传统面食发酵剂中菌群多样性的研究

杨浣漪，张国华，何国庆
（浙江大学生物系统工程与食品科学学院，浙江杭州 310058）

摘要：我国传统面食发酵剂的使用具有悠久的历史，其制作的馒头、包子等发酵食品因风味独特而深受大家喜爱，但对传统面食发酵剂中微生物菌群的研究却非常薄弱。本文以河南地区的传统面食发酵剂为对象，采用分离培养及分子鉴定技术对其微生物生态多样性进行了研究。通过对微生物基本形态特征观察结合生理生化试验及分子鉴定技术，将分离到的 30 株酵母菌鉴定为 4 类，其中 11 株为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)，6 株为异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)，8 株为东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)，5 株为扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)，其中酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为优势酵母菌种；分离的 28 株乳酸菌中 13 株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)，8 株为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)，7 株为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)，其中植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)为优势乳酸菌。此外，样品中还分离到了一株霉菌，经鉴定为米根霉(*Rhizopus oryzae*)。

关键词：面食发酵剂；酵母菌；乳酸菌；霉菌
文章篇号：1673-9078(2013)9-2115-2119

Biodiversity of Microorganisms in Chinese Traditional Starter Cultures Ecosystem

YANG Huan-yi, ZHANG Guo-hua, HE Guo-qing
(College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Traditional starter culture has a long history for preparation of popular fermented stable foods because of its unique flavor and texture. In this paper, microbial community in traditional starter cultures from Henan province was investigated. Culture-dependent method was used for isolation and identification by morphologic traits, physiology and biochemistry analysis. The results of isolation and identification showed that there were 4 species yeasts in the samples, including *Saccharomyces cerevisiae* (11 isolates), *Pichia anomala* (6 isolates), *Issatchenkia orientalis* (8 isolates) and *Saccharomycopsis fibuligera* (5 isolates). Meanwhile, all LAB isolates were identified as 3 species, which were *Lactobacillus plantarum* (13 isolates), *Enterococcus faecalis* (8 isolates) and *Lactobacillus casei* (7 isolates). *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* were the predominant microflora in the tested sample. In addition, one mold (*Rhizopus oryzae*) was isolated in the sample.

Key words: Traditional starter cultures; yeast; lactic acid bacteria; mold

我国传统面食发酵剂的使用具有悠久的历史，民间采用发酵酸面团生产馒头出现于13世纪。20世纪80年代中期，即发活性干酵母被引入我国市场，传统面食发酵剂逐渐被替代[1]。虽然面包酵母具有极大的方便性，但面包酵母为单菌种发酵，与混菌体系的传统面食发酵剂相比，面包酵母发酵的馒头风味较平淡，香味不浓，感官品质较差且复蒸性能差[2]。近年来，随着社会经济的发展和人们生活水平的提高，人们对发酵面食的品质提出更高的要求。传统发酵剂为多菌种混合发酵，其中酵母菌是一类主要微生物，包括酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）和非酿酒酵母（non-*Saccharomyces*），分别起着酒精发酵和产生酯、醛等风味物质的作用，另外在发酵剂中还含有一定数量和种类的其他微生物种群，如各类乳酸菌、霉菌等，可在发酵过程中协同进行糖化、酯化，生成醇、酯、醛、酮等多种风味物质[2]，从而使其发酵的产品具有独特的口感和风味。因此，传统面食发酵剂再度受到极大的关注。

目前，我国对传统面食发酵剂的系统研究尚处于起步阶段，主要集中在对发酵剂的制作工艺研究、主要菌种的分离筛选及发酵剂对馒头品质的影响等方面，其中对微生物菌相体系的研究是最薄弱的环节[3]。为了弘扬中国的面食文化，特别是传统发酵剂面食的工业化，传统发酵剂中微生物菌群组成是我们研究的

收稿日期：2013-05-26
基金项目：国家自然基金(31130042)；国家十二五课题(2012BAD37B01)
作者简介：杨浣漪（1990-），女，在读硕士，研究方向：传统发酵食品
通信作者：何国庆（1957-），男，博士，教授，食品生物技术及发酵工程

起点和基础。本文主要采用分离、纯化，综合形态观察、生理生化试验和分子鉴定技术，对从河南省安阳市采集的传统面食发酵剂中微生物群落组成进行系统分析，不仅有利于认识传统发酵剂中复杂的微生态体系，还可为下一步研究发酵剂中各微生物间相互作用及其对发酵面食品质影响奠定基础，同时也为传统面食的工业化生产提供重要的参考数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源

传统面食发酵剂样品购自河南省安阳市农贸市场。

1.1.2 培养基及主要试剂

YPD培养基、WL培养基等按文献[4]和[7]提供的方法配制；生化反应鉴定管、PDA琼脂培养基、MRS培养基，杭州微生物试剂有限公司；真菌基因组DNA提取试剂盒、细菌基因组DNA提取试剂盒、PCR清洁试剂盒，杭州爱思进生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 发酵剂中微生物的分离纯化

取发酵剂样品1 g，无菌水进行梯度稀释，取10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}三个稀释度，涂布于PDA和MRS培养基上，分别在28 ℃、37 ℃培养48 h。从PDA平板上挑取酵母菌及霉菌单菌落，MRS培养基上挑取细菌单菌落并进行编号。

1.2.2 酵母菌 WL 培养基分类鉴定及生化分析

将保藏于4 ℃的菌种活化，划线接种于WL营养琼脂培养基上，28 ℃培养5 d，记录菌落颜色和形态。

观察酵母菌的菌落及细胞形态、液体培养特征、假菌丝、子囊孢子等，同时对酵母菌进行糖发酵实验、碳源同化实验、硝酸盐试验等[5]，其中碳源同化和硝酸盐试验采用酵母样真菌生化鉴定管。

1.2.3 PCR 扩增及检测

根据DNA试剂盒说明书提取基因组DNA，并进行PCR扩增。PCR反应体系为：10×PCR Buffer (Mg^{2+} free) 4 μL，$MgCl_2$ 4 μL，dNTP 5 μL，正，反向引物各0.5 μL，模板DNA 1 μL，rTaq酶0.5 μL，用灭菌去离子水补加到50 μL。其中，酵母菌扩增引物为NL1：5’-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3’，NL4：5’-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3’；乳酸菌的引物为F：5’-CCTACGGGAGGCAGCAG-3’，R：5’-ATTACCGCGGCTGCTGG-3’；霉菌的引物为ITS1：5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’，ITS4：5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’。PCR产物纯化后送上海生物工程股份有限公司测序，测序结果在NCBI数据库上进行比对分析。

2 结果与讨论

2.1 酵母菌的鉴定

2.1.1 酵母菌的 WL 培养基分类结果

1992年Cavazza等[6]已利用酵母菌在WL 琼脂培养基（Wallerstein Laboratory Nutrient Aga）上菌落颜色及形态不同鉴定了葡萄酒中酵母菌种类。本文将其应用于传统发酵面食发酵剂中酵母菌的初步鉴定。从PDA平板上随机挑取30个酵母菌单菌落并编号，通过WL培养基30个单菌落被分为4类，其菌落特征和形态见图1。依据Cavazza等[6]、杨莹[7]文章中对酵母菌WL分类描述，I类酵母菌6株，菌落呈浅蓝色，扁平不透明，表面光滑，奶油状，为异常毕赤酵母（*Pichia anomala*）；II类酵母菌8株，菌落呈奶油色，中心泛绿，边缘粗糙毛绒状，经检索为东方伊萨酵母（*Issatchenkia orientalis*）；III类酵母菌11株，菌落呈奶油色，表面光滑不透明，形成圆锥型突起，是酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的典型特征，IV类酵母菌则未提及。



图 1 酵母菌在 WL 培养基上的菌落

Fig.1 The colony of the yeast strains on WL medium

2.1.2 酵母菌的生理生化鉴定结果

酵母菌的个体形态、出芽方式、能否产生假菌丝以及子囊孢子形成能力等，是酵母菌鉴定的重要依据。酵母菌的个体形态及液体培养特征见表1。结果显示：除I类酵母菌为单端出芽外，其余均为周边出芽；II、IV类酵母菌可产生假菌丝；I、II、III类酵母菌均能产生子囊孢子，而IV类酵母菌未观察到子囊孢子的形成；I、II类酵母菌的液体表面产生了膜醭，其中I类底部有沉淀，II类底部无沉淀；III、IV类酵母菌的液体表面没有任何菌膜，菌体聚集在底部，其中III类菌体致密，IV类菌体疏松。结合供试菌株的生理生化测试结果(表2)，在《酵母菌的特征与鉴定手册》中检索可将四类酵母

菌分别鉴定为异常毕赤酵母、东方伊萨酵母、酿酒酵母和扣囊复膜酵母。

表 1 酵母菌个体形态及液体培养特征描述

Table 1 Morphological characteristics and liquid cultural characteristics of the yeast isolates

类型	大小/μm	形状	出芽方式	假菌丝	子囊孢子	液体培养特征
I	（3~6）×（4~7）	圆形	单端出芽	无	有	表层有膜醭，有沉淀
II	3×（6~8）	卵圆形至香肠形	周边出芽	有	有	表层有膜醭，无沉淀
III	3~6	圆形或卵圆	周边出芽	无	有	表层无膜醭，沉淀致密
IV	2.5×（4~6）	卵圆形	周边出芽	有	无	表层无膜醭，沉淀疏松

表 2 传统发酵剂中分离的酵母菌的生理特性

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of yeast isolates

	项目	菌株类型			
		I	II	III	IV
糖发酵	葡萄糖	+	+	+	+
	蔗糖	+	-	V	V
	麦芽糖	V	-	V	+
	乳糖	-	-	-	-
	海藻糖	+	-	V	V
	半乳糖	V	-	V	-
	木糖	V	-	-	-
	蔗糖	+	+	V	V
碳源同化	山梨醇	+	-	V	V
	甘油	+	V	V	+
	乳糖	-	-	-	-
	阿拉伯糖	-	-	-	-
	棉子糖	+	-	V	V
	鼠李糖	-	-	-	-
	纤维二糖	+	-	-	+
	麦芽糖	+	-	V	+
	木糖醇	-	-	-	V
	松三糖	+	-	V	V
	肌醇	-	-	-	V
	α-甲基-D-葡萄糖苷	+	-	+	+
	乙酰葡萄糖胺	-	+	-	-
	硝酸盐	+	-	-	-
	淀粉形成	-	-	-	-
	尿素水解	-	-	-	-

注：“+”代表阳性，“-”代表阴性，“V”代表可变。

2.1.3 酵母菌的 26S rDNA 基因序列分析

从表1所示的每个酵母类型中随机挑取了13株菌，提取其基因组DNA，并以此为模板扩增菌株26S rDNA D1/D2片段，经电泳检测（见图2），扩增的目的条带大小为600 bp左右。测序结果在NCBI数据库中比对并构建系统发育树（见图3）。

如图3所示，Hn-Y-3、Hn-Y-21与*Pichia anomala* L80，Hn-Y-8、Hn-Y-25与*Saccharomycopsis fibuligera* g-4b-1，Hn-Y-4、Hn-Y-7等与*Saccharomyces cerevisiae* JM2，Hn-Y-2、Hn-Y-12等与*Issatchenkia orientalis* F701分别处于同一主枝上，且Bootstrap检验的支持百分率均高达100%，这与生理生化鉴定结果一致。所以I类酵母菌为异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)，II类酵母菌为东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)，III类酵母菌为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)，IV类酵母菌为扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)。

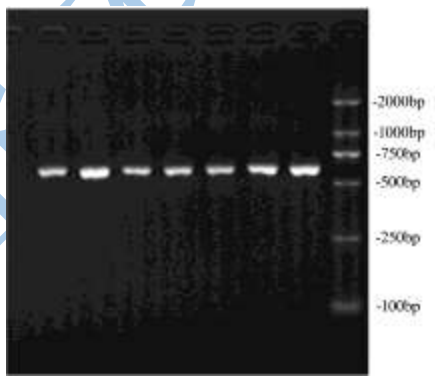


图 2 部分酵母菌 26S rDNA D1/D2 区域的 PCR 扩增产物

Fig.2 Amplified products of the D1/D2 domain sequences of several yeast strains

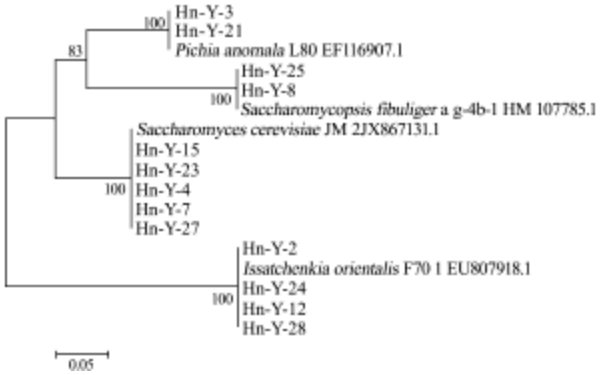


图 3 酵母菌基于 26S rDNA 序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of the yeasts according to 26S rDNA sequences

从以上分离得到的酵母菌的作用来看，大致可将发酵剂中的酵母菌分成两大类。一类为酿酒酵母，即*Saccharomyces cerevisiae*，是发酵剂中的优势菌株，在发酵的过程中，产生CO_2和乙醇，形成馒头蓬松的网状

结构，并赋予馒头特征风味；另一类是非酿酒酵母（non-*Saccharomyces*），能够合成多种酶，或者产生、增强一些有益的风味化合物，或者降解某些异味物质如乙酸、乙醛等[8,9]，如*Pichia anomala*，即可在发酵过程中产生包括柠檬烯、月桂烯、香桧烯、3-甲基-1-丁醇、苯乙醇等香气物质，而*Issatchenkia orientalis*则能进行柠檬酸-乙醇发酵，将柠檬酸降解为乙醇，最终改变发酵产物的风味特征。

2.2 乳酸菌分离鉴定结果

在MRS平板上随机挑取50个细菌单菌落并进行分离纯化及编号。对分离菌株进行革兰氏染色和过氧化氢酶试验，其中革兰氏染色呈阳性，过氧化氢酶试验呈阴性的有28株。

提取这28株菌的基因组DNA，并以此为模板扩增菌株16S rDNA区域，经电泳检测(见图4)，扩增的条带长度为1200 bp左右。PCR产物测序结果在NCBI数据库中进行比对，并构建系统发育树(见图5)。

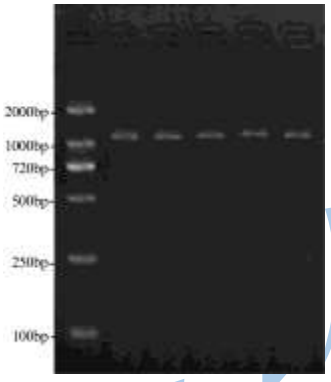


图 4 部分乳酸菌 16S rDNA 区域的 PCR 扩增产物

Fig. 4 Amplified products of the 16S rDNA sequences of several LAB strains

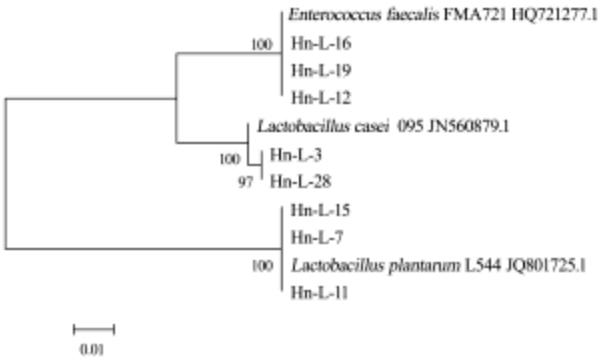


图 5 乳酸菌基于 16S r DNA 序列的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of the LAB strains according to 16S rDNA sequences

如图5所示，Hn-L-12、Hn-L-16和Hn-L-19与*Enterococcus faecalis* FMA721，Hn-L-3、Hn-L-28与*Lactobacillus casei* 095，Hn-L-7、Hn-L-11和Hn-L-15与*Lactobacillus plantarum* L544分别以较高置信度处于同一主枝上。故发酵剂样品中分离到的乳酸菌共有3种，分别为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) 8株、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*) 7株和植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）13株。从分离的结果来看，植物乳杆菌是其中的优势菌株。它是乳酸杆菌的一种，通过同型或异型发酵，产生乳酸、醋酸等有机酸，与酵母菌代谢产生的醇类物质发生酯化，从而使发酵的馒头香味较浓且风味独特，同时某些植物乳杆菌在繁殖的过程中还能产生乳酸杆菌素，可抑制和杀死食品中的腐败菌及致病菌，以延长产品的货架期，另外作为人体胃肠道的益生菌群，具有维持肠道内菌群平衡、提高机体免疫力和促进营养物质吸收等多种功能[10~11]。干酪乳杆菌，常常出现在牛奶和干酪、乳制品、饲料、面团中，与植物乳杆菌一样，它也能产生乳酸菌素以及作为益生菌对人体起调节肠内菌群平衡、促进消化吸收等作用[12]。

2.3 霉菌的鉴定结果

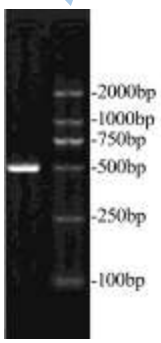


图 6 霉菌 ITS 区域的 PCR 扩增产物

Fig. 6 Amplified products of the ITS sequences of mold

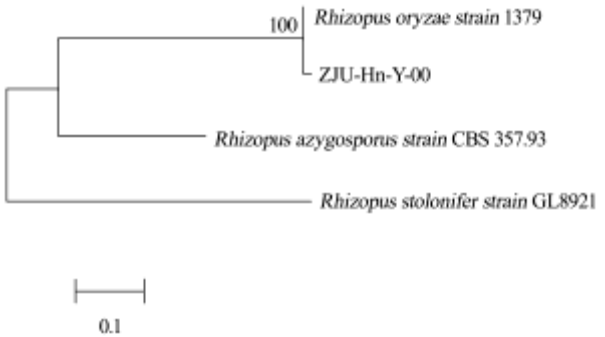


图 7 霉菌基于 ITS 序列的系统发育树

Fig.7 Phylogenetic tree of the mold according to ITS sequences

对霉菌的ITS区进行扩增，经电泳检测，产物大小为500 bp（见图6）。将扩增产物送样测序，结果在NCBI数据库中比对并构建系统发育树（见图7）。由图7可得，发酵剂中分离到的霉菌为*Rhizopus oryzae*，即米根霉，它能糖化淀粉，转化蔗糖，产生乳酸、反丁烯二酸及

微量酒精。有些地方的发酵剂制作时要接种一定量的酒曲，酒曲中含有作为糖化发酵剂的霉菌，而米根霉就为其中重要的霉菌之一。

3 结论

采用分离、纯化，形态观察、生理生化试验和分子鉴定技术对河南地区采集的发酵剂中微生物菌群进行了分析，结果发现分离的30株酵母菌中主要以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为主，共11株，其次为异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)6株、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)8株和扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*)5株；分离的28株乳酸菌中以植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)为优势菌，共13株，其次是粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)8株及干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)7株。此外，在所采集的面食发酵剂样品中还分离到一种霉菌，经鉴定为米根霉(*Rhizopus oryzae*)。

参考文献

[1] 苏东海.馒头酵母的分离与筛选[J].农产品加工,2008,7:82-84
Su D H. Separation and filtration for bread yeast [J].Academic Peripdical of Farm Products Processing, 2008, 7:82-84

[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.
Yang J Y, Liu C H. Industrialization of Chinese traditional Jiaozi [J]. Food Research and Development, 2007, 28(2): 164-166

[3] 张国华,何国庆.我国传统馒头发酵剂的研究现状[J].中国食品学报,2012,12(11):115-120
Zhang G H, He G Q. Traditional starter cultures of Chinese steamed bread [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(11): 115-120

[4] 倪慧娟.新疆地区和青海地区传统发酵乳制品中酵母菌的生物多样性[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2009
Ni H J. Identification and biodiversity of yeasts isolated from traditional fermented milk products in Xinjiang and Qinghai of China [D]. Hohhot: Inner Mongolia agricultural university, 2009

[5] 巴尼特 J A.酵母菌的特征与鉴定手册[M].胡瑞卿译.青岛:青岛海洋大学出版社,1990
Barnett J A. Characteristics and Identification of Yeast manual [M]. Hu Ruiqing translation. Qingdao: Qingdao ocean university press, 1990

[6] Cavazza A, Grando M S, Zini C. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini [J]. Vigevini 9, 1992, 17-20

[7] 杨莹,徐艳文,薛军侠,等.WL 营养琼脂对葡萄酒相关酵母的鉴定效果验证[J].微生物学杂志,2007,27(5):75-78
Yang Y, Xu Y W, Xue J X, et al. Validate the identification effect of WL nutrient agar on wine yeast [J]. Journal of microbiology, 2007, 27(5): 75-78

[8] Viana F, Gil J V, Vallés S, et al. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135(1): 68-74

[9] Sáez JS, Lopes CA, Kirs VC, et al. Enhanced volatile phenols in wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and spoiled with *Pichia guilliermondii* and *Dekkera bruxellensis* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(2): 170-176

[10] Aldo Corsetti, Luca Settanni. Lactobacilli in sourdough fermentation [J]. Food Research International, 2007, 40: 539-558

[11] A Hansen, P Schieberle. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: Applied and fundamental aspects [J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16: 85-94

[12] Shan-na Liu, Ye Han, Zhi-jiang Zhou. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods [J]. Food Research International, 2011, 44: 643-651