

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.05.008

全麦发酵面团菌群结构分析及对风味物质的影响

Structure analysis of whole wheat yeast bacteria and its effects on flavor substances

尚 英 熊荣园

SHANG Ying XIONG Rong-yuan

(南充职业技术学院, 四川 南充 637131)

(Nanchong Vocational and Technical College, Nanchong, Sichuan 637131, China)

摘要:采用宏基因组学的方法解析全麦传统发酵面团细菌菌群结构组成,确定其核心菌属为乳酸菌科乳杆菌属短乳杆菌种。对全麦传统发酵面团和商业发酵面团的风味物质进行了测定,发现传统发酵面团风味物质种类比商业发酵多9种,在含量上也存在差异,但均以烃的含量最多。说明传统发酵剂更有利于全麦面团风味物质的形成,更易让消费者接受,为传统发酵剂在全麦制品中的应用提供理论支持。

关键词:全麦食品;面团;发酵;乳酸菌

Abstract: In order to develop and improve the utilization of whole grains, the macrogenomics method was used to analyze the structural composition of the whole wheat traditional fermentative dough, and the result shows that the core fermentation genus was *Lactobacillaceae Lactobacillus brevis*. According to the relevant literature, the flavor substances of whole wheat traditional fermentative dough and commercial fermentative dough were determined. The traditional fermentative dough contains 9 more flavor substances than commercial fermentation and there were also differences in the content, with the hydrocarbon content was showing the highest. It was indicated that the traditional fermentation strain was more conducive to the formation of flavor substances in the whole wheat dough, this was more acceptable to consumers and provided theoretical support for the application of traditional fermentation strains in whole wheat products.

Keywords: whole wheat food; dough; fermentation; lactic acid bacteria

一直以来,精细化饮食是中国的主流饮食文化,小麦在精细化加工过程中,如麸皮、皮层、胚芽等具有营养价值的物质均被转移到饲料等副产品中,造成营养物质的

浪费^[1]。但随着现代营养学和预防医学的研究,越来越认识到全谷物非精细化饮食可以有效地预防多种慢性疾病的发生,如提高食品中的全谷物含量可有效降低糖尿病的发病率^[2]。小麦粉及其制品作为中国的主食之一,对全麦粉的成分研究^[3]指出,全麦粉中含有丰富的三甲基甘氨酸和胆碱,长期服用全麦粉可以有效预防新生儿的神经血管缺陷问题,同时可减少成年人的高血压和心血管疾病发病概率^[4]。《中国居民膳食指南(2016)》也提倡人们将全谷物作为膳食重要组成成分^[5]。全麦面粉保留了天然小麦的全部成分,与精制面粉相比,可提供更多的B族维生素、矿物质、膳食纤维等营养成分及有益健康的植物化学物^[6-7]。全麦饮食是一种安全有效的健康生活方式^[8]。

目前国内的发酵面粉制品主要采用精制面粉,且多数采用单一的商业酵母菌发酵^[9-10]。发酵速度快,但风味和口味比较单一^[11-12]。欧美国家在使用全麦面粉代替精细化面粉制作烘焙食品的研究较为深入,而国内关于应用全麦面粉开发烘焙食品的研究刚起步^[13]。如将全麦发酵食品有效利用起来,不仅可以提高面制品的经济附加值,同时可以有效提高人们的合理膳食水平,保证了人们的健康^[14-15]。本研究拟以四川南充高坪区域特色“老面”作为传统发酵剂和全麦面粉制成面团,对发酵面团中的酵母菌、乳酸菌及其他细菌进行分离纯化与鉴定,采用宏基因组学的方法解析该面团中的细菌菌群结构,并确定其核心菌属/菌种。同时将市售商业发酵剂与全麦面粉制成面团,比较2种面团的风味物质含量。旨在为全麦面粉的应用提供理论支持,同时为全麦发酵食品的研究和开发提供依据,以期改善工业化全麦发酵面团的质量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

去离子水:校食品检测与饲料监测中心制备;

作者简介:尚英(1969—),女,南充职业技术学院副教授。

E-mail: dxh2151481@163.com

收稿日期:2019-01-02

全麦面粉:市售一级,山东德运面粉有限公司;
传统发酵剂:老面,校学生食堂提供;
商业酵母菌剂:安琪高活性干酵母,安琪酵母股份有限公司。

1.2 试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒:美国西格玛奥德里奇有限公司;

胶回收试剂盒:北京天根生物科技公司;

DNAPolymerase、dNTPs、10 × Taqbuffer、Taq 酶、Tris-饱和酚、溶菌酶、分子生物学试剂:大连宝生物 Takara 有限公司;

其他试剂:分析纯,吴江新源化学试剂有限公司。

1.3 仪器与设备

微量分光光度计:NanoDrop2000 型,美国 Thermo Fisher 公司;

水平电泳系统:JY-SPCT 型,北京君意东方电泳设备有限公司;

凝胶成像仪:WD-9403S 型,北京市六一仪器厂;

第二代高通量测序仪:Miseq 型,美国 Illumina 公司;

恒温培养箱:SHP-180 型,杰瑞尔电器有限公司;

气质联用色谱仪:5977A 型,美国安捷伦科技有限公司;

去离子纯水机:Eco-Q 型,上海和泰仪器有限公司;

醒发箱:SMF-32B 型,无锡胜麦机械有限公司;

冷冻离心机:5415R 型,德国 Eppendorf 公司;

超低温冰箱:DW-86L959 型,青岛海尔公司;

超净工作台:SJ-CJ-2F 型,苏州苏洁医疗公司。

1.4 方法

1.4.1 面团的制备

(1) 工艺流程

调制面团(面粉 500 g,纯净水 240 mL)→和面(20 min)→成型→一次醒发(相对湿度 85%,36 °C,20 min)→揉制(10 min)→二次醒发(相对湿度 85%,36 °C,30 min)

(2) 操作要点:将全麦面粉和传统老面放入和面缸中,使用搅拌机进行和面,先慢速搅拌 10 min,再快速搅拌 10 min,和面后应达到面筋充分扩展,表面无断裂痕迹,面团手感柔和,表面光洁。通过 2 次充分醒发提高面团的发酵完整度,同时考虑避免出现过度发酵的情况出现。

商业酵母发酵面团采用全麦面粉与商品化酵母菌剂混合后发酵的方法,具体加工流程同传统老面发酵流程。

1.4.2 面团样品的采集、贮藏及预处理 从实验室温箱中取出传统发酵完全的全麦面团样品,无菌称取 100 g 左右的面团,中心位置、中间层和表面分别挖取 10 g 面团放入锥形瓶,重复以上操作 5 次,每次采样的面团为测序目

标样品,依次命名为 1~5 号样品。向采集的面团中加入 190 mL 无菌生理盐水,摇床内持续摇动 20 min,使面团充分吸收水分并分散均匀。从分散液中取 5 mL 液体装入 15 mL 无菌离心管中,-4 °C 冰箱备用。

1.4.3 面团总基因组提取 将 1.4.2 制备的分散液(在冰箱的贮藏时间不超过 48 h)于 4 °C,10 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀于 4 °C 冰箱中备用。采用试剂盒法提取总基因组,具体方法参考试剂盒说明书。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳(120 V,60 min)进行提取基因组检测,电泳结果显示条带完整,测定浓度后写明样品名称为传统面团和商业面团,放入-20 °C 冰箱,准备测序。

1.4.4 MiSeq 宏基因组测序及生物信息学分析 以 1.4.3 中提取的细菌总基因组为模板,扩增 V3~V4 区(250 bp 左右)的基因片段。引物扩增序列为:GGYAAGNGGGGYDTA;TACAATCTATCVGGGTCN。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖电泳切胶回收后,立即使用 Illumina MiSeq PE 250 进行高通量测序。测序完成后,先进行质控去除低质量序列。使用 Flash 软件进行序列拼接,得到分析所用总序列后进行聚类,得到各样品的总 OTU,采用 Qiime 软件进行分析,分析内容包括:绘制稀疏曲线、Alpha 多样性分析、科水平和种水平的物种多样性分布统计。

1.4.5 面团挥发性风味物质的测定 称取 5 g 面团于顶空样品瓶(15 mL)中,60 °C 水浴加热 35 min。通过 SPME 针头将萃取头伸入样品瓶顶空部分,萃取 25 min,转至气相色谱仪,240 °C 解析 7 min。色谱条件:色谱柱 35 m×0.22 μm×220 μm,进样口最终温度 240 °C,起始温度 50 °C,静止 3 min,以 3 °C/min 加热至 55 °C,再以 4 °C/min 加热至 100 °C,之后以 5 °C/min 加热到 230 °C,静止 3 min,载气 He,保持 0.5 mL/min 流量体积,采用不分流模式,2 μL 进样量。质谱条件:使用电子轰击离子源(EI)为电离方式;接口温度 240 °C;保持离子源温度 190 °C;电子能量 60 eV;扫描范围 m/z 41~488。

1.5 数据分析

试验数据采用 Graphpad Prism 7 进行处理,采用 One-Way ANOVA 进行显著性分析,使用 Origin 2017 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 风味物质组成

由表 1 可知,在全麦传统发酵面团和全麦商业发酵面团中分别检测出 45,36 种风味物质,其中包括:芳香、酸、酯、酮等 8 类。数量上,2 种面团中烃类的含量最多,其次为醛类和醇类物质,醚类物质最少。总含量上,传统发酵面团的风味物质含量最多,比商业发酵面团多 9 种,烃类物质为含量差异最多的物质。风味物质的产生与微生物的作用有关,其中全麦面粉中的糖类物质经微生物

表 1 风味物质分析结果[†]
Table 1 Analysis results of flavor substances %

物质名称	相对含量		物质名称	相对含量	
	传统发酵	商业发酵		传统发酵	商业发酵
邻苯二甲醚	0.36	—	异戊醇	5.76	1.44
4-乙基 2 甲基苯酚	1.33	0.54	甲硫基丙醇	1.46	1.35
萘	0.80	0.67	2,3-丁二醇	1.06	1.14
苯乙醇	2.11	2.39	2-乙基 2-辛醇	1.10	—
辛酸	1.80	1.45	邻苯二甲醚	0.83	—
肉豆蔻酸	1.23	1.33	对苯烯基茴香醚	2.27	4.80
棕榈酸	1.04	1.43	十五烷	3.55	4.68
3-羟基月桂酸	0.88	0.59	十六烷	2.38	4.13
油酸	0.45	—	十二烷烃	1.78	—
丁酸乙酯	0.68	—	十四烷烃	2.64	3.83
辛酸乙酯	0.74	0.56	十八烷烃	3.04	4.27
亚油酸乙酯	1.06	0.82	2,6,10-三甲基十五烷	3.32	2.87
乳酸乙酯	5.26	3.23	2-甲基十六烷	1.16	2.84
乙酸乙酯	2.33	4.07	3-甲基十七烷	1.94	1.73
棕榈酸乙酯	0.13	0.92	二十七烷	1.49	2.36
相叶基丙酮	7.40	8.40	二十一烷	2.69	3.22
植酮	2.80	—	二十八烷	1.78	2.78
乙醛	2.50	1.37	二十烷	3.22	4.41
桃醛	1.83	—	植烷	2.77	—
2-十一烯醛	0.36	0.75	2,6,10,14-四甲基十六烷	1.84	2.68
正辛醛	2.24	3.30	己醛	1.49	1.48
苯乙醛	2.60	1.90	葵醛	0.68	2.00
乙醇	2.32	3.27	合计	90.50	89.00

† “—”表示未检测到。

发酵,可以产生酸和醇类化合物,而产生的酸和醇类化合物可进一步反应产生酯类化合物;微生物通过醛醇缩合反应、氨基酸的 Strecker 降解和高级醇氧化都可产生多种羰基化合物。

2.2 宏基因组法分析菌群结构

在科分类水平上(图 1),所有测序样品中的主要细菌科为乳酸菌科,所占比例均为 90%以上;第二为醋酸杆菌科,所占比例为 5%左右;此外,所有样品中还含有芽孢杆菌科(1%)和明串珠菌科(1%)的细菌。属分类水平分析结果如图 2 所示,5 个样品中含量最高为乳杆菌属,达 88%以上,其他含量较高的菌属分别为魏氏菌属、醋杆菌属、明串珠菌属等。通过菌群分类研究结果显示,在全麦发酵面团样品中含量最高的菌群主要是乳酸杆菌,该菌可能在全麦面团的发酵过程中扮演重要的角色。

2.2 乳酸菌种的分类水平分析

上述研究已证实乳酸菌为全麦传统发酵面团中主要的细菌核心菌群,乳酸菌种的含量情况如图 3 所示,样品

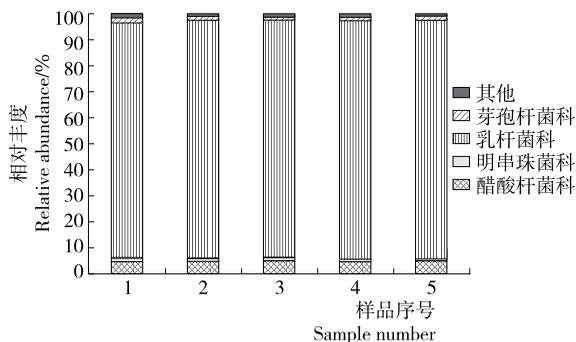


图 1 科水平的物种分布情况

Figure 1 Species distribution at the family level

中分别含有植物乳杆菌、短乳杆菌、发酵乳杆菌、旧金山乳杆菌、德氏乳杆菌、面包乳杆菌,其中含量最高的菌种为短乳杆菌,达 35%~39%,其次为发酵乳杆菌,达 21%~23%,植物乳杆菌和旧金山乳杆菌含量相对接近,均在 10%~16%。

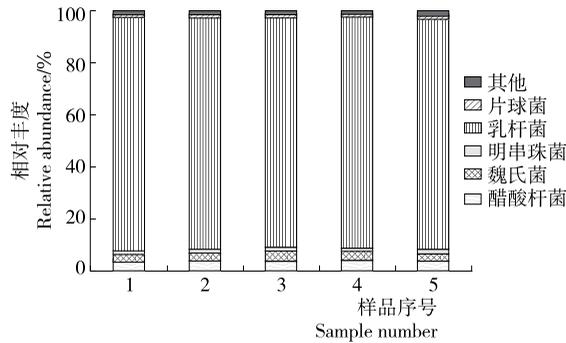


图2 属水平的物种分布情况

Figure 2 Species distribution at the genus level

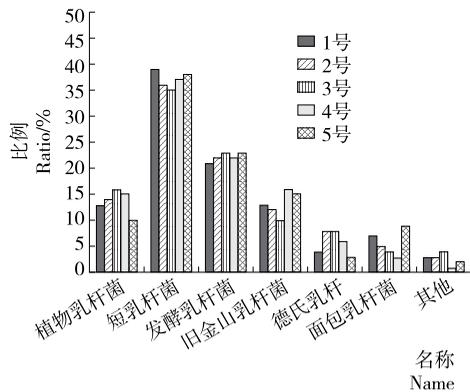


图3 乳酸菌种水平分布情况

Figure 3 Lactic acid bacteria distribution at species level

3 结论

从试验可以看出,传统发酵全麦面团除酵母菌外还含有较多的乳酸菌,用传统发酵菌剂发酵全麦面团比用商业酵母菌剂在风味物质的总量以及种类方面较优,表明传统发酵菌株对全麦制品的风味更有利。可能是商业酵母菌剂只有酵母菌,使得发酵的全麦面团风味物质种类较少。而传统发酵菌剂含有的乳酸菌,使全麦面团酸化产生多种有机酸,有利于醇、酮、醛和酯等风味物质的生成。随着全社会对人群健康的重视,全麦发酵面团的研制,能够带来一定的健康价值和经济价值,同时还具有广泛的应用价值。后续将对全麦发酵面团的传统发酵菌剂的用量、发酵条件和制作工艺对风味物质的影响进行重点研究,以便更好地为全谷物饮食的开发和利用提供理论基础。

参考文献

[1] 米尔班古丽·阿卜杜如苏力, 玛依古丽·库尔班, 努斯热提古丽·安外尔, 等. 新疆传统饅头发酵面团中酵母菌的多样性分析[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 199-203.

[2] 张守花, 陈银霞, 王显伦. 一次发酵工艺对冷冻面团及饅头品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(11): 90-93.

[3] 艾志录, 聂文静, 李真, 等. 中国不同地区老饅头对饅头质

构和感官品质的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(6): 1427-1433.

[4] 黄堃. 英研究证实全麦食品有助降血压和预防心血管疾病[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(12): 172-173.

[5] 中国营养学会. 中国居民膳食指南 2016[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 8-12.

[6] 贾峰, 周晓配, 刘效谦, 等. 紫外分光光度法检测发酵面团中清球蛋白含量[J]. 现代食品, 2017(2): 63-66.

[7] 柳甜甜, 王金水, 冯景丽, 等. 酸面团发酵过程中蛋白质降解规律研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(1): 220-224.

[8] 何承云, 林向阳, 李光磊, 等. 馒头面团发酵性能的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(9): 93-96.

[9] 马榕灿, 李志建, 胡惠影, 等. 酿酒酵母与异常威克汉姆酵母发酵面团特性比较研究[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2017, 38(5): 22-25.

[10] 刘若诗, 万晶晶, 黄卫宁, 等. 冻干酸面团发酵剂对发酵面团及面包香气的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 11-15.

[11] 张煌, 杨晓露, 李仁和. 发酵剂对面团及馒头品质的影响[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(4): 72-75.

[12] 李继锋, 王香玉, 王新伟, 等. 冷藏中种发酵法制作酸面团馒头及工艺参数的优化[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2017, 38(6): 41-47.

[13] 徐同成, 王文亮, 祝清俊, 等. 全麦食品的营养与保健功能研究进展[J]. 中国食物与营养, 2009(10): 55-58.

[14] 纪琳媛. 乳酸菌发酵剂在发酵面团中的应用[J]. 现代食品, 2016(7): 11-14.

[15] 孙银凤, 徐岩, 黄卫宁, 等. 不同发酵基质的酸面对酵母面团体系面包烘焙及老化特性的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(13): 37-42.

(上接第 43 页)

[9] 马雨洁, 刘航, 徐元元, 等. 熟制荞麦面条抗氧化品质及体外淀粉消化特性[J]. 食品科学, 2013, 34(17): 65-69.

[10] 洪雁, 顾娟, 顾正彪. 体内外实验测定荞麦淀粉消化特性[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 293-297.

[11] 尹青岗, 张倩, 赵国华. 加工方式对红薯淀粉体外消化性的影响[J]. 粮油加工, 2008(2): 115-117.

[12] 段云龙, 梁毅, 李冰, 等. 茶多酚对面包品质及面包酚类物质抗氧化能力的影响[J]. 食品科技, 2016, 41(8): 137-142.

[13] 洪兴华, 孟慧, 孙长勉, 等. 日粮中添加茶多酚对山羊抗氧化性能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2009, 45(21): 29-31.

[14] 李变变. 茶多酚对苹果酒抗氧化作用的研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(25): 296-297.

[15] 阮妙芸. 茶多酚对淀粉消化的影响研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009: 19-26.

[16] 张智涵. 淀粉与茶多酚共研磨对淀粉理化性质和消化性的影响[D]. 天津: 天津科技大学, 2018: 38-40.

[17] 全吉淑, 尹学哲, 田中真实. 茶多酚降糖作用机制的研究[J]. 山东医药, 2006, 46(32): 32-33.