

保宁醋醋曲中产香酵母的鉴定 及挥发性成分研究

钟正丹¹, 吴华昌^{2,*}, 邓静², 左上春¹, 刘阳¹, 李玉斌¹, 龚加路¹, 张建军¹

(1.四川理工学院生物工程学院, 四川自贡 643000;

2.四川旅游学院食品学院, 四川成都 641000)

摘要:从保宁醋醋曲中筛选出4株产香较强的酵母,通过真菌rDNA-ITS区PCR扩增及构建系统发育树,确定四株产香酵母Y7和Y9、Y10、Y18分别为异常威克汉姆酵母(*Wickerhamyces anomalus*)和口津假丝酵母(*Candida melibiosica*),采用GC-MS技术检测产香酵母发酵产物中的挥发性风味物质的种类和含量。结果表明:Y7、Y9、Y10、Y18风味物质种类数依次为26、30、21、22,其中,Y9、Y10、Y18的醇类物质种类较多,相对含量较高的为乙醇和苯乙醇,而Y7酯类物质种类最多,主要为具有浓郁果香的乙酸乙酯,其相对含量达到25.238%。产香酵母的风味物质种类及相对含量不同,可赋予食醋不同类型的香气,对于食醋的增香有着重要的意义。

关键词:保宁醋,产香酵母,分子鉴定,挥发性成分

Identification and study of fermentation metabolites of aroma-producing yeast strains from Baoning vinegar

ZHONG Zheng-dan¹, WU Hua-chang^{2,*}, DENG Jing², ZUO Shang-chun¹, LIU Yang¹, LI Yu-bin¹,
GONG Jia-lu¹, ZHANG Jian-jun¹

(1.College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000, China;

2.Department of Food Science, Sichuan Tourism University, Chengdu 641000, China)

Abstract:Four aroma-producing yeast strains were screened from 'qu' of Baoning vinegar. The fungal DNA-ITS area was amplified and the diagram of phylogenetic tree was constructed, which determined the four strains Y7 and Y9, Y10, Y18 were *Wickerhamyces anomalus* and *Candida melibiosica*, and the GC-MS technology was used to detect the species and relative content of volatile flavor in fermentation substances. The results showed that the flavor substances of Y7, Y9, Y10, Y18 were number of 26, 30, 21, 22, among them. The Y9, Y10, Y18 had more alcohols sort in species, and the higher relative content of alcohols sort was ethanol and benzene ethanol. The Y7 had more ester substances in species, among the ester substances, the relative content of ethyl acetate was up to 25.238%, which full of rich aroma. The species and relative content of aroma-producing yeast was difference, which gave different types of aroma to the vinegar, and had great significance for the flavored vinegar

Key words: Baoning vinegar; aroma-producing yeast; molecular identification; volatile components

中图分类号: TS264.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0206-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.036

保宁醋是一种传统酸性调味品,以六十多种中草药制曲发酵而成,是我国药醋的典型代表^[1]。保宁醋以其独特的酿造工艺而具有酸味柔和、香味浓郁、经久不腐等特点^[2],并富含多种氨基酸、维生素、微量元素等营养物质,因而深受广大消费者喜爱。

醋曲是保宁醋酿造主要的微生物来源,直接决定

保宁醋的质量与风味,以自然通风开放式制曲,其酿造微生物因开放式环境而多种多样,主要包括醋酸菌、乳酸、酵母、霉菌等微生物。而酵母菌是保宁醋酒精发酵阶段的重要微生物,将可发酵性糖转化为乙醇、风味成分及前体物质^[3],构建食醋的主体香味成分,其中产香酵母可产生众多芳香物质,具有明显增

收稿日期:2015-06-30

作者简介:钟正丹(1991-),女,硕士研究生,研究方向:分子生物学及代谢调控,E-mail:zzdan_dan@163.com。

* 通讯作者:吴华昌(1970-),男,教授,研究方向:传统发酵食品,E-mail:whc3930590@163.com。

基金项目:四川省教育厅科技成果重大培育项目(15CZ0029);四川省学术带头人后备人选基金;四川省科技支撑计划(2015NZ0037);四川理工学院研究生创新基金(y2014024)。

香作用,也有研究表明大量香气成分多在陈酿期生成^[4],陈酿时间过长,增加生产周期,降低产量;时间过短,风味不足,影响食醋品质,而产香酵母所产生的大量风味物质可缓解这一问题。目前,产香酵母广泛存在于白酒^[5]、果酒^[6]、酱油^[7-8]、甜面酱^[9]、食醋等传统发酵食品中。韩志双^[10]等人从麸醋醋醅筛得一株栗酒裂殖酵母,产酯量达到3.66 g/L,产酒精能力达到0.8825 mL/L。胡沂淮^[11]等人从洋河大曲中筛选到一株生香酵母,可产生27种风味成分,包括醇类、酮类、醛类、有机酸、脂类等典型的香味成分,赋予白酒独特的风味香型。但产香酵母的研究多涉及菌株选育、发酵条件优化、生理生化鉴定等方面,且多应用于白酒、果酒等酒类生产,关于从保宁醋醋曲中直接分离产香酵母及其分子鉴定和风味成分的研究尚未见报道。本实验通过分子生物学和固相微萃取-气质联用的方法,鉴定筛选产香酵母,并检测其发酵代谢产物中风味物质的种类和含量,为改善保宁醋的口感风味、缩短发酵周期提供有力的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

DL2000 DNA Marker、rTaq酶、dNTP等PCR相关试剂 购自大连宝生物有限公司;引物ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)、ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) 由invitrogen(中国)公司合成;保宁醋醋曲取自四川省保宁醋有限公司;YPD培养基 蛋白胨1%,酵母膏1%,葡萄糖2%,自然pH;麦芽汁培养基 购自广东环凯微生物科技有限公司,取130.1 g,加入蒸馏水1 L,搅拌加热煮沸至完全溶解,分装三角瓶,115 °C灭菌15 min;PDA培养基 马铃薯20 g,葡萄糖2 g,琼脂2 g,自来水100 mL,自然pH,121 °C灭菌20 min。

DY-6C型电泳仪 北京市六一仪器厂;S1000型PCR扩增仪、GelDoc 2000型紫外凝胶成像仪 美国Bio-Rad公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酵母菌的筛选 称取10 g醋曲样品于离心管中,并加入30 mL 0.8%的生理盐水,涡旋均匀,四层纱布过滤后,取2 mL滤液加入已灭菌的液体YPD培养基中,28 °C、150 r/min摇床24 h后,取1.0 mL菌液于盛有9 mL无菌水的试管中,依次用无菌水稀释,获得最终浓度为 10^{-3} ~ 10^{-5} 的稀释液,每个稀释度吸取100 μ L稀释液涂布于分离培养基上,28 °C倒置培养2~3 d,挑取疑似酵母单菌落进行镜检、分离、纯化并保藏。

1.2.2 酵母的产香能力比较 将纯化后酵母菌种接种于液体YPD培养基中,在28 °C下恒温振荡培养24 h后,以5%接种量接入液体发酵培养基中,在28 °C下恒温振荡培养3 d,嗅闻法^[12]判断是否产香。

1.2.3 产香酵母的形态鉴定 参照《真菌鉴定手册》^[13]和《酵母菌的特征与鉴定手册》^[14],将筛选得到的四株产香酵母菌接种于YPD培养基上,28 °C恒温培养20 h,观察酵母菌的细胞形态,继续培养到第4 d,观察酵母菌的菌落形态,并进行生理生化实验。

1.2.4 rDNA -ITS区基因序列扩增及同源性分析 参考倪振飞^[15]等人的方法提取酵母菌基因组DNA,采用引物ITS1/ITS4^[16]对酵母进行特异扩增。25 μ L PCR体系:2.5 μ L 10 \times Buffer,0.15 μ L (5 U/ μ L) Taq酶,1.5 μ L (25 mmol/L) MgCl₂,1 μ L (2.5 mmol/L) dNTP,0.5 μ L (10 μ mol/L) ITS1,0.5 μ L (10 μ mol/L) ITS4,17.85 μ L ddH₂O,1 μ L模板DNA。扩增程序:94 °C预变性3 min;94 °C变性30 s,57 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,34个循环,72 °C延伸10 min。空白对照用1 μ L无菌蒸馏水为模板。1%的琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外成像系统上拍照分析。样品PCR产物送往上海杰李生物有限公司测序。

构建系统发育树及同源性分析:在NCBI中对测序结果进行同源性比对(BLAST),利用ClustalX2.0对序列进行多重比对,使用Mega4.0软件采用Neighbor-joining法构建系统发育树,进行同源性分析。

1.2.5 顶空固相微萃取-气质联用法检测产香酵母的挥发性成分

1.2.5.1 菌种活化及发酵 挑取一环酵母菌种接种于YPD液体培养基中,在28 °C下恒温振荡培养24 h后,以5%接种量接入麦芽汁培养基中,在28 °C下恒温振荡培养5 d。

1.2.5.2 顶空固相微萃取 准确量取6 mL发酵液于15 mL顶空瓶中65 °C恒温水浴,将50/30 μ m DVB/CAR/PDMS萃取头插入顶空瓶中平衡10 min后吸附30 min(在固相微萃取装置上实现),将萃取头移入气相色谱的高温汽化室中解吸5 min,进行GC-MS分析。

1.2.5.3 GC-MS条件 色谱条件:毛细管色谱柱Agilent HP-INNOWax (60 m \times 0.25 mm,0.25 μ m);手动无分流进样,进样口温度230 °C,程序升温45 °C,保留3 min,以10 °C/min的速率升至200 °C,保留5 min;检测器温度230 °C,载气He,流速1 mL/min。

质谱条件:EI电离源,电子能量70 eV,扫描范围10~550 u,离子源温度230 °C,接口温度230 °C。

1.3 数据处理

实验数据处理由GC-MS数据分析软件系统完成,未知化合物经计算机检索同时与NSIT谱库和RTLPEST谱库相匹配,仅当匹配度大于800(最大值为1000)的鉴定结果才予以报道,采用峰面积归一化法定量计算出各挥发性成分的相对含量。

2 结果与讨论

2.1 产香酵母的筛选

从保宁醋醋曲中共筛选到11株酵母,编号为Y2、Y3、Y4、Y7、Y8、Y9、Y10、Y12、Y13、Y18、Y19,采用嗅闻法测定筛选酵母的产香能力,结果如表1所示。

表1 酵母菌产香性能的鉴定

Table 1 Identification of aroma-producing capacity of yeast

菌株	Y2	Y3	Y4	Y7	Y8	Y9	Y10	Y12	Y13	Y18	Y19
产香情况	++	-	+	+++	-	+++	+++	+	+	+++	++

注:“+++”表明菌株产香浓郁;“++”表明菌株产香稍淡;“+”表明菌株产香微弱;“-”表明菌株几乎无香味。

由表1所得,酵母菌Y7、Y9、Y10和Y18产生香味最为浓郁,菌株Y2、Y19产生的香味稍淡,Y4、Y12、Y13产香微弱,故选择Y7、Y10、Y9、Y18进行后期实验。

2.2 产香酵母的形态鉴定

观察四株产香酵母的菌落形态、个体形态及部分生理生化实验,其结果表2、表3所示。由表2可知:四株酵母均为乳白色,有光泽,个体形态为椭圆形,均为单个或不规则排列,单侧产芽孢,仅Y7无假菌丝。由生理生化实验可知,菌株Y7与异常威克汉姆酵母(*Wickerhamyces anomalus*)相似,菌株Y9、Y10、Y18与口津假丝酵母(*Candida melibiosica*)相似。

2.3 分子鉴定结果

四株产香酵母PCR扩增产物以1%琼脂糖凝胶电泳检测,其结果如图2所示,测序结果进行Blast基因比对,利用ClustalX2.0对序列进行多重比对,使用Mega4.0软件采用Neighbor-joining法构建系统发育树,结果如图2。

由图1、图2可知:四株菌株PCR扩增条带均在600 bp左右,菌株Y9、Y10、Y18相似,与口津假丝酵母(*Candida melibiosica* BEL103)在发育树同一分支上,同源性达到98%,可认为三株产香酵母均为口津

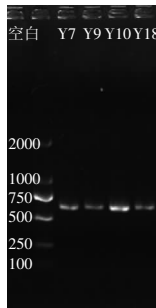


图1 产香酵母PCR扩增图谱

Fig.1 Patterns amplified by PCR aroma-producing yeast

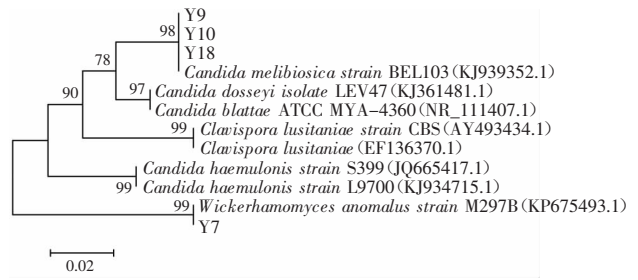


图2 产香酵母系统发育树示意图

Fig.2 Phylogenetic tree of aroma-producing yeast

假丝酵母(*Candida melibiosica* KJ939352)。经BLAST比对后,Y7和菌株异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus* strain M297B, KP675493.1)序列相似度最高,为99%,可认为菌株Y7为异常威克汉姆酵母。异常威克汉姆酵母和假丝酵母是典型的产香型酵母^[7],刘阳^[8]等人也从柑橘果皮中得到异常威克汉姆酵母和假丝酵母,并可产生大量苯乙醇等风味物质。

2.4 产香酵母发酵液中挥发性香气成分的检测

采用GC-MS技术检测4株产香酵母发酵液中挥发性香气成分,结果如表4所示。

由表4所知,四株产香酵母的挥发性成分组成存在一定的差异,Y7与Y9、Y10、Y18存在较大的差异,Y9、Y10和Y18差异稍小。Y7、Y9、Y10、Y18检测到风味物质种类数依次为26、30、21、22。

醇类是食醋酒精发酵阶段必不可少的物质,同时也是食醋香味的重要组成成分。Y7、Y9、Y10、Y18发酵液中共检测到18种醇类物质,分别有6、15、10、9种。4种发酵液中均可检测到的醇类物质有4种,分别为乙醇、异丁醇、异戊醇及苯乙醇,其贡献率最大的醇类为乙醇和苯乙醇,乙醇能给人愉快的酒精味,同时也是食醋酒精发酵阶段的主要产物,为醋酸酸化阶段提供主要原料。Y7乙醇相对含量最低为

表2 产香酵母的形态鉴定

Table 2 Morphological identification of aroma-producing yeast

菌株编号	菌落形态	个体形态
Y7	圆形,乳白色,中央凸起,湿润光滑稍有光泽,边缘整齐,易挑起,有香味,3 mm	椭圆,较大,单个或不规则排列,单侧产芽孢
Y9	圆形,乳白色,湿润光滑,有光泽,边缘整齐,易挑起,扁平,3 mm	椭圆,个体形态较小,单个或不规则排列,单侧产芽孢,有假菌丝
Y10	圆形,3 mm,乳白色,湿润光滑,有光泽,边缘整齐,易挑起,扁平	椭圆,个体形态较小,单个或不规则排列,单侧产芽孢,有假菌丝
Y18	圆形,乳白色,湿润光滑有光泽,边缘整齐,易挑起,凸起,2 mm	椭圆,个体形态较小,单个或不规则排列,单侧产芽孢,有假菌丝

表3 产香酵母生理生化鉴定

Table 3 Physiological and biochemical identification aroma-producing yeast

菌株	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	淀粉	柠檬酸	硝酸盐	甘油	无维生素	淀粉形成试验
Y7	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Y9	+	V	+	-	+	-	V	V	-
Y10	+	V	V	-	+	-	V	+	-
Y18	+	V	V	-	+	-	V	V	-

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性;“V”表示可变。

表4 产香酵母发酵液中挥发性成分检测
Table 4 Detection of volatile components of aroma-producing yeast in the fermentation

序号	匹配项名称	中文名称	香味	相对含量(%)			
				Y7	Y9	Y10	Y18
1	Ethyl alcohol	乙醇	愉快的酒精味	21.492	50.320	72.665	70.020
2	1-Propanol, 2-methyl-	异丁醇	杂醇油和酒精味	1.393	3.511	1.065	1.246
3	1-Butanol, 3-methyl-	异戊醇	奶酪香、腐败臭	-	14.202	7.998	9.128
4	6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, (R)-	香茅醇	甜玫瑰香	0.070	0.120		
5	Phenylethyl Alcohol	苯乙醇	清甜的玫瑰样花香	24.968	23.223	12.321	13.327
6	2-Dodecanol	2-十二醇		-	-		
7	2-Furanmethanol	糠醇	焦糖香		0.185	0.134	0.123
8	1-Propanol, 3-(methylthio)-	3-甲硫基丙醇	圆葱、肉汤香味		0.188	0.097	
9	Benzyl Alcohol	苯甲醇	水果香、花香、柑橘香		0.060	0.014	
10	1-Undecanol	1-十一醇	柑橘香气		-		
11	1-Pentanol	正戊醇	水果香、青草味			-	
12	3-Furanmethanol	3-呋喃甲醇			-		-
13	1-Propanol	正丙醇	醇香、成熟水果香				0.050
14	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-	反式-橙花叔醇	玫瑰香、柑橘香味		0.221	0.140	
15	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, [S-(Z)]-	S-(Z)-3,7,11-三甲基-1,6,10-十二烷三烯-3-醇			-	-	-
16	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	橙花叔醇					-
17	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇			0.154		
18	2-Methylene cyclopentanol	2-亚甲基环戊醇			0.060		
19	Ethyl Acetate	乙酸乙酯	果香、酒香	25.238			
20	Benzenepropanoic acid, ethyl ester	3-苯丙酸乙酯	草莓、李子及花香	0.168	0.118	0.037	0.053
21	Benzenoacetic acid, ethyl ester	苯乙酸乙酯	有浓烈而甜的蜂蜜香气	0.048	0.166	-	0.077
22	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	2-苯乙酸乙酯	玫瑰和蜂蜜香	10.912	1.290		0.429
23	Decanoic acid, ethyl ester	癸酸乙酯	葡萄香	0.054			
24	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	乙酸异戊酯	香蕉香	1.790			
25	1-Butanol, 3-methyl-, formate	甲酸异戊酯	李子香	0.010		-	-
26	Octanoic acid, ethyl ester	辛酸乙酯	菠萝香	0.126			
27	2,4-Decadienoic acid, ethyl ester, (E, Z)-	(E, Z)-2,4-癸二烯酸乙酯	青香、苹果香、水果香、梨香		0.175		0.113
28	Ethyl 4-methylbenzoate	对甲基苯甲酸乙酯					0.020
29	Benzoic acid, ethyl ester	苯甲酸乙酯	稍有水果气味		0.062		
30	4-Fluorobenzoic acid, 2-phenylethyl ester	4-氟苯甲酸-2-苯乙醇乙酯				0.368	
31	Nonanal	壬醛	果香和脂肪臭	0.064	0.384	0.086	0.101
32	Benzaldehyde	苯甲醛	花香、杏仁香	0.109	0.066		0.056
33	Benzenoacetaldehyde	苯乙醛	蜂蜜香、玫瑰香	0.012	0.217		
34	2-Octenal, (E)-	反-2-辛烯醛	柑橘、柠檬香	0.044			
35	Acetaldehyde	乙醛	愉快的苹果香			0.098	0.146
36	Acetic acid	乙酸	尖锐的酸味	0.619	0.152	0.491	0.412
37	Propanoic acid, 2-methyl-	异丁酸	酸味、腐臭、奶酪香			0.157	
38	Naphthalene	萘	香樟木气味	-			
39	Azulene	甘菊蓝		-			
40	Benzene, 1-methoxy-4-(1-propenyl)-	茴香脑	甜茴香香气	0.322	0.229		
41	Estragole	4-烯丙基苯甲醚	大茴香似香气	-	-		
42	Oxirane, [[4-(1,1-dimethylethyl)phenoxy]methyl]-	4-叔丁基苯基缩水甘油醚		-			

续表

序号	匹配项名称	中文名称	香味	相对含量(%)			
				Y7	Y9	Y10	Y18
43	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	2-乙酰基吡咯	油味、脂肪臭、波米花香	0.056			
44	Acetamide, N-(2-phenylethyl)-	N-(2-苯乙基)乙酰胺				-	-
45	2-Butanone, 3-hydroxy-	3-羟基-2-丁酮	水果香、霉腐臭、木香	0.608	1.380	1.098	
46	2-Undecanone	甲基壬基甲酮		0.133			
47	Oxime-, methoxy-phenyl-	甲氧基苯基肟		0.157	0.148	0.246	0.276
48	1H-Indene, 1-methylene-	1-亚甲基-1H-茚		0.030			
总计				87.582	96.048	97.297	96.682

注：“-”表明该物质相对含量较低，未获得具体数值。

21.492%，Y10乙醇相对含量最高达到72.665%，但Y10苯乙醇相对含量最低为12.321%，Y7苯乙醇相对含量最高，为Y10的两倍，达到24.968%。苯乙醇是一种天然的香味物质，具有甜香、玫瑰花香和蜂蜜香^[19-20]，广泛存在于玫瑰花、康乃馨等植物及精油中，并且是葡萄酒、苹果酒、白酒、白兰地等酒类中的重要香气成分^[19,21]，并在其他传统发酵食品中均得到应用。石娇娇^[22]等人从自然甜面酱中筛得6株产香酵母，其中四株均可产生苯乙醇。龚加路^[23]等人从泡菜中得到的生香酵母也可生成苯乙醇，其相对含量高达24.225%。这表明多数产香酵母均可生成苯乙醇，但相对含量有所不同。

酯类物质是食醋、白酒、酱油等传统发酵食品的主体香味成分，Y7、Y9、Y10、Y18发酵液中共检测到12种酯类物质，分别为8、5、4、5种。其中3-苯丙酸乙酯和苯乙酸乙酯在4种发酵液中均可检测到，但其相对含量较少。Y7产生的酯类物质种类最多，主要是乙酸乙酯和2-苯乙酸乙酯，相对含量为25.238%和10.912%，其中乙酸乙酯具有明显的果香、酒香，因而广泛存在于果酒、白酒等酒类中，如李志辉^[24]等人筛选到可产生乙酸乙酯等酯类物质的异常威克汉姆酵母，有效提高酒体风味及质量。2-苯乙酸乙酯呈现玫瑰及蜂蜜香，已在葡萄酒、白酒等酒中得以发现^[25]。Y7还可特异性生成乙酸乙酯、癸酸乙酯、乙酸异戊酯和辛酸乙酯，这些物质大多都呈现水果香、花香，赋予食品怡人的香气。其余3种发酵液中酯类物质种类及相对含量均较少，但仍具有其独特的酯类物质，Y9可特异性生成苯甲酸乙酯，具有水果香味；Y10和Y18可分别产生4-氟苯甲酸-2-苯乙醇乙酸酯和对甲基苯甲酸乙酯。

醛类及其他化合物仍是重要的香味成分，Y7、Y9、Y10、Y18发酵液中醛类物质共检测到5种，分别为4、3、2、3种。这五种醛类物质都具有一定的花香或果香，其相对含量都较低，均处于微量状态，其中Y7产生的醛类物质种类最多，仅不产生乙醛，相对含量最高的为苯甲醛，具有花香和杏仁香。不同发酵液中共检测到13种其他化合物，分别为8、7、5、4种，其中四株产香酵母均产生的物质为乙酸和甲氧基苯基肟，其相对含量均在1%以下。

熊越在四川麸醋的香气成分分析过程中，表明保宁醋的主体香味是乙酸乙酯、2,3-丁二酮、壬醛、

乙酸、癸醛、苯甲醛(ROAV \geq 1)^[26]，醋的香气成分中，乙酸乙酯的含量占绝对优势，而仅菌株Y7可产生乙酸乙酯，相对含量为25.238%，远高于成品醋的6.11%，这是由于在陈酿阶段酯类物质减少^[4]。四株菌可形成这些主体香味分别为4、4、3、4种，均不产生癸醛，均形成壬醛和乙酸，其相对含量均低于0.7%，乙酸相对含量远低于成品醋的35.22%，由于食醋中的乙酸主要来自醋酸菌酸化。Y9、Y10、Y18可产生2,3-丁二酮，相对含量分别为0.608%、1.38%、1.098%。Y7、Y9、Y18可产生苯甲醛，相对含量为0.109%、0.066%、0.056%，虽然这些香气成分相对含量较低，但对于保宁醋的主体香味有着重要的贡献。

3 结论

从保宁醋醋曲中共得到4株产香较强酵母菌，分别为Y7、Y9、Y10、Y18，经rDNA-ITS分子鉴定，Y7为异常威克汉姆酵母(*Wickerhamyces anomalus*)，Y9、Y10、Y18均为口津假丝酵母(*Candida melibiosica*)，采用GC-MS技术检测产香酵母发酵产物中的挥发性香味物质，主要风味物质为醇类、酯类、醛类、少量酸类及其他化合物，其中，Y9、Y10、Y18醇类物质种类较多，呈香物质种类无明显差异，Y7酯类物质种类最多，主要为乙酸乙酯，其相对含量达到25.238%，并且其苯乙醇相对含量均高于其他三株酵母，达到24.968%，目前，产香酵母广泛用于酱油、白酒、啤酒等传统发酵食品的增香。而不同香型的产香酵母将为食醋的酿造提供不同的风味成分，为食醋新风味的开发研究提供有力的支撑，但关于产香酵母的工业生产有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘军,朱文优,杨勇.保宁醋固态发酵理化指标的动态分析[J].中国酿造,2006(5):45-47.
- [2] 刘军.保宁醋酿造的工艺特性[J].江苏调味副食品,2003,20(6):11-12,18.
- [3] 聂志强,汪越男,郑宇,等.传统食醋酿造过程中微生物群落的多样性及功能研究进展[J].中国酿造,2012,31(7):1-6.
- [4] 黄达明,杨勇,张志才.不同发酵期和陈酿期镇江香醋香气成分的变化[J].中国酿造,2008(9):56-61.
- [5] 周世水,熊建春.酒曲中生香酵母的分离鉴定与产酯工艺优化[J].现代食品科技,2010(1):98-99,108.

(下转第225页)

度,改善血液微循环,提高脑细胞的活性,增强记忆力和思维能力,增强人体防御系统的功能等,此外还可以排除人体内过量的饱和脂肪酸形成的多余脂肪,从而达到减肥的目的^[15]。因此多不饱和脂肪酸潜在的医用和药用价值受到了世界的关注,引起了食品、医药甚至化妆品等行业的高度重视。

3 结论

采用单因素和 $L_9(3^4)$ 正交实验相结合的方法优化了溶剂萃取仪提取瓜蒌籽油的工艺,在实验设定的范围内,浸提时间对油脂得率影响显著,料液比和淋洗时间对油脂得率影响不显著。溶剂萃取仪提取瓜蒌籽油的最佳工艺条件为:正己烷为浸提剂、料液比1:10、浸提时间70 min和淋洗时间30 min,此工艺下的得率为60.12%。GC-MS分析表明瓜蒌籽油富含不饱和脂肪酸(88.18%),其中多不饱和脂肪酸占总脂肪酸含量的55.34%,是一种极具潜力的多不饱和脂肪酸的食用油资源。

参考文献

- [1] 周富荣. 中华人民共和国药典[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(7): 441-441.
- [2] Huang Y, He P, Bader K P, et al. Seeds of *Trichosanthes kirilowii*, an energy-rich diet[J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2000, 55(3-4): 189-194.
- [3] Yang J, Zhou C, Yuan G, et al. Effects of Geographical Origin on the Conjugated Linolenic Acid of *Trichosanthes kirilowii* Maxim Seed Oil[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2012, 89(3): 401-407.
- [4] 曾益坤, 黄秀娟, 王兴国. 栝楼籽油理化性质及其脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂, 2007, 32(10): 80-82.
- [5] 彭书明, 梁山, 何健, 等. 瓜蒌籽中脂肪酸的气相色谱分析[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1197-1198.
- [6] 赵小云, 管中华, 李齐激, 等. 瓜蒌籽中脂肪酸组成型态及抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 177-180.
- [7] 彭书明, 雷泞菲, 梁山, 等. 微波和超声波辅助提取瓜蒌籽油工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 1996-1997.
- [8] 郑义, 李超. 响应曲面法优化瓜蒌籽油的超声提取工艺研究[J]. 粮油加工, 2010(10): 13-16.
- [9] 孙潇辉. 瓜蒌籽油提取及多不饱和脂肪酸的富集与微胶囊制备[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- [10] 苗利利, 仇农学, 庞福科, 等. 不同提取方法对石榴籽油中石榴酸含量的影响[J]. 中国油脂, 2009, 34(3): 6-8.
- [11] 张伟敏, 魏静, 朱晓芳, 等. 槟榔籽油提取工艺优化与脂肪酸成分分析[J]. 食品科学, 2011(24): 21-25.
- [12] 贺建武, 刘祝祥, 陈功锡. 山榧籽油提取工艺优化及其脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂, 2014, 39(3): 6-9.
- [13] 龙云飞, 王沛佩, 杨克迪, 等. 响应面法优化亚麻籽油提取工艺[J]. 食品科学, 2012(14): 45-49.
- [14] 张伟敏, 魏静, 朱晓芳, 等. 槟榔籽油提取工艺优化与脂肪酸成分分析[J]. 食品科学, 2012, 32(24): 21-25.
- [15] 王萍, 张银波, 江木兰. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 中国油脂, 2009, 33(12): 42-46.
- [6] 何义. 鸭梨果酒酿造专用产香酵母菌分离鉴定及香气成分分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2006.
- [7] 施庆珊, 陈仪本, 欧阳友生, 等. 酱油酿造中的生香酵母及生香过程[J]. 中国酿造, 2006(1): 57-60.
- [8] 冯杰. 埃切假丝酵母产香机理及其对酱油风味的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [9] 石娇娇, 张建军, 邓静, 等. 自然发酵甜面酱中耐高温生香酵母的鉴定与挥发性香气成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2014(9): 167-171.
- [10] 韩志双, 刘军, 黄思敏, 等. 传统麸醋醋醅中一株产香酵母的筛选鉴定及生长特性研究[J]. 中国调味品, 2013, 38(10): 41-45.
- [11] 胡沂淮, 贾亚伟, 戴源, 等. 生香酵母Yeast-1产香物质的GC-MS分析[J]. 酿酒科技, 2014(2): 87-89.
- [12] 曹敬华. 产香风味菌筛选及对美拉德反应作用的研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2011.
- [13] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [14] 巴尼特 A 佩R, 亚罗 D. 胡瑞卿译. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
- [15] 倪峥飞. 镇江香醋固态发酵过程中酿造微生物强化及醋醅总DNA提取方法的初步研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [16] Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, et al. Development of a DNA Microarray for Detection and Identification of Fungal Pathogens Involved in Invasive Mycoses[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(10): 4943-4953.
- [17] 王国良, 宋俊梅, 曲静然. 生香酵母及其应用[J]. 食品工业, 2004(3): 16-17, 29.
- [18] 刘阳, 邓静, 吴华昌, 等. 柑橘果皮中生香酵母的筛选及挥发性香气成分分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(12): 4050-4055.
- [19] Fan W, Qian MC. Identification of aroma compounds in Chinese 'Yanghe Daqu' liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography-olfactometry[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2006, 21(2): 333-342.
- [20] Fan W, Qian MC. Characterization of aroma compounds of chinese "Wuliangye" and "Jiannanchun" liquors by aroma extract dilution analysis[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(7): 2695-2704.
- [21] Fan W, Qian MC. Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry dilution analysis of young and aged Chinese "Yanghe Daqu" liquors[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(20): 7931-7938.
- [22] 石娇娇, 邓静, 吴华昌, 等. 自然发酵甜面酱中生香酵母的鉴定及发酵代谢产物的研究[J]. 中国调味品, 2014, 39(12): 11-14.
- [23] 龚加路, 吴华昌, 邓静, 等. 泡菜生香酵母的分离鉴定与挥发性香气成分分析[J]. 生物技术, 2015, 25(1): 75-78.
- [24] 李志辉, 任蓓蕾, 朱健辉, 等. 一株产乙酸乙酯酵母C42的分离与鉴定[J]. 食品工业科技, 2014(8): 188-191.
- [25] Fang Y, Qian M. Aroma compounds in Oregon Pinot Noir wine determined by aroma extract dilution analysis(AEDA) [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2005, 20(1): 22-29.
- [26] 熊越, 贺雅非, 李洪军, 等. 顶空固相微萃取-气质联用分析四川麸醋的香气成分[J]. 食品科学, 2011(2): 252-255.

(上接第210页)