

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.02.032

# 高产植酸酶乳酸菌及其黑豆酸面团 发酵低植酸营养面包研究

Studies on screening of high-yield phytase-producing lactic acid bacteria and its low-phytate nutritional breads through black bean sourdough fermentation

曹伟超<sup>1</sup> 罗 昆<sup>1</sup> 程 新<sup>1</sup> 陈 诚<sup>1</sup> 郑建仙<sup>2</sup>

CAO Wei-chao<sup>1</sup> LUO Kun<sup>1</sup> CHENG Xin<sup>1</sup> CHEN Cheng<sup>1</sup> ZHENG Jian-xian<sup>2</sup>

黄卫宁<sup>1</sup> 李 宁<sup>3</sup> FILIP Arnaut<sup>4</sup> 周黎源<sup>5</sup>

HUANG Wei-ning<sup>1</sup> LI Ning<sup>3</sup> FILIP Arnaut<sup>4</sup> ZHOU Li-yuan<sup>5</sup>

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510641; 3. 广州焙乐道食品有限公司, 广东 广州 511400;

4. 焙乐道食品集团, 比利时 布鲁塞尔 1201; 5. 山东稻香村食品工业有限公司, 山东 菏泽 274000)

(1. State Key of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510641, China; 3. Guangzhou Puratos Food Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 511400, China; 4. Puratos Group, Brussels 1201, Belgium; 5. Shandong Daoxiangcun Food Industry Co., Ltd., Heze, Shandong 274000, China)

**摘要:**从自然发酵的黑豆中筛选出一株具有高植酸酶活性的乳酸菌 L-19 并将其作为发酵剂制作黑豆酸面团。通过响应面分析法对黑豆酸面团的发酵工艺进行优化, 探究最佳发酵条件下目标菌株的生长及产酸特性, 并分析体系中多肽的分子量分布及抗营养因子含量变化, 同时以感官品评的方式对黑豆酸面团面包的烘焙特性进行评价。结果表明: 乳酸菌 L-19 经鉴定为乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*), 其胞外酶与胞内酶活性分别为 1.36, 0.30 U/mL。通过响应面设计确定的最优发酵条件为面团得率 (DY) 300、发酵温度 37 °C、接种量 8%, 黑豆基质中, 目标菌株生长良好、酸化能力适中。黑豆酸面团经发酵后, 体系中的多种抗营养因子得到有效降解, 其中植酸降解率高达 62.70%。此外, 黑豆蛋白水解后释放出

多种肽, 其中小分子肽占比达 51.47%。与对照组相比, L-19 黑豆酸面团面包表现出更高的整体可接受度。因此, 乳酸片球菌 L-19 能够有效改善黑豆酸面团面包的营养及感官品质, 具有较佳的应用潜力。

**关键词:**植酸酶; 黑豆酸面团; 抗营养因子; 多肽

**Abstract:** In this study, a strain of lactic acid bacteria (LAB) L-19 with high phytase activity selected from spontaneous fermentation black bean substrate was used as starter to prepare black bean sourdough. The fermentation process of black bean sourdough was optimized by response surface design. The growth of LAB and acidity of the sourdough were investigated in the work, and the molecular weight distribution of peptides and the degradation ratio of anti-nutritional factors (ANF) were analyzed during sourdough fermentation. Meanwhile, the baking characteristics of black bean sourdough bread were evaluated. The results showed that LAB L-19 with phytase-producing capacity was identified as *Pediococcus acidilactici*, and its extracellular and intracellular phytase activity were 1.36 U/mL and 0.30 U/mL, respectively. The optimal fermentation conditions were determined by response surface analysis as followed: DY value 300, fermentation temperature 37 °C, inoculation quantity 8%. The LAB L-19 grew well in black bean sourdough and showed moder-

**基金项目:**“十三五”国家重大专项(编号:2016YFD0400500); 国家自然科学基金(编号:31071595, 31571877); 比利时国际合作项目(编号:BE110021000)

**作者简介:**曹伟超, 男, 江南大学在读硕士研究生。

**通信作者:**黄卫宁(1963—), 男, 江南大学教授, 博士。

E-mail: wnhuang@jiangnan.edu.cn

郑建仙(1966—), 男, 华南理工大学教授, 博士。

E-mail: feixzhen@scut.edu.cn

**收稿日期:**2020-03-27

ate acidizing ability. Various anti-nutritional factors were effectively degraded in black bean sourdough, the degradation ratio of phytic acid was as high as 62.70%. In addition, a variety of peptide were released due to proteolysis of black bean, of which small molecule peptides accounted for 51.47%. Compared with the control, the overall acceptability of L-19 black bean sourdough bread was also higher. Therefore, the nutritional and sensory quality of product were improved by the LAB L-19 fermentation, and showed a potential application in black bean sourdough bread.

**Keywords:** phytase; black bean sourdough; anti-nutritional factors; peptide

烘焙食品已成为世界主流食品<sup>[1]</sup>,其中面包是消费率最高的品类之一。然而,随着人们消费观念的不断提高,营养单一的小麦面包已无法满足人们的需求。近年来,黑豆因其合理的氨基酸组成模式及高蛋白优势而备受青睐<sup>[2]</sup>。但是,黑豆中含有多种抗营养因子,其中植酸的干物质含量可达 $(18.32 \pm 1.18) \text{ mg/g}$ <sup>[3]</sup>,这些物质能与蛋白质、矿物质等多种营养成分结合,使得营养成分在人体消化过程中难以被吸收<sup>[4]</sup>。

现代烘焙行业中,酸面团常被作为一种天然的新型生物改良剂以赋予产品更高的感官品质及营养价值<sup>[5]</sup>。其中,探索微生物源的优化方法以便从自然界中获得具有特定功能作用的目标菌株是酸面团技术研究的前沿领域之一。Teixeira等<sup>[6]</sup>发现,具有 $\alpha$ -半乳糖苷酶活力的短乳杆菌能有效降解多种意大利豆中的棉子糖;Coda等<sup>[7]</sup>应用植物乳杆菌发酵蚕豆基质以降低缩合单宁含量;Gualberto等<sup>[8-10]</sup>研究了通过添加微生物来源的植酸酶以达到降解植酸的目的,但是将定向筛选的高植酸酶活性乳酸菌直接应用于豆类酸面团体系的研究仍未见报道。

试验拟从豆类基质中筛选出具有高植酸酶活性的乳酸菌,并将其作为发酵剂制作黑豆酸面团面包;通过响应面设计确定黑豆酸面团的最佳发酵条件,探究发酵处理对黑豆蛋白及抗营养因子的影响,同时对黑豆酸面团面包的感官品质进行评估,旨在通过菌株筛选定向解决黑豆中的抗营养问题,为开发高蛋白、低植酸含量的营养面包及豆类酸面团技术的工业化应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

黑豆粉:山东呆豆家健康食坊;  
高级面粉:中粮鹏泰面业有限公司;  
即发活性干酵母:乐斯福(明光)有限公司;  
MRS肉汤培养基:杭州百思生物技术有限公司;  
乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*) L-19:高产植

酸酶,筛选自自然发酵黑豆粉;

戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*) K-12:不产植酸酶,筛选自自然发酵黑豆粉;

搅拌机:5K5SS型,美国Kitchen Aid公司;

醒发箱:SPC-40SP型,新麦机械(无锡)有限公司;

切片机:SM-302型,新麦机械(无锡)有限公司;

烤箱:SM-503型,新麦机械(无锡)有限公司;

实验室 pH 计:FE20型,梅特勒仪器(上海)有限公司;

恒温恒湿培养箱:SPX-150C型,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;

紫外分光光度计:TU-1810型,北京普析通用仪器有限责任公司;

质构仪:CT3型,美国Brookfield公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 产植酸酶乳酸菌的初筛 从自然发酵豆粉(黑豆、红豆、蚕豆、鹰嘴豆)和传统酸面团中分离纯化出245株乳酸菌,取分离纯化后的乳酸菌悬浮液点接在改进后的植酸酶筛选培养基<sup>[11]</sup>(含1%植酸钙)上,30℃培养48h,观察并测量菌落及其周围透明水解圈大小,挑选出透明圈直径与菌落直径比值较大的菌株接种于琼脂斜面培养基中,保存备用。

1.2.2 产植酸酶乳酸菌的复筛 参照GB/T 18634—2009并修改。将菌株接种至MRS肉汤中培养24h,4℃、12 000 r/min离心10 min,取上清液用于测定胞外酶活<sup>[12]</sup>。同时用无菌磷酸盐缓冲液(pH 7.4)洗涤菌泥两次,然后悬浮于5 mL缓冲液中,450 W超声处理20 min(间隔5 s),取破碎液用于测定胞内酶活。另取5 mL活化后的乳酸菌培养24 h,离心、洗涤后烘干至恒重并记录菌体重量<sup>[13]</sup>。取1.8 mL乙酸缓冲液(pH 5.5)于10 mL试管中,加入0.2 mL待测液(磷标准液,上清液,破碎液)后混匀,37℃水浴5 min,加入4 mL 5.0 mmol/L植酸钠溶液(pH 5.5)继续水浴30 min,最后加入4 mL终止液及显色液,摇匀,测定415 nm处吸光度。对照组先加入终止液及显色液再加入植酸钠溶液。以无机磷标准液的浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.3 产植酸酶乳酸菌菌落形态及菌株鉴定 将贮藏于冰箱中的菌株活化两代并划线分离至MRS固体平板,37℃培养48 h,观察菌落形态。进一步挑取单菌落涂布于载玻片上,革兰氏染色后通过光学显微镜进行镜检。以DNA原液为模板进行PCR扩增,引物为27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3')与1492R(5'-GGT-TACCTTGTACGACTT-3'),扩增片段通过琼脂糖凝胶电泳检测纯度及浓度后进行测序,并进行同源性分析。

### 1.2.4 黑豆酸面团发酵的单因素试验

(1) 菌悬液制备:将乳酸菌L-19在MRS液体培养基

中活化至对数后期,6 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用无菌生理盐水洗涤两次并收集菌泥,将其制成浓度为  $10^7$  CFU/g 的菌悬液。

(2) 面团得率(DY)对植酸含量的影响:按每 100 g 酸面团计,接种 9% 菌悬液后调节初始 pH 至 4.5,DY 值分别为 150,200,250,300,350,37 °C 培养 24 h,考察 DY 值对酸面团中植酸含量的影响。

(3) 接种量对植酸含量的影响:按每 100 g 酸面团计,调节初始 pH 至 4.5,DY 值为 250,分别接种 3%,6%,9%,12%,15% 菌悬液,37 °C 培养 24 h,考察接种量对酸面团中植酸含量的影响。

(4) 发酵温度对植酸含量的影响:按每 100 g 酸面团计,接种 9% 菌悬液后调节初始 pH 至 4.5,DY 值为 250,分别于 23,30,37,44,51 °C 培养 24 h,考察发酵温度对酸面团中植酸含量的影响。

(5) 初始 pH 值对植酸含量的影响:按每 100 g 酸面团计,DY 值为 250,接种 9% 菌悬液后分别调节初始 pH 至 3,4,5,6,7,37 °C 培养 24 h,考察初始 pH 对酸面团中植酸含量的影响。

1.2.5 Box-Behnken 响应面试验 根据单因素试验结果,依据 Design-Expert 8.0.6 软件的 Box-Behnken 试验设计原理,选取 DY 值、接种量、发酵温度作为自变量,以植酸含量为响应值进行三因素三水平的响应面分析试验,优化黑豆酸面团发酵工艺参数。

1.2.6 酸面团的制备 将高产植酸酶的乳酸片球菌 L-19 接至 MRS 液体培养基中,37 °C 培养 24 h,6 000 r/min 离心 5 min,用无菌生理盐水洗涤两次得菌体。将获得的菌体悬浮于无菌水中并与黑豆粉混匀(根据最优条件,乳酸菌的初始接种量为 8%、面团 DY 值为 300),37 °C 培养 30 h,得酸面团。以不产植酸酶的乳酸菌 K-12 作为对照组。

1.2.7 酸面团发酵过程中 pH、可滴定酸(TTA)及生长曲线的测定 取 10 g 黑豆酸面团样品与 90 mL 无菌水搅拌 20 min,静置 10 min,测其 pH,采用 0.1 mol/L NaOH 滴定至 pH 8.6,消耗的 NaOH 体积即为 TTA<sup>[14]</sup>。称取 10 g 黑豆酸面团于 90 mL 无菌生理盐水中,梯度稀释后取 100  $\mu$ L 混合液涂布于 MRS 固体培养基上,37 °C 培养 36 h,观察并进行菌落计数<sup>[15]</sup>。

1.2.8 酸面团中抗营养因子含量的测定

(1) 植酸含量:参照 Buddrick 等<sup>[16-17]</sup>的方法并修改。称取 0.5 g 样品于 50 mL 离心管中,加入 30 mL 0.5 mol/L 的 HCl 溶液,150 r/min 震荡提取 3 h,5 000 r/min 离心 30 min,取 1 mL 上清液(空白组以 1 mL HCl 溶液代替)与 2 mL  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  溶液(0.02%)混匀,沸水浴 30 min,迅速冰浴冷却,6 000 r/min 离心 30 min,取 2 mL 上清液与 3 mL 1% 双吡啶混匀进行

颜色反应,测定 519 nm 处吸光度。此外,将植酸标准样品溶解于 HCl 中,分别配制浓度为 0.00,0.04,0.08,0.12,0.16,0.20 mg/L 的植酸溶液,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准曲线。

(2) 棉子糖含量:称取 10 g 酸面团样品,预先使用石油醚回流除去脂肪,按料液比( $m_{\text{酸面团}} : V_{\text{乙醇}}$ ) 1 : 10 (g/mL) 加入 80% 乙醇并于 80 °C 回流 1 h,抽滤,收集滤液,滤渣中加入 100 mL 水并搅拌 1 h 后重新抽滤,再次收集滤液。使用 10% 醋酸铅沉淀蛋白并离心(11 000 r/min,20 min),重复多次使蛋白质除尽,用草酸去除铅元素。滤液经真空浓缩至 100 mL,采用 HPLC 进行分析。色谱条件为<sup>[18]</sup>:色谱柱为 Bridge BEH Amide (4.6 mm $\times$ 250 mm,5  $\mu$ m);以  $V_{\text{乙醇}} : V_{\text{水}}$  为 70 : 30 的混合液作为流动相;柱温 35 °C;流速 1.0 mL/min;进样量 20  $\mu$ L;示差折光检测器;检测池温度 35 °C。

(3) 单宁含量:准确称取 1.0 g 样品与 10 mL 试剂 I ( $V_{\text{盐酸}} : V_{\text{甲醇}}$  为 1 : 100) 震荡 2.5 h,4 000 r/min 离心 20 min,保留上清液。采用香草醛法<sup>[7]</sup>测定样品中缩合单宁含量。以儿茶素作为标样绘制标准曲线,测定结果以儿茶素当量表示。

1.2.9 酸面团中多肽分子量分布 称取 1.0 g 样品于烧杯中并加入 50 mL 流动相,120 r/min 震荡 30 min,10 000 r/min 离心 20 min,取上清液并过膜处理,进行 HPLC 分析。色谱条件<sup>[19]</sup>:色谱柱为体积排阻色谱柱 TSKgel2000SWXL(300 mm $\times$ 7.8 mm);以  $V_{\text{乙醇}} : V_{\text{水}} : V_{\text{三氟乙酸}}$  为 45.0 : 55.0 : 0.1 的混合液作为流动相;紫外检测波长 220 nm;流速 0.5 mL/min;柱温 30 °C。

1.2.10 面包感官评定 参照杨文丹等<sup>[20]</sup>的方法制作面包,黑豆粉在面粉中的替代比例为 15%。采用 9 分嗜好法进行感官评定,由 20 位经过培训的人员(10 女 10 男)对面包外观、内部结构、柔软度、口感以及整体可接受度进行评分。

### 1.3 数据处理

采用 Excel 2013 和 Origin 8.5 软件进行数据处理及图表绘制,通过 SPSS 16.0 软件进行显著性和方差分析(ANOVA),显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产植酸酶乳酸菌的镜检形态及菌株鉴定

从自然发酵的豆粉(黑豆、红豆、蚕豆、鹰嘴豆)以及传统酸面团中分离纯化出 245 株乳酸菌,经初筛后得到具有植酸钙水解能力的乳酸菌共 7 株(见图 1),相应的透明圈与菌落直径比见表 1。通过测定植酸酶活性进一步复筛(表 2),仅 3 株乳酸菌 K-22、L-4、L-19 表现出较高的植酸酶活性,其中 L-19 菌株的植酸酶活性最高,其胞外酶与胞内酶活性分别为 1.36,0.30 U/mL,与 Karaman

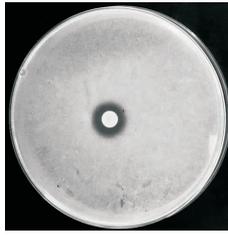


图1 L-19 植酸钙水解圈

Figure 1 L-19 phytate calcium hydrolysis ring

表1 乳酸菌的透明圈与菌落直径比<sup>†</sup>

Table 1 Transparent circle and colony diameter ratio with different LAB

菌株	D/cm	d/cm	D/d
K-13	1.28±0.03	0.60±0.04	2.13±0.09
K-16	1.04±0.03	0.64±0.02	1.62±0.05
K-22	1.36±0.05	0.60±0.02	2.26±0.04
K-23	1.15±0.05	0.64±0.09	1.82±0.18
L-4	1.66±0.02	0.65±0.05	2.56±0.19
L-19	1.77±0.03	0.62±0.05	2.85±0.21
L-20	1.06±0.06	0.65±0.06	1.63±0.19

<sup>†</sup> D为透明圈直径,d为菌落直径。

表2 乳酸菌的植酸酶活比较<sup>†</sup>

Table 2 Comparison of phytase enzyme activities of different LAB U/mL

菌株	胞外	胞内
K-22	0.74±0.02 <sup>a</sup>	0.15±0.04 <sup>b</sup>
L-4	0.91±0.04 <sup>b</sup>	0.07±0.02 <sup>a</sup>
L-19	1.36±0.05 <sup>c</sup>	0.30±0.02 <sup>c</sup>

<sup>†</sup> 小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

等<sup>[4]</sup>的数百株乳酸菌及酵母菌相比,该菌株的植酸酶活性更高,表明L-19具备高产植酸酶特点。胞外植酸酶可与面团中的植酸直接接触,更利于植酸的降解<sup>[21]</sup>。

鉴于L-19的植酸酶活力最高,因此将其作为目标菌株进行后续试验。L-19在MRS固体平板上呈乳白色扁平圆形,其边缘整齐、表面平滑且带有光感(见图2),具有典型的乳酸菌菌落特征。此外,同源比对结果(图3)表明该菌株L-19为乳酸片球菌,登录号为KJ580428.1。

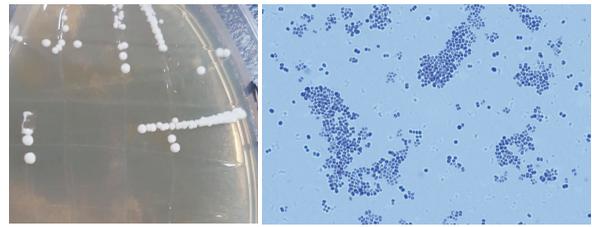


图2 L-19 菌落形态及镜检

Figure 2 Colony morphology and microscopic examination of L-19 (1 000×)

## 2.2 单因素试验

由图4可知,提高面团的DY值能够显著降低植酸含量。这是因为较高的水分有利于菌株的生长代谢与相应酶的合成<sup>[22]</sup>。酸面团中的植酸含量随接种量及发酵温度的提高先减少后增加,当接种量为9%,发酵温度为37~44℃时,更有利于植酸的降解。这可能是由于低接种量无法使目标菌株成为优势菌群,而过高的接种量会导致体系过度酸化,抑制植酸酶的活性<sup>[23]</sup>。此外,发酵温度也是影响乳酸菌生长代谢及酶活的重要因素,但试验得出的最适温度与Humer等<sup>[24]</sup>的研究结果有所差异。初始pH值对植酸降解水平没有显著影响。

## 2.3 响应面分析

2.3.1 拟合模型的建立及显著性检验 在单因素试验基础上,选用响应面法对黑豆酸面团发酵工艺条件进行优化。利用Design-Expert 8.0.6软件的Box-Behnken试验设计,以DY值、接种量、发酵温度为响应变量,以植酸含量为响应值进行数据拟合。响应面试验因素水平编码表见表3,Box-Behnken试验设计及结果见表4。

对表4进行多元回归拟合,得到多元回归方程:

$$Y = 3.47 + 0.17A + 0.049B + 0.31C + 0.22AB + 0.44AC + 0.12BC + 0.78A^2 + 0.36B^2 + 0.46C^2 \quad (1)$$

由表5可知,方程中的一次项A对黑豆酸面团中植酸含量的影响显著(P<0.05),一次项C、交互项AC及二次项A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>对黑豆酸面团中植酸含量的影响极显著(P<0.01)。回归模型的F值为17.33(P<0.01),表明该数学模型选择恰当;失拟项F值为1.23(P>0.05),说明失拟项差异不显著,试验无失拟项因素存在,进一步说明模型拟合度良好。拟合方程的决定系数R<sup>2</sup>达到0.9570,

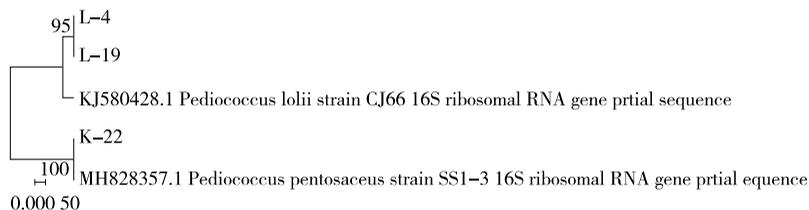


图3 高产植酸酶乳酸菌系统发育树

Figure 3 Lactic acid bacteria with high yield phytase phylogenetic tree

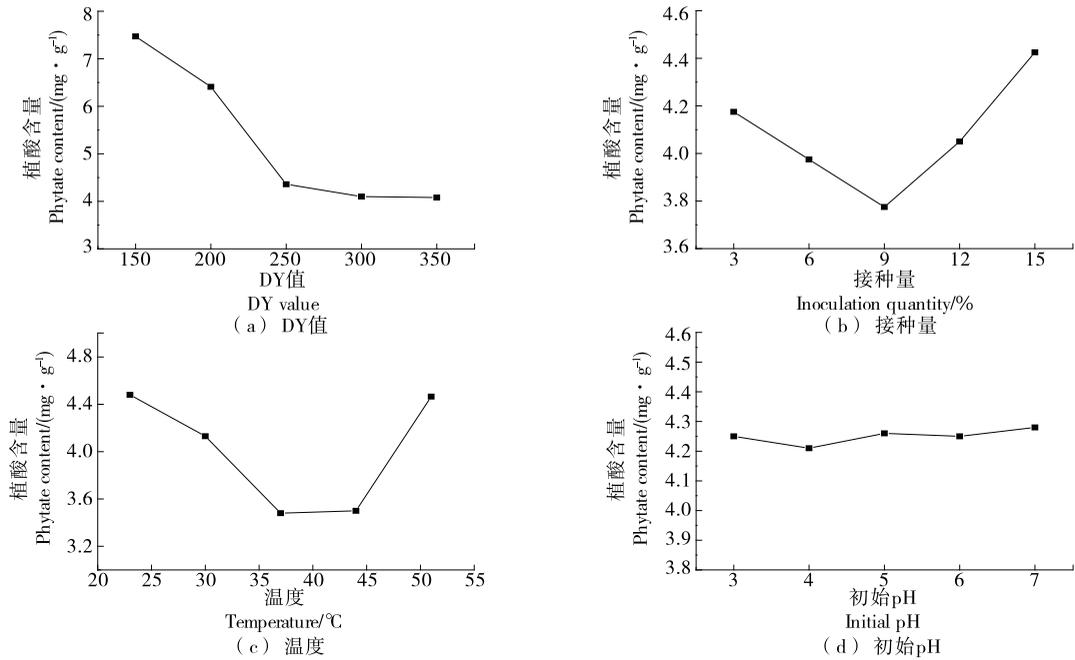


图 4 各因素对黑豆酸面团植酸含量的影响

Figure 4 Effects of different factors on phytate content of black bean sourdough

表 3 因素水平编码表

Table 3 Coding of factors and levels

水平	A DY 值	B 发酵温度/°C	C 接种量/%
-1	250	30	6
0	300	37	9
1	350	44	12

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4 Experimental scheme and results of Box-Behnken design

试验号	A	B	C	植酸/(mg · g <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	0	4.43
2	1	-1	0	4.55
3	-1	1	0	4.22
4	1	1	0	5.22
5	-1	0	-1	4.75
6	1	0	-1	3.99
7	-1	0	1	4.55
8	1	0	1	5.56
9	0	-1	-1	4.15
10	0	1	-1	3.88
11	0	-1	1	4.46
12	0	1	1	4.66
13	0	0	0	3.26
14	0	0	0	3.38
15	0	0	0	3.38
16	0	0	0	3.76
17	0	0	0	3.55

表 5 回归模型的方差分析及显著性检验<sup>†</sup>

Table 5 Analysis of variance and significance test of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	6.47	9	0.72	17.33	0.000 5**
A	0.23	1	0.23	5.66	0.049 0*
B	0.02	1	0.02	0.46	0.520 1
C	0.76	1	0.76	18.24	0.003 7**
AB	0.19	1	0.19	4.67	0.067 5
AC	0.78	1	0.78	18.89	0.003 4**
BC	0.06	1	0.06	1.33	0.286 3
A <sup>2</sup>	2.57	1	2.57	62.10	0.000 1**
B <sup>2</sup>	0.54	1	0.54	12.94	0.008 8**
C <sup>2</sup>	0.91	1	0.91	21.91	0.002 3**
残差项	0.29	7	0.04		
失拟项	0.14	3	0.05	1.23	0.4071
纯误差	0.15	4	0.04		
总和	6.76	16			

<sup>†</sup>  $R^2=0.957 0, R_{\text{Adj}}^2=0.901 8$ ; \*\* 表示差异极显著 ( $P<0.01$ ), \* 表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

说明模型能解释 95.70% 的响应值的变化, 校正系数  $R_{\text{Adj}}^2=0.901 8$ , 说明拟合值与试验值相关性较高; 故确定该二次回归方程可用于优化黑豆酸面团的发酵条件并对植酸含量的变化进行预测。

2.3.2 响应面分析 由图 5 可知, 面团得率(DY)与接种量的响应面倾斜度最大, 表明两者对植酸含量的影响更

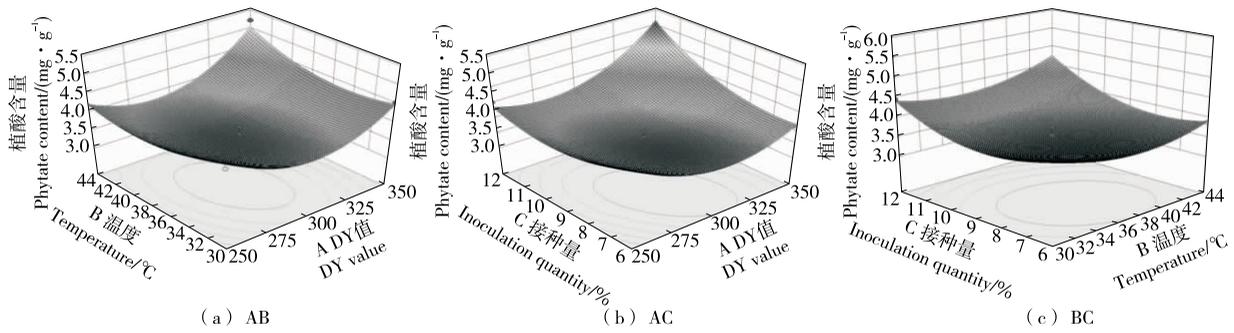


图5 各因素交互作用对植酸含量的影响

Figure 5 Interactive effects of factors on the content of phytic acid

加显著。而发酵温度与面团得率(DY)对应的等高线更偏向于呈椭圆形,说明两者间的交互作用最为强烈。相反,接种量与发酵温度间的交互效应最弱,其对植酸含量的影响程度也最小。

2.3.3 实验验证 由 Design-Expert 8.0.6 软件得出黑豆酸面团的最佳发酵条件为 DY 值 299.17、发酵温度 36.93 °C、接种量 8.04%,此时植酸含量为 3.415 mg/g。考虑到实际操作的可行性,将最佳发酵工艺调整为: DY 值 300、发酵温度 37 °C、接种量 8%。在此条件下进行 3 次验证实验,所得黑豆酸面团中植酸含量为 3.424 mg/g 与理论值相近,说明采用响应面设计得到的工艺参数真实可信,具有指导意义。

2.4 黑豆酸面团发酵过程中的菌株生长曲线比较

由图 6 可知,两株乳酸菌的初始菌落总数均为 7.1 lg(CFU/g) 左右,相比于无停滞期的 K-12, L-19 经过短暂停滞期后进入对数增长期,说明 K-12 对黑豆基质的适应能力较强。而进入稳定期后, L-19 的菌落总数 [8.7 lg(CFU/g)] 略高于 K-12 的 [8.5 lg(CFU/g)], 说明 L-19 在发酵后期更加适应黑豆酸面团体系。Hammes 等<sup>[23]</sup>认为发酵过程中酸面团体系内的微生物群体将趋于相对稳定状态,其中乳酸菌的菌落总数约为 8 ~ 9 lg(CFU/g),与试验结果一致。

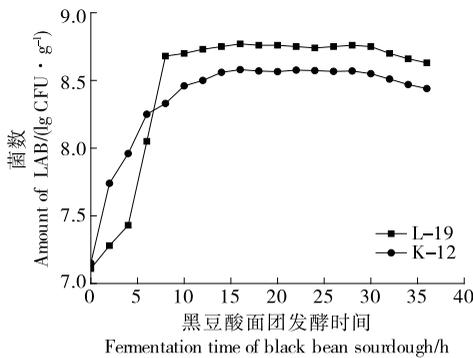


图6 黑豆酸面团发酵过程中菌株生长曲线

Figure 6 The growth curve of strain during fermentation of black bean sourdough

2.5 黑豆酸面团发酵过程中 pH 和 TTA 的变化

由图 7 可知,乳酸片球菌 L-19 的产酸能力稍强于 K-12,且两者的酸化趋势无明显差异。发酵初期,黑豆酸面团体系的酸化速度较为缓慢,直至第 5 h 后 pH 出现跃变并最终稳定在 4.1 左右。pH 的降低是乳酸菌在生长过程中合成多种有机酸的作用结果<sup>[26]</sup>,与试验中的酸化曲线大体相符。此外,酸化现象被视为酸面团发酵过程中最重要的技术特征之一,适宜的酸化有利于改善面包品质。Buddrick 等<sup>[16]</sup>认为酸面团体系的最适 pH 为 3.5 ~ 4.3,与试验中面团的酸化程度相近,表明两株乳酸菌具备可应用性。

2.6 黑豆酸面团发酵前后的抗营养因子含量

由表 6 可知,乳酸菌发酵能够有效降解体系中的抗营养因子,相比于发酵前的植酸含量,采用 L-19、K-12 发酵的黑豆酸面团其植酸含量分别降低了 62.70%, 37.84%, 说明 L-19 对植酸的降解作用更强,该降解率也优于 Karaman 等<sup>[4,27-28]</sup>的研究结果,这进一步表明 L-19 具备高产植酸酶的特性。棉子糖、缩合单宁含量经 L-19 发酵后分别降低了 35.29%, 25.61%, 但与植酸降解率相比仍有较大差距,说明乳酸片球菌 L-19 具有特定降解植酸的功能作用。抗营养因子的降解主要源于酸性环境下激活的植酸酶及菌株生长代谢过程中合成的微生物酶<sup>[29]</sup>。

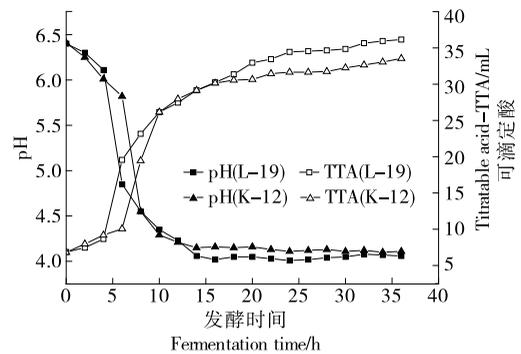


图7 黑豆酸面团发酵过程中 pH 和 TTA 的变化

Figure 7 Changes of pH and TTA in black bean sourdough during fermentation

表 6 黑豆酸面团发酵前后的抗营养因子含量<sup>†</sup>

Table 6 Comparison of anti-nutritional factors in different black bean sourdough before and after fermentation

样品	植酸/ (mg · g <sup>-1</sup> )	棉子糖/ (10 <sup>-2</sup> g · g <sup>-1</sup> )	缩合单宁/ (10 <sup>-2</sup> g · g <sup>-1</sup> )
发酵前	9.17 ± 0.15 <sup>c</sup>	0.34 ± 0.03 <sup>b</sup>	13.47 ± 0.29 <sup>b</sup>
L-19 发酵	3.42 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.04 <sup>a</sup>	10.02 ± 0.13 <sup>a</sup>
K-12 发酵	5.7 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>a</sup>	9.88 ± 0.11 <sup>a</sup>

† 小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

2.7 黑豆酸面团中的多肽分子量分布

研究酸面团发酵过程中黑豆蛋白酶解释放的具有生物学功能多肽<sup>[30]</sup>分子量变化具有重要意义。由表 7 可知,黑豆酸面团中的多肽分为 8 种不同的分子量水平,其中分子量处于 50~2 000 Da 的小分子活性肽在两种酸面团中分别占 51.47%,45.07%,这是因为乳酸片球菌 L-19 产生的植酸酶降低了黑豆基质中的植酸含量,从而避免了体系中的其他蛋白酶系与其发生非特异性结合而失活<sup>[31]</sup>,使黑豆蛋白水解程度得到了提升,因此乳酸片球菌 L-19 有助于改善黑豆酸面团面包的营养特性。

2.8 面包产品的感官评定

由图 8 可知,两种酸面团面包的整体可接受度较高,L-19 黑豆酸面团面包的品质(7.8)优于对照组 K-12

表 7 发酵后黑豆酸面团中的多肽分子量分布

Table 7 Molecular weight distribution of polypeptide in fermented black bean sourdough

菌株	保留时 间/min	数均分 子量/Da	重均分 子量/Da	峰位分 子量/Da	峰面积百 分比/%
L-19	11.009	19 011	20 064	21 758	36.44
	13.477	6 672	6 969	5 396	5.66
	13.612	3 938	4 030	5 002	3.69
	14.632	2 453	2 487	2 810	2.73
	15.235	1 391	1 449	1 999	3.78
	17.257	686	712	638	4.87
	19.402	246	267	190	9.52
	21.057	69	90	75	33.30
K-12	11.005	19 578	20 672	21 808	42.52
	13.478	6 619	6 913	5 394	5.94
	13.612	3 966	4 057	5 002	4.16
	14.651	2 451	2 484	2 781	2.30
	16.175	1 382	1 439	1 176	2.42
	17.310	678	703	619	3.81
	19.349	245	264	196	8.99
	20.528	68	87	101	29.85

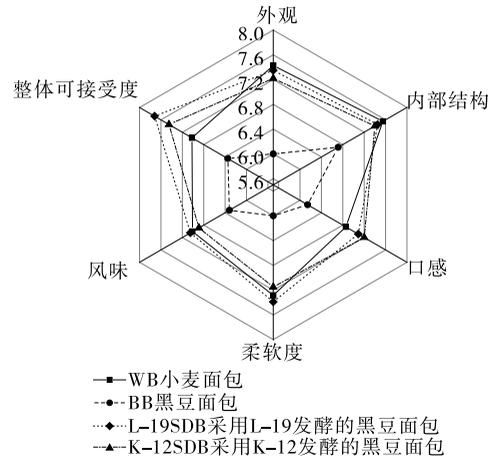


图 8 面包感官评定

Figure 8 Sensory evaluation of different bread

(7.4),而未经发酵的黑豆面包最不易被接受。研究<sup>[32]</sup>表明,酸面团技术对外加豆类蛋白面包的品质具有改善作用,与试验结果相似。其中植酸含量的降低是改善面包品质的重要因素之一,是由于植酸干扰面团筋网络的形成<sup>[33]</sup>,从而影响面包品质。

3 结论

研究表明,试验筛选的乳酸片球菌 L-19 具有高产植酸酶的功能特性,利用该菌株作为发酵剂制作的黑豆酸面团有利于改善面包的营养及感官品质。黑豆基质中,乳酸片球菌 L-19 生长良好,酸化程度适当。经发酵后,黑豆中的多种抗营养因子得到有效降解,其中植酸的降解程度尤为显著。此外,乳酸片球菌 L-19 有助于黑豆蛋白水解以释放出小分子活性肽。感官方面,黑豆酸面团面包 L-19 的整体可接受度最高,具有良好的烘焙特性。植酸的降解率仅是反映面包营养价值改善的其中一个指标,试验并未涉及其他相关营养指标的评价,有待进一步探究。

参考文献

[1] JIA Chun-li, HUANG Wei-ning, LIN Ji, et al. Improvement of hydrocolloid characteristics added to angel food cake by modifying the thermal and physical properties of frozen batter[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 41(20): 227-232.

[2] VAZ PATTO M C, AMAROWICZ R, ARYEE A N A, et al. Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2015, 34(1/2/3): 105-143.

[3] ANGIOLONI A, COLLAR C. High legume-wheat matrices: an alternative to promote bread nutritional value meeting dough viscoelastic restrictions[J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(2): 273-284.

[4] KARAMAN K, SAGDIC O, DURAK M Z. Use of phytase

- active yeasts and lactic acid bacteria isolated from sourdough in the production of whole wheat bread[J]. LWT, 2018, 91: 557-567.
- [5] 汤晓娟. 产胞外多糖酸面团发酵及其冷冻面团抗冻机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019: 3-4.
- [6] TEIXEIRA J S, MCNEILL V, GÄNZLE M G. Levansucrase and sucrose phosphorylase contribute to raffinose, stachyose, and verbascose metabolism by lactobacilli [J]. Food Microbiol, 2012, 31: 278-284.
- [7] CODA R, MELAMA L, RIZZELLO C G, et al. Effect of air classification and fermentation by *Lactobacillus plantarum* VTT E-133328 on faba bean (*Vicia faba* L.) flour nutritional properties[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 193: 34-42.
- [8] GUALBERTO D G, BERGMAN C J, WEBER C W. Mineral binding capacity of dephytinized insoluble fiber from extruded wheat, oat and rice brans[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 1997, 51(4): 295-310.
- [9] BRUNE M, LENA R, HALLBERG L, et al. Human iron absorption from bread: Inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups[J]. Journal of Nutrition, 1992, 122(3): 442-449.
- [10] HAROS M, ROSELL C M, BENEDITO C. Fungal phytase as a potential breadmaking additive[J]. European Food Research and Technology, 2001, 213(4/5): 317-322.
- [11] 崔志芳, 刘娜, 季爱云. 植酸酶产生菌的快速筛选及发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2010(7): 137-139.
- [12] 张洪. 产植酸酶乳酸杆菌的筛选及对肉鸡生长性能和粪磷排出量的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2009: 17-18.
- [13] 钱超. 酒曲产 $\beta$ -葡萄糖苷酶的乳酸菌在葡萄酒面团面包中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2017: 9-10.
- [14] 张庆, 王凤, 黄卫宁, 等. 植物乳杆菌发酵对燕麦蛋白溶解度和营养特性的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 204-209.
- [15] 蒋慧, 吴玉新, 庄靓, 等. 融合魏斯氏菌和异常威克汉姆酵母混菌发酵荞麦酸面团馒头的香气物质特征[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 234-241.
- [16] BUDDRICK O, JONES O A H, CORNELL H J, et al. The influence of fermentation processes and cereal grains in wholegrain bread on reducing phytate content[J]. Journal of Cereal Science, 2014, 59(1): 3-8.
- [17] ZHAO Hui-min, GUO Xiao-na, ZHU Ke-xue. Impact of solid state fermentation on nutritional, physical and flavor properties of wheat bran[J]. Food Chemistry, 2017, 217: 28-36.
- [18] 刘迎春, 曹宇, 张建新. 混合菌发酵豆粕条件优化及功能性低聚糖水苏糖、棉子糖的测定[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(16): 4 007-4 011.
- [19] 王乃富. 乳酸菌发酵酶解豆粉及其生物活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007: 65-66.
- [20] 杨文丹, 张宾乐, 庄靓, 等. 发酵麦麸对面包面团生化特征及烘焙学特性的影响[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 6-11.
- [21] CIZEIKIENE D, JUODEIKIENE G, BARTKIENE E, et al. Phytase activity of lactic acid bacteria and their impact on the solubility of minerals from wholemeal wheat bread[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2015, 66(7): 736-742.
- [22] 潘进权, 刘玉婷, 刘夏婷. 毛霉发酵豆粕工艺条件的优化[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 178-182.
- [23] PARK Y, PARK J, PARK K, et al. Supplementation of Alkaline phytase (Ds11) in whole-wheat bread reduces phytate content and improves mineral solubility[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(6): C791-C794.
- [24] HUMER E, SCHEDULE K. Fermentation of food and feed: A technology for efficient utilization of macro and trace elements in monogastrics [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2016, 37: 69-77.
- [25] HAMMES W P, BRANDT M J, FRANCIS K L, et al. Microbial ecology of cereal fermentations[J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16(1/2/3): 4-11.
- [26] 张思佳. 酸面团乳酸菌发酵荞麦面包品质的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015: 14-15.
- [27] NUOBARIENE L, CIZEIKIENE D, GRADZEVICIUTE E, et al. Phytase-active lactic acid bacteria from sourdoughs: Isolation and identification[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63(1): 766-772.
- [28] PALACIOS M C, HAROS M, ROSELL C M, et al. Selection of phytate-degrading human bifidobacteria and application in whole wheat dough fermentation[J]. Food Microbiology, 2008, 25(1): 169-176.
- [29] GOBBETTI M, DE ANGELIS M, DI CAGNO R, et al. Novel insights on the functional/nutritional features of the sourdough fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 302: 103-113.
- [30] 高洋, 于栋. 黑豆多肽的研究现状[J]. 现代食品, 2017(16): 20-22.
- [31] ANASTASIO M, PEPE O, CIRILLO T, et al. Selection and use of phytate-degrading LAB to improve cereal-based products by mineral solubilization during dough fermentation [J]. Journal of Food Science, 2010, 75: M28-M35.
- [32] WANG Ya-qin, SORVALI P, LAITILA A, et al. Dextran produced in situ as a tool to improve the quality of wheat-faba bean composite bread[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 84: 396-405.
- [33] PARK E Y, FUERST E P, BAIK B. Phytate negatively influences wheat dough and bread characteristics by interfering with cross-linking of glutenin molecules [J]. Journal of Cereal Science, 2016, 70: 199-206.