

不同发酵剂对小米营养成分及 γ -氨基丁酸含量的影响

姚世聪, 赵 丹, 路 锬

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要:研究三株不同丝状真菌(米曲霉, 米根霉 3.1175 和米根霉 3.2751)发酵对小米营养成分及 GABA 含量的影响。通过测定不同时间段发酵后小米中的总酸, 氨基酸态氮, 还原糖等营养成分以及 γ -氨基丁酸的含量, 结果发现小米中的总酸和还原糖在三株菌的发酵下均得到显著提高($p < 0.05$)。此外, 氨基酸态氮在米曲霉和米根霉 3.2751 的发酵下得到显著提高($p < 0.05$), 而米根霉 3.1175 发酵的小米变化则不显著($p > 0.05$), 米曲霉发酵的小米中 γ -氨基丁酸含量随着发酵时间的增加而显著提高($p < 0.05$)。因此米曲霉和米根霉 3.2751 发酵的小米具有更大的开发前景。

关键词:小米发酵, 真菌发酵, γ -氨基丁酸(GBGA), 氨基酸态氮

Effect of different filamentous fungi fermentation on nutritional components and γ -Aminobutyric Acid content of millet

YAO Shi-cong, ZHAO Dan, LU Si

(College of Food Science and Nutritional Engineering, Chinese Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The effect of three filamentous fungi (*Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae* 3.1175 and *Rhizopus oryzae* 3.2751) solid-state fermentation on nutritional components and GABA content of millet was investigated. The content of titratable acid, amino acid nitrogen, reducing sugar and γ -Aminobutyric Acid (GABA) of millet fermented by these three fungi were changed after incubation. The titratable acid and reducing sugar of millet fermented by three filamentous fungus were increased significantly ($p < 0.05$). The free amino acid of millet fermented by *A. oryzae* and *R. oryzae* 3.2751 were increased significantly ($p < 0.05$). The *R. oryzae* 3.1175 was not significant ($p > 0.05$). Meanwhile the GABA of *A. oryzae* fermented millet was increased significantly ($p < 0.05$). Therefore, the fungi fermented millet has a better development future especially fermented by *A. oryzae* and *R. oryzae* 3.2751.

Key words: millet fermentation; fungi fermentation; γ -Aminobutyric Acid (GABA); amino acid nitrogen

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)19-0165-04

小米属于杂粮的一种, 它起源于中国, 是我国传统的优势粮食作物、主食作物和抗旱耐贫瘠作物, 为“五谷”之一。它具有生育期短, 适应性广、耐干旱、耐贫瘠、耐储存、价格低廉等优点, 因而成为我国北方地区主要的杂粮作物之一, 在河北、山西、陕西、内蒙古、河南等地都有种植^[1]。中国农业科学院作物品种资源研究所指出: 小米是一种具有保健作用的营养丰富的优质粮源, 蛋白质含量平均值高于其他谷物, 且氨基酸比例协调, 其中增强脑细胞功能的谷氨酸和能消除机体疲劳的天门冬氨酸含量非常丰富^[2]。 γ -氨基丁酸(GBGA)是广泛分布于动植物中的一种氨基酸, 作为一种中枢神经抑制性传递物质, 介导40%以上抑制性神经的传导, 参与人体或动物体内脑循环的生理活动^[3]。日常摄入的植物性食品并不能满足人体对 GABA 的需要, 科学家利用 Glu 转化成 GABA 的特性可制造富含 GABA 的功能性食

品^[4]。1986 年, 日本科学家首先成功开发了富含 GABA 的茶, 并制成商品销售, 之后又相继开发出富含 GABA 的发芽糙米和乳酸菌, 酵母菌发酵的高 GABA 浓度的健康食品素材等^[5]。在我国, 发酵豆制品, 如豆腐, 腐乳等都含有较丰富的 GABA^[4], 其他报道表明, 抗高血压, 增进脑机能及肝功能也与富含 GABA 的饮料和食品配料有密切的关系^[6]。目前, 小米的加工产业仍存在着深加工产品较少, 基本以原粮为主, 产品附加值低的问题^[1], 结合食品加工中常用的真菌发酵, 以及发酵食品在很大程度上满足了现代人的营养需求, 可以看到小米发酵食品将有较大的开发潜力。本文通过使用食品生产中认为安全的丝状真菌对小米进行发酵, 研究此过程中小米 γ -氨基丁酸等营养成分的变化, 从而为生产小米相关发酵产品打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小米 谷来丰牌; 米曲霉、米根霉 3.1175、米根霉 3.2751 购自中国科学院微生物研究所; γ -氨基丁

收稿日期: 2012-04-11

作者简介: 姚世聪(1992-), 女, 在读本科生, 研究方向: 食品科学。

酸、甘氨酸、葡萄糖 购自 sigma 公司;其他试剂均为分析试剂。

MLS-3020 灭菌釜、生化培养箱 LRH-250 均为上海精密科学仪器有限公司;AY220 岛津托盘电子分析天平 上海民桥精密科学仪器有限公司;pHS-25型 pH 计 上海雷磁仪器厂;TDL-5-A 型离心机、超声波药品处理机 均为济宁金百特电子有限责任公司;荧光酶标仪 SpetraMax M2°。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵小米的制备 称取小米 0.5kg,清洗后,加水至浸没小米,浸泡 2h 后将水滤去,自然晾干,然后用粉碎机粉碎,使粒度小于 80 目。分装于玻璃罐中,每罐 20g,透气膜封口后在 121℃ 下采用高压灭菌锅蒸煮小米 15min,冷却至室温后,分别将米曲霉、米根霉 3.1175、米根霉 3.2751 接入小米粉中(接种量 10^6 孢子/g),在 27℃、湿度 90% 培养箱中培养;分别于 0、24、48、60、72h 取样,对发酵小米进行成分的分析。

1.2.2 pH 及总酸含量测定

1.2.2.1 样品制备 20g 发酵小米用 100mL 蒸馏水超声提取 30min,3000r/min 离心 15min;沉淀再用 100mL 水以相同条件提取,合并两次上清液,定容到一定体积取上清液用于总酸测定。

1.2.2.2 测定 pH 吸取一定量的样液,使用 pH 计直接测定样液 pH。

1.2.2.3 测定酸度 用移液管吸取 50mL 样液,加入酚酞指示剂 5 滴,用氢氧化钠标准溶液滴定,至出现微红色 30s 内不褪色为终点,记下所消耗的体积。

1.2.2.4 结果计算 试样的总酸度以每 100g 中氢离子毫摩尔数表示,按下式计算:

$$\text{总酸度}[\text{mmol}/100\text{g}] = [(C \times V_1)/V_0] \times 200/m \times 100$$

式中:C-氢氧化钠标准溶液摩尔浓度(mol/L);
 V_1 -滴定时所消耗的氢氧化钠标准溶液体积(mL);
 V_0 -吸取滴定用的样液体积(mL);m-试样质量(g);
200-试样浸提后定容体积(mL)。

1.2.3 氨基酸态氮测定 采用水合茚三酮方法测定;20g 发酵小米加入 100mL 蒸馏水,室温下超声提取 30min,3000r/min,离心 15min;沉淀再用 100mL 水以相同条件提取,合并两次上清液。然后定容到一定体积用来测定氨基酸态氮。表示为 FAN mg/100g 干物质。

1.2.4 还原糖测定^[7]

1.2.4.1 样品制备 制备方法同 1.2.2.1。

1.2.4.2 样品测定 采用 DNS 法测定还原糖含量,取 1.0mL 待测样品,加水 1mL,再加入 1.5mL 反应试剂。沸水浴加热 5min 后,流水迅速冷却,加水 10mL,在 540nm 下测定各管吸光值。根据测得的光密度,从标准曲线上查得还原糖的含量,结果表示为 g/100g 干物质。

1.2.5 γ -氨基丁酸测定^[8]

1.2.5.1 样品制备 20g 发酵小米加入 50mL 正己烷,在室温下超声脱脂 30min;减压抽滤后,固体加

200mL 水,室温下超声提取 2h,3000r/min 离心 15min,取上清液用于 γ -氨基丁酸的测定。

1.2.5.2 样品测定 取 600 μ L 待测样品溶液,依次加入硼酸缓冲液 400 μ L,6% 重蒸酚 1000 μ L,混匀,再加入 5% NaClO 溶液 400 μ L,充分混匀,沸水水浴 10min,冰水冷却 20min,加入 60% 乙醇 4.0mL,充分混匀,于 645nm 波长处测定吸光值,从标准曲线上查得 γ -氨基丁酸的含量,结果表示为 mg/g 干物质。

1.3 数据分析

实验重复三次,全部数据均用 SPSS17.0 统计软件进行处理,用单因素方差分析 ANOVA,实验结果以标准误差(Mean $\pm$ SD)表示, $p < 0.05$ 具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 发酵对小米总酸含量和 pH 的影响

总酸是指样品中有机酸和游离无机酸的总和^[9]。微生物发酵可将淀粉等大分子物质转化为有机酸,如乳酸、苹果酸等。如图 1~图 2 所示,在整个发酵过程中,24h 内三株菌总酸的含量变化均不明显,24h 后,米根霉 3.2751 发酵的小米其总酸含量升高最快,发酵 72h 时总酸含量达到 12.48mmol/100g,此时,米曲霉发酵的小米总酸含量达到 5.73mmol/100g,且测得的 pH 均有下降,且下降趋势与总酸含量上升趋势基本相同,实验说明在发酵过程中,米曲霉和米根霉 3.2751 均可将淀粉等大分子物质转化成有机酸。但是米根霉 3.1175 在发酵过程中,其总酸含量在发酵前后没有显著性差异,测得 pH 的变化也不明显。姜照等^[10]利用乳酸菌和酵母菌发酵玉米醪发现,随着发酵时间的延长,pH 呈下降趋势,总酸含量增加,且其主要的有机酸是乳酸和苹果酸,以上研究与本文结论相似,推测发酵过程中产生的有机酸可能为乳酸和苹果酸。

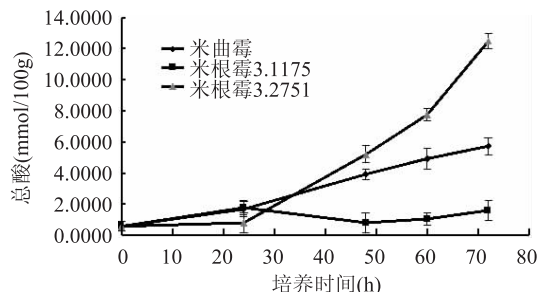


图1 米曲霉、米根霉 3.1175

和米根霉 3.2751 发酵小米总酸含量

Fig.1 Titratable acid of millet fermented by *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae* 3.1175 and *Rhizopus oryzae* 3.2751 at different incubation period

2.2 发酵对小米氨基酸态氮含量的影响

真菌发酵主要是利用微生物生长产生的丰富酶系,将原料中的蛋白质分解成游离的氨基酸,从而增加蛋白质的消化率,增加小米的营养价值,同时氨基酸也是产品鲜味的主要来源^[11]。其中,米曲霉分泌的主要是中碱性蛋白酶^[12]。如图 3 所示,通过发酵,三株真菌均使小米中氨基酸态氮含量上升,随着发

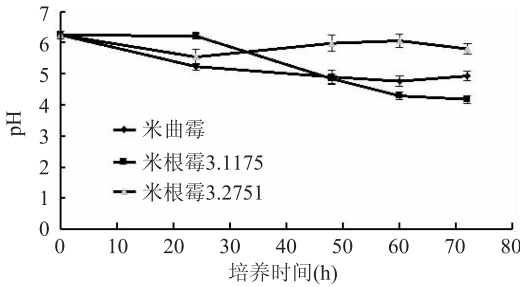


图2 米曲霉和米根霉 3.1175, 米根霉 3.2751 发酵小米的 pH 测定

Fig.2 Test on pH of millet fermented by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* 3.1175 and *Rhizopus oryzae* 3.2751 at different incubation period

酵时间增加,小米蛋白不断被水解,释放出大量的游离氨基酸。发酵至 72h 时,米曲霉与米根霉 3.2751 发酵的小米氨基酸态氮含量分别增加了 380.7% 与 471.2%,有显著的升高。前人^[12]研究表明,米曲霉在发酵蚕豆时氨基酸态氮和还原糖均有所提高,与本文结论相同。米根霉 3.1175 则增加了 208.1%。

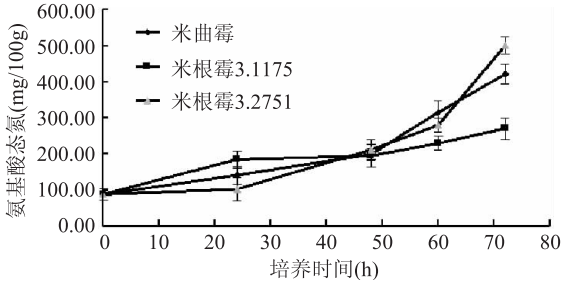


图3 米曲霉和米根霉 3.1175, 米根霉 3.2751 发酵小米氨基酸态氮含量

Fig.3 Free amino acids nitrogen of millet fermented by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* 3.1175 and *Rhizopus oryzae* 3.2751 at different incubation period

2.3 发酵对小米还原糖含量的影响

小米中主要的可食部分是碳水化合物,含量为 74.62%^[1]。如图 4 所示,在三株真菌的发酵过程中,米曲霉与米根霉 3.2751 发酵的小米测得还原糖的含量在 24h 后快速上升,但米根霉 3.1175 发酵的小米测得还原糖的含量较另两株菌上升略少。其中,米曲霉可在发酵过程中产生糖化酶,淀粉酶,纤维素酶等^[12]。在发酵至 60h 时,米曲霉中还原糖含量达到最大值,米根霉 3.2751 在发酵 48h 后测得还原糖含量基本不变,此时米根霉 3.1175 发酵的小米测得还原糖含量开始上升。发酵 72h 时,米曲霉与米根霉 3.2751 发酵的小米中还原糖含量显著高于米根霉 3.2751 发酵的小米中还原糖含量。

2.4 发酵对小米 γ -氨基丁酸含量的影响

GABA 是目前研究较为深入的一种重要的抑制性神经递质,具有很高的药用和经济价值。近期研究发现,通过乳酸菌、酵母菌、曲霉菌等一些安全性高的微生物发酵生产 GABA,其产品具有成本低,产量高及可安全用于食品的优点,并可视作天然功能性食品配料^[13]。如图 5 所示,在小米发酵过程中,米

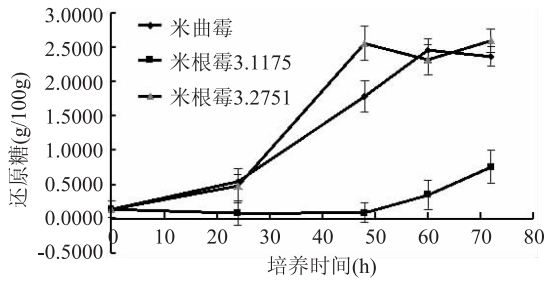


图4 米曲霉和米根霉 3.1175, 米根霉 3.2751 发酵小米还原糖含量

Fig.4 Reducing sugar of millet fermented by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* 3.1175 and *Rhizopus oryzae* 3.2751 at different incubation period

根霉 3.1175,米根霉 3.2751 对 γ -氨基丁酸含量没有显著影响,发酵后含量与发酵前基本持平。在米曲霉发酵的过程中,小米的 γ -氨基丁酸显著升高,在 48h 时达到最大值,之后基本维持不变。说明采用米曲霉发酵对小米中 γ -氨基丁酸含量有较大的影响,可用于开发富含 γ -氨基丁酸的功能性食品。

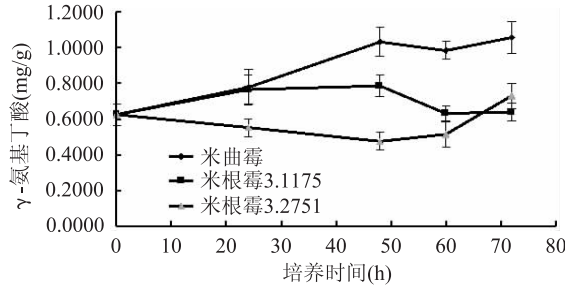


图5 米曲霉和米根霉 3.1175, 米根霉 3.2751 发酵小米 γ -氨基丁酸含量

Fig.5 γ -Aminobutyric Acid of millet fermented by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* 3.1175 and *Rhizopus oryzae* 3.2751 at different incubation period

3 结论

通过对三株真菌发酵小米并研究其营养成分变化及影响发现,米曲霉和米根霉 3.2751 均可将淀粉等大分子物质转化成有机酸。米曲霉与米根霉 3.2751 在发酵至 72h 时,小米氨基酸态氮含量分别增加了 380.7% 与 471.2%,有显著的升高。米曲霉与米根霉 3.2751 发酵的小米中还原糖含量显著高于米根霉 3.1175 发酵的小米中还原糖含量。米曲霉发酵的小米所含 γ -氨基丁酸的含量升高较大,而米根霉 3.1175 和米根霉 3.2751 对于此指标没有显著性影响。

参考文献

- [1] 王勇.小米的营养价值及内蒙古小米生产加工现状[D].呼和浩特:内蒙古大学,2010.
- [2] 李静,谭海刚,王莹.发酵型小米奶的研制[J].食品工程,2008,1:33-34.
- [3] 咕殿星,舒小丽,等.稻米蛋白质研究与利用[M].北京:农业出版社,2009:63-64.
- [4] 王惠玲,史小峰.传统发酵豆制品 γ -氨基丁酸含量分布研

(下转第 172 页)

号花生产生的发根的培养条件进行了优化。研究表明,MS 为最适的基本培养基,蔗糖含量为 1.5%、氮源含量同标准 MS 培养基、磷酸盐为 3.75mmol/L、初始 pH 为 6.1 时可以促进发根的生长;添加 NAA、6-BA、IBA 等激素抑制发根的生长。100 μ mol/L SA 和 100mg/L 酵母提取物分别对发根胞内和胞外合成白藜芦醇有一定作用,其中 SA 可极大地增加培养液中白藜芦醇苷的合成量,但需要进一步研究其最适添加量。

参考文献

- [1] 史丽.白藜芦醇的生物活性研究进展[J].食品与药品,2006,8(11A):5-8.
- [2] 苗晓燕,于树宏,沈银柱,等.利用基因转化提高虎杖毛状根中活性成分的含量[J].药学报,2007,42(9):995-999.
- [3] 闻玉莉,杨世海.罗勒毛状根的诱导及培养[J].安徽农业科学,2010,38(4):1727-1730.
- [4] Bensaddek L, Gillet F, Saucedo JE, et al. The effect of nitrate and ammonium concentrations on and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots[J]. J Biotechnology, 2001, 85(1): 35-40.
- [5] 许铁峰,张汉明,丁如贤,等.粟米草毛状根的研究[J].第二军医大学学报,1999,20(10):764-766.
- [6] 万瑞晨,崔红.商陆发状根生长动力学研究[J].河南科学,2005,23(2):214-217.
- [7] 于荣敏,马娜,严春艳,等.外源激素对何首乌毛状根生长及蒽醌类成分生物合成的影响[J].生物工程学报,2006,22(4):620-623.
- [8] Medina B F, Jose Condori, Agnes M Rimando, et al. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut[J]. Phytochemistry, 2007, 68:1992-2003.
- [9] Kim J S, Lee SY, Park SU. Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains [J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 17:3785-3787.
- [10] 刘杰,任艳,张宗申,等.花生毛状根诱导及其体外培养[J].安徽农业科学,2012,40(6):3229-3233.
- [11] 蔡国琴,李国珍,叶和春,等. Ri 质粒转化的青蒿素发根培养及青蒿素的生物合成[J].生物工程学报,1995,11(4):315-320.
- [12] 李翠芳,王芳,麻浩,等.培养基及温度对新疆紫草毛状根生长的影响[J].新疆农业科学,2009,46(5):1117-1120.
- [13] 张兴,刘晓娟,吕巧玲,等.毛状根生产次生代谢产物的研究进展[J].化工进展,2007,26(9):1228-1232.
- [14] 许铁峰,张汉明,丁如贤,等.粟米草毛状根的研究[J].第二军医大学学报,1999,20(10):764-766.
- [15] 于树宏,刘传飞,李玲,等.野葛毛状根的离体培养与异黄酮生产[J].植物生理与分子生物学报,2002,28(4):281-286.

(上接第 164 页)

Chemistry, 2008, 106:1004-1013.

- [6] A Karayannidou, E Makri, E Papalamprou, et al. Limited proteolysis as a tool for the improvement of the functionality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates produced by seeds or industrial by-products (solvent cake) [J]. Food Chemistry, 2007, 104:1728-1733.
- [7] Guanli Zhao, Yan Liu, Mouming Zhao, et al. Enzymatic

hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4):1438-1443.

- [8] D Spellman, E McEvoy, G O`Cuinn, et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis [J]. International Dairy Journal, 2003, 13(6):447-453.

(上接第 167 页)

究[J].粮食与食品工业,2009,16(5):43-49.

- [5] 姚惠源. 稻米深加工[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004:96.
- [6] 马力. 食品化学与营养学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007:32.
- [7] G L Miller. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3):426-428.
- [8] 廖周华,陈铭志,李彩娟,等. 麦麸提取 γ -氨基丁酸工艺的优选[J]. 亚热带农业研究, 2010, 6(4):267-270.
- [9] 张利. 国际饮料分析方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社,

1992:109.

- [10] 姜照,杜金华,孙文涛,等. 发酵温度对发酵玉米醪中总酸及主要微生物的影响[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(6): 87-91.
- [11] 白鹏,刘红英,薛长湖,等. 米曲霉发酵对鲍鱼中氨基酸态氮含量的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(26): 16448-16449.
- [12] 夏明忠. 蚕豆菜用栽培及加工利用[M]. 四川: 四川科学技术出版社, 2006:92.
- [13] 刘志强,肖翔,周立平. 红曲霉与乳酸菌混合发酵产 γ -氨基丁酸工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2011(3):113.