传统酸面团中细菌与酵母菌的分离与鉴定

刘同杰[1]，李云[1]，吴诗榕[1]，金乐天[1,2]，张国华[1]，杨浣漪[1]，何国庆[1]

（1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院，浙江省食品微生物技术重点实验室，浙江大学馥莉食品研究院，浙江杭州 310058）（2. 朝鲜韩德秀平壤轻工业大学，朝鲜平壤）

摘要：为进一步描述我国传统面食发酵剂的理化性质和菌落组成，收集了北方地区 6 份发酵剂样品，测定了其酸度和菌落总数，并对分离、纯化、初筛后得到的 75 株细菌和 60 株酵母菌进行了测序鉴定。结果显示，样品 pH 值范围为 3.73~5.46，总滴定酸度为 8.3~19.8 mL；乳酸菌和酵母菌的计数结果分别为 8.35±0.07~9.75±0.12 Log cfu/g，6.31±0.22~8.68±0.04 Log cfu/g。鉴定出包括短乳杆菌（*Lactobacillus brevis*）、植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）和旧金山乳杆菌（*Lactobacillus sanfranciscensis*）在内的乳酸菌 8 种；酵母菌 4 种，其中优势菌为酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）；其他细菌 6 种，主要为解淀粉芽孢杆菌（*B. amyloliquefaciens*）、地衣芽孢杆菌（*B. licheniformis*）和醋杆菌。结果表明，我国传统面食发酵剂菌相复杂，以酵母菌和乳酸菌为主，还包括芽孢杆菌、醋酸杆菌在内的多种其他细菌，甚至可能含有致病菌。通过比较细菌和酵母在不同酸面团样品中的分布，发现不同来源样品的微生物种类组成存在差异。

关键词：酸面团；菌相分析；16S/26S rDNA 测序；生物多样性；系统发育树

文章篇号：1673-9078(2014)9-114-120 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.020

Isolation and Identification of Bacteria and Yeast from Chinese Traditional Sourdough

LIU Tong-jie[1], LI Yun[1], WU Shi-rong[1], JIN Le-tian[1,2], ZHANG Guo-hua[1], YANG Huan-yi[1], HE Guo-qing[1]

(1.College of Biosystems Engineering and Food Science of Zhejiang University, Zhejiang provincial key laboratory of Food Microbiology, Fuli Institute of Food Science of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

(2.DPRK Han Dexiu Pyongyang University of light industry, Pyongyang, DPRK)

Abstract: In this study, the physicochemical properties and microbial profile of traditionally fermented sourdough for Chinese steamed bread were examined. Six samples of sourdough were collected from northern China. Acidity and colony counts were measured. After isolation, purification, and preliminary screening, 75 strains of bacteria and 60 strains of yeasts were obtained and identified by DNA sequencing. The pH was between 3.73 and 5.46 and total titratable acid (TTA) values ranged from 8.3 to 19.8 mL. In all the samples, the number of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts ranged from 8.35±0.07 to 9.75±0.12 Log cfu/g and 6.31±0.22 to 8.68±0.04 Log cfu/g, respectively. Eight LAB species, including *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, and *L. sanfranciscensis*, and six other bacterial species, including *Bacillusamyloliquefaciens*, *Bacilluslicheniformis*, and three species of *Acetobacter*, were identified. Among the four identified yeasts, the dominant species was *Saccharomyces cerevisiae*. The results indicate that Chinese traditional starter cultures for flour-based food are complex bacterial floras dominated by LAB and yeast, in addition to several other microorganisms, including *Bacillus* spp., *Acetobacter* spp., and even pathogenic bacteria. Differences in microbial species compositions among LAB and yeasts in samples from different areas were identified by comparing species distributions in different sourdough samples.

Key words: sourdough; elucidation of microbial flora structure; 16S/26S rDNA sequencing; biodiversity; phylogenetic tree

我国传统的面食发酵剂类似于西方发酵面包用的酸面团，在我国一般被称为“老面”、“酵子”、“面肥”等[1]，具有悠久的使用历史。上世纪 80 年代，即发活性干酵母被引入我国，因其使用便捷，传统面食发酵剂逐渐被取代，但直到现在仍有很多地区尤其农村地区，仍然使用其制备馒头等主食，因使用传统面食发酵剂制备的馒头品质更优。究其原因，活性干酵母为单一菌种发酵，与传统发酵剂的混菌体系发酵相比，发酵的馒头风味平淡、香气不佳，总体的感官品

收稿日期：2014-04-17

基金项目：国家自然科学基金资助项目（31371826）

作者简介：刘同杰（1989-），男，在读博士，研究方向：传统发酵食品

通讯作者：何国庆（1957-），男，博士，教授，研究方向：食品生物技术及发酵工程

质低，复蒸性能差[2]。而传统发酵剂中包含以酵母菌和乳酸菌（lactic acid bacteria，LAB）为主[3]的多种微生物，面团发酵时各种微生物同时起作用，协同进行糖化、蛋白分解、酯化、产气等过程，代谢物质丰富，因而发酵的面食感官品质更佳。酵母菌发酵产生大量气体，使面团体积膨大，面团蓬松；乳酸菌则酸化面团，改善面团质构，产生包括挥发酸在内的各种风味成分。此外，乳酸菌分泌的胞外多糖可以延缓面制品老化，产生的抑菌物质可以有效抑制有害细菌和真菌的生长，延长馒头、面包等的保藏时间等。这些都是单一的酵母发酵所欠缺的，因而采用传统面食发酵剂制作的馒头、包子等食品深受人们的喜爱。但是，由于传统发酵是混菌体系发酵，且易受环境因素、个人经验等因素的影响，造成产品品质的不稳定。而且，传统发酵剂大多为自然发酵，家庭自用或作坊式生产，卫生条件较差，其中可能含有一些杂菌甚至是有害菌，而以往的菌相研究绝大多数集中于酵母和乳酸菌，忽略了其他的菌群，致使无法全面地解析传统发酵剂的菌相。

西方国家对酸面团已经开展了几十年的研究，有力地促进了其传统主食面包的工业化。相比之下，我国对传统面食发酵剂的研究起步较晚，目前，主要集中于对传统发酵剂菌相的研究，发酵剂制备工艺的改良，优良菌种的筛选与复配等，尚缺乏对酸面团发酵机理的研究。而对其开展深入研究是提升传统主食的品质，促进其工业化生产，保证食品安全的基础。本文在实验室已有工作的基础上[4]，对采自六个省份的传统发酵剂中的优势酵母、乳酸菌以及其他细菌进行了分离、纯化与鉴定，进一步了解我国传统发酵剂中的优势菌群和存在的微生物种类，为后续研究各微生物相互作用及其影响酸面团发酵的机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源

从以馒头为主食的地区收集了六份传统面食发酵剂，分别收集自山西吕梁、陕西西安、河南安阳、河北石家庄、山东泰安和安徽亳州。酸面团收集后于冰箱中 4 ℃保存备用。

1.1.2 培养基及主要试剂

YPD 培养基（2%葡萄糖，2%蛋白胨，1%酵母膏，固体加入 2%琼脂粉）、WL 培养基[5]、SDB 培养基[6]、牛肉膏蛋白胨培养基（牛肉膏 0.3%，蛋白胨 1%，NaCl 0.5%，琼脂粉 2%，pH 7.2~7.4）、MRS 培养基，杭州微生物试剂有限公司；M17 培养基，青岛海博生物技术有限公司；Axygen 细菌基因组 DNA 提取试剂盒，杭州爱思进生物技术有限公司；基因组 DNA 快速抽提试剂盒（酵母），上海生工生物工程股份有限公司；DNA 聚合酶，宝生物工程（大连）有限公司。

1.1.3 主要仪器

YQX-Ⅱ型厌氧培养箱，上海新苗医疗器械制造有限公司；Powerpac Basic 电泳仪，ALS-1296 PCR 仪，BioRad 生命医学产品有限公司；5417R 冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司；PB-10 型 pH 计，德国 Sartorius 公司；ChamGel 5000 凝胶成像仪，北京赛智创业科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 酸面团酸度与菌落总数的测定

1.2.1.1 pH 值与可滴定酸度（Titratable Acidity，TTA）的测定

称取 10 g 酸面团样品，加入到 90 mL 蒸馏水中，磁力搅拌器中速搅拌 10 min 至酸面团样品呈完全悬浮。以酸度计测定该悬浊液的 pH 值，即为酸面团样品的 pH 值。以 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液滴定该悬浊液至 pH 值为 8.5 时，所消耗的 NaOH 的体积（mL）即为该酸面团样品的 TTA 值。每份样品平行测定 3 次。

1.2.1.2 微生物菌落总数测定

无菌条件下称取酸面团样品 5 g，加入到 45 mL 灭菌后的生理盐水（0.85%，*m/V*）中，用灭菌后的玻璃棒搅拌至样品彻底均匀悬浮，取 1 mL 悬浮液 10 倍梯度稀释至 10^{-7}。酵母菌的计数采用平板涂布法，取梯度 10^{-4}~10^{-6}，每个稀释度取 100 μL 稀释液均匀涂布于 YPD 培养基上，28 ℃培养 48 h 后进行计数。乳酸菌的计数采用倾注法，取梯度 10^{-5}~10^{-7}，每个稀释度取 1 mL 稀释液到无菌培养皿中，倒入 SDB 培养基混匀，于 30 ℃下厌氧培养 48 h~72 h 后计数。每个梯度做三个平行。

1.2.2 乳酸菌的分离纯化

样品稀释方法同菌落计数，下同。取梯度 10^{-5}~10^{-7}，从每个梯度吸取 100 μL 样品稀释液均匀涂布于 MRS、M17 和 SDB 三种不同培养基上，分别在 37 ℃、有氧（MRS，M17）和 30 ℃、厌氧（MRS，M17，SDB）两种培养条件下 48 h~72 h。选取合适的稀释度（菌落数在 30~300 之间），挑选疑似乳酸菌 10~15 株，接种到相应的液体培养基上，在上述条件下培养 24 h 后进行划线纯化，经 3~5 次纯化后获得纯菌落。对得到的纯培养物进行过氧化氢酶试验和革兰氏染色，并镜检观察。将过氧化氢酶阴性，且革兰氏

染色阳性的菌株初步视为乳酸菌；反之，镜检观察后根据其细胞形态，将其归为酵母或其他种类细菌。

1.2.3 乳酸菌的初步分类

根据乳酸菌镜检的结果，将乳酸菌分为杆状、短小杆状和球状；对于杆状和短小杆状菌根据其在 15 ℃和 45 ℃时的生长能力进行分组；对于球状菌，根据其在 pH 9.6 和 6.5% NaCl 条件下的生长能力进行分组。

1.2.4 酵母菌和其他细菌的分离纯化

选择梯度 10^{-3}~10^{-6}，每个梯度吸取 100 μL 样品稀释液均匀涂布于 YPD 培养基和牛肉膏蛋白胨培养基，分别在 28 ℃、37 ℃条件下培养 48 h 后，从合适的稀释度（菌落数在 30~300 之间）挑选酵母菌和细菌，其中，每个样品挑取酵母菌 10~15 株，细菌数量则根据其生长状况挑选。随后接种到相应的液体培养基中，相同温度条件下培养 48h 后划线纯化，划线 3~5 次获得纯的酵母菌和细菌菌株。

1.2.5 酵母菌 WL 培养基初步分类

将获得的纯酵母菌株划线接种于 WL 琼脂培养基，28 ℃培养 5~7 d 后，根据菌落的颜色与形态进行初步的分类，结合文献报道初步判定酵母类别。

1.2.6 DNA 提取与 PCR

根据试剂盒的说明书分别提取酵母菌和细菌的基因组 DNA，并进行 PCR 扩增。其中 PCR 的反应体系为：10×buffer（Mg^{2+}）5.0 μL，dNTPs（2.5 mM）4.0 μL，正、反向引物各 3 μL，ExTaq DNA 聚合酶（5 U/μL）0.25 μL，DNA 模板 2 μL，用无菌去离子水补齐至 50 μL。其中，酵母菌的扩增引物为 NL1：GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG，NL4：GGTCCGTGTTTCAAGACGG；乳酸菌和其他细菌的扩增引物为 16S rDNA 通用引物 27F 和 1492R。酵母菌 DNA 的 PCR 条件如下：94 ℃预变性 5 min； 94℃变性 30 S，55 ℃退火 30 S，72 ℃延伸 60 S，30 个循环；72 ℃终延伸 10 min。细菌 DNA 的 PCR 条件为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 S，56 ℃退火 30 S，72 ℃延伸 60 S，30 个循环；72 ℃终延伸 10 min。

1.2.7 琼脂糖凝胶电泳检测与 DNA 测序及系统发育树的构建

PCR 产物经 0.8%（*m/V*）琼脂糖凝胶电泳检测后，送上海睿迪生物科技有限公司测序。登录 NCBI 数据库将所得序列与已知序列进行比对。用软件 MEGA6.05 进行序列分析，并采用 Neighbor-Joining 法进行系统发育分析，构建进化树。

1.2.8 数据统计分析

酸面团酸度测定与菌落总数测定实验使用 Microsoft Excel 2010 进行数据分析，结果用平均值±SD 值表示。实验组之间的差异用 ANOVA 进行分析比较，P<0.05 为差异显著，P<0.01 为差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 酸面团酸度与菌落计数结果

表 1 酸面团样品酸度与菌落计数结果

Table 1 The acidity and results of enumeration of LAB and yeasts of the sourdough samples

样品编号	来源	pH	TTA/(10^{-1}mL/g)	菌落计数/(Log cfu/g)	
				酵母菌	乳酸菌
SX	山西	3.77±0.01	17.77±0.20	7.86±0.05	8.56±0.08
AH	安徽	3.87±0.02	13.55±0.08	7.49±0.05	8.50±0.05
TA	山东	3.73±0.03	13.13±0.16	7.85±0.07	9.57±0.06
XA	陕西	3.88±0.03	17.27±0.08	7.81±0.03	9.53±0.01
HN	河南	5.46±0.01	8.30±0.13	8.68±0.04	8.35±0.07
HB	河北	4.03±0.04	19.80±0.05	6.31±0.22	9.75±0.12

酸面团样品的酸度测定和菌落计数结果见表 1。所有样品的 pH 值处于 3.73~5.46 之间，TTA 在 8.3~19.8 之间，总体酸度较高，与国内外已报道的酸面团的酸度基本一致[2,7~8]。其中，河南样品的 pH 与 TTA 值与其他样品相差较大，pH 值最高，TTA 值最低。可能的原因是河南样品以干燥粉末状存在，其中的挥发性酸类在样品贮存的过程中损失较大，导致酸度降低。其余样品的 pH 值相差不大，但有趣的是，TTA 值却呈现不同的变化：河北样品的 pH 值较高，说明氢离子浓度相对较低，但其 TTA 值却显著高于所有样品（P<0.01）；山西样品与山东样品，安徽样品与陕西样品的 pH 值均没有显著差异（P>0.05），但 TTA 之间却有极显著的差异（P<0.01），表明各样品包含的有机酸的种类不尽相同，进而推测各样品所包含的产酸微生物的种类和数量也有差异。通常认为，酸面团中的乳酸菌与酵母菌数量比为 100:1，此时的酸面团达到较佳稳定状态。从菌落计数结果看，酵母菌的菌落数在 10^6~10^8cfu/g，而乳酸菌菌落数达到 10^8~10^9 cfu/g，与大多数的报道结果一致[2,7~8]。从各个样品来看，只有山东和陕西的样品中乳酸菌和酵母菌的的比例接近 100：1，河北样品中乳酸菌与酵母菌的比例甚至超过了 1000:1，而山西和安徽样品中的比例不到 10:1，形成鲜明对比的是，河南样品中酵母菌数量甚至多于乳酸菌数量。这或许表明，不同地区的样品中含有不同的乳酸菌组成，不同的乳酸菌与酵母具有不同生长抑

制或协同作用，因而具有不同的数量组成。

2.2 乳酸菌的分离纯化与鉴定

经分离纯化与革兰氏染色观察、过氧化氢酶检验后，得到了乳酸菌 176 株，其中杆菌 168 株，球菌 8 株。根据细胞形态和生长能力将所得到的 176 株乳酸菌分成 9 组（表 2）。依据发酵剂样品来源，并结合乳酸菌的分组情况，每个样品选取 10~12 株乳酸菌进行 16S rDNA 测序鉴定,总共选取了 65 株。提取这 65 株乳酸菌的基因组 DNA，并以此为模板扩增 16S rDNA，经电泳检测（图 1），扩增的条带长度约 1600 bp。将 PCR 产物测序结果在 NCBI 中进行比对，并构建系统发育树（图 2）。

表 2 乳酸菌的表型分类

Table 2 Phenotypic grouping of LAB

特征	分类								
	Ⅰ (n=10)	Ⅱ (n=3)	Ⅲ (n=47)	Ⅳ (n=107)	Ⅴ (n=2)	Ⅵ (n=45)	Ⅶ (n=1)	Ⅷ (n=2)	Ⅸ (n=5)
形态	杆	杆	杆	杆	短杆	短杆	球	球	球
生长状态：									
15℃	-	-	+	+	-	+	n.d.	n.d.	n.d.
45℃	-	+	-	+	-	+	n.d.	n.d.	n.d.
pH 9.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	+	+
6.5%NaCl	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	+

注：+表示观测到菌体生长，-表示未观察到菌体生长，n.d.表示未测定，n表示每类的菌株数。

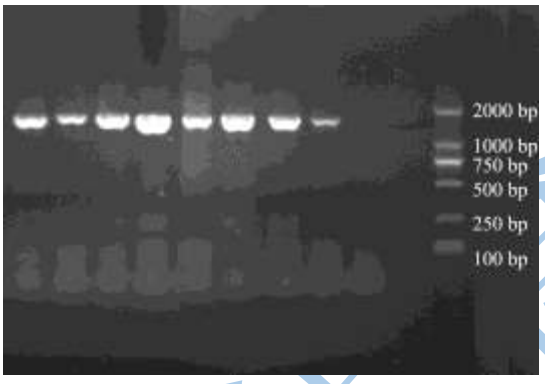

图 1 部分乳酸菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物

Fig.1 Amplified products of 16S rDNA sequences of several lactic acid bacteria strains

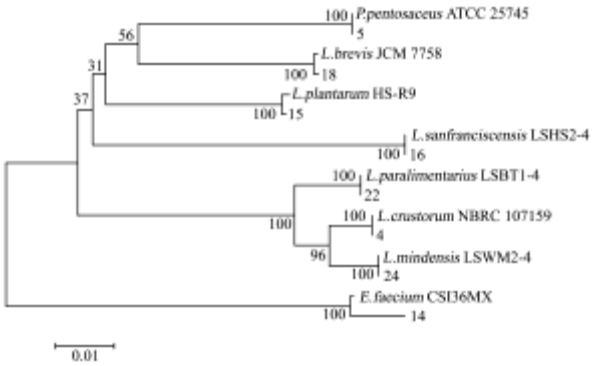

图 2 乳酸菌基于 16S rDNA 的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of the LAB strains according to 16S rDNA sequences

从图 2 可知，测序菌株与比对菌株以非常高的置信度处于同一分支上，因此可判定，鉴定的 65 株的乳酸菌共有 8 种，分别为短乳杆菌（*Lactobacillus brevis*）20 株、植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）10 株、旧金山乳杆菌（*Lactobacillus sanfranciscensis*）10 株、面包乳杆菌（*Lactobacillus crustorum*）8 株、戊糖片球菌（*Pediococcus pentosaceus*）7 株、类食品乳杆菌（*Lactobacillus paralimentarius*）5 株、明登乳杆菌（*Lactobacillus mindensis*）4 株、粪肠球菌（*Enterococcus faecium*）1 株。从数量上看，短乳杆菌最多，其次为植物乳杆菌和旧金山乳杆菌。国外研究表明，植物乳杆菌、旧金山乳杆菌和短乳杆菌为西方传统酸面团中的优势菌，且旧金山乳杆菌仅被发现于酸面团中。这表明我国传统面食发酵剂与西方传统酸面团在乳酸菌组成上确有相似之处。植物乳杆菌、旧金山乳杆菌和短乳杆菌都可以进行异型发酵，代谢产物中除乳酸外还有有机酸、醇、醛等，是酸面团发酵风味或风味前体物的重要来源。相对于前面三种乳酸菌，面包乳杆菌、明登乳杆菌和类食品乳杆菌均较晚被发现，且都发现于传统酸面团中，其中，面包乳杆菌和明登乳杆菌都属于植物乳杆菌类群，16S rDNA 测序表明它们具有较近的亲缘关系。从分布上看（表 3），河南样品中的乳酸菌种类最多，其次是陕西样品，山西样品最少，仅检测到了短乳杆菌。在所有样品中，短乳杆菌和植物乳杆菌分布最广泛，六个样品中的四个样品中能够检测到。而粪肠球菌和戊糖片球菌仅在河南样品中发现，明登乳杆菌仅在陕西样品中检测到。值得注意的是，六个样品中任两个样品乳酸菌种类组

成均不相同，这也印证了之前关于酸面团总酸度不同可能是由于乳酸菌组成不同的假设。

表 3 各样品中不同乳酸菌的种类分布

Table 3 Distribution of LAB in different samples

乳酸菌种类	样品来源					
	河北	陕西	山西	河南	山东	安徽
Lactobacillusbrevis			7/20	2/20	1/20	10/20
Lactobacillusplantarum		1/10		3/10	5/10	1/10
Lactobacillussanfranciscensis	7/10	3/10				
Lactobacilluscrustorum				6/8	2/8	
Pediococcus pentosaceus				7/7		
Lactobacillus paralimentarius	2/5	3/5				
Lactobacillus mindensis		4/4				
Enterococcus faecium				1/1		

注：分母表示对应菌种分离到的总株数，分子表示该菌在对应样品中分离到的株数。

2.3 酵母菌的分离纯化与鉴定

2.3.1 酵母菌的 WL 培养基分离

经乳酸菌筛选和 YPD 培养基分离纯化与镜检，共挑选酵母菌 90 株，将其全部接种到 WL 培养基培养观察后，根据菌落特征和形态及培养基颜色变化分成 4 类（见图 3）。Ⅰ类培养基绿色，菌落呈奶油色带绿色，球形突起，表面光滑，不透明，奶油状；Ⅱ类培养基绿色，菌落中央奶油色，边缘绿色，扁平光滑，不透明；Ⅲ类培养基蓝色，菌落白色，表面粗糙，不透明；Ⅳ类培养基淡绿色，近无色，菌落白色，表面粗糙，可见绒毛，菌落较大。根据 Cavazza 等[9]、杨雪峰等[5]等对酵母在 WL 培养基上的特征描述，初步判定Ⅰ类可能为酿酒酵母，Ⅱ类可能为假丝酵母，Ⅲ类、Ⅳ类则未提及。

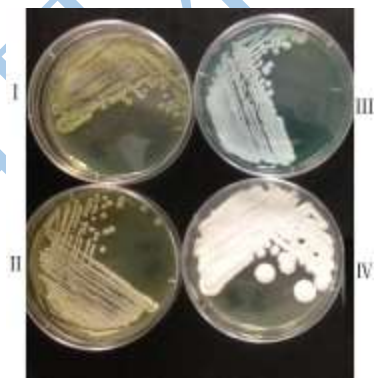

图 3 酵母菌在 WL 培养基上的不同形态

Fig.3 Different morphology of the yeasts on WL media

2.3.2 酵母菌 DNA 提取与测序分析

根据样品来源并结合菌落形态分组，每个样品中选取 10~15 株酵母提取基因组 DNA，并以其为模板，对 26S rDNA 的 D1/D2 可变区进行 PCR 扩增，经电泳检测扩增条带长约 600 bp（图 4），送样测序后，将结果与 NCBI 数据库进行比对并构建系统发育树（图 5）。

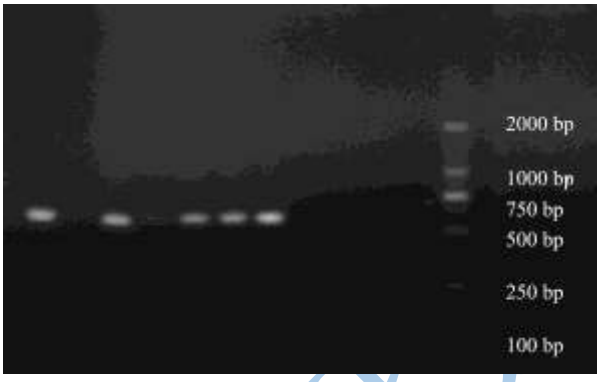

图 4 部分酵母菌 26S rDNA D1/D2 可变区的 PCR 产物

Fig.4 Amplified products of the D1/D2 variable domain sequences of several yeast strains

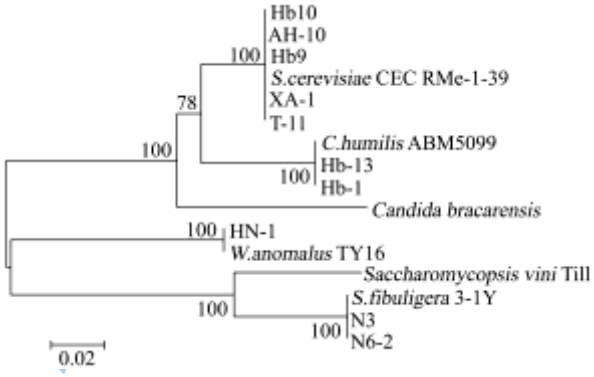

图 5 酵母菌基于 26S rDNA D1/D2 区序列的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of the yeast strains according to 26S rDNA D1/D2 domain sequences

鉴定发现选取的 60 株酵母中共包含 4 类，分别为酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、假丝酵母 *Candida humilis*、异常威克汉姆酵母（*Wickerhamomyces anomalus*，也称异常毕赤酵母，*Pichia anomala*）、扣囊复膜酵母（*Saccharomycopsis fibuligera*）。无论从数量还是分布上看，酿酒酵母都是主要的菌种，鉴定的 60 株酵母中有 48 株为酿酒酵母，且在所有样品中均有发现。而 *Candida humilis* 仅发现于河北样品中，异常威克汉姆酵母和扣囊复膜酵母仅发现于河南样品中，其余样品都仅发现酿酒酵母。这表明酿酒酵母确是传统面食发酵剂中的最主要的酵母菌，这与西方传统酸面团中基本以酿酒酵母为优势菌的结果相一致，结合实验结果和已报道的结果，基本可以断定中西方的传统酸面团中酿酒酵母均为优势酵母。酿酒酵母代谢产生的二氧化碳被面团中面筋蛋白与淀粉粒构成的三维结构包裹，无法逸出，导致面团的体积增大，在热加工过程中气体体积增大，从而使面团的体积蓬松。同时，酵母代谢产生的乙醇在发酵

的过程中与乳酸菌产生的有机酸类反应生成酯类物质，是发酵面团风味物质的来源之一。*Candida humilis* 也属于酸面团中的常见酵母菌，在一些硬质小麦的麦麸面粉酸面团中作为优势菌存在[10]，因其不能代谢麦芽糖，通常与旧金山乳杆菌共存，因后者在代谢过程中可利用麦芽糖产生葡萄糖供前者利用。本文在河北样品中同时发现了两种菌，印证了 *Candida humilis* 与 *Lactobacillussanfr anciscensis* 之间密不可分的联系。异常威克汉姆酵母也是酸面团中经常发现的酵母，虽然频率低于酿酒酵母和 *Candida humilis*，但在一些酸面团中以优势菌或唯一检出的酵母菌存在[11]。且有研究发现，异常威克汉姆酵母在面团发酵过程中可以产生抑制真菌生长的物质，能延长面包的货架期[12]。扣囊复膜酵母虽然不是酸面团中的常见菌种，但却广泛地分布于淀粉质物料中，是一种重要的商业化菌种，其自身可以产生淀粉酶直接分解淀粉，并可将淀粉分解为海藻糖[13]。除了可以分泌淀粉酶外，扣囊复膜酵母还可以分泌酸性蛋白酶、β-葡糖苷酶，并已被广泛应用于发酵和制药工业。由上述可知，除主要的酿酒酵母外，*Candida humilis*、异常威克汉姆酵母和扣囊复膜酵母也是或有望成为酸面团发酵过程中重要的菌种，适当发挥它们的发酵特性有利于提高发酵面制品的品质。

2.4 其他细菌的分离纯化与鉴定

经乳酸菌筛选和牛肉膏蛋白胨培养基分离纯化，共获得 10 株非乳酸菌细菌，提取这 10 株菌的基因组 DNA 并经 PCR 扩增后测序，构建系统发育树（见图 6）。如图所示，这 10 株非乳酸菌细菌包括 6 种，分别为解淀粉芽孢杆菌（*B. amyloliquefaciens*）4 株，地衣芽孢杆菌（*B. licheniformis*）2 株，藤黄微球菌（*M. luteus*）1 株，热带醋酸菌（*A. tropicalis*）1 株，巴氏醋酸杆菌（*A. pasteurianus*）1 株，奥尔兰醋杆菌（*A. orleanensis*）1 株。解淀粉芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌有很高的亲缘关系，均属于枯草芽孢杆菌类群，该类群细菌具有极高的产酶能力，可产生大量的 α-淀粉酶和蛋白酶，是目前生产淀粉酶和蛋白酶重要的基因工程菌和目的基因来源菌。可以推定，它们在面团发酵的过程中，分解淀粉和蛋白质，可以提供其他微生物生长所需的单糖、双糖、氨基酸等营养物质，以及为风味物质的产生提供必要的前提物质。同时，解淀粉芽孢杆菌在代谢过程中产生的一些代谢产物可以广泛抑制有害微生物的生长繁殖[14]。值得注意的是，在山西样品中还发现了一株藤黄微球菌，属于条件致病菌，这表明传统发酵剂中可能存在有害菌。此外，还从河南和河北样品中分离到了三株醋酸杆菌，醋酸杆菌代谢产生的醋酸是酸面团特征风味成分，还可以改善质构，抑制腐败微生物生长等。

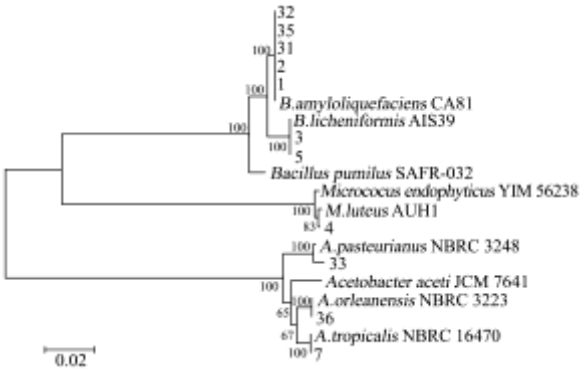

图 6 非乳酸细菌基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of the non-LAB strains according to 16S rDNA sequences

2.5 不同发酵剂菌相分析与比较

从表 4 可见，6 个样品中所含的菌种组成均不相同，河南样品所含的种类最多，共发现 12 种，包括 5 种乳酸菌、3 种酵母菌、2 种芽孢杆菌和 2 种醋酸杆菌。且 *Pediococcus pentosaceus*，*Enterococcus faecium*，*A. tropicalis* 和 *A. pasteurianus* 仅发现于河南样品中，该样品是研究传统发酵剂菌种多样性的宝贵资源。河南样品中的产酸菌种类最多，且数量与其他样品相差无几，但是酸度却是最低的，原因可能如前所述，因其存在形式为干粉状，其中的微生物代谢较弱，产生的酸挥发损失较多，从而导致酸度较低。从河北样品分离到 7 种微生物，与其他样品以 *Lactobacillus brevis* 或 *Lactobacillus plantarum* 为优势乳酸菌不同，*Lactobacillus sanfranciscensis* 在河北样品中占主导地位，且没有发现前两种菌。*Lactobacillus sanfrancis censis* 属于酸面团固有菌种，产酸柔和，使面团具有优良的感官品质，在西方的酸面团中扮演着重要的角色。*Candida humilis* 常与 *Lactobacillus sanfranciscensis* 协同存在，虽然陕西样品中也发现了 *Lactobacillus sanfranciscensis*，却未发现 *Candida humilis*，可能是因为陕西样品中 *Lactobacillus plantarum* 为优势菌，无法保证 *Candida humilis* 生长需要的葡萄糖。陕西样品中发现了 4 种乳酸菌，包括仅发现于其中的 *Lactobacillus mindensis*，酿酒酵母是其中唯一的酵母，此外未发现其他细菌。从菌种分布上看，*Saccharomyces cerevisiae* 分布最广，存在于所有样品中；*Lactobacillus brevis* 和 *Lactobacillus plantarum* 在 67%（4 个）的样品中被发现，且两者同时存在于河南、山东和安徽样品中，该组合出现的频率高于其他乳酸菌的两两组合。*B.*

amyloliquefaciens 和 *B. licheniformis* 同时存在于河北、河南两样品中，*B. amyloliquefaciens* 则单独存在于山东样品中，这两种细菌在酸面团中出现频率相对较高，其他微生物出现的频率则相对较低，大多仅在一种样品中发现。对比发现，我国传统面食发酵剂中的优势酵母和乳酸菌与西方传统的酸面团基本一致，两者应该具有相同的发酵机理，西方对酸面团的研究可以为我们研究传统面食发酵剂提供良好的借鉴。

表 4 不同发酵剂样品中检测到的细菌和酵母菌种类

Table 4 Distribution of LAB and yeasts species in the sourdough samples

种类	样品来源					
	河北	陕西	山西	河南	山东	安徽
乳酸菌						
Lactobacillus brevis			+	+	+	+
Lactobacillus plantarum		+		+	+	+
Lactobacillus sanfranciscensis	+	+				
Lactobacillus crustorum				+	+	
Pediococcus pentosaceus				+		
Lactobacillus paralimentarius	+	+				
Lactobacillus mindensis		+				
Enterococcus faecium				+		
酵母菌						
Saccharomyces cerevisiae	+	+	+	+	+	+
Candida humilis	+					
Wickerhamomyces anomalus				+		
Saccharomycopsis fibuligera				+		
其他细菌						
B. amyloliquefaciens	+			+	+	
B. licheniformis	+			+		
M. luteus			+			
A. tropicalis				+		
A. pasteurianus				+		
A. orleanensis	+					

注：+表示样品中发现此菌种。

3 结论

通过对六份传统面食发酵剂样品的酸度指标和微生物指标进行测定分析发现，酸面团样品具有较低的 pH 值和较高的总酸度值，其中微生物的组成以乳酸菌和酵母菌为主，且主要为乳酸杆菌属和酿酒酵母，不同来源的酸面团菌相差别较大。对其中的细菌与酵母进行鉴定，发现 8 种乳酸菌，分别为短乳杆菌（*Lactobacillus brevis*）、植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）、旧金山乳杆菌（*Lactobacillus sanfranciscensis*）、面包乳杆菌（*Lactobacillus crustorum*）、戊糖片球菌（*Pediococcus pentosaceus*）、类食品乳杆菌（*Lactobacillus paralimentarius*）、明登乳杆菌（*Lactobacillus mindensis*）、粪肠球菌（*Enterococcus faecium*），从数量和分布上看，短乳杆菌与植物乳杆菌为优势菌种；发现 4 种酵母菌，分别为酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、*Candida humilis*、异常威克汉姆酵母（Wickerhamomyces anomalus，也称异常毕赤酵母）、扣囊复膜酵母（*Saccharomycopsis fibuligera*），酿酒酵母是优势菌种；6 种其他细菌，分别为解淀粉芽孢杆菌（*B. amyloliquefaciens*），地衣芽孢杆菌（*B. licheniformis*），藤黄微球菌（*M. luteus*），热带醋酸菌（*A. tropicalis*），巴氏醋酸杆菌（*A. pasteurianus*），奥尔兰醋杆菌（*A. orleanensis*）。传统发酵剂菌相复杂，不同的样品中微生物的组成不尽相同，各种微生物共同作用于面团发酵过程，而赋予发酵面制品独特的风味和口感。对传统发酵剂进行菌相分析不仅是深入研究其发酵机理的前提条件，也是保障食品安全的重要措施，同时也将为提升传统主食的品质，实现传统主食工业化、标准化生产奠定基础。

参考文献

[1] 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 Guo-hua, HE Guo-qing. Traditional starter cultures of chinese steamed bread[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(11): 115-120

[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,200,28(2):164-166
YANG Jing-yu, LIU Chang-hong. Industrializationof chinese traditional Jiaozi [J].Food Research and Development, 2007, 28(2): 164-166

[3] Zhang J C, Liu W J, Sun Z H, et al. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China [J].Food Control, 2011, 22(5): 767-774

[4] 杨浣漪,张国华,何国庆.传统面食发酵剂中菌群多样性的研究[J].现代食品科技,2013,29(9):2115-2119
YANG Huan-yi, ZHANG Guo-hua,HE Guo-qing. Biodiversity of microorganismsin chinesetraditional starter cultures ecosystem [J]. Modem Food Science and Technology, 2013, 29(9): 2115-2119

[5] 杨雪峰,苏龙,刘树文.利用WL营养培养基鉴定葡萄酒中的相关酵母菌[J].中外葡萄与葡萄酒,2006,4:4-7

YANG Xue-feng, SU Long, LIU Shu-wen. Use WL medium to identify related yeasts in wine fermentation period [J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2006, 4: 4-7

[6] Kline L, Sugihara T. F. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity [J]. Applied microbiology, 1971, 21(3): 459-465

[7] Zhang G H, He G Q. Predominant bacteria diversity in Chinese traditional sourdough [J]. Journal of Food Science, 2013, 78(8): M1218-1223

[8] Viiard E, Mihhalevski A, Rühka T, et al. Evaluation of the microbial community in industrial rye sourdough upon continuous back-slopping propagation revealed *Lactobacillus helveticus* as the dominant species [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(2): 404-412

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

[10] Gullo M, Romano A D, Pulvirenti A, et al. *Candida humilis*-dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread [J]. International journal of food microbiology, 2003, 80(1): 55-59

[11] Daniel H M, Moons M C, Huret S, et al. Wickerhamomyces anomalus in the sourdough microbial ecosystem [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2011, 99(1): 63-73

[12] Coda R, Cassone A, Rizzello C G, et al. Antifungal Activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, **77**(10): 3484-3492

[13] Chi Z, Chi Z, Liu G, et al. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology [J]. Biotechnology advances, 2009, 27(4): 423-431

[14] Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens [J]. Microb Cell Fact, 2009, 8(63): 1-12

现代食品科技