

高产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌在葡萄汁 酸面团面包中的应用

Application of high producing β -glucosidase lactic acid
bacteria in raisin sourdough bread

钱超¹ 杨文丹¹ 张宾乐¹ 庄靓¹
QIAN Chao¹ YANG Wen-dan¹ ZHANG Bin-le¹ ZHUANG Jin¹
徐岩² 黄卫宁¹ 李宁³ Filip Arnaut⁴
XU Yan² HUANG Wei-ning¹ LI Ning³ FILIP Arnaut⁴

(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. 江南大学生物工程学院
工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 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)

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;
2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology,
Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 3. Guangzhou Puratos Food Co. Ltd., Guangzhou,
Guangdong 511400, China; 4. Puratos Group NV/SA, Brussels, 1201, Belgium)

摘要:从 4 种酒曲中分离筛选乳酸菌, 并通过七叶苷平板显色法结合酶活测定筛选出 3 株高产 β -葡萄糖苷酶的菌株。通过 16S rDNA 基因鉴定其种属, 研究了 3 株菌粗酶液的最适温度、pH, 并对酶进行定位。应用高产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌发酵葡萄汁酸面团制作面包, 通过固相微萃取气相色谱质谱联用技术(GC—MS)分析了面包香气成分, 并进行了感官评定。结果表明: 酒曲中一共筛得 124 株乳酸菌, 其中产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌有 28 株, 产酶能力最高的 3 株乳酸菌经鉴定为哈尔滨乳杆菌(*Lactobacillus harbinensis*, M12 和 M24)和戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*, J28)。用 M12 发酵葡萄汁酸面团制作面包(RSB), RSB 中一共检测出 52 种风味物质, 较普通酵母面包(CYB)的风味物质种类增加了 52.9%, 而风味物质总峰面积也提高了 65.5%。经过感官评定, RSB 的整体接受度优于普通酵母面包(CYB)及含未发酵葡萄汁的酵母面包(RYB)。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 酸面团; 面包; 风味; 乳酸菌

Abstract: Three high producing β -glucosidase lactic acid bacteria strains were isolated and screened from Qu by eseulin plate colored method combining enzyme activity test, then identified by 16S rDNA. The screened bacteria with highest enzyme activity was used in raisin sourdough fermentation and bread making. After that, the aroma of the bread was analyzed by GC-MS as well as sensory evaluation. The results showed that among the 125 isolated lactic acid bacteria, there were 28 strains which produce β -glucosidase. Three strains showed high enzyme-producing ability, they were identified as *Lactobacillus harbinensis* (M12, M24) and *Pediococcus pentosaceus* (J28). M12, which appeared the highest activity was used in raisin sourdough fermentation and bread making. Compared with the common yeast bread, the number and the peak area of the aroma compounds in raisin sourdough bread increased by 52.9% and 65.5%. Besides, raisin sourdough bread is more acceptable than common yeast bread and raisin yeast bread in sensory evaluation.

Keywords: β -glucosidase; sourdough; bread; flavor; lactic acid bacteria

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31071595, 31571877);
国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(编号:
2012AA022207C); 比利时国际合作项目(编号:
BE110021000)

作者简介:钱超, 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

收稿日期:2017—03—27

面包风味包括香气、滋味和质地等, 与原料、发酵、酶反应和热反应多种因素有关, 其中挥发性风味物质是影响消费者购买意图的重要依据。目前主要通过添加合成香精、天然

香料和具有浓厚香气的原料来提高面包风味^[1]。但普遍存在安全隐患、留香差、成本高以及不够健康等缺陷。寻求更加安全、有效和健康的方法改善面包风味成为了研究者们研究热点。

将水果或果干通过发酵得到的发酵液添加到面包中去，制得具有水果风味和发酵香气的发酵水果面包，可以很明显地改善面包风味^{[2]38[3]47}。

葡萄含有丰富的营养物质，已有研究^{[2]38[3]47}通过将葡萄接种产香酵母发酵的发酵液制作面包获得天然发酵风味面包，但是其并没有充分发挥葡萄本身的风味。葡萄本身含有种类丰富的品种香，主要是萜烯类物质^[4]，而这些萜烯类物质大部分以不挥发的糖苷形式存在。 β -葡萄糖苷酶是一类水解葡萄糖苷键的酶，它可以水解葡萄中的糖苷类物质，使与之结合的萜烯等风味物质成为可挥发性的游离态。所以在葡萄酒研究中，研究者^[5-6]们通过筛选产 β -葡萄糖苷酶的菌株来提高葡萄酒的风味。

目前中国对 β -葡萄糖苷酶的研究主要集中在高产黑曲霉菌等菌种的筛选，酶的固定化应用，及其在葡萄酒发酵过程中的增香作用^[7-8]，对其应用在发酵葡萄汁酸面团的报道还没有。故本研究旨在分离筛选出产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌发酵葡萄汁酸面团制作面包，以期充分发挥葡萄本身的果香，提高面包的风味，将为 β -葡萄糖苷酶的应用提供一条新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

- 酒曲：多地酒厂收集；
- 对硝基苯基- β -D 吡喃葡萄糖 (p-NPG)、对硝基苯酚 (pNP)、七叶苷：杭州百思生物科技公司；
- 细菌提取试剂盒：天根生化科技有限公司；
- 引物 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 和 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3')：上海桑尼生物科技有限公司；

- 面包粉：中粮面业(秦皇岛)鹏泰面粉有限公司；
- 干酵母：安琪酵母股份有限公司；
- 黄油：中粮食品营销有限公司；
- 白砂糖、食盐、玫瑰香葡萄干：市售。

1.2 仪器与设备

- 超净台：SW-CJ-2F 型，苏州安泰空气技术有限公司；
- 恒温水浴锅：HH.S2I-4 型，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；
- 离心机：H1650-W 型，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；
- 恒温恒湿培养箱：BSC-250 型，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；
- 电子显微镜：XSP-10C 型，上海彼爱姆光学仪器制造有限公司；
- 电子天平：JE2002 型，上海浦春计量仪器有限公司；
- 紫外可见分光光度计：TU-1810 型，北京普析通用仪器

- 有限责任公司；
- PCR 仪：PC300 型，艾本德(中国)有限公司；
- pH 计：FE20 型，梅特勒仪器(上海)有限公司；
- 搅拌机：SM-25 型，新麦机械(无锡)有限公司；
- 醒发箱：SPC-40SP 型，新麦机械(无锡)有限公司；
- 烤箱：SM-523 型，新麦机械(无锡)有限公司；
- 气相色谱-质谱联用仪：TSQ Quantum XLS 型，赛默飞世尔科技(中国)有限公司；
- 固相微萃取装置(萃取头)：CAR/PDMS 型，美国 Supelco 公司。

1.3 方法

1.3.1 产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌的分离

(1) MRS 筛选培养基的配制：称取蛋白胨 10.0 g，牛肉膏 10.0 g，酵母提取物 5.0 g，葡萄糖 20.0 g，柠檬酸三铵 2.0 g，磷酸氢二钾 2.0 g，乙酸钠 5.0 g，吐温-80 1.0 mL，七水硫酸镁 0.5 g，四水硫酸锰 0.25 g，加入去离子水至 1 L，调 pH 至 6.2~6.4；再称取 20 g 碳酸钙加入到 100 mL 蒸馏水中，制成碳酸钙乳浊液；将 MRS 培养基和碳酸钙乳浊液分开于 121 ℃灭菌 15 min；倒平板前，待培养基融化冷却后，平板上加入一定量的碳酸钙乳浊液，晾干以后再接种。

(2) 酒曲中乳酸菌的分离：称取 10 g 酒曲，溶于 90 mL 生理盐水中，置于磁力搅拌器上混匀 30 min 后，取 1 mL 梯度稀释；吸取 10^{-5} ， 10^{-6} ， 10^{-7} 梯度的稀释液各 100 μ L 在 MRS 筛选平板上进行涂布，于 37 ℃恒温培养箱中培养 48 h^[9-10]。挑取菌落旁出现透明溶解圈的菌落接到 MRS 液体培养基中，再经过数次划线分离和镜检，得到纯化的乳酸菌。传代并加 30%甘油保护剂，保存于一80 ℃超低温冰箱中，做后续试验。

1.3.2 产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌的筛选

(1) 初筛：根据赵林果等^[11-12]的方法，采用 96 孔板法进行筛选。在 MRS 液体培养基中添加质量分数 0.3% 的七叶苷和 0.05% 的柠檬酸铁，加上 1.8% 的琼脂。121 ℃下灭菌 15 min。之后在 96 孔板中每个孔中加入 250 μ L 的培养基。将保存于一80 ℃超低温冰箱中的乳酸菌在室温下解冻，以 2 mL/100 mL 接种于 MRS 液体培养基中，37 ℃下培养 24 h，传代 2 次，恢复菌株活力。然后取活化后的乳酸菌 15 μ L 接种到 96 孔板上，每株菌做 2 个平行。

(2) 复筛：取 5 mL 在液体培养基中活化 24 h 后的乳酸菌，在 4 ℃下 5 000 r/min 离心 10 min，取离心沉淀用生理盐水溶液洗涤 2 次后，加入 1 mL 生理盐水，混匀稀释作为粗酶液。取 100 μ L 粗酶液加入 1.8 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液在 37 ℃下水浴 5 min，然后加入 100 μ L 底物 p-NPG (20 mmol/L)，空白组改用 100 μ L 缓冲液替代粗酶液。反应 10 min 之后加入 1 mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液 1 mL 终止反应。400 nm 下测量其紫外吸收^[13]。酶单位 (U)^[14] 则定义为以上条件下，每分钟催化生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量即为 1 个酶活力单位。菌干重测定：取 15 mL 生长 24 h 的菌液在 4 ℃下 5 000 r/min 离心 10 min 得菌体，放入 110 ℃干燥箱中烘干至恒重，称重。

(3) pNP 标准曲线的绘制:称取 pNP 139.0 mg,加蒸馏水定容至 1 000 mL,分别吸取 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,用 1 mol/L Na_2CO_3 溶液定容后混匀。稀释后的 pNP 终浓度分别为 0.01,0.02,0.03,0.04,0.05,0.06 mmol/mL,以蒸馏水作为空白,用分光光度计于 400 nm 处测其紫外吸收。以 pNP 浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线。

1.3.3 产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌的鉴定 根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明,提取待鉴定菌株的 DNA,并将其作为 PCR 扩增模板,进行目标片段扩增。待鉴定菌株的 16S rDNA 基因扩增体系见表 1^[15]。

表 1 产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌 16S rDNA 的 PCR 扩增体系

Table 1 PCR amplification system for 16S rDNA of high producing β -glucosidase lactic acid bacteria

试剂种类	添加量/ μL
d NTPs MIX (2.5 mmol/L)	4.0
10 $\times$ Buffer (+ Mg^{2+})	5.0
Easy Taq DNA 酶 (5 U/ μL)	2.0
27F (10 pmol/ μL)	1.5
1495R (10 pmol/ μL)	1.5
DNA 模板(100 ng/ μL)	2.0
加 dd H_2O 至反应体系总体积	50.0

根据表 1 列出的 PCR 扩增体系,进行扩增,程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 下预变性 5 min 后进入 30 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min。最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 7 min。

扩增产物分别经过琼脂糖凝胶电泳检测、凝胶成像仪拍照确认条带后,将产物送往上海桑尼公司进行测序,再将测序结果所得扩增序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源序列比对,以确定菌株的种属^[16]。下载相应的模式菌株,通过 MEGA 软件和 Neighbor-Joinning 方法构建系统发育树。

1.3.4 乳酸菌中 β -葡萄糖苷酶的定位 对数生长中期菌液各取 1 mL,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 5 000 r/min 离心 10 min 得到菌体和菌液上清,菌液上清直接进行酶活测定,菌体用生理盐水洗涤 2 遍,添加 1 mL 生理盐水悬浮后再进行酶活性测定。

再取 10 mL 菌液,同样处理后得菌体,菌体洗涤 2 次后加入 10 mL PBS (NaCl 140 mmol/L; KCl 2.7 mmol/L; KH_2PO_4 1.8 mmol/L; Na_2HPO_4 10 mmol/L; pH 7.4) 悬浮。再在冰浴条件下,将菌体悬浮液用超声细胞破碎机破碎 20 min(450 W,间隔 5 s)。其中 1 mL 破碎液直接进行酶活

测定,再取 1 mL 破碎液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 r/min 离心 10 min 得到菌体破碎液上清和细胞碎片。细胞碎片用生理盐水洗涤 2 次,再添加 0.5 mL 生理盐水,进行悬浮后测定酶活,菌体破碎液上清同样直接进行酶活性测定^[17]。

1.3.5 粗酶液的酶学性质 分别取 100 μL 粗酶液,加入不同 pH 的 1.8 mL 的缓冲液按照 1.3.2(2)的方法测酶活。

再分别取 100 μL 粗酶液,加入 1.8 mL 的乙酸—乙酸钠缓冲液(pH=4.5)后置于不同温度下水浴 5 min 后,再加入 100 μL 底物 p-NPG,在相应温度下反应 10 min,其余步骤同 1.3.2(2)。

1.3.6 含有葡萄汁的发酵酸面团面包的制作与风味

(1) 含有葡萄汁的发酵酸面团面包的制作:将高产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌接种于 MRS 液体培养基中活化,培养 24 h 后,取 5 mL 菌液以 5 000 r/min 离心 10 min,沉淀用生理盐水洗涤 2 次。然后接种至小麦粉:水质量比为 1:1 的面团中(用葡萄汁替代 20% 的水),使接入菌的初始量为 10^6 CFU/g,然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养箱中培养 12 h 后,即为含有葡萄汁的发酵酸面团。对照组为普通酵母面包和含有葡萄汁酵母面包。3 种面包的配方见表 2。参照张思佳等^[18]的制作方法并略作修改:将含有葡萄汁的发酵酸面团和面粉以及其他配料混合加入搅面缸中搅打成形后,取出用保鲜膜覆盖 5 min,然后分割为每个面团 90 g,再次用保鲜膜覆盖 10 min 后,成型,之后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的醒发箱中醒发 90 min,最后置于烤箱中以上火 170 $^{\circ}\text{C}$ 下火 210 $^{\circ}\text{C}$ 焙烤 23 min。取出后脱模,室温冷却 2 h 后做后续试验。

(2) 面包风味分析:取 5 g 面包芯碎片加入样品瓶中,60 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温水浴,再将老化后的 CAR/PDMS 萃取头插入顶空瓶中萃取 40 min。之后将萃取头插入气相色谱的高温汽化室中进样并进行 GC—MS 分析。

色谱条件:DB-5MS 毛细管色谱柱,载气为 He,保持 1.2 mL/min 速度恒流 2 min 后分流,速度为 10 mL/min,分流比为 12:1。升温程序为 40 $^{\circ}\text{C}$ 下,恒温 2 min 后,以 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升至 160 $^{\circ}\text{C}$,再以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 240 $^{\circ}\text{C}$,之后保持 10 min。

质谱条件:进样孔温度 250 $^{\circ}\text{C}$,电子电离,电子能量为 70 eV,发射电流为 200 μA ,离子源温度 200 $^{\circ}\text{C}$,采集方式为全扫描,质量范围 m/z 为 33~495。结果利用 GC—MS 数据分析软件进行处理,化合物经计算机检索,并与 NSIT 谱库和 RTLPEST 谱库相匹配,仅报道匹配度大于 800 的结果并采用峰面积归一化法定量计算出各挥发性香气成分在面包中的相对含量^[19]。

表 2 普通酵母面包(CYB)、含有葡萄汁的酵母面包(RYB)和含有葡萄汁的发酵酸面团面包(RSB)配方

Table 2 Formulations of wheat yeast bread, raisin yeast bread and raisin sourdough bread g

面包	高筋粉	含有葡萄汁的 发酵酸面团	葡萄汁	酵母	水	盐	糖	起酥油
普通酵母面包(CYB)	300	0	0	3	180	1.5	18	12
含有葡萄汁的酵母面包(RYB)	300	0	9	3	171	1.5	18	12
含有葡萄汁的发酵酸面团面包(RSB)	255	90	0	3	135	1.5	18	12

(3) 感官评价:20 位经过培训的人员(男女比例 1:1)组成感官评定小组,评定方法采用 9 分嗜好法,数字越大代表喜好程度越高,分别对面包的色泽、外观等方面进行评分。

1.3 数据分析

运用 SPSS、Microsoft office 和 Origin 等软件进行数据的分析。利用方差分析法(ANOVA)对数据进行显著性分析,显著差异水平取 $P<0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 酒曲中乳酸菌的分离

经过乳酸菌筛选培养基的筛选,平板涂布,划线分离和染色镜检,部分乳酸菌菌落形态见图 1,从 4 种酒曲中共分离出 124 株乳酸菌,其中承德酒曲(C)33 株,梅兰春酒曲(M)33 株,酒鬼酒曲(J)28 株,汤沟酒曲(T)30 株。

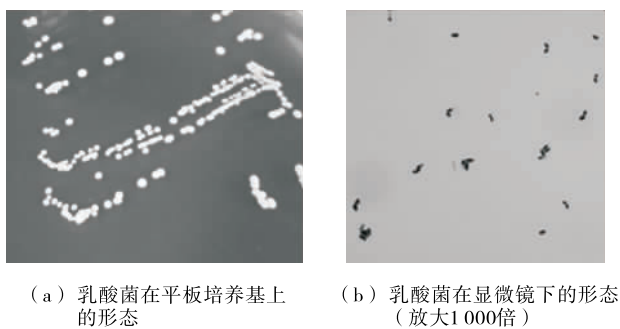


Figure 1 Colony morphology of lactic acid bacteria

2.2 产 β-葡萄糖苷酶的乳酸菌的分离筛选

2.2.1 产 β-葡萄糖苷酶的乳酸菌的初筛 β-葡萄糖苷酶可以将七叶苷(6,7-2-羟基-香豆素-β-D-葡萄糖苷)分解为葡萄糖和七叶苷原(6,7-2-羟基-香豆素),七叶苷原可以与 Fe^{3+} 作用显现出棕黑色。从 96 孔平板结果中,一共有 28 株乳酸菌显棕黑色(见图 2)。除汤沟酒曲(T)外,其余酒曲中均有产酶的菌株,但数量差异较大,其中梅兰春酒曲(M)中 50% 以上的乳酸菌都具有不同程度的酶活,而酒鬼酒曲(J)中则只有 3 株。这可能与酒曲制作原料中的微生物以及当地的环境微生物有关。将这 28 株菌传代并加 30% 甘油保护剂,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中,做后续试验。

2.2.2 产 β-葡萄糖苷酶的乳酸菌的复筛 对硝基苯酚与碳酸钠试剂在碱性条件下显色,通过测定其吸光值,制得标准曲线见图 3。

由图 3 可知,回归方程为 $y=19.369x-0.0771$,线性相

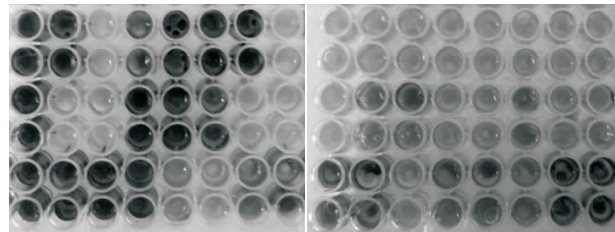


Figure 2 Eesulin plate colored method

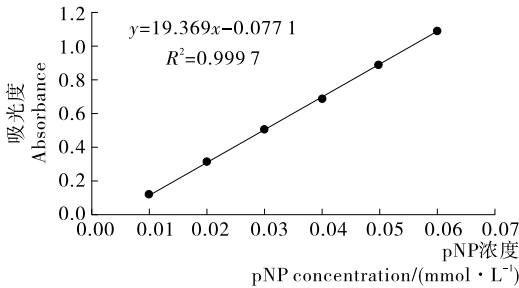


Figure 3 The standard curve of p-nitrophenol

关系数为 0.999 7,在 pNP 含量为 0.010~0.060 mmol/L 时,吸光度值与对硝基苯酚含量呈线性相关。

由图 4 可知,各个菌株间酶活差异较大,从 2.2 U/g 到 10.1 U/g,其中 M12 的酶活最高为 10.1 U/g,M24、J28 次之,酶活分别为 7.3,6.8 U/g。最终将这 3 株作为高产 β-葡萄糖苷酶的乳酸菌。

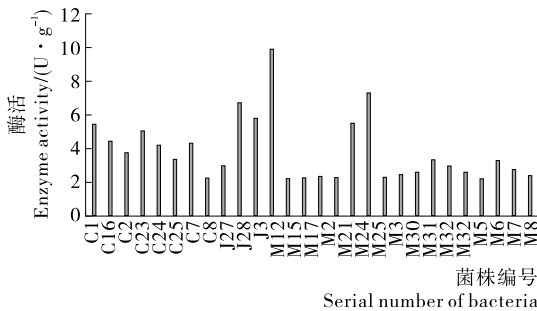


Figure 4 The enzyme activity of Secondary screening lactic acid bacteria

2.2.3 高产 β-葡萄糖苷酶的乳酸菌的鉴定 3 株乳酸菌的 16S rDNA 的测序结果见表 3,其中,M12、M24 与 *Lactobacillus harbinensis* FQ003 的同源性都达到了 99%。J28 与 *Pediococcus pentosaceus* KID7 的同源性达到了 100%。根据比对结果,构建系统发育树,见图 5。

由图 5 可知,M12 和 M24 是同一种属的哈尔滨乳杆菌,但在菌液中的形态有比较大的差异。酒曲中分离戊糖片球菌已有报道^[10],但鲜有从酒曲分离出哈尔滨乳杆菌的报道。

2.2.4 乳酸菌中 β-葡萄糖苷酶的定位研究 由图 6 可知,这 3 种菌均是完整细胞的酶活最高,除 J28 的上清有微弱酶活

表 3 高产 β-葡萄糖苷酶的乳酸菌的 16s rDNA 序列比对
Table 3 Blast result of 16S rDNA sequence of high producing β- glucosidase lactic acid bacteria

菌株编号	序列比对结果	序列号	同源性/%
M12	哈尔滨乳杆菌 (<i>Lactobacillus harbinensis</i> FQ003)	KF418816.1	99
M24	哈尔滨乳杆菌 (<i>Lactobacillus harbinensis</i> FQ003)	KF418816.1	99
J28	戊糖片球菌 (<i>Pediococcus pentosaceus</i> KID7)	KJ810576.1	100

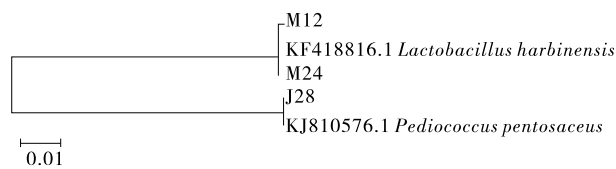


图 5 高产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌的 16S rDNA 序列系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence of high producing β -glucosidase

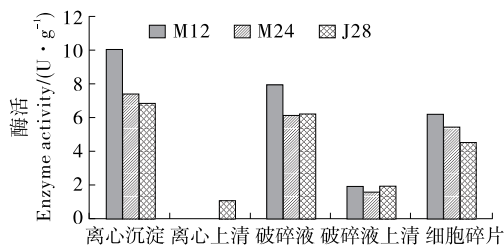


图 6 β -葡萄糖苷酶的定位

Figure 6 β -glucosidase activity of different fractions in strains

之外,其余两株菌上清菌没有酶活。超声破碎之后,破碎液酶活都很高,推测这 3 株菌产的 β -葡萄糖苷酶均是胞内酶;而细胞碎片主要是细胞壁碎片和细胞膜碎片以及部分可能未被破碎的菌体,推测该酶可能是结合在细胞壁上^[20],也有可能结合在原生质体的细胞膜上,为膜结合酶^[21]。

2.2.5 粗酶液的酶学性质 3 种菌的粗酶液最适 pH 略有不同,M12 的最适 pH 为 4.5,而 M24 与 J28 在 pH 为 4.0 时酶活最高,见图 7。这与相关报道一致,即 β -葡萄糖苷酶的最适 pH 在 4~6^[22-23]。

最适温度方面 M12 与 M24 的最适温度均为 37 °C,而 J28 的最适温度在 44 °C,见图 8。文献中不同菌株的最适温

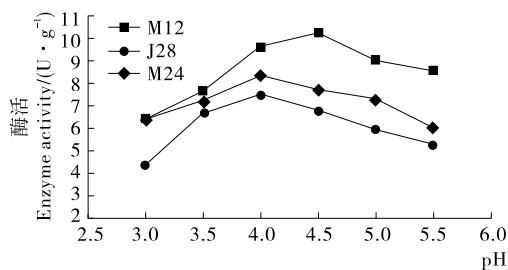


图 7 粗酶液的最适 pH

Figure 7 The activity of crude enzyme in different pH

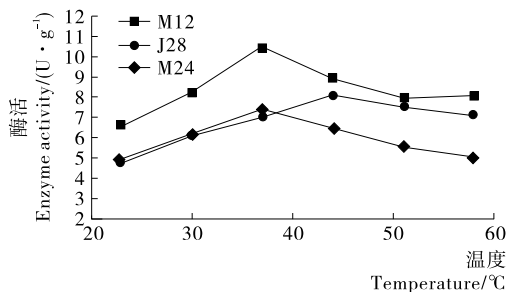


图 8 粗酶液的最适温度

Figure 8 The activity of crude enzyme in different temperatures

度差异较大,李晓东等^[22]发现的一株黑曲霉的 β -葡萄糖苷酶最适温度为 70 °C,万振堂等^[24]筛选出的一株乳酸菌的 β -葡萄糖苷酶最适温度为 37 °C,张敏等^[25]筛选出的一株酵母菌的最适温度为 30 °C。故选取最适合温度和 pH 均适合发酵酸面团的 M12 做后续酸面团发酵试验。

2.3 含有葡萄汁的发酵酸面团面包的风味研究

由表 4、5 可知,3 种面包的风味物质种类和含量各有不同。普通酵母面包共检测出 34 种风味化合物,含有葡萄汁的酵母面包中检测出了 35 种风味物质,虽然种类相差不大,但总峰面积提高了 34.4%;含有葡萄汁的发酵酸面团面包中共检测出 52 种风味物质,较普通酵母面包风味物质种类提高了 52.9%,而风味物质总峰面积提高了 65.5%。由此可见,添加葡萄汁和含有葡萄汁发酵酸面团均会提高面包的风味。

3 种面包的风味物质主要包括醇类、酸类、烷烃类、芳香类和脂类等,萜烯类物质则是葡萄汁的引入带来的特殊风味物质。

醇类物质在 3 种面包中含量都是最高的,虽然醇类物质阈值相对较高,但因其风味中所占的比例也是最大,所以是影响面包风味的一类重要的物质^[26]。由表 5 可知,3 种面包的醇类物质的种类并没有显著差异,而含量差异显著,其中含有葡萄汁的酵母面包的醇类含量提高了 35.7%,发酵葡萄酸面团面包的醇类含量提高了 30.2%。乙醇和异戊醇含量最高,乙醇和异戊醇是酵母发酵产生,含量提高可能是由酵母的活力提高引起的。

酸类物质是酸面团发酵面包产生独特风味的重要原因。与 CYB 相比,RYB 的酸类物质种类不但没有增加,反而减少了。但是在含量上增加了 26.2%。而 RSB 的酸类物质种类上增加了 5 种,而总体含量也提高了 169.5%。这与张庆等^[27]的结论相似。

芳香类化合物在面包中所占的比重也较大,其中含量比较高的苯乙醇具有清甜的玫瑰样花香,苯乙醛具有水果的香气。与 CYB 相比,RYB 的芳香类物质含量提高 51.2%,而 RSB 则比 CYB 和 RYB 分别提高了 196.9%和 96.4%。由此可见,葡萄汁和酸面团的引入都提高了面包中芳香类化合物的含量。

萜烯类化合物在面包中的含量虽然不高,但是其阈值较低,是 RSB 风味组成的重要部分。葡萄汁的添加使 PYB 中出现了萜烯类的物质,但是含量很低,添加了 M12 发酵的酸面团之后,萜烯含量提升明显。由此可以推断出,高产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌对面包的萜烯类风味物质有明显的提升作用。其中含量最高的 8-羟基芳樟醇带有浓青带甜的木青气息,脱氢橙花醇具有令人愉快的玫瑰和橙花的香气, β -石竹烯醇具有辛香、木香和柑橘香。

2.4 面包感官分析

由图 9 可知,含有葡萄汁的酸面团制作的面包在外观、风味和口感等方面均优于普通酵母面包和含有葡萄汁的酵母面包。外观方面,CYB 的得分较低,可能是比容较小引起的。RSB 和 RYB 没有显著性差异。色泽方面,RYB 要比 RSB 和 CYB 低,表现为 RYB 要更加偏褐色,推测原因是添加了葡萄汁,而葡萄汁中有较多的葡萄糖和果糖,导致面包

表 4 普通酵母面包、含有葡萄汁的酵母面包和含有葡萄汁的发酵酸面团面包的 GC—MS 结果

Table 4 The GC—MS analysis of wheat yeast bread, raisin yeast bread and raisin sourdough bread

编号	保留时间/min	风味化合物	相对含量(峰面积,×10 ⁷)			编号	保留时间/min	风味化合物	相对含量(峰面积,×10 ⁷)		
			CYB	RYB	RSB				CYB	RYB	RSB
1	2.62	乙醇	148.8	208.3	179.9	34	17.49	2,3-乙二醇	—	0.9	—
2	4.39	己醛	6.6	5.9	5.4	35	17.77	异月桂烯醇	—	—	0.4
3	4.81	2-甲基 1 丙醇	3.9	6.3	5.0	36	17.83	丁氧甲基丁酸乙氧基酯	3.1	4.0	4.6
4	4.99	1,3-丁二醇	—	—	0.9	37	18.27	2-氨基基-丁酸	—	—	0.4
5	5.36	4-氨基-1-正丁醇	—	—	0.4	38	18.52	8-羟基芳樟醇	—	—	2.3
6	5.41	丙烷	—	0.2	—	39	18.49	异丙基苯甲醛	—	0.9	—
7	5.93	柠檬烯	—	0.5	0.8	40	19.04	十一碳二烯醛	—	—	2.4
8	6.10	庚醛	1.7	1.5	—	41	19.05	癸二烯酸	1.6	2.1	—
9	6.11	戊基乙醇酸	—	—	1.2	42	19.27	己酸	7.3	10.9	20.9
10	6.82	异戊醇	49.8	61.1	77.2	43	19.50	4-甲基-2,3 戊二醇	—	—	0.3
11	7.09	2-甲氧基丁烯酸甲酯	—	—	0.4	44	19.65	2-氨基基丙酸	0.7	0.3	0.3
12	7.32	正戊醇	0.8	1.9	1.3	45	20.03	苯甲醇	2.0	2.8	4.2
13	8.84	乙偶姻	0.5	—	6.1	46	20.26	脱氢橙花醇	—	—	1.6
14	9.02	2,3-丁二醇	1.7	2.9	0.9	47	20.59	苯乙醇	20.2	28.7	60.5
15	10.24	正己醇	5.4	10.9	13.2	48	20.75	香叶基丙酮	—	—	1.3
16	11.13	壬醛	2.4	6.1	7.1	49	20.84	土青木香酮	—	—	0.5
17	11.45	十一醛	0.4	—	—	50	21.10	2-亚烯基环丁烯	—	—	0.4
18	12.07	乙酸	7.4	11.8	17.6	51	22.63	1-甲氧基戊基环丙烷	1.8	2.2	2.0
19	13.22	硝基乙烷	—	0.7	—	52	22.72	辛酸	1.3	1.8	3.5
20	13.36	癸醛	—	—	2.6	53	23.26	2,6,6-三甲基-2 环己烯-1 醇	0.5	0.6	0.9
21	13.91	苯甲醛	3.8	6.2	11.9	54	23.77	6,10,14-三甲基 2-十五烷酮	0.6	—	—
22	14.17	2-壬烯醛	1.8	2.0	5.4	55	24.10	壬酸	0.7	—	1.2
23	14.29	甲基丙酸	5.9	5.8	10.8	56	24.33	羟苯乙酯	—	0.8	—
24	15.49	丁酸	—	—	1.4	57	24.74	壬内脂	1.2	—	2.0
25	15.88	癸酸乙酯	1.6	2.2	2.8	58	24.88	柠檬醛 b	—	—	0.6
26	16.11	苯乙醛	0.5	0.5	2.1	59	25.06	2-乙基 1-十二烷醇	0.7	—	—
27	16.20	二甲基-5-己烯 1 醇	10.0	7.6	15.0	60	25.26	癸酸	—	—	0.7
28	16.39	2,2-二甲基-3 辛酮	—	—	2.3	61	25.28	3-甲基-2 丁醇	—	0.4	—
29	16.48	3,6-二甲基辛酮	1.0	—	—	62	25.95	6,7-十二烷二酮	—	—	1.7
30	16.67	≈十二碳烯 4 醇	1.2	—	1.4	63	26.52	柠檬醛 a	—	—	0.2
31	17.05	β-石竹烯醇	—	—	1.5	64	26.96	三甘醇	—	0.3	0.3
32	16.84	4-甲基-戊二醇	—	0.3	—	65	27.30	3-甲基丁醇	0.8	0.9	0.5
33	17.47	戊酸	—	—	1.9						
计数			34	35	52	总峰面积			297.9	400.5	490.1

表 5 普通酵母面包、含有葡萄汁的酵母面包和含有葡萄汁的发酵酸面团面包的风味物质统计

Table 5 The statistics of aroma compounds in wheat yeast bread, raisin yeast bread and raisin sourdough bread

风味物质	CYB		RYB		RSB	
	种类	峰面积/×10 ⁷	种类	峰面积/×10 ⁷	种类	峰面积/×10 ⁷
醇类	11	223.7	13	303.6	13	291.2
酮类	2	1.6	0	0.0	2	4.0
醛类	5	13.0	5	16.4	4	10.3
烷烃类	2	2.3	3	3.2	3	8.4
芳香类	4	26.5	5	40.1	5	78.7
酸类	7	24.9	5	30.9	12	67.1
萜烯	0	0.0	1	0.5	9	6.3
酯类	3	5.8	3	7.0	4	9.8

在烘焙过程中,美拉德反应和焦糖化反应加剧引起的。而 RSB 中经过酸面团发酵之后,葡萄糖等已经被乳酸菌消耗,所以色泽与 CYB 组相差不大。口感方面,根据测试者描述,RYB 和 RSB 在口感上还能吃出一些 CYB 中没有的口味,RSB 中有略微的酸味影响了其评分但也在可接受范围内。风味方面,优劣程度排序为 RSB>RYB>CYB。根据测试者描述,CYB 风味较为一般,RYB 和 RSB 风味上要更加丰富一点,其中 RSB 中能闻出一些淡清香与果香,整体风味更加浓郁。整体可接受度方面,优劣排列顺序为 RSB>RYB>CYB。表明只添加葡萄汁的面包与普通酵母面包相比,外观、口感和风味等方面均有优势,色泽评分较普通酵母面包低,而添加含有乳酸菌发酵的酸面团除色泽与空白酵母面包评分相同外,其余各项评分均有较大提高,与只添加葡萄汁的酵母面包相比,口感因为略有酸味导致评分有所降低外,其他方面都有明显的提高。整体接受度上,含有葡萄汁的酸面团面包要高于其他两组面包。

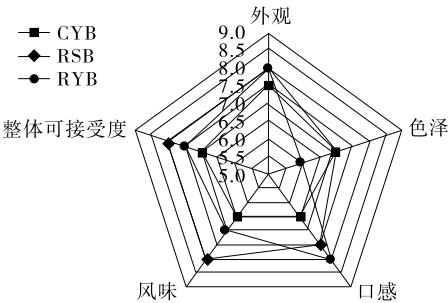


图 9 3 种面包的感官评价

Figure 9 Sensory characteristics of three kinds of bread

3 结论

本研究从酒曲中筛选高产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌,探究了该乳酸菌产酶活位置和最适条件,并将其运用至含有葡萄汁基质的酸面团中,制作水果酸面团面包。结果表明,添加高产 β -葡萄糖苷酶的乳酸菌发酵的葡萄汁酸面团能够明显改善面包风味,制得的面包较普通酵母面包有更多的萜烯类风味物质,能够带给消费者更愉悦的感官体验,整体可接受度更高。若能够将工艺条件进一步优化,将有望实现工业化生产。

参考文献

[1] 汤晨,张蕾,仇智宁. 试论食用香精香料安全性[J]. 粮食与油脂, 2012, 25(7): 50-51.

[2] 张薇. 果酱自然发酵酸面团菌群结构及发酵面包烘焙品质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.

[3] 涂雅俊. 葡萄干发酵汁的性质及其对面包烘焙特性的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2013.

[4] 李庆华. 高产 β -葡萄糖苷酶酿酒酵母的筛选及其发酵特性的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009: 1-2.

[5] 彭帅,樊明涛,张庭静,等. 熊果苷诱导植物乳杆菌 β -D-葡萄糖苷酶对葡萄酒香气的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(19): 12-15.

[6] BAFFI M A, TOBAL T, LAGO J H G, et al. A Novel beta-Glucosi-

dase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and Application in Winemaking[J]. J Food Sci, 2011, 76(7): C997-C1 002.

[7] 桑苇,唐柯,徐岩,等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶对葡萄酒解增香调控及香气物质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(5): 8-13.

[8] 韦策,陆青山,勇强,等. 固定化 β -葡萄糖苷酶填充床反应器的研究[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(3): 64-68.

[9] 侯小歌,杜小波,李学思,等. 中温大曲中乳酸菌的分离鉴定及产酸特性[J]. 酿酒科技, 2010(9): 17-20.

[10] 王兴洁,魏超,廖光敏,等. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌的分离鉴定及发酵条件优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(7): 40-44.

[11] 赵林果,孟鹏,李丽娟,等. 利用七叶灵显色技术检验和判断 β -葡萄糖苷酶的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(12): 163-166.

[12] 蔡万华,丁少鹏,叶蕊芳,等. 利用 96 孔板和酿酒酵母生长圈复合筛选高产管囊酵母[J]. 酿酒科技, 2011(4): 36-38.

[13] 李少远. 最新数据: 全球葡萄园面积、葡萄酒产量和消费情况 [EB/OL]. [2016-04-26]. <http://www.jianiang.cn/shuju/042B61342016.html>.

[14] 白瑞,苏东民,苏东海,等. 小麦麸皮内源性 β -木糖苷酶酶活测定及酶学性质[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 30-33.

[15] 程晓燕. 酸面团乳酸菌优势菌群及发酵馒头品质与风味特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015: 11.

[16] 滕志利,钱方,姜淑娟,等. 产广谱细菌素乳酸菌的筛选及分类鉴定[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 45-48.

[17] BARBAGALLO R N, SPAGNA G, PALMERI R, et al. Assessment of beta-glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34(3/4): 292-296.

[18] 张思佳,张薇,苏晓琴,等. 乳杆菌发酵对荞麦面包抗氧化及烘焙特性影响[J]. 食品工业科技, 2015(19): 49-53.

[19] 王益妹,钱超,黄卫宁,等. 梅兰春酒醅中生香酵母的分离鉴定及其发酵面包香气成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(9): 45-51.

[20] P REZ-MART N F, SESE A S, IZQUIERDO P M, et al. Screening for glycosidase activities of lactic acid bacteria as a biotechnological tool in oenology[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(4): 1 423-1 432.

[21] 张哲. 植物乳杆菌 β -D-葡萄糖苷酶的胞内定位及性质研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014: 17.

[22] 李晓东,周明,杨丽娜,等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶的酶学特性研究[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(3): 14-18.

[23] MESAS J M, RODRIGUEZ M C, ALEGRE M T. Basic characterization and partial purification of beta-glucosidase from cell-free extracts of *Oenococcus oeni* ST81[J]. Letters In Applied Microbiology, 2012, 55(3): 247-255.

[24] 万振堂,杨丽杰. 产胞外 β -葡萄糖苷酶乳酸菌的筛选及其酶学性质的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(4): 28-32.

[25] 张敏,李佳益,史学伟,等. 产 β -葡萄糖苷酶非酿酒酵母的筛选及酶学特性研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(5): 97-101.

[26] POZO-BAY N M A, GUICHARD E, CAYOT N. Flavor Control in Baked Cereal Products[J]. Food Reviews International, 2006, 22(4): 335-379.

[27] 张庆,钟京,王凤,等. 植物乳杆菌燕麦酸面团发酵面包风味化合物的特征[J]. 食品科学技术学报, 2011, 29(4): 12-18.