g。