

广东客家黄酒酒曲中微生物的初步鉴定及其产 γ -氨基丁酸能力的研究

黄敏欣¹, 赵文红^{1,2}, 朱豪¹, 白卫东^{1,2}, 颜东梅¹, 李斌²

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510225) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 本文以广东客家黄酒酒曲为对象, 对黄酒发酵用红曲、麦曲和酒药中的微生物进行分离, 探讨了酒曲中微生物产 γ -氨基丁酸(GABA)的能力。研究表明, 从红曲中分离出 2 株真菌分离物, 其中红曲霉 1 株和酵母 1 株; 从麦曲中分离出 7 株真菌分离物, 其中毛霉 1 株, 曲霉 4 株, 根霉 1 株和酵母 1 株; 从酒药中分离出 6 株真菌分离物, 其中根霉 1 株, 曲霉 4 株和酵母 1 株。通过生化特性研究及序列分析, 鉴定出麦曲的曲霉中有 1 株为米曲霉, 酵母为酿酒酵母。将所分离出的菌株分别进行液态发酵, 并采用高效液相色谱检测了发酵液中 GABA 的含量。研究结果显示, 从红曲、麦曲和酒药中分离出来的真菌分离物都具有产 GABA 的能力, 不同真菌分离物产 GABA 的能力不同。其中, 根霉和几株曲霉发酵液中 GABA 含量较高, 特别米曲霉, 达到 40 mg/L 以上, 毛霉产 GABA 含量次之, 为 34.22 mg/L, 而酵母产 GABA 含量最少, 为 10 mg/L 左右。

关键词: 广东客家黄酒; 酒曲; 鉴定; GABA

文章编号: 1673-9078(2015)8-95-102

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.017

Preliminary Identification of Microorganisms from Jiuqu Used for Guangdong Hakka Rice Wine and Their γ -aminobutyric Acid-producing Capacity

HUANG Min-xin¹, ZHAO Wen-hong^{1,2}, ZHU Hao¹, BAI Wei-dong^{1,2}, YAN Dong-mei¹, LI Bin²

(1. College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

(2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Microorganisms present in red jiuqu, wheat jiuqu, and rice jiuqu used for Guangdong Hakka rice wine fermentation were isolated and identified and γ -aminobutyric acid (GABA) production by these microorganisms was studied. The results showed that red jiuqu contained two fungal isolates, a *Monascus* strain and a yeast strain; wheat jiuqu contained seven fungal isolates, a *Mucor* strain, four *Aspergillus* strains, one *Rhizopus* strain, and one yeast strain; while rice jiuqu contained six fungal isolates, one *Rhizopus* strain, four *Aspergillus* strains, and one yeast strain. Analysis of biochemical characteristics and sequence analysis identified one of the *Aspergillus* strains and the yeast strain isolated from wheat jiuqu as *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*, respectively. The isolates were cultured separately by submerged fermentation and the amount of GABA in the fermentation broth was estimated by high-performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that all fungal isolates from red jiuqu, wheat jiuqu, and rice jiuqu could produce GABA, but they had varied GABA production capacities. *Rhizopus* and several *Aspergillus* strains produced relatively high amount of GABA, especially *Aspergillus oryzae* (more than 40 mg/L), followed by a *Mucor* strain (34.22 mg/L). Yeast strains produced the least amount of GABA, at approximate 10 mg/L.

Key words: Guangdong Hakka rice wine; jiuqu; identification; gamma-aminobutyric acid

广东客家黄酒是一种营养保健的发酵型低度酒, 享有“液体蛋糕”之美誉^[1], 集中生产于广东梅州、

收稿日期: 2014-10-14

基金项目: 广东省产学研项目(2013B090600157); 广东省自然科学基金项目(2014A030313592); 广东省教育厅重点项目

作者简介: 黄敏欣(1990-), 女, 在读研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 赵文红(1966-), 女, 教授, 研究方向: 食品生物技术

河源及惠州一带。广东客家黄酒主要以优质糯米和客家特定地域内的山泉水为主要原料, 辅以红曲、麦曲、酒药作为发酵剂通过独特的发酵工艺酿造而成。

γ -氨基丁酸(GABA)是客家黄酒中的重要功能性成分, 其作为一种重要的抑制性神经递质, 参与多种代谢活动, 具有降血压、改善脑功能、增强长期记忆、抗焦虑、高效减肥及提高肝、肾机能等生理作用^[2-3]。

同时,具体研究表明,GABA在人体中的含量高低与某些疾病的形成有关。如帕金森病人脊髓中GABA含量较低,同样在癫痫病患者脊髓液中GABA含量低于正常值^[4]。日本大阪大学医学院的研究表明,食用富含GABA的米胚食品对Kupperman综合症具有显著的改善效果^[5]。另外,Huntington疾病、老年痴呆等神经衰败症与神经组织中GABA含量的降低有关^[6]。

GABA可以通过微生物发酵产生,曲霉菌、酵母菌、大肠杆菌和乳酸菌等微生物等均可利用谷氨酸脱羧酶发酵产生GABA^[7]。因此,对广东客家黄酒酒曲中的微生物进行分离和鉴定以及研究它们产GABA的能力极具意义。广东客家黄酒发酵过程中的微生物来源主要是酒曲。黄酒酒曲主要是酒药、麦曲和红曲,而在发酵过程中起主要作用的微生物有酵母菌、毛霉、根霉、红曲霉等^[8],其中酵母主要起到糖化和酒化作用,根霉和毛霉等主要起到糖化作用^[1]。

目前,有关广东客家黄酒酒曲中微生物的分离鉴定研究得较少,仅黄继红^[9]和陈晓芸^[10]等对广东客家黄酒中的酒曲微生物进行初步分离鉴定并对其糖化力和酒化力等发酵性能进行研究,而关于广东客家黄酒酒曲中微生物产GABA能力的研究尚未见报道。因此,本文对广东客家黄酒酿造用酒曲中的红曲、麦曲和酒药中微生物进行分离鉴定,对分离出的微生物进行发酵试验,探索酒曲中微生物产GABA的能力,以期了解广东客家黄酒酒曲中微生物的组成结构和富含GABA广东客家黄酒的研制提供理论基础。

1 材料及方法

1.1 原料与试剂

酒药,麦曲、红曲,分别都为(5.0±0.1)g,由广东省紫金县某黄酒厂提供;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),天津市大茂化学试剂厂;糯米,市售;2%的糯米粉培养基,实验室配制,取糯米适量,粉碎成糯米粉,取20g,加入蒸馏水将其煮沸溶解,配制成1000mL,pH为6.0±0.2。

葡萄糖等,天津金汇太亚化学试剂有限公司。限制性核酸内切酶,TaKaRa公司;T4DNA连接酶等,上海万疆生物技术有限公司。乙腈、甲醇,瑞典欧谱生公司;氨基酸混标(Asp、Glu、Ser、His、Gly、Thr、Arg、Ala、Tyr、Cys、Val、Phe、Ile、Leu、Lys),安捷伦科技有限公司;GABA标品,上海晶纯生化科技股份有限公司;邻苯二甲醛衍生试剂(OPA),安捷伦科技有限公司;磷酸盐缓冲液,广州市东晖贸易有限公司;以上所有试剂均为色谱纯。

1.2 主要仪器设备

生化培养箱PYX-250S-A,韶关市科力实验仪器有限公司;高压灭菌锅LDZX-30KBS,上海申安医疗器械厂;电炉XLYH1-DL-1,北京中西远大科技有限公司;电子天平BS223S,北京赛多利斯仪器系统有限公司;高效液相色谱仪Agilent 1100,安捷伦科技有限公司;PCR扩增仪5334,Eppendorf公司;凝胶成像分析系统BioSpectrum,美国思博明科学器材公司;高速离心机HC-3518,杭州华创科学器材有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酒曲中微生物的分离与鉴定

1.3.1.1 酒曲中霉菌的分离

取酒曲样品磨成粉,称取1g粉样酒曲用无菌生理盐水分别稀释 $10^2\sim 10^6$ 倍,各取不同稀释度的菌悬液1mL分别涂布于不同PDA平板培养基中,置于32℃的恒温培养箱中,培养2~5d。待菌落长出后,选取稀释度适当、微生物菌落分离度好的PDA平板,从中挑取不同形态特征单菌落分别划线于新PDA上继续培养,培养2~5d后再重复上述分离纯化操作,直至分离得到纯化的菌株。观察各菌株的形态,并将它们用PDA斜面培养基保存于4℃冰箱中。

1.3.1.2 酒曲中酵母的分离

取酒曲样品磨成粉,称取1g粉样酒曲用无菌生理盐水分别稀释 $10^2\sim 10^6$ 倍,各取不同稀释度的菌悬液1mL分别涂布于不同PDA平板培养基中,置于28℃的恒温培养箱中,培养48h左右。待菌落长成后,选取稀释度适当、微生物菌落分离度好的PDA平板,从中挑取具有酵母菌落特征的菌落,分别划线于新PDA上继续培养,培养48h后再重复上述分离纯化操作,直至分离得到纯化的菌株。观察各菌株的形态,并将它们用PDA斜面培养基保存于4℃冰箱中。

1.3.1.3 酒曲中部分霉菌和酵母的鉴定

参照文献^[11]进行各项生化指标的测定,包括葡萄糖氧化发酵、甲醇生长实验等;参照文献^[12-13]进行基因序列扩增,基因序列测定由广州市微生物研究所完成。并构建系统发育树。序列对排使用CLUSTAL X 1.81,使用MEGA 3.1构建系统发育树,重复次数为1000。树为无根树。

1.3.2 酒曲微生物产GABA的检测

1.3.2.1 微生物的培养

取100mL配置好的2%糯米粉溶液于250mL锥形瓶中盖上胶塞,置于121℃的高压灭菌锅中灭菌30

min, 作为微生物液体培养基。待液体培养基冷却后, 挑取健壮的单菌落接种于液体培养基中, 酵母于 28 °C 水浴摇床中培养 72 h, 霉菌于 32 °C 水浴摇床中培养 72 h, 待用于微生物产 GABA 能力的鉴定。

1.3.2.2 发酵液的处理

取发酵液于离心管中 10000r/min 离心 10 min, 离心后取上清液过 0.25 μm 滤膜, 装于高效液相色谱样品瓶中, 待高效液相色谱检测。

将分离出的微生物接种到 2% 糯米粉培养基之后, 立即离心, 取上清液, 过 0.25 μm 滤膜, 高效液相色谱检测, 来作为对比试验。通过对比发酵液前后的 GABA 含量之差, 衡量微生物产 GABA 的能力。

1.3.2.3 GABA 的高效液相色谱检测

色谱条件: 色谱柱: C18 (4.6×150 mm); 柱温: 40 °C; 检测器及波长: 紫外检测检测器, 340 nm; 流动相 A: 0.04 mol/L NaH₂PO₄ 用 6 mol/L NaOH 调 pH 至 7.8; 流动相 B: 乙腈:甲醇:水体积比为 45:45:10; 进样程序: 吸取 5 μL 缓冲液, 吸取 1 μL OPA 衍生剂, 吸取 0 μL H₂O, 吸取 10 μL 样品, 吸取 0 μL H₂O, 8 μL 原位混合, 最大速度, 6 次, 进样。本实验采用的梯度洗脱程序见表 1。

表 1 HPLC 梯度洗脱程序

Table 1 HPLC gradient elution conditions			
时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0	2.00	100	0
1.9	2.00	100	0
18.1	2.00	43	57
20.6	2.00	0	100
23.5	2.00	0	100
24.2	2.00	100	0
26.0	2.00	100	0

1.3.3 数据分析

利用 SPSS 17.0 对数据进行统计分析, 数据以均值±标准差(means±SD)表示;

利用 CLUSTAL X 1.81, MEGA 3.1 分析系统发育树。

2 结果与讨论

2.1 GABA 高效液相色谱检测方法的建立

(1) 标准溶液的配制: 准确称取 GABA 标准品 40.0mg, 流动相定容至 100 mL。其 GABA 标准品色谱图如图 1 所示。

由图 1 和图 2 对比可知, GABA 的出峰时间是 15.498 min 左右, 与共存的其他 15 种氨基酸出峰时间

无重叠现象, 即其他氨基酸对目标物 GABA 的测定无干扰。因此, 高效液相色谱法能有效地将样品中 GABA 与其他氨基酸分开, 并准确地对 GABA 进行定量分析。

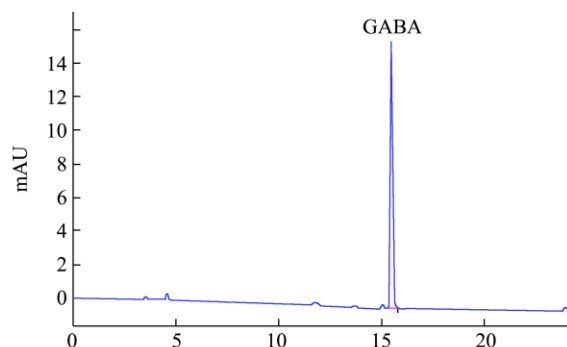


图 1 GABA 标准品 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of the GABA standard

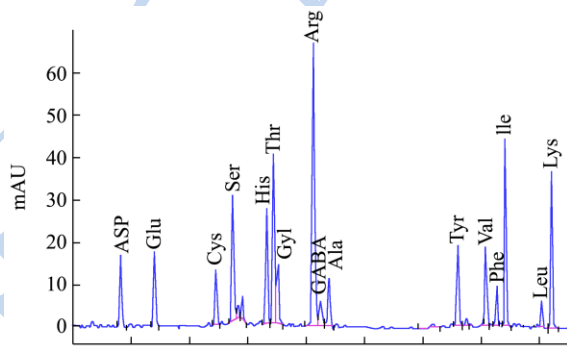


图 2 样品中 GABA 和氨基酸 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of GABA and amino acids in the wine samples

(2) 标准曲线的建立: 按 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μL 的进样量进样, 测定不同浓度下标准溶液的峰面积, 绘制标准曲线, 得到 GABA 的回归方程为 $y = 592.1483x + 0.9446$, 其中, y 为峰面积, x 为响应值; 相关系数 $r = 0.99984$ 。说明本测定方法呈现良好的线性关系。

(3) 加标回收率的测定: 在样品中加入不同已知量 GABA 标准品, 并检测加标后样品中 GABA 含量, 按下式计算其加标回收率:

$$\text{加标回收率} = \frac{\text{实测量样品中含量}}{\text{加标量}} \times 100\%$$

得到 GABA 的回收率为 104.73%, RSD 为 0.847%。

因此, 本研究方法的建立, 对广东客家黄酒中 GABA 的定性定量分析具有很高的准确性和可靠性。

2.2 酒曲微生物的分离与鉴定

2.2.1 红曲中微生物的分离

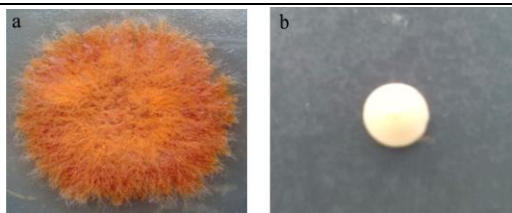


图 3 红曲中微生物 PDA 培养菌落图

Fig.3 Colonial morphology of microorganisms in red jiuqu cultured on PDA medium

注: a: 红曲霉, b: 酵母。

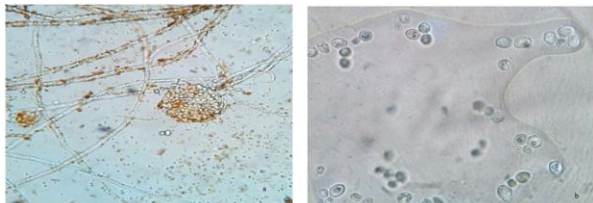


图 4 红曲中微生物镜检图

Fig.4 Microscope images of microorganisms in red jiuqu

注: a: 红曲霉, b: 酵母。

2.2.2 麦曲中微生物的分离

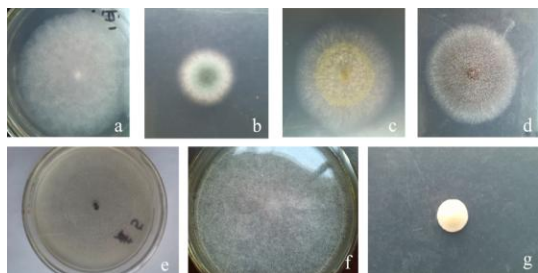


图 5 麦曲中微生物 PDA 培养菌落图

Fig.5 Colonial morphology of microorganisms in wheat jiuqu cultured on PDA medium

注: a: 毛霉, b~e: 曲霉, f: 根霉, g: 酵母。

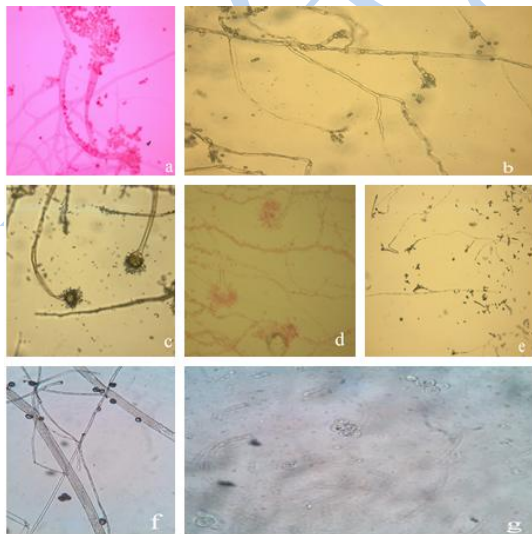


图 6 麦曲中微生物镜检图

Fig.6 Microscope images of microorganisms in wheat jiuqu

注: a: 毛霉, b~e: 曲霉, f: 根霉, g: 酵母。

2.2.3 酒药中微生物的分离

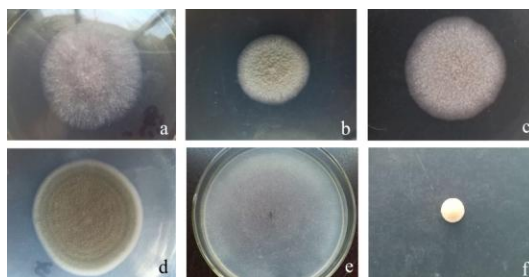


图 7 酒药中微生物 PDA 培养菌落图

Fig.7 Colony morphology of microorganisms in rice jiuqu cultured on PDA medium

注: a: 根霉, b~e: 曲霉, f: 酵母。

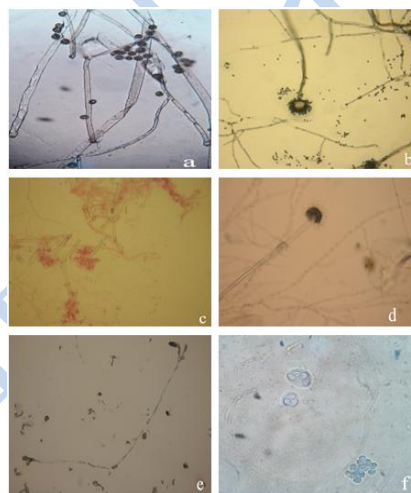


图 8 酒药中微生物镜检图

Fig.8 Microscope images of microorganisms in rice jiuqu

注: a: 根霉, b~e: 曲霉, f: 酵母。

从红曲、麦曲和酒药中所分离出的微生物可知,此三种曲均是具有糖化和酒化能力的微生物,其中根霉、毛霉和曲霉对淀粉糖化具有非常重要的作用,而酵母则同时具有糖化和酒化作用,而红曲中的红曲霉代谢的红曲色素使酒呈现特有的红色。在酿造中,这些微生物共同作用,使广东客家黄酒具备特殊的口感、风味及营养物质。而且根据相关文献报道^[14-16],从这些酒曲中分离出的微生物均可能具有产 GABA 能力。

2.2.4 酒曲中部分霉菌和酵母的鉴定

2.2.4.1 酒曲中部分霉菌的鉴定

用 BLAST 与 GenBank 中数据库中的序列比较,从 GenBank 中获得和该菌株序列相近种、属的 ITS rDNA 序列,构建系统发育树。序列对排使用 CLUSTAL X 1.81,使用 MEGA 3.1 构建系统发育树,重复次数为 1000。树为无根树。

表 2 红曲中微生物菌落形态及镜检结果

Table 2 Colony morphology and microscopic characteristics of microorganisms in red jiuqu

微生物	菌落形态	镜检结果
红曲霉 ^a	初生菌丝白色,老熟后呈橙红色,菌落绒状,菌落直径 3~5 cm。	菌丝具有横隔、中有油滴,球形闭囊壳、壳内子囊较多。
酵母 ^b	菌落呈乳白色,圆形凸起,边缘整齐,菌落直径 3~5 mm 左右。	细胞呈球形,具有芽孢和子囊,子囊中含 3-4 个子囊孢子。

注: a 和 b 为菌落图 3 和电子显微镜图 4 的编号。

表 3 麦曲中微生物菌落形态及镜检结果

Table 3 Colony morphology and microscopic characteristics of microorganisms in wheat jiuqu

微生物	菌落形态	镜检结果
毛霉 ^a	菌丝白色,菌丝浓密,老熟后菌丝呈灰色	菌丝无隔、分枝状,无假根或匍匐菌丝,菌丝体上直接生出孢囊梗,顶端有球形孢子囊
曲霉 ^b	初生菌丝白色,老熟后呈青灰色,呈辐射状,表层为青灰色粉末状	菌丝有隔,菌丝顶有球形顶囊,顶囊表面辐射状小梗,小梗上有一串串分生孢子
曲霉 ^c	菌落黄色,表面粉末状,呈辐射状	菌丝有隔,孢子梗顶部有球形顶囊,顶囊上有辐射状分生孢子
曲霉 ^d	菌丝为白色,呈辐射状,老熟后菌丝顶部呈黑色粉末状	菌丝有隔,孢子梗顶部有球形顶囊,顶囊上有辐射状分生孢子
曲霉 ^e	菌落黑色,菌丝极短,贴在培养基生长,48 h 内可长满整个平板	菌丝极短,菌丝顶端有黑色孢子
根霉 ^f	菌丝白色,气生菌丝浓密,布满整个平板,菌丝顶端可见灰色孢子囊	菌丝无隔,有匍匐菌丝和假根,菌丝顶部有孢子囊梗,其顶端膨大成孢子囊,孢子囊底部有球形囊轴
酵母 ^g	菌落乳白色,圆形凸起,边缘整齐	细胞呈球形,具有芽孢和子囊,子囊中含 3~4 个子囊孢子。

注: a~g 为菌落图 5 和电子显微镜图 6 的编号。

表 4 酒药中微生物菌落形态及镜检结果

Table 4 Colony morphology and microscopic characteristics of microorganisms in rice jiuqu

微生物	菌落形态	镜检结果
根霉 ^a	菌丝白色,菌丝浓密,老熟后菌丝呈灰黑色	菌丝无隔、分枝状,有假根或匍匐菌丝,菌丝体上直接生出孢囊梗,顶端有球形孢子囊
曲霉 ^b	初生菌丝白色,老熟后菌丝呈青灰色,菌丝呈棉絮状,菌丝表面成粉末状	菌丝有隔,菌丝顶有球形顶囊,顶囊表面辐射小梗,其上生出分生孢子
曲霉 ^c	菌丝白色,菌丝呈棉絮状,菌丝表面成粉末状	菌丝有隔,菌丝顶有球形顶囊,顶囊表面辐射状分生孢子
曲霉 ^d	初生菌丝白色,老熟后菌丝呈深灰色,菌丝浓密	菌丝有隔,菌丝顶有球形顶囊,顶囊表面辐射小梗,其上生出分生孢子
曲霉 ^e	菌落黑色,菌丝极短,贴在培养基生长,48h 内可长满整个平板	菌丝极短,菌丝顶端有黑色孢子
酵母 ^f	菌落呈乳白色,圆形凸起,边缘整齐,菌落直径 3~5 mm 左右	细胞呈球形,具有芽孢和子囊,子囊中含 3~4 个子囊孢子

注: a~f 为菌落图 7 和电子显微镜图 8 的编号。

系统发育树采用邻接法构建;参照序列来自 GenBank 数据库;分支上的数值表示经 1000 次计算后的置信度值;比例标尺表示遗传距离。

序列是真菌核糖体基因中的 ITS rDNA 区域,经 BLAST 与 GenBank 中数据库中序列比对,根据核糖体基因 ITS rDNA 区域在真菌鉴定中的要求,大于 99%

即可视为同一个种。鉴定菌株为米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)。

对麦曲中分离出的霉菌^c构建的系统发育树如图 9 所示。

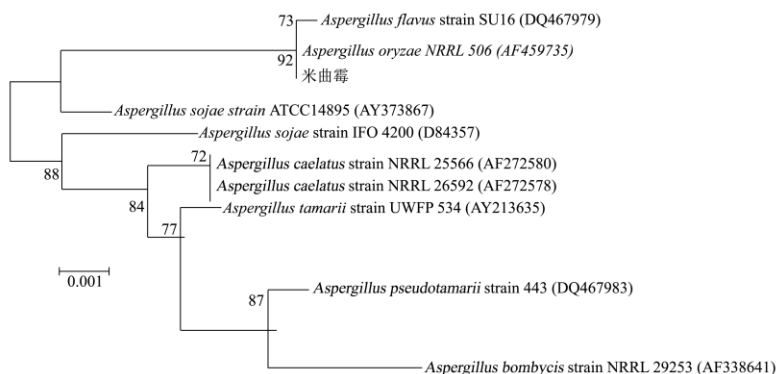


图 9 麦曲中霉菌^c系统发育树

Fig.9 Phylogenetic relationships of *Aspergillus* in wheat jiuqu

注: c:菌落图 5 和电子显微镜图 6 的编号。

2.2.4.2 酒曲中部分酵母的鉴定

麦曲中分离出的酵母^g的生化特征见表 5。

表 5 生化试验结果

Table 5 Results of biochemical tests	
生化检测项目	酵母 ^g
50% 葡萄糖发酵实验	V
L-山梨糖	+
麦芽糖	V
DL-乳糖	-
半乳糖	V
甲醇生长实验	+
蔗糖	V
纤维二糖	-
果糖	-
甘油	+
可溶性淀粉	V
0.1% 放线菌酮	-
脲酶	-
DBB	-
产酸	-
硝酸盐生长实验	+

注: “+”为反应呈阳性或者可以生长、利用; “-”为反应呈阴性或者不可以生长、利用; “V”为不明显。

用 BLAST 与 GeneBank 中数据库中的序列比较, 从 GeneBank 中获得和该菌株序列相近种、属的 26S rDNA 和 16S rDNA 序列, 构建系统发育树。序列对排使用 CLUSTAL X 1.81, 使用 MEGA 3.1 构建系统发育树, 重复次数为 1000。树为无根树。

系统发育树采用邻接法构建; 参照序列来自 GenBank 数据库; 分支上的数值表示经 1000 次计算后的置信度值; 比例标尺表示遗传距离。

序列是真菌核糖体基因中的 26S 区域, 经 BLAST 与 GenBank 中数据库中序列比对, 根据核糖体基因 26S 区域在真菌鉴定中的要求, 大于 99% 即可视为同一个种。鉴定菌株为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

对麦曲中分离出的酵母^g进行了 26S rDNA 及 16S rDNA 扩增, 扩增产物进行了序列测序, 测序后构建系统发育树如图 10 所示。

2.3 酒曲微生物产 GABA 的检测

广东客家黄酒中的 GABA 是客家黄酒在发酵过程中由微生物代谢产生的。参与客家黄酒发酵的微生物主要有酵母、根霉、毛霉和红曲霉等, 它们的代谢活动直接影响到 GABA 的含量。客家黄酒中的微生物在发酵过程中以蒸熟的糯米为主要培养基, 水为辅料, 且发酵时加入的红曲、麦曲和酒药带入的营养物质极少, 因此以 2% 的糯米淀粉为培养基, 对酒曲中分离出来的微生物进行液态培养, 并检测发酵液中 GABA 含量, 以此对微生物产 GABA 的能力进行判断。

2.3.1 红曲中微生物产 GABA 的检测

由表 6 可知, 从红曲中分离出的红曲霉和酵母均具有产 GABA 的能力, 其中红曲霉发酵液中 GABA 的含量为 41.87 mg/L, 酵母发酵液中 GABA 含量为 10.03 mg/L。

2.3.2 麦曲中微生物产 GABA 的检测

从表 7 可知, 客家黄酒酿造用的麦曲中分离出的 7 株微生物均有产 GABA 的能力, 其中一株根霉和一株米曲霉发酵液中 GABA 含量最高达到 40 mg/L 以上, 发酵液中 GABA 含量最少的是酿酒酵母, 其含量为 12.63 mg/L。

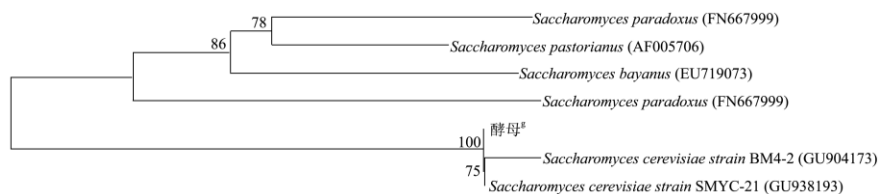


图 10 麦曲中酵母^g系统发育树

Fig.10 Phylogenetic relationships of yeast in wheat jiuqu

注: g:菌落图 5 和电子显微镜图 6 的编号。

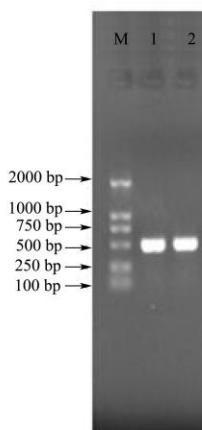


图 11 麦曲中酵母^g特异性 PCR 图谱

Fig.11 Species-specific PCR profile of yeast in wheat jiuqu

注: g:菌落图 5 和电子显微镜图 6 的编号。

表 6 红曲中微生物产 GABA 的能力

Table 6 GABA-producing capacity of microorganisms in red jiuqu

微生物	产量/(mg/L)
红曲霉 ^a	41.87±2.52
酵母 ^b	10.03±0.53

注: a 和 b 为菌落图 3 和电子显微镜图 4 的编号。

表 7 麦曲中微生物产 GABA 的能力

Table 7 GABA-producing capacity of microorganisms in wheat jiuqu

jiuqu	
微生物	产量/(mg/L)
毛霉 ^a	34.22±1.34
曲霉 ^b	12.91±1.03
米曲霉	48.46±3.11
曲霉 ^d	22.14±1.03
曲霉 ^e	27.23±1.28
根霉 ^f	40.84±2.05
酿酒酵母	12.63±0.94

注: a-f 为菌落图 5 和电子显微镜图 6 的编号。

2.3.3 酒药中微生物产 GABA 的检测

从表 8 可知, 客家黄酒酿造用的酒药中所分离出的 6 株微生物均具有产 GABA 的能力, 其中发酵液中 GABA 含量最高的是曲霉 e 菌株发酵液, 含量为 47.57 mg/L。

表 8 酒药中微生物产 GABA 的能力

Table 8 GABA-producing capacity of microorganisms in rice jiuqu

jiuqu	
微生物	产量/(mg/L)
根霉 ^a	23.43±1.22
曲霉 ^b	16.74±1.14
曲霉 ^c	29.88±1.42
曲霉 ^d	37.40±1.83
曲霉 ^e	47.57±1.62
酵母 ^f	6.32±0.25

注: a~f 为菌落图 7 和电子显微镜图 8 的编号。

3 结论

3.1 探索广东客家黄酒发酵过程中参与发酵的微生物, 对客家黄酒酿造用的红曲、麦曲和酒药的微生物进行了分离和初步鉴定: 从红曲中分离出 2 株真菌分离物, 其中红曲霉 1 株和酵母 1 株; 从麦曲中分离出 7 株真菌分离物, 其中毛霉 1 株, 曲霉 4 株, 根霉 1 株和酵母 1 株; 从酒药中分离出 6 株真菌分离物, 其中根霉 1 株, 曲霉 4 株和酵母 1 株。通过生化特性研究及序列分析, 鉴定出麦曲的曲霉中有 1 株为米曲霉, 酵母为酿酒酵母。

3.2 探讨广东客家黄酒酒曲中微生物产 GABA 的能力, 将分离出的微生物进行产 GABA 能力的鉴定, 以客家黄酒酿造用的糯米为原料, 制成 2% 的糯米粉液体培养基, 对分离出来的微生物进行液态发酵培养, 经过 72 h 发酵, 并检测发酵液中 GABA 的增加量。结果发现从红曲、麦曲和酒药中分离出来的微生物都具有产 GABA 的能力, 不同微生物产 GABA 的能力不同, 其中根霉和几株曲霉发酵液中 GABA 含量较高, 特别米曲霉, 达到 40 mg/L 以上, 毛霉产 GABA 含量次之, 为 34.22 mg/L, 而酵母产 GABA 含量最少, 为 10 mg/L 左右。

3.3 由于检测的费用控制, 挑选测序的数量有限, 因此本文只对麦曲中的一株霉菌和酵母进行序列分析, 其他真菌分离物有待进一步鉴定。总之, 酒曲中的微生物在发酵过程中提供的糖化酶、酒化酶等是酿酒过

程中不过或缺的,这些微生物不仅影响着黄酒的风味,同时影响着黄酒的营养^[17]。广东客家黄酒酿造是一个多菌种共同发酵的过程,各微生物之间可能存在拮抗或协同作用,而且在整个发酵过程中微生物生长的环境处于一个动态的变化^[18]。在如此复杂的发酵过程中,探索哪些微生物对黄酒中GABA贡献大,需要进一步研究,如研究客家黄酒发酵的主要微生物在发酵的各个不同阶段产GABA的情况,以及各微生物之间的相互影响。同时,在客家黄酒的不同发酵阶段,不同微生物对GABA代谢情况仍然不明确,且各种微生物的GABA关键限速酶GAD在高糖、高酒精度的条件下,酶活性是否受到抑制,进而影响到GABA产量,同样需要进一步深入了解。

参考文献

- [1] 谢广发.黄酒酿造技术[M].北京:中国轻工业出版社,2010
XIE Guang-fa. Yellow rice wine brewing technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2010
- [2] Marie E Gibbs, David N Bowser. Astrocytes and interneurons in memory processing in the chick hippocampus: roles for G-protein coupled protein receptors, GABA (B) and mGluR1 [J]. Neurochem. Res., 2009, 34: 1712-1720
- [3] 胡普信.中国黄酒的科研现状及发展[J].中国酿造,2008,3: 4-5
HU Pu-xin. Development trend and current technology situation of chinese rice wine [J]. China Brewing, 2008, 3: 4-5
- [4] Sutch R J, Davies C C, Bowery N G. GABA release and uptake measured in crude synaptosomes from genetic absence epilepsy rats from strasbourg (GAERS) [J]. Neurochemistry International, 1999, 34(5): 415-425
- [5] Oryza GABA series. Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd., 1999
- [6] Tadashi Okada, Tomoko Sugishita, et al. Effect of defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration [J]. Nippon Shokuhin Kagaku KogakuKaishi, 2000, 47(8): 596-603
- [7] 孙佰申.红曲霉发酵及某些生理活性物质的研究[D].杭州:浙江工业大学,2004
SUN Bai-shen. Research of some physiological active substance by fermentation of *Monascus Spp.* [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2004
- [8] 吕旭聪,翁星,黄若兰,等.红曲黄酒酿造用曲及传统酿造过程中酵母菌的多样性研究[J].中国食品学报,2012,12(1): 182-190
LV Xu-cong, WENG Xing, HUANG Ruo-lan, et al. Research on biodiversity of yeasts associated with hongqu glutinous rice wine starters and the traditional brewing process [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(1): 182-190
- [9] 黄继红,张新武,杨公明,等.客家糯米酒高产菌株筛选及鉴定研究[J].农产品加工(学刊),2011,2:19-22
HUANG Ji-hong, ZhANG Xin-wu, YANG Gong-ming, et al. Screening and identification of high-producing strains in the production of hakka rice wine [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2011, 2: 19-22
- [10] 陈晓芸.广东客家娘酒传统酿造工艺研究及主要酒曲微生物的分离和特性[D].南昌:南昌大学,2011
ChEN Xiao-yun. Study on traditional brewing process of guangdong hakka niang wine and characteristics of microorganisms isolated from raw starter [D]. Nanchang: Nanchang University, 2011
- [11] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999
SHEN Ping, FAN Xiu-rong, LI Guang-wu. Microbiology experiment [M]. Beijing:China Higher Education Press, 1999
- [12] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002
ZHAO Bin, HE Shao-jiang. Microbiology experiment [M]. Beijing: Science Press, 2002
- [13] 王开敏,赵敏.产纤溶酶菌株的分离和鉴定及纤溶酶基因在酿酒酵母中的表达[J].中国食品学报,2009,9(2):23-28
WANG Kai-min, ZHAO Min. Isolation and identification of strains producing fibrinolytic enzyme and expression of fibrinolytic enzyme gene in *saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(2): 23-28
- [14] Endo A, Monacolin K, A new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species [J]. The Journal of Antibiotics, 1979, 32: 852-854
- [15] 何国庆.食品发酵与酿造工艺学[M].北京:中国农业出版社,2001
HE Guo-qing. Food fermentation and brewing process [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001
- [16] 徐晓波,蒋冬花,李杰.5株生物合成GABA酵母菌株的分离、筛选和鉴定[J].微生物学杂志,2009,29(1):55-59
XU Xiao-bo, JIANG Dong-hua, LI Jie. Isolation, screening and identification of five GABA producing yeast strains [J]. Journal of Microbiology, 2009, 29(1): 55-59
- [17] 白卫东,赵文红,冯爱军,等.广东客家娘酒风味物质在发酵过程中的变化研究[J].中国食品学报,2013,13(4):241-244

BAI Wei-dong, ZHAO Wen-hong, FENG Ai-jun, et al. Study on the changes of guandong hakka niang wine flavor substances in fermentation process [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(4): 241-244

[18] 李勇波,赖樱花,成坚,等.HPLC 检测客家黄酒酸败前后有机酸变化及工艺优化[J].中国酿造,2011,11:178-182

LI Yong-bo, LAI Ying-hua, CHEN Jian, et al. Changes of organic acids contents in hakka wine by HPLC and technology optimization [J]. China Brewing, 2011, 11: 178-182

现代食品科技