(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101691551 B
(45)授权公告日 2012.02.15

(21)申请号 200910063858.1

(22)申请日 2009.09.08

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:M209127 2009.06.18

(73)专利权人 华中农业大学
地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72)发明人 赵思明 熊善柏 方炎鹏 郭蕾 刘小翠 刘友明 刘茹

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏锋

(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)
C12N 1/16(2006.01)
A23L 1/105(2006.01)
C12R 1/645(2006.01)
C12R 1/25(2006.01)

审查员 李肖蕖

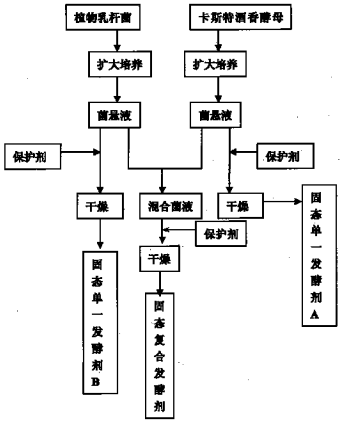
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 5 页

(54)发明名称

食品发酵用的植物乳杆菌及应用

(57)摘要

本发明属于农业微生物和食品加工技术领域，具体涉及一种作为微生物发酵剂的菌株，包含该菌株和卡斯特酒香酵母的复合发酵剂及其应用。本发明的特征在于，分离、筛选得到一株适合米发糕发酵用的乳酸菌－植物乳杆菌(Lactobacillus plantarum)，该菌株保藏在中国典型培养物保藏中心，其保藏号为CCTCC NO:M209127。利用该植物乳杆菌(Lactobacillusplantarum)ZSM-002菌株和卡斯特酒香酵母(Brettanomyces custersii)ZSM-001制备成一种微生物复合发酵剂。该微生物复合发酵剂可应用于大米发酵制品，包括其在米发糕制品中的应用。该微生物复合发酵剂具有良好的发酵性能，产品具有典型的酸甜香味，且复合发酵剂易于工业化生产。



CN 101691551 B

1. 一种食品发酵用的菌株，其特征在于，该菌株为植物乳杆菌(Lactobacillusplantarum)ZSM-002，保藏在中国典型培养物保藏中心，保藏号为CCTCC NO：M209127，其16S RNA序列如下所示：

ttaggcggct ggttcctaaa aggttacccc accgactttg ggtgttacaa actctcatgg 60
tgtgacgggc ggtgtgtaca aggcccggga acgtattcac cgcggcatgc tgatccgcga 120
ttactagcga ttccgacttc atgtaggcga gttgcagcct acaatccgaa ctgagaatgg 180
ctttaagaga ttagcttact ctcgcgagtt cgcaactcgt tgtaccatcc attgtagcac 240
gtgtgtagcc caggtcataa ggggcatgat gatttgacgt catccccacc ttcctccggt 300
ttgtcaccgg cagtctcacc agagtgccca acttaatgct ggcaactgat aataagggtt 360
gcgctcgttg cgggacttaa cccaacatct cacgacacga gctgacgaca accatgcacc 420
acctgtatcc atgtccccga agggaacgtc taatctctta gatttgcata gtatgtcaag 480
acctggtaag gttcttcgcg tagcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg 540
cccccgtcaa ttcctttgag tttcagcctt gcggccgtac tccccaggcg gaatgcttaa 600
tgcgttagct gcagcactga agggcggaaa ccctccaaca cttagcattc atcgtttacg 660
gtatggacta ccagggtatc taatcctgtt tgctacccat actttcgagc ctcagcgtca 720
gttacagacc agacagccgc cttcgccact ggtgttcttc catatatcta cgcatttcac 780
cgctacacat ggagttccac tgtcctcttc tgcactcaag tttcccagtt tccgatgcac 840
ttcttcggtt gagccgaagg ctttcacatc agacttaaaa aaccgcctgc gctcgcttta 900
cgcccaataa atccggacaa cgcttgccac ctacgtatta ccgcggctgc tggcacgtag 960
ttagccgtgg ctttctggtt aaataccgtc aatacctgaa cagttactct cagatatgtt 1020
cttctttaac aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgcg gcgttgctcc 1080
atcagacttt cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggcc 1140
gtgtctcagt cccaatgtgg ccgattaccc tctcaggtcg gctacgtatc attgccatgg 1200
tgagccgtta ccccaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tgatagccga 1260
agccatcttt caagctcgga ccatgcggtc caagttgtta tgcggtatta gcatctgttt 1320
ccaggtgtta tcccccgctt ctgggcaggt ttcccacgtg ttactcacca gttcgccact 1380
cactcaaatg taaatcatga tgcaagcacc aatcaatacc agagttcgtt cgacttgcat 1440
gtat 1444。

食品发酵用的植物乳杆菌及应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品发酵和食品加工技术领域，具体涉及一种作为微生物发酵剂的菌株的筛选，包含该菌株的复合发酵剂（菌剂）及其在米发糕制品中的应用。

背景技术

[0002] 米发糕是我国传统的大米发酵食品，具有蓬松、柔软、黏弹性好、甜酸适度等风味特征，富含水溶性蛋白、多糖、多肽、维生素、矿物质等营养成分，因其独特的风味和口感而备受广大消费者喜爱。但目前大多采用手工作坊和老浆发酵方法生产。由于发酵的过程微生物菌系复杂，且在发酵的过程中微生物的活性和比例容易发生变化，容易受杂菌污染，导致米发糕生产的周期拉长，而且产品的质量也不稳定。研究大米发酵食品的发酵剂对于传统发酵食品的工业化生产具有重要意义。

[0003] 发酵是米发糕等发酵米制品生产的重要工序，米发糕发酵过程中起主要作用的微生物是酵母菌和乳酸菌。其中酵母菌在发酵中因酶的作用产生 CO_2 及醇类物质，以及蔗糖酶、麦芽糖酶、蛋白酶、乳糖酶、脱氢酶、烯醇化酶和氧化还原酶等酶类产生的风味物质，可赋予产品蓬松、醇香等风味（王定昌，赖荣婷．酵母的用途，粮油食品科技．2002(1)：37-43）；乳酸菌在发酵中产生乳酸、乳酸、乙酸、甲酸、苯乳酸、己酸等有机酸，可赋予食品柔和的酸味，同时还可与发酵中产生的醇、醛、酮等物质相互作用，产生多种新的呈味物质，同时还产生多糖及呈味肽、蛋白分解酶类、改善米发糕质地的淀粉酶类，赋予产品柔和的酸味、米发糕独特香气等风味和稠厚的口感（李元莉等．功能性乳酸菌发酵剂在食品发酵工业中的应用，中国乳品工业．2006(1)：35-38）。两种微生物对米发糕的品质均具有不可替代的作用。

[0004] 微生物发酵剂是用于生产发酵制品的特定微生物培养物，微生物发酵剂在发酵制品生产中的应用，改变了传统发酵制品的生产模式，开发发酵制品的专用微生物发酵剂是解决传统发酵食品的工业化生产的重要方法。直接使用微生物发酵剂具有如下优点：发酵活力强，发酵时间短；可以保持微生物菌种的活性、比例；可有效地防止杂菌的污染（李元莉等，功能性乳酸菌在食品发酵工业中的应用，中国乳品工业，2006，1：35-37）；可以节省原材料，降低成本，避免发酵失败；还可以保证发酵产品质量的稳定（贺稚非等，泡菜活性直投式乳酸菌发酵剂的研究，食品科学，2006，8：191-197）；微生物发酵剂接种量小，可以精确控制发酵工程（杜磊等，乳酸菌浓缩发酵剂的研究意义，河南畜牧兽医，2007，2：13）等。

[0005] 多菌种发酵是微生物发酵领域中通用技术问题。下列文献报道了利用乳酸菌和酵母菌可以很好的混合发酵（赵玉红等，乳酸菌和酵母菌共生发酵生产面包的研究，食品工业科技，2003(3)：61-62）多菌种混合发酵可以弥补单菌种发酵的单调性（何余堂等，混合发酵法生产花粉面包的工艺优化，食品科技，2006(9)：57-59），使产品风味物质更加丰富，质量更好，还可增加产品的多样性，扩大市场消费。一般认为，乳酸菌对产品的储存稳定性起决定作用；而酵母菌对产品的形态，色泽，风味起决定作用，因此制作混合发酵剂具有良

好的效果。

[0006] 发酵剂对于在米制品发酵食品中的应用才刚刚起步，专利申请号 2007100536112，专利公开号为 CN101173223 制备的复合发酵剂中卡斯特酒香酵母菌为传统米发糕生产中分离的菌株，而复合用的植物乳杆菌 AS1.510 购自中国科学院微生物研究所，两者复合后制备的发酵剂制作成的米发糕无法真正和传统米发糕的风味与口感媲美。卡斯特酒香酵母主要作为提高米发糕的发酵性能、增加其气孔而提高蓬松度、产醇类的醇香味，植物乳杆菌主要作为提高米发糕的醇厚口感、提供柔和的酸味。两者复合可使米发糕具有蓬松、柔软、黏弹性好、甜酸适度的优良风味。但目前米发糕生产中的乳酸菌多来自于老浆发酵，专利公开号为 CN101173223 文献中采用的购自中国科学院微生物研究所的植物乳杆菌 AS1.510 在使用过程具有乳酸风味较淡，发酵时间长等缺陷。目前还没有关于适用于米发糕发酵专用微生物发酵剂的乳酸菌菌株。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于克服现有技术的缺陷，一是从米浆的发酵液中分离出发酵性能良好的纯种菌株作为微生物发酵剂应用的菌株；二是制备作为大米制品特别是米发糕发酵用的包含本发明的植物乳杆菌和筛选的酵母菌的复合发酵剂（菌剂）；三是含有本发明制备的微生物菌株的复合发酵剂（以下简称菌剂）在大米制品特别是在米发糕生产中的应用，以达到米发糕等发酵米制品生产简便、高效、优质、稳定生产的目的。

[0008] 本发明通过下列技术方案实现：

[0009] 申请筛选得到一株适用于食品发酵特别是适用于大米制品例如米发糕发酵生产的植物乳杆菌 (Lactobacillus plantarum)ZSM-002，该菌株于 2009 年 6 月 18 日送交湖北省武汉市武汉大学内的中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 用于专利程序的保藏，其保藏号为 CCTCCNO：M209127。

[0010] 为了方便生产单位使用，申请人将上述选育的植物乳杆菌 (Lactobacillus plantarum)ZSM-002（保藏号为 CCTCC NO：M209127）与另外一株在前保藏的保藏号为 CCTCC NO：M207150（专利申请号 2007100536112，专利公开号为 CN101173223，专利公开日为 2008 年 5 月 7 日）的卡斯特酒香酵母菌 (Brettanomyces custersii)ZSM-001 一起制成微生物复合发酵剂（菌剂）。

[0011] 申请人提供了一种微生物复合发酵剂（菌剂）的制备方法（详细方法参见实施例 1），所述的微生物复合发酵剂（菌剂）的菌株分别来自于申请人自行分离鉴定的植物乳杆菌 (Lactobacillus plantarum)ZSM-002 和卡斯特酒香酵母 (Brettanomyces custersii) ZSM-001，利用上述两个菌株制备成复合发酵剂（菌剂），该复合发酵剂具有下列特征；

[0012] 1) 该复合发酵剂菌剂的含水量为 20％以下；

[0013] 2) 该复合发酵剂菌剂中卡斯特酒香酵母 ZSM-001 与植物乳杆菌 ZSM-002 的活菌数均达到 10^6cfu/mL 以上。

[0014] 植物乳杆菌 ZSM-002 菌株的分离、筛选和鉴定：

[0015] 如附图 1 所示，本发明的植物乳杆菌 (Lactobacillus plantarum)ZSM-002 的分离、筛选和鉴定如无特别说明均参照周德庆主编，《微生物学实验手册》，上海科学技术出版社，1986 年；胡瑞卿译，《乳酸菌的特征与鉴定手册》，中国轻工业出版社，1999 年；凌代

文等编著,《微生物实验技术》,山东大学出版社,1987 年版介绍的方法。本发明的植物乳杆菌 ZSM-002 是本申请人从传统的米发糕原料 - 米浆发酵液中分离得到 40 个候选菌,经分离、纯化,进行过氧化氢酶试验反应阳性、MRS 液体培养基由紫色变为黄色的葡萄糖产酸试验和葡萄糖产气试验,将初筛的菌株活化后接入 MRS 的液体培养基中,30℃培养,定时取样,测定发酵液的 pH 值和 OD 值,筛选出产酸最快的菌株(方法参见 :Greco M, Mazzette R. Evolution andidentification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausage. Meat Sci., 2005, (69) :733-739.)。申请人将其编号为 ZSM-002。经鉴定该菌株为植物乳杆菌 (Lactobacillusplantarum)。

[0016] 植物乳杆菌菌株 ZSM-001 菌株的保藏按上述《微生物学实验技术手册》操作。

[0017] 本发明的植物乳杆菌 ZSM-002 菌株的菌学特征 :

[0018] 植物乳杆菌 ZSM-002 单菌落小,浅黄色,圆形,表面湿润,细胞呈短杆状,长约 0.5-1um,宽约 0.3-0.6um,呈环链状排列。进行明胶液化试验、H_2O_2 酶活性、硫化氢试验、pH 4.5 培养试验、pH5.4 培养试验、运动性试验均为阳性 ;发酵蜜二糖、半乳糖、麦芽糖、棉子糖、水杨素、葡萄糖、蔗糖、木糖、七叶苷、果糖、山梨醇、甘露醇、海藻糖、不发酵松三糖、菊糖。

[0019] 植物乳杆菌 ZSM-002 在分类学上属于植物乳杆菌 (Lactobacillus plantarum),该菌株 2007 年 9 月 25 日保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 :CCTCC NO. M209127。

[0020] 与现有传统米发糕生产所用的老浆(含天然发酵微生物相比),本发明具有以下优点 :

[0021] 1、该菌株可以作为优质专用发酵剂 :本发明作为高活菌数的菌种培养物接入到米发酵制品(例如米发糕)中,可使米发糕中起主要发酵作用的微生物成为优势菌种,实现强化发酵,发酵时间短,发酵特性好,产品质量稳定,风味优良。

[0022] 2、本发明的发酵剂使用方便 :本发明的发酵剂可直接添加到米浆中,不需添加其他添加剂,使用方便,使用剂量小。

[0023] 3、本发明的复合发酵剂实现了混合菌种(卡斯特酒香酵母和植物乳杆菌)的复合发酵,酵母菌发酵使米发糕成品具有良好的形态,蓬松的口感,而植物乳杆菌代谢产生的乳酸还使成品具有酸甜的滋味,并且乳酸也具有防腐作用,有利于产品的保鲜。

附图说明

[0024] 序列表 SEQ ID NO :1 是本发明的植物乳杆菌 ZSM-002 的 16S 核苷酸序列

[0025] 图 1 :是本发明的菌种分离、筛选以及鉴定的技术流程图。

[0026] 图 2 :是本发明的固态复合与单一发酵剂(菌剂)的技术流程图。

[0027] 图 3 :是利用本发明发酵剂(菌剂)生产米发糕应用的工艺路线。

[0028] 图 4 :是本发明的菌种鉴定的电泳图。

[0029] 图 5 :是本发明的菌种的 16S rRNA 全长序列与数据库中 Lactobacillus plantarum strain(IMAU70164) 序列对比图。

具体实施方式

[0030] 实施例 1 :菌株的分离、筛选与鉴定

[0031] 1、分离培养基 :MRS 琼脂培养基组分,具体成分及其配比如下 :

[0032] 蛋白胨 10.0g,牛肉膏 10.0g,酵母提取物 5.0g,磷酸氢二钾 2.0g,柠檬酸二铵 2.0g,乙酸钠 5.0g,葡萄糖 20.0g,吐温 801mL,硫酸镁 0.58g,硫酸锰 0.25g,碳酸钙 5.0g,蒸馏水 1000mL。调 pH 值至 6.2 ～ 6.4,高压灭菌 (101Kpa,121℃)30min。

[0033] 2、分离方法 (稀释平板法)

[0034] 2.1 样品稀释液的制备 :

[0035] 用 1ml 无菌吸管吸取富集培养液 1ml,放入装有 9ml 无菌水的试管中,振荡混匀即成 10^{-1} 稀释液 ;再用 1ml 无菌吸管吸取 10^{-1} 稀释液 1ml 放入装有 9ml 无菌水的试管中,吹吸三次,让菌液混匀,即成 10^{-2} 稀释液 ;再换一支无菌吸管吸取 10^{-2} 稀释液 1ml 放入装有 9ml 无菌水的试管中,吹吸三次,让菌液混匀,即成 10^{-3} 稀释液 ;以次类推,每次更换吸管,连续稀释至 10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} 稀释度。

[0036] 2.2 平板接种培养 :

[0037] 用接种环挑取平皿表面及底部的圆形及针尖装的乳酸菌的疑似菌落,划线接种于 MRS 平板培养基中,30℃培养 48h。平板纯化四代,镜检后转斜面贮藏,得到单菌落。

[0038] 2.3 菌株筛选 :

[0039] 2.3.1 初筛

[0040] 1) 菌体形态观察 :培养 48h 后,挑取单一菌落,做革兰氏染色试验,在光学显微镜下观察并记录现象。

[0041] 2) 过氧化氢酶试验 :将含量约为 3%的过氧化氢溶液直接滴加到菌株平板上,观察有无气泡产生。若有气泡生成,则为过氧化氢酶反应阳性。

[0042] 3) 葡萄糖产气试验 :在装有液体 MRS 培养基的试管中倒置一杜氏小管,接入疑似菌株,30℃培养 24h,观察杜氏小管内有无气泡生成。

[0043] 4) 葡萄糖产酸试验 :在装有液体 MRS 培养基的试管中加入浓度为 1.6g/100mL 的溴甲酚紫作为指示剂,添加量为 1.4mL/L。接入疑似菌株,30℃培养 24h,若培养基由紫色变为黄色,则证明有酸产生。

[0044] 2.3.2 复筛

[0045] 将初筛的疑似菌株活化后接入 MRS 的液体培养基中,30℃培养,定时取样,测定发酵液的 pH 值和 OD 值,筛选出一株产酸最快的菌株,申请人将其编号为 ZSM-002(方法参同前 :Greco M, Mazzette R. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during theripening of Sardinian sausage. Meat Sci., 2005, (69) : 733-739.)。

[0046] 2.4 乳酸菌的鉴定 :

[0047] 2.4.1 生理生化法鉴定乳酸菌 :

[0048] 参照伯杰手册第九版 (科学出版社,1994),,对分离的疑似菌株进行细菌形态观察、革兰氏染色、氧化酶反应、接触酶反应、温度尘长等实验进行初步鉴定。从葡萄糖和葡萄糖酸钙产酸、产气实验及蜜二糖、棉子糖等生理和生化分类鉴定 (实验参照乳酸细菌分类鉴定及实验方法,参考文献见以下所述)。

[0049] 结合菌株的形态学特征、培养特征和生理生化特征,参考周德庆主编,《微生物学

实验手册》,上海科学技术出版社,1986 年 ;胡瑞卿译,《乳酸菌的特征与鉴定手册》,中国轻工业出版社,1999 年 ;凌代文等编著,《微生物实验技术》,山东大学出版社,1987 年等文献,将乳酸菌鉴定到种。确定本发明筛选得到的菌株 ZSM-002 为植物乳杆菌 (Lactobacillus plantarum)。

[0050] 本发明的植物乳杆菌菌株 ZSM-002 的保藏培养基为蛋白胨 10.0g,牛肉膏 10.0g,酵母提取物 5.0g,磷酸氢二钾 2.0g,柠檬酸二铵 2.0g,乙酸钠 5.0g,葡萄糖 20.0g,吐温 801mL,硫酸镁 0.58g,硫酸锰 0.25g,碳酸钙 5.0g,补充蒸馏水至 1000mL。灭菌前调培养基的 pH 值至 6.2 ～ 6.4,按照上述所述的高压蒸汽常规方法灭菌。

[0051] 2.4.2 利用 16S rRNA 全长序列分析鉴定乳酸菌

[0052] 采用天根生化科技 (北京) 有限公司的 TIANamp Bacteria 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取本发明分离的 ZSM-002 菌株菌株基因组 DNA,PCR 扩增引物为南京金思特生物技术公司所提供通用引物,菌株全长序列扩增参照 Bosshard 等方法进行,引物序列如下 :

[0053] 16S rDNA-15′ -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′

[0054] 16S rDNA-25′ -AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′

[0055] PCR 反应体系如下 (采用 50μL 反应体系) :10×Buffer 5μL, dNTP(2mmol/L) :4μL,引物 1(10pmol/μL) :2μL,引物 2(10pmol/μL) :2μL, Taq 酶 (5U/μL) :0.5μL,模版 DNA :2μL, ddH_2O :34.5μL。PCR 扩增产物送南京金思特生物技术公司测序,测序结果应用 BLAST 程序与美国国立生物技术信息中心数据库 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 中的已报道的细菌 16S rRNA 序列进行相似性比较分析。发现 :ZSM-002 菌株的全长序列 16S rRNA 和 Lactobacillus plantarum strain16S rRNA 全长核苷酸序列 (IMAU70126) 相比同源性达到 100％ (见图 5 :Query 为 ZSM-002 菌株 16S rRNA 全长序列, Sbjct 为数据库中 IMAU70164 菌)。确定本发明的菌株 ZSM-002 为植物乳杆菌 (Lactobacillus plantarum)。

[0056] 实施例 2 固态复合发酵剂 (菌剂) 的制备

[0057] 1、试验材料

[0058] 试验用的菌株为本申请人以前分离鉴定的卡斯特酒香酵母菌 ZSM-001(保藏号为 CCTCCNO :M207150 ;专利申请号 200710053612,专利公开号为 CN101173223,专利公开日为 2008 年 5 月 7 日) 和植物乳杆菌 ZSM-002(保藏编号为 :CCTCC NO.M209127) ;食品原料选择早籼米 (市售产品)。

[0059] 2、固态单一菌种发酵剂与固态复合发酵剂的制作

[0060] 1) 斜面试管菌种的培养 :将卡斯特酒香酵母菌 ZSM-001 和植物乳杆菌 ZSM-002 分别接种于按前述常规方法灭菌的酵母葡萄糖蛋白胨土豆琼脂培养基 (胡瑞卿译,酵母菌的特征与鉴定手册,青岛海洋大学出版社,1991 年,灭菌前调培养基的 pH 至 6.0 左右) 和 MRS 培养基 (凌代文主编,乳酸细菌分类鉴定及实验方法,中国轻工业出版社,灭菌前调培养基的 pH 至 6.2-6.4) 斜面固体上,在 30℃条件下培养 2-3d,使其活化即为试管斜面菌种 ;

[0061] 2) 三角瓶扩大培养 :将步骤 1) 的卡斯特酒香酵母 ZSM-001 的试管菌种接种于按前述常规方法灭菌的土豆汁 (1L 蒸馏水中加入 200g 去皮的新鲜土豆,沸水煮 30min,纱布过滤,补水至 1L)2％蔗糖的三角瓶液体培养基上,灭菌前调培养基的 pH 至 6.0-6.5 的培养基上,于 30℃条件下培养 24h,使其菌体活菌数达到 10^7cfu/mL,得到卡斯特酒香酵母三角瓶的菌种,备用 ;将步骤 1) 的植物乳杆菌 ZSM-002 试管菌种接入含有脱脂奶粉 100g/L,蔗糖

60g/L，乳酸钙 0.15g/L，补充水分至 1L，灭菌前调培养基的 pH 至 6.0-6.5 煮沸灭菌的三角瓶液体培养基中，在 30℃条件下培养 24h，使其菌体活菌数达到 10^8cfu/mL，得到植物乳杆菌 ZSM-002 的三角瓶菌种，备用；

[0062] 3) 菌液混合：将步骤 2) 的卡斯特酒香酵母菌 ZSM-001 与植物乳杆菌 ZSM-002 的菌悬液以体积比为 9 ：1 的比例混合，加入质量比为 10％的脱脂奶粉，10％的蔗糖，5％的甘油，2％的乳糖混合均匀，得到混合菌液；

[0063] 4) 干燥：

[0064] 将步骤 2) 的卡斯特酒香酵母 ZSM-001 菌液与植物乳杆菌 ZSM-002 菌液分别按质量比计加入 10％的脱脂奶粉，10％的蔗糖，5％的甘油，2％的乳糖混合均匀；再加按质量比计 8.5％的填充料（淀粉）、0.15％的单甘脂、0.3％的白砂糖混匀，设定其喷雾干燥条件为：进料温度为 140℃、出料温度为 65℃即得到固态单一发酵剂（菌剂）。

[0065] 将步骤 3) 的混合菌液按质量比计加 8.5％的填充料（淀粉）、0.15％的单甘脂、0.3％的白砂糖混匀，设定其喷雾干燥条件为：进料温度为 140℃、出料温度为 65℃即得到固态复合发酵剂（菌剂）。

[0066] 5) 聚乙烯包装袋密封包装所述的固态复合发酵剂（菌剂），置于 4℃冰箱贮藏备用。

[0067] 3、固态复合发酵剂（菌剂）在米发糕的制作中的应用。

[0068] 1) 原料米：称取原料早籼米 1Kg（市售），按照常规方法清洗；

[0069] 2) 浸泡：加水 2000mL，于 30℃浸泡 21h；

[0070] 3) 米浆的制备：用自来水清洗数遍后加 1200mL 水磨浆；

[0071] 4) 接种：加入质量比为 3％本发明制备的复合发酵剂，使其与米浆混匀；

[0072] 5) 发酵：将接种后的米浆放入恒温（38℃）培养箱发酵培养 3.5h；

[0073] 6) 调味：将发酵后步骤 5) 的米浆中加入 200g 蔗糖调味，混匀；

[0074] 7) 蒸煮：将步骤 6) 的米浆放入蒸锅中，上蒸汽后蒸 15min 取出，即得到本发明所述的米发糕。

[0075] 在本实施例中，申请人比较了本发明的固态复合发酵剂在不同淀粉为填充料的基质上的活菌数的试验，结果如表 1 所示：

[0076] 表 1 本发明的固态复合发酵剂在不同淀粉为填充料的基质上活菌数的变化

[0077]

填充料类型	预糊化淀粉	可溶性淀粉	普通淀粉
乳酸菌菌落数（cfu/g）	4.4×10^8	3.3×10^7	2.1×10^6
酵母菌菌落数（cfu/g）	3.1×10^7	3.5×10^6	1.8×10^6

[0078] 表 1 看出，本发明制备的固态复合发酵剂在预糊化淀粉为填充料的基质上活菌数最高，在普通淀粉填充料基质上活菌数较低。

[0079] 同时还比较了本发明制备的固态复合发酵剂在不同添加量，发酵时间及发酵温度下对米发糕发酵后的感官品质评价见表 2 所示。

[0080] 表 2 本发明的固态复合发酵剂对发酵后米发糕的感官品质的评价（综合评价满分为 10 分）

[0081]

实验编号	固态发酵剂添加量	发酵温度（℃）	时间(h)	形态	色泽	香气	滋味	口感	综合评分
1	2	32	2.5	6.5	5.6	6.8	5.4	4.8	6.7
2	2	35	2.5	7.4	6.1	6.9	5.2	5.2	7.2
3	2	38	2.5	6.2	5.9	6.7	5.6	5.2	7.6
4	3	32	3.5	6.5	5.9	7.0	6.0	7.0	8.6
5	3	35	3.5	5.9	6.0	7.5	6.1	6.8	8.8
6	3	38	3.5	7.0	7.0	7.7	6.6	7.0	9.0
7	4	32	4.5	6.6	5.8	6.6	5.2	4.8	7.5
8	4	35	4.5	6.8	6.4	6.8	5.2	5.7	8.0
9	4	38	4.5	6.0	6.6	6.8	6.0	6.7	8.5

[0082] 由表 2 可知，不同组合条件下制作的米发糕感官品质存在较大差异，实验表明，添加质量比为 3％的固态复合发酵剂，于 38℃下发酵 3h 制作的米发糕色泽洁白、蓬松度较好、酸甜适中、米发糕香气较浓、感官得分最高。

[0083] 实施例 3 固态复合发酵剂与固态单一菌种发酵剂的对比实验

[0084] 1、试验材料

[0085] 在本实施例中，所述的固态复合发酵剂按实施例 2 的方法制作（卡斯特酒香酵母菌 ZSM-001 和植物乳杆菌 ZSM-002 的菌悬液体积之比为 1 ： 9），所述的固态单一发酵剂按实施例 2 的方法制作，早籼米为市售产品（同实施例 2）。

[0086] 2、固态复合发酵剂与固态单一菌种发酵剂发酵制作的米发糕的比较

[0087] 按实施例 2 中米发糕的制作方法制作米发糕进行感官品质评价（结果见表 3），固态复合发酵剂与固态单一菌种发酵剂的添加量相同。

[0088] 表 3 本发明的固态复合发酵剂与单一菌种发酵剂制作的米发糕的感官品质评价（综合评价满分为 10 分）

[0089]

实验编号	添加物	形态	色泽	香气	滋味	口感	综合评分
1	固态复合发酵剂	8.1	8.0	8.7	8.8	8.8	9.3
2	单一菌种发酵剂（卡斯特酒香酵母）	7.8	7.0	6.0	6.0	5.2	7.1
3	单一菌种发酵剂（植物乳杆菌）	4.8	6.0	5.0	8.0	7.2	6.2

[0090] 由表 3 可知，与两种固态单一菌种发酵剂所生产的米发糕相比，本发明的固态复合发酵剂（菌剂）在实验条件范围内具有较强的发酵作用，而且米发糕成品的感官品质（如色泽洁白、蓬松度较好、酸甜适中、米发糕香气较浓）有较大的提高。

[0091] 实施例 4 本发明固态复合发酵剂与传统老浆、专利公开号为 CN101173223 制备发酵剂的对比实验

[0092] 1、试验材料

[0093] 在本实施例中，所述的固态复合发酵剂按实施例 2 的方法制作（卡斯特酒香酵母菌 ZSM-001 和植物乳杆菌 ZSM-002 的菌悬液体积之比为 1 ： 9)，专利公开号为 CN101173223 的制备方法制作的固态复合发酵剂，早籼米为市售产品（同实施例 1)。

[0094] 2、固态复合发酵剂与专利公开号为 CN101173223 制备发酵剂制作的米发糕的比较

[0095] 按实施例 1 中米发糕的制作方法制作米发糕，固态复合发酵剂、传统老浆与专利公开号为 CN101173223 制备发酵剂的添加量相同。

[0096] 实验结果见表 4 ：

[0097] 表 4 本发明的固态复合发酵剂与专利公开号为 CN101173223 制备发酵剂制作的米发糕的感官品质评价（综合评价满分为 10 分）

[0098]

实验编号	添加物	形态	色泽	香气	滋味	口感	综合评分
1	本发明固态复合发酵剂	8.1	8.0	8.7	8.8	8.8	9.3
2	CN101173223 专利制备的发酵剂	7.8	8.0	6.9	7.1	7.3	8.1
3	传统老浆	5.3	7.0	5.0	4.0	5.2	5.6

[0099] 由表 4 可知，因传统生产米发糕中老浆添加量以质量比计一般在 10％～ 20％，本实施例中与传统生产米发糕所用的老浆添加量以质量比计为 3％时，短时间内难以发酵综合评分最低相比本发明的固态复合发酵剂添加量少、易保存；与专利公开号为 CN101173223 制备的发酵剂所生产的米发糕相比，本发明的固态复合发酵剂（菌剂）在实验条件范围内具有较强的发酵作用，而且米发糕成品的感官品质有较大的提高，尤其是其制作的米发糕色泽洁白、蓬松度较好、酸甜适中、米发糕香气浓郁、发酵味醇厚，质量完全可以人工控制，容易实现标准化生产。

[0100] 序列表

[0101] <110> 华中农业大学

[0102] <120> 食品发酵用的植物乳杆菌及应用

[0103] <130>

[0104] <141>2009-08-28

[0105] <160>1

[0106] <170>PatentIn version 3.1

[0107] <210>1

[0108] <211>1444

[0109] <212>DNA

[0110] <213> 植物乳杆菌 (Lactobacillus plantarum)

[0111] <220>

[0112] <221>gene

[0113] <222>(1)..(1444)

[0114] <223>

[0115] <400>1

[0116] ttaggcggct ggttcctaaa aggttacccc accgactttg ggtgttacaa actctcatgg 60

[0117] tgtgacgggc ggtgtgtaca aggcccggga acgtattcac cgcggcatgc tgatccgcga 120

[0118] ttactagcga ttccgacttc atgtaggcga gttgcagcct acaatccgaa ctgagaatgg 180

[0119] ctttaagaga ttagcttact ctcgcgagtt cgcaactcgt tgtaccatcc attgtagcac 240

[0120] gtgtgtagcc caggtcataa ggggcatgat gatttgacgt catccccacc ttcctccggt 300

[0121] ttgtcaccgg cagtctcacc agagtgccca acttaatgct ggcaactgat aataagggtt 360

[0122] gcgctcgttg cgggacttaa cccaacatct cacgacacga gctgacgaca accatgcacc 420

[0123] acctgtatcc atgtccccga agggaacgtc taatctctta gatttgcata gtatgtcaag 480

[0124] acctggtaag gttcttcgcg tagcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg 540

[0125] cccccgtcaa ttcctttgag tttcagcctt gcggccgtac tccccaggcg gaatgcttaa 600

[0126] tgcgttagct gcagcactga agggcggaaa ccctccaaca cttagcattc atcgtttacg 660

[0127] gtatggacta ccagggtatc taatcctgtt tgctacccat actttcgagc ctcagcgtca 720

[0128] gttacagacc agacagccgc cttcgccact ggtgttcttc catatatcta cgcatttcac 780

[0129] cgctacacat ggagttccac tgtcctcttc tgcactcaag tttcccagtt tccgatgcac 840

[0130] ttcttcggtt gagccgaagg ctttcacatc agacttaaaa aaccgcctgc gctcgcttta 900

[0131] cgcccaataa atccggacaa cgcttgccac ctacgtatta ccgcggctgc tggcacgtag 960

[0132] ttagccgtgg ctttctggtt aaataccgtc aatacctgaa cagttactct cagatatgtt 1020

[0133] cttctttaac aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgcg gcgttgctcc 1080

[0134] atcagacttt cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggcc 1140

[0135] gtgtctcagt cccaatgtgg ccgattaccc tctcaggtcg gctacgtatc attgccatgg 1200

[0136] tgagccgtta ccccaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tgatagccga 1260

[0137] agccatcttt caagctcgga ccatgcggtc caagttgtta tgcggtatta gcatctgttt 1320

[0138] ccaggtgtta tcccccgctt ctgggcaggt ttcccacgtg ttactcacca gttcgccact 1380

[0139] cactcaaatg taaatcatga tgcaagcacc aatcaatacc agagttcgtt cgacttgcat 1440

[0140] gtat 1444

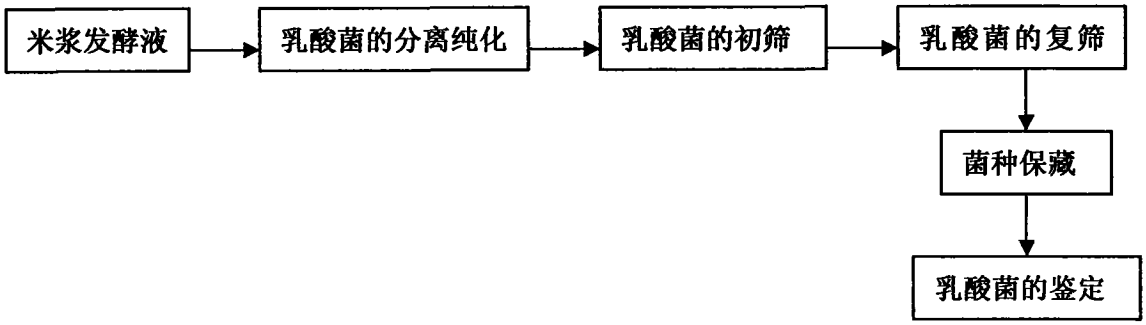

米浆发酵液
乳酸菌的分离纯化
乳酸菌的初筛
乳酸菌的复筛
菌种保藏
乳酸菌的鉴定

图 1

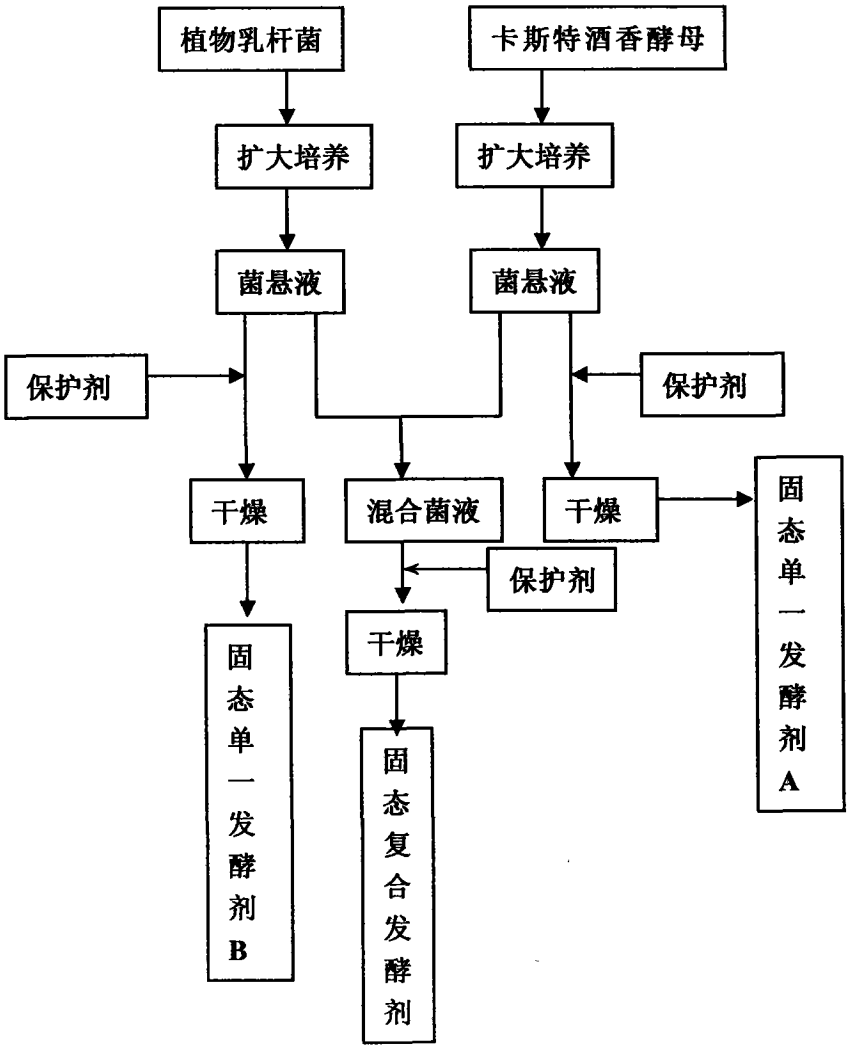

植物乳杆菌
卡斯特酒香酵母
扩大培养
扩大培养
菌悬液
菌悬液
保护剂
保护剂
干燥
混合菌液
干燥
固态单一发酵剂A
保护剂
干燥
固态单一发酵剂B
固态复合发酵剂

图 2

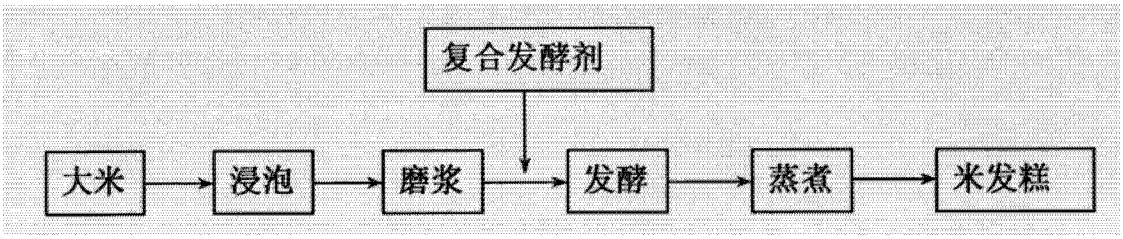

复合发酵剂
大米
浸泡
磨浆
发酵
蒸煮
米发糕

图 3

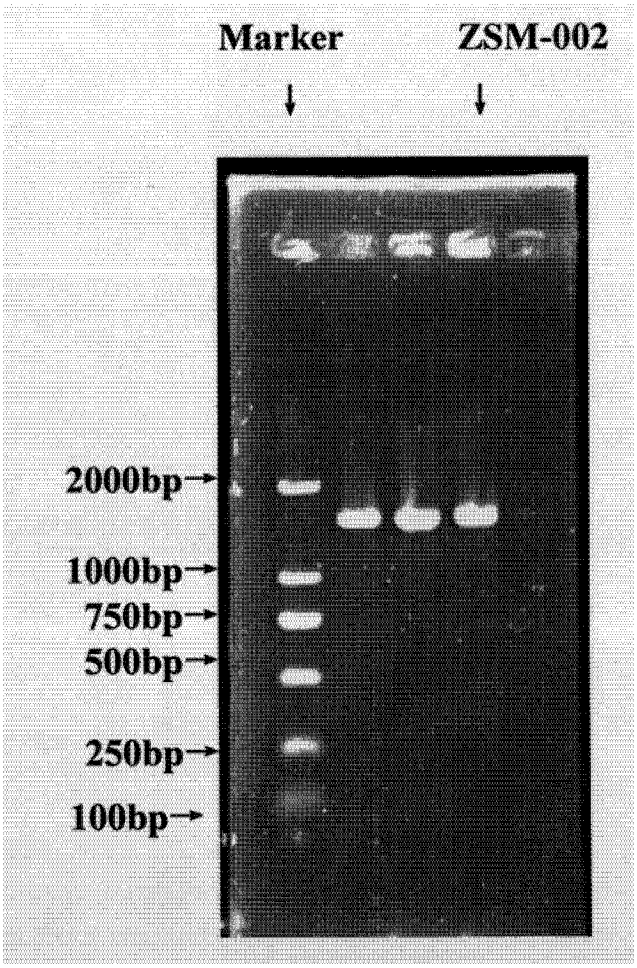

Marker
ZSM-002
2000bp
1000bp
750bp
500bp
250bp
100bp

图 4

Lactobacillus plantarum strain IMAU70164 16S ribosomal RNA gene

```
Query  1     TTAGGCGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGG  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1452  TTAGGCGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGG  1393

Query  61    TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1392  TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGA  1333

Query  121   TTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1332  TTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGG  1273

Query  181   CTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCAC  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1272  CTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCAC  1213

Query  241   GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGT  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1212  GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGT  1153

Query  301   TTGTCACCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTT  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1152  TTGTCACCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTT  1093

Query  361   GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACC  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1092  GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACC  1033

Query  421   ACCTGTATCCATGTCCCCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAG  480
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1032  ACCTGTATCCATGTCCCCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAG  973

Query  481   ACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  972   ACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG  913

Query  541   CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  912   CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAA  853

Query  601   TGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTCATCGTTTACG  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  852   TGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTCATCGTTTACG  793
```

图 5 续 1

```
Query  661   GTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATACTTTCGAGCCTCAGCGTCA  720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  792   GTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATACTTTCGAGCCTCAGCGTCA  733

Query  721   GTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTTCAC  780
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  732   GTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTTCAC  673

Query  781   CGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCAC  840
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  672   CGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCAC  613

Query  841   TTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTA  900
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  612   TTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTA  553

Query  901   CGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG  960
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  552   CGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG  493

Query  961   TTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTT  1020
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  492   TTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTT  433

Query  1021  CTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCC  1080
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  432   CTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCC  373

Query  1081  ATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCC  1140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  372   ATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCC  313

Query  1141  GTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGG  1200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  312   GTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGG  253

Query  1201  TGAGCCGTTACCCCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGA  1260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  252   TGAGCCGTTACCCCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGA  193

Query  1261  AGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTT  1320
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  192   AGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTT  133
```

图 5 续 2

```
Query  1321  CCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACT  1380
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  132   CCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACT  73

Query  1381  CACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTTCGACTTGCAT  1440
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  72    CACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTTCGACTTGCAT  13

Query  1441  GTAT  1444
              ||||
Sbjct  12    GTAT  9
```

图 5