传统酵子中产香酵母菌的分离·鉴定及发酵香气的检测

付娜[1,2],王锡昌[1*],杜毅[2],黄健[2]　(1.上海海洋大学食品学院,上海 201306;2.爱普香料集团股份有限公司,上海 201809)

摘要　[目的]从酵子中筛选出发酵香气较好的菌种,使其发酵产物能增强发酵面制品风味。[方法]通过平板划线分离法,从传统酵子中分离出1株酵母样真菌,对其形态学特征及18S rDNA区序列进行分析,采用气相色谱-质谱(GC-MS)法对该菌株糊化小麦淀粉发酵产生的挥发性香气成分进行检测。[结果]被命名为FN001的该菌株属于*Wickerhamomy cesanomalus*,该酵母菌发酵产生的香气组分主要为酯类、醇类和酸类,包括乙醇、乙酸乙酯、丁醇、丁酸乙酯、乙酸丁酯、丁酸丁酯、苯乙醇、丁酸、乙酸等,其中,乙醇的相对百分含量高达20.33%、乙酸乙酯14.52%、丁醇14.51%、乙酸丁酯13.90%。[结论]利用此菌株发酵可为发酵面制品提供较浓郁的香气来源。

关键词　酵子;异常威克汉姆酵母;气相色谱-质谱联用法
中图分类号　TS201.3　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　0517-6611(2016)32-0089-03

Isolation and Identification of Aroma-producing Yeast from Traditional Jiaozi and Detection of Its Fermentation Aroma

FU Na[1,2], WANG Xi-chang[1*], DU Yi[2] et al　(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. APPLE Flavor & Fragrance Group Co., Ltd., Shanghai 201809)

Abstract　[Objective] To screen better fermented aroma strains from Jiaozi, and to enhance the flavor of fermented flour products. [Method] A strain of yeast was isolated from Jiaozi by streak plate method. Morphological characteristics and 18S rDNA analysis revealed that it was named as strain FN001. The major volatile compounds produced by the strain were identified by gas chromatography-mass spectrometry, which were esters, alcohols and acids. They included ethanol, ethyl acetate, butanol, ethyl butyrate, butyl acetate, butyl butyrate, phenethyl alcohol, butyrate and acetic acid. Among them, relative content of ethanol was as high as 20.33%, those of ethyl acetate, butanol and butyl acetate were 14.52%, 14.51% and 13.90%, respectively. [Conclusion] Strain FN001 was used to provide a rich aroma of fermented products.

Key words　Jiaozi; *Wickerhamomycesanomalus*; GC-MS

冷冻面团的应用为发酵面食制品工业化、标准化、连锁化生产创造了条件[1]。其中,发酵剂是必不可少的。酵子是一种多菌发酵剂,含有大量能够产生风味物质的微生物,赋予发酵面制品特殊风味[2],但是酵子的发酵力较弱,需要消耗较长的发酵时间。要想在适应工业化的过程中达到丰富发酵面制品口感的效果,可将酵母发酵产香过程单独进行,而菌种的分离与培养会使研究工作更精细化、具体化。

在研究发酵产香的微生物中,酵母发酵产香的报道较为常见。在以往研究中,李锐等[3]研究了不同来源酿酒酵母对柑橘果酒香气成分的影响,付俊淑等[4]对分离出的酵母菌菌株进行分子鉴定和挥发性香气的检测分析,廖永红等[5]对产香酵母和其发酵香气进行了研究。笔者从酵子中筛选出1种产香能力较好的酵母菌,并以筛选出的酵母菌为研究对象,鉴定其种属,且在糊化淀粉溶液下进行发酵,从而得出一种可以改善发酵面团风味的辅料,为冷冻面团制品风味改良提供技术支撑。

1　材料与方法

1.1　材料　传统酵子,采自河南省商丘市,酵母样真菌FN001分离于此传统酵子。7890A气相色谱仪、5975质谱仪,Agilent公司;固相微萃取装置及50/30 μm DVB/CAR/PDMS萃取头,Supelco公司。

1.2　方法

1.2.1　酵母样真菌的筛选。分离培养基与纯化培养基为PDA和YPD培养基[6]。将酵子碾碎后取0.1 g溶于无菌水中用无菌玻璃棒搅拌均匀并静置0.5 h,取0.5 mL溶液接种到平板上,置于28 ℃恒温培养箱中培养,当平板上长出菌落时,用接种环挑取菌落,连续划线传代培养几次,即得纯化的菌株,选出发酵香气较浓的菌种。

1.2.2　18S rDNA的测定。将分离出的酵母样真菌送至上海美吉生物医药科技有限公司进行18S rDNA测定。根据供试菌株的序列,在GenBank数据库中分别进行同源序列搜索。

PCR反应条件:采用三温度点法,双链DNA在95 ℃下保持30 s变性,再迅速冷却至55 ℃保持30 s,引物退火并结合到靶序列上,然后快速升温至72 ℃并保持40 s,在*Taq*DNA聚合酶的作用下,使引物链沿模板延伸。循环次数为35次。

1.2.3　酵母菌发酵。将活化好的酵母菌株接种到4%的蔗糖溶液中,接种量为5.1×10^6个/mL,当酵母菌达到5.0×10^7个/mL时,加入含水量为91%的糊化小麦淀粉溶液中,于28 ℃下通气培养,72 h发酵后取样并进行上机检测香气成分。

1.2.4　香气物质提取。精确量取10 mL发酵液放入15 mL顶空瓶中,萃取温度为60 ℃,用萃取头萃取40 min,进样进行气相色谱-质谱(GC-MS)分析。

1.2.5　GC-MS分析条件。色谱柱为DB-5MS(30 m×0.25 mm,0.5 μm);程序升温为40 ℃保持1 min,以6 ℃/min升至100 ℃,以3 ℃/min升温至200 ℃,以10 ℃/min升温至210 ℃,保持3 min。进样口温度250 ℃,检测器温度250 ℃,无分流进样。载气,高纯He(99.999%);载气流速1.0 mL/min。

电离方式EI;电子能量70 eV;离子源温度230 ℃,全扫描模式,质量扫描范围为40~600 u。

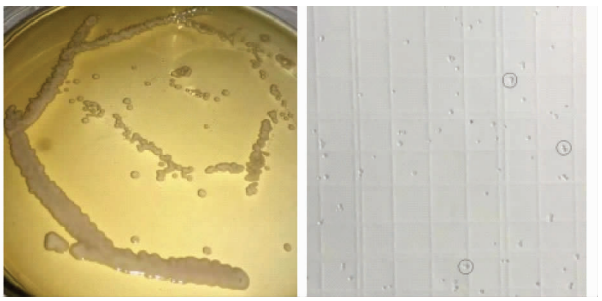
1.2.6　香气成分的分析。用气相色谱-质谱-计算机联用仪进行分析鉴定。分析结果运用计算机谱库(NIST08和WILEY7)进行初步检索及资料分析,再结合文献进行人工

基金项目　国家自然科学基金项目(31271900)。
作者简介　付娜(1985-),女,河南商丘人,博士,从事食品营养与风味化学研究。*通讯作者,教授,博士,从事食品营养与风味研究。
收稿日期　2016-09-09

谱图解析,确认香气物质的各化学成分,并用气相色谱峰面积归一化定量计算出各香气成分的相对含量。

2 结果与分析

2.1 FN001 菌株的培养和形态特征 将 FN001 菌株培养于 PDA 培养基上,于 28 ℃培养 2 d 后,菌落为圆形,乳白色,质地均匀,边缘整齐,表面光滑、湿润、黏稠、易挑取,并散发出发酵香气,光学显微镜下细胞呈球形,进行出芽生殖(图 1)。



注:"o"内表示出芽生殖。

Note: o indicated gemmation.

图 1 酵母菌的菌落形态与繁殖方式

Fig. 1 Colony morphology and propagation mode of FN001

2.2 18S rDNA 检测结果 随着现代生物学技术的发展,染色体核型分析、核糖体内转录间隔区分析(ITS 序列)、核糖体分析和肌动蛋白基因分析等将取代传统的酵母分类方法[7-9]。该试验对分离出的酵母真菌 FN001 进行 18S rDNA 测定,其 PCR 扩增胶图见图 2。

试验得出 FN001 真菌的拼接序列:TTTACTACTTGGTATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAACCCCGACTGTTTGGAAGGGGTGTATTTATTAGATAAAAAATCAATGCTCTTCTGAGCTCTTTGATGATTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGACTTCGTGTCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTTTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAGGGCCCATTTGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATGTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGCTTGGTCAGCCGGTCCGCTTTTTTGCGTGTACTGGTCCTGACCGAGCCTTTCCTTCTGGCTAACCTGTCTCTCGGGGCAGGCGAACCAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTTTGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTTGGTTCTATTTTGTTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCGGGGGCATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGTGGTGTTTTTTTATATACCCCACTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACCTTAACCTACTAAATAGTGCGATTAGCTTTTGCTGATTTTGACACTTCTTAGAGGGACTATCGATTTCAAGTCGATGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACGGAGCCAGCGAGTAATAACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGA。

样本序列比对结果显示:异常威克汉姆酵母 18S 核糖体 *RNA* 基因的部分序列;内转录间隔区 1,5.8S 核糖体 RNA 基因;内转录间隔区 2,全序列;和 28S 核糖体 RNA 基因的部分序列最大得分 2 856,总得分 2 856,查询范围 100%,E 值0.0,识别率 100%。经鉴定该菌株为异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomycesanomalus*)。

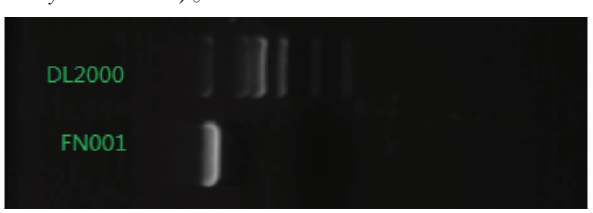


图 2 PCR 扩增胶图

Fig. 2 Plastic figure of PCR amplification

2.3 发酵香气检测 考虑到工业应用及筛选此菌株的目的,该研究采用 4% 的蔗糖溶液为活化酵母的溶液,以糊化小麦淀粉为发酵底物,发酵过程中产生的挥发性成分经质谱检测,结果见表 1。

由表 1 可知,筛选的酵母在糊化小麦淀粉溶液中发酵 72 h后,共检测出香气组分 22 种,其中醇类 5 种,酯类 11 种,酸类 2 种,另外还含有甘油、苧烯、苯乙醛与乙基麦芽酚。

醇类相对百分含量为 42.32%,分别是乙醇、丁醇、异戊醇、己醇、苯乙醇。其中乙醇和丁醇的相对百分含量最高,为 20.33%、14.50%,且乙醇具有特殊香味,微甘,并伴有刺激的辛辣滋味,而丁醇具有酒味。

酯类相对百分含量为 49.39%,分别为乙酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸丁酯、乙酸异戊酯、γ-丁内酯、丁酸丁酯、丁酸异戊酯、丁酸-2-甲基丁酯、水杨酸甲酯、乙酸苯乙酯、3-苯丙酸乙酯。其中乙酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸丁酯与丁酸丁酯的含量较高,分别为 14.52%、10.17%、13.90% 和 8.06%,乙酸乙酯具有强烈的醚似的气味,清灵、微带果香的酒香,丁酸乙酯、丁酸丁酯和乙酸丁酯具有使人愉悦的果香。另外,含量较少的酯类有乙酸异戊酯、γ-丁内酯、水杨酸甲酯、乙酸苯乙酯、3-苯丙酸乙酯。酵母在发酵过程形成的酯类,可以由有机酸(乙酸、乳酸等)与高级醇通过酯化反应产生[10]。

酸类相对百分含量为 6.50%,分别为乙酸(3.22%)和丁

酸(3.28%),乙酸具有刺激的辛辣味,丁酸带有难闻的气味。

除以上三大类物质之外,发酵香气成分中还含有甘油、苧烯、苯乙醛、乙基麦芽酚,相对百分含量分别为 0.53%、0.56%、0.17%和 0.53%。其中,苯乙醛具有类似风信子的香气,稀释后具有水果的甜香气,乙基麦芽酚的溶液具有甜香味。

在以往研究发酵产香的微生物中,酵母发酵产香的报道较为常见,高健等[6]从莴苣中分离出 1 株产香酵母,该酵母发酵产生的香气组分主要是烯类和醇类,其中柠檬烯的相对含量高达 20%。该研究从酵子中分离到的 FN001 菌株发酵糊化淀粉产生的香气中,香气组分主要是醇类与酯类,占总香气物质含量的 80%以上。

表 1　酵母发酵 72 h 后的香气成分及相对含量

Table 1　Aromatic compositions and their relative contents in the yeast fermentation after 72 h

种类 Type	化合物名称 Name of compound	分子式 Molecular formula	相对分子量 Relative molecular weight	相对百分含量 Relative percentage content//%	气味描述 Odor description
醇类	乙醇	C_2H_6O	46	20.33	具有特殊香味,微甘,并伴有刺激的辛辣滋味
Alcohols(5 种)	丁醇	$C_4H_{10}O$	74	14.51	有酒味
	异戊醇	$C_5H_{12}O$	88	5.03	有不愉快的气味
	己醇	$C_6H_{14}O$	102	0.42	食用香料,主要用于配制椰子和浆果类香精
	苯乙醇	$C_8H_{10}O$	122	2.03	具有清甜的玫瑰样花香
酯类 Esters(11 种)	乙酸乙酯	$C_4H_8O_2$	88	14.52	有强烈的醚似的气味,清灵、微带果香的酒香
	丁酸乙酯	$C_6H_{12}O_2$	116	10.17	具有水果的香味
	乙酸丁酯	$C_6H_{12}O_2$	116	13.90	愉快的果香气味
	乙酸异戊酯	$C_7H_{14}O_2$	130	0.97	较强的新鲜果香,稍甜,有类似熟香蕉、生梨和苹果样的气味
	γ-丁内酯	$C_4H_6O_2$	86	0.25	有独特的芳香气味
	丁酸丁酯	$C_8H_{16}O_2$	144	8.06	有水果香气
	丁酸异戊酯	$C_9H_{18}O_2$	158	0.58	具有水果的香味
	丁酸-2-甲基丁酯	$C_9H_{18}O_2$	158	0.25	呈新鲜水果香气,天然存在于草莓中
	水杨酸甲酯	$C_8H_8O_3$	152	0.11	无色至淡黄色液体,有药草的特殊气味,味甜而辣
	乙酸苯乙酯	$C_{10}H_{12}O_2$	164	0.39	甜的,玫瑰花香,带有粉香的蜂蜜样香气,类似苹果样的果香
	3-苯丙酸乙酯	$C_{11}H_{14}O_2$	178	0.19	呈甜的水果和蜂蜜似花香香气
酸类 ACids(2 种)	乙酸	$C_2H_4O_2$	60	3.22	具有特殊香味,微甘,并伴有刺激的辛辣味
	丁酸	$C_4H_8O_2$	88	3.28	丁酸带有难闻的气味,味先辣后甜,与乙醚类似
其他 Others	甘油	$C_3H_8O_3$	92	0.53	有暖甜味
	苧烯	—	—	0.56	—
	苯乙醛	C_8H_8O	120	0.17	具有类似风信子的香气,稀释后具有水果的甜香气
	乙基麦芽酚	$C_7H_8O_3$	140	0.53	有芬芳香气的白色晶状粉末,溶于溶液后均保持其甜香味

3　结论与讨论

该研究从酵子中分离到 1 株酵母样真菌,命名为 FN001,结合 18S rDNA 序列分析,该菌株被鉴定为 *Wickerhamomycesanomalus*。鉴于菌株培养时所发出的发酵香气及其工业应用,该研究采用 GC-MS 手段,检测了菌株发酵糊化淀粉产生的各种挥发性成分。结果表明,菌株产生的挥发性成分大多为醇、酸、酯类,且酯类和醇类相对百分含量较高,分别为 49.39%和 42.32%。因此,该菌株的分离为利用微生物高效生产丰富发酵面制品风味物质提供了较好的研究材料。

参考文献

[1] 王文果. 冷冻面团的研究与发展[J]. 四川食品与发酵, 2006, 42(3): 15-19.

[2] 杨敬雨, 刘长虹. 中国传统酵子的工业化[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(2):164-166.

[3] 李锐, 冯奎, 吴婧, 等. 不同来源酿酒酵母对柑橘果酒香气成分的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 206-213.

[4] 付俊淑, 庄世文, 徐丹丹, 等. 酵母分离株分子鉴定及其挥发性香气成分检测分析[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(2): 44-48.

[5] 廖永红, 沈晗, 石文娟, 等. 产香酵母碳源利用及发酵产香特性初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(2): 1-6.

[6] 高健, 许爱清, 唐新科. 一株莴苣内生产香酵母菌的分离、鉴定及挥发性香气成分分析[J]. 食品科学, 2011,32(23):162-166.

[7] WANG S A, BAI F Y. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., ayeast species from tree bark[J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2008, 58(Pt 2): 510-514.

[8] ESPOSTO M C, COGLIATI M, TORTORANO A M, et al. Electrophoretic karyotyping of *Cryptococcus neoformans* AD-hybrid strains[J]. Mycoses, 2009, 52(1): 16-23.

[9] DANIEL H M, SORRELL T C, MEYER W. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of Candida species and their teleomorphs[J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2001, 51(Pt4): 1593-1606.

[10] 李华, 王华, 袁春龙, 等. 葡萄酒工艺学[M]. 北京: 科学出版社, 2007:75-80.