

# 高活性天然酵母发酵剂的优化

## Study on the optimization of sourdough starter with high activity

赵佳佳<sup>1</sup> 顾尧<sup>2</sup> 李言<sup>2</sup> 钱海峰<sup>2</sup> 王立<sup>2</sup>

ZHAO Jiajia<sup>1</sup> GU Yao<sup>2</sup> LI Yan<sup>2</sup> QIAN Haifeng<sup>2</sup> WANG Li<sup>2</sup>

(1. 江苏旅游职业学院, 江苏 扬州 225000; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. Jiangsu College of Tourism, Yangzhou, Jiangsu 225000, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**摘要:**目的: 研究标准化稳定天然酵母发酵剂的制备工艺, 探究干燥工艺及保护剂对天然酵母活性的影响, 并研究其贮藏活性。方法: 选用多种水果制备天然酵母, 研究其发酵过程并分离菌株通过 ITS 和 16s 基因测序在数据库中比对鉴定优势菌株。以干燥工艺处理后的存活率和贮藏活性为指标, 通过选择干燥工艺、样品状态和保护剂配方来获得最佳方案。结果: 葡萄天然酵母制备的面包具有最好的比容、孔隙度和硬度。在此基础上, 以干燥存活率和贮藏活性为指标得到两种保护效果较好的配方: ① 冷冻干燥优势菌种菌液, 脱脂乳粉 35%、麦芽糊精 7.5% 和海藻糖 25%, 干燥存活率约为 93%; ② 天然酵母整体喷雾干燥, 脱脂乳粉 35%、麦芽糊精 10% 和海藻糖 15%, 干燥存活率约为 90%。结论: 喷雾干燥的发酵剂贮藏活性下降较快, 而冷冻干燥的发酵剂贮藏活性较强。

**关键词:** 天然酵母; 面包; 乳酸菌; 干燥工艺; 保护剂

**Abstract: Objective:** This research aimed to study the preparation of standardized and stable sourdough starter, to explore the effects of different drying processes and protective agents on the survival rate of sourdough, and examine its storage activity.

**Methods:** A variety of fruits were selected to prepare sourdough, the fermentation process was studied, and the strains were isolated and identified by ITS and 16s gene sequencing in the database. The optimum scheme was obtained by selecting the drying process, sample state and protectant formulation with the activity after drying and storage activity as indexes. **Results:** It was found that the bread prepared with grape sourdough had the best specific volume, porosity and hardness. On this basis, the drying survival rate and storage activity were used as indexes to

study the combination of drying protectants. Finally, two better protective agent formulations were obtained by orthogonal experiment: ① Freeze-dried the dominant pure bacterial solution, skim milk 35%, maltodextrin 7.5% and trehalose 25%, and the drying survival rate was about 93%. ② Spray dried sourdough germ whole, skim milk 35%, maltodextrin 10% and trehalose 15%, and the drying survival rate was about 90%. **Conclusion:** It was found that the storage activity of the spray-dried starter decreased rapidly, while that of the freeze-dried starter was slower.

**Keywords:** sourdough; bread; lactic acid bacteria; drying process; protective agent

面包是世界范围内食用最广泛的主食之一<sup>[1]</sup>。诸多新型健康天然产品中, 天然酵母有 3 000 多年的历史, 其通常被定义为面粉、水和内源性微生物的发酵混合物<sup>[2]</sup>。乳酸菌和酵母菌是天然酵母微生物的两种主要类型, 二者比例通常为 100 : 1<sup>[3]</sup>。用天然酵母制备的面包具有降低血糖指数<sup>[4]</sup>, 提高矿物质生物利用度<sup>[5]</sup>和降低麸质含量等作用。与普通面包相比, 天然酵母面包含有更少的可发酵低聚糖、双糖、单糖和多元醇(FODMAP)<sup>[6]</sup>, 且含有更多的生物活性化合物, 如  $\gamma$ -氨基丁酸和多酚类化合物<sup>[7]</sup>。

根据微生物发酵活性, 天然酵母的应用形式可分为 I 型、II 型和 III 型三大类。I 型天然酵母是通过传统方法培养, 主要为室温环境下的连续继代培养(间隔时间一般为 8~24 h)。这种发酵方式可以保证内源微生物始终处于较活跃状态。同时, 其微生物来源主要为环境、原料和水, 这种发酵过程能够保持自身菌群处于较稳定的状态<sup>[8]</sup>。近年来, 对微生物基因等方面的高通量研究方法愈发完善, 使得对复杂菌群的研究更加深入, 天然酵母就是其中一例, 其样本通常同时含有 1~2 种酵母菌和数种乳酸菌。I 型天然酵母在面包制备中有很好的产气效果(一般不额外添加商用即发酵母), 且能够改善面包组织、

**基金项目:** 江苏旅游职业学院“青蓝工程”项目; 江苏省“青蓝工程”项目

**作者简介:** 赵佳佳, 女, 江苏旅游职业学院讲师, 硕士。

**通信作者:** 王立(1978—), 男, 江南大学食品学院教授, 博士。

E-mail: wangli0519@163.com

**收稿日期:** 2023-10-02 **改回日期:** 2024-01-10

增添风味和延长保质期。然而,天然酵母的微生物多样性使其品质差异巨大。I 型天然酵母在使用中存在的主要问题为规模小、操作复杂、易污染、难以标准化等。生产中存在的不利因素促进了 II 型和 III 型天然酵母的产生<sup>[9]</sup>。

II 型天然酵母是通过大型发酵装置实现大批量一次发酵,来实现更合理的批次化面包生产,其流程通常是持续发酵 15~20 h 或者发酵 8 h 后再投料扩大发酵一次,完成发酵后贮藏于相应容器中,再投入生产。因其一般维持一个较长的发酵阶段,内部微生物群通常处于代谢中后期,因此 II 型天然酵母一般表现出较高的酸度,在面包生产中更多地扮演酸化剂和风味添加剂的角色。为达到使用时仍有较好发酵活性的效果,II 型天然酵母的菌种一般具有较好的耐酸性能,常见的酵母菌有酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、乳酸菌有:短乳杆菌(*Levilactobacillus brevis*)、发酵乳杆菌(*Limosilactobacillus fermentum*)、植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)、罗伊氏乳杆菌(*Limosilactobacillus reuteri*)和旧金山乳杆菌(*Fructilactobacillus sanfranciscensis*)等<sup>[10]</sup>。由于 II 型天然酵母的酸度较强(一般 pH 低于 3.5),生产过程中会影响最终产品的食用品质。同时,在批次化生产中,尽管 II 型天然酵母在同一批次的产品中效果较均一,但经过长时间使用后其批次间差异仍较为显著<sup>[11]</sup>。

为达到长时间的品质均一,研究者对稳定化的天然酵母发酵剂进行了相关研究,III 型天然酵母就是其中最主要的产品形式。III 型天然酵母是将培养完成的天然酵母通过不同的干燥手段制备成的粉末状发酵剂<sup>[12]</sup>。这种方式保留了天然酵母的风味特性,批次间生产的稳定性也得到提升。然而,因干燥工艺和菌种保护的缺陷导致发酵剂的发酵活性较差,生产中通常需要极大的投料量(超过面粉质量 10%)。因此,根据发酵微生物的发酵活性、风味物质产出和温度敏感性选择合适的菌种是制备 III 型天然酵母的关键因素。其中异型发酵的短乳杆菌(*L. brevis*)、兼性异型发酵的戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)和兼性异型发酵的植物乳杆菌(*L. plantarum*)具有较好的相应属性<sup>[13]</sup>。同时,针对在干燥过程中缺少适合的保护剂等问题,需进一步研究以优化天然酵母发酵剂,使其品质稳定、贮藏活性好、干燥存活率高。

研究拟对天然酵母进行分离鉴定,采用不同方案进行不同干燥工艺处理,分析保护剂对其存活率的影响,并进一步对存活率高的方案进行贮藏试验,以探究其实际应用价值,旨在为天然酵母面包产业化发展提供理论和技术指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

高筋小麦粉:益海嘉里金龙鱼粮油股份有限公司;

起酥油:艾迪科食品有限公司;

即发干酵母:乐斯福(明光)有限公司;

乳酸杆菌琼脂培养基(MRS):杭州百思生物技术有限公司;

水果、食用盐、蔗糖、海藻糖(HRE)、麦芽糊精(MD)、脱脂乳粉(SM)、乳清蛋白(WHEY):市售;

酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(YPD)、片状 NaOH、酚酞:国药集团药业股份有限公司;

酵母基因组 DNA 提取试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司;

引物:苏州金唯智生物科技有限公司;

真空冷冻干燥机:LGJ-10E 型,四环福瑞科技有限公司;

喷雾干燥机:BUCHIB-290 型,步崎实验室设备贸易有限公司;

电烤箱:WTNS36 型,联合纬创机械有限公司;

醒发箱:JW-LD18SP 型,联合纬创机械有限公司;

PCR 仪:XP 型,博日科技有限公司;

物性分析仪:TA.XTC-18 型,保圣实业有限公司;

pH 计:FE20 型,梅特勒—托利多精密仪器有限公司;

霉菌培养箱:BMJ-400C 型,博讯医疗生物有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 天然酵母及其面包制备

(1) 天然酵母的培养:参考虞桢芳<sup>[14]</sup>的方法并修改。将百香果、葡萄、橙子、梨洗净,擦干,切成 2 cm×3 cm×3 cm 块状。取 400 g 水果于玻璃发酵罐中,加入 400 mL 灭菌水,40 g 蔗糖,保鲜膜封口后关闭罐口,室温下避光培养 7 d。发酵完成后得到百香果天然酵母发酵液(pfs)、葡萄天然酵母发酵液(gs)、橙子天然酵母发酵液(os)和梨天然酵母发酵液(ps)。将发酵液和高筋面粉按质量比 1:1 混匀,28℃发酵 24 h,按相同比例添加等质量的灭菌水和面粉,再发酵 24 h,并重复添加和发酵两次,最终得到天然酵母,分别命名为 PFS、GS、OS 和 PS。

(2) 面包制作:将面包面团所需物料按表 1 配制好,向搅拌机内投入物料搅打成团。加入起酥油,搅打至表面光滑,获得面包面团。将面团正反两面于室温各静置醒发 30 min,分割成 150 g 的面团并搓圆。静置松弛 20 min,用擀面杖将面团擀整成型,放入模具中醒发,醒发温度为 38℃,85%湿度,醒发时间 50 min。放入烤箱烘烤,上火 180℃,下火 200℃,时间 25 min。为控制发酵菌数量,进行了发酵剂添加量的平衡,即发干酵母一般的活菌数为 10<sup>10</sup> CFU/g,天然酵母稳定后的总活菌数一般不超过 5×10<sup>8</sup> CFU/g,因此在配方上对其添加的发酵剂数量进行了控制。各天然酵母制备的面包分别命名为 PFSB、GSB、OSB 和 PSB,空白面包样命名为 CB。面包于

表 1 面包配方<sup>†</sup>  
Table 1 Recipe of breads g

| 物料    | 空白面包  | 天然酵母面包 |
|-------|-------|--------|
| 小麦粉   | 1 000 | 950    |
| 细砂糖   | 100   | 100    |
| 即发干酵母 | 15    | 8      |
| 天然酵母  | /     | 100    |
| 盐     | 10    | 10     |
| 水     | 600   | 550    |
| 起酥油   | 60    | 60     |

<sup>†</sup> 天然酵母中含有小麦粉和水,其质量比为 1:1;天然菌种的添加量依据其总活菌数量,使其与空白样品中所含发酵菌数量水平相同。

室温静置 6 h 后取样测定或冻干备用。

1.2.2 菌群分离与鉴定 取部分天然酵母进行 10 倍梯度稀释至  $10^{-8}$ 。于适当的稀释梯度(通常为  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ )下取 10  $\mu$ L 样品涂布于 YPD 和 MRS 平板进行培养。在菌落数量较合适的平板上挑取全部单菌落,放入相应液体培养基中进行扩大培养,取部分菌液按体积比 1:1 加入 60% 甘油,混匀,于  $-80^{\circ}\text{C}$  贮藏。

采用 16s 和 ITS 高通量基因测序对分离得到的菌种进行鉴定。用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取乳酸菌 DNA,用酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取酵母菌 DNA,对比其吸光度值,并判断其纯度。进行 PCR 扩增试验,反应体系为 50  $\mu$ L,包括上游引物 2  $\mu$ L、下游引物 2  $\mu$ L、DNA 模板 2  $\mu$ L、PCR 扩增预混液 25  $\mu$ L 和 ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L,其中 PCR 预混液包括 DNA 聚合酶、脱氧核苷酸、Mg<sup>2+</sup> 等。扩增条件:95  $^{\circ}\text{C}$  保持 5 min,开始循环 95  $^{\circ}\text{C}$  保持 20 s,55  $^{\circ}\text{C}$  保持 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  保持 1 min,重复 33 次,循环结束后 72  $^{\circ}\text{C}$  保持 5 min,于 4  $^{\circ}\text{C}$  贮藏。乳酸菌所使用的上游扩增引物为 27F: (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'),下游扩增引物为 1492R: (5'-CTACGCTACCTTGTACGA-3'),酵母菌所使用的上游扩增引物为 ITS1: (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'),下游扩增引物为 ITS4: (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。取 2.5  $\mu$ L PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳,并使用化学凝胶成像系统进行成像拍照。将 PCR 产物寄送检测公司进行测序,并与已知菌种序列进行同源性对比。

1.2.3 发酵剂制备 将分离鉴定出的优势菌种进行扩大培养,按菌种分布比例混合后命名为天然酵母优势菌菌液,并加入保护剂,若不加保护剂则加入 5% 的小麦面粉作为载体。将天然酵母整体加入保护剂或不加保护剂作为干燥底料。两种干燥方式的菌落数控制在酵母菌  $10^7$  CFU/mL,乳酸菌  $10^9$  CFU/mL。冷冻干燥条件:底

料混匀后于  $-80^{\circ}\text{C}$  冷冻 4~6 h,真空冷冻干燥,  $-20^{\circ}\text{C}$  真空处理 2~3 d。喷雾干燥工艺条件:干燥底料于 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min 后进料,进出口温度 135/75  $^{\circ}\text{C}$ 、进料速度 1 mL/s。得到干燥后的发酵剂于 4  $^{\circ}\text{C}$  贮藏(不控制空气),按干燥后和贮藏时间取样进行活菌量测定。将天然酵母整体和优势菌菌液分别进行喷雾干燥和冷冻干燥处理,喷雾干燥天然酵母整体命名为 SD-D,冷冻干燥天然酵母整体命名为 FD-D,喷雾干燥优势菌菌液命名为 SD-S,冷冻干燥优势菌菌液命名为 FD-S。

保护剂试验中,经筛选得到麦芽糊精(MD)、海藻糖(TRE)、脱脂乳粉(SM)和分离乳清蛋白(WHEY)作为保护剂。在得到单保护剂最佳浓度后,排除分离乳清蛋白后,进行三因素三水平的正交试验分析最佳的复配保护剂。

1.2.4 pH 值测定 采用 pH 计。

1.2.5 存活率测定 待测样品使用灭菌水进行 10 倍梯度稀释至  $10^{-8}$ 。选择 3 个较恰当的浓度梯度(通常为  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ),取 10  $\mu$ L 稀释液进行平板涂布(MRS 琼脂平板和 YPD 琼脂平板),分别倒置于 37,28  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h,进行菌落计数。每组样品重复测定 3 次。

1.2.6 比容测定 参照 AACC10-05 标准测试方法并修改。使用小米替代油菜籽测定体积,使用电子秤称重后计算比容。每组样品重复测定 3 次。

1.2.7 孔隙度测定 将面包放凉后切薄片,使用扫描仪扫描面包截面,用 ImageJ 软件分析面包截面孔隙属性。每组样品重复测定 6 次。

1.2.8 质构测定 参照 AACC74-09 测试方法并修改。面包放凉后 3 h,将其切为均匀薄片(16~18 mm),取 3 片进行 TPA 测试。探头为 P36R,下压速率 2 mm/s、测定速率 1.5 mm/s、应变力 0.005 N,形变程度 50%,两次压缩间隔 4 s。

1.2.9 数据统计与分析 采用 Excel 2019 和 SPSS 20 软件进行统计分析和显著性分析,显著性水平为 0.05。数据可视化由 Origin 2022 软件完成。

## 2 结果与讨论

### 2.1 天然酵母发酵过程

由图 1(a)可知,os 和 pfs 在培养初期的 pH 值显著低于 ps 和 gs 的,其中 os 的 pH 值最低为 5.03。其主要原因为不同天然酵母选用的发酵底物自身酸度不同<sup>[15]</sup>。发酵第 3~5 天,4 种天然酵母的 pH 值均快速下降至 3.5~4.0,与 Fang 等<sup>[16]</sup>的研究结果类似。其主要原因为天然酵母在培养过程中经过前期的菌群竞争出现了有显著生存优势的菌种,并且在中期优势菌群进行快速生长产生了大量的有机酸代谢物使得整体 pH 值快速下降。发酵末期,4 种天然酵母的 pH 值变化基本稳定,gs 和 ps

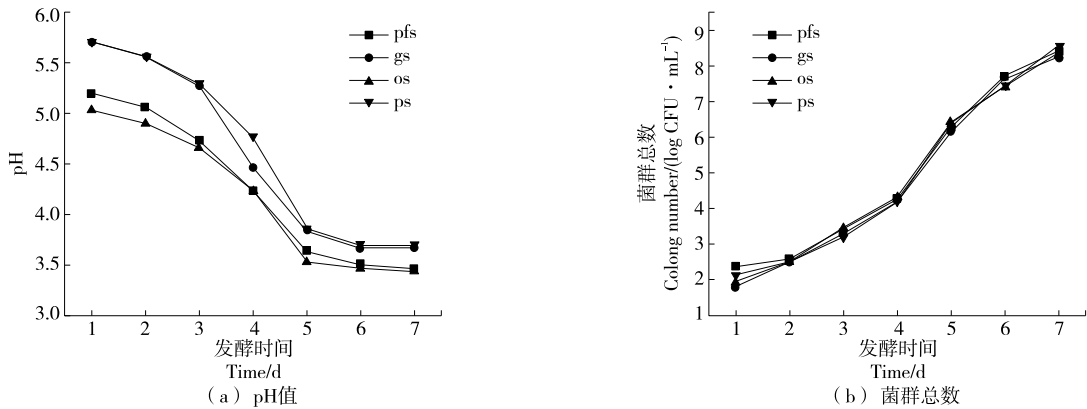


图 1 不同天然酵母发酵过程的 pH 值和菌群数量变化

Figure 1 Changes of pH value and colony number during fermentation of different sourdoughs

的 pH 值仍显著高于 os 和 pfs 的,但绝对差距缩小了近 50%。发酵后期酸度差异主要来源于发酵底物的酸度不同和优势菌群代谢差异<sup>[15]</sup>。

由图 1(b)可知,菌落总数在整个发酵期间持续增长,在发酵前 2 d 和第 7 天的增速较为缓慢,在发酵中期的增速最快,与刘若诗<sup>[17]</sup>的研究结果类似,与天然酵母发酵期间 pH 值的变化结果相符合。发酵后期,不同天然酵母的菌落数均 $>10^8$  CFU/mL 且无显著差异,主要原因是获得竞争优势的主要菌种为植物乳杆菌,其生长活性差异较小且环境给予的营养物质总量固定。

不同的天然酵母发酵过程中的 pH 值均呈先缓慢下降后快速下降再趋于稳定的趋势,表明天然酵母培养存在前期菌群水平高、杂菌多的情况,这是天然酵母优势菌群不稳定的主要原因。中期优势菌群迅速生长繁殖,代谢产物快速增多;后期菌群达到动态稳定,在环境营养物质不足等因素影响下,整体代谢活性降低。

## 2.2 天然酵母的品质

由表 2 可知,GSB 的比容显著大于其他面包的,CB、PFSB 和 OSB 的次之且无显著差异,PSB 的比容显著小于其他面包的。不同的天然酵母制备的面包因其优势菌不同,其品质也有一定差异,主要是不同菌株的代谢产物有差异,包括胞外多糖、有机酸种类和产量等<sup>[18]</sup>。5 种面

包的平均孔隙无显著差异,但 PSB 和 PFSB 的孔隙相对较大。孔隙大小能在一定程度上反映面包的组织品质,细密的空隙能包裹更多的气体,更利于品质提升<sup>[19]</sup>。

GSB 和 PSB 的硬度小于其他面包的,同时 GSB 的品质略优于 PSB。OSB 的硬度显著小于 PFSB 和 CB 的。Yu 等<sup>[15]</sup>研究表明,添加天然酵母可以改善面包的质构特性,尤其是硬度及其相关属性,其主要原因是有机酸和其他有益代谢物改善了面包的组织结构。在弹性方面,PSB、OSB 和 PFSB 的弹性相对优于其他面包,但其绝对差距较小。综上,GSB 的品质相对更好,并以此为基础进行发酵剂的开发。

## 2.3 菌种鉴定

由表 3 可知,酿酒酵母和植物乳杆菌是 4 组天然酵母中丰度相对较高的菌种。酿酒酵母是活性相对较强的菌种,一般可以耐受较低的 pH 值和高渗透压,比较适合天然酵母和面包生产的体系。植物乳杆菌作为主要的细菌菌种,在多个方面起到有益作用,包括肠道和抗氧化方面,而其对多种碳水化合物消化能力是使其在该体系中较为常见的主要原因<sup>[20]</sup>。

## 2.4 干燥工艺分析

由图 2 可知,经 FD-S 和 SD-D 处理后的活菌数显著高于其他组别,经 SD-S 和 FD-D 处理后的活菌数较少

表 2 天然酵母面包烘焙属性<sup>†</sup>

Table 2 Baking qualities of sourdough breads

| 样品   | 比容/<br>(cm <sup>3</sup> · g <sup>-1</sup> ) | 平均孔隙大小/<br>mm <sup>2</sup> | 孔隙度/<br>%                | 硬度/<br>N                 | 弹性                      |
|------|---------------------------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| CB   | 4.68±0.07 <sup>b</sup>                      | 173.73±6.41                | 39.62±2.10 <sup>c</sup>  | 0.273±0.019 <sup>a</sup> | 0.80±0.03 <sup>c</sup>  |
| PFSB | 4.65±0.01 <sup>b</sup>                      | 179.49±1.06                | 49.43±1.61 <sup>a</sup>  | 0.250±0.010 <sup>a</sup> | 0.84±0.01 <sup>ab</sup> |
| GSB  | 4.79±0.01 <sup>a</sup>                      | 176.68±7.09                | 41.77±2.70 <sup>bc</sup> | 0.176±0.012 <sup>c</sup> | 0.82±0.02 <sup>bc</sup> |
| OSB  | 4.64±0.04 <sup>b</sup>                      | 174.51±3.25                | 43.80±3.05 <sup>b</sup>  | 0.212±0.011 <sup>b</sup> | 0.85±0.01 <sup>ab</sup> |
| PSB  | 4.54±0.08 <sup>c</sup>                      | 182.30±5.64                | 46.83±2.74 <sup>ab</sup> | 0.185±0.012 <sup>c</sup> | 0.87±0.02 <sup>a</sup>  |

<sup>†</sup> 字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )。



表 3 天然酵母微生物分离鉴定

Table 3 Isolation and identification of sourdough strains

| 样品名 | 酵母菌  |                       |      | 乳酸菌      |                       |      |
|-----|------|-----------------------|------|----------|-----------------------|------|
|     | 菌种   | 菌株名称                  | 占比/% | 菌种       | 菌株名称                  | 占比/% |
| PFS | 酿酒酵母 | <i>S.c</i> isolate A3 | 43.5 | 植物乳杆菌    | <i>L.p</i> Heal19     | 83.6 |
|     | 酿酒酵母 | <i>S.c</i> KSD        | 23.7 |          |                       |      |
| PS  | 酿酒酵母 | <i>S.c</i> isolate 28 | 56.3 | 植物乳杆菌    | <i>L.p</i> 3356       | 64.8 |
|     |      | <i>S.c</i> Y125       | 26.4 | 乳酸乳球菌    | <i>L. lactis</i> 4355 | 29.2 |
| GS  | 酿酒酵母 | <i>S.c</i> Y117       | 34.0 | 融合魏斯氏乳酸菌 | <i>W.c</i> 3052       | 7.9  |
|     | 酿酒酵母 | <i>S.c</i> TU11       | 27.6 | 植物乳杆菌    | <i>L.p</i> 2194       | 32.1 |
|     | 酿酒酵母 | <i>S.c</i> XZFM15F1   | 26.3 | 植物乳杆菌    | <i>L.p</i> 2329       | 25.7 |
|     |      |                       |      | 植物乳杆菌    | <i>L.p</i> N-1        | 16.9 |
|     |      |                       |      | 植物乳杆菌    | <i>L.p</i> 2877       | 13.4 |
| OS  | 酿酒酵母 | <i>S.c</i> OM38       | 85.8 | 植物乳杆菌    | <i>L.p</i> 2194       | 51.5 |
|     |      |                       |      | 植物乳杆菌    | <i>L.p</i> SKL-18     | 37.0 |

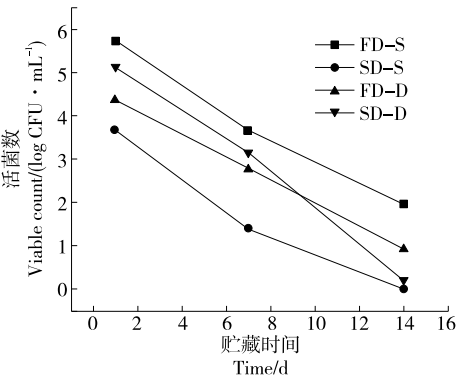


图 2 无保护剂干燥处理的乳酸菌存活情况

Figure 2 Survival rate of bacteria treated without protective agent drying

(<5%)。酵母菌的存活能力较强,在干燥处理后存活率要高于细菌。FD-S 的活菌数始终保持最高,但在无保护剂环境下,活菌数呈指数级下降。同时,经 SD-S 处理后的活菌数和贮藏活菌数均显著低于其他组别。FD-S 采用冻干优势菌株菌液的方案处理,其活菌数和贮藏效果较好,可能是因为菌株菌液更适应冻干的处理方式,且在后续贮藏中微胶囊能较好地延续微生物的低新陈代谢状态<sup>[21]</sup>。SD-D 采用整体喷雾干燥天然酵母的方案处理,保留了大部分固体作为载体,其初始活菌数较高但贮藏效果较差,主要原因可能是在缺少保护剂的情况下,尽管进行了温度等条件的调整,但活菌的细胞壁仍会受到热损伤。在干燥初始的情况下可以进行繁殖,但在低新陈代谢的情况下菌株难以长期存活<sup>[22]</sup>。因此,选择纯菌液冻干和天然酵母整体喷干两种方式进行保护剂添加处理,可以弥补其缺点提高存活率并延长贮藏期限。

2.5 干燥保护剂优化

由图 3 可知,SM 保护剂对两种干燥方案的保护效果

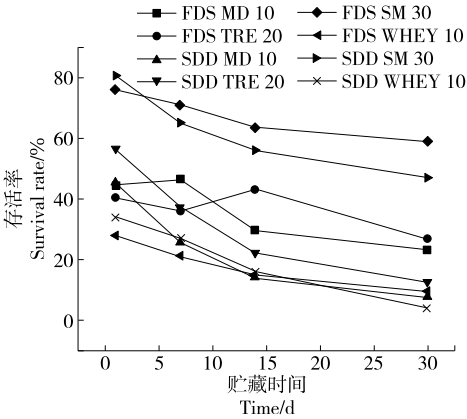


图 3 添加单种保护剂后的存活率曲线

Figure 3 Survival rate of bacteria treated with protective agents

显著高于其他保护剂,使用 MD 和 TRE 保护剂进行冻干处理的存活率约为 40%,且贮藏保护效果较好,第 30 天时仍有约 30% 的存活率。所有喷雾干燥组均存在贮藏过程中存活率下降较快的问题,可能是单保护剂的使用量和保护效果对降低热处理造成的损伤作用不强<sup>[23]</sup>。使用 WHEY 作为冻干保护剂时,初始存活率较低,其保护效果不佳。干燥过程中糖类保护剂的羟基会与蛋白质表面的极性基团形成氢键,取代表面的水分子,形成一层膜防止菌体表面直接暴露从而提高菌活性<sup>[24]</sup>。使用 MD 和

TRE 作为保护剂进行干燥的初始存活率为 40%~60%，保护效果相对较好。同时，糖类保护剂在冻干时会转变为玻璃态，具有较高的黏度和较低的扩散性，会包裹在物质表面维持整体结构，这可能是糖类保护剂在冻干处理时贮藏效果较好的主要原因<sup>[23]</sup>。蛋白保护剂通常能够自发吸附在菌体表面，对大多数菌的干燥处理都有保护作用，SM 为常见且有效的保护剂。WHEY 在两种处理方式中效果均相对较差，其主要原因可能是乳清蛋白对菌体的包裹性不好，同时 WHEY 自身的热稳定能力在其原本的工艺流程中结构已经被破坏。因此，选用 SM、MD 和 TRE 进行后续复配研究。

在前期试验基础上，以 MD 添加量、TRE 添加量和 SM 添加量为试验因素，以菌种存活率为考察指标进行三因素三水平正交试验优化最佳的复配保护剂配比。试验因素水平见表 4，试验设计及结果见表 5。

由表 5 可知，试验 7 的冷冻干燥初始存活率显著高于其他组，试验 3 和试验 5 的冷冻干燥初始存活率最低，其他组的冷冻干燥存活率为 65%~85%。试验 1、试验 4 和试验 7 的冷冻干燥存活率相对较高，试验 3、试验 6 和试验 9 的冷冻干燥存活率相对较低，其主要原因可能是 MD 添加量较低时，SM 和 TRE 能发挥较好的保护作用，MD 添加量较高时，同等含量的 SM 和 TRE 的保护作用明显减弱。这可能是 MD 对蛋白结合位点的抢夺能力强于其他物质，且 MD 自身的保护能力较弱，导致高含量时整体的保护效果减弱<sup>[25]</sup>。SM 的保护效果随其添加量的增加而增强，但容易受到其他物质的干扰，说明其结合能

力相对较弱，但保护效果很好。综上，冷冻干燥保护剂的最佳配方为 SM 35%、MD 7.5% 和 TRE 25%。

试验 8 的喷雾干燥存活率最高，其次为试验 7 和试验 9 的，试验 3 的最低。试验 3 的保护效果最差可能是因为 MD 添加量太高在喷干过程中黏性过强，因而在有面粉等碳水化合物环境中无法包裹菌体形成较好的微胶囊<sup>[25]</sup>。试验 7、试验 8 和试验 9 的喷雾干燥存活率相对较高，可能是因为 SM 添加量较高，在有面粉等基础物质的环境中需要一定含量才能完成蛋白质的包裹。相对更高的试验 8 中糖类保护剂更少，可能是糖类保护剂的黏性太强会影响 SM 的包裹。最佳喷雾干燥复配保护剂配方为 SM 35%、MD 10% 和 TRE 15%。

2.6 贮藏稳定性

由图 4(a)可知，冷冻干燥组在贮藏第 1 周存活率快速下降，之后进入稳定期，存活率下降缓慢，贮藏 2 个月时仍有约 75% 的存活率，与 Stefanello 等<sup>[26]</sup>的研究结果类似。冻干保护剂与菌体表面通过羟基等连接形成膜，既可以降低冰晶对菌体的伤害，又可以包裹菌体在贮藏

表 5 试验设计及结果<sup>†</sup>

Table 5 The design and results of experimental

| 试验号 | A | B | C | 冷冻干燥<br>存活率/%         | 喷雾干燥<br>存活率/%         |
|-----|---|---|---|-----------------------|-----------------------|
| 1   | 1 | 1 | 1 | 69.4±0.6 <sup>c</sup> | 64.5±1.3 <sup>d</sup> |
| 2   | 1 | 2 | 2 | 80.3±1.0 <sup>b</sup> | 70.5±1.3 <sup>c</sup> |
| 3   | 1 | 3 | 3 | 46.3±1.4 <sup>d</sup> | 54.7±2.9 <sup>e</sup> |
| 4   | 2 | 1 | 2 | 85.1±1.7 <sup>b</sup> | 65.6±2.1 <sup>d</sup> |
| 5   | 2 | 2 | 3 | 40.3±0.5 <sup>d</sup> | 64.0±2.6 <sup>d</sup> |
| 6   | 2 | 3 | 1 | 70.2±1.4 <sup>c</sup> | 73.9±1.2 <sup>c</sup> |
| 7   | 3 | 1 | 3 | 94.5±0.8 <sup>a</sup> | 84.9±1.9 <sup>b</sup> |
| 8   | 3 | 2 | 1 | 78.0±1.3 <sup>b</sup> | 90.3±1.8 <sup>a</sup> |
| 9   | 3 | 3 | 2 | 63.5±2.9 <sup>c</sup> | 82.1±2.5 <sup>b</sup> |

<sup>†</sup> 字母不同表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

| 表 4 试验因素水平表                     |          |          |           |
|---------------------------------|----------|----------|-----------|
| Table 4 Test factor level table |          |          |           |
| 水平                              | A SM 添加量 | B MD 添加量 | C TRE 添加量 |
| 1                               | 25       | 7.5      | 15        |
| 2                               | 30       | 10.0     | 20        |
| 3                               | 35       | 12.5     | 25        |

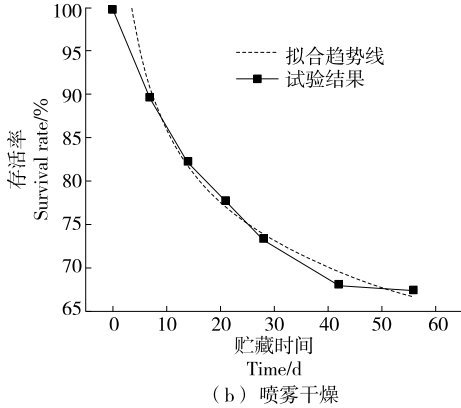
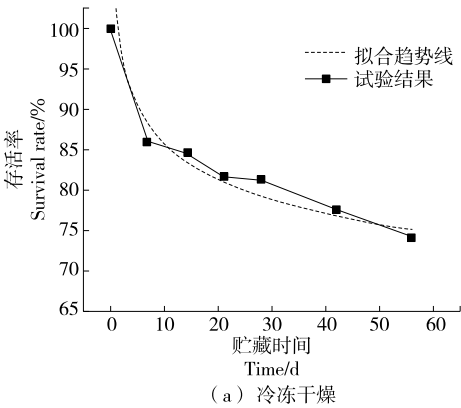


图 4 最优存活率复配保护剂的贮藏效果

Figure 4 Comparison of storage quality of protective compound agents with optimal survival rate

期间维持菌体的低新陈代谢状态。由图 4(b)可知,喷雾干燥组在贮藏 6 周内一直保持较快的失活速率,其主要原因可能是喷雾干燥的热处理不可避免地会导致菌体失活,即使在低新陈代谢下,蛋白受损、变性等因素会影响菌体的存活率<sup>[27]</sup>。贮藏 6 周后菌体的存活率较为稳定,且贮藏 2 个月内活性仍保持>65%,能够满足作为发酵剂使用的活性要求。总体而言,冷冻干燥天然酵母优势菌液具有相对更好的存活率和贮藏品质。

### 3 结论

通过对比多种水果天然酵母的应用品质,得到较好的一种,并将其制备成具有较好贮藏活性的天然酵母发酵剂。结果表明,天然酵母的最终优势菌群在发酵第 3 天获得竞争优势,在后续快速生长繁殖,并在发酵 5 d 后进入稳定期。其中,葡萄天然酵母具有最佳的应用品质,其主要优势酵母菌株为酿酒酵母 Y117、TU11 XZFM15F1,乳酸菌菌株为融合魏斯氏乳杆菌 3052、植物乳杆菌 2194、植物乳杆菌 2329、植物乳杆菌 N-1 和植物乳杆菌 2877。

通过研究干燥方式和复配保护剂对天然发酵剂的存活率和贮藏活性影响,最佳的复配保护剂配方为:① 冷冻干燥优势菌种菌液(FDS),脱脂乳粉 35%、麦芽糊精 7.5%和海藻糖 25%;② 天然酵母整体喷雾干燥(SDD),脱脂乳粉 35%、麦芽糊精 10%和海藻糖 15%。两种天然酵母发酵剂在贮藏 2 个月时仍有较高的活性,但喷雾干燥的发酵剂贮藏活性相对冷冻干燥下降得更快。研究对标准化天然酵母发酵剂进行了系列试验,开发了稳定化高活性的天然酵母发酵剂,但其中关于发酵剂应用效果评价与其贮藏活性延长还需要进一步研究。其应用效果评价应从组织质构、风味属性和保质期等多方面进行评估;其贮藏活性延长可从保护新工艺开发等方面入手。

### 参考文献

- [1] VANDEVIVERE S, JAACKS L M, MONTEIRO C A, et al. Global trends inultraprocessed food and drink product sales and their association with adult body mass index trajectories[J]. *Obesity Reviews*, 2019, 2(20): 10-19.
- [2] D'ALESSANDRO A, LAMPIGNANO L, DE P G. Mediterranean diet pyramid: A proposal for Italian people. A systematic review of prospective studies to derive serving sizes[J]. *Nutrients*, 2019, 11(6): 1 296.
- [3] GOBBETTI M, CORSETTI A, ROSSI J. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1994, 10(3): 275-279.
- [4] BRANDT M J. Industrial production of sourdoughs for the baking branch-an overview[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 302: 3-7.
- [5] SUBASI A S, ERCAN R. The effects of wheat variety, sourdough treatment and sourdough level on nutritional characteristics of whole wheat bread[J]. *Journal of Cereal Science*, 2023, 110: 103637.
- [6] PEJCZ E, LACHOWICZ-WISNIEWSKA S, NOWICKA P, et al. Effect of inoculated lactic acid fermentation on the fermentable saccharides and polyols, polyphenols and antioxidant activity changes in wheat sourdough[J]. *Molecules*, 2021, 26(14): 4 193.
- [7] FILANNINO P, DI CAGNO R, GOBBETTI M. Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: Get out of the labyrinth[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 49: 64-72.
- [8] 邹奇波, 黄卫宁, 程新, 等. 混菌发酵酸面团对全麦面包风味与烘焙特性的影响[J]. *食品与机械*, 2020, 36(4): 32-39.
- [9] ZOU Q B, HUANG W N, CHENG X, et al. Effects on flavor and baking characteristics of whole wheat bread by fermented sourdough with the mixed culture[J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(4): 32-39.
- [9] 曹伟超, 周黎源, 罗昆, 等. 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[J]. *食品与机械*, 2021, 37(2): 186-193.
- [10] CAO W C, ZHOU L Y, LUO K, et al. Studies on screening of high-yield phytase-producing lactic acid bacteria and its low-phytate nutritional breads through black bean sourdough fermentation[J]. *Food & Machinery*, 2021, 37(2): 186-193.
- [10] PEREZ-ALVARADO O, ZEPEDA-HERNANDEZ A, GARCIA-AMEZQUITA L E, et al. Role of lactic acid bacteria and yeasts in sourdough fermentation during breadmaking: Evaluation of postbiotic-like components and health benefits [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 969460.
- [11] GOBBETTI M. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1998, 9(7): 267-274.
- [12] DE VUYST L, VAN KERREBROECK S, LEROY F. Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation[J]. In *Advances in Applied Microbiology*, 2017, 100: 49-160.
- [13] GALANAKIS C M. Innovations in traditional foods[M]. Duxford, United Kingdom: Woodhead Publishing, 2019: 14-40.
- [14] 虞桢芳. 水果天然酵母发酵特性及其对面包烘焙品质的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2018: 5-40.
- [14] YU Y F. Studies on leavening properties of fruit sourdoughs and their effects on baking quality of bread [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018: 5-40.
- [15] YU Y F, WANG L, QIAN H F, et al. Contribution of spontaneously-fermented sourdoughs with pear and navel orange for the bread-making[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 89: 336-343.
- [16] FANG L P, WANG W J, DOU Z X, et al. Effects of mixed fermentation of different lactic acid bacteria and yeast on phytic acid degradation and flavor compounds in sourdough[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2023, 174: 114438.

(下转第 212 页)

- fermentation process of mulberry juice by lactic acid bacteria and changes in functional components and antioxidant activity during fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 90-100.
- [24] 刘畅, 左常洲, 彭菁, 等. 响应面优化植物乳杆菌发酵番茄汁工艺及其品质评估[J]. 食品工业科技, 2022, 43(10): 246-253. LIU C, ZUO C Z, PENG J, et al. Response surface optimization of the fermentation process of tomato juice by *Lactobacillus plantarum* and its quality evaluation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(10): 246-253.
- [25] 颜飞翔, 朱丹, 牛广财, 等. 秋香梨果醋醋酸发酵工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(4): 184-188, 225. YAN F X, ZHU D, NIU G C, et al. Optimization of acetic acid fermentation process and antioxidant activity of Qiuxiang pear vinegar[J]. Food & Machinery, 2021, 37(4): 184-188, 225.
- [26] 王玉玮, 袁宏, 岳田利. 雪莲菌发酵豇豆工艺优化及其挥发性风味成分分析[J]. 食品与机械, 2021, 37(5): 176-182, 232. WANG Y W, YUAN Y H, YUAN T L. Process optimization of fermented cowpea by kefir grains and analysis of volatile flavor components[J]. Food & Machinery, 2021, 37(5): 176-182, 232.
- [27] 白桂英, 叶淑红, 王琛彬, 等. 黑枸杞乳酸菌饮料发酵工艺优化及功能性成分研究[J]. 中国酿造, 2022, 41(4): 157-162. BAI G Y, YE S H, WANG C C, et al. Fermentation process optimization and functional ingredients of black wolfberry lactic acid bacteria beverage[J]. China Brewing, 2022, 41(4): 157-162.
- [28] 朱立斌, 朱丹, 牛广财, 等. 毛酸浆乳酸发酵工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品科技, 2020, 45(7): 50-56. ZHU L B, ZHU D, NIU G C, et al. Lactic acid fermentation condition optimization and antioxidant activity of *Physalis Pubescens* L.[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(7): 50-56.
- [29] 何婉莹, 黄展锐, 赵良忠, 等. 生浆法制作豆腐的工艺优化[J]. 现代食品科技, 2021, 37(10): 188-196. HE W Y, HUANG Z R, ZHAO L Z, et al. Optimization of Tofu production from filtered raw soybean milk [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 188-196.
- [30] 李志华. 产  $\beta$ -葡萄糖苷酶乳酸菌菌株的特性研究[D]. 延边: 延边大学, 2014: 5-7. LI Z H. Study on characteristics of lactic acid bacteria strains producing  $\beta$ -glucosidase[D]. Yanbian: Yanbian University, 2014: 5-7.
- [31] SHAHIDI F, ALASALVAR, LIYANA PATHIRANA C M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2007, 55(4): 1 212-1 220.
- [32] SMID E, KLEEREBEZEM M. Production of aroma compounds in lactic fermentations [J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2014, 5(1): 313-326.
- [33] ARDO Y. Flavour formation by amino acid catabolism [J]. Biotechnology Advances, 2006, 24(2): 238-242.
- 
- (上接第 203 页)
- [17] 刘若诗. 乳酸菌面团发酵剂的制备及其发酵烘焙特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010: 5-35. LIU R S. Studies on preparation of lactic acid sourdough starters and their fermentation and baking properties[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010: 5-35.
- [18] BUKSA K, KOWALCZYK M, BORECZEK J. Extraction, purification and characterisation of exopolysaccharides produced by newly isolated lactic acid bacteria strains and the examination of their influence on resistant starch formation[J]. Food Chemistry, 2021, 362: 130221.
- [19] GALLI V, MAZZOLI L, LUTI S, et al. Effect of selected strains of lactobacilli on the antioxidant and anti-inflammatory properties of sourdough[J]. Int J Food Microbiol, 2018, 286: 55-65.
- [20] BESTED A C, LOGAN A C, SELHUB E M. Intestinal microbiota, probiotics and mental health: From Metchnikoff to modern advances: Part II-contemporary contextual research [J]. Gut Pathogens, 2013, 5: 3.
- [21] MIRANDA R F, DE PAULA M M, DA COSTA G M, et al. Orange juice added with *L*-casei: Is there an impact of the probiotic addition methodology on the quality parameters? [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 106: 186-193.
- [22] HUANG S, VIGNOLLES M L, CHEN X D, et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 63: 1-17.
- [23] ASSADPOUR E, JAFARI S M. Advances in spray-drying encapsulation of food bioactive ingredients: From microcapsules tonanocapsules [J]. In Annual Review of Food Science and Technology, 2019, 10: 103-131.
- [24] 姜甜, 陆文伟, 崔树茂, 等. 不同微囊化方法包埋双歧杆菌菌粉特性分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 128-134. JIANG T, LU W W, CUI M S, et al. Characteristic analysis of different micro encapsulated *Bifidobacterium*[J]. Institute of Food Biotechnology, 2021, 42(11): 128-134.
- [25] ZHANG Z, PENG S, SUN X Q, et al. A novel insight to screen the optimal spray-drying protectants and parameters for manufacturing lactic acid bacteria preparations[J]. Drying Technology, 2020, 38(14): 1 843-1 856.
- [26] STEFANELLO R F, MACHADO A A R, CAVALHEIRO C P, et al. Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried wheat sourdough production [J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 89: 510-517.
- [27] CAGLAR N, ERMIS E, DURAK M Z. Spray-dried and freeze-dried sourdough powders: Properties and evaluation of their use in breadmaking[J]. Journal of Food Engineering, 2021, 292: 110355.