

两株抗氧化活性酵母的鉴定及对乳成分的影响

陈历水^{1,2}, 马 莺¹, 丁庆波², 刘巧红¹, Jean Louis MAUBOIS³

(1. 哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院, 哈尔滨 150090, chenls@cofco.com; 2. 中粮集团有限公司 创新管理部食品研发中心, 北京 100020; 3. 法国农业科学研究院 雷恩乳品中心, 雷恩 35042)

摘 要: 为获得有抗氧化活性的工业用酵母菌株, 对2株来源于原料乳中有较强抗氧化活性的酵母菌进行鉴定. 根据菌株的表型、生理生化特征和基因型的特性, 初步将这2株菌鉴定为毕赤氏发酵酵母 (*Pichia fermentans*). 将这2株酵母菌在高温灭菌(UHT)牛乳中培养以研究其对牛乳主要成分的影响, 结果表明: 这2株酵母能在UHT牛乳中产乙醇, 具有促进蛋白水解活性与脂肪水解活性的能力, 能有效提高乳中的游离氨基酸和脂肪酸的含量.

关键词: *Pichia fermentans*; 鉴定; 乳糖发酵; 蛋白水解活性; 脂肪水解活性

中图分类号: TS252.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2010)12-1932-06

Identification of two yeast stains with antioxidant activity and their effects on the main component of bovine milk

CHEN Li-shui^{1,2}, MA Ying¹, DING Qing-bo², LIU Qiao-hong¹, Jean Louis MAUBOIS³

(1. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, chenls@cofco.com; 2. Food R & D Center, Innovation and Management Dept., COFCO Ltd., Beijing 100020, China; 3. Institut National de la Recherche Agronomique, Rennes 35042, France)

Abstract: To obtain industrial yeast strains with antioxidant activity, identification of two yeasts with excellent antioxidant activity, which were isolated from raw milk, were carried out in this paper. Based on their morphological, biochemical, physiological and genotypic characterization, two strains were identified as *Pichia fermentans*. Then, the influence of these two strains on the main components in the milk was further evaluated by incubating in ultra high temperature (UHT) - processed bovine milk. The results indicated that both of these two strains were able to produce ethanol and facilitate proteolysis and lipolysis, and increased the content of free amino acid and fatty acid in the UHT milk.

Key words: *Pichia fermentans*; identification; lacto fermentation; proteolysis; lipolysis

酵母菌作为一种食品污染菌和腐败菌一直备受关注, 其典型的缺陷有过量产气、出现酵母味或其他的异味、变色和引起质构变化等^[1-4]. 近几年来, 科研人员开始关注酵母在发酵乳制品中的有益作用, 如作为次级发酵剂对乳制品发酵和成熟过程的风味影响, 抑制有害菌的生长及对人体潜在的益生作用等^[5-6]. Roostita 等在研究酵母菌的

生长特性时发现 *Debaryomyces hansenii* 能代谢柠檬酸盐, 与 *Saccharomyces cerevisiae* 一样能产生乙醇; 虽然二者不能代谢乳糖, 但都具有脂解和蛋白水解的活性, 能产丙三醇和乳酸^[4]. 有研究表明, 一些常用的食品源酵母如果正确使用不会对发酵乳制品的品质造成影响, 相反, 还会对其提供有益的作用, 如利用乳酸使凝乳的 pH 值升高, 刺激酸敏感细菌生长; 产生胞外蛋白水解酶和脂肪水解酶, 使乳制品中可溶性含氮物 and 高级脂肪酸增加, 赋予产品特有的风味; 发酵葡萄糖等产生 CO₂ 帮助干酪形成孔状结构^[7]; 抑制腐败微生物和梭状

收稿日期: 2009-07-06.

作者简介: 陈历水(1974-), 男, 博士研究生;

马 莺(1961-), 女, 教授, 博士生导师.

芽孢杆菌的生长^[1];产生多种水溶性维生素,提高乳制品的营养。

研究酵母在发酵乳制品中产生风味物质的报道较多^[8-11],但少有对特定的具有潜在功能活性的酵母影响乳品成分、促进风味物质形成的能力方面的研究。

本文采用形态学特征、生理生化特征和分子生物学特征三者相结合的方法对从原料乳中分离得到的 2 株抗氧化活性较强的酵母菌进行了初步鉴定;并将该菌添加到 UHT 牛乳中,对其影响牛乳主要成分的特性进行了研究。

1 实 验

1.1 酵母菌及酵母菌的培养

酵母菌来源于北京或哈尔滨地区的牧场原料乳中,其中 CICC1850 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。所有菌株的液体培养基为 YPD 培养基(质量分数为 2% 葡萄糖、0.5% 酵母提取物、1% 蛋白胨),菌株的保藏采用固体 YPD 培养基(质量分数为 0.5% 葡萄糖、0.5% 酵母提取物、1% 蛋白胨、1.8% 琼脂)。

1.2 化学仪器与试剂

PCR 仪(TaKaRa 温度梯度 PCR 仪,日本);全自动氨基酸分析仪(Hitachi L-8000);气相-质谱联用仪(GC-MS Agilent 6890)。

DNA 聚合酶(KOD-Plus)购于 Toyobo 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购于北京博大泰克生物技术有限责任公司;葡萄糖、酵母提取物、蛋白胨等生化试剂为北京陆桥公司生产;磺基水杨酸、PBS 缓冲液及其他试剂均为分析纯,UHT 牛乳(北京三元食品股份有限公司生产)。

1.3 菌株的初步筛选

将新鲜的脱脂原料乳(脱脂温度 50 °C)在 1.4 μm 的膜设备(Type MSF 1, Tetra Alcross[®], 利乐,丹麦)中进行 3 倍浓缩(浓缩温度不超过 50 °C)。将滞留液依次稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、… ,直到酵母菌孢子数为 1~10 个/mL,吸取 1 mL 菌液到 YPD 固体培养基上,涂布均匀,28 °C 培养 72 h,长出的菌落再次稀释 3 次后分离,一共得到 129 株酵母菌进行进一步实验。根据形态和收集的产地或时间不同,最后选择 12 株酵母菌按照文献[12]的方法进行抗氧化实验。

1.4 抗氧化活性酵母菌的鉴定

根据文献[13]分别对筛选菌株进行形态学和生理生化指标的测定。将菌株鉴定到种的水平,并进行菌株的分子生物学鉴定,以确定其种属

特性。

1.5 生长特性的确定

将酵母菌接种于 YPD 液体培养基中,在 28 °C 培养 80 h,每隔 8 h 取样一次,测酵母细胞总数,并据此绘制生长曲线。

1.6 对乳成分影响实验

将 5% (体积分数) 的酵母种子液接入装有 50 mL UHT 牛乳的 200 mL 三角瓶里进行发酵培养,培养温度 28 °C,摇床速度 125 r/min,培养 10 d 后进行游离氨基酸及脂肪酸等成分的测定。

1.7 乳糖及乙醇的测定

乳糖及乙醇的测定参照文献[4]进行。

1.8 游离氨基酸的测定

游离氨基酸的测定按照 IDF^[13] 的标准进行修改:取 10 mL 样品,离心(3 000g × 20 min),取 5 mL 上清液,加质量分数为 7.5% 的磺基水杨酸 1 mL,静置 10 min,离心(2 000g × 20 min, 4 °C),用全自动氨基酸分析仪进行测定。

1.9 脂肪酸的测定

取 2.0 mL 样品,加 8 mL 氯仿-甲醇(体积比为 2:1),充分混合后转入离心管中离心(4 000g × 20 min, 4 °C),取下层置于 50 mL 烧瓶中加热吹干。采用三氟化硼-甲醇甲酯化方法将脂肪甲酯化,取 2 uL 进行 GC-MS 测定。

色谱条件:分离柱,DB-23MS, 30 m × 0.32 mm i. d. × 0.25 μm;进样口温度,230 °C;载气流速,1.0 mL/min;程序升温,60 °C,6 min;以 8 °C/min 升到 250 °C,保持 15 min。质谱条件:离子源温度,200 °C;传输线温度,230 °C;延迟时间,4 min;监测器电压,350 V;离子化模式,EI;发射电流,250 μA;数据采集,全扫描;扫描范围,29~200 u。

1.10 数据分析

实验数据均采用 SPSS 统计软件(12.0 版)分析,每组实验重复 3 次,数据结果(除特殊标出的外)均以均值 ± 标准方差(D_s)的方式表示。

2 结果与讨论

2.1 抗氧化活性酵母菌的筛选

将初筛分离得到的菌株接入液体培养基中进行抗氧化实验。依据菌的形态、分离时间和分离地点对 12 株既耐低酸又耐胆盐的菌株进行抗氧化活性实验,发现编号为 BY5、HJ15 的 2 株酵母菌抗氧化活性最高(如表 1),无论是其完整细胞还是无细胞培养物的抗氧化活性,都明显高于其他酵母菌^[12],因此,选择这 2 株菌进行下一步实验。

表1 酵母菌的抗氧化活性

| 菌株号 | DPPH 活性/% | | 抗脂质过氧化/% | |
|----------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | 酵母完整细胞 | 提取物 | 酵母完整细胞 | 提取物 |
| BY5 | 41.82 ± 0.27 ^{ef} | 26.72 ± 0.68 ^g | 68.64 ± 0.71 ^{de} | 59.38 ± 3.12 ^f |
| HJ15 | 44.33 ± 2.19 ^{fg} | 27.43 ± 0.40 ^g | 67.19 ± 4.90 ^{de} | 53.53 ± 7.84 ^{ef} |
| BY10 | 40.00 ± 4.29 ^h | 12.33 ± 1.19 ^d | 59.57 ± 3.56 ^{abcd} | 49.87 ± 8.02 ^{ef} |
| BY15 | 29.57 ± 0.27 ^d | 11.90 ± 0.22 ^d | 75.44 ± 2.85 ^e | 34.57 ± 1.34 ^{cd} |
| BY31 | 46.78 ± 0.55 ^{gh} | 13.09 ± 1.33 ^d | 43.76 ± 2.55 ^{bcd} | 0 ^a |
| HY4 | 12.31 ± 0.10 ^b | 0 ^a | 58.25 ± 1.87 ^{abcd} | 5.48 ± 3.12 ^a |
| HY15 | 38.79 ± 0.36 ^e | 8.03 ± 0.36 ^c | 68.32 ± 4.36 ^{de} | 8.94 ± 3.92 ^a |
| HJ6 | 28.87 ± 0.55 ^d | 15.25 ± 1.65 ^e | 65.30 ± 3.65 ^{cde} | 27.46 ± 1.65 ^{bc} |
| HJ10 | 19.97 ± 0.55 ^c | 0 ^a | 53.21 ± 0.80 ^{ab} | 56.48 ± 5.79 ^f |
| BY14 | 8.63 ± 0.55 ^b | 4.27 ± 0.07 ^b | 49.43 ± 8.99 ^a | 31.55 ± 5.25 ^{bcd} |
| HJ22 | 4.25 ± 0.18 ^a | 0 ^a | 50.57 ± 5.25 ^a | 42.69 ± 4.10 ^{de} |
| CICC1850 | 40.46 ± 1.82 ^{ef} | 22.01 ± 0.14 ^f | 58.94 ± 1.78 ^{abcd} | 20.91 ± 4.45 ^b |

注:同一列中不同字母表示差异显著($p < 0.05$).

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态学特征

图1,2分别为BY5和HJ15菌株的培养特征和个体形态特征. BY5的细胞形态为杆状或椭圆形, HJ15为椭圆形;二者大小都约为 $5\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$,菌落颜色均为乳白色,表面光滑粘稠,边缘整齐,不透明,菌落形态为圆形隆起,液体培养形成菌膜和沉淀;细胞主要以出芽方式繁殖,不形成子囊孢子,形成假菌丝.

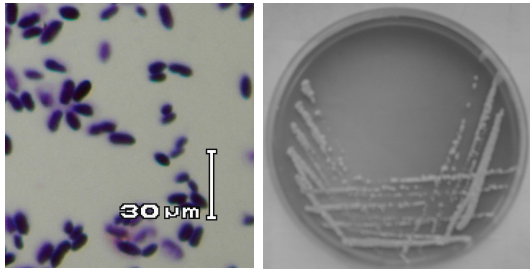


图1 BY5菌株细胞的表形

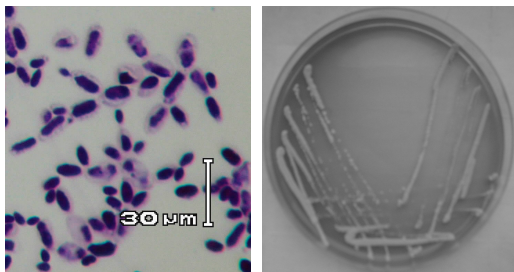


图2 HJ15菌株细胞的表形

2.2.2 生理生化特征

表2为BY5和HJ15的生理生化鉴定指标,由表2可知,二者在生理生化特征方面没有明显的差异.除了针对蜜二糖和棉子糖及质量分数50%葡萄糖有不同的反应外,其他检测结果均相同.参照文献[13],鉴定BY5和HJ15均为兼性好氧菌,初步鉴定属于发酵毕赤氏酵母菌(*Pichia*

fermentans).

表2 BY5及HJ15菌株的生理生化特征

| 实验项目 | BY5 | HJ15 |
|-------------------------|-----|------|
| 尿素水解 | — | — |
| DBB | — | — |
| 葡萄糖发酵 | + | + |
| 抗放线菌酮 | — | — |
| 氮素同化 | — | — |
| 尸胺 | + | + |
| 葡萄糖同化 | — | — |
| 纤维二糖 | — | — |
| 半乳糖 | — | — |
| 麦芽糖 | — | — |
| 蜜二糖 | — | + |
| 棉子糖 | — | + |
| 甘露醇 | V | V |
| 赤藓糖 | — | — |
| 1-甲基- α -D-吡喃葡萄糖 | + | + |
| 质量分数50%葡萄糖 | — | V |

注: + 生长; — 不生长, V 可变.

2.2.3 分子生物学鉴定

酵母的分子生物学鉴定按照 Kurtzman^[15]的方法,通过酵母核糖体大亚基26S rDNA的D1/D2区域DNA序列的特异性进行鉴定.提取酵母菌的总DNA,对其26S rDNA D1/D2区域的DNA序列进行PCR扩增,扩增后进行电泳检测,如图3,发现二者序列均在500~750 bp之间,将所得部分序列送上海生工测序,得到BY5的D1/D2区部分序列为563 bp, HJ15为530 bp.将测得的序列以BLAST软件在GenBank中进行相似性检索,用DNASTar软件分析,结果发现BY5和序列号为EF550234(一株来源于水果表面的*P. fermentans*)的同源性达100%,与EU019222.1(一株分离于新疆koumiss的*P. fermentans*酵母菌)同源性达98.8%;HJ15与AM882677.1(一株分离于印度腐败水果的*P. fermentans*酵母菌)同

源性达到 99.8%, 与 EU019222.1 源性达 99.6%。然后将检索结果提交 GenBank, 得到序列号为:BY5 (FJ219591); HJ15 (FJ219598)。将得到的序列同 GenBank 中 11 株源性高于 98% 的酵母菌进行 BLAST 分析, 构建系统发育树, 见图 4。结果显示 HJ15 与 EU445387 (一株来源于断奶小猪肠道的酵母)、AM882677 亲缘关系最近, BY5 与 EU019222.1、DQ377652 亲缘关系最近。由此可以初步确定这 2 株菌为 *P. fermentans* 酵母。

BY5 中 26S rDNA D1/D2 区部分序列:

TGCCCCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAA
GCTCAGATTTGGAATCGCTTCGGCGAGTTGTGAA
TTGCAGGTTGGCGCCTCTGCGGCGGCGGCGGTCC
AAGTCCCTTGAACAGGGCCCAATTGAGGCTGA
GAGCCCCGTGGGACCGTTTGCCTACGCTCTGAGG
CCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAG
CTCTAAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAA
ATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACT
GTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAG
AGTGAACAGCACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAA
GGGTATTGCGCCGACATGGAGCGTGGCGACCG
CTGCCCCCTCGTGGCGGGCGCTCTGGGCGTGCTCT
GGGCCAGCATCGGTTTTTGGCCGGGAGAAGGGC
GGCGGCATGTAGCTCTTCGGAGTGTATAGCCT
GCCGCCGGCGCCGAGCGGGGACCGAGGACTG
CGACTTTTGTCTCGGATGCTGGCACAACGGCGCA
ACACCGCCCGTCTTGAACAACCGGACCA(共 563 bp)。

HJ15 中 26S rDNA D1/D2 区部分序列:

CGGCAAAAGCTCAGATTTGGAATCGCTTCGG
CGAGTTGTGAATTCAGGTTGGCGCCTCTGCGGC
GGCGGGTCCAAGTCCCTTGAACAGGGCGCC
ATTGAGGGTGAGAGCCCCGTGGACCGTTTGCC
TATGCTCTGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTT
TGGAATGCAGCTCTAAGCGGGTGGTAAATTCCA
CTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGC

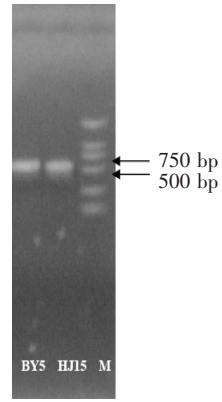


图 3 26S rDNA D1/D2 区 PCR 产物扩增图

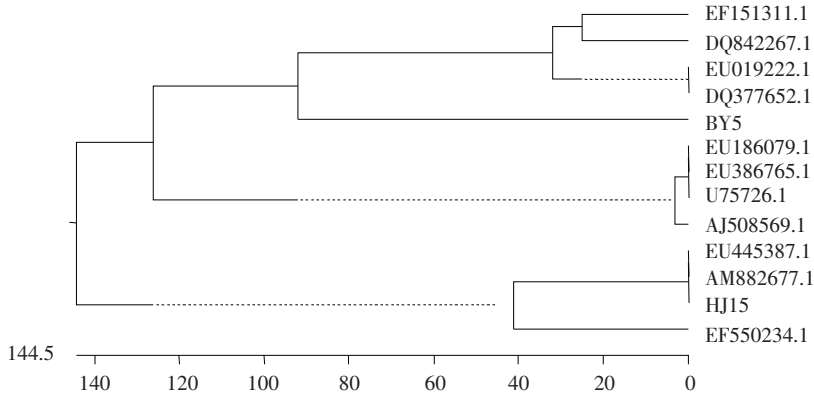


图 4 以 26S rDNA 为基础的 BY5 与 HJ15 系统发育树

GAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCAC
TTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTC
TTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCCGACATGGAG
CGTGGCGCACCGCTGCCCTCTGCGGCGGCGCTCT
GGGCGTGCTCTGGGCCAGCATCGGTTTTTGGCCG
GGGAGAAGGGCGGCGGGCATGTAGCTCTTTCGGA
GTGTTATAGCCTGCCGCCGGCGCCCGAGCGGG
GACCGAGGACTGCGACTTTTGTCTCGGATGCTGG
CACAACGGCGCAACACC(共 530 bp)。

2.3 *P. fermentans*BY5 与 HJ15 对乳成分的影响

P. fermentans 酵母是发酵乳制品中常见的酵母之一, 尤其在一些风味比较特殊的发酵乳制品中常常被检测到, 如 kefir、viili、Cantalet 干酪^[11, 16], Camembert^[17] 干酪等。牛乳中的主要成分是乳糖、脂肪和蛋白质, 它们是乳制品风味产生的主要前体物质, 因此, 为了给生产实践提供一些理论依据, 本实验将筛选得到的 2 株 *P. fermentans* 酵母添加到 UHT 牛乳中对其影响牛乳中乳糖、脂肪、蛋白质的特性进行研究。

2.3.1 *P. fermentans* 酵母 BY5 和 HJ15 的生长特性

通过实验优化发现酵母 BY5 和 HJ15 在 pH6、培养温度 28 °C 为最适生长条件, 因此, 将 BY5 和 HJ15 酵母放在 YPD 液体培养基中 (pH6) 培养 80 h, 每隔 8 h 取一次样进行细菌总数的测定, 生长曲线见图 5。可以看出, 两株菌在好氧条

件下均表现出典型的 Monod 生长曲线,0 ~ 16 h 为对数生长期,在 64 h 时二者达到最大值。

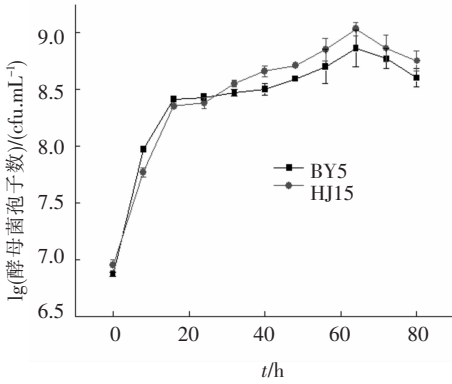


图5 BY5 与 HJ15 的生长曲线

2.3.2 对 UHT 乳中乳糖的作用

发酵乳制品的风味形成是一个复杂的过程,包括乳成分的化学及生物化学转变,其中乳糖通常被微生物利用生成乳酸,然后转变成其他的代谢产物如乙醇等. 由于 *P. fermentans* 酵母一般不能发酵乳糖,而且在发酵乳中也没有检测到乳糖的降解产物葡萄糖和半乳糖,但是发酵液中总的乳糖质量浓度却明显下降(如表3),而且还有少量的次级产物乙醇被检测出来. 究其原因有两种可能:一是这2株酵母可能有微弱的发酵乳糖的能力,将乳糖分解后,得到的产物葡萄糖及半乳糖被酵母进一步利用生成乙醇,而剩余的微量葡萄糖及半乳糖不易被检出. 二是这2株酵母确实没有发酵乳糖的能力,发酵液中的乙醇系酵母发酵牛乳中含有的微量葡萄糖所产生^[4];或者是酵母细胞壁或细胞内可能含有的微量β-半乳糖苷酶被酵母通过自溶作用分泌出来,对乳糖进行了作用,得到葡萄糖和半乳糖,而其中的葡萄糖和半乳糖又被酵母所利用,形成乙醇,至于具体的原因还需进一步验证。

表3 原料乳及发酵乳中糖及乙醇质量浓度 mg · mL⁻¹

| 项目 | 原料牛乳 | BY5 发酵乳 | HJ15 发酵乳 |
|-----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 乳糖 | 49.46 ± 2.82 ^a | 14.66 ± 1.05 ^b | 22.67 ± 2.82 ^b |
| 葡萄糖 | ND | ND | ND |
| 半乳糖 | ND | ND | ND |
| 乙醇 | ND | 2.02 ± 0.05 ^a | 1.57 ± 0.08 ^a |

注:ND 为未检出;同一行不同字母表示差异性显著 ($p < 0.05$).

2.3.3 对 UHT 乳中游离氨基酸(FAA)的影响

游离氨基酸是影响发酵乳制品风味的重要组成部分^[18-19]. 本实验对添加 *P. fermentans* 酵母前后的 UHT 牛乳的游离氨基酸变化进行了测定分析(表4). 结果表明,经所选酵母发酵后,牛乳的总游离氨基酸质量浓度有了较大的提高,分别从 0.7 mg/mL 提高到 22.02 mg/mL (BY5) 和

18.05 mg/mL (HJ15); 甲硫氨酸则从 0 增加到 0.14 mg/mL (BY5) 和 2.11 mg/mL (HJ15); NH₃ 从 0.06 增加到 0.94 mg/mL (BY5) 和 0.16 mg/mL (HJ15). 因此,可以认为该酵母菌能产生对风味物质有影响的蛋白酶、肽酶或者氨基转移酶。

表4 BY5 与 HJ15 发酵乳与原料乳中的游离氨基酸 mg · mL⁻¹

| 游离氨基酸 | 原料乳 | BY5 发酵乳 | HJ15 发酵乳 |
|-----------------|-------|---------|----------|
| Asp | 0.027 | 0.267 | 0.080 |
| Thr | 0.016 | 0.124 | 0.010 |
| Ser | 0.003 | 0 | 0 |
| Glu | 0.238 | 8.160 | 6.153 |
| Gly | 0.052 | 0.352 | 0 |
| Ala | 0.031 | 0.957 | 0.131 |
| Cys | 0.030 | 0.274 | 0.157 |
| Val | 0.024 | 0.063 | 0.118 |
| Tyr | 0.031 | 0 | 3.868 |
| Ile | 0 | 0 | 0 |
| Leu | 0.024 | 3.273 | 0.067 |
| Phe | 0.054 | 3.618 | 3.381 |
| Lys | 0.041 | 1.858 | 2.173 |
| His | 0.004 | 0.005 | 0.009 |
| Arg | 0.029 | 0.015 | 0.013 |
| Pro | 0.040 | 2.119 | 1.726 |
| Met | 0 | 0.142 | 2.106 |
| NH ₃ | 0.061 | 0.936 | 0.159 |
| 总含量 | 0.707 | 22.020 | 18.047 |

实验结果为3次实验的平均值。

2.3.4 对乳中脂肪酸的影响

脂肪水解和脂肪酸的变化会影响发酵乳制品的风味,同时脂肪酸可以通过酶反应或化学反应产生其他风味物质. 由表5可知,添加酵母菌后与添加前的 UHT 牛乳脂肪酸有较大的变化. 其中 BY5 发酵后的短链脂肪酸(C₄ - C₁₂)浓度较发酵前

表5 BY5 与 HJ15 发酵乳与原料乳中的脂肪酸在总脂肪中的百分比

| 脂肪酸 | 原料乳 | BY5 发酵乳 | HJ15 发酵乳 |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 己酸(C _{6,0}) | 1.48 ± 0.01 ^a | 2.32 ± 0.05 ^b | 1.49 ± 0.01 ^a |
| 辛酸(C _{8,0}) | 1.20 ± 0.02 ^a | 2.10 ± 0.01 ^b | 1.23 ± 0.01 ^a |
| 癸酸(C _{10,0}) | 0.32 ± 0.01 ^a | 0.20 ± 0.01 ^b | 0.06 ± 0.00 ^c |
| 月桂酸(C _{12,0}) | 3.88 ± 0.10 ^a | 7.27 ± 0.83 ^b | 3.93 ± 0.04 ^c |
| 肉豆蔻酸(C _{14,0}) | 15.71 ± 1.01 ^a | 6.44 ± 0.24 ^b | 18.44 ± 1.02 ^a |
| 棕榈酸(C _{16,0}) | 45.30 ± 3.02 ^a | 49.27 ± 2.05 ^b | 44.94 ± 2.34 ^a |
| 棕榈油酸(C _{16,1}) | 0.81 ± 0.02 ^a | 4.47 ± 0.06 ^b | 2.43 ± 0.02 ^c |
| 硬脂酸(C _{18,0}) | 23.95 ± 1.18 ^a | 18.20 ± 1.07 ^b | 24.69 ± 2.06 ^a |
| 油酸(C _{18,1}) | 1.69 ± 0.09 ^a | 2.10 ± 0.01 ^b | 1.73 ± 0.01 ^a |
| 亚油酸(C _{18,2}) | 4.40 ± 0.05 ^a | 5.06 ± 0.01 ^b | 0.30 ± 0.01 ^c |
| 花生酸(C _{20,0}) | 0.82 ± 0.01 ^a | 1.77 ± 0.10 ^b | 0.45 ± 0.02 ^c |
| 花生四烯酸(C _{20,4}) | 0.44 ± 0.01 ^a | 0.80 ± 0.01 ^b | 0.31 ± 0.01 ^a |

注:同一行中不同字母表示差异性显著 ($p < 0.05$)

前的牛乳明显增加,而且 $C_{18:2}$ (亚油酸)、 $C_{20:4}$ (花生四烯酸) 等人体必需脂肪酸浓度均有所升高;与此相反,经过 HJ15 发酵过的牛乳其短链脂肪酸没有增加,中链脂肪酸($C_{13} - C_{18}$)却明显升高,其中肉豆蔻酸($C_{14:0}$)和棕榈油酸($C_{16:1}$)增加尤为明显,至于长链脂肪酸($> C_{20}$)则均有降低的效果,由此可推出这 2 株菌可能有较高的脂肪酶活性,且该酶对长链脂肪酸有特异性。

3 结 论

1) 对 2 株抗氧化活性较强的乳源酵母菌进行表型、生理生化和分子生物学特性鉴定,初步确定这 2 株菌为 *P. fermentans* 酵母。

2) 添加 *P. fermentans* 酵母后,UHT 牛乳中乳糖减少,有乙醇产生,而游离氨基酸和脂肪酸浓度明显升高,实验说明这 2 株酵母能产乙醇,能有效地提高牛乳中的游离氨基酸和脂肪酸的浓度,具有一定的蛋白水解活性与脂肪水解活性,适合应用于发酵乳制品中进行进一步研究。

参考文献:

- [1] FLEET G H. A Review: Yeasts in dairy products [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1990, 68: 199 - 211.
- [2] ROHM H, ELISKASES - LECHNER F, BRUER M. Diversity of yeasts in selected dairy products [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1992, 72: 370 - 376.
- [3] DEAK T, BEUCHAT L R, GUERZONI M E, *et al.* A collaborative study on media for the enumeration of yeasts in foods [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 43: 91 - 95.
- [4] ROOSTITA R, FLEET G H. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 31: 205 - 219.
- [5] PSOMAS E I, FLETOURIS D J, LIPOPOULOU - TZANETAKI E, *et al.* Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and feta cheese [J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86: 3416 - 3422.
- [6] KUMURA H, TANOUE Y, TSUKAHARA M, *et al.* Screening of dairy yeast strains for probiotic applications [J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87: 4050 - 4056.
- [7] ELMER H M, JAMES L S. *Applied Dairy Microbiology* [M]. New York: Marcel Dekker, 2001.
- [8] DE FREITAS I, PINON N, MAUBOIS J L, *et al.* The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129: 37 - 42.
- [9] GORI K, MORTENSEN H D, ARNEBORG N, *et al.* Ammonia production and its possible role as a mediator of communication for *Debaryomyces hansenii* and other cheese - relevant yeast species [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90: 5032 - 5041.
- [10] WANG S Y, CHEN H C, LIU J R, *et al.* Identification of yeasts and evaluation of their distribution in taiwanese kefir and viili starters [J]. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91: 3798 - 3805.
- [11] DE FREITAS I, PINON N, BERDAGUE J L, *et al.* *Kluyveromyces lactis* but not *Pichia fermentans* used as adjunct culture modifies the olfactory profiles of Cantalet cheese [J]. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91: 531 - 543.
- [12] BARNETT J A, PAYNE R W, YARROW D. *Yeasts: Characteristics and Identification* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- [13] IDF. 115A, *International Dairy Federation: Standard FIL - IDF* [S]. Brussels, Belgium; [s. n.], 1989.
- [14] 陈历水, 马莺, MAUBOIS J L, 等. 乳源 *Pichia fermentans* 酵母的抗氧化特性研究 [J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2010, 42 (2): 292 - 296.
- [15] KURTZMAN C P, ROBBETT C J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 331 - 371.
- [16] BELINHA I, AMORIM M A, RODRIGUES P, *et al.* Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55: 2446 - 2451.
- [17] BOUTROU R, KERRIOU L, GASSI J Y. Contribution of *Geotrichum candidum* to the proteolysis of soft cheese [J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16: 775 - 783.
- [18] FOX P F. *Fundamentals of Cheese Science* [M]. London: Aspen Publishers Inc, 1999.
- [19] KRANENBURG van R, KLEEREBEZEM M, HYLCKAMA van V J, *et al.* Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis [J]. *International Dairy Journal*, 2002, 12: 111 - 121.