

# 微生物发酵开发杏果渣香料的研究

杨靖<sup>1</sup>, 刘广昊<sup>1</sup>, 王琼波<sup>2</sup>, 韩丽<sup>3</sup>, 王清福<sup>4</sup>, 赵志伟<sup>4</sup>, 李蕾<sup>4</sup>, 王秋领<sup>4</sup>

1. 郑州轻工业大学 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 漯河医学高等专科学校 食品营养系, 河南 漯河 462002;

3. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;

4. 河南中烟工业有限责任公司 技术中心, 河南 郑州 450002

**摘要:** 为开发杏果渣香料, 从杏果园土壤中分离筛选产香效果最佳的菌株, 利用单因素试验和 Box-Behnken 响应面试验优化该菌株发酵杏果渣的工艺条件, 并对其关键酶进行初步定位。结果表明: 产香效果最佳的菌株 LY13 经鉴定为维克汉姆酵母菌 (*Wickerhamomyces*), 杏果渣经该菌株发酵后呈现丰富的甜香、果香和花香, 且发酵液中醇类、酯类和酮类物质总量均较高; 最佳发酵工艺条件为发酵转速 145 r/min、发酵时间 49 h、发酵温度 31 °C、初始 pH 值 7.1, 在此条件下, 发酵产物中挥发性香气物质的总量为 135.38 μg/g, 且该菌株的产香关键酶主要为细胞膜酶。本研究可为产香微生物提供新型菌株资源, 也为后续杏果渣发酵香料的工业化生产提供理论基础。

**关键词:** 杏果渣; 微生物发酵; 香料; 关键酶

**中图分类号:** TS41; TS201.3 **文献标识码:** A

## 0 引言

杏是蔷薇科李亚科杏属植物, 原产于中国西北地区<sup>[1]</sup>, 其果实酸甜可口、香味浓郁, 深受消费者喜爱。目前, 常见的杏果加工产品主要有杏脯<sup>[2]</sup>、杏酒<sup>[3]</sup>、杏醋<sup>[4]</sup>、杏汁饮料<sup>[5]</sup>等; 由于杏果富含柠檬烯、3-羟甲基丁酮、苯乙醇、β-紫罗兰酮等香气物质, 也常被用作香料原料<sup>[6]</sup>。然而, 传统的香料提取方法会产生大量的杏果渣, 这些果渣多被作为垃圾倾倒掩埋, 易造成资源浪费和环境污染。

近年来, 将微生物发酵技术应用于果渣发酵的研究逐渐成为行业热点, 通过发酵对果渣进行二次加工利用, 可以增加产品风味并提高其感官品质<sup>[7]</sup>。例如, 张丽萍等<sup>[8]</sup>研究发现, 利用乳酸杆菌发酵猕猴桃果渣制备的饮料中, 挥发性香味物质新增 31 种; 吴震等<sup>[9]</sup>研究发现, 以桑葚果渣为原料发酵制备的果醋中, 挥发性香味物质新增 50 种。杏果渣中富含生物大分子物质(蛋白质、果胶等)和香味前体物质(类胡萝卜素、糖苷类化合物等)<sup>[10-11]</sup>, 是优质的微生物发酵原料, 但其多被用作提取类胡萝

收稿日期: 2023-10-18; 修回日期: 2024-01-19

基金项目: 中国烟草总公司重点研发项目(110202202006)

作者简介: 杨靖(1972—), 男, 河南省南阳市人, 郑州轻工业大学教授, 主要研究方向为烟草化学与烟草生物技术。E-mail: 2005076@zzuli.edu.cn

通信作者: 王秋领(1968—), 男, 河南省驻马店市人, 河南中烟工业有限责任公司技术中心工程师, 主要研究方向为香精香料与烟草化学。E-mail: wangqlhnzy@126.com

卜素<sup>[12]</sup>、多酚、黄酮<sup>[13]</sup>等物质的原料,利用微生物发酵技术开发杏果渣香料的研究尚未见报道。

微生物发酵产香具有周期短、受环境影响较小、所产废弃物较少等优点,已广泛应用于白酒、食醋、饮料、烟用香料等领域。贾丽艳等<sup>[14]</sup>从酒醅中分离出一株高产乙酸乙酯的酿酒酵母 Y2,利用该菌株发酵的白酒,清香、酯香和糟香突出。王文斌等<sup>[15]</sup>以山茶萸提取物为原料,经枯草芽孢杆菌发酵制得山茶萸发酵香料,并将其添加至卷烟中,可使烟气细腻柔和、刺激性减小,香气有所提升。但目前所开发的大部分产香微生物的产香量较低,且适宜产业化应用的种类较少。

基于此,本研究拟采用嗅香评价和气相色谱-质谱联用(GC-MS)法从杏果园的土壤中筛选具有显著产香能力的菌株,以杏果渣为原料,通过单因素试验和 Box-Behnken 响应面法优化杏果渣发酵的工艺条件,并对产香菌株细胞质酶和细胞膜酶发酵产物进行分析,初步定位关键酶的位置,以期为杏果渣香料的开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

树上干杏(干果),采集于新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克自治州(东经 82°0'21",北纬 43°33'16");土壤样品,采集于洛阳某杏果园(东经 112°23'31",北纬 34°37'47");二氯甲烷(色谱纯),山东禹王和天下新材料有限公司;蛋白胨、酵母提取物,赛默飞世尔科技公司;2,6-二氯甲苯(色谱纯),北京百灵威科技有限公司;乙酸异戊酯、无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2.5% 戊二醛固定液,上海麦克林生化科技有限公司。除特别标注外,其余试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器与设备

DPX-9052B 型恒温培养箱,上海福玛实验设备有限公司;IS-RSDA 型恒温振荡培养箱,美国精骐有限公司;同时蒸馏萃取装置,郑州赛克斯玻璃仪器有限公司;8890-5977B 型 GC-MS 仪,美国安捷伦科技有限公司;LDZX-50 KBS 型立体压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;Regulus-8100 冷冻型高分辨率场发射扫描电镜,日立科学仪器有

限公司;JY-11DN 型超声波细胞粉碎仪,宁波新芝生物科技有限公司;CMAX Plus 滤光片型光吸收酶标仪,美谷分子仪器有限公司。

### 1.3 培养基及磷酸盐缓冲溶液配制

YPD 培养基:20 g/L 葡萄糖,20 g/L 蛋白胨,10 g/L 酵母浸粉,121 °C 灭菌 20 min。

YPD 固体培养基:在 YPD 培养基的基础上,添加 20 g/L 琼脂,121 °C 灭菌 20 min。

杏果渣发酵培养基:树上干杏 50 g,蒸馏水 500 mL,浸泡过夜后用破碎机打浆,同时蒸馏萃取 2.5 h 后收集水相端,121 °C 灭菌 20 min。

磷酸盐缓冲溶液(pH 值为 7.2):8 g/L NaCl,0.2 g/L KCl,3.628 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O,0.24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,121 °C 灭菌 20 min。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 产香菌株筛选** 1)产香菌株初筛。无菌条件下,在锥形瓶中加入 10 g 土壤样品和 90 mL 无菌水,于 30 °C、150 r/min 条件下培养 4 h 后取出,将培养液按 10%接种量接入 100 mL YPD 培养基中,富集培养 48 h;将富集液进行梯度稀释,取 10<sup>-4</sup>、10<sup>-6</sup> 和 10<sup>-8</sup> 3 个梯度稀释液均匀涂布在 YPD 固体培养基上,于 30 °C 条件下培养 1~2 d 至长出单菌落;挑取单菌落,采用划线法进行纯化后,编号保存。将保存的菌株在 YPD 培养基中富集活化后,以 1%接种量分别接入杏果渣发酵培养基中,于 30 °C、150 r/min 条件下培养 36 h 后,各取 10 mL 发酵液,由 7 位经过专业嗅香训练的评价人员根据香气对发酵液进行初步嗅香评价,标记香气改变明显的菌株。

2)产香菌株复筛。将初筛得到的菌株以 1%接种量接入杏果渣发酵培养基中,空白对照组接种等量无菌水。根据嗅香评价和 GC-MS 分析结果筛选产香效果最佳的菌株。

3)嗅香评价。按照《香料香气评定法》(GB/T 14454.2—2008)<sup>[16]</sup>,从花香、果香、酒香、青香、甜香 5 个方面对发酵后的杏果渣发酵液进行嗅香评价。每个方面最高分 5 分,最低分 0 分,结果用雷达图表示。

4)GC-MS 分析。取 15 mL 发酵液,加入 15 mL 二氯甲烷溶液,涡旋振荡萃取 10 min,收集二氯甲

烷萃取液,重复操作3次后合并,加入无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥过夜,再加入50  $\mu\text{L}$  2,6-二氯甲苯(0.6426 mg/mL)溶液为内标物,常压浓缩至1 mL后,进行GC-MS分析。

GC条件:DB-5 MS色谱柱(60 m $\times$ 250  $\mu\text{m}$  $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ );进样口温度为280  $^\circ\text{C}$ ;分流比为3:1;分流流量为3.0 mL/min;载气为He,流速为1.0 mL/min;升温程序为初始温度50  $^\circ\text{C}$ ,保持3 min,以2  $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至130  $^\circ\text{C}$ ,保持3 min,再以5  $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至180  $^\circ\text{C}$ ,保持2 min,最后以3  $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至280  $^\circ\text{C}$ ,保持5 min。

MS条件:电离方式为电子轰击(EI),电子能量为70 eV;离子源温度为230  $^\circ\text{C}$ ;四极杆温度为150  $^\circ\text{C}$ ;溶剂延迟7 min;采用全扫描检测,质量扫描范围为35~500 amu。

定性分析:利用NIST20标准谱库进行检索,以匹配度高于70%的结果予以定性分析。

定量分析:以2,6-二氯甲苯(0.6426 mg/mL)溶液为内标物,采用内标半定量法,按下式进行半定量分析:

$$C_i = (A_i/A_n) \times C_n$$

式中, $C_i$ 为香气物质含量/( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), $C_n$ 为内标物含量/( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), $A_i$ 为香气物质的峰面积, $A_n$ 为内标物的峰面积。

**1.4.2 产香菌株鉴定** 1)形态学鉴定。取1 mL产香菌株菌悬液,于8000 r/min条件下离心5 min,弃上清液,加入1 mL预冷后的2.5%戊二醛固定液,在4  $^\circ\text{C}$ 环境下固定4 h后,用0.2 mol/L的磷酸盐缓冲溶液清洗3次,无水乙醇脱水2次(每次15~20 min),乙酸异戊酯置换两次(每次20 min),离心后弃上清液,留微量液体;取微量液体滴加在干净载玻片上,放入烘箱中干燥过夜,用导电胶将表面有白色菌体附着的载玻片粘在样品台上,喷金后,利用高分辨率场发射扫描电镜观察菌株细胞形态。

2)分子生物学鉴定。将纯化后的产香菌株委托上海生工生物科技公司进行26S rDNA测序,在NCBI数据库对测序结果进行序列同源性BLAST比对,初步确定菌株的分类地位,并通过MEGA11软件构建系统发育树。

**1.4.3 菌株生长曲线绘制** 将筛选得到的产香菌株按1%接种量接入YPD培养基中,于30  $^\circ\text{C}$ 、150 r/min条件下培养36 h,每隔2 h测定 $OD_{560}$ ;以 $OD_{560}$ 为纵坐标,生长时间为横坐标,绘制菌株生长曲线<sup>[17]</sup>。

**1.4.4 发酵工艺条件优化** 1)单因素试验设计。影响酵母菌发酵的主要因素包括发酵时间、发酵温度、初始pH值、发酵转速等<sup>[18-19]</sup>,因此,本研究选择发酵温度、发酵时间、发酵转速和初始pH值进行单因素试验。

发酵温度确定:在发酵时间36 h、发酵转速150 r/min、初始pH值5.0的条件下,设置发酵温度分别为25  $^\circ\text{C}$ 、27  $^\circ\text{C}$ 、30  $^\circ\text{C}$ 、33  $^\circ\text{C}$ 和35  $^\circ\text{C}$ ,考查不同发酵温度对发酵液中挥发性香气物质总量的影响。

发酵时间确定:在最适发酵温度、发酵转速150 r/min、初始pH值5.0的条件下,设置发酵时间分别为12 h、24 h、36 h、48 h和60 h,考查不同发酵时间对发酵液中挥发性香气物质总量的影响。

发酵转速确定:在最适发酵温度、最适发酵时间、初始pH值5.0的条件下,设置发酵转速分别为100 r/min、150 r/min、200 r/min、250 r/min和300 r/min,考查不同发酵转速对发酵液中挥发性香气物质总量的影响。

初始pH值确定:在最适发酵温度、最适发酵时间、最适发酵转速的条件下,设置初始pH值分别为4.0、5.0、6.0、7.0和8.0,考查不同初始pH值对发酵液中挥发性香气物质总量的影响。

2)Box-Behnken响应面试验设计。在单因素试验的基础上,选择发酵转速(A)、发酵时间(B)、发酵温度(C)和初始pH值(D)为自变量,以发酵液中挥发性香气物质总量(Y)为响应值,进行四因素三水平响应面试验。Box-Behnken响应面试验设计因素与水平见表1。

**1.4.5 关键酶初步定位** 收集纯化后的产香菌株菌体3 g,用30 mL 0.2 mol/L的磷酸盐缓冲溶液充分溶解后,冰浴条件下利用超声波细胞粉碎机进行超声波处理(功率60%,间隔5 s破碎5 s,循环10 min,共2次)至完全破碎,再于10 000 r/min条件下冷冻离心10 min,取上清液,得到细胞质粗酶液,利用酶标仪测定其浓度;沉淀用0.2 mol/L的磷

表1 Box-Behnken 响应面实验设计因素与水平

Table 1 The factors and levels of Box-Behnken response surface experimental design				
水平	因素			
	A/(r · min <sup>-1</sup> )	B/h	C/°C	D
-1	100	36	27	6.0
0	150	48	30	7.0
1	200	60	33	8.0

酸盐缓冲溶液复溶,利用酶标仪测定其浓度,直至与细胞质粗酶液浓度相同,得到细胞膜粗酶液<sup>[20-21]</sup>。分别将细胞质粗酶液和细胞膜粗酶液按体积分数为1%加入杏果渣发酵培养基中,在温度30℃、转速150 r/min和初始pH值7.0的条件下处理6h,通过对处理后样品进行嗅香评价和GC-MS分析,初步定位关键酶。

### 1.5 数据处理与分析

采用Microsoft Excel 2020软件进行实验数据整理,利用Design-Expert 13软件进行响应面实验设计和数据分析,通过Origin 2021绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 产香菌株筛选结果分析

从土壤样品中共分离纯化到16株菌株,通过嗅香评价筛选出5株能产生明显香气的菌株,分别编号为LY13、LY25、LY33、LY36和LY37。产香菌株发酵液中挥发性香气物质的种类、总离子流图及GC-MS分析结果如图1、图2和表2所示。由图1、图2和表2可知,菌株LY13、LY25、LY33、LY36和LY37发酵液中分别检测到46种、33种、25种、30种和32种挥发性香气物质,这些挥发性香气物质总量分别为87.69 μg/g、81.14 μg/g、41.08 μg/g、40.58 μg/g和46.59 μg/g,其中菌株LY13和LY25发酵液中的挥发性香气物质的种类和总量均高于其他菌株。

醇类物质是菌株LY13和LY25发酵杏果渣的主要代谢产物,其中异戊醇和苯乙醇含量较高,分别呈果香和玫瑰花香<sup>[22-23]</sup>,但二者发酵后的酯类物质与酮类物质的种类和含量差异明显,菌株LY13发酵液中检测出12种酯类物质和9种酮类物质,而LY25发酵液中仅检测出7种酯类物质和6种酮类

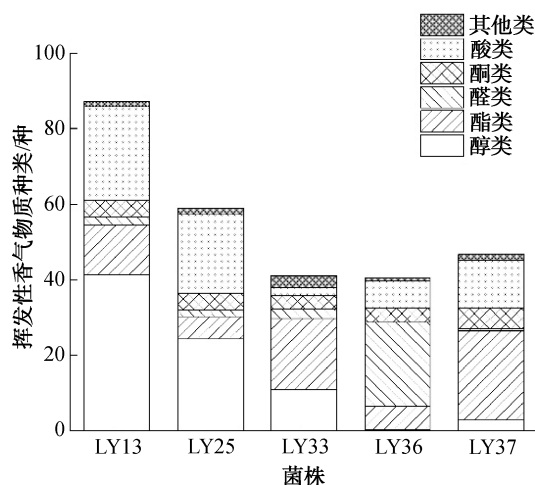


图1 产香菌株发酵液中挥发性香气物质的种类  
Fig. 1 Types of volatile aroma substances in fermentation broths of aroma-producing strains

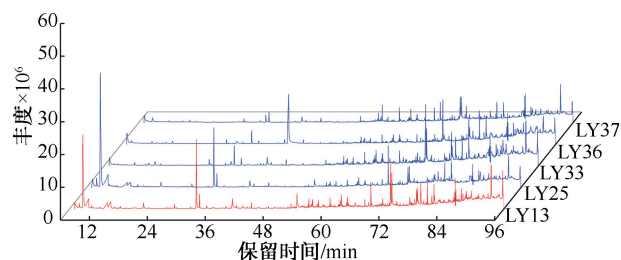


图2 产香菌株发酵液中挥发性香气物质的总离子流图

Fig. 2 Total ionograms of volatile aroma substances in fermentation broths of aroma-producing strains  
物质,其中菌株LY13发酵液中 $\gamma$ -丁内酯、二氢猕猴桃内酯、乙酸异戊酯、3-羟基-2-丁酮、2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮、 $\beta$ -二氢紫罗兰酮和呋喃酮的含量均高于菌株LY25,这些酯类和酮类物质是发酵产物甜香和水果香气的重要贡献物质。

产香菌株发酵液的嗅香评价雷达图如图3所示。由图3可知,相较于其他菌株发酵液,菌株LY13发酵液的果香、花香和甜香较突出。综上所述可知,选择菌株LY13为杏果渣的产香菌株。

### 2.2 产香菌株LY13鉴定结果分析

**2.2.1 形态学鉴定结果** 产香菌株LY13的形态如图4所示。由图4可知,产香菌株LY13在YPD固体培养基上的菌落形态呈圆形,颜色为乳白色,边缘光滑,而在高分辨率场发射扫描电镜下的细胞形态为椭圆形,出芽增殖。

表2 产香菌株发酵液中的挥发性香气物质 GC-MS 分析结果

Table 2 Results of GC-MS analysis of volatile aroma substances in fermentation broths of aroma-producing strains

		μg/g				
类别	名称	LY13	LY25	LY33	LY36	LY37
醇类	对薄荷烷-1,8-二醇	0.14	0.09	0.45	0.13	0.45
	异戊醇	26.70	32.67	4.60	—	0.23
	3-氧代- $\alpha$ -紫罗兰醇	—	—	—	—	0.90
	$\alpha$ -松油醇	—	—	0.43	0.09	—
	2,3-丁二醇	0.63	—	—	—	—
	2,5-呋喃二甲醇	0.48	0.48	—	—	—
	对羟基苯乙醇	2.56	2.09	—	—	—
	苯乙醇	10.64	11.89	5.45	—	1.12
酯类	异戊酸甲酯	—	—	—	—	0.11
	$\gamma$ -丁内酯	0.16	0.06	—	0.21	0.36
	二氢猕猴桃内酯	0.61	0.47	1.50	0.60	1.09
	棕榈酸甲酯	0.24	0.42	1.18	0.42	0.95
	东莨菪内酯	4.46	4.03	10.25	1.95	8.65
	棕榈酸乙酯	0.36	0.34	2.10	0.30	0.95
	硬脂酸甲酯	0.07	0.19	0.26	0.19	0.27
	戊酸辛酯	—	—	—	—	0.06
	油酸乙酯	0.47	—	2.87	—	0.80
	乙酸异戊酯	0.20	0.18	—	0.07	—
	庚酸烯丙酯	0.02	—	—	0.04	—
	2-甲基乙酰乙酸乙酯	0.16	—	—	—	—
	异戊酸香叶酯	0.23	—	0.62	—	—
	肉豆蔻酸异丙酯	6.31	—	—	2.51	10.46
酮类	3-羟基-2-丁酮	1.43	1.23	—	0.65	0.43
	二氢-3-羟基-4,4-二甲基-2(3H)呋喃酮	0.16	—	—	0.07	0.13
	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮	1.15	1.03	0.23	0.56	0.78
	$\beta$ -二氢紫罗兰酮	1.11	1.08	1.67	1.50	3.08
	植酮	0.37	0.42	0.61	0.35	0.89
	3,5-二羟基-2-甲基-4(H)-吡喃-4-酮	0.15	—	—	0.15	0.09
	脱氢二氢- $\beta$ -紫罗兰酮	—	—	1.01	0.51	—
	3-乙酰基-2-丁酮	0.19	0.13	—	—	—
	呋喃酮	0.15	0.08	—	—	—
	环己酮	0.09	—	—	—	—
酸类	苯甲酸	0.38	—	—	—	0.56
	亚油酸	1.53	0.72	1.30	4.75	6.09
	油酸	1.18	0.96	—	—	1.82
	硬脂酸	2.88	1.72	—	2.45	4.32
	2-甲基丁酸	4.02	3.96	—	0.10	—
	异丁酸	9.36	9.02	0.40	—	—
	异戊酸	4.56	4.41	0.34	—	—
	苯乙酸	0.58	—	—	—	—
丁酸	0.31	0.16	—	—	—	
醛类	5-甲基糠醛	0.13	0.21	0.79	—	0.37
	癸醛	0.10	0.08	0.18	0.17	0.15
	壬醛	0.25	—	—	0.06	—
	糠醛	—	—	—	0.32	—
	苯甲醛	1.36	1.18	—	0.20	—

表2(续)

类别	名称	LY13	LY25	LY33	LY36	LY37
醛类	戊醛	—	—	0.84	—	—
	苯乙醛	0.27	0.14	—	—	—
	月桂醛	—	—	0.68	—	—
	5-羟甲基糠醛	—	—	—	21.43	—
其他类	丁香酚	0.28	0.07	—	—	0.11
	2,4-二叔丁基苯酚	0.95	1.48	2.94	0.53	1.01
	广藿香烯	0.05	0.11	0.10	0.08	0.08
	D-柠檬烯	0.14	0.04	0.28	0.10	0.15
	2,4-二仲丁基苯酚	0.06	—	—	0.09	0.13
	总量	87.69	81.14	41.08	40.58	46.59

注:—表示未检测到,下同。

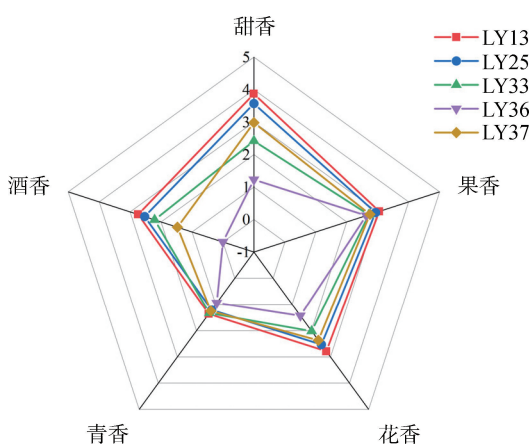


图3 产香菌株发酵液的嗅香评价雷达图  
Fig. 3 Radar chart for olfactory evaluation of fermentation broths of aroma-producing strains

**2.2.2 分子生物学鉴定结果** 基于26S rDNA 基因序列构建的系统发育树如图5所示。产香菌株LY13的26S rDNA序列长度为591 bp,此序列与维克汉姆酵母菌(*Wickerhamomyces*) 26S rDNA序列的相似性高达96%(见图5),即产香菌株LY13与维克汉姆酵母菌的亲缘关系最近,且在一个分支上。结合形态学特征,初步鉴定产香菌株LY13为维克汉姆酵母菌。

### 2.3 产香菌株LY13生长曲线分析

产香菌株LY13的生长曲线如图6所示。由图6可知,产香菌株LY13在培养8 h时进入对数生长期,此时培养基营养物质丰富、生长空间充足,菌体增殖能力最强且呈对数增长;在培养20 h时进入生长稳定期,此时培养基营养物质减少、生长空间变小及累积大量有毒代谢物会导致菌体的增殖速度逐渐下降,菌体总数呈稳定趋势。

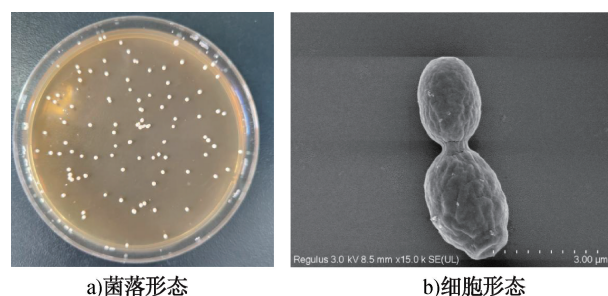


图4 产香菌株LY13的形态

Fig. 4 Morphology of aroma-producing strain LY13

### 2.4 发酵工艺单因素试验结果分析

各单因素对发酵液中挥发性香气物质总量的影响如图7所示。由图7a)可知,当发酵温度为25~35℃时,发酵液中挥发性香气物质总量呈先增加后降低的趋势。当发酵温度为30℃时,发酵液中挥发性香气物质总量最高,为87.27 μg/g。当发酵温度较低时,菌株生长受到抑制,导致其生理生化功能降低;当发酵温度升高时,菌株的生长速率随之增加,但高温会导致其发生自溶,存活量减少<sup>[24-25]</sup>,对发酵产生不利影响。故选择发酵温度为30℃较适宜。

由图7b)可知,当发酵时间为12~60 h时,发酵液中挥发性香气物质总量呈先增加后降低的趋势。当发酵时间为48 h时,挥发性香气物质总量最高,为107.60 μg/g。当发酵时间较短时,发酵不完全,挥发性香气物质总量较低;当发酵时间较长时,菌株的代谢产物会抑制其生长,导致发酵效果降低<sup>[26]</sup>。故选择发酵时间为48 h较适宜。

由图7c)可知,当发酵转速为100~300 r/min时,发酵液中挥发性香气物质总量呈先增加后降低

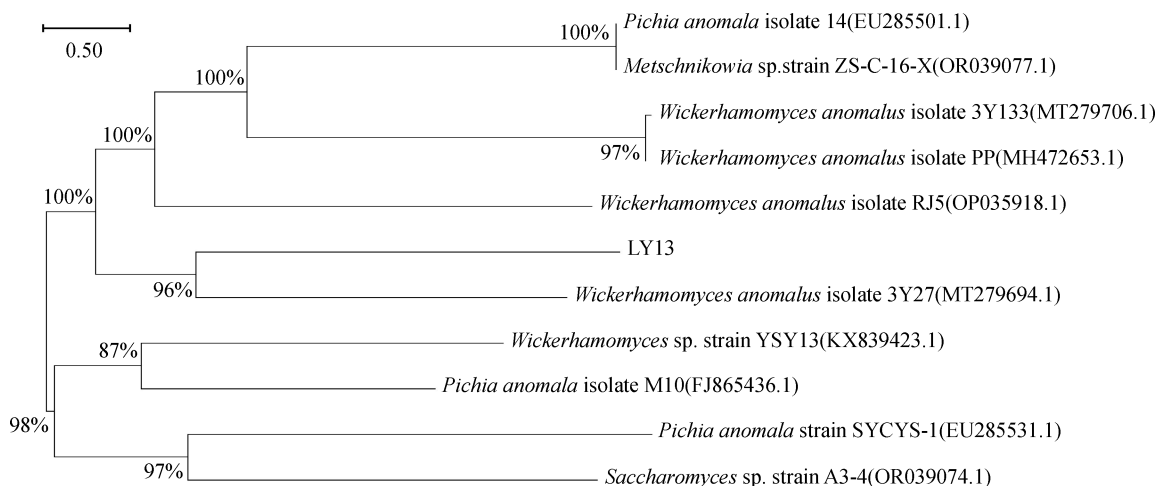


图 5 基于 26S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed based on 26S rDNA gene sequences

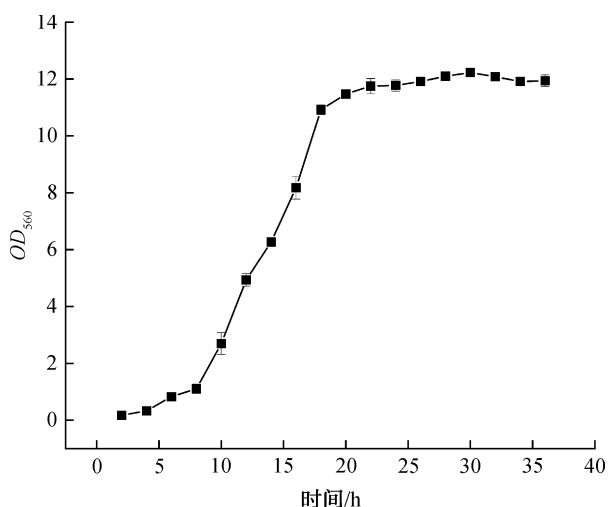


图 6 产香菌株 LY13 的生长曲线

Fig. 6 The growth curve of aroma-producing strain LY13

的趋势。当发酵转速为 150 r/min 时,挥发性香气物质总量最高,为 107.60 μg/g。在发酵过程中,发酵转速可显著影响发酵液的溶氧量,发酵转速过低会导致溶氧量不足,而发酵转速过高形成的剪切力会对菌株造成伤害,影响其正常生理代谢<sup>[27]</sup>。故选择发酵转速为 150 r/min 较适宜。

由图 7d)可知,当发酵初始 pH 值为 4.0~8.0 时,发酵液中挥发性香气物质总量呈先增加后降低的趋势。当发酵初始 pH 值为 7.0 时,挥发性香气物质总量最高,为 134.08 μg/g。初始 pH 值过高或过低均会抑制菌株的生长,导致其代谢能力减弱,影响发酵进程<sup>[28]</sup>。故选择发酵初始 pH 值为 7.0 较适宜。

## 2.5 发酵工艺 Box-Behnken 响应面试验结果分析

发酵工艺 Box-Behnken 响应面试验设计及结果见表 3。对表 3 数据结果进行拟合,得到发酵转速(A)、发酵时间(B)、发酵温度(C)、初始 pH 值(D)与挥发性香气物质总量(Y)的二次多项式回归方程:

$$Y = 136.44 - 0.46A + 0.29B + 2.10C + 0.97D - 2.53AB - 0.61AC + 1.34AD + 0.32BC + 2.30BD + 0.84CD - 4.67A^2 - 3.99B^2 - 2.63C^2 - 8.97D^2$$

回归方程的方差分析结果见表 4。由表 4 可知,回归模型的 F 值为 18.00,且 P 值<0.000 1,失拟项的 P 值(为 0.091 8)>0.05,表明该模型拟合程度较好。回归系数  $R^2 = 0.947 4$ ,校正系数  $R^2_{adj} = 0.894 7$ ,表明该模型准确可靠,可用于预测各因素对挥发性香气物质总量的影响。由 P 值可知,C、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  和  $D^2$  对挥发性香气物质总量的影响极显著( $P < 0.01$ ),AB 和 BD 对挥发性香气物质总量的影响显著( $P < 0.05$ )。根据 F 值,各因素对挥发性香气物质总量的影响顺序为:发酵温度(C)>初始 pH 值(D)>发酵转速(A)>发酵时间(B)。

各因素交互作用的响应曲面图及等高线图如图 8 所示。由图 8 可知,发酵时间与初始 pH 值之间的交互作用、发酵时间与发酵转速之间的交互作用的响应曲面相对陡峭,表明这两个交互作用中因素的变化对响应值影响显著( $P < 0.05$ )。

通过回归模型对响应值进行预测,得到最佳发酵工艺条件为:发酵转速 145.29 r/min、发酵时间

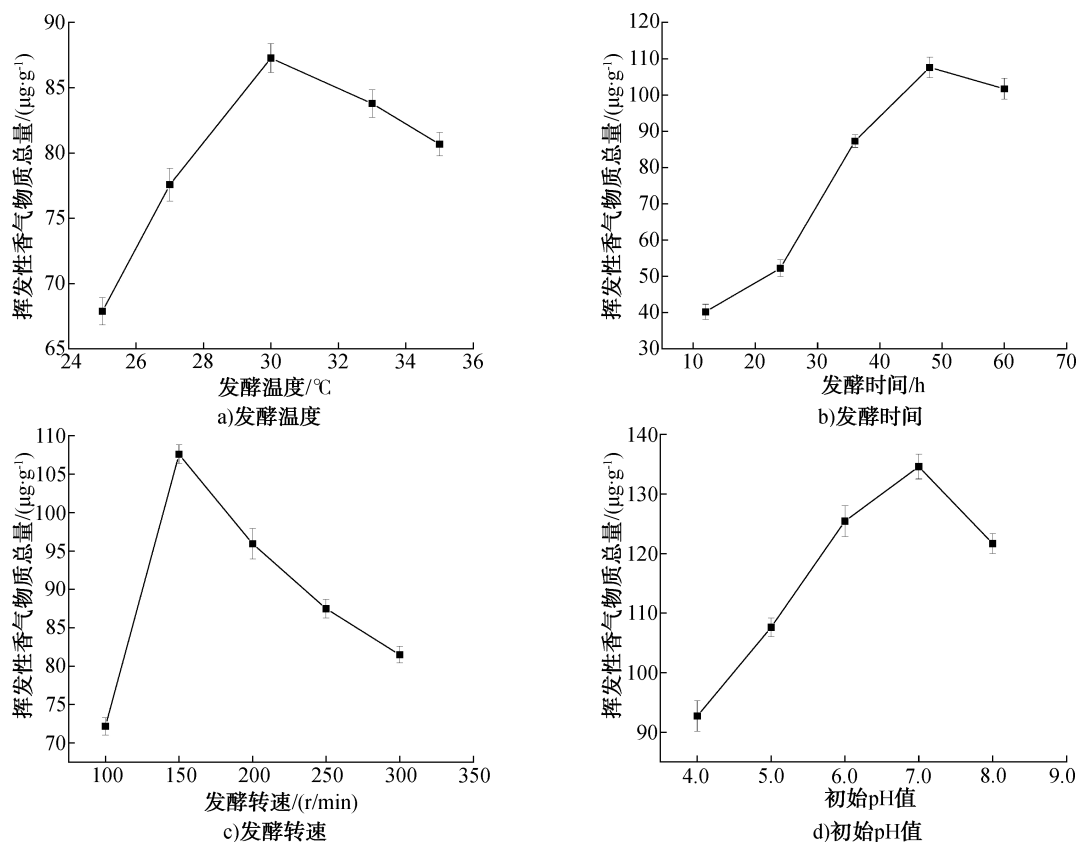


图7 各单因素对发酵液中挥发性香气物质总量的影响

Fig. 7 Effect of single factors on the total amount of volatile aroma substances in fermentation broths

49.29 h、发酵温度 31.3 °C、初始 pH 值 7.08。在此工艺下,挥发性香气物质的预测总量为 136.72 μg/g。为方便实际操作,将最佳发酵工艺条件修正为:发酵转速 145 r/min、发酵时间 49 h、发酵温度 31 °C、初始 pH 值 7.1。在此工艺下进行 3 次验证实验,得到挥发性香气物质的实测总量为 135.38 μg/g,与软件预测值较接近,表明所建立的响应面模型稳定且优化方案可行。

## 2.6 关键酶初步定位分析

产香菌株 LY13 粗酶液处理样品的嗅香评价雷达图如图 9 所示。由图 9 可知,产香菌株 LY13 的细胞膜粗酶液处理样品的甜香、酒香和花香均优于细胞质粗酶液处理样品,初步确定产香菌株 LY13 的产香关键酶主要是细胞膜酶。

产香菌株 LY13 粗酶液处理样品中挥发性香气物质的 GC-MS 分析结果见表 5。由表 5 可知,细胞膜粗酶液处理样品和细胞质粗酶液处理样品分别检测出 14 种和 20 种挥发性香气物质,其中,细胞膜粗酶液处理样品中 3-羟基-2-丁酮、异戊醇、苯乙醇、

乙酸异戊酯和 2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮的含量高于细胞质粗酶液处理样品,这 5 种物质可赋予处理样品果香、花香和甜香,是重要的呈香物质<sup>[29-30]</sup>。此外,细胞膜粗酶液处理样品中还检测出 γ-丁内酯和二氢-3-羟基-4,4-二甲基-2(3H)呋喃酮,这 2 种物质可赋予处理样品甜香和果香<sup>[31-32]</sup>。与表 2 中产香菌株 LY13 发酵产生的挥发性香气物质相比,通过酶处理产生的挥发性香气物质减少了 33 种,且异戊醇、苯乙醇等挥发性香气物质含量均有所下降,这可能是由于离开菌体后酶的活性降低,导致产香能力减弱。值得注意的是,相较于表 2,表 5 中 3-羟基-2-丁酮的含量有较大提升,且没有检测到 2,3-丁二醇,这可能是由于 3-羟基-2-丁酮的还原途径因细胞膜酶和细胞质酶的分离而被切断,导致 3-羟基-2-丁酮累积<sup>[29]</sup>。根据 GC-MS 分析结果初步确定产香菌株 LY13 的关键酶主要是细胞膜酶。

微生物发酵通常会产多种代谢产物,其中不乏一些具有负面影响的副产物,且由于发酵过程中



表3 发酵工艺 Box-Behnken 响应面设计  
设计及结果

Table 3 Box-Behnken response surface test design and results of fermentation process

试验号	A	B	C	D	Y/( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )
1	0	0	0	0	136.58
2	0	-1	1	0	132.34
3	1	1	0	0	125.45
4	0	-1	0	-1	125.81
5	1	0	0	-1	119.92
6	0	0	1	1	128.39
7	0	-1	-1	0	125.54
8	0	1	-1	0	127.07
9	0	0	0	0	137.30
10	1	0	-1	0	128.86
11	-1	0	-1	0	127.71
12	-1	-1	0	0	125.21
13	1	0	1	0	128.83
14	0	0	1	-1	125.45
15	0	0	-1	-1	123.13
16	-1	0	1	0	130.13
17	0	-1	0	1	123.11
18	0	1	0	1	125.23
19	0	0	0	0	135.12
20	0	1	0	-1	118.73
21	1	0	0	1	125.25
22	-1	0	0	-1	123.43
23	0	0	-1	1	122.72
24	1	-1	0	0	128.45
25	-1	1	0	0	132.32
26	0	0	0	0	137.32
27	0	0	0	0	135.89
28	-1	0	0	1	123.42
29	0	1	1	0	135.14

杏果渣中的营养物质被不断消耗和发酵产物的抑制作用,发酵效率会逐渐降低<sup>[30]</sup>。而酶催化通常对底物具有高选择性,可专一性地生成特定产物,从而提高产物浓度,减少副产物生成<sup>[31]</sup>。除此之外,酶在处理过程中不会受产物的抑制作用,可保持较高的催化效率。产香关键酶的确定可为其后续分离纯化打下基础,也可为后续开发产香酶制剂做准备。

### 3 结论

本文以嗅香评分和挥发性香气物质总量为指标,从杏果园土壤中分离筛选出一株具有明显产香能力的菌株 LY13,经形态学和分子生物学鉴定为维

表4 回归方程的方差分析结果  
Table 4 The variance analysis results of the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	730.42	14	52.17	18.00	< 0.000 1	**
A	2.48	1	2.48	0.86	0.370 2	
B	1.01	1	1.01	0.35	0.564 6	
C	53.13	1	53.13	18.33	0.000 8	**
D	11.31	1	11.31	3.90	0.068 3	*
AB	25.55	1	25.55	8.82	0.010 2	*
AC	1.50	1	1.50	0.52	0.483 7	
AD	7.13	1	7.13	2.46	0.139 1	
BC	0.40	1	0.40	0.14	0.714 8	
BD	21.16	1	21.16	7.30	0.017 2	*
CD	2.81	1	2.81	0.97	0.341 9	
A <sup>2</sup>	141.27	1	141.27	48.74	< 0.000 1	**
B <sup>2</sup>	103.23	1	103.23	35.61	< 0.000 1	**
C <sup>2</sup>	44.72	1	44.72	15.43	0.001 5	**
D <sup>2</sup>	521.39	1	521.39	179.88	< 0.000 1	**
残差	40.58	14	2.90			
失拟项	37.00	10	3.70	4.14	0.091 8	
纯误差	3.58	4	0.89			
合计	771.00	28				
$R^2=0.947 4$		$R_{adj}^2=0.894 7$				

注: \* 表示影响显著( $P < 0.05$ ), \*\* 表示影响极显著( $P < 0.01$ )。

克汉姆酵母菌(*Wickerhamomyces*);杏果渣经该菌株发酵后,醇类、酯类和酮类物质总量均较高,发酵液具有丰富的甜香、果香和花香;通过单因素试验和 Box-Behnken 响应面设计得到该菌株的最佳发酵工艺条件为发酵转速 145 r/min、发酵时间 49 h、发酵温度 31 ℃、初始 pH 值 7.1,在此工艺下,挥发性香气物质总量为 135.38  $\mu\text{g/g}$ ;通过对该菌株细胞质粗酶液和细胞膜粗酶液处理样品进行嗅香评价和 GC-MS 分析,确定该菌株的产香关键酶主要为细胞膜酶。本研究可为水果副产物发酵香料的开发提供参考,有利于促进水果副产物的多样化利用。

### 参考文献:

[1] SU C Y, ZHENG X C, ZHANG D D, et al. Investigation of sugars, organic acids, phenolic compounds, antioxidant activity and the aroma fingerprint of small white apricots grown in Xinjiang[J]. Journal of Food Science, 2020, 85 (12): 4300-4311.

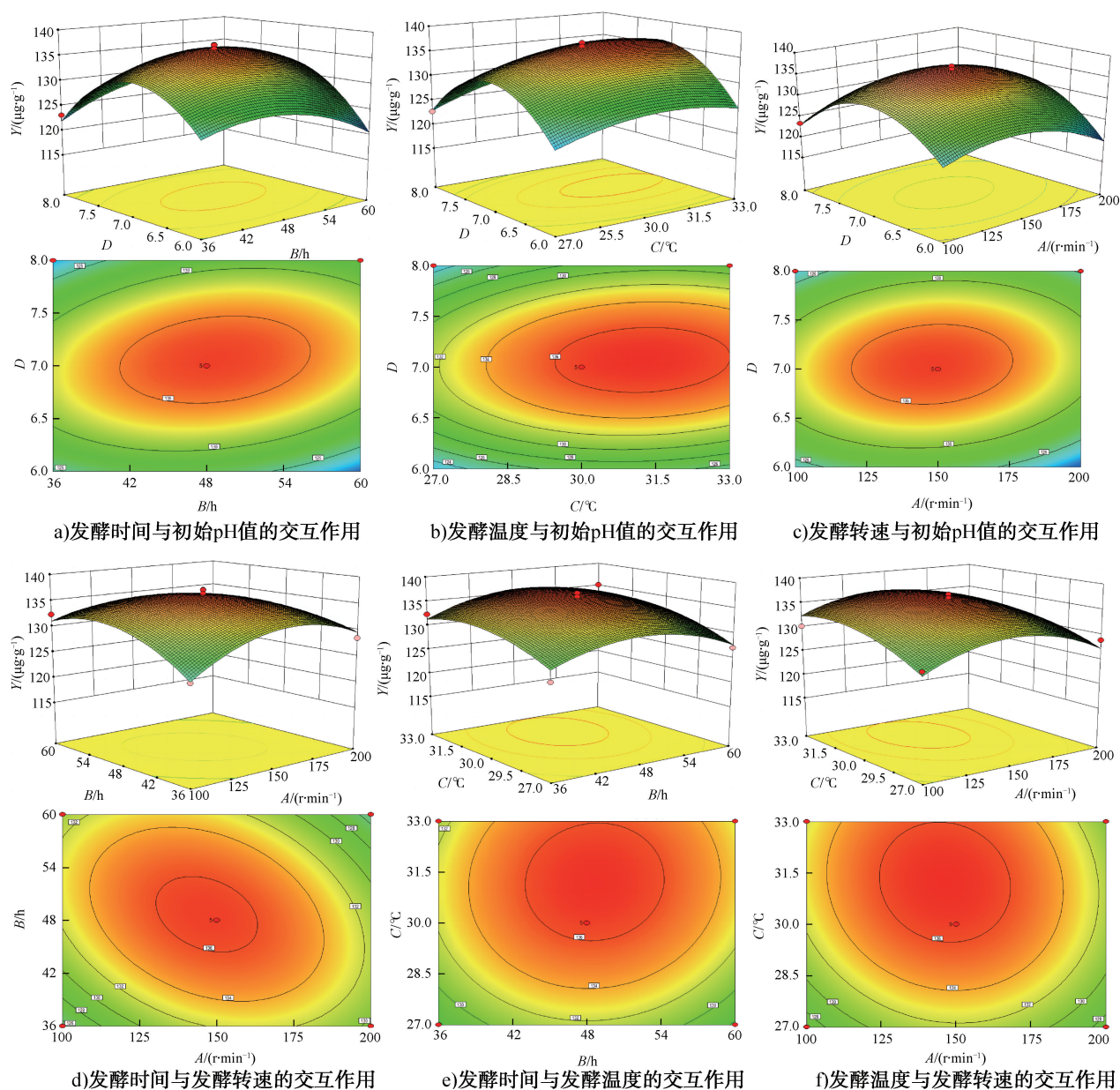


图 8 各因素交互作用的响应曲面图及等高线图

Fig. 8 The corresponding surface atlas contour maps for the interaction of factors

[2] 王雪,王新宇,刘希艺,等.以杏坯为原料加工杏脯的渗糖工艺优化[J].中国调味品,2023,48(7):101-110.

[3] 刘敏,高伟,张睿梅.杏汁发酵与杏皮渣发酵对杏酒香气质量的影响[J].食品科学,2021,42(22):193-200.

[4] 李凤林,李应华.新型山杏醋饮料的研制[J].饮料工业,2009,12(7):16-18.

[5] 陈新军,唐凤仙,单春会,等.库车小白杏果醋饮料工艺研究[J].食品工业,2016,37(8):171-175.

[6] 王花俊,毛多斌,张峻松.杏汁挥发性成分分析及在卷烟加香中的应用[J].郑州轻工业学院学报(自然科学版),2011,26(1):1-4.

[7] 黄林华,吴厚玖.我国水果副产物综合利用的研究及应用[J].食品安全质量检测学报,2015,6(11):4446-4452.

[8] 张丽萍,刘瑞玲,孟祥红,等.益生菌发酵猕猴桃果渣饮料及其营养品质与风味分析[J].食品工业科技,2022,43(20):252-262.

[9] 吴震,吴煜樟,陈莉,等.桑葚果渣固态发酵醋有机酸及风味特征分析[J].食品与发酵工业,2021,47(10):103-108.

[10] 刘敏,王杰,王君.杏酒澄清工艺的响应面法优化[J].中国酿造,2020,39(4):176-180.

[11] ZHANG L N,ZHANG Q Y,LI W H,et al. Identification of key genes and regulators associated with carotenoid metabolism in apricot (*Prunus armeniaca*) fruit using weighted gene coexpression network analysis[J].Bmc Genomics, 2019,20(1):876.

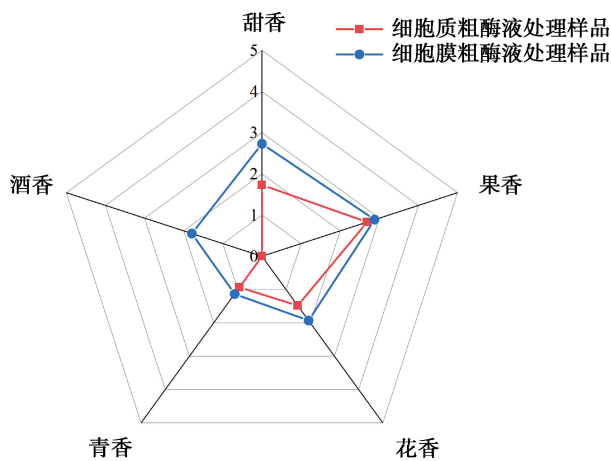


图9 产香菌株LY13粗酶液处理样品的嗅香评价雷达图

Fig. 9 Radar chart for olfactory evaluation of samples treated with crude enzyme from aroma-producing strain LY13

表5 产香菌株LY13粗酶液处理样品中挥发性香气物质的GC-MS分析结果

Table 5 Results of GC-MS analysis of volatile aroma substances in samples treated with crude enzyme from aroma-producing strain LY13  $\mu\text{g/g}$

类别	名称	细胞质粗酶液处理样品	细胞膜粗酶液处理样品
醇类	对薄荷烷-1,8-二醇	0.35	0.35
	异戊醇	—	3.55
	苯乙醇	—	1.82
酯类	$\gamma$ -丁内酯	—	0.06
	二氢猕猴桃内酯	0.55	0.58
	棕榈酸甲酯	0.34	0.32
	棕榈酸乙酯	0.75	1.08
	乙酸异戊酯	—	0.38
	肉豆蔻酸异丙酯	3.35	3.36
酮类	3-羟基-2-丁酮	12.55	18.57
	二氢-3-羟基-4,4-二甲基-2(3H)呋喃酮	—	0.06
	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮	0.58	0.76
	植酮	0.29	0.30
	环己酮	0.53	—
酸类	苯甲酸	—	0.14
	硬脂酸	2.23	2.37
	2-甲基丁酸	0.06	0.06
	异丁酸	—	0.38
醛类	癸醛	—	0.03
	壬醛	0.01	0.01
	糠醛	0.52	—
	5-羟甲基糠醛	19.54	0.36

[12] 窦芹,李芳,朱正兰,等.从杏子干渣中提取类胡萝卜素的工艺研究[J].农产品加工,2010(2):76-78,80.

[13] CHEAIB D,EL DARRA N,RAJHA H N,et al. Study of the selectivity and bioactivity of polyphenols using infrared assisted extraction from apricot pomace compared to conventional methods [J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2018,7(12):E174.

[14] 贾丽艳,田宇敏,荆旭,等.清香风味导向的酿酒酵母Y2的分离鉴定及生物学特性研究[J].中国食品学报,2020,20(1):230-236.

[15] 王文斌,宁静,王晶,等.山茱萸提取物成分分析及其在卷烟中的应用[J].香料香精化妆品,2018(6):4-8,12.

[16] 中国轻工业联合会.香料香气评定法;GB/T 14454.2—2008[S].北京:中国标准出版社,2008.

[17] 丛文蓉,陈晶瑜,韩北忠.不同酿酒酵母发酵特性及抗氧化特性的比较[J].中国酿造,2012,31(5):21-24.

[18] 鲁云凤,张四普,张征田,等.猕猴桃果酒生香酵母的诱变选育及其发酵条件优化[J].食品研究与开发,2022,43(20):141-146.

[19] 白钰琨,廖博曦,孙昭,等.酿酒酵母固态发酵的精准调控技术研究[J].食品与发酵工业,2023,49(15):54-62.

[20] 张涛,张锦,史艳可,等.产酸克雷伯氏菌胞内粗酶液降解泰乐菌素[J].生物学杂志,2022,39(5):65-71,76.

[21] 史广宇,尹华,叶锦韶,等.铜绿假单胞菌胞内酶粗提液对十溴联苯醚的降解[J].环境科学,2013,34(4):1517-1523.

[22] 王燕荣,胡海霞,史晓霞,等.混菌发酵对‘123’苹果酒香气成分的影响[J].中国酿造,2023,42(9):96-102.

[23] ELHALIS H,COX J,FRANK D,et al. The role of wet fermentation in enhancing coffee flavor, aroma and sensory quality [J]. European Food Research and Technology, 2021,247(2):485-498.

[24] 李明瑕,刘春风,王壬,等.黄桃果酒发酵工艺优化及香气成分分析[J].食品与生物技术学报,2021,40(10):39-49.

[25] 郭明遗,邓艳,杜前红,等.青李薄荷酒发酵工艺优化及风味成分分析[J].食品与机械,2023,39(6):201-209.

[26] 张顶坤,邓秋红,岳秦,等.不同发酵时间猕猴桃米酒品质变化的研究[J].中国酿造,2022,41(3):187-192.

[27] 杨利,张旭,谭文松.溶氧水平与搅拌转速对发酵生产透明质酸分子量的影响[J].华东理工大学学报(自然科学版),2008,34(6):805-808,875.

[28] 宋志姣,周艺垠,郭燕,等.栽秧泡果酒发酵工艺优化及挥发性风味物质分析[J].中国食品添加剂,2021,32(1):51-58.

[29] 刘晓霏,付晶,霍广鑫,等.生物法制备平台化合物乙偶姻的最新研究进展[J].中国生物工程杂志,2015,35(10):91-99.

[30] 高锐,杨威,宋鹏飞,等.微生物制备烟用香料的研究进

展[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(2): 92-96.  
[31] 许春艳, 孙宝国, 徐友强, 等. 合成己酸乙酯酯化酶产生

菌的鉴定及产酶条件优化[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 138-147.

## Development of apricot pomace flavoring by microbial fermentation

YANG Jing<sup>1</sup>, LIU Guanghao<sup>1</sup>, WANG Qiongbo<sup>2</sup>, HAN Li<sup>3</sup>, WANG Qingfu<sup>4</sup>,  
ZHAO Zhiwei<sup>4</sup>, LI Lei<sup>4</sup>, WANG Qiuling<sup>4</sup>

1. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. Department of Food Nutrition, Luohe Medical College, Luohe 462002, China;
3. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
4. Technology Center, China Tobacco Henan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** To develop apricot pomace flavoring, the most effective aroma-producing strain was isolated and screened from apricot orchard soil. The process conditions for microbial fermentation of apricot pomace by this strain were optimized using single-factor experiments and Box-Behnken response surface methodology, and the key enzyme was preliminarily identified. The results showed that the strain LY13, identified as *Wickerhamomyces*, had the best aroma-producing effect. After fermentation of apricot pomace by this strain, the resulting product exhibited rich sweet, fruity, and floral aromas, with a high total content of alcohols, esters, and ketones in the fermentation liquid. The optimal fermentation conditions were a stirring speed of 145 r/min, a fermentation time of 49 hours, a fermentation temperature of 31°C, and an initial pH of 7.1. Under these conditions, the total content of volatile aromatic compounds in the fermented product reached 135.38 μg/g, and the key enzyme responsible for aroma production was mainly located in the cell membrane. This study provides a novel strain resource for aroma-producing microorganisms and a theoretical basis for the industrial production of apricot pomace flavoring through microbial fermentation.

**Key words:** apricot pomace; microbial fermentation; flavoring; key enzyme

[责任编辑:杨晓娟]