

抗鱼肉脂肪氧化的耐冷冻酵母筛选及鉴定

郭薇丹, 刘薇丛, 胡作民, 李正雯, 付湘晋*

(中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004)

摘要: 以常见食品为分离材料, 采用冻融法对耐冷冻酵母进行富集, 采用涂布平板法和平板划线法分离、纯化耐冷冻酵母; 并分析这些酵母菌株的生长特性、产气特性、抗鱼肉脂肪氧化特性。获得25株具有耐冷冻特性的酵母, 其中菌株J3、J7、J8、J9、J12、J15、J18、J25低温下发酵力较好, 菌株J8、J12、J18抗鱼肉脂肪氧化活性较强, 可消减鱼肉中脂肪氧化产物; 通过5.8S rDNA测序法及系统发育分析, 8株耐冷冻酵母均鉴定为异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalus*)。本研究为开发新型水产品保鲜剂提供了参考。

关键词: 耐冷冻酵母; 抗氧化; 发酵力; 菌株鉴定; 异常威克汉姆酵母

Screening for and Identification of Freeze-Tolerant Yeasts with Antioxidant Activity in Fish

GUO Weidan, LIU Weicong, HU Zuomin, LI Zhengwen, FU Xiangjin*

(College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: In this paper, freeze-tolerant yeasts from common fermented foods were enriched by five freeze-thawing cycles and were isolated and purified by spread plate and streak plate methods. The growth characteristics, gas production characteristics and antioxidant activity against lipid oxidation in fish of the isolates were analyzed. A total of 25 yeast strains with freezing tolerance were obtained, of which, strains J3, J7, J8, J9, J12, J15, J18 and J25 exhibited good fermentation ability at low temperatures while J8, J12 and J18 inhibited lipid oxidation effectively. These 8 strains were identified as *Wickerhamomyces anomalus* by 5.8S rDNA sequencing and phylogenetic analysis. This study provides valuable information for developing new preservatives for aquatic products.

Keywords: freeze-tolerance yeast; antioxidant activity; fermentation ability; microbial identification; *Wickerhamomyces anomalus*
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180610-145

中图分类号: S983

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 10-0166-05

引文格式:

郭薇丹, 刘薇丛, 胡作民, 等. 抗鱼肉脂肪氧化的耐冷冻酵母筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2019, 40(10): 166-170.
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180610-145. <http://www.spkx.net.cn>

GUO Weidan, LIU Weicong, HU Zuomin, et al. Screening for and identification of freeze-tolerant yeasts with antioxidant activity in fish[J]. Food Science, 2019, 40(10): 166-170. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180610-145. <http://www.spkx.net.cn>

鱼肉富含不饱和脂肪酸, 非常容易氧化, 产生腥味及有害物质, 如丙二醛、己醛、壬醛等^[1]。添加抗氧化剂是抑制脂肪氧化最常用的方法。随着人们对食品品质越来越高的追求, 急需开发高效安全天然抗氧化剂代替化学合成抗氧化剂, 其中食品微生物类抗氧化剂是研究热点之一^[2-3]。大量报道发现某些乳酸菌、酵母菌具有优良的抗氧化活性^[4-6]。Baka等^[7]研究发现, 乳酸菌 *Lactobacillus sakei* 4413能有效抑制香肠中的脂肪氧化,

可使硫代巴比妥酸反应物 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 值比对照低1 mg/kg; Zeng Xuefeng等^[8]报道, 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 120、酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 22可有效抑制酸鱼脂肪氧化。付湘晋等^[9-10]研究发现, 酵母可有效抑制鱼肉脂肪氧化, 并清除脂肪氧化产物, 如丙二醛、己醛、癸醛, 脱除鱼肉腥味; 所用酵母为面包酵母、葡萄酒酵母、啤酒酵母、酿酒酵母等; 这些酵母的最适生长温度为20~28 °C, 而

收稿日期: 2018-06-10

第一作者简介: 郭薇丹 (1996—) (ORCID: 0000-0002-2402-1362), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与安全。

E-mail: 756175304@qq.com

*通信作者简介: 付湘晋 (1980—) (ORCID: 0000-0002-9537-6216), 男, 副教授, 博士, 研究方向为水产肉制品科学及食品代谢组学。E-mail: drxjf@163.com

鱼肉一般采用冷藏，限制了酵母菌株在鱼肉保鲜上的应用。所以，筛选既有抗氧化活性、又有耐冷冻特性的酵母，用于水产品、肉制品保鲜，有一定实际应用前景。

耐冷冻酵母指可以进行冷冻保藏，且在冷藏、解冻后，酵母仍然具有较高的活性，发酵能力和产气能力都较好的酵母^[11]。目前，筛选耐冷冻酵母用于冷冻面团加工的研究较多^[12-14]，如江正强等^[15]在自然界选了上百株酵母菌株，通过冷冻筛选出了耐冷冻酵母W122，在长时间的冷冻之后，其发酵力仍然有78%。但目前鲜见报道筛选既具有抗氧化活性又具有耐冷冻特性的酵母。

本研究以常见食品为分离材料，采用冻融法对耐冷冻酵母进行富集，涂布平板法和平板划线法分离、纯化耐冷冻酵母；并分析这些酵母菌株的生长特性、产气特性、抗鱼肉脂肪氧化特性，为开发新型水产品、肉制品保鲜剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株分离材料：苹果、葡萄、榨菜、面肥、豆豉、生啤酒、栀子花、酒糟等购自当地市场或自制。

培养基：察氏液体培养基，在120 °C高压灭菌20 min。取出后冷却待用。

硫代巴比妥酸（分析纯） 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

TG25KR离心机 长沙东旺实验仪器有限公司；SW-CJ-IFD超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司；SPK-150BIII微生物培养箱 北京中兴伟业仪器有限公司；BlueStar B紫外-可见分光光度计 北京莱伯泰科仪器股份有限公司；G154DWS立式自动压力蒸汽灭菌锅 厦口致微仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 耐冷冻酵母的富集

取适量面肥、苹果、葡萄、蘑菇榨菜、豆豉、啤酒、栀子花、酒糟等可发酵食品，按质量比1:100放入超纯水中，将其置于28 °C的恒温培养箱培养5 d，使其充分发酵富集酵母菌。之后将所得富集液进行冻融循环。每次-18 °C冷冻12 h，28 °C培养24 h，共冻融循环5次^[16]。冻融结束后，样品进行纯化分离得到所需酵母。

1.3.2 耐冷冻酵母的分离

耐冷冻酵母的筛选采用10倍稀释涂布法。将涂布好的培养基放入28 °C的恒温培养箱中培养3 d，观察已培养好的菌落，典型的酵母菌菌落表面光滑、湿润、黏稠，质地柔软，易于挑起，多为乳白或奶油色，有酒香味；据此特征挑取单菌落。对于所挑取的单菌落平板划线，

进行分离、纯化。重复进行3次以上以得到纯菌落。将纯化后的酵母菌接种至试管斜面上，保存于4 °C备用。

1.3.3 酵母生长曲线的测定

酵母菌株的活化：无菌环境下，在50 mL锥形瓶中，接种酵母菌1环于20 mL培养液，置于28 °C恒温培养箱中培养18 h，得到酵母的种子液。

将所得种子液吸取20 mL分装于两个500 mL三角瓶中（200 mL察氏培养基），于28 °C培养。接种后每隔2 h取样，以未接种培养液调零，测定各样品在波长600 nm处的吸光度^[17]。

1.3.4 酵母发酵力的测定

取培养18 h的种子液置于具塞试管中，放置杜氏小管，并盖紧盖子，以防漏气。将上述装有杜氏小管的具塞试管置4 °C的冰箱中恒温培养，观察杜氏小管中产气情况。

1.3.5 酵母菌株鉴定

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）测序委托生工生物工程（上海）股份有限公司完成。选用ITS序列，它对酵母序列有很高的敏感性和特异性^[18]。

正向引物ITS1的序列：5'-TCCGTAGGTGAA C C T G C G G -3'；反向引物ITS4的序列：5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR体系（50 μL）：PCR Mix 25 μL，ITS1（10 μmol/L）2 μL，ITS4（10 μmol/L）2 μL，模板1 μL；去离子水20 μL。扩增程序：98 °C预变性2 min；98 °C、10 s，54 °C、10 s，72 °C、10 s，35个循环；72 °C、5 min。取2 μL PCR扩增原液点样于1%的琼脂糖凝胶，电泳缓冲液为TAE缓冲液，控制电压110 V，电泳40 min。

测序结果在NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库BLAST进行比对，得到同源性较高（99%）的基因序列。

1.3.6 酵母抗鱼肉脂肪氧化活性测定

手工采集新鲜草鱼背部白肉，加1倍质量的蒸馏水，10 000 r/min匀浆1 min，获得鱼浆。取培养18 h的酵母菌液1 mL，加入5 g鱼浆，对照鱼肉中加1 mL蒸馏水，充分混匀；样品4 °C放置4 h，取样，根据文献方法测定TBARS值^[19]。

1.4 数据统计及图像处理

采用Excel软件进行数据统计、绘图。采用MEGA6软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 酵母的菌落形态

通过对分离材料进行培养、冻融富集后。对所得发酵液进行涂布平板法和平板划线法，分离、纯化，从而得到纯菌落。最终得到25株酵母菌落，标记为J1~J25。

将酵母菌株接种于察氏培养基上进行培养, 得到纯化的酵母单菌落, 并观察其形态特征。由表1可知, 酵母菌落大部分白色, 有个别为红色或浅红色, 且形态为微隆。大部分酵母菌落的边缘光滑透明, 而菌株J4、J9、J14、J21的菌落边缘则为不透明。所有菌落都是光滑、有光泽且湿润。

表1 酵母菌落形态特征

Table 1 Colonial characteristics of yeast strains

菌株	菌落颜色	菌落形态	分离材料
J1	红色	微隆、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	面肥
J2	浅红色	微隆、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	面肥
J3	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	面肥
J4	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、不透明	面肥
J5	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	面肥
J6	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	葡萄
J7	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	葡萄
J8	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	葡萄
J9	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、不透明	葡萄
J10	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	葡萄
J11	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	葡萄
J12	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	苹果
J13	浅红色	微隆、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	苹果
J14	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、不透明	苹果
J15	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	榨菜
J16	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	榨菜
J17	浅红色	微隆、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	豆豉
J18	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	啤酒
J19	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	啤酒
J20	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	啤酒
J21	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、不透明	梔子花
J22	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	酒糟
J23	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	酒糟
J24	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	酒糟
J25	白色	隆起、光滑、有光泽、湿润、边缘光滑透明	酒糟

2.2 酵母的生长特性

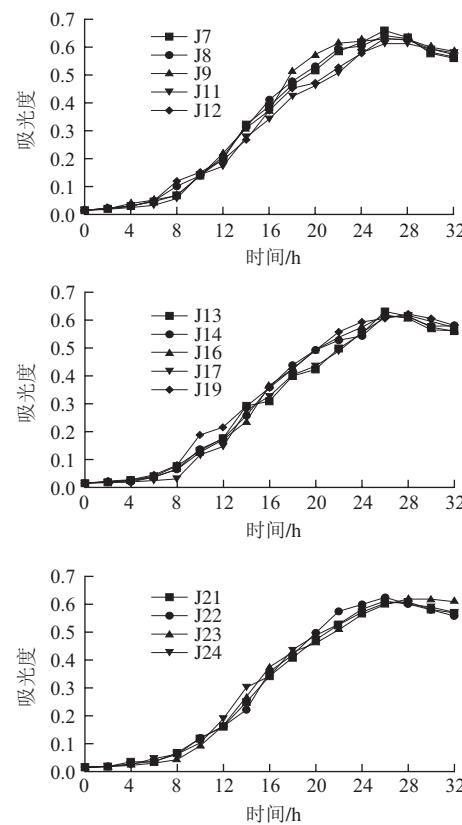
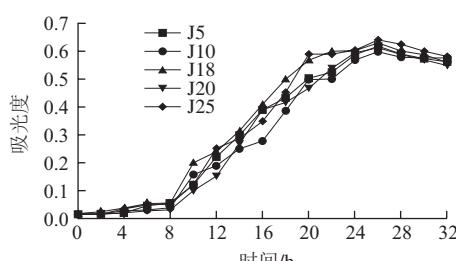
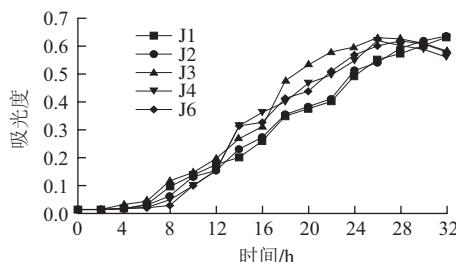


图1 酵母菌株的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of yeast strains

由图1可知, 随着培养时间的延长, 菌液的吸光度随着培养时间延长而逐渐增大, 趋势明显, 当培养至24 h时, 吸光度值趋于平稳, 酵母菌开始处于稳定期。

2.3 酵母的产气特性

酵母发酵会产生气体, 因此酵母的发酵能力的强弱可以通过酵母的产气能力来进行判断。杜氏管发酵法是一种直观、简便测定发酵力的方法^[20]。通过对筛选所得的25株耐冷冻菌株进行产气能力的测定, 从而进一步筛选得到发酵力好的耐冷冻酵母。由表2可知, 低温条件下, 发酵力较好的菌株有J3、J7、J8、J9、J12、J15、J18、J25, 这几株酵母4℃时24 h内即已产气, 而普通酿酒酵母在12℃时, 延迟期约2 d^[21], 在4℃时基本不生长产气^[22]; 表明筛选到的菌株在低温下具有更好活力。

表2 酵母产气特性

Table 2 Gas production characteristics of yeast strains

酵母菌株	24 h	48 h	72 h	96 h
J1	—	—	—	—
J2	—	—	—	—
J3	+	++++	/	/
J4	—	—	+	++
J5	+	++	+++	+++++
J6	—	+++	++++	+++++
J7	++	++++	/	/
J8	++++	++++	/	/

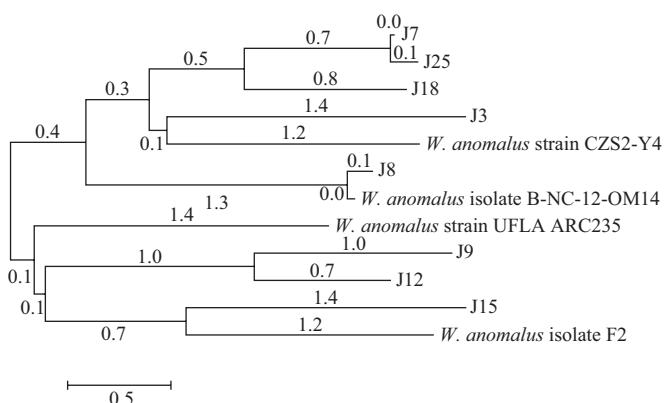
续表2

酵母菌株	24 h	48 h	72 h	96 h
J9	++	+++++	/	/
J10	-	-	++	+++++
J11	-	-	-	-
J12	++	+++	+++++	/
J13	-	-	-	-
J14	-	-	-	+
J15	++	++++	+++++	/
J16	+	++	++	+++
J17	-	-	-	-
J18	+	+++	+++++	/
J19	-	-	-	+
J20	-	++	+++++	/
J21	-	-	-	+
J22	-	+	+++++	/
J23	-	-	+++++	/
J24	-	++	+++++	/
J25	+	+++	+++++	/

注: -杜氏小管中无气体; +杜氏小管中气体体积≤1/5; ++杜氏小管中气体体积1/5~2/5; +++杜氏小管中气体体积2/5~3/5; ++++杜氏小管中气体体积3/5~4/5; +++++杜氏小管中气体体积4/5至气体充满试管; /未检测。

2.4 耐冷冻酵母的鉴定

对筛选所得的8株发酵力较好的酵母进行测序鉴定。5.8S rDNA通过引物ITS1和ITS4进行PCR扩增。测序结果采用NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库BLAST进行比对。依据以上8株菌株的同源性比较结果,选取与各菌株同源性较高,且已定名菌株的信息进行系统发育分析,并构建系统进化树,如图2所示。8株酵母菌株都属于异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)。*W. anomalus*是一种食品中常见酵母^[23-24],如面粉饺子面团中,*W. anomalus*占比67.2%,米粉饺子面团中*W. anomalus*占比27.0%^[25],Khamir酸面团中分离到的酵母菌株均鉴定为*W. anomalus*^[26]。



的耐冷冻酵母菌株J3、J7、J8、J9、J12、J15、J18、J25，这8株菌均具有一定抗鱼肉脂肪氧化活性，其中菌株菌株J3、J7、J8、J9、J12、J18可消减TBARS；通过5.8S rDNA测序、在线序列比对及发育树分析，8株酵母菌株均鉴定为*W. anomalus*。本研究为开发新型水产品保鲜剂提供了参考，筛选到的菌株具有用于功能性食品加工的前景。

参考文献：

- [1] 陈瑜楠. 冷藏腐败过程鱼肉蛋白质和脂肪变化的高光谱成像监控方法研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- [2] 蔡旋, 陈小连, 杨帆, 等. 微生物源性抗氧化剂体外抗氧化能力的初步研究[J]. 生物技术, 2011, 21(6): 84-87. DOI:10.3969/j.issn.1004-311X.2011.06.160.
- [3] 韩伟, 刘文群, 黄丽婵. 食品中微生物抗氧化作用的初步研究[J]. 中国酿造, 2008, 27(15): 28-30. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2008.08.009.
- [4] KAKUTA T, HOSHIKUMA A, KANAUCHI M, et al. Studies on antioxidant produced by the yeast. Part I. identification and some properties of antioxidant produced by the yeast[J]. Food Preservation Science, 1999, 25: 215-220. DOI:10.5891/jafps.25.215.
- [5] VIEIRA E F, MELO A, FERREIRA I M P L V O. Autolysis of intracellular content of Brewer's spent yeast to maximize ACE-inhibitory and antioxidant activities[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 82: 255-259. DOI:10.1016/j.lwt.2017.04.046.
- [6] CHO Y J, KIM D H, JEONG D, et al. Characterization of yeasts isolated from kefir as a probiotic and its synergic interaction with the wine byproduct grape seed flour/extract[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 90: 535-539. DOI:10.1016/j.lwt.2018.01.010.
- [7] BAKA A, PAPAVERGOU E, PRAGALAKI T, et al. Effect of selected autochthonous starter cultures on processing and quality characteristics of greek fermented sausages[J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(1): 54-61. DOI:10.1016/j.lwt.2010.05.019.
- [8] ZENG X F, XIA W S, JIANG Q X, et al. Effect of autochthonous starter cultures on microbiological and physico-chemical characteristics of Suan Yu, a traditional Chinese low salt fermented fish[J]. Food Control, 2013, 33(2): 344-351. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.03.001.
- [9] 付湘晋, 许时婴, KIM J. 酸碱法提取鮰鱼蛋白脱腥及酵母脱腥机理[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(1): 57-62. DOI:10.3321/j.issn:1673-1689.2009.01.012.
- [10] 付湘晋, 贺海翔, 许时婴, 等. 酵母细胞液处理对白鮰鱼鱼糜脂肪氧化和风味的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 95-99.
- [11] 吕莹果, 王群学, 陈能飞. 冷冻面团中酵母的抗冻性及抗冻酵母的研究进展[J]. 江苏食品与发酵, 2007(3): 25-28.
- [12] ALVESARAÚJO C, ALMEIDA M J, SOUSA M J, et al. Freeze tolerance of the yeast *Torulaspora delbrueckii*: cellular and biochemical basis[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 240(1): 7-14. DOI:10.1016/j.femsle.2004.09.008.
- [13] 韩春然, 马永强, 张红薇. 高渗培养对酵母抗冻能力的影响[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(12): 193-195. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2010.12.056.
- [14] 张玲, 李威娜, 刘中深, 等. 冷冻面团中抗冻酵母选育研究[J]. 职业技术, 2012(7): 117-118. DOI:10.3969/j.issn.1672-0601.2012.07.097.
- [15] 江正强, 王怡斯, 李里特. 低糖面团用耐冷冻酵母的筛选及其性质[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(6): 15-19.
- [16] 叶晓枫, 韩永斌, 赵黎平, 等. 冻融循环下冷冻非发酵面团品质的变化及机理[J]. 农业工程学报, 2013, 29(21): 271-278. DOI:10.3969/j.issn.1002-6819.2013.21.034.
- [17] 何贝, 王学东, 叶鹏, 等. 几种品牌酵母耐性生长曲线对比研究[J]. 中国酿造, 2014, 33(12): 63-67. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2014.12.012.
- [18] 陈源源, 陈浩, 石贵阳, 等. ITS序列在酵母批量分子鉴定中的适用性[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(4): 11-14. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2012.04.025.
- [19] FU X, LIN Q, XU S. Effect of drying methods and antioxidants on the flavor and lipid oxidation of silver carp slices[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 61: 251-257. DOI:10.1016/j.lwt.2014.10.035.
- [20] 王芹. 巧妙放置杜氏小管[J]. 仪器仪表与分析监测, 2005(2): 46. DOI:10.3969/j.issn.1002-3720.2005.02.020.
- [21] BALLESTER-TOMAS L, PRIETO J A, GIL J V, et al. The Antarctic yeast *Candida sake*: understanding cold metabolism impact on wine[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 245: 59-65. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.009.
- [22] BALLESTER-TOMAS L, PEREZ-TORRADO R, RODRIGUEZ-VARGAS S, et al. Near-freezing effects on the proteome of industrial yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 221: 70-77. DOI:10.1016/j.jbiotec.2016.01.029.
- [23] 明红梅, 周健, 陈蒙恩, 等. 大曲中异常威克汉姆酵母发酵产苯乙醇的条件优化[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(14): 3492-3496. DOI:10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2015.14.041.
- [24] 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 Environment Microbiology, 2011, 77(10): 3484-3492. DOI:10.1128/AEM.02669-10.
- [25] LI Z, LI H, BIAN K. Microbiological characterization of traditional dough fermentation starter (Jiaozi) for steamed bread making by culture-dependent and culture-independent methods[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 234: 9-14. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.024.
- [26] SAKANDAR H A, USMAN K, IMRAN M. Isolation and characterization of gluten-degrading *Enterococcus mundtii* and *Wickerhamomyces anomalus*, potential probiotic strains from indigenously fermented sourdough (Khamir)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 91: 271-277. DOI:10.1016/j.lwt.2018.01.023.
- [27] AMANUMA Y, OHASHI S, ITATANI Y, et al. Protective role of ALDH2 against acetaldehyde-derived DNA damage in oesophageal squamous epithelium[J]. Science Report, 2015, 5: 14142. DOI:10.1038/srep14142.
- [28] 姚仕彬, 叶元土, 蔡春芳, 等. 酵母培养物水溶物对丙二醛损伤的离体草鱼肠道黏膜细胞的保护作用[J]. 动物营养学报, 2014, 26(9): 2652-2663. DOI:10.3969/j.issn.1006-267x.2014.09.027.
- [29] WANG C, WEERAPANA E, BLEWETT M M, et al. A chemoproteomic platform to quantitatively map targets of lipid-derived electrophiles[J]. Nature Methods, 2014, 11(1): 79-85. DOI:10.1038/nmeth.2759.
- [30] KONKIT M, CHOI W J, KIM W. Aldehyde dehydrogenase activity in *Lactococcus chungangensis*: application in cream cheese to reduce aldehyde in alcohol metabolism[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(3): 1755-1761. DOI:10.3168/jds.2015-10549.