(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110760452 A
(43)申请公布日 2020.02.07

(21)申请号 201911141925.7

(22)申请日 2019.11.20

(83)生物保藏信息
CGMCC No.18293 2019.07.25

(71)申请人 江南大学
地址 214000 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

(72)发明人 李崎 贾云 钮成拓 刘春凤 王金晶 郑飞云

(74)专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211
代理人 彭素琴

(51)Int.Cl.
C12N 1/16(2006.01)
A23L 11/00(2016.01)
C12R 1/645(2006.01)

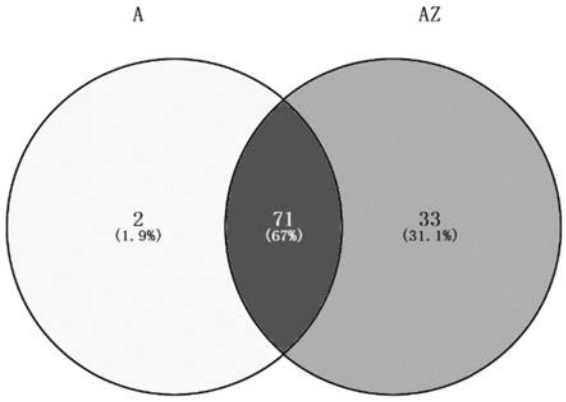
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一株鲁氏结合酵母及其在豆酱发酵中的应用

(57)摘要

本发明公开了一株鲁氏结合酵母及其在豆酱发酵中的应用，属于生物工程发酵技术领域。本发明提供了一种具有良好耐盐性的鲁氏结合酵母Y-8及其在豆酱发酵过程中的应用方法。该菌株能有效增加了豆酱的风味并显著提高了豆酱的品质。所述鲁氏结合酵母已于2019年7月25日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为CGMCC No.18293，保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号，中国科学院微生物研究所。该菌株可以耐受0-20%的盐度，且具有良好的风味合成能力，可以应用于豆酱的发酵生产。



CN 110760452 A

1.一株鲁氏结合酵母(Zygosaccharomyces rouxii),已于2019年7月25日由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏编号为CMCC No.18293,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所。

2.一种培养权利要求1所述的鲁氏结合酵母的方法,其特征在于,将所述鲁氏结合酵母接种于YPD液体培养基中,培养35h-40h。

3.含有权利要求1所述鲁氏结合酵母(Zygosaccharomyces rouxii)的组合物。

4.一种的豆酱酿造方法,其特征在于,在豆瓣酱生产过程中接种所述鲁氏结合酵母。

5.根据权利要求4所述的方法,其特征在于,将活化至对数中后期的鲁氏结合酵母接种至酱醅中。

6.根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述鲁氏结合酵母接种量为0.5-2.5%(w/v)。

7.根据权利要求4所述的方法,其特征在于,接种鲁氏结合酵母后培养25d-35d。

8.应用权利要求1所述鲁氏结合酵母制备的调味品。

9.应用权利要求4-7所述方法制备的调味品。

10.根据权利要求8或9任一所述的调味品,其特征在于,所述调味品包含黄豆酱或豆瓣酱或豆面酱。

一株鲁氏结合酵母及其在豆酱发酵中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株鲁氏结合酵母及其在豆酱发酵中的应用，属于生物工程发酵技术领域。

背景技术

[0002] 酵母是一种单细胞真菌，并非系统演化分类的单元。一种肉眼看不见的微小单细胞微生物，能将糖发酵成酒精和二氧化碳，分布于整个自然界，是一种典型的异养兼性厌氧微生物，在有氧和无氧条件下都能够存活，是一种天然发酵剂。一般泛指能发酵糖类的各种单细胞真菌，可用于酿造生产，也可为致病菌——遗传工程和细胞周期研究的模式生物。酵母菌是人类文明史中被应用得最早的微生物。目前已知有1000多种酵母，根据酵母菌产生孢子(子囊孢子和担孢子)的能力，可将酵母分成三类:形成孢子的株系属于子囊菌和担子菌。不形成孢子但主要通过出芽生殖来繁殖的称为不完全真菌，或者叫“假酵母”(类酵母)。

[0003] 鲁氏结合酵母(Zygosaccharomyces rouxii)在分类学上属于真核生物原界、真菌界、子囊菌门、酵母亚门、酵母纲、酵母目、酵母科、接合酵母属，鲁氏酵母菌落呈圆形。

[0004] 豆酱是我国一种传统的发酵调味品，通常以蚕豆、面粉和辣椒为主要原料，经曲霉、酵母及细菌等多种微生物发酵而成。传统的豆酱生产工艺一般采用多菌种混合固态发酵的开放式工艺，其本质是蚕豆和面粉中的蛋白质、淀粉、脂肪等成分在米曲霉分泌的各种酶的作用下分解成糖、氨基酸等小分子物质，然后细菌和酵母利用这些小分子物质进一步合成各种风味化合物，最终形成了豆酱独特的风味。其中酵母对风味物质的形成有着重要意义，主要包括结合酵母属(Zygosaccharmyces)、球拟酵母属(Torulopsis)和假丝酵母属(Candida)。

[0005] 然而，在传统发酵过程中，由于高盐对微生物生长和酶活的抑制，使得传统豆酱的酿造时间一般为半年左右，生产周期较长。为此很多企业采用高温速酿法来加快发酵的进行，但由于发酵温度过高，抑制了有益菌类的生长，不利于酒精发酵，使产品失去了传统的风味品质。

[0006] 针对以上问题，筛选一株具有良好耐盐性和风味的可应用于豆酱发酵的增香酵母将可以有效的提高豆酱的风味与品质。

发明内容

[0007] 本发明的第一个目的是提供一种鲁氏结合酵母(Zygosaccharmyces rouxii)，已于2019年7月25日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为CGMCC No.18293，保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号，中国科学院微生物研究所。

[0008] 本发明第二个目的是提供所述的鲁氏结合酵母的培养方法，所述方法是将鲁氏结合酵母接种至YPD液体培养基中，培养36h。

[0009] 本发明第三个目的是提供含有所述鲁氏结合酵母(Zygosaccharomyces rouxii)的组合物。

[0010] 在本发明的一种实施方式中,所述组合物是微生物制剂,其中含有所述鲁氏结合酵母(Zygosaccharomyces rouxii)。

[0011] 在本发明的一种实施方式中,所述鲁氏结合酵母以1%(v/v)接种量,在30℃、200rpm震荡培养至对数生长中后期。

[0012] 本发明第四个目的是提供一种的豆酱酿造方法,所述方法是在豆瓣酱生产过程中接种所述鲁氏结合酵母。

[0013] 在本发明的一种实施方式中,将活化至对数中后期的鲁氏结合酵母接种至酱醅中。

[0014] 在本发明的一种实施方式中,所述鲁氏结合酵母接种量为1-2%(w/v)。

[0015] 在本发明的一种实施方式中,接种鲁氏结合酵母后培养30d。

[0016] 本发明第五个目的是提供应用所述鲁氏结合酵母制备的调味品。

[0017] 本发明的一种实施方式中,所述调味品包含黄豆酱或豆瓣酱或豆面酱。

[0018] 本发明第五个目的是提供应用所述豆酱酿造方法制备的调味品。

[0019] 本发明的一种实施方式中,所述调味品包含黄豆酱或豆瓣酱或豆面酱。

[0020] 有益效果

[0021] 本发明提供了一株鲁氏结合酵母及其在豆酱中的应用,该菌株酿造出的豆酱具备104种挥发性风味物质,较普通豆酱的73种多了31种;其中酯类,醇类,羰基类、烷烃类、杂环类、酸类和其他化合物的含量在接种鲁氏结合酵母Y-8的酱醅中显著增加,较普通豆酱分别提高了15.5倍、33.1倍、1.1倍、1.1倍、6.0倍、1.8倍和3.9倍,具备醇厚、酯香的豆酱风味。同时蛋白酶含量和葡萄糖淀粉酶含量显著提高49.5%和45.4%,且可滴定酸含量下降了12.3%,明显优于普通发酵的豆酱。并且在4%～8%的NaCl中生长较快,能够耐受一定浓度的NaCl适应豆酱发酵生产。因此,为豆酱的工业化生产提供了优良菌株。

[0022] 生物材料保藏

[0023] 鲁氏结合酵母(Zygosaccharmyces rouxii),已于2019年7月25日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.18293,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所。

附图说明

[0024] 图1是鲁氏结合酵母Y-8在不同盐度下的生长情况。

[0025] 图2是未接种鲁氏结合酵母(A)与接种鲁氏结合酵母(AZ)酱醅中挥发性风味物质种类比较。

具体实施方式

[0026] 实施例1鲁氏结合酵母的筛选

[0027] 配制高盐YAP培养基:葡萄糖20g·L^{-1},蛋白胨20g·L^{-1},酵母粉10g·L^{-1},丙酸钠10g·L^{-1},氯化钠60g·L^{-1}。

[0028] 配制YPD培养基:葡萄糖20g·L^{-1},蛋白胨20g·L^{-1},酵母粉10g·L^{-1},固体培养基添加20g·L^{-1}琼脂粉。

[0029] 将10g传统发酵豆酱酱醅加入到90mL无菌生理盐水(0.9%氯化钠)中,于200rpm、

30℃孵育1h，然后稀释涂布于高盐YAP平板，28℃培养72h。挑选乳白色单菌落反复进行平板划线分离，得到纯化的单菌落。将单菌落接种于YPD液体培养基中，28℃、200rpm培养36h。取适量培养液12000rpm离心2分钟后，弃上清收集菌体。用酵母基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA，使用引物ITS1和ITS4扩增其内部转录间隔区域。引物序列分别为：ITS1：TCCGTAGGTGAACCTGCGG；ITS4：TCCTCCGCTTATTGATATGC。PCR产物由上海生工进行测序，结果如SEQ ID NO.1所示，在NCBI网站上进行BLAST序列比对，确定为鲁氏结合酵母，并命名为Y-8。

[0030] 实施例2鲁氏结合酵母的盐度耐受实验

[0031] 配置不同盐浓度YPD培养基：葡萄糖20g·L^{-1}，蛋白胨20g·L^{-1}，酵母粉10g·L^{-1}，固体培养基添加20g·L^{-1}琼脂粉分别添加0％、4％、8％、12％、16％和20％(w/v)NaCl。

[0032] 以2％接种量(按体积比)接种于上述YPD液体培养基中培养48h后，测定鲁氏结合酵母在不同盐度条件下的生长状况，以评价其耐盐性。

[0033] 如图1所示，鲁氏结合酵母Y-8表现出良好的耐盐性生，其在NaCl终浓度为4％和8％条件下生长速度较快，在NaCl终浓度为0％、12％和16％条件下生长速度次之，在NaCl终浓度20％时鲁氏结合酵母Y-8菌株生长速度相对缓慢。

[0034] 实施例3鲁氏结合酵母在豆酱发酵中的应用

[0035] 蚕豆121℃高压蒸煮变性后冷却至室温，与小麦粉充分混合(3:1，w/w)，并以0.3％接种量(按体积比)接种米曲霉3.042，在30℃下培养60h后制得成曲。将成曲与20％(w/v)的盐水按1:1(w/w)的比例混合后加入发酵罐进行发酵，发酵温度为40℃。发酵30d后，将活化至对数中后期的鲁氏结合酵母Y-8接种至酱醅中，接种量为1-2％(w/v)，以未接种鲁氏结合酵母的酱醅为对照，发酵温度为30℃，继续培养30d。

[0036] 发酵结束后，发现接种鲁氏结合酵母Y-8的酱醅较未接种鲁氏结合酵母的酱醅风味更加饱满，香气更为醇厚。对酱醅的挥发性风味物质进行分析，接种鲁氏结合酵母Y-8的酱醅中挥发性化合物的含量和种类与未接种的酱醅有显著差异。如图2所示，在未接种鲁氏结合酵母和接种鲁氏结合酵母Y-8的酱醅中分别发现73和104种挥发性物质，在接种鲁氏结合酵母Y-8后挥发性风味物质的种类增加了31种。如表1所示，酯类，醇类，羰基类、烷烃类、杂环类、酸类和其他化合物的含量在接种鲁氏结合酵母Y-8的酱醅中显著增加。表2列举了未接种鲁氏结合酵母与接种鲁氏结合酵母Y-8酱醅中检测得到的多种风味物质的种类及其含量，发现和未接种菌株酱醅相比，接种了鲁氏结合酵母Y-8的酱醅汇总绝大部分风味物质含量均有大幅度上升，其中酯类，醇类，羰基类、烷烃类、杂环类、酸类和其他化合物的含量在接种鲁氏结合酵母Y-8的酱醅中较普通豆酱分别提高了15.5倍、33.1倍、1.1倍、1.1倍、6.0倍、1.8倍和3.9倍。因此，接种鲁氏结合酵母可以有效改善豆酱风味。

[0037] 表1未接种鲁氏结合酵母(A)与接种鲁氏结合酵母Y-8(AZ)酱醅中挥发性风味物质含量分析(mg/100g干基)

[0038]

	醇类	酯类	羰基类	杂环类	烷烃类	酸类	其它
A	200.64	95.56	80.36	44.84	15.62	29.37	10.34
AZ	3524.20	3253.36	165.92	95.99	109.84	81.72	50.29

[0039] 表2未接种鲁氏结合酵母(A)与接种鲁氏结合酵母Y-8(AZ)酱醅中挥发性风味物质种类及含量

[0040]

风味物质	中文名	A	AZ
醇类	异戊醇	481.15	4025.58
	1-辛烯-3-醇	383.13	548.60
	2,3-丁二醇	373.90	3494.24
	苯乙醇	296.04	2985.67
	反式-2-辛烯-1-醇	108.22	175.81
	糠醇	91.47	152.93
	异丁醇;2-甲基丙醇	74.82	819.57
	乙醇	74.41	22265.01
	芳樟醇	49.03	126.75
	3-甲硫基丙醇	42.59	122.66
	1-辛醇	18.03	27.48
	3-辛醇	9.19	156.89
	叔十六硫醇	4.38	29.80
	正丁醇	0.00	162.55
	丙醇	0.00	112.10
	DL-β-乙基苯乙基乙醇	0.00	36.36
酯类	亚油酸乙酯	11.17	5568.46
	棕榈酸甲酯	305.91	370.50
	亚油酸甲酯;(Z,Z)-9,12-十八烷二烯酸甲酯	258.18	223.56
	12-甲基十四烷酸甲酯	72.02	262.39
	乙酸乙酯	45.36	1790.99
	十四酸甲酯	31.68	27.47
	乙酸异戊酯	31.30	117.10
	异戊酸乙酯	26.76	1042.09
	乙酸甲酯	25.83	32.21

[0041]

	苯乙酸甲酯	24.33	216.83
	12-甲基十三烷酸甲酯	21.18	30.23
	2-甲基丁酸-3-甲基丁酯	12.93	113.89
	棕榈酸乙酯;十六酸乙酯	12.82	3086.66
	2-甲基丁酸乙酯	10.80	1649.81
	乙酸苯乙酯	8.78	48.28
	丁酸异戊酯	8.13	61.95
	2-甲基丁酸 2-甲基丁酯	8.13	54.65
	异丁酸异戊酯	7.80	12.21
	反油酸乙酯	6.41	3549.43
	2-甲基丁酸-2-二甲基丙酯	6.22	43.46
	异戊酸异戊酯	5.63	116.00
	3-羟基十八酸甲酯	5.36	20.05
	苯乙酸乙酯	4.05	1907.73
	乙酸异丁酯	3.34	21.14
	异丁酸乙酯	1.46	607.67
	十一酸乙酯	0.00	5333.36
	十四酸乙酯;肉豆蔻酸乙酯	0.00	1476.34
	十三烷酸乙酯	0.00	664.73
	十五酸乙酯	0.00	633.77
	5-甲基己酸乙酯	0.00	500.95
	苯甲酸乙酯	0.00	483.94
	十七酸乙酯	0.00	417.71
	9-十六碳烯酸乙酯	0.00	320.66
	异己酸乙酯	0.00	293.17
	亚麻酸乙酯	0.00	234.69
	月桂酸乙酯;十二酸乙酯	0.00	196.22
	辛酸乙酯	0.00	166.31
	γ-亚麻酸甲酯	0.00	138.76
	-	0.00	104.98
	癸酸乙酯	0.00	93.71
	丙酸乙酯	0.00	88.26
	反式-4-癸烯酸乙酯	0.00	78.50
	正己酸乙酯	0.00	77.10
	肉豆蔻脑酸甲酯	0.00	60.18
	（Z）-十七烷-9-烯酸乙酯	0.00	45.08
	（Z）-十五碳-9-烯酸乙酯	0.00	29.38
	丁酸乙酯	0.00	27.46
	3-庚二酸，乙酯	0.00	25.13
	丁酸苯乙酯	0.00	24.27
	十六酸 2-甲基丙酯	0.00	24.18
	9-十四酸甲酯	0.00	20.01
酸类	异戊酸	219.08	454.40
	乙酸	70.14	316.59
	正十六酸	4.50	21.32
	4-甲基戊酸;异己酸	0.00	24.88
羰基类	异戊醛	157.33	428.69
	1-辛烯-3-酮	136.29	135.40
	苯乙醛	110.17	182.71

[0042]

	2-甲基丁醛	99.87	218.13
	3-辛酮	97.35	191.67
	反-2-辛烯醛	52.07	137.80
	3-羟基-2-丁酮;乙偶姻	50.24	9.95
	异丁醛	48.17	102.71
	2-叔丁基-5-甲基 - [1,3]二氧戊环-4-酮	33.13	0.00
	苄基丙酮	12.60	9.10
	4-酮庚乙酸	6.33	29.98
	4-茚满甲醛	0.00	213.02
杂环	2,3,5,6-四甲基吡嗪	170.27	368.33
	2,3,5-三甲基吡嗪	103.28	192.94
	3-糠醛；3-呋喃甲醛	64.44	130.20
	5-甲基呋喃醛	40.79	92.95
	2,5-二甲基吡嗪	29.09	57.38
	2-乙基-3,5,6-三甲基吡嗪	19.57	74.05
	3-乙酰基吡咯	10.72	24.96
	3-苯基呋喃	10.27	19.05
烷烃	2,4,5-三甲基-1,3-二氧戊环	10.20	684.85
	十五烷	42.85	129.00
	十六烷	30.03	112.67
	三甲基十二烷	9.26	50.14
	十四烷	12.33	32.26
	十七烷	9.78	32.24
	辛烷，1-甲氧基 -	4.05	29.80
	2,6,10-三甲基十三烷	1.13	27.44
	1,3-二氧戊环，4,5-二甲基-2-十五烷基	36.54	0.00
其他	异戊腈	41.50	45.22
	苯乙烯	29.95	32.44
	2,4,6-环庚三烯-1-甲腈	27.46	296.54
	-	4.50	64.56
	十二腈	0.00	29.16
	酚	0.00	34.92

[0043] 实施例4鲁氏结合酵母对豆酱发酵中理化指标的影响

[0044] 对得到的未接种鲁氏结合酵母和接种了鲁氏结合酵母Y-8菌株的酱醅的理化性质进行了测定，并列于表3中。从表3可知，和未接种菌株酱醅相比，接种了鲁氏结合酵母Y-8菌株的酱醅的水分、盐度和还原糖含量几乎相同，而其氨态氮含量达到2.9％，比对照组A的2.0％提升了45％。接种鲁氏结合酵母的酱醅中蛋白酶和葡萄糖淀粉酶的酶活也高于对照组A，较对照分别提升了49.5％和45.4％；而其可滴定酸含量较对照组A降低了12.3％。氨态氮含量、蛋白酶和葡萄糖淀粉酶酶活越高，说明酱醅的品质越好，从结果中可知，鲁氏结合酵母Y-8菌株的接入提升了豆酱的品质。

[0045] 表3未接种鲁氏结合酵母(A)与接种鲁氏结合酵母Y-8(AZ)酱醅中理化指标及酶活比较

[0046]

样品	水分	盐度	还原糖	氨态氮	可滴定酸	蛋白酶	葡萄糖淀粉酶
A	51.8%	12.9%	23.4%	2.0%	5.7%	214.7 U/g	115.2 U/g
AZ	51.4%	12.8%	23.5%	2.9%	5.0%	321.1 U/g	167.54 U/g

[0047] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

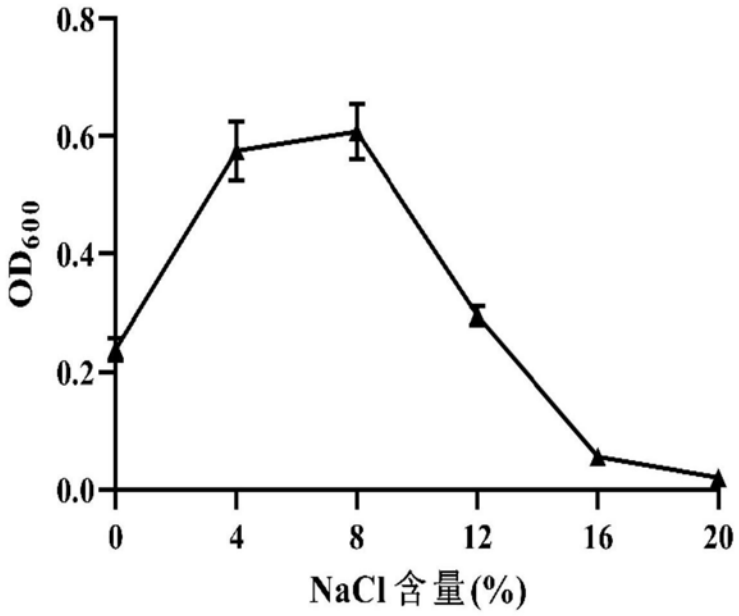


图1

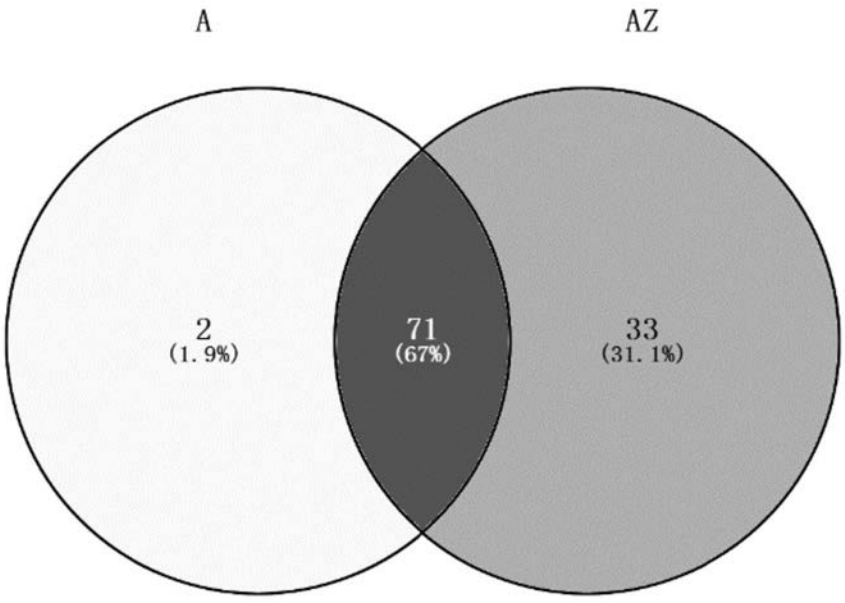


图2