

桂花内生菌分离及桂花蜂蜜酒酿制研究

樊 晶,何 睿,吴海线,李渝红,张 静,王 冰,梁亦龙
(重庆邮电大学 生物信息学院,重庆 400005)

摘要:为更好的筛选酿制桂花酒的菌种,从桂花中筛选出菌株 Gh1,对其形态特征、生理生化性质进行鉴定,对 Gh1 的 16S rDNA 序列进行分析,就桂花蜂蜜酒酿制进行了探究。结果表明:Gh1 经鉴定为芽胞杆菌,酿制的桂花蜂蜜酒口感香醇,酒精含量为 8%~11%,并可通过添加维生素 C,来调和桂花发酵的苦味。

关键词:桂花;内生菌;16S rDNA

中图分类号:Q939.97 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)10-0149-03 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2015.10.0149

蜂蜜营养丰富,其中果糖和葡萄糖的含量占 65%以上,还含有丰富的蛋白质、氨基酸、矿物质、维生素、酶类及芳香化合物等,具有健脾和胃、清凉退火、生津止渴等功能,对治疗和预防心脑血管病和多种慢性病有积极的作用,但蜂蜜中有多种有益物质,在自然状态并不能被人体所吸收^[1]。桂花又名木犀,属芳香植物,具有散寒破结,化痰

止咳、经闭腹痛作用。若两者结合经过混合发酵制得的桂花蜂蜜酒酿,可提高营养价值。

一般的桂花酒主要是通过通过在酿制完成的白酒中加入桂花浸泡或者直接加入桂花液进行调配而得来的,桂花液的加工制造会增加酿酒工艺的繁琐度,而且直接用桂花液调制的酒在香味上可能存在不均匀的问题;而用鲜花泡酒来使桂花的香味融入酒中也受到了季节的限制,即便是使用干花泡酒,也不能很好的融入桂花香味,使桂花香和酒香融为一体。本文通过发酵菌种和培养条件的研究,探求一种酿制桂花蜂蜜酒的方法,为桂花、蜂蜜的加工利用提供新的有效途径。

收稿日期:2015-06-04
基金项目:重庆邮电大学创新实验计划资助项目(2014-7);重庆市教委资助项目(KJ130520)
第一作者简介:樊晶(1994-),女,湖北省仙桃市人,在读学士,从事细胞分子生物学研究。E-mail: 1875218553@qq.com。

参考文献:

[1] 吕作舟. 食用菌栽培学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006:160.

[2] 李红宇. 玉米秸秆营养价值评定及其发酵饲料的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.

[3] 陈家明, 余稳稳, 吴晖, 等. 玉米芯的营养成分分析[J]. 现代食品科技, 2012, 28(9): 1073-1075.

[4] 张介驰, 韩增华, 张丕奇, 等. 发菌温度对黑木耳菌丝和子实体生长的影响[J]. 食用菌学报, 2014, 21(2): 36-40.

[5] 王相刚, 许修宏, 缪元霞, 等. 农作物秸秆替代木屑栽培黑木耳的关键性技术[J]. 北方园艺, 2015(3): 160-163.

Study on Screening Substrate of Black Fungus Cultivated by Straw

JIANG Jia-nan¹, LI Yan-fang¹, ZHU Lin¹, DU Meng²

(1. College of Agriculture and Water Conservancy Engineering, Suihua University, Suihua, Heilongjiang 152061; 2. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: In order to culture black fungus use crop waste, taking corncob, cornstalk and rice husk ect on as main cultivated materials, the effect of six substrate formulas on cultivate of black fungus were studied. The results showed that the mycelium of black fungus in different substrate formulas grew well, the formula 4 (sawdust 18%, corncob 60%, rice husk 20%, gypsum 1%, lime 2%) had well-growing and higher output. Meanwhile it had good commodity characters and high comprehensive economic benefits.

Keywords: straw; black fungus; substrate components; cultivation

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为桂花、蜂蜜、葡萄酒、无菌水、马铃薯(去皮)200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 26 g、水 2 000 mL、牛肉膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g。试验所用主要设备有超净工作台(苏州净化有限公司)、生化培养箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司)、恒温干燥箱(金坛市宏华仪器厂)、恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂)、立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

1.2 方法

1.2.1 内生菌菌种的筛选 取 1 g 桂花,灭菌研磨,无菌超净台上接入到已灭菌的马铃薯葡萄糖培养基中,摇床培养。恒温摇床以 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30°C 下培养 1~2 d,观察其生长,选取香味浓郁的菌进行多次划线培养后,挑单菌落,保藏。在显微镜下进行拍照,并用血细胞计数板计数。最后得一株具产香菌的菌株,记为 Gh1。

1.2.2 菌种鉴定 显微镜观察菌株菌落形态,并进行生理生化性质检测。培养并提取分离的菌株的基因组 DNA,采用上游引物 5' CAGAGCAA-CAGGATTAGA3'; 下游引物 5' AGTGCCAT-GATGACTTGA3'。PCR 扩增 16S rRNA 基因序列^[2]。PCR 反应程序: 95°C 变性 5 min, 95°C 变性 1 min, 50°C 复性 30 S, 72°C 延伸 1 min, 进行 30 个循环,最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物进行测序(上海生物工程公司)。利用 16S rRNA 基因序列同源性分析的方法进行鉴定。将分离到的菌株在 GenBank 进行序列比对,构建系统发育树。

1.2.3 菌种发酵的发酵性能研究 取 3 个 250 mL 三角瓶,各加入 100 mL 的桂花、蜂蜜、水(重量为 1:1:1),按 8% 的接种量分别接入 Gh1 菌株。在 35°C 下发酵。发酵过程中每 24 h 观察发酵情况,并测定糖度、酒精度^[3]的变化。

1.2.4 桂花蜂蜜酒发酵工艺流程 发酵原液配制(蜂蜜 1:3 稀释)→发酵→过滤→澄清→灭菌→发酵→陈酿→澄清→调配、过滤→巴斯消毒→成品封存

发酵原液的配制:采用比例 1:3 的规格配置,每瓶发酵原液包括糖腌桂花:蜂蜜:无菌水比例为 1:1:6 和菌种混合液 3%~5%。该菌种混合液包括酿酒酵母、桂花内生菌按 1:1 的比例添加。调配:桂花蜂蜜酒有轻微的苦涩味,添加 1% 维生素

C 和 0.05% 甜菊糖,密封陈酿。

1.2.5 菌株系统进化分析 菌株 Gh1 的 16S rRNA 基因扩增并测序后,将其序列与所有的芽孢杆菌的 16S rRNA 进行比对,利用 MEGA4.0 软件构建了系统发育树。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定

2.1.1 菌种形态观察 从显微镜观察菌株菌落形态(见图 1)看出,平板培养菌落体稍隆起,较粗糙,边缘为平整,呈同心环状,中心位置颜色较深。进行革兰氏染色,结果为革兰氏阳性菌,杆状有芽孢。

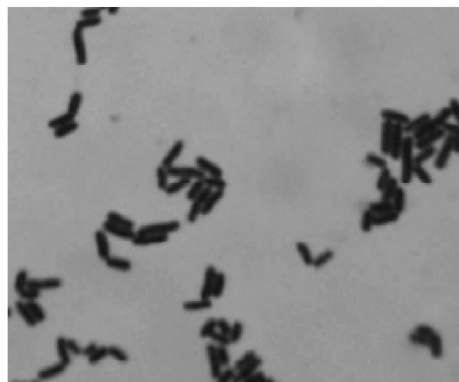


图 1 Gh1 的革兰氏染色图($\times 400$)

Fig. 1 Gh1 Staining ($\times 400$)

菌株 Gh1 呈短杆状,革兰氏染色阳性,兼性好氧生长,硝酸盐还原成亚硝酸盐,酪氨酸水解阴性、MR 试验阴性、VP 试验阳性,不具运动性,产吡啶和过氧化氢酶,具有固氮能力。菌株 Gh 利用葡萄糖、蔗糖、棉子糖、阿拉伯糖、甘露醇和木糖,能液化明胶,水解淀粉,并且在糖度 1.0%~8.0% 的范围内都能较好生长。经细菌系统鉴定手册(2001 年版)及《伯杰细菌鉴定手册》^[4-5]对比可确定该菌株属于短杆菌属(*Bacillus brevis*)。

2.1.2 Gh1 菌发酵糖度、酒精度含量检测 Gh1 菌和酿酒酵母发酵 1 个月后,检测糖度为 13.9,酒精度为 7.74。而单一的酿酒酵母发酵 1 个月后,其糖度为 11.2,酒精度为 6.3。说明加 Gh1 菌种后,其糖度和酒精度都有所提高,增强了发酵的效果。

2.2 16S rRNA 序列扩增

通过对 16SrRNA 序列的 PCR 结果分析可知,其 DNA 序列片段大小是 1 200 bp 左右。

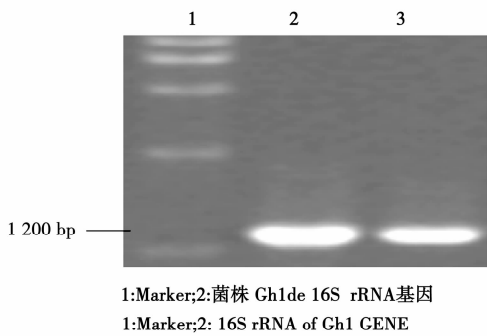


图 2 菌株 Gh1 的 16S rRNA 基因的凝胶电泳图
Fig. 2 Agarose gel of PCR products profiles of 16S rDNA

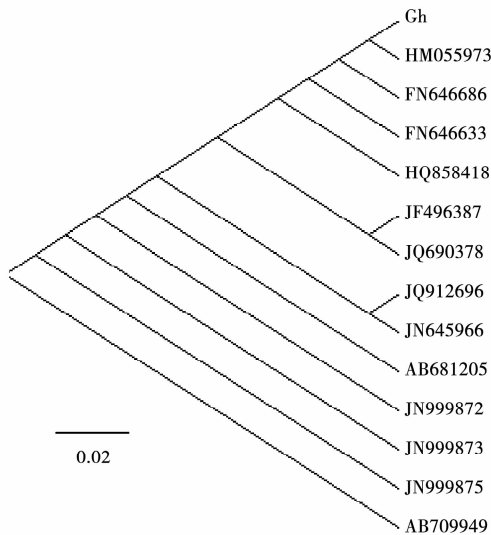


图 3 菌株 Gh1 的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of strain Gh1

2.3 菌株系统进化分析

利用 MEGA4.0 软件构建了系统发育树^[3](见图 3),以芽孢杆菌为对照,分离菌株 Gh1 与芽孢菌聚在一起,相似性有超过 97%,说明其与芽孢杆菌的亲缘关系较近。

2.4 发酵评定

经外观考察和专家评定,确定桂花蜂蜜酒色外观呈淡黄透亮液体,均匀澄清,没有悬浮物,酒味醇厚,爽口纯正,具有清新的桂花香以及蜂蜜味。

3 结论

通过对桂花内生菌 Gh1 进行分离及其形态、生理生化特性的研究表明,确定此内生菌为芽孢杆菌,工艺以桂花内生菌 Gh1、酿酒酵母为菌株,进行发酵,适宜生长温度为 35℃。得到的桂花蜂蜜酒去除苦涩味道,口感香醇,酒精含量在 8%~11%,并添加维生素 C,来调和桂花发酵的苦味,适合热衷于低度酒的饮酒人群,包括老人和年轻女性,有较好的保健作用。

参考文献:

[1] 曹伟,尉亚辉.蜂产品保健原理与加工技术[M].北京:化学工业出版社,2002.
[2] 李晓英,文万彬,吴林蔚,等.糟坊头酒坊遗址古窖池中几株细菌鉴定及其代谢产物分析[J],酿酒,2012,39(1): 59-62.
[3] GB/T 15038-2006,葡萄酒、果酒通用分析方法[S].
[4] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
[5] 布坎南,吉本斯.伯杰细菌鉴定手册[M].8 版.北京:科学出版社,1984.

Study on the Screening of *Osmanthus fragranse* Endophytes and the Technology Condition for Making Honey Wine

FAN Jing, HE Rui, WU Hai-xian , LI Yu-hong, ZHANG Jing, WANG Bing, LIANG Yi-long
(Chongqing University of Posts and Telecommunications, School of Bioinformatics, Chongqing 400065)

Abstract: In order to screen the strains of *Osmanthus fragranse* to make *Osmanthus* honey wine, by the analysis on the morphological characteristics, physiological and biochemical properties and 16S rDNA sequence of Gh1 strain which was screened from *Osmanthus*. The results showed that the Gh1 strain was bacillus. The brewing technology of *Osmanthus* honey wine was studied, the alcohol content was 8%~11%, after adding VC to reconcile the amargoso of *Osmanthus* fermentation, the *Osmanthus* honey wine tasted savoury and mellow.

Keywords: *Osmanthus fragranse*; endophyte; 16s rRNA