用于发酵型风味剁辣椒耐盐酵母菌的筛选

徐浩[1,2]，刘素纯[1,3]，聂荣[1,3]，刘莹[1,2]，李罗明[2]，王菲[2]
（1. 湖南农业大学食品科学技术学院，湖南长沙 410128）（2. 湖南省发酵食品工程技术研究中心，湖南长沙 410128）（3. 食品科学与生物技术湖南省重点实验室，湖南长沙 410128）

摘要：本试验从高盐辣椒坯中分离筛选得到了一株耐盐酵母菌 Yx.509，该菌株能够在 24% NaCl 浓度下能够正常的生长代谢。将 Yx.509 菌株扩大培养后，接种到不同盐浓度的剁辣椒坯中，发酵 7 d 后高盐剁辣椒风味良好，色泽红艳，脆感较好。因此，该菌株能够满足于风味高盐剁辣椒的生产。结合形态学、生理生化试验和 26S rDNA 测序鉴定为鲁氏接合酵母。

关键词：酵母菌；耐盐；风味剁辣椒；筛选；鉴定

文章篇号：1673-9078(2013)5-1076-1079

Screening of Salt-tolerant Yeast for Fermented Flavor Chopped Pepper

XU Hao[1,2], LIU Su-chun[1,3], NIE Rong[1,3], LIU Ying[1,2], LI Luo-ming[2], WANG Fei[2]
(1.College of Food Science and technology Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China) (2.Hunan Provincial Research Center of Engineering and Technology for Fermented Food, Changsha 410128, China) (3.Hunan Key Laboratories of Food Science and Biotechnology, Changsha 410128, China)

Abstract: A salt-tolerant yeast, named Yx.509, was screened from the salty pepper blank, which can survive and tolerate 24% NaCl. The culture of strain was then scaled-up after inoculated the stain to highly salty chopped pepper blank. After 7days, the fermented chopped pepper showed a good flavor, bright red color and crisp feel. This strain was identified as *Zygosaccharomyces rouxii* by using morphological, physiological and biochemical tests and 26S rDNA sequencing.

Key words: yeast; salt-tolerance; flavor chopped pepper; screen; identification

辣椒，又叫番椒、海椒，一年或多年生草本植物，茄科辣椒属，原产地墨西哥，明朝末年传入中国，已成为中国人一种很重要的蔬菜。辣椒富含β-胡萝卜素、B 族维生素、V_E、叶酸、镁及钾，其 Vc 的含量在蔬菜中居第一位[1~2]，辣椒中的辣椒素还具有抗炎及抗氧化作用，有助于降低心脏病、某些肿瘤及其他一些随年龄增长而出现的慢性病的风险[3~4]。

辣椒不仅可以用来作为蔬菜，经过加工后还是一种很重要的调味品，市面上常见的产品有剁辣椒、辣椒粉、辣椒酱等[5]。辣椒的生长季节性较强，因此加工辣椒因原料受限也就相对具有季节性。生产剁辣椒的厂家一般是在辣椒成熟时，收购新鲜辣椒后就地用高盐腌制，直接加工成半成品，以便于运输和保存，然后再运到工厂脱盐后进行调配加工[6]，这种加工方法因其 NaCl 浓度较高，一般的微生物很难在这种极条件下生长，脱盐处理后，辣椒中的营养成分大量端流失，调味而制成的剁辣椒与农村自然发酵的剁辣椒相比风味不足。目前国内对专用的耐高盐发酵辣椒微生物的研究较少，赵玲艳等[7]研究用乳酸菌来发酵低盐剁辣椒，耐盐酵母菌多见于生产酱油增香，在发酵辣椒上鲜见报道应用。因此筛选出耐盐在 22%以上的发酵剁辣椒用耐盐酵母菌对调味品产业来说意义重大。

收稿日期：2013-02-26

作者简介：徐浩（1986-），男，硕士研究生，研究方向为营养与食品卫生学
通讯作者：刘素纯（1966-），女，博士，教授，研究方向为营养与食品卫生学

1 材料与方法

1.1 材料

高盐辣椒坯由长沙市坛坛香调料食品有限公司提供。

1.2 培养基

富集培养基培养基：马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，水 1000 mL，pH 自然，121 ℃ 20 min 灭菌。

豆芽汁琼脂培养基：黄豆芽 100 g，葡萄糖 50 g，琼脂 20 g，水 1000 mL，pH 自然，121 ℃ 20 min 灭菌。

YPD 液体培养基：酵母膏 10 g，蛋白胨 20 g，葡萄糖 20 g，水 1000 mL，121 ℃ 20 min 灭菌。

YPD 琼脂培养基：酵母膏 10 g，蛋白胨 20 g，葡萄糖 20 g，琼脂粉 20 g，水 1000 mL，121 ℃ 20 min 灭菌。

糖发酵基础培养基、无碳基础培养基、无氮基础培养基，生理生化试验用。

1.3 试验方法

1.3.1 酵母菌分离纯化

用无菌药匙取一定量高盐辣椒坯至富集培养基中培养，一段时间后取富集培养菌液接种到一新鲜含NaCl 16%的富集培养基中，培养24 h后再稀释涂布，静置培养，待长出菌落后，将具有酵母菌菌落特征的单菌落挑选出，进行分离纯化，镜检为纯种后，接种到YPD斜面培养基上4 ℃低温保藏。将初筛菌种在含18% NaCl浓度的液体培养基中培养，在培养过程中定期镜检观察菌种的生长状况生长4 d后，进行平板四分法划线分离，然后从经培养后的平板和斜面上挑出单菌落继续培养如此反复直到确定其为单一菌株为止。

1.3.2 酵母菌的耐盐度测试

为了考察耐盐酵母菌在不同盐浓度下的耐受情况，试验中以NaCl浓度梯度分别为8%、12%、16%、20%、24%，在不同食盐浓度的YPD液体培养基中分别加入耐盐酵母菌，接种量均为2%，置于30 ℃，160 r/min摇床培养5 d，每1 d取1次样，采用分光光度法，于600 nm处测定样品的OD值。

1.3.3 发酵辣椒试验及其评价分析

1.3.3.1 发酵辣椒的制作及其感官评价

于附近农贸市场购买时鲜红辣椒,将其洗净晾干，切分、剁碎、分装成100 g每瓶，设置5个不同盐浓度，按比例分别加盐8%、12%、16%、20%、24%，将所筛菌种的扩大培养液接种到各发酵瓶中，接种量为10%，装瓶密封发酵7 d后，取出发酵辣椒进行感官评价。

1.3.3.2 发酵辣椒的香气成分分析

取发酵辣椒液，用GCMS-QP2010气相色谱-质谱联用仪分析其香气成分。

a. SPME法提取发酵液中的挥发性风味物质

取大约100 g的发酵辣椒成品，用打浆机打成匀浆后，取7 mL打成匀浆的样品，置于15 mL顶空瓶中，于磁力搅拌器上70 ℃加热后，插入已老化好的萃取头，吸附40 min，通过GC进行解析，解析时间5 min[8~9]。

b. 仪器分析条件

气相色谱条件：柱型：DB-5ms毛细管柱(30.0 m×0.25 mm，0.25 μm)；柱温：升温程序为初温40 ℃保持3 min，然后以5 ℃/min升至150 ℃，接着以10 ℃/min升至250 ℃，保持10 min，再以20 ℃/min升至270 ℃，保持1 min；进样口温度250 ℃，不分流进样，载气为高纯He，流速为1.0 mL/min。

质谱条件：电离方式EI，电离电压70 eV，离子源温度200 ℃，灯丝电流150 μA，扫描质量范围33~500 u，扫描方式为scan[8~9]。

1.3.4 酵母菌的形态学观察

将纯化后的酵母菌涂布到豆芽汁琼脂培养基，30 ℃培养72 h后，观察菌落大小、色泽、表面形态、边缘情况等特征。液体培养特征观察：将分离纯化后的酵母接种于麦芽汁液体培养基中，30 ℃培养72 h后观察有无醭以及有无沉淀物。取少量纯化的菌种制成涂片，用次甲基蓝染色在显微镜油镜下观察酵母的菌体形态[10~11]。

1.3.5 26S rDNA序列分析法鉴定酵母菌

基因组提取按照生工SK1375真菌基因组DNA抽提试剂盒说明书操作。

PCR体系建立（25 μL）：Template（基因组），1 μL；Primer up (10 μM)，0.5 μL；Primer down (10 μM)，0.5 μL；dNTP mix (10 Mm each)，0.5 μL；10*Taq reaction Buffer，2.5 μL；Taq (5 μ/μL)，0.2 μL；加水至25 μL。

PCR程序设定：预变性94 ℃ 5 min；循环94 ℃ 30S，55 ℃ 35 S，72 ℃ 1 min，35个循环；延伸72 ℃，8 min；26S rDNA D1/D2区引物：NL1（5’-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3’），NL4（5’-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3’）。

PCR产物经过纯化后送上海生工生物工程有限公司进行测序。将测序结果用Blast软件与GenBank核酸序列数据库中已知酵母菌相应序列进行同源性分析比对，采用用MEGA5.0软件建立系统发育树[12~13]。

1.3.6 生化试验

参照酵母菌的特征与鉴定手册，做糖发酵试验、碳源同化试验、氮源同化试验、类淀粉化合物形成测定、脲酶试验等试验，查阅鉴定手册，鉴定其种属[10~11]。

2 结果与讨论

2.1 耐盐酵母菌的筛选

2.1.1 耐盐酵母菌的分离

将高盐椒坯中的菌株富集培养后，稀释涂布，挑选具有酵母菌菌落特征的单菌落，反复通过平板划线分离纯化得一菌株命名为Yx.509。

2.1.2 菌株的耐盐度测试

将菌株接种到8%、12%、16%、20%、24%5个不同盐浓度的YPD液体培养基中，30 ℃培养5 d，每1 d取一次样，在722N型可见分光光度计600 nm处测得其吸光值，如图1。

由图1可知，该菌株在5个不同盐浓度下都可生

长，能够耐受较高的盐浓度，但是在低盐浓度下生长更好。

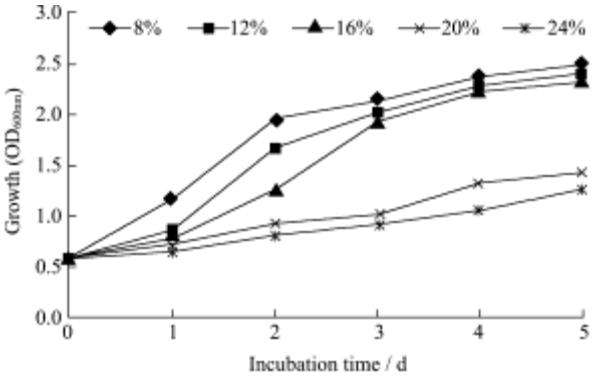


图 1 5 种不同盐浓度下菌株生长情况

Fig.1 The growth of the strain at five different salinities

2.1.3 发酵辣椒试验结果分析

2.1.3.1 发酵辣椒的感官评价

将发酵 7 d后的剁辣椒取出，进行感官评价，结果如表 1。

表 1 发酵辣椒的感官评价

Table 1 Sensory evaluation of the fermented chili

剁辣椒	发酵后的感官结果
8%NaCl	气味异常，有浓郁的酒香混杂，辣椒表面有白色菌花，表层辣椒皮肉分离，无脆感，色泽暗红，底部汁液浑浊，有酸味
12%NaCl	有少量白色菌花，不良气味，表层辣椒颜色较暗。
16% NaCl	香气浓郁，以醇香和酯香为主，椒块棱角分明，脆鲜多汁，色泽红亮，瓶底有少量澄清汁液，表面无霉斑生成
20%NaCl	香气足，有辣椒的清香，质脆味鲜多汁，色泽红亮，表面无霉斑
24%NaCl	气味正常，有辣椒清香和酯香，质地较脆，有鲜味，辛辣且咸味过重，椒块棱角分明，粗细均匀，瓶底有少量澄清汁液，表面无霉斑

由表 1 可知，在 5 个不同盐浓度下发酵辣椒，其中低盐度的容易滋生杂菌，气味不良，而在高盐度的环境下，绝大多数的杂菌都不能够生长，Yx.509 发酵的高盐剁辣椒，产品脆鲜且香气较好，能够满足筛选的需要，因此对此菌株作进一步的研究。

2.1.3.2 发酵辣椒香气成分分析

采用顶空固相微萃取(solidphas emicroextraction, SPME)的预处理方法，结合气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography and mass spectrometry，GC-MS)，对发酵辣椒成品的香气成分进行分析，结果见图 2。

发酵辣椒中的香气物质主要来源于原料、酵母菌代谢产物以及它们为前体物质合成的其它物质，主要包括醇类、酯类、羰基类化合物和醛类等众多复杂的香气成分。通过顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱联用仪检测出发酵辣椒中的挥发性产物如表2，其中醇类9种，酯类9种，烷烃类10种，醛类4种，酮类1种，吡嗪1种，一共5类34种化合物。通过本试验发现所筛耐盐酵母菌Yx.509在高盐条件下能够发酵辣椒且产生香气物质种类较多，以醇类、酯类、烷烃类为的众多香气物质。

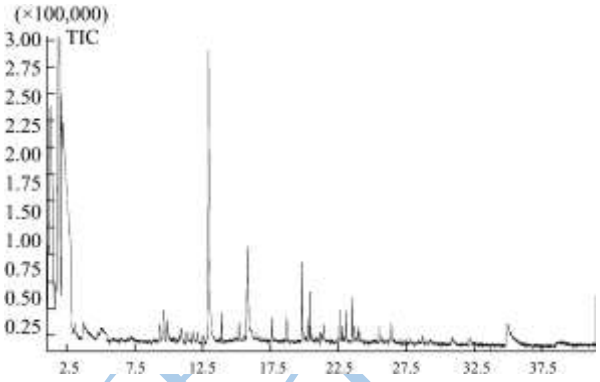


图 2 发酵辣椒成品挥发成分的总离子流图

Fig.2 Total ion current chromatogram of volatile components infermented chili pepper

表 2 发酵辣椒中的挥发性有机成分

Table 2 Volatile components in native chili pepper

成分	保留时间	名称	相对含量/%
醇类	2.165	乙醇	66.05
	3.725	正戊醇	0.76
	5.91	2-甲基-1-丁硫醇	0.13
	9.6	对叔丁基环己醇	1.72
	10.794	紫苏醇	0.30
	11.293	玫瑰醇	0.51
	12.082	(S)-氧化芳樟醇	0.29
	12.925	芳樟醇,里那醇	10.15
	15.807	α-松油醇	3.55
酯类	6.45	乙酸异戊酯	0.13
	9.875	己酸乙酯	0.51
	12.808	D-(-)-泛酰内酯	0.21
	15.748	辛酸乙酯	0.94
	16.025	正戊酸己酯	0.20
	17.563	壬酸乙酯	0.42
	19.8	(Z)-4-癸烯酸乙酯	1.88
	21.288	癸酸乙酯	0.93
	34.973	棕榈酸乙酯	4.05
烃类	10.882	3-十二炔	0.73
	12.472	萜品油烯	0.37
	14.983	冰片烯	0.15
	16.755	(+)-α-长叶蒎烯	0.11

转下页

接上页

烃类	20.147	2-甲基十三烷	0.87
	20.426	正十四烷	0.58
	21.397	罗汉柏烯	0.62
	22.56	2-甲基十四烷	0.36
	22.79	β-石竹烯	0.89
	23.033	雪松烯	1.06
	23.511	3-十二炔	0.73
醛类	4.736	正己醛	0.18
	11.75	反-2-辛烯醛	0.34
	16.1	1-癸醛	0.19
	16.475	β-环柠檬醛	0.11
酮类	20.894	β-大马酮	0.11
吡嗪	15.152	2-异丁基-3-甲氧基吡嗪	0.61

2.2 耐盐酵母菌的鉴定

2.2.1 酵母菌的菌落特征和个体形态观察

菌落呈圆形，菌落表面光滑、湿润、粘稠，易挑起，菌落质地均匀，正、反面及中央与边缘的颜色一致，呈乳白色，边缘十分圆整，中间隆起，如图3。在液体培养基中，表面不产膜，但液体浑浊。在光学显微镜下，生殖为芽殖，菌体细胞呈球形，大小为8~20 μm。

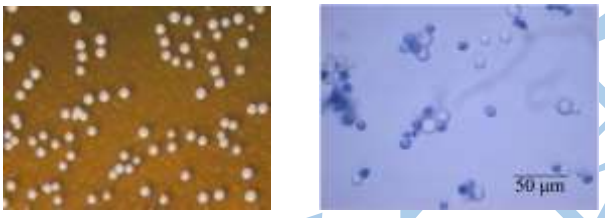


图 3 Yx. 509 的菌落特征和个体形态

Fig.3 Microflora character and shape character of Yx.509

2.2.2 耐盐酵母菌 26S rDNA

2.2.2.1 耐盐酵母菌Yx.509的26S rDNA PCR产物电泳

PCR产物电泳图如图 4 所示。

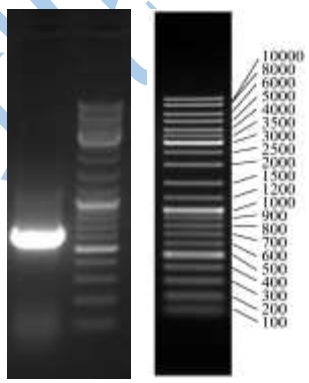


图 4 酵母 Yx. 509 的 26S PCR 产物电泳图

Fig.4 The electrophoretogram of Yx.509's 26S PCR products

2.2.2.2 Yx.509 的系统发育树

经测定，Yx.509 耐盐酵母菌 26S rDNA D1/D2 区序列扩增片段长度为 602 bp，将这组序列应用 BLAST 程序与 NCBI-GenBank 数据库中的已知酵母菌序列进行同源性比对分析，发现与该菌株序列通用性最高的绝大多数为鲁氏酵母（*Zygosaccharomyces rouxii*），选取相关菌株的 26S rDNA 序列建立系统发育树如图 5。

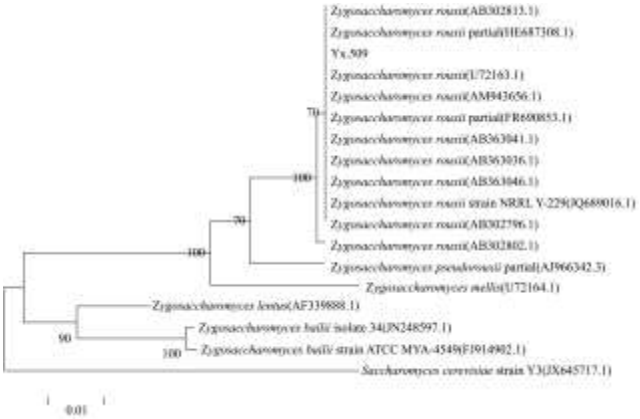


图 5 酵母 Yx. 509 及其相关菌的基于 26S rDNA 基因序列的系统发育树

Fig.5 The phylogenetic tree of Yx.509 and its related bacteria based on 26S rDNA gene sequences

2.2.3 生理生化特征分析

从糖发酵试验、碳源同化性试验、氮源同化性试验、类淀粉化合物形成试验、脲酶试验等方面对 Yx.509 进行了生理生化特征分析，试验结果如表 3。

表 3 Yx. 509 的生理生化特征

Table 3 The results of biochemical and physiological chracterization

试验项目	试验结果	试验项目	试验结果
糖发酵试验	葡萄糖 +	碳源同化试验	鼠李糖 -
	半乳糖 -		D-阿拉伯糖 -
	麦芽糖 +		D-木糖 -
	蔗糖 +		D-甘露醇 +
	海藻糖 -		山梨醇 +
	蜜二糖 -		肌醇 -
	乳糖 -	氮源同化试验	硝酸钾 -
	纤维二糖 -		亚硝酸钠 -
	棉子糖 -	类淀粉化合物形成试验	-
	可溶性淀粉 -	脲酶试验	-

注：“+”表示阳性，可发酵或可同化，“-”表示阴性，不可发酵或不可同化。

通过表 3 中的试验结果，在《酵母菌的特征与鉴定手册》和《真菌鉴定手册》[12~13]中检索，结合 26S

rDNA 序列分析结果，可以得知所筛菌株 Yx.509 为鲁氏接合酵母。

3 结论

从长沙市坛坛香调料食品有限公司提供的高盐椒坯中分离筛选得到一株耐盐酵母 Yx.509，镜检下该酵母菌的菌体形态为球形，通过 26S rDNA 序列分析法和生理生化试验鉴定为鲁氏接合酵母。该菌株能够在 24% NaCl 浓度下生长繁殖，生长速度较快且该菌株被用来发酵高盐剁辣椒，发酵辣椒成品香气浓郁，风味较佳，脆度较好。通过进一步的研究有望开发成为一种新型高盐辣椒专用发酵剂。

参考文献

[1] 黄科,李宾.辣椒功能保健成分研究进展[J].辣椒杂志,2006,3:6-8

[2] 李军明.辣椒的营养保健价值[J].中国食物与营养, 2010, 2: 68-71

[3] 张晶,金莎,董蕊,等.辣椒的药理作用研究进展[J].中国药房,2010,21(7):663-665

[4] 聂乾忠,夏延斌,曾晓楠,等.辣椒素类物质对高血脂症大鼠血脂的影响[J].食品与机械,2010,26(1):77-80

[5] 张忠刚,邓放明.辣酱的生产现状及发展方向[M].农产品加工,2006

[6] 蒋立文,李宗军,谭周进,等.剁辣椒的生产现状及技术进展[J].中国酿造,2006,2:6-8

[7] 赵玲艳,邓放明,杨抚林,等.自然发酵辣椒中乳酸菌的分离及其发酵性能研究[J].食品科学.2005,26(10):82-86

[8] Pamela Vernocchi，Maurice Ndagijimana，et al. Influence of starch addition and dough microstructure on fermentation aroma production by yeasts and lactobacilli [J]. Food Chemistry, 2008, 108: 1217-1225

[9] 刘嘉,陈杰,孙文彬,等.顶空固相微萃取-气质联用技术分析发酵辣椒的挥发性成分[J].食品科学,2011,32(24):256-260

[10] 巴尼特 JA,佩恩 RW,亚罗 D.酵母菌的特征与鉴定手册[M].山东:青岛海洋出版社,1991

[11] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979

[12] 赵丽丽,陈存社,郭凤莲.26S rDNA 序列分析法鉴定酵母菌[J].中国酿造,2008,15:49-51

[13] 李金霞,刘光全,程池.酿酒酵母 26S rDNA D1/D2 区域序列分析统发育研究[J].酿酒科技,2007,34(1):37-39

现代食品科技