

## 耐冷冻酵母菌的筛选

江正强 齐金姗 邓红 区显聪 李里特

(中国农业大学食品学院)

**摘要** 为从自然界中筛选出耐冷冻酵母菌,从土壤、谷物、果蔬、空气等不同来源筛选分离得到 60 多株酵母菌,通过模拟面团预发酵进行耐冷冻酵母菌的初筛选,并通过普通面团预发酵进一步筛选,得到了 3 株耐冷冻酵母菌,编号为 FTY-28, FTY-31 和 FTY-56。这 3 株耐冷冻酵母菌冷冻 7 d 后存活率和相对发酵力均超过 80%,且海藻糖质量分数大大高于耐冷冻性较差的酵母菌,其质量分数最高达 16.2%。

**关键词** 耐冷冻酵母菌; 筛选; 冷冻面团; 预发酵; 发酵力

中图分类号 TQ 926.1

## Screening the Freeze-tolerant Yeast Strains

Jiang Zhengqiang, Qi Jinshan, Deng Hong, Ou Xiancong, Li L ite

(College of Food Science and Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract** In order to screen the freeze-tolerant yeast strains, more than 60 yeast strains were isolated from various natural resources like soil, cereals, fruits & vegetables, air etc. The preliminary screening was done through pre-fermenting in simulative dough. Furthermore, the freeze-tolerant yeast strains were screened through pre-fermenting in dough, FTY-28, FTY-31 and FTY-56 were confirmed with the freeze-resistant ability. Their survival rates and relative fermentative ability were more than 80% after frozen for 7 days. Trehalose content of the frozen yeasts is much higher than that of the normal yeasts, the highest is up to 16.2%.

**Key words** freeze-tolerant yeast; screening; frozen dough; pre-fermentation; fermentative ability

冷冻面团法是 20 世纪 50 年代以来发展起来的面包生产新工艺,目前在许多国家和地区广泛应用,欧洲各国、美国日本等应用冷冻面团法都已有几十年的历史。美国有 50% 以上的超市面包房和零售店采用冷冻面团法加工面包,在法国冷冻面团法生产的面包也占面包总销售量的一半以上。冷冻面团法不仅可以用于面包生产,也适用于我国传统的发酵面制品如馒头、包子等的生产。在我国应用冷冻面团法生产发酵面制品虽然刚刚起步,但具有很大的发展潜力<sup>[1,2]</sup>。许多研究表明,提高冷冻面团制品质量的关键是要有耐冷冻酵母菌<sup>[3,4]</sup>。适用于冷冻面团法的耐冷冻酵母有耐热克鲁维酵母菌(*Kluyveromyces thermotolerans*)和啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)。这些菌株多由土壤、谷物、水果和花卉等中分离得到<sup>[2,5]</sup>。日本研究

收稿日期: 2002-05-11

教育部优秀青年基金资助项目

江正强,北京清华东路 17 号 中国农业大学(东校区)294 信箱, 100083

人员分离出FR  $\Gamma$ 413, FR  $\Gamma$ 802, FR  $\Gamma$ 501等耐冷冻菌株,其中FR  $\Gamma$ 501在低糖到高糖(质量分数5%~30%)面团中都能保持解冻后的发酵活力,可用于油脂含量少的面包类,但不能用于无糖面团。他们将FR  $\Gamma$ 413与无糖面团用的CYM面包酵母杂交,得到的FTYJ杂合菌株,兼有耐冷冻及发酵无糖面团的特性。也有人通过突变的方法得到适宜于冷冻面团制备的,在发酵性能上对低温敏感的CSF(Cold-sensitive fermentation)突变体,该菌株在5℃低温下不发酵,但在25~40℃时,具有与亲本菌株相当的发酵性能<sup>[6]</sup>。

国内对冷冻面团法生产面包的综述性报道较多<sup>[1,6~8]</sup>,也有人在进行耐冷冻面包酵母选育的研究,但缺少预发酵环节<sup>[2]</sup>。不进行预发酵的冷冻面团对酵母的伤害很小,不能体现酵母在冷冻面团中的活力。目前,尚未见我国选育出耐冷冻性酵母的有关报道。本研究采用在模拟面团和普通面团预发酵之后进行冷冻的方法,来选育耐冷冻酵母菌,目的是从自然界中筛选出耐冷冻酵母菌,以应用于冷冻面团法生产发酵面制品。

## 1 材料与方法

### 1.1 酵母来源

从市售商业面包酵母菌“丹宝利”和“安琪”中分离得到2株酵母菌,编号为Y<sup>-</sup>D和Y<sup>-</sup>A;从土壤、谷物、果蔬和空气等中筛选分离得到60余株酵母菌,编号为FTY-1至FTY-60。

### 1.2 试验仪器

PWB/10-003恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂生产;pH计、真空抽滤器、计数器和P/N 206-89757-92紫外分光光度计,日本Millipore公司生产;JB-3型定时恒温磁力搅拌器和循环水多用真空泵,上海沪西分析仪器厂生产;HQL300A摇床柜式恒温冷冻摇床,中国科学院武汉科学仪器厂生产;XSJ-2显微镜,重庆光学仪器厂生产;“西门子”冰箱,SMENS生产;GL-20B冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂生产。

### 1.3 酵母菌分离和培养用培养基

采用平板筛选法从自然界中筛选、划线分离得到60多株酵母菌,所用培养基分别为YM, YPD和YPG<sup>[5]</sup>。

### 1.4 酵母菌总数的测定

称取部分试样加无菌水至100mL,充分摇匀,吸取1mL再加无菌水稀释至血球计数板的每个小格含有一二个酵母菌细胞为宜。取一干净血球计数板,盖玻片置于计数板上,用吸管吸取稀释后的菌液,加一滴于盖玻片边缘,使其自行渗入充满整个计数室,静置1~2min,使细胞全部沉降于计数板表面,用生物显微镜计数<sup>[9,10]</sup>。

### 1.5 鲜酵母菌的制备<sup>[2]</sup>

将酵母菌种从YPD固体培养基中转接入YPG斜面,30℃培养2d后,转接至内装200mL YPD培养基的500mL三角瓶中,140r·min<sup>-1</sup>振荡培养24h,离心收集菌体,蒸馏水洗涤2次,制备成菌悬液,用抽滤杯抽滤脱水,即可制成鲜酵母菌,水的质量分数为70%左右。

### 1.6 模拟面团预发酵<sup>[9]</sup>

模拟面团配比参照文献[9],将0.4g鲜酵母菌加入50mL模拟面团培养基中,30℃下分别预发酵30,60,90,120,150和180min,每种处理每次分别取2份样品,每份5mL,在离心机中以6000r·min<sup>-1</sup>离心15min,用冷蒸馏水洗涤2次,将上清液倾出,再加入0.5mL冷蒸馏

水制成菌悬液, 分别在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下冷冻 1 h 和 7 d。将菌悬液置于水浴锅中 $30^{\circ}\text{C}$ 解冻 3 min, 稀释至 $10^{-6}$ , 从稀释后的菌液中用移液枪取出 $100\ \mu\text{L}$ 菌液涂在 YPD 平板培养基上, 培养 48 h, 用计数器记录菌落数。存活率定义为冷冻 7 d 后酵母菌落数与冷冻 1 h 后酵母菌落数的比值。

### 1.7 面团预发酵<sup>[9]</sup>

面团配比: 面粉 100%, 酵母菌 2% (与面粉质量比, 下同), 糖 5%, 水 50%; 面团揉搓至适当程度, 放入相对湿度 90%~95% 的发酵箱, 于 $30^{\circ}\text{C}$ 分别预发酵 0, 30, 60, 90, 120, 150 和 180 min, 预发酵结束后的面团分别用保鲜膜包裹好, 放在 $-20^{\circ}\text{C}$ 的冻藏柜中分别冻藏 1 h 和 7 d。将面团从冰箱中取出, 除去保鲜膜, 将面团置于水浴锅中 $30^{\circ}\text{C}$ 解冻 3 min, 稀释至 $10^{-6}$ , 从稀释后的菌液中用移液枪取出 $100\ \mu\text{L}$ 菌液涂在 YPD 平板培养基上, 培养 48 h, 用计数器记录菌落数。存活率的计算同本文 1.6。

### 1.8 酵母菌发酵力的测定和相对发酵力

面团配比和冷冻操作同本文 1.7 (预发酵 2 h), 将面团放入发酵力测定装置中, $30^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中放置 15 min, 然后记录在 2 h 内的 $\text{CO}_2$ 产气量。通过冷冻 7 d 后面团 $\text{CO}_2$ 产气量的变化来判断此种酵母菌的耐冻能力。相对发酵力定义为面团在冷冻 7 d 后与冷冻 1 h 后 $\text{CO}_2$ 产气量的比值。

### 1.9 酵母菌中海藻糖质量分数的测定

精确称取鲜酵母菌 0.1 g (称准至 0.000 2 g) 置于 10 mL 离心管中, 加入 4.0 mL 浓度为 $0.5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的冷三氯乙酸溶液, 于冰水浴中抽提 20 min, 置于离心机中 $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 得上清液, 再重复提取 2 次。将上清液倒入 50 mL 容量瓶中, 用冰水稀释至刻度, 摇匀, 准确吸取空白 (4.0 mL 浓度为 $0.5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三氯乙酸溶液用冰水稀释至 50 mL) 及试剂 1.00 mL 置于 2 个洁净的试管中, 再分别准确加入蒽酮试液 5 mL, 摇匀, 沸水浴反应 10 min, 立即冷却, 至室温, 摇匀, 于紫外分光光度计 630 nm 处测定吸收度, 以空白作为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 模拟面团预发酵法筛选耐冻酵母菌

FTY-1 至 FTY-60 号酵母菌在模拟面团中预发酵不同时间, 冷冻 7 d 后, 测定酵母菌的存活率, 结果见图 1。可以看出, 经过预发酵, 酵母菌容易受到冷冻伤害, 然而 FTY-27, FTY-28, FTY-31 和 FTY-56 经过 30~180 min 的预发酵, 冷冻 7 d 后存活率变化不大, 基本都在 80% 以上, 表现出很好的耐冷冻性, 说明冷冻对其存活率的影响不大。其他 56 株酵母菌 (统称为 Y-Other) 则耐冷冻性很差, 随着预发酵时间的延长, 存活率急剧下降, 预发酵 180 min 的存活率不到 30%, 说明这些酵母菌对冷冻很敏感。

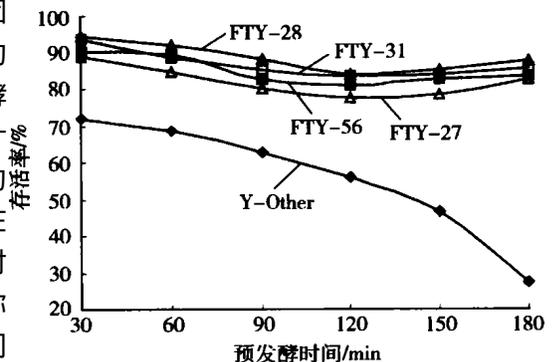


图 1 模拟面团预发酵时间与酵母菌存活率的关系 (冷冻 7 d)

## 2.2 面团预发酵法复筛耐冻酵母菌

面团发酵法能够直接反映出酵母菌在冷冻面团中的作用,2株普通商业面包酵母菌和4株初筛得到的酵母菌在面团中经不同时间的预发酵,冷冻7d后的存活率见图2。6种酵母菌的耐冷冻性能由高到低排列为FTY28,FTY-31,FTY56,FTY-27,Y-D和Y-A,只有FTY28,FTY-31和FTY56在不同预发酵时间下存活率下降缓慢,预发酵180min冷冻7d后FTY28和FTY-31的存活率仍达到80%以上,FTY56的存活率超过70%;FTY-27,Y-D和Y-A的存活率随着预发酵时间的延长而急剧下降,预发酵180min冷冻7d后的存活率均低于32.5%。因此,可以确定FTY-31,FTY28和FTY56属于耐冷冻酵母菌。

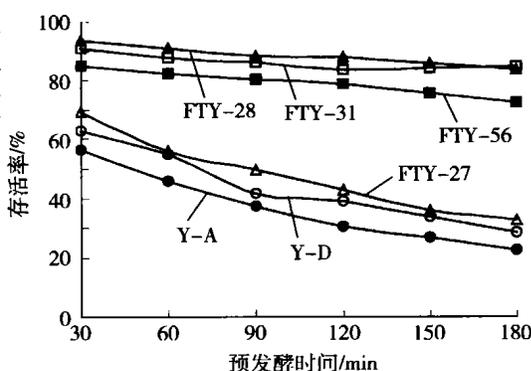


图2 面团预发酵时间与酵母菌存活率的关系(冷冻7d)

## 2.3 不同酵母菌的相对发酵力

冷冻面团法生产发酵面制品,不仅要求酵母菌具有很高的存活率,而且要求经冷冻后酵母菌的发酵力变化不大。2株普通商业面包酵母菌和4株初筛出的酵母菌在面团中预发酵2h,冷冻7d后相对发酵力的变化见图3。可以看出,具有耐冷冻性的FTY-31,FTY-28和FTY-56的相对发酵力在80%以上,其中FTY-31和FTY-28的相对发酵力超过90%,而耐冷冻性差的FTY-27,Y-D和Y-A的相对发酵力则低于50%,其中Y-A的相对发酵力仅为30%左右;因此,FTY-31,FTY-28和FTY-56适合冷冻面团法生产发酵面制品。

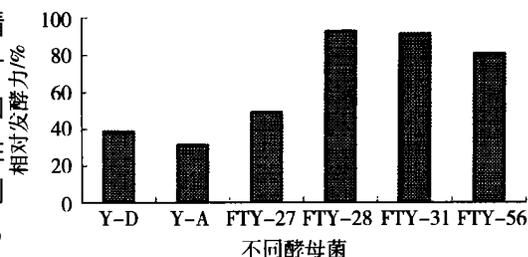


图3 不同酵母菌的相对发酵力(冷冻7d)

## 2.4 不同酵母菌海藻糖的质量分数

海藻糖能在高温、干燥、冷冻等异常条件下保护酵母菌的细胞结构,从而提高其抗逆性。不同酵母菌海藻糖质量分数的测定结果见表1。可以看出,耐冷冻酵母菌FTY-28,FTY-31和FTY-56海藻糖质量分数很高,最高达16.2%;而耐冷冻性差的FTY-27和普通商用酵母菌海藻糖的质量分数很低,最低仅为2.4%。海藻糖是极好的抗冷剂,在冷冻期间,耐冷冻酵母菌细胞内蓄积高含量海藻糖,能够起到保护细胞不受到伤害的作用。

表1 不同酵母菌海藻糖的质量分数

菌种	FTY-27	FTY-28	FTY-31	FTY-56	Y-A	Y-D
海藻糖质量分数/%	5.4	13.6	16.2	12.5	2.8	2.4

## 3 结论

1)本研究从自然界分离出60多株酵母菌,通过模拟面团发酵试验初步筛选得到的FTY-

27, FTY-28, FTY-31 和 FTY-56 酵母菌具有良好的耐冷冻性。

2) 通过面团发酵试验进一步筛选得到 3 株酵母菌 FTY-28, FTY-31 和 FTY-56, 经不同时间预发酵, 冷冻 7 d 后的存活率达 70% 以上, 判定为耐冷冻酵母菌; 2 株商业面包酵母菌和 FTY-27 预发酵 180 min 冷冻 7 d 后的存活率低于 32.5%。

3) 相对发酵力试验结果表明, FTY-28, FTY-31 和 FTY-56, 冷冻 7 d 后的相对发酵力变化不大, 适合冷冻面团法生产发酵面制品。

4) 不同酵母菌的海藻糖质量分数测定结果表明, 耐冷冻酵母菌 FTY-28, FTY-31 和 FTY-56 的海藻糖质量分数很高, 而耐冷冻性差的 FTY-27 和普通商用酵母菌的海藻糖质量分数很低。

### 参 考 文 献

- 1 张守文 冷冻面团加工烘焙食品的最新技术动态 中国粮油学报, 1999, 14(2): 17~ 23
- 2 许春英, 王昌禄 抗冻性面包酵母选育及其在冷冻面团中的应用 粮食与油脂, 2001(2): 30~ 32
- 3 Inoue Y, Bushuk W. Studies on Frozen Doughs I: Effects of frozen storage and freeze-thaw cycles on baking and rheological properties Cereal Chem, 1991, 68(6): 627~ 631
- 4 Francisca R, Pascual S, Jose A P. Engineering baker's yeast: room for improvement TBTECH, 1999, 17: 237~ 243
- 5 Hino A, Takano H, Tanaka Y. New freeze-tolerant yeast for frozen dough preparations Cereal Chem. 1987, 64(4): 269~ 275
- 6 Kyogoku Y, Ouchi K. Isolation of a cold-sensitive fermentation mutant of a baker's yeast strain and its use in a refrigerated dough process Appl Environ Microbiol, 1995, 61(2): 639~ 642
- 7 陆 婕, 管筱武, 梁运祥 冷冻面团面包生产工艺的研究进展 粮食与饲料工业, 2000, (10): 38~ 40
- 8 刘传富, 董海洲, 侯汉学 冷冻面团面包生产技术及其前景展望 粮食与油脂, 2001, (9): 44~ 45
- 9 Hino A, Mihara K, Nakashina K, et al. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts Appl Environ Microbiol, 1990, 56(6): 1386~ 1391
- 10 Autio K, Mattila-Sandholm T. Detection of active yeast cells in frozen dough section Appl Environ Microbiol, 1992, 58(7): 2153~ 2157