

彭辉, 姜鹏, 李忍, 等. 鲁氏酵母菌 QOR6 产呋喃酮发酵条件优化及代谢特征分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 178–184. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040099

PENG Hui, JIANG Peng, LI Ren, et al. Optimization of Fermentation Condition on Furanone Production by *Zygoaccharomyces rouxii* QOR6 and Its Metabolic Characteristics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(2): 178–184. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040099

· 生物工程 ·

鲁氏酵母菌 QOR6 产呋喃酮发酵条件优化及代谢特征分析

彭辉^{1,2}, 姜鹏^{1,2,*}, 李忍^{1,2}, 刘念^{1,2}, 李志江^{1,2,*}

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319;

2. 黑龙江省杂粮加工及质量安全工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 为明确鲁氏酵母菌代谢合成呋喃酮工艺条件与代谢情况, 以鲁氏酵母 (*Zygoaccharomyces rouxii*) QOR6 为出发菌株, 通过单因素实验和正交试验优化 QOR6 代谢合成呋喃酮的发酵条件, 并采用气相色谱-质谱联用技术测定其挥发性香气物质的种类和相对含量。结果表明, 当 QOR6 发酵温度 28 ℃、发酵初始 pH4.2、培养转速为 180 r/min 和接种量为 20×10^7 CFU/mL 时, 呋喃酮的产量为 2.90 mg/L, 比优化前提高了 1.09 倍。发酵液中挥发性成分共有 41 种, 主要包括醇类、醛类、酯类、芳香族和烃类等。其中, 醇类含量最高, 占总挥发物的 81.13%。其他相对含量较高的为乙酸苯乙酯 (3.48%)、甲醛 (0.34%)、2,6-二叔丁基苯酚 (8.77%)、氯甲氧基甲烷 (0.20%) 和 3-乙基-2,5-甲基吡嗪 (0.70%)。本文旨在为鲁氏酵母菌在食品中的应用提供了技术支持。

关键词: 鲁氏酵母菌 QOR6, 气相色谱-质谱法, 香气成分, 代谢特征

中图分类号: TS264.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)02-0178-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022040099

本文网刊:



Optimization of Fermentation Condition on Furanone Production by *Zygoaccharomyces rouxii* QOR6 and Its Metabolic Characteristics

PENG Hui^{1,2}, JIANG Peng^{1,2,*}, LI Ren^{1,2}, LIU Nian^{1,2}, LI Zhijiang^{1,2,*}

(1. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. Heilongjiang Engineering Research Center for Coarse Cereals Processing and Quality Safety, Daqing 163319, China)

Abstract: To clarify the conditions and furanone production by *Zygoaccharomyces rouxii*, the fermentation conditions by *Z. rouxii* QOR6 were optimized through single factor and orthogonal experiments. Then the types and relative contents of volatile aroma substances were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that the fermentation temperature of 28 ℃, the initial pH of 4.2, the incubation speed of 180 r/min and the inoculation amount of 20×10^7 CFU/mL were the optimal conditions, in which the yield of HDMF reached 2.90 mg/L, 1.09 times higher than that of before optimization. There were 41 volatiles components in the fermentation broth, mainly including alcohols, aldehydes, esters, aromatics and hydrocarbons. Among them, alcohols indicated the highest content, accounting for 81.13% of the total volatiles. Other metabolites with higher relative contents were phenethylacetate (3.48%), formaldehyde (0.34%), 2,6-di-tert-butylphenol (8.77%), chloromethoxymethane (0.20%) and 3-ethyl-2,5-methylpyrazine (0.70%). This study might provide technical support for the application of the *Z. rouxii* in food.

收稿日期: 2022-04-12 +并列第一作者

基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (LH2020C086); 黑龙江省博士后资助项目 (LBH-Q20055); 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目 (ZRCPY201811); 黑龙江八一农垦大学校内基础培育计划项目 (ZRCPY201912)。

作者简介: 彭辉 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 74002780@qq.com。

姜鹏 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: jpeng2675234121@126.com。

* 通信作者: 李志江 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: lizhijiang@126.com。

Key words: *Zygosaccharomyces rouxii* QOR6; gas chromatography-mass spectrometry; aroma component; metabolic characteristic

鲁氏酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii*)是嗜高渗透的产香菌株,可将糖类代谢转化为高级醇、芳香族化合物以及具有焦香气味呋喃酮(4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H) furanone, HDMF)等,这些物质常被作为增香剂,对食品风味具有很大的影响^[1-2]。常见代谢合成 HDMF 菌株有鲁氏酵母、毕赤酵母、乳酸菌等^[3]。鲁氏酵母菌是目前报道中生物合成 HDMF 最主要的菌株,在添加 D-果糖和 NaCl 的培养基中发酵 5 d,鲁氏酵母菌合成 HDMF 产量可达到 6.77 mg/L^[4]。毕赤酵母在培养 4 d 时 HDMF 产量最高约为 2 mg/L,乳酸菌在培养 3 d 时 HDMF 产量达到 1.17 mg/L^[5]。研究表明,鲁氏酵母菌在食品加工中具有安全性高、无毒副作用等优点。其在酱油、香醋和豆酱中均起到重要的呈味效果^[6-7]。鲁氏酵母菌也可提高香肠的口感与风味^[8]。国内外对于鲁氏酵母菌产香的研究多集中在传统高盐发酵食品中,关于其他食品产业的应用报道相对较少。利用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术评价了鲁氏酵母菌参与的发酵葡萄酒样品,检测了葡萄酒中的高级醇、果香和花香气味等风味物^[9-10]。

本实验室采用基因工程技术,利用醌氧化还原酶(Quinone oxidoreductase, QOR)构建 *Z. rouxii* QOR 过表达工程菌, QOR 是酵母菌利用果糖-1,6-二磷酸(Fructose-1,6-bisphosphate, FBP)代谢合成 HDMF 的重要催化酶^[11]。筛选得到的高产 HDMF 菌株 QOR6, QOR 基因表达量相比于出发菌株提高了 4.8 倍(未发表结果)。但其代谢合成 HDMF 发酵条件及代谢特征未见报道。因此,本文深入研究鲁氏酵母菌 QOR6 发酵合成 HDMF 条件,有利于鲁氏酵母菌改善食品风味,推动其在食品增香中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鲁氏酵母菌 QOR6 本实验室构建; YPD 液体培养基: 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖, 10 g/L 酵母提取物; YPD 固体培养基: 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖, 10 g/L 酵母提取物, 琼脂; HDMF 标品 美国 Sigma 公司; 甲醇、乙腈和甲酸(色谱级) 百灵威科技有限公司。

MLS-830L 立式压力蒸汽灭菌锅 普和希健康医疗器械(上海)有限公司; Opti-Clean 1300 垂直流超净工作台 立新仪器(上海)有限公司; SB25-12DTD 超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司; H1850R 台式高速离心机 湘仪离心机仪器有限公司; 显微镜 上海永科光学仪器有限公司; ZQLY-300V 立式双层振荡器 上海知楚仪器有限公司; ZXSP-B0270 生化培养箱 上海智城分析仪器制造有限公司; PB-10/C 酸度计 北京赛多利斯仪器

系统有限公司; 1290 UHPLC 型超高效液相色谱仪 安捷伦科技有限公司; ITQ 1100 型气相色谱质谱联用仪 赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的活化与培养 参考 Liu 等^[12]方法并稍作改动。取冻存的鲁氏酵母菌 QOR6, 在灭菌后的 YPD 固体培养基中划线, 于恒温培养箱中在 28 ℃ 的条件下培养 3 d。挑取单菌落移至装有 100 mL YPD 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 于全温振荡器中在 28 ℃、180 r/min 条件下培养 3 d, 当细胞总数达到 $2.5 \times 10^8 \sim 3.0 \times 10^8$ CFU/mL 时备用。取 5 mL 已活化好的菌液接种到 100 mL YPD 培养基中, 在全温振荡器中 28 ℃、180 r/min 条件下培养 27 h 作为种子液用于后续试验。

1.2.2 HDMF 的测定 根据 Li 等^[13]的研究方法并稍作修改。取培养后的发酵液在 4 ℃ 条件下 8000 r/min 离心 10 min, 移液枪精准吸取 2 mL 上清液, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后采用 HPLC 测定 HDMF 含量。液相色谱条件: UPLC BEH-Amide(1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 100 mm), 流动相为 0.1% 甲酸(A)和乙腈(B), 洗脱梯度为: 0~10 min, 5%B; 10~15 min, 20%B; 15~20 min, 100%B。流速 1 mL/min, 柱温 25 ℃, 进样量 10 μ L, 检测波长 287 nm, 使用外标法定量。

1.2.3 鲁氏酵母菌 QOR6 合成 HDMF 产量的发酵条件优化 将不同浓度的种子液接种到 YPD 培养基中, 采用控制变量法进行单因素实验, 以发酵温度 28 ℃、pH4.7、转速 180 r/min、接种量 20×10^7 CFU/mL、发酵时间 3 d 作为基础培养工艺参数^[13], 分别考察温度(24、28、32 和 36 ℃)、初始 pH(5.7、5.2、4.7、4.2 和 3.7)、转速(160、180、200 和 220 r/min)、接种量(2×10^7 、 5×10^7 、 20×10^7 和 50×10^7 CFU/mL)等因素对 QOR6 合成 HDMF 产量的影响。

根据单因素实验结果, 设计 4 因素 3 水平的正交试验, 确定 QOR6 的最佳发酵参数。正交试验因素水平见表 1。

表 1 正交试验 $L_9(3^4)$ 因素水平表
Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平	因素			
	温度(℃)	初始pH	转速(r/min)	接种量($\times 10^7$ CFU/mL)
1	24	4.7	160	5
2	28	4.2	180	20
3	32	3.7	200	50

1.2.4 挥发性物质测定

1.2.4.1 待测样品制备 离心后的发酵液中加入液氮迅速冷冻研磨粉碎, 称取适量粉碎样品, 于顶空瓶

中,加入 2 g 饱和氯化钠,压盖,置于 80 ℃ 水浴中平衡 20 min,再将固相微萃取针扎进顶空中,继续放入 80 ℃ 水浴中 20 min,上机检测。

1.2.4.2 GC-MS 测定条件 GC 条件: TG-5 MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);程序升温:初始温度 50 ℃,保持 3 min 以后,6 ℃/min 的升温速度升至 250 ℃,保持 5 min。载气为高纯氮气,流速 1.0 mL/min;进样量 1.0 μL。

MS 条件:电离方式为 EI,电子能量为 70 eV,接口温度为 250 ℃,离子源温为 230 ℃,四级杆温度为 200 ℃,无溶剂延迟,全扫描方式,质量扫描范围 40~650 m/z。

挥发性物质定性定量分析:采集到的质谱图利用 NIST 谱库进行检索,鉴定样品中的挥发性成分,并利用面积归一化法分析各成分的相对含量。

1.3 数据处理

实验每组 3 个平行样品,结果用平均值±标准差来表示。利用 SPSS 25.0 进行数据分析和 Prism 8.0 制图。采用单因素方差分析及 Duncan 检验比较各组数据, $P<0.05$ 表示样品间具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 发酵温度对鲁氏酵母菌 QOR6 合成 HDMF 产量的影响

随着发酵温度的增加,发酵液中的 HDMF 产量呈现出先升高后降低的趋势(图 1)。当发酵温度为 36 ℃ 时,发酵液中的 HDMF 含量最低为 1.56 mg/L;当发酵温度为 28 ℃ 时,HDMF 含量达到最高为 2.65 mg/L,显著高于其他样品($P<0.05$)。因此,当发酵温度在 28~32 ℃ 时适宜鲁氏酵母菌 QOR6 生长,这与康远军等^[14] 研究结果相一致。研究表明,在发酵过程中,发酵温度主要通过影响酵母体内生物酶活性来调控生长和代谢活性^[15],当发酵温度过高时,细胞内酶的催化活性受到抑制导致代谢产物降低。因此,鲁氏酵母菌 QOR6 产 HDMF 的最佳发酵温度为 28 ℃,并在此温度下用于研究后续实验。

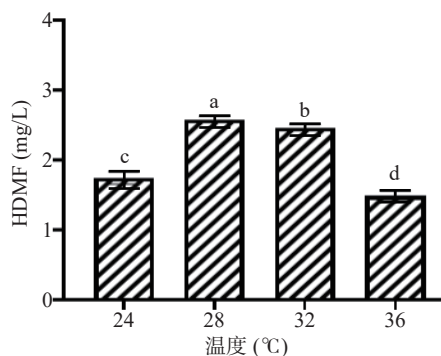


图 1 不同发酵温度条件下 QOR6 合成 HDMF 产量

Fig.1 HDMF production from *Z. rouxii* QOR6 under different fermentation temperatures

注:不同小写字母表示处理间有显著性差异($P<0.05$);图 2~图 4 同。

2.2 初始 pH 对鲁氏酵母菌 QOR6 合成 HDMF 产量的影响

初始 pH 对鲁氏酵母菌 QOR6 产 HDMF 含量的影响如图 2 所示。随着发酵液初始 pH 的增加,发酵液中的 HDMF 含量呈现出先升高后降低的趋势。在初始 pH 为 4.2 时,发酵液中的 HDMF 含量最高为 2.18 mg/L,显著高于其他实验组($P<0.05$)。当初始 pH 为 5.7 时,发酵液中的 HDMF 含量最低。因此,鲁氏酵母菌适合在较低酸性的条件下生长代谢,当初始 pH 为 4.2 时有利于鲁氏酵母菌 QOR6 生长和代谢。

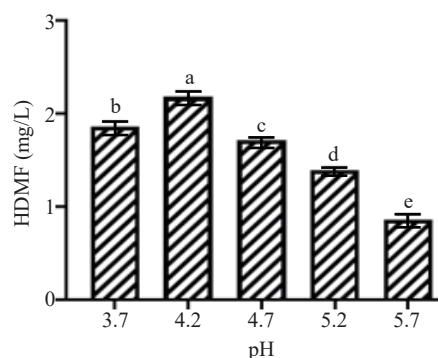


图 2 不同初始 pH 条件下 QOR6 合成 HDMF 产量

Fig.2 HDMF production from *Z. rouxii* QOR6 under different initial pH

研究表明,在发酵过程中,适宜的初始 pH 有利于提高发酵过程中微生物中酶的活性,从而促进其生长代谢^[16]。鲁氏酵母菌可在 pH1.5~10.5 的范围内生长,且最适生长范围在 3.5~5.0^[3],这与本文的研究结果相类似。因此,将培养基 pH 调至 4.2 作为初始 pH 用于后续研究。

2.3 转速对鲁氏酵母菌 QOR6 合成 HDMF 产量的影响

培养转速对鲁氏酵母菌 QOR6 产 HDMF 产量的影响如图 3 所示。随着转速的增加,发酵液中的 HDMF 含量呈现出先升高后降低的趋势。在培养转速为 180 r/min 时,发酵液中的 HDMF 含量最高为 2.6 mg/L($P<0.05$)。而当培养转速为 220 r/min 时,

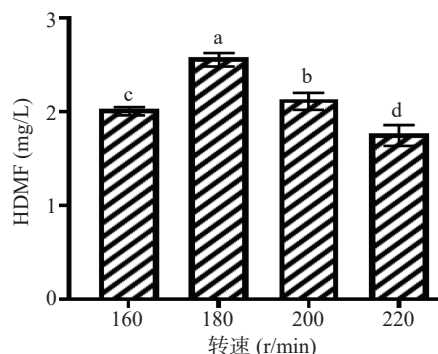


图 3 不同转速条件下 QOR6 合成 HDMF 产量

Fig.3 HDMF production from *Z. rouxii* QOR6 under different agitation speeds

发酵液中的 HDMF 含量最低为 1.76 mg/mL。

鲁氏酵母属于兼性厌氧菌, 在有氧环境更适宜生长, 适当的摇瓶培养可以为酵母生长提供充足的氧气, 利于前期细胞数目的积累^[17]。转速过高导致发酵液中 HDMF 含量降低的原因可能是由于供氧充足时, 导致细胞数目增加, 耗氧量高, 酵母快速生长而代谢产物减少^[18]。因此, 后续实验培养转速为 180 r/min。

2.4 接种量对鲁氏酵母菌 QOR6 产 HDMF 产量的影响

接种量对鲁氏酵母菌 QOR6 产 HDMF 含量的影响如图 4 所示。随着接种量的增加, 发酵液中的 HDMF 含量呈现出先升高后降低的趋势。在接种量为 20×10^7 CFU/mL 时, 发酵液中的 HDMF 含量最高为 1.54 mg/L, 显著高于其他实验组($P<0.05$); 当接种量为 2×10^7 CFU/mL 时, 发酵液中的 HDMF 含量最低。因此, 当接种量为 20×10^7 CFU/mL 时, 有利于鲁氏酵母菌 QOR6 代谢。研究表明, 酵母接种量对细胞的生长代谢具有显著的调节作用^[19]。随着发酵接种量的增加, 发酵液中的 HDMF 含量呈现出先升高后降低, 可能是由于接种量过低, 酵母细胞数量少, 代谢出的目标产物少。而接种量较高, 细胞间竞争加剧, 营养物质或氧气不足导致酵母细胞生长缓慢^[18]。

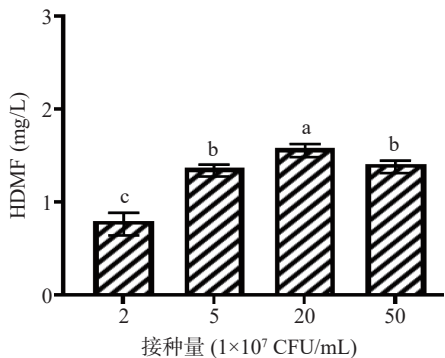


图 4 不同接种量条件下 QOR6 合成 HDMF 产量
Fig.4 HDMF production from *Z. rouxii* QOR6 under different inoculation amounts

2.5 正交试验结果

正交试验结果表明(表 2), 影响 QOR6 合成 HDMF 的因素顺序为: 温度(A)>转速(C)>初始 pH(B)>接种量(D)。方差分析结果表明(表 3), 温度、转速和初始 pH 对 QOR6 发酵生产 HDMF 具有显著影响($P<0.05$), 而接种量对 HDMF 产量无显著影响($P>0.05$)。正交试验优化得到的条件为: 发酵温度 28 ℃、初始 pH4.2、转速 180 r/min、接种量 20×10^7 CFU/mL。此条件下, 测得 HDMF 产量高达 2.90 mg/L。由于外源 D-果糖和 NaCl 对鲁氏酵母产 HDMF 具有促进作用, 因此与前人研究结果 6.77 mg/L 存在差异^[4]。

2.6 挥发性物质分析

在最优发酵条件下, 利用 GC-MS 技术测定鲁氏酵母菌 QOR6 代谢合成的挥发性物质, 结果如表 4

表 2 正交试验结果

Table 2 Result of orthogonal test

实验号	A温度	B初始pH	C转速	D接种量	HDMF产量 (mg/L)
1	1	1	1	1	2.18±0.26
2	1	2	2	2	2.31±0.41
3	1	3	3	3	2.15±0.24
4	2	1	2	3	2.78±0.54
5	2	2	3	1	2.65±0.36
6	2	3	1	2	2.61±0.29
7	3	1	3	2	2.43±0.22
8	3	2	1	3	2.37±0.39
9	3	3	2	1	2.39±0.25
k ₁	2.19	2.44	2.36	2.41	
k ₂	2.68	2.46	2.49	2.45	
k ₃	2.39	2.38	2.41	2.43	
R	0.49	0.08	0.13	0.04	

A>C>B>D
A₂B₂C₂D₂

表 3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	均方	F值	显著性
温度	1.078	2	0.539	89.391	*
初始pH	0.031	2	0.015	16.838	*
转速	0.112	2	0.056	61.470	*
接种量	0.019	2	0.009	10.202	
误差	0.016	18	0.003		

注: *差异显著($P<0.05$)。

所示。

2.6.1 醇类挥发物质分析 醇类物质主要是鲁氏酵母菌通过糖酵解途径产生, 表现为甜香和花果香^[20-21]。样品中共检测出 7 种醇类(表 4), 占总挥发物的 81.13%。主要有异丁醇(酒精气味)、异戊醇(花香, 水果香)、叔戊醇(焦灼味)和苯乙醇(清甜的玫瑰样花香)等^[22]。其中含量最多的是苯乙醇, 占总挥发物的 56.58%, 是由苯丙氨酸代谢出的一种具有玫瑰香味的芳香醇, 因其嗅闻强度较高, 是果酒中常见的香气活性物质^[23]。赵培城等^[24]在研究绍兴黄酒的香气物质时发现, 醇香的主要贡献来源是苯乙醇和异戊醇。因此, 鲁氏酵母菌 QOR6 也能够增加食品的甜果香, 可应用于食品发酵。

2.6.2 酯类挥发物质分析 酯类物质通常由发酵期间微生物代谢作用及醇类和有机酸的酯化反应生成^[25]。样品共检测出 10 种酯类(表 4), 占总挥发物的 6.49%。主要有苯乙酸乙酯(花香, 蜂蜜香)、乙酸苯乙酯(花香和水果香)、2-甲基丁酸, 2-苯乙酯(月季花香、甜果香和蜡烛气味)等^[26]。其中乙酸苯乙酯的占比最大为 3.48%, 是风味物质中花果香气的主要来源。酯类物质对白酒风格形成具有重大意义, 不同香型的白酒中, 酯类的种类及含量不同^[27]。酯类物质也是酱类发酵食品中主要香气贡献成分, 酱油中的酯类化合物是已报道物质中品种最多的^[28]。因此, 在发酵

表 4 挥发性化合物 GC-MS 测定结果
Table 4 Results of volatile compounds by GC-MS detection

分类	序号	化合物名称	保留时间 (min)	分子量 (Da)	相对含量 (%)
醇类(7种)	1	异丁醇 Isobutanol	2.30	74.07	1.69
	2	异戊醇 Isoamylol	3.86	88.09	16.64
	3	叔戊醇 2-Methyl-1-butanol	3.93	88.00	5.77
	4	2,2-二氯乙醇 2,2-Dichloro-ethanol	13.59	113.96	0.06
	5	苯乙醇 Phenylethyl alcohol	15.32	122.07	56.58
	6	(R)-3,7-二甲基-6-辛烯醇 (R)-3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol	18.37	156.11	0.31
	7	全氟己基乙醇 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctan-1-ol	30.71	364.01	0.08
		合计			81.13
酯类 (10种)	8	胆甾烷-3,22,26-三醇-16-[2-硫代羟乙基]-3,26-二乙酸酯 3,22,26-Triol-cholestan- 16-[2-thiohydroxyethyl]- 3,26-diacetate	2.17	564.39	0.05
	9	1,2-丙二醇二甲酸酯 1,2-Propanediol diformate	5.04	132.04	0.06
	10	苯乙酸乙酯 Benzeneacetic acid ethyl ester	18.87	164.08	0.49
	11	乙酸苯乙酯 Acetic acid 2-phenylethyl ester	19.21	164.08	3.48
	12	2-甲基丁酸, 2-苯乙酯 2-Methyl-butanoic acid, 2-phenylethyl ester	21.93	206.13	1.52
	13	2-苯基乙基丁酸戊酯 Pentyl 2-phenylethyl butylphosphonate	23.12	312.19	0.27
	14	二(2-苯乙基)草酸酯 Bis(2-phenylethyl) oxalate	25.55	298.12	0.14
	15	邻苯二甲酸戊酯 Pentyl 2-phenylethyl phthalate	25.68	340.17	0.27
	16	邻苯二甲酸二甲酯 Dimethyl phthalate	36.06	194.19	0.08
	17	邻苯二甲酸二辛酯 Dioctyl phthalate	37.85	390.56	0.13
合计					6.49
醛类(8种)	18	巴豆醛 2-Butenal	2.58	70.04	0.07
	19	异戊醛 3-Methyl-butanal	2.64	86.07	0.10
	20	苯甲醛 Benzaldehyde	10.20	106.04	0.34
	21	苯乙醛 Benzeneacetaldehyde	12.82	120.06	0.19
	22	壬醛 Nonanal	14.71	142.14	0.20
	23	4-戊烯醛 4-Pentenal	16.71	84.06	0.06
	24	3,4-二甲基苯甲醛 3,4-Dimethyl-benzaldehyde	18.19	134.07	0.19
	25	甲基乙基脒丙醛 Propanal, (1-methylethyl) hydrazone	31.40	114.12	0.17
		合计			1.32
芳香类 (5种)	26	2-氨基吡啶 2-Aminopyridine	5.97	94.05	0.07
	27	2,5-二甲基吡嗪 2,5-Dimethyl-pyrazine	8.55	108.07	0.27
	28	3-乙基-2,5-甲基吡嗪 3-Ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine	13.79	136.10	0.70
	29	环戊基苯 Cyclopentyl-benzene	19.67	146.11	0.06
	30	2,6-二甲基-4-氨基吡啶 2,6-Dimethyl-4-pyridinamine	20.87	122.08	0.09
合计					1.19
烃类(4种)	31	氯甲氧基甲烷 Chloromethoxy-methane	3.35	80.00	0.20
	32	二甲基癸烷 Decane, 2-methyl	27.36	155.30	0.06
	33	1,1-二甲基锇酞氯-3-烯 1,1-Dimethyl-germacyclopent-3-ene	17.92	158.02	0.07
	34	4-苯基-1-环己烯 4-Phenyl-1-cyclohexene	24.35	158.11	0.17
		合计			0.50
其他(7种)	35	2,6-二叔丁基苯酚 2,6-Di-tert-butylphenol	25.96	206.33	8.77
	36	氯甲氧基醚 Chloromethoxy-methane	3.35	80.00	0.20
	37	3,5-二硝基苯甲酸 3,5-Dinitrobenzoic acid	31.68	212.12	0.07
	38	N-(2-甲基双环[2.2.1]庚-2-基)乙酰胺 Exo-2-methyl-endo-2-(acetylamino) norbornane	17.18	167.13	0.1
	39	(2E)-2-氰基-N-羟基-2-(羟基亚氨基)乙酰胺 (2E)-2-Cyano-N-hydroxy-2-(hydroxyimino) ethanimidamide	17.37	128.03	0.07
	40	2,2,3,3,4,4,4-七氟-N-(2-苯基乙基)-丁酰胺 2,2,3,3,4,4,4-Heptafluoro-N-(2-phenylethyl)-butanamide	37.22	213.05	0.09
	41	6,7,8,9-Tetrahydro-2-amino-4-(2-fluorophenyl)-5H-cyclohepta[b]pyridine-3-carbonitrile	10.67	281.13	0.12
		合计			9.42

过程中添加鲁氏酵母菌 QOR6, 可以增加食品的花果香气。

2.6.3 醛类挥发物质分析 醛类化合物主要来源于

糖类与氨基酸作用, 阈值较低, 具有脂肪香气^[29]。样品中共检测到 8 种醛类(表 4), 占总挥发物的 1.32%。主要有巴豆醛(臭味)、异戊醛(青草香、巧克力香

味)、苯甲醛(苦杏仁、樱桃及坚果香)、苯乙醛(风信子花香和甜果香)、壬醛(玫瑰、柑橘和油脂气味)、3,4-二甲苯基甲醛(杏仁味)和 4-戊烯醛^[30]等,其中苯甲醛的占比最大为 0.34%。发酵过程中醛类的生成量虽少,但对香气成分的贡献很大。醛类物质在肉制品加工中对风味的影响突出,含有小分子量的醛时,可使产品整体的风味更醇厚。李永杰等^[31]在风干肠中检测到壬醛,由不饱和脂肪酸的自动氧化而成,有较强的油脂味,对发酵肉制品的香味有重要贡献。刘丹丹等^[32]在对酱牛肉风味物质测定时,发现醛类是最主要的风味来源,其中苯甲醛含量最高。因此,鲁氏酵母菌 QOR6 的添加,能增强食品的油脂香,可在肉制品中进行应用。

2.6.4 芳香族化合物及烃类挥发性物质分析 发酵液中共检测到 5 种芳香族化合物(表 4),占总挥发物的 1.19%,其中 3-乙基-2,5-甲基吡嗪含量最高为 0.70%。芳香族化合物的产生主要由醛和烯醇进一步环化生成的吡嗪和吡啶。发酵液中共检测到 4 种烃类化合物(表 4),占总挥发物的 0.50%,其中氯甲氧基甲烷含量最高为 0.20%。烃主要来源于脂肪酸醇氧自由基的均质化和脂肪降解,一般会有所谓的烷烃气味,其中阈值较低的不饱和烃对香气贡献较大^[33-34]。烯烃和烷烃类大多属于小分子物质,在发酵前期,可作为营养物质,经酵母发酵进一步合成酯类物质^[35]。

2.6.5 其他挥发性物质分析 发酵液中产生的其他挥发性物质,主要有酰胺类、酚类、酸类和醚类,占总挥发物的 9.42%。酰胺类物质对风味没有显著贡献,具有一定刺激性气味。酸类物质是醇和醛氧化产生,多作为非挥发性香气物质存在于发酵液。醚类可能是在高温下,由醇脱水化合而成。样品中只检测到 1 种酚类为 2,6-二叔丁基苯酚,其相对含量为 8.77%,也有学者在糯米酒、熟制香菇和软梨果酒等食品挥发性成分中检测到该物质^[36-37]。上述各种物质间的相互作用,使得鲁氏酵母菌 QOR6 代谢出的挥发性香气成分更为丰富。

3 结论

本研究对鲁氏酵母菌 QOR6 代谢合成 HDMF 培养条件进行了优化,并对其代谢出的挥发成分进行分析,为酵母因酿造方式带来的环境改变提供适宜的发酵参数。最终确定该菌株产 HDMF 最优培养条件:发酵温度 28℃、初始 pH4.2、转速为 180 r/min、接种量为 20×10^7 CFU/mL。在此条件下,合成的 HDMF 产量为 2.90 mg/L。此外,代谢得到的醇、酯、醛类化合物种类丰富,检测到有苯乙醇、异戊醇、乙酸苯乙酯、苯甲醛等关键香气成分,他们的呈味效果将更突出,使发酵液整体呈现出甜果香及坚果的香气。由此可见,鲁氏酵母菌不仅可以提高 HDMF 的含量,还能显著改善发酵液风味。后续可在此研究基础上,对风味物质形成的特定代谢途径以及相关的调控基因进行挖掘。研究结果可为鲁氏酵母菌基因

改造菌株进一步研究,以及利用其呈味特征在食品工业中的应用提供技术参考。

参考文献

- [1] SINGRACGA P, NIAMSIRI N, VISESSANGUAN W, et al. Application of lactic acid bacteria and yeasts as starter cultures for reduced-salt soy sauce (moromi) fermentation[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 78: 181-188.
- [2] DAKAL T C, SOLIERI L, GIUDICI P. Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 185: 140-157.
- [3] 潘百玲,戴凌燕,刘微,等.微生物代谢合成呋喃酮的培养条件和酶学调控研究进展[J].黑龙江八一农垦大学学报,2021,33(5):67-73. [PAN B L, DAI L Y, LIU W, et al. Research progress of culture condition and enzyme regulation about microbial metabolism and synthesis of furanone[J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2021, 33(5): 67-73.]
- [4] 周亚男.鲁氏酵母高密度培养制备及产呋喃酮条件优化研究[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2018. [ZHOU Y N. Optimization of high density culture and preparation of DMHF from *Zygosaccharomyces rouxii*[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2018.]
- [5] 王鹏霄,宋焕禄,陈存社.微生物发酵法制备 4-羟基-2,5-二甲基-3[2H]-呋喃酮的研究进展[J].中国酿造,2009,10:4-6. [WANG X P, SONG H L, CHEN C S. Research progress of producing 4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3(2H)-furanone by microbial fermentation[J]. *China Brewing*, 2009, 10: 4-6.]
- [6] 廉瑞,刘爽,李敬尧,等.酱油中鲁氏接合酵母的安全性初步评价[J].中国酿造,2022,41(1):70-74. [LIAN R, LIU S, LI J R, et al. Preliminary safety evaluation of *Zygosaccharomyces rouxii* in soy sauce[J]. *China Brewing*, 2022, 41(1): 70-74.]
- [7] 李梦琦,赵一凡,郑飞云,等.耐高糖产香酵母菌的分离鉴定及其应用[J].食品与发酵工业,2019,45(24):45-51. [LI M Q, ZHAO Y F, ZHENG F Y, et al. Isolation identification and application of sugar-tolerant and aroma-producing yeast[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(24): 45-51.]
- [8] 王鹤霖,范苗艺,李昕,等.鲁氏酵母发酵香肠加工工艺的研究[J].肉类工业,2018(5):25-28. [WANG H L, FAN Z Y, LI X, et al. Study on the processing technology of the fermented sausage of *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. *Meat Industry*, 2018(5): 25-28.]
- [9] CHENG H, CHEN J, LI X, et al. Differentiation of the volatile profiles of Chinese bayberry cultivars during storage by HS-SPME-GC/MS combined with principal component analysis[J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2015, 100: 59-72.
- [10] 战吉威,曹梦竹,游义琳,等.非酿酒酵母在葡萄酒酿造中的应用[J].中国农业科学,2020,53(19):4057-4069. [ZHAN J S, CAO M Z, YOU Y L, et al. Research advance on the application of non-saccharomyces in winemaking[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(19): 4057-4069.]
- [11] HECQUET L, SACELEME M, BOLTE J, et al. Biosynthesis of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1996, 44: 1357-1360.
- [12] LIU H, DAI L Y, WANG F Y, et al. A new understanding: Gene expression, cell characteristic and antioxidant enzymes of *Zygosaccharomyces rouxii* under the D-fructose regulation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 132: 109409.
- [13] LI X, DAI L Y, LIU H, et al. Molecular mechanisms of furanone production through the EMP and PP pathways in *Zygosaccha-*

- romyces rouxii* with D-fructose addition[J]. *Food Research International*, 2020, 133: 109137.
- [14] 康远军, 李欣, 陈雄, 等. 鲁氏酵母发酵培养基及发酵条件的优化[J]. *中国调味品*, 2015, 40(7): 61-65. [KANG Y J, LI X, CHEN X, et al. Optimization of medium components and fermentation conditions of *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. *China Condiment*, 2015, 40(7): 61-65.]
- [15] FANG G S, LIU P X, CHANG X, et al. Isolation and identification of a high-yield ethyl caproate-producing yeast from daqu and optimization of its fermentation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12(5): 663744.
- [16] HAUCK T, BRUHLMANN F, SCHWAB W. 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone formation by *Zygosaccharomyces rouxii*: effect of the medium[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2003, 51(16): 4753.
- [17] 刘朋肖, 常煦, 成柳洁, 等. 酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯发酵条件的优化[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(2): 178-189. [LIU P X, CHANG X, CHENG L J, et al. Optimization of fermentation conditions for ethyl caproate production from *Saccharomyces cerevisiae* Y3401[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(2): 178-189.]
- [18] 刘朋肖, 刘玉春, 李晨语, 等. 酿酒酵母 Y3401 产乙醇条件优化及其产香特性[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(4): 168-178. [LIU P X, LIU Y C, LI C Y, et al. Optimization of cultural conditions for ethyl alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae* Y3401 and its aroma-producing characteristics[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(4): 168-178.]
- [19] LI W Z, SHI C, GUANG J, et al. Development of Chinese chestnut whiskey: Yeast strains isolation, fermentation system optimization, and scale-up fermentation[J]. *AMB Express*, 2021, 11: 7.
- [20] PUTU V, ROBERT L, HELEN O, et al. Effects of co-inoculation and sequential inoculation of *Tetragenococcus halophilus* and *Zygosaccharomyces rouxii* on soy sauce fermentation[J]. *Food Chemistry*, 2018, 240: 1-8.
- [21] SOMKUWAR R G, SHARMA A K, KAMBALE N, et al. Volatome finger printing of red wines made from grapes grown under tropical conditions of India using thermal-desorption gas chromatography-mass spectrometry (TD-GC/MS)[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 57(3): 1119-1130.
- [22] 王梦琪, 朱荫, 张悦, 等. “清香”绿茶的挥发性成分及其关键香气成分分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(22): 219-228. [WANG M Q, ZHU Y, ZHANG Y, et al. Analysis of volatile composition and key aroma compounds of green teas with fresh scent flavor[J]. *Food Science*, 2019, 40(22): 219-228.]
- [23] 李艳, 康俊杰, 成晓玲, 等. 3种酿酒酵母酿造赤霞珠干红葡萄酒的香气成分分析[J]. *食品科学*, 2010, 31(22): 378-382. [LI Y, KANG J J, CHENG X L, et al. Aroma components in cabernet sauvignon dry red wine fermented with three species of yeast strains[J]. *Food Science*, 2010, 31(22): 378-382.]
- [24] 赵培城, 蔡际豪, 顾赛麒, 等. 不同酒龄传统绍兴黄酒的特征风味物质分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(22): 231-237. [ZHAO P C, CAI J H, GU S Q, et al. Analysis of characteristic flavor substances of traditional Shaoxing rice wines of different ages[J]. *Food Science*, 2020, 41(22): 231-237.]
- [25] GAO X, FENG T, SHENG M, et al. Characterization of the aroma-active compounds in black soybean sauce, a distinctive soy sauce[J]. *Food Chemistry*, 2021, 298: 130334.
- [26] BELLEGIA L, FERROCINO I, REALE A, et al. Unfolding microbiota and volatile organic compounds of Portuguese Painho de Porco Preto fermented sausages[J]. *Food Research International*, 2022, 155(5): 111063.
- [27] LI H, QIN D, WU Z, et al. Characterization of key aroma compounds in Chinese guojing sesame-flavor Baijiu by means of molecular sensory science[J]. *Food Chemistry*, 2019, 284(6): 100-107.
- [28] 李杨, 李明达, 刘军, 等. 酱油酿造过程中风味物质的形成与鉴定[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(4): 251-256. [LI Y, LI M D, LIU J, et al. Formation and identification of flavor substances during soy sauce brewing[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(4): 251-256.]
- [29] PANG X N, HAN B Z, HUANG X N, et al. Effect of the environment microbiota on the flavour of light-flavour Baijiu during spontaneous fermentation[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 3396.
- [30] 高煜煜, 张旭普, 白俊岩, 等. 不同发酵工艺糙米酵素中游离氨基酸、 γ -氨基丁酸及挥发性香气成分分析[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(23): 36-41. [GAO M M, ZHANG X P, BAI J Y, et al. Component analysis of free amino acids, GABA and volatile aroma in brown rice enzymes with different fermentation processes[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(23): 36-41.]
- [31] 李永杰, 唐月, 李慧瑶, 等. 基于智能感官和气相色谱-质谱联用技术研究食盐添加量对风干肠风味特征的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(4): 1-7. [LIU Y J, TANG Y, LI H Y, et al. Effect of salt content on the flavor profile of air-dried sausages as determined by instrumental sensory technologies and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Food Science*, 2022, 43(4): 1-7.]
- [32] 刘丹丹, 赵培, 陈金玉, 等. 呼吸式滚揉腌制对中式酱牛肉挥发性物质的影响[J]. *食品与机械*, 2022, 38(2): 21-26. [LIU D D, ZHAO P, CHEN J Y, et al. Effects of breathing tumbling on volatile substances of Chinese soy-sauced beef[J]. *Food & Machinery*, 2022, 38(2): 21-26.]
- [33] WATANABE A, KAMADA G, IMANARI M, et al. Effect of aging on volatile compounds in cooked beef[J]. *Meat Science*, 2015, 107(9): 12-19.
- [34] 王勇勤, 郭新, 黄笠原, 等. 基于电子鼻和气相色谱-质谱联用技术分析不同贮藏时间羊肉火腿香气成分[J]. *食品科学*, 2019, 40(2): 215-221. [WANG Y Q, GUO X, HUANG L Y, et al. Analysis of volatile compounds of mutton ham with different storage times based on electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Food Science*, 2019, 40(2): 215-221.]
- [35] 田亚, 王晓宇, 杨欣, 等. 贵州米酸汤发酵过程中风味品质的研究[J]. *中国调味品*, 2020, 45(5): 94-99. [TIAN Y, WANG X Y, YANG X, et al. Research on flavor quality of Guizhou rice sour soup during fermentation[J]. *China Condiment*, 2020, 45(5): 94-99.]
- [36] 闫晓雪, 伍时华, 吴军, 等. 糯米酒的液态发酵工艺优化[J]. *中国酿造*, 2022, 41(3): 168-173. [YAN X X, WU S H, WU J, et al. Optimization of liquid-state fermentation technology of glutinous rice wine[J]. *China Brewing*, 2022, 41(3): 168-173.]
- [37] 张韵, 李葱葱, 王菁, 等. 不同烹制工艺对香菇挥发性成分和感官特性的影响[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(6): 75-84. [ZHANG Y, LI H H, WANG J, et al. Effects of cooking techniques on volatile components sensory characteristics of shiitake mushroom[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(6): 75-84.]