

一株呈果香风味产香菌株的筛选鉴定及应用

闫冬妮,叶佳玲,肖尧,张力瀚,余森*

(成都大帝汉克生物科技有限公司,四川 成都 611137)

摘要:该研究从地方特色水果果肉和果皮中分离菌株,通过感官嗅闻法筛选香气特征及强度明显的产香菌株,通过形态学观察、生理生化实验及分子生物学技术对筛选菌株进行鉴定。对该菌株进行耐受性分析、高密度培养,并与安琪商用酵母按干质量比例2:1混合发酵山楂果渣饲料。采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用(HS-SPME-GC-MS)法检测发酵产物香气成分含量。结果表明,分离筛选获得1株呈浓郁果香风味的产香菌株DDC 008,其鉴定为地丝双足囊菌(*Dipodascus macrosporus*),其发酵48 h的 β -苯乙醇产量为 (100 ± 4.96) mg/L。菌株DDC 008高密度培养30 h可得到75 g/L细胞干质量。混菌发酵样品中共检测出31种香气成分,总含量为126.084 mg/L,与安琪酵母单菌发酵结果相比,混菌发酵山楂果渣饲料的挥发性香气物质总量较增加25.6%,月桂酸乙酯、软脂酸乙酯和丁香酚含量分别提高了26.7%、70.8%和68.5%。因此,地丝双足囊菌DDC 008在改善和丰富果味发酵食品或饲料方面将具有广阔的应用前景。

关键词:产香微生物;双足囊菌;混菌发酵;果渣发酵;香气成分

中图分类号:TS261.2 文章编号:0254-5071(2025)10-0142-07 doi:10.11882/j.issn.0254-5071.2025.10.020

引文格式:闫冬妮,叶佳玲,肖尧,等.一株呈果香风味产香菌株的筛选鉴定及应用[J].中国酿造,2025,44(10):142-148.

Screening and identification of aroma-producing yeast strain with fruity flavor and its application

YAN Dongni, YE Jialing, XIAO Yao, ZHANG Lihan, YU Miao*

(Dad Hank (Chengdu) Biotech Corp, Chengdu 611137, China)

Abstract: Strains were isolated from the flesh and peel of local specialty fruits, and the strains with obvious aroma characteristics and intensity were screened by sensory sniffing. The screened strains were identified by morphological observation, physiological and biochemical experiments, and molecular biology techniques. The strains were subjected to tolerance analysis and high-density cultivation, and the strain was used for mixed fermentation with Angel commercial yeast in a dry mass ratio of 2:1 to ferment hawthorn fruit residue feed. The aroma components and contents of the fermentation products were analyzed by HS-SPME-GC-MS. The result showed that an aroma-producing strain DDC 008 with rich fruity flavor was selected and identified as *Dipodascus macrosporus*. The yield of β -phenylethanol after 48 h fermentation was (100 ± 4.96) mg/L. High-density cultivation of strain DDC 008 could result in a cell dry mass of 75 g/L. A total of 31 aroma compounds were detected in the mixed fermentation samples, with a total content of 126.084 mg/L. Compared with the single strain fermentation results of Angel yeast, the total volatile aroma compounds in the mixed fermentation hawthorn fruit residue feed increased by 25.6%, and the contents of ethyl laurate, ethyl palmitic acid and eugenol increased by 26.7%, 70.8% and 68.5%, respectively. Therefore, *D. macrosporus* DDC 008 might have a broad application in improving and enriching fruity flavor fermented foods or feed in the future.

Key words: aroma-producing microorganism; *Dipodascus macrosporus*; mixed fermentation; fruit residue fermentation; aroma component

微生物赋予了发酵食品独特的风味与营养成分,是塑造其感官质量与营养价值的关键,而产香酵母更是扮演了重要角色^[1]。产香酵母属于非酿酒酵母,在生长代谢过程能够产生以酯类为主,还有醇、酸、醛、酮、酚及萜类等挥发性风味物质^[2],种类广泛,包括毕赤酵母属(*Pichia*)、假丝酵母属(*Candida*)、有孢汉逊酵母属(*Hanseniaspora*)等^[3-4]。产香酵母应用领域广泛,常应用于白酒^[5]、酱油^[6]、腌菜^[7]等发酵食品领域,不少研究者还将产香酵母应用于发酵饲料方面^[8],而发酵果渣饲料是一个重要的研究方向,利用果渣发酵饲料既可以减少果渣资源的浪费,又可以为畜牧养殖提供非常规绿色饲料资源,添加至畜禽日粮中还可改善幼

崽肠胃功能,促进消化吸收^[9]。

产香酵母是果渣饲料发酵过程中的主要功能微生物,与其他菌种协同作用,提高其营养价值,改善风味,提升适口性^[10]。刘芸^[11]将筛选的优势酵母混菌发酵苹果渣原料,降低了发酵产物中的果胶、粗纤维等抗营养因子含量,提高了粗蛋白含量;梅华迪等^[12]将黑曲霉、热带假丝酵母、植物乳杆菌和枯草芽孢杆菌按1:1:1:1比例发酵柑橘渣,发现柑橘渣较多苦味物质如柚皮苷、柠檬苦素降低,粗蛋白质含量显著增加;杨靖等^[13]利用筛选的产香酵母发酵杏果渣,发酵产物呈花果香,挥发性香味物质总量达135 μ g/g。因此筛选发酵性能优良的酵母菌种对提升果渣饲料的感

收稿日期:2025-01-06 修回日期:2025-06-23
基金项目:大帝汉克生物科技有限公司产香酵母项目
作者简介:闫冬妮(1990-),工程师,硕士,研究方向为微生物与发酵工程。
*通讯作者:余森(1987-),工程师,博士,研究方向为动物营养与采食调控。

官品质和营养价值具有重要意义。

该研究通过传统培养方法分离筛选具有呈浓郁果香的产香菌株,对其进行分子生物学鉴定,并对其进行高密度培养,与安琪商用酵母混合发酵山楂果渣饲料,研究其对香气成分的影响,旨在为发酵风味好、适口性好、营养丰富的山楂果渣饲料提供理论依据和菌株资源储备。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料与菌株

成熟苹果:陕西扶风县市售;耙柑:四川中江县市售;葡萄:成都市售;安琪香霸酵母:安琪酵母股份有限公司。

1.1.2 试剂

4-辛醇(色谱纯):北京索莱宝科技有限公司;酵母菌脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)提取试剂盒、无水乙醇、甘油、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、硫酸锌、硫酸铁、硫酸铜、硫酸锰、硫酸镁、生物素、泛酸钙、吡哆醇(均为分析纯):上海生工生物工程股份有限公司;蛋白胨、葡萄糖、酵母浸粉、玉米浆(均为生化试剂):北京奥博星生物技术有限责任公司;山梨醇、木糖、蔗糖、草糖、麦芽糖、柠檬酸、乳糖(均为分析纯)、尿素生化鉴定管:广东环凯微生物科技有限公司。

山楂干渣粉、麸皮、豆粕粉:大帝汉克生物科技有限公司。

1.1.3 培养基

酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YPD)液体培养基:葡萄糖20 g/L、蛋白胨20 g/L、酵母粉10 g/L,初始pH 5.0~5.5,115℃灭菌15 min。

YPD固体培养基:YPD液体培养基中添加琼脂20 g/L。

发酵培养基:葡萄糖40 g/L、酵母浸粉1.5 g/L、玉米浆15 g/L、磷酸二氢钾1 g/L、硫酸镁0.5 g/L、生物素0.01 mg/L、泛酸钙0.02 mg/L、吡哆醇0.2 mg/L、硫酸锌10 mg/L、硫酸铁12 mg/L、硫酸铜12 mg/L、硫酸锰10 mg/L,初始pH 5.0~5.5,115℃灭菌15 min。

果渣发酵培养基:山楂干渣粉500 g/L、麸皮100 g/L、豆粕粉100 g/L、磷酸氢二钾20 g/L、自来水250 mL/L,100℃灭菌30 min。

1.2 仪器与设备

C1000型聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪、DYY-6C型电泳仪、Gel Doc EZ凝胶成像仪:美国伯乐公司;UV2450紫外分光光度计:日本岛津公司;CX33显微镜:日本奥林巴斯株式会社;50 L搅拌式发酵罐:镇江东方生物工程设备技术有限公司;Agilent-7890A气相色谱-5975C质谱联用仪、DB-17ms气相色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm):美国Agilent公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株的分离筛选

从产自陕西扶风县的成熟苹果、四川中江县的耙柑以及成都本地葡萄中取样,3种水果分别取果肉和果皮,置于无菌锥形瓶中,28℃培养72 h,加50 mL无菌水制成悬液。此菌悬液作为母液梯度稀释至 10^{-6} ,取 10^{-4} ~ 10^{-6} 稀释菌液涂布于富集培养基上,28℃倒置培养48 h,选择酵母菌菌落特征明显的单菌落,进一步划线2~3次,获得纯菌落。将纯化的疑似酵母菌落进行镜检观察,并逐一转接至YPD固体斜面,并进行编号保存,备用。

将筛选菌株接种于YPD培养基中,28℃摇床培养60 h,对筛选菌株发酵液进行嗅闻^[4],并对挥发性香气成分总量进行测定^[15]。

1.3.2 菌株的鉴定

形态学观察:将筛选菌株在YPD固体培养基上划线,并置于28℃条件下培养24 h。培养结束后,观察并记录菌落特征。在载玻片上滴加一滴蒸馏水,用无菌接种环挑取在YPD固体培养基上培养24 h的酵母菌至蒸馏水中,盖上载玻片于显微镜下观察其细胞形态。

生理生化实验:碳源同化实验、氮源同化实验参照杨惠婷等^[16]的方法。

分子生物学鉴定:采用酵母基因组提取试剂盒提取纯化菌株脱氧核糖核酸(DNA)。以酵母DNA为模板,采用真菌18SrDNA通用引物进行PCR扩增。PCR扩增体系(50 μL):模板2 μL、2×Taq Mix 25 μL、正向和反向引物(10 pmol/L)各1 μL、双蒸水(ddH₂O)21 μL。PCR扩增条件:95℃预变性5 min;98℃变性10 s,55℃退火10 s,72℃延伸1 min,29个循环;72℃再延伸5 min,4℃保存。采用0.8%琼脂糖凝胶电泳对PCR扩增产物检测合格后,委托北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。

在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站上用基本局部比对搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)进行同源性比对分析;选取数据库中有代表性的菌株18SrDNA,采用clustalx 1.83软件的Multiple Sequence Alignment程序进行同源性序列比对;采用MEGA7.0软件,以邻接法(neighbour-joining, NJ)构建系统发育树(Bootstrap=1 000)。

1.3.3 生长耐受性分析

将对数期的筛选菌株分别接种于不同葡萄糖质量浓度(20 g/L、40 g/L、70 g/L、100 g/L、150 g/L、200 g/L、300 g/L)、乙醇体积分数(0、2%、4%、6%、8%、10%、12%)、pH(2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)、NaCl质量分数(0、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%)的YPD液体培养基中,初始OD_{600 nm}值为0.1,28℃、200 r/min培养24 h,分别测定OD_{600 nm}值,考察菌株的糖、乙醇体积分数、酸碱以及盐耐受性。

1.3.4 筛选菌株的高密度培养

参考文献[17]的方法,取一环保存于斜面培养基中的菌

株DDC 008,接种于50/500 mL YPD锥形瓶中,28 ℃、200 r/min培养至对数期为一级种子;取一级种子按10%接种量转接至装液量为200 mL/2 000 mL YPD液体培养基中,28 ℃、200 r/min培养至对数期为二级种子;将二级种子液按10%接种量接种至50 L发酵培养基搅拌罐中进行发酵,培养温度28 ℃,pH为5.0,装液量30 L/50 L,初始转速350 r/min,初始通气量30 L/min。采取分批补料培养,流加葡萄糖(200 g/L,115 ℃灭菌15 min),乙醇含量保持在2 g/L以下,每4 h取样,分别测定OD_{600nm}值、发酵液中的葡萄糖和乙醇含量。

1.3.5 筛选菌株与安琪商用酵母混合发酵果渣饲料

按照两种发酵方式,称取①2 g筛选菌株+1 g安琪商用酵母和②3 g安琪商用酵母(干质量)分别接种至果渣发酵培养基,30 ℃培养,每24 h搅拌晾晒,发酵3~4 d结束发酵。将发酵产品置于80 ℃恒温烘干,用粉碎机粉碎成粉末≤100目,得到果渣饲料成品。

1.3.6 挥发性香气成分分析

样品处理:准确称取1.5 g样品,1 g氯化钠于20 mL顶空固相微萃取瓶中,向顶空瓶中加入4 mL超纯水和30 μL 6 250 μg/L 4-辛醇(内标),混匀。70~80 ℃萃取10~15 min,平衡1 min。

气相色谱条件:进样口和检测器温度均为250 ℃,DB-WAX色谱柱(60 m×25 μm×0.25 μm),用高纯氦气(He)作为载气,恒流速为1.5 mL/min。升温程序为初始温度在40 ℃保持3 min,然后以3 ℃/min提高到150 ℃,保持2 min,以

6 ℃/min提高到200 ℃,最后以10 ℃/min提高到230 ℃,保持15 min。采用不分流进样模式。

质谱条件:电子电离(electronic ionization,EI)源,电子能量70 eV,离子源温度230 ℃,四级杆温度150 ℃,扫描范围35~400 amu。

定性与半定量:数据检索,通过计算机对检出的各组分进行检索,以Wiley和美国国家标准与技术研究院(national institute of standards and technology,NIST)为检索谱库进行定性;采用内标法进行定量。

1.3.7 数据分析

使用Microsoft Office Excel 2018处理数据,Origin 2020绘图。

2 结果与分析

2.1 产香酵母的分离筛选

通过菌落形态观察,分离获得4株疑似酵母菌,其中自成都本地葡萄果实分离出2株,四川中江耙柑果皮分离出1株,陕西扶风苹果果皮分离出1株,分别编号为DDC 001、DDC 002、DDC 003和DDC 008,其香气评价结果见表1。由表1可知,采用嗅闻法对菌株进行筛选,结果发现菌株DDC 001呈现出淡淡清香气,香气层次感单一;DDC 002呈现出香蕉风味的果香气,香气富有层次感;DDC 003呈现出明显酒香气,香气层次感单一;DDC 008呈现出苹果风味的果香气,香气浓郁,持续时间较长,结合挥发性香气成分总量测定结果,选择菌株DDC 008开展后续研究。

表1 酵母菌株香气评价
Table 1 Aroma evaluation of the yeast strains

菌株	清香	酒香	果香	香气特征	挥发性香气成分总量/(mg·L ⁻¹)
DDC 001	+			清新的清香味	84.56±4.67
DDC 002			++	柔和的熟香蕉果香味	99.65±10.05
DDC 003		++		明显的酒香味	120.63±7.85
DDC 008			+++	浓郁的熟苹果果香味	160.53±20.79

注:“+”表示气味浓郁程度,“+”越多表示香气越浓郁。

2.2 菌株DDC的鉴定

2.2.1 形态特征观察

菌株DDC 008的菌落形态和细胞形态见图1。

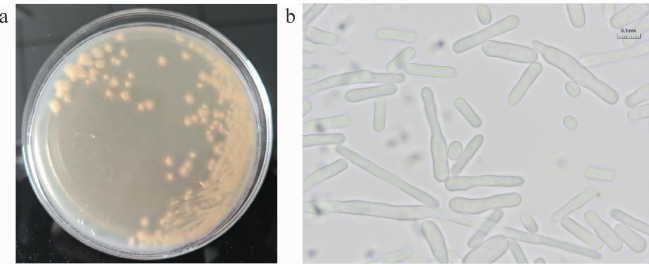


图1 菌株DDC 008的菌落形态(a)及细胞形态(b)
Fig. 1 Colony morphology (a) and cell morphology (b) of strain DDC 008

由图1可知,菌株DDC 008在YPD培养基上为白色、圆形、干燥不透明、不规则边缘有绒毛、不光滑、紧密的平铺菌落,具有典型果香香气;成熟菌体呈长杆状,宽5~7 μm,还有长筒形,末端钝圆或圆形的节生孢子,大小为(5~6 μm)×(8~15 μm)。

2.2.2 生理生化试验

对菌株DDC 008进行生理生化试验,结果见表2。由表2可知,菌株DDC 008可以利用葡萄糖、山梨醇、木糖、蔗糖、蕈糖、柠檬酸和乳糖,但无法利用麦芽糖作为碳源;菌株DDC 008不可利用尿素作为氮源;综合以上生理生化实验结果,对照《酵母菌特征与鉴定手册》和《真菌鉴定手册》初步判定该菌株为酵母类群。

表2 菌株DDC 008的生理生化试验结果
Table 2 Results of physiological and biochemical experiments of strain DDC 008

菌株	葡萄糖	山梨醇	木糖	蔗糖	草糖	麦芽糖	柠檬酸	乳糖	尿素
DDC008	+	+	+	+	+	-	+	+	-

注：“+”表示结果呈阳性，“-”表示结果呈阴性。

2.2.3 分子生物学鉴定

菌株DDC 008的18S rDNA测序结果提交至GenBank数据库,获得基因登录号为SUB14155573。选取相似性较高的基因序列,利用MEGA 7.0构建菌株DDC 008的系统发育树,结果见图2。由图2可知,菌株DDC 008与*Dipodascus macrosporus*相似性最高,系统发育分析归于统一分枝。结合形态学特征,确定为地丝双足囊菌属成员,鉴定为*Dipodascus macrosporus* DDC 008。

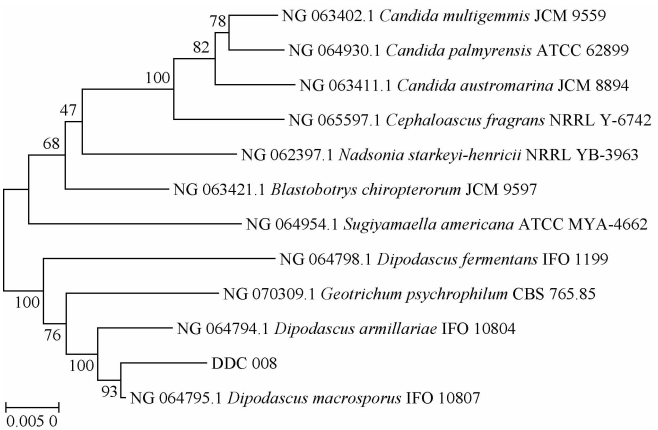


图2 基于18S rDNA基因序列构建的菌株DDC 008系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain DDC 008 based on 18S rDNA gene sequence

2.3 菌株DDC 008发酵液中挥发性风味物质分析

因发酵液挥发性风味成分复杂,种类达150余种,仅分析占比1%以上的挥发性物质,确定菌株DDC 008的产香属性,其培养24 h及48 h的挥发性风味物质测定结果见表3。由表3可知,菌株DDC 008发酵24 h检测到挥发性风味物质总量为132.752 mg/L,其中醇类物质含量最高,约为52.156 mg/L,占比约40%,主要有β-苯乙醇、乙醇、3-甲基-1-丁醇、异丁醇等,β-苯乙醇含量最多,占比约22%,约30 mg/L;酯类物质含量约为35.280 mg/L,占比约30%,主要有乙酸乙酯、醋酸异戊酯、丁酸乙酯、丙酸乙酯、乙酸丙酯等,乙酸乙酯含量最多,占比约20%。菌株DDC 008发酵48 h检测到挥发性物质总量为169.239 mg/L,其中醇类物质含量最高,约为122.847 mg/L,占比约70%,主要为β-苯乙醇、3-甲基-1-丁醇、异丁醇和乙醇等,β-苯乙醇含量最多,占比约59.8%,约100±4.96 mg/L;酯类物质含量约为4.513 mg/L,占比仅3%,主要有醋酸异戊酯、异戊酸乙酯、丁酸异戊酯、异丁酸异戊酯

等。菌株DDC 008在48 h检测到醇类物质总量和β-苯乙醇含量是发酵24 h的2.3倍和3倍多;酯类物质种类在变化且总量减少,乙酸乙酯在48 h未检出,24 h检测到的酯类物质结构简单,48 h的酯类物质结构复杂。

表3 菌株DDC 008培养24 h和48 h的挥发性风味物质含量测定结果
Table 3 Determination results of volatile flavor components contents of strain DDC 008 cultured for 24 h and 48 h

香气类型	化合物	香气描述	含量/(mg·L ⁻¹)	
			发酵24 h	发酵48 h
醇类	β-苯乙醇	玫瑰香,蜂蜜甜香	30.056±1.825	100.028±4.966
	3-甲基-1-丁醇	醇香、醚香、香蕉香	14.561±2.975	20.447±3.861
	乙醇	酒香	5.469±1.238	0.859±0.179
	异丁醇	温和甜香	2.126±0.385	1.541±0.309
	乙酸乙酯	菠萝果香,葡萄、樱桃香	25.840±6.217	-
	醋酸异戊酯	香蕉、生梨、苹果果香	2.736±1.065	1.252±0.726
酯类	丁酸乙酯	菠萝、香蕉、苹果果香,玫瑰香	2.507±0.862	-
	丙酸乙酯	菠萝、葡萄、苹果果香	2.252±0.725	-
	乙酸丙酯	甜果香,蜜糖、香蕉果香	1.945±0.171	-
	异戊酸乙酯	甜果香,青香	-	1.456±0.296
	丁酸异戊酯	果香,甜香	-	0.946±0.195
	异丁酸异戊酯	菠萝果香及甜香	-	0.859±0.114
总量			132.752±23.094	169.239±25.791

注:“-”表示未检出。

β-苯乙醇作为一类高级醇,具有令人愉悦的玫瑰风味特征香气,是产香酵母生长代谢的重要产物。赵运英等^[18]自酱油醪中分离获得一株野生型产香酵母-贝酵母在自然环境中能合成269 mg/L β-苯乙醇;王光路等^[19]从贾湖高温堆积酒醪中分离纯化获得1株库德里阿兹威(氏)毕赤酵母,自然条件下β-苯乙醇产量为2.0 g/L左右;贾丽艳等^[20]筛选得到一株白地霉,可产生果香味、清香味、并夹杂奶香味,其中玫瑰花香的β-苯乙醇占风味物质的28.14%。本研究中的菌株DDC 008在液态发酵时能合成呈花香味、果香味的醇类、酯类物质,48 h合成β-苯乙醇约100±4.96 mg/L,约占风味物质的59.8%,虽与前人研究结果有差距,但菌株DDC 008作为一株产香酵母,可进行后续研究。

2.4 菌株DDC 008耐受性分析

不同因素条件对菌株DDC 008生长代谢的影响见图3。由图3a可知,乙醇对菌株DDC 008生长代谢呈体积分数依赖性抑制,当乙醇体积分数<4%时,菌株保持较高生长活性,当乙醇体积分数>6%时,菌株生长受到显著抑制,当乙醇体积分数>10%时,菌株生长基本停滞。由图3b可知,无盐条件下,菌株DDC 008生长最佳,随着NaCl质量分数增加,吸光度值逐渐降低,当NaCl质量分数>6%时,菌株DDC 008生长代谢明显降低。由图3c可知,菌株DDC 008在葡萄糖质量浓度20~200 g/L范围内生长良好,葡萄糖质量浓度

70 g/L时,菌株生长最好,当葡萄糖质量浓度>300 g/L时,菌株生长代谢降低。由图3d可知,菌株DDC 008随着pH的升高呈先上升后下降的趋势,在pH 3.0~9.0范围内生长良好,最适生长pH为4.0,pH<3.0或>8.0时,菌株生长代谢能力明显下降。综上,菌株DDC 008的糖耐受性较强,酸碱耐受范围较广,乙醇与盐耐受性中等,可进一步研究其发酵性能。

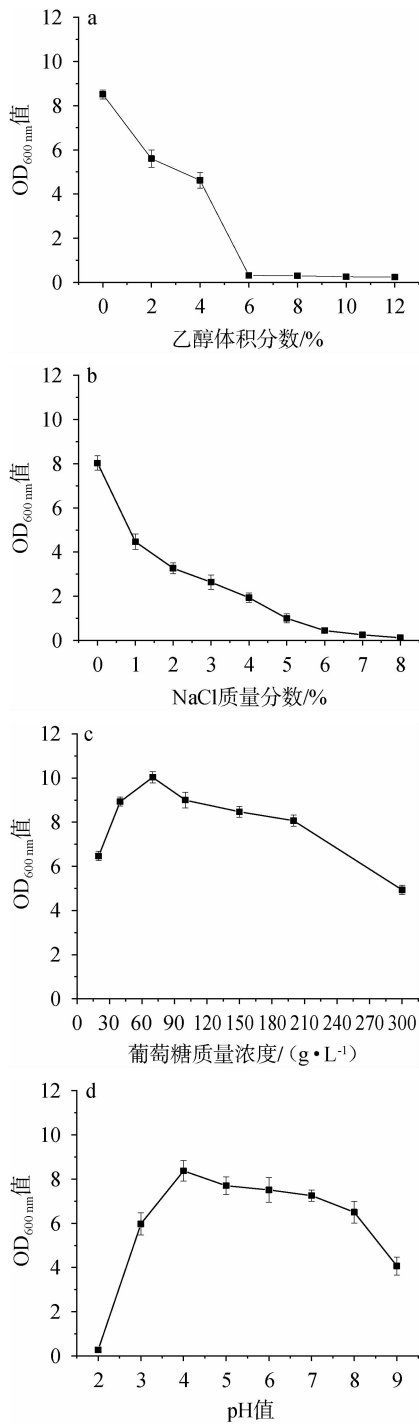


图3 乙醇体积分数(a)、NaCl(b)、葡萄糖(c)和pH(d)对菌株DDC 008生长的影响

Fig. 3 Effect of ethanol volume fraction (a), NaCl (b), glucose (c) and pH (d) on the growth of the strain DDC 008

2.5 菌株DDC 008的高密度培养

菌株DDC 008高密度发酵的过程中各指标的变化见图4。由图4可知,菌株DDC 008发酵10 h,葡萄糖质量浓度降至5 g/L,开始流加碳源,持续供给低浓度葡萄糖,避免产生巴斯德效应,发酵过程中乙醇含量保持在4 g/L以下,菌株DDC 008始终保持较高生长活性。0~4 h为生长延滞期,4~30 h为对数期,生物量与细胞干质量同步快速增长,最大生长速率0.22 h⁻¹,30 h以后菌株开始衰亡,培养32 h终止发酵,此时生物量OD_{600nm}值为110,细胞干质量75 g/L,得到大量菌株DDC 008的菌体细胞。刘云肖等^[21]在可利霉素菌渣大规模培养白地霉,通过添加2.0%葡萄糖和0.5%尿素或0.5%硫酸铵,其生物量增加8.46倍,OD_{600nm}值达到70。LI X等^[22]在搅拌罐中采用分批补料方式培养产香酵母-耐盐酵母鲁西酵母,葡萄糖耗尽后开始指数饲养获得细胞干质量72.86 g/L。本研究结果与上述文献中的高密度培养产香酵母结果相似,菌株DDC 008作为一种产香酵母,展现出不俗的发酵性能,可以通过高密度发酵得到大量菌体细胞,以用于大规模的固态发酵果渣饲料。

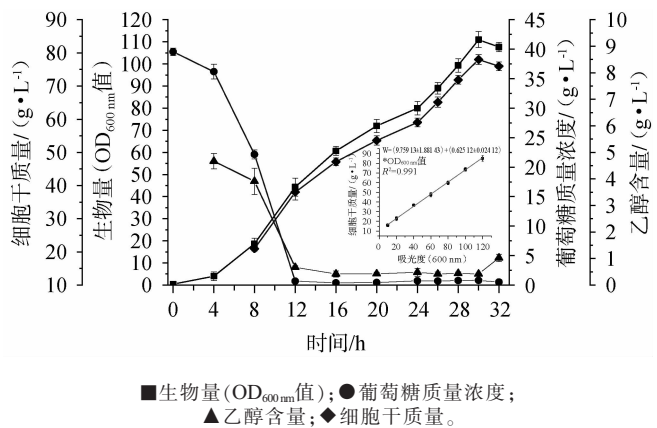


图4 菌株DDC 008的高密度培养结果

Fig. 4 High-density cultivation results of the strain DDC 008

2.6 菌株DDC 008与安琪商用酵母混菌发酵对山楂果渣饲料挥发性香气成分的影响

分别采用安琪商用酵母进行单菌发酵,以及菌株DDC 008与安琪商用酵母混菌(2:1)发酵山楂果渣饲料,考察其对挥发性香气成分的影响,结果见表4。由表4可知,共测出40种香气成分,单菌发酵样品中共检测出35种香气成分,混菌发酵样品中共检测出31种挥发香气成分,两种发酵样品中共有香气成分为27种,特有香气成分为13种。其中,11,14,17-顺-二十碳三烯酸甲酯、(E)-反式香兰基丙酮、乙酸正辛酯、乙酸壬酯、十九烷与2,3-丁二醇6种化合物是单菌发酵样品中未检出的,而亚麻酸甲酯、E-β-法尼烯、辛酸、2,4,6-三甲基辛烷、δ-己内酯、丙酸苯乙酯、3-糠酸甲酯、焦黏酸酐、戊醇9种化合物是混菌发酵样品中未检测到

的。酯类物质种类方面,两种样品均检出乙酸苯乙酯、软脂酸乙酯、十八碳烯酸乙酯、亚麻酸乙酯、月桂酸乙酯、油酸乙酯、软脂酸甲酯、癸酸乙酯、9-软脂酸乙酯、肉豆蔻酸乙酯、油酸甲酯、辛酸乙酯、醋酸异戊酯、丁内酯等多种化合物。醇类物质种类方面,两种样品均检出 β -苯乙醇、 α -松油醇。

表4 单菌及混菌发酵山楂果渣饲料样品挥发性香气成分分析
Table 4 Analysis of volatile flavor components in hawthorn fruit residue feed samples fermented with single and mixed strains

序号	类型	化合物	香气描述	单菌发酵含量/(mg·L ⁻¹)	混菌发酵含量/(mg·L ⁻¹)	
1	醇类	β -苯乙醇	玫瑰香,蜂蜜甜香	2.016±0.235	2.869±0.274	
2		α -松油醇	紫丁香的清香	0.843±0.034	0.698±0.065	
3		2,3-丁二醇	果香,黄油香	0.845±0.015	1.285±0.151	
4		戊醇	杂醇气,辣,有面包、酒、果香	0.093±0.027	-	
5		乙酸苯乙酯	热带水果香,花香	20.558±1.204	7.420±0.422	
6	酯类	软脂酸乙酯	蜡香,果爵,奶油香气	18.861±1.183	32.536±1.044	
7		十八碳烯酸乙酯	鲜花香,果香	9.845±0.680	17.400±0.947	
8		亚麻酸乙酯		7.410±0.113	13.330±1.539	
9		月桂酸乙酯	果香,花香,略带油脂气	5.716±0.591	7.244±0.528	
10		油酸乙酯	花香,果香,油脂气	4.899±0.368	7.831±0.481	
11		软脂酸甲酯		4.606±0.373	4.957±0.567	
12		癸酸乙酯	葡萄、康酿克酒香	4.356±0.282	5.861±0.239	
13		9-软脂酸乙酯	水果香,花香和清新香气	2.925±0.184	4.723±0.256	
14		肉豆蔻酸乙酯	甜香,蜡香及奶油味	2.190±0.252	3.457±0.545	
15		油酸甲酯	特殊酯类香气	1.968±0.281	2.258±0.255	
16		亚麻酸甲酯		1.562±0.174	-	
17		11,14,17-顺-二十碳三烯酸甲酯		-	1.870±0.501	
18		辛酸乙酯	杏香,奶油香,甜酒香	0.634±0.065	0.988±0.316	
19		醋酸异戊酯	香蕉,生梨,苹果甜的果香	1.152±0.360	1.186±0.166	
20		丁内酯	牛奶、奶油气	0.634±0.048	0.988±0.036	
21	酸类	δ -己内酯	椰子油、乳脂香,伴有焦香、果香	0.254±0.029	-	
22		丙酸苯乙酯	玫瑰香,水果香及覆盆子、草莓气	0.209±0.042	-	
23		乙酸正辛酯	茉莉香,甜桃气	-	0.192±0.018	
24		乙酸壬酯	甜果香,蜡香,热带水果香	-	0.171±0.015	
25		3-糠酸甲酯	水果、蘑菇、烟草香	0.191±0.010	-	
26		辛酸	酸干酪	0.513±0.019	-	
27		异戊酸;异缬草酸	酸败气	0.525±0.026	0.484±0.030	
28		三甲基辛烷		0.406±0.043	-	
29		二甲基十一烷		0.230±0.014	0.100±0.011	
30		十六烷		1.141±0.213	0.446±0.072	
31		十九烷		-	0.819±0.031	
32		糠醛	甜香,焦糖香	1.011±0.102	0.596±0.052	
33		糠醛类	反式香兰基丙酮	香草香	-	0.927±0.053
34			5-甲基糠醛	甜香,辛香,咖啡,焦糖气	0.400±0.37	0.410±0.024
35			-6-甲基四氢吡喃-2-酮		0.241±0.010	0.295±0.015
36	其他	丁香酚	丁香,辛香	2.530±0.349	4.264±0.421	
37		<i>E</i> - β -法尼烯	清新,甜美气	0.515±0.063	-	
38		醋酸铵	醋味	0.858±0.049	0.459±0.067	
39		焦黏酸酐肼		0.154±0.009	-	
40		间辛烯		0.374v0.021	0.335±0.015	
总计				99.708±6.957	126.084±14.619	

注:“-”表示未检出。

安琪商用酵母单菌发酵的山楂果渣饲料中香气物质总含量为99.708 mg/L,其中酯类物质87.779 mg/L,醇类物质2.592 mg/L,酸类物质1.038 mg/L,烷烃类物质1.777 mg/L,糠醛类物质1.652 mg/L,其他类物质5.276 mg/L。菌株DDC 008与安琪商用酵母混菌发酵的山楂果渣中香气物质总含量为126.084 mg/L,其中酯类物质112.412 mg/L,醇类物质4.413 mg/L,酸类物质0.484 mg/L,烷烃类物质1.365 mg/L,糠醛类物质2.228 mg/L,其他类物质5.497 mg/L。对比发现,混菌发酵样品中香气成分含量大幅增加,较单菌发酵提高了25.6%,酯类物质提高了27.8%,醇类物质提高了49.5%;月桂酸乙酯、软脂酸乙酯和丁香酚含量分别提高了26.7%、70.8%和68.5%。虽然混菌发酵山楂果渣饲料的香气物质总量提高,但是香气物质减少4种。也有混菌发酵研究中出现类似现象,如BAO J等^[23]利用植物乳杆菌与枯草芽孢杆菌混合发酵螺旋藻原料时,发现挥发性香气物质种类减少。造成该现象的原因有很多,如菌种相互作用、代谢途径的调控、底物竞争等,而具体原因仍需进一步研究。

混菌发酵既保留了山楂粉渣发酵底物的特征果香味,又呈现出清新、柔和的花果香气,风味更加醇厚。菌株DDC 008作为重要产香酵母类群之一,对发酵产物的风味产生重要影响。这与人研究结论类似,王鹏等^[24]研究发现,地丝双足囊菌属在浓香型白酒发酵糟醅中含量丰富,对白酒风味产生了重要影响;邓杰等^[25]发现地丝双足囊菌属在浓香型白酒的高温大曲中作为主要优势真菌菌种(占比高达13.39%),对中高浓香型白酒的独特风味发挥重要作用。综上,菌株DDC 008作为一种产香酵母,在改善和丰富发酵果渣饲料风味方面发挥重要作用。

3 结论

本课题从地方特色水果果肉和果皮中筛选获得一株发酵呈浓郁果香气味的产香酵母,经形态学观察、生理生化试验以及分子生物学鉴定其为地丝双足囊菌(*Dipodascus macrosporus*)。将其与安琪商用酵母按干质量2:1应用于山楂果渣饲料的混菌发酵。结果表明,该菌株发酵48 h的 β -苯乙醇产量为(100.00 $\pm$ 4.96) mg/L,用于果渣混合发酵后香气物质含量大幅度提高,醇类物质增加最大,酯类物质增加次之,丁香酚含量提高了约68.5%,月桂酸乙酯含量提高了约26.7%,软脂酸乙酯含量提高了约70.8%;果渣混菌发酵物既保留山楂果渣饲料的特征果香风味,又呈现出清新、柔和的花果香气,且果香风味醇厚,整体风味丰富,适口性更好。因此,产香酵母*Dipodascus macrosporus* DDC 008在发酵领域具有巨大的潜在应用价值。

参考文献:

- [1] M M L, ELLEN S M, MICHAEL G, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 196-208.
- [2] 张安东, 贝益临, 张欣, 等. 产香酵母在食品工业中的应用[J]. 绿色科

技, 2015, 42(11): 260-264.

- [3] ALBERTIN W, ZIMMER A, MIOT-SERTIER C, et al. Combined effect of the *Saccharomyces cerevisiae* lag phase and the non-*Saccharomyces* consortium to enhance wine fruitiness and complexity[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2017, 101(20): 7603-7620.
- [4] BELLOCH C, ORLIC S, BARRIO E, et al. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex[J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 122(1/2): 188-195.
- [5] 卢延想, 梁慧珍, 陈鹏, 等. 高温大曲中产香酵母的筛选及特征香气分析[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(11): 167-174.
- [6] 康艳丽, 陈作林, 曾小波, 等. 酱醪生香酵母的选育及其生长动力学研究[J]. 中国酿造, 2023, 42(4): 118-124.
- [7] 黄鑫, 唐红梅, 唐青莲, 等. 大头菜发酵过程中生香酵母的分离、筛选及鉴定[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(18): 198-203.
- [8] 姚志芳, 冯宇哲, 王磊, 等. 酵母菌和乳酸菌在生物发酵饲料中的应用研究进展[J]. 饲料研究, 2020, 43(10): 154-158.
- [9] 田航飞, 孙汝江, 张豪, 等. 果渣发酵饲料的应用现状和研究进展[J]. 江西农业学报, 2022(34): 173-178.
- [10] 熊荣园, 王黎明, 蔡韵凝, 等. 酵母发酵蔬果渣在饲料中的应用研究进展[J]. 饲料研究, 2023(46): 142-146.
- [11] 刘芸. 苹果渣固态发酵高蛋白产量菌株筛选及发酵条件研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2011.
- [12] 梅华迪, 唐延天, 马现永, 等. 柑橘渣生产蛋白饲料的发酵工艺筛选[J]. 饲料研究, 2022(45): 60-63.
- [13] 杨靖, 刘广昊, 王琼波, 等. 微生物发酵开发杏果渣香料的研究[J]. 轻工学报, 2025(40): 1-12.
- [14] 刘文丽, 孙舒扬, 贡汉生, 等. 不同酿酒酵母发酵的干红樱桃酒酒体成分及感官质量分析[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(1): 157-161, 166.
- [15] 柴红, 师守国, 李善菊, 等. 中条山野生葡萄产香酵母的筛选及其混菌发酵对葡萄酒香气成分的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 262-272.
- [16] 杨惠婷. 浙江地区酿酒酵母的优选鉴定及发酵特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022.
- [17] 刘立明, 刘佳, 樊祥臣, 等. 一种酿酒酵母高密度发酵培养的方法: CN201510410296.9[P]. 2018-10-16.
- [18] ZHAO Y Y, LI S Y, SHU Q X, et al. Highly efficient production of 2-phenylethanol by wild-type *Saccharomyces bayanus* strain[J]. *Biore-source Technol*, 2024, 403(8): 10-20.
- [19] 王光路, 刘兰茜, 郑颖, 等. 一株高产 β -苯乙醇酵母菌的分离及产香特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(12): 68-74.
- [20] 贾丽艳, 田宇敏, 荆旭, 等. 果香风味导向白地霉M5的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 210-220.
- [21] 刘云肖, 郝玉有, 刘新星, 等. 可利霉素发酵废渣培养白地霉的发酵过程参数研究和残抗分析[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(12): 899-904.
- [22] LI X, KANG Y, YU C, et al. Exponential feeding strategy of high-density cultivation of a salt-tolerant aroma-producing yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in stirred fermenter[J]. *Biochem Eng J*, 2016, 111: 18-23.
- [23] BAO J, ZHANG X, ZHENG J H, et al. Mixed fermentation of *Spirulina platensis* with *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* by random-centroid optimization[J]. *Food Chem*, 2018, 264(10): 64-72.
- [24] 王鹏, 吴群, 徐岩. 中国白酒发酵过程中的核心微生物群及其与环境因子的关系[J]. 微生物学报, 2018, 58(1): 142-153.
- [25] 邓杰, 张曼, 周杰, 等. 2种浓香型白酒大曲中微生物群落结构及功能研究[J]. 食品科学技术学报, 2024, 42(4): 75-85.