

文章编号: 1000-1573(2012)05-0083-05

酸面团酵母菌 Sy22 的分离与发酵性能评价

杨雪娟¹, 潘向辉¹, 李姗姗¹, 裴家伟¹, 张柏林¹, Moneta Jadwiga²

(1. 河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定 071000;

2. 罗兹技术大学 发酵工程与工业微生物系, 波兰 罗兹 90-924)

摘要: 为了获得性能优良的面团发酵菌株, 本试验来自内蒙古的发酵酸面团中分离获得 5 株酵母菌株, 分别对其发酵性能进行测定, 最终选取性能优良菌株 Sy22 进一步研究。基于形态学、生理生化试验以及 26SrDNA D1/D2 区序列分析综合测试结果, 菌株 Sy22 被鉴定为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。在 30℃ 下发酵 12 h, 分别对单独添加该菌株面团的发酵性能以及该菌株与类食品乳杆菌 412 联合发酵面团的发酵性能、活菌数进行研究, 结果显示: 单一酵母菌株发酵后, 面团 pH 由 6.07 降至 5.36, 滴定酸度由 3.6°T 增加到 5.02°T, 发酵力为 0~1.32%; 联合菌株发酵后, 酸面团 pH 由 5.58 下降至 3.85, 滴定酸度由 5.24°T 增加到 14.02°T, 发酵力为 0~1.79%, 酸面团中的酵母菌活菌数为 8.2×10^8 CFU/g, 乳杆菌 412 活菌数为 9.6×10^8 CFU/g。由此得出, 菌株 Sy22 可单独作为面团发酵菌株使用, 能很好的参与面团的发酵; 与类食品乳杆菌 412 联合后发酵能力好, 并表现出良好共生性。

关键词: 酵母菌 Sy22; 类食品乳杆菌 412; 酸面团; 发酵

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

Fermentation performance of yeast Sy22 isolated from sourdough

YANG Xue-juan¹, PAN Xiang-hui¹, LI Shan-shan¹, PEI Jia-wei¹

ZHANG Bo-lin¹, Moneta Jadwiga²

(1. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. Institute of Fermentation & Microbiology, Politechnika Lodzka, Lodz 90-924, Poland)

Abstract: In order to get good dough fermentation strains, five yeast strains isolated from fermented sourdough from Inner Mongolia of China were screened according to their growing performance. Among the 5 strains, strain Sy22 showed the best growth during dough fermentation process. Strain Sy22 was identified as *Saccharomyces cerevisiae* according to its morphological, physiological and biochemical properties as well as 26SrDNA of the D1/D2 sequence data. Fermented at 30°C for 12 h, respectively, the dough fermentation performance of strain Sy22 as well as the combination of strain Sy22 and *Lactobacillus paralimentarius* 412 dough fermentation performance, the number of viable cells were studied. The results showed that, after single yeast strain fermentation, dough pH decreased from 6.07 to 5.36, its titratable

收稿日期: 2012-02-24

基金项目: 益生菌定向筛选与功能开发关键技术(2008AA10Z335); 乳酸菌特色资源库及乳酸菌发酵剂和代谢工程技术研究(2011AA100902)。

作者简介: 杨雪娟(1987-), 女, 河北省邯郸人, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。

通讯作者: 张柏林(1962-), 男, 陕西省咸阳人, 博士生导师, 研究方向为益生菌资源开发与利用。

acidity was increased from 3.6°T to 5.02°T and a fermenting power from 0 to 1.32% (calculated as release volume of CO₂). Combined strains fermentation sourdough had a decreased pH from 5.58 to 3.85, and its titratable acidity was increased from 5.24°T to 14.02°T, together with a fermenting power from 0 to 1.79%, The number of viable cells was 8.2×10^8 CFU/g for strain Sy22, and 9.6×10^9 CFU/g for *L. paralimentarius* 412. The results also showed that the yeast strain Sy22 should be very promising for the use as sourdough starter in steamed-bread making, and could be involved in the fermentation of the sourdough. Its combination with *L. paralimentarius* 412 was found to have good fermentation capacity, and showing a good symbiotic between them.

Key words: yeast strain Sy22; *Lactobacillus paralimentarius* 412; sourdough; fermentation

酸面团是一种传统的馒头面团发酵剂,是由谷物、水和具有活性的微生物(比如酵母菌和乳酸菌)经自然发酵制得的一种面团^[1-4]。Kim 等人指出酸面团对面包制作工艺、营养、感官品质、延长贮藏寿命等方面起积极作用^[5]。其中酵母是馒头生产过程中最重要的微生物发酵剂和生物疏松剂,在馒头生产中起着关键作用。在发酵过程中,酵母能产生 CO₂、乙醇、醛酮和乳酸等物质,其中产生的乙醇、醛酮和乳酸等物质形成良好的风味^[6],生成的 CO₂ 气体使成品充满气孔,形成海绵状,具有良好的外观品质。

20 世纪 80 年代中期,即发活性干酵母从国外引入我国市场,人们开始用酵母发酵蒸制馒头,使成品馒头微甜、醇香,口感好,组织结构均匀且细腻^[7],酵母逐步取代了民间发酵剂(酵子,老酵头)。酵母是纯种发酵,酶系单一^[8],大部分品牌制作的产品风味较平淡,香味不浓^[9]。随着人们对食品营养等各方面的重视,单一酵母发酵已无法满足人们的要求,可见,以传统的带有典型地域特色的酸面团为基础,筛选发酵面团性能优良、风味独特的酵母菌株,既满足了家庭制作需要,同时也对促进我国传统食品——馒头的发展具有积极意义。

近年来,国内外相继对酸面团中的乳杆菌进行了研究, Sook Jong Rhee 指出乳杆菌在面包发酵过程中能有效防止有害微生物的污染,利于延长产品保藏期^[10]。Monika Kocková 等人从启动面包发酵的酸面团中分离出 20 种乳杆菌,并对其进行了发酵性能的研究^[11]。李晨等对类食品乳杆菌 412 单独或者与安琪酵母联合发酵的条件、生长特性、发酵产酸能力进行了探索^[12],研究表明,类食品乳杆菌可以单独参与酸面团的发酵,对面团酸化起积极作用,适宜发酵温度是 28℃。但对酸面团中的酵母菌株的分离、发酵性能的整体研究报道则较少。

本研究从传统酸面团中分离出酵母菌株,并进一步对分离菌株在面团中的发酵性能进行了进一步

的研究,旨在为提高馒头品质提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与培养基

1.1.1 材料 菌株:采集自内蒙古自然发酵酸面团;面粉:“黑马”特级一等面粉由石家庄辛集黑马面粉厂提供。

1.1.2 培养基 YPD 液、固体培养基用于酵母菌株的筛选分离、活化、生长及活菌计数;产子囊孢子培养基、糖发酵基础培养基等酵母鉴定用培养基用于酵母菌株的鉴定;MRS 液、固体培养基用于乳杆菌的活化、生长及活菌计数。

1.2 方法

1.2.1 酵母菌的分离及培养条件 200 mL 液体 YPD 培养基中加入 100 g 酸面团样品,无菌条件下 30℃ 培养 24 h 后,摇匀,用无菌生理盐水梯度稀释,选取 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 3 个稀释度,准确吸取 0.1 mL 稀释液均匀涂布于 YPD 固体培养基上,30℃ 恒温培养箱中倒置培养 48 h,挑取典型单菌落于 YPD 液体培养基中,30℃ 下培养 24 h 后划线分离 2~3 次,将纯培养物转入 YPD 固体斜面培养基上培养 12 h 后,置于 4℃ 低温冰箱保藏。

1.2.2 酵母菌株的鉴定 ①细胞形态特征及生理生化特征,酵母鉴定方法参考文献^[13]。②分子生物学鉴定,由大连宝生物生化公司鉴定。

1.2.3 酸面团的制作 培养 12 h 的酵母培养液,离心(4℃, 6 000 r/min, 10 min)收集菌体,用无菌生理盐水调节酵母活菌数至 10^8 CFU/mL;将培养 18 h 的类食品乳杆菌 412 培养液同样条件调节活菌数至 10^9 CFU/mL^[12],所得菌悬液置于三角瓶中备用。

无菌条件下,将 100 g 面粉,60 mL 无菌蒸馏水,20 mL 上述菌悬液三者混匀后调制面团,揉制后置于恒温培养箱中,分别发酵 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 后直接取样测定指标。

1.2.4 菌株面团发酵能力测定 ① 发酵面团 pH 及滴定酸度测定。将分离所得的各株酵母菌活化好后,按照 1.2.3 的方法制作面团,置于 30℃ 恒温培养箱中发酵。发酵一定时间后,对其 pH 和滴定酸度(TTA)进行测定^[12]。吉尔涅尔度(°T)表示面团的滴定酸度,每消耗 1 mL NaOH 即为 1°T。

② 菌株面团发酵力测定。本试验采用量筒法测定酵母面团发酵力^[14],即 100 g 面团放入 500 mL 量筒中,发酵规定时间后,读取量筒中面团体积(mL)。发酵力以指定时间内(面团体积-面团初始体积)/面团初始体积值的比值(%)来表示。

1.2.5 酵母菌与乳杆菌联合发酵面团中酵母菌与乳杆菌活菌数测定 取 10 g 发酵面团,加入 90 mL 灭菌生理盐水,搅拌 30 min 后,进行梯度稀释,移取 1 mL 稀释液置于灭菌培养皿中,加入 YPD 固体培养基(额外添加 0.1 g/L Nisin,以抑制乳杆菌的生长)或 MRS 固体培养基(额外添加 0.1 mg/L 放线菌酮,以抑制酵母菌的生长),置于 30℃ 恒温培养箱中培养 72 h 记录菌落数^[15]。菌株活菌数以菌落形成单位 CFU/g 计数。

以上测定方法中,样品测定均取 3 个重复,结果以 3 次测定的平均值表示。

2 结果与分析

2.1 酵母菌落形态特征及菌株鉴定

分离所获得 5 株酵母菌株菌落呈乳白色,表面光滑,边缘整齐(见图 1A);菌落细胞成卵形、圆形或椭圆形,单端芽殖(见图 1B);不能形成掷孢子;可形成子囊孢子,不形成假菌丝;37℃ 生长,熊果苷反应呈阳性;无维生素培养基上生长;50% 或 60% 葡萄糖条件下生长;可同化 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,但不同化 KNO_3 ;结合糖发酵试验、碳源同化试验与氮源同化试验结果,符合酿酒酵母特征。

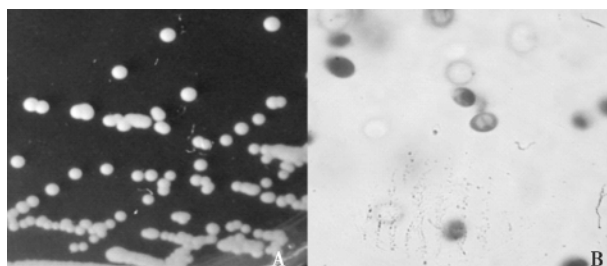


图 1 酵母 Sy22 形态图(A 为菌落形态;B 为细胞形态)

Fig. 1 Morphology of yeast Sy22 (A colony morphology; B cell morphology)

2.2 酵母菌在面团中发酵活性评价

图 2 和图 3 分别显示的是随发酵时间的延长 5 株酵母菌参与发酵面团的 pH 值与滴定酸度的变化

情况。观察发现,5 株酵母菌株均能促进面团的酸化,其中添加 Sy22 的面团在发酵中 pH 下降速度和滴定酸度增加速度略快。

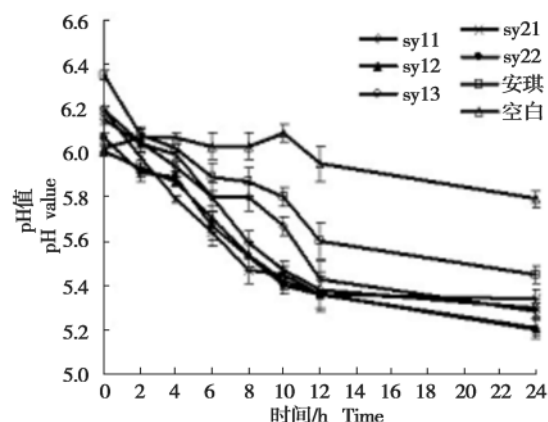


图 2 面团 pH 值的变化

Fig. 2 pH changed of dough

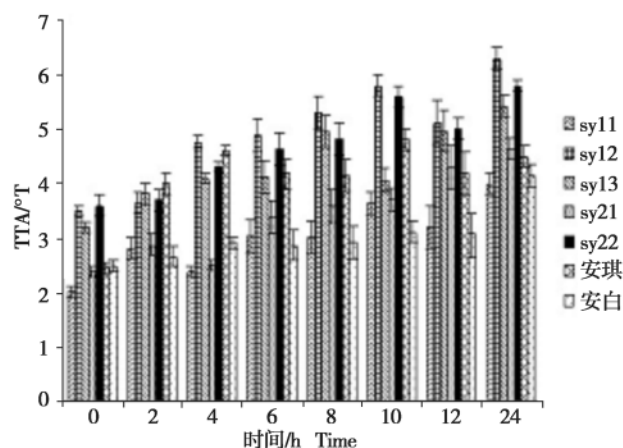


图 3 面团滴定酸度(TTA)的变化

Fig. 3 TTA changed of dough

图 4 显示的是随发酵的进行酵母菌株对面团发酵力的影响。由图 4 看出,Sy22 在后期发酵上有明显优势。

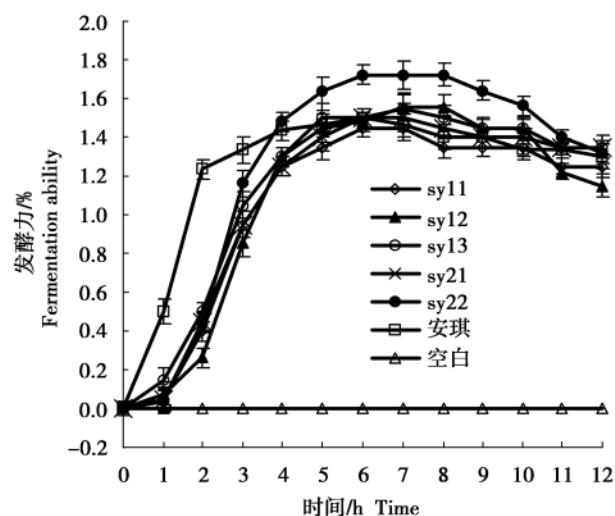


图 4 面团发酵力的变化

Fig. 4 Change of dough fermentation ability

图 5 显示的是菌株 Sy22 和 Sy12 的 26S rDNA D1/D2 区基因的电泳图。将 Sy22 的序列与标准菌株 *Saccharomyces cerevisiae* D53 (Gene bank accession Number: HM627121) 进行比对, 同源性为 100%。综合形态学、生理生化特性结果, Sy22 被鉴定为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

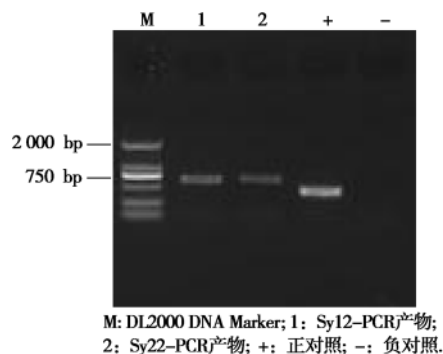


图 5 Sy12 与 Sy22 的 26S rDNA D1/D2 区基因

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of PCR product by using Sy21 and Sy22 specified primers

综合上述分析, 本试验分离所得酵母菌株均能启动面团的酸化, 且都可以发酵面团, 但其中 Sy22 菌株对面团的发酵性能整体要优于其他菌株, 故可作为启动面团发酵的商业化菌株使用。因此, 本试验将对 Sy22 作进一步的研究。

2.3 酵母菌 Sy22 与类食品乳杆菌 412 联合发酵的特性

图 6 和图 7 分别表示酵母菌 Sy22 与类食品乳杆菌 412 联合发酵面团 pH 和滴定酸度的变化情况, 添加 Sy22 与类食品乳杆菌 412 的面团表示为 Sy22。观察得出, 酵母菌 Sy22 与类食品乳杆菌 412 联合发酵后, 酸化速度加快, 产酸能力明显增强。

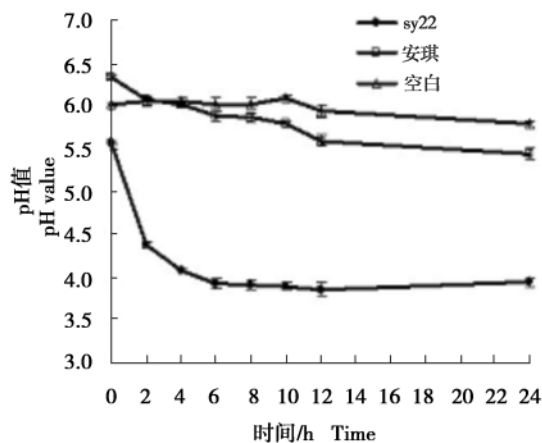


图 6 pH 值的变化

Fig. 6 pH changed of dough

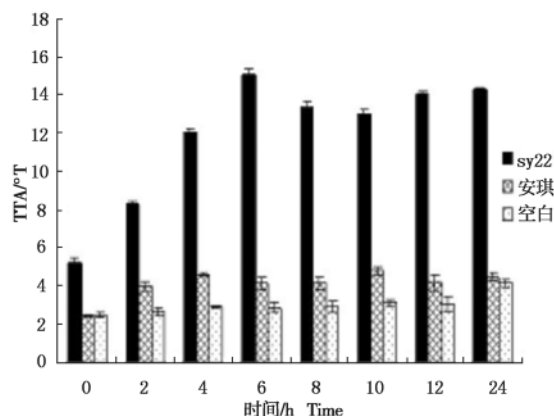


图 7 滴定酸度 (TTA) 的变化

Fig. 7 TTA changed of dough

图 8 表示的是发酵时间对酸面团发酵力的影响。由图得出, 酵母菌 Sy22 与类食品乳杆菌 412 联合菌株在发酵后期显示出了较强的发酵能力, 最高增长至 1.85%。图 9 表示的是联合发酵对酵母菌与乳杆菌活菌数的影响情况。由图可见, 发酵 12h 后两者活菌数均有所增长, 由此可见酵母菌 Sy22 与类食品乳杆菌 412 联合培养后可以良好的共生。

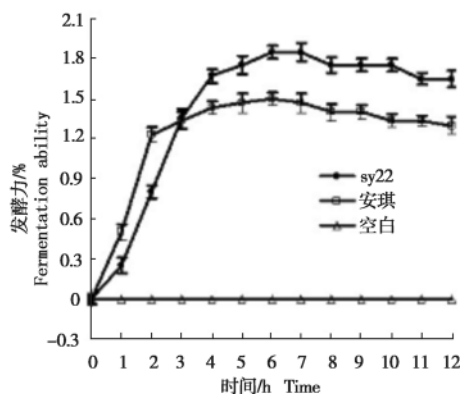


图 8 发酵力的变化

Fig. 8 Fermentation ability changed of dough

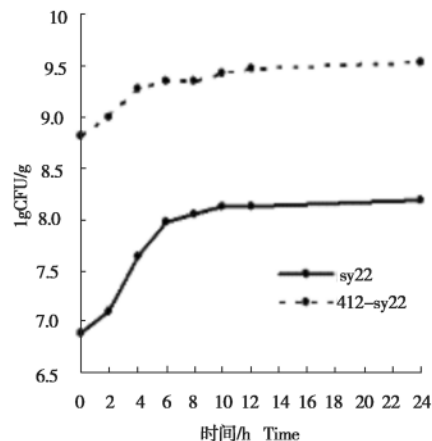


图 9 酵母菌与类食品乳杆菌 412 活菌数的变化

Fig. 9 Biomass of yeast and *L. paralimentarius* 412

3 讨论

馒头作为中国大部分,尤其是北方的传统主食,深受人们的喜爱,其品质主要取决于酸面团的发酵质量,现今多以加入市售酵母发酵,菌株品种单一,而传统酸面团中微生物种类丰富,从而产生的香气成分、乳酸、氨基酸等营养物质较多,有利于改善馒头的口感及整体品质,满足现代人们的生活及营养需要。对于传统酸面团的研究在日益增多,但对于酸面团中酵母菌的分离及发酵性能等一系列综合研究的很少,故本试验从内蒙古传统酸面团中分离酵母菌株出发,对试验菌株的发酵性能等方面做出了评价,为今后更好地发展传统酸面团的优势提供科学依据。结果显示:

1)从 pH、滴定酸度、发酵力角度来看,酿酒酵母 Sy22 能够启动面团发酵,与商业化安琪酵母发酵能力相近,可以作为馒头面团发酵的酵母菌株使用。

2)酵母菌 Sy22 接种量为 10^7 CFU/g,类食品乳杆菌接种量为 10^8 CFU/g, 30 °C 下联合发酵 12 h,酸面团 pH 下降加快、酸度增加、发酵性能较好,酵母及乳杆菌活菌数均有所增加,酵母菌 Sy22 与类食品乳杆菌 412 联合后能够较好地参与酸面团发酵,并显示出良好共生性,有利改善馒头最终产品的品质。

参考文献:

- [1] De Vuyst L, Ganzle M. Special Issue Second International Symposium on Sourdough: From Fundamentals to Applications [J]. Trends in Food Science and Technology, 2005, 16(1-3): 1-12.
- [2] De Vuyst L, Neysens P. Biodiversity of sourdough lactic acid bacteria [J]. Trends in Food Science and Technology, 2005(16): 43-56.
- [3] De Vuyst L, Vancanneyt M. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria [J]. Food Microbiology, 2007(24): 120-127.
- [4] Corsetti A, Settanni L. *Lactobacilli* in sourdough fermentation [J]. Food Research International, 2007, 40: 539-558.
- [5] Kim Y, Haung W, Zhu H. Rayas-Duarte [J]. Food Chemistry, 2009, 114: 685-692.
- [6] Salim-ur-Rehman, Haq Nawaz, Sarfraz Hussain, et al. Effect of Sourdough Bacteria on the Quality and Shelf Life of Bread [J]. Pakistan Journal of Nutrition, 2007, 6(6): 562-565.
- [7] 杨敬雨, 刘长虹. 中国传统酵子的工业化[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(2): 164-166.
- [8] 张守文. 面包酵母的功能特性与科学使用方法[J]. 食品科技, 2002(4): 31-34.
- [9] 苏东海. 馒头酵母的分离与筛选[J]. 农产品加工, 2008(7): 82-84.
- [10] Sook Jong Rhee, Jang-Eun Lee, Cherl-Ho Lee. Importance of lactic acid bacteria in Asian[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 1-13.
- [11] Monika Kocková, Petra Gereková, Zuzana Petrulá, et al. Evaluation of fermentation properties of lactic acid bacteria isolated from sourdough[J]. Acta Chimica Slovaca, 2011, 4(2): 78-87.
- [12] 李晨, 王松, 展海宁, 等. 类食品乳杆菌 412 对酸面团发酵的影响[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 99-104.
- [13] Jacomina Lodder, N J W Kreger-Van Rij. The yeast: a taxonomic study [M]. Wisconsin: North-Holland Pub. Co., 1967: 178-203.
- [14] 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.
- [15] 潘向辉. 酸面团中酵母菌筛选及发酵特性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2011.

(编辑: 李 川)