

# 混合发酵生产馒头菌种的筛选

胡丽花<sup>1</sup>, 苏东民<sup>1</sup>, 苏东海<sup>2,\*</sup>, 辛秀兰<sup>2</sup>

(1. 河南工业大学, 河南郑州 450052;

2. 北京电子科技职业学院, 北京 100029)

**摘要:**传统馒头制作属于自然杂菌混合发酵,传统发酵使其具有独特风味。本研究主要是从传统的馒头发酵剂中筛选性能优良,适于馒头混合发酵的酵母菌和乳酸菌。通过对采集到的14个样品中的微生物进行分离、筛选、复筛,筛选性能较好的酵母菌和乳酸菌各15株,酵母菌中尤以Sq4-3、Sq7-2、Sq9-2、Sq9-4和JZ1-4的发酵性能最好。最后挑选酵母菌Sq4-3与5株代表性乳酸菌进行馒头混合发酵实验,结果表明不同乳酸菌对馒头品质的影响不同,其中添加Sq2.2的酸面团发酵的馒头总体感官评分最高,为7.56分。

**关键词:**乳酸菌,酵母菌,筛选,馒头

## Screening strains for co-fermenting Mantou

HU Li-hua<sup>1</sup>, SU Dong-min<sup>1</sup>, SU Dong-hai<sup>2,\*</sup>, XIN Xiu-lan<sup>2</sup>

(1. College of Grain and Food, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China;

2. Biology Department, Beijing Vocational College of Electronic Science, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Traditional Mantou was fermented by natural mixed starter cultures with unique flavor. In this study, the purpose is to screen lactic acid bacteria and yeasts from traditional starter cultures of Mantou, which have fine performance and are appropriate to co-ferment Mantou. The microorganisms of 15 LABs and 15 yeasts were obtained from 14 samples through separating, screening and re-screening, especially the best strains were Sq4-3, Sq7-2, Sq9-2, Sq9-4 and JZ1-4 among yeasts. Eventually Sq4-3 and 5 representative strains among lactic acid bacteria were chosen to co-ferment Mantou. The results showed that different LAB had different effect on quality of Mantou. Mantou fermented by sourdough adding Sq2.2 have the highest score for the overall sense 7.56 points.

**Key words:** lactic acid bacteria; yeast; screen; Mantou

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)11-203-04

自从面包酵母被发明和使用以来,因其方便性而逐渐取代了传统面食发酵剂。传统面食发酵剂的使用虽然存在缺陷,但其混合菌种发酵使成品具有独特风味或特殊功能<sup>[1]</sup>。近年来国外对传统发酵剂酸面团的研究表明:酸面团的微生物为酵母菌和乳酸菌,应用酸面团能够改善面包的风味和质构,增加营养价值,延长货架期等<sup>[2]</sup>。我国传统主食发酵剂资源丰富,很有必要对我国传统主食发酵剂进行系统研究。本文的目的是根据菌种的形态特征、生化特性从采集到的传统馒头发酵剂中分离、筛选出性能优良且适于混合发酵馒头的酵母菌和乳酸菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

样品 河南省商丘和焦作的14个酵子样品;小

麦粉 北京大磨坊面粉有限公司;培养基 综合马铃薯培养基、麦芽汁培养基、MRS培养基。

LDZX-40BI型立式自动电热压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; Model 9960A Ultrasonic cleaners CBL photoelectron TECHNOLOGY;超净工作台 北京昌平长城空气净化工程公司;HPS-250生化培养箱 哈尔滨市东明医疗仪器厂;WJ-160A-II二氧化碳细胞培养箱 上海新苗医疗器械制造有限公司;3K15高速离心机 Sigma。

### 1.2 实验方法

1.2.1 样品的采集 从河南省商丘市采集11个样品标号为Sq1~11;来自河南省焦作孟州得3个样品编号为JZ1~3。将样品装入无菌瓶中,0~4℃保存。

1.2.2 微生物计数 各取样品1g分别加入到99mL无菌水中,超声波振荡20min,用无菌移液管准确吸取上清液1mL,加无菌水9mL进行稀释,10倍等梯度稀释法至 $10^{-7}$ ,分别取 $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ , $10^{-7}$ 浓度梯度稀释液各0.1mL,分别涂布于综合马铃薯培养基、麦芽汁琼脂和MRS培养基平板,每个梯度做2个平行,于28、28、30℃倒置培养72h,进行计数<sup>[3]</sup>。

#### 1.2.3 菌种分离和筛选

收稿日期:2009-08-28 \*通讯联系人

作者简介:胡丽花(1983-),女,硕士研究生,研究方向:传统食品的工业化。

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(5093026);北京市教委科技计划面上项目(KM200900002003)。

1.2.3.1 酵母菌的分离和筛选 酵母菌的分离与筛选用含 0.5g/L 氯霉素的麦芽汁琼脂培养基,从菌落特征明显的单菌落上挑起少许移植于斜面培养基,于 28℃ 恒温培养 72h,进行第 1 次纯化。挑取纯化后的菌落少许划线接种于分离培养基,28℃ 恒温培养 72h,进行第 2 次分离。按照第 1 次纯化操作进行第 2 次纯化,镜检。将采用连续划线分离纯化的菌种用麦芽汁琼脂斜面 4℃ 保藏<sup>[3]</sup>。

1.2.3.2 乳酸菌的分离和筛选 每一样品系列稀释度的菌悬液接种于 MRS 琼脂平板,由 MRS 琼脂培养基的自动筛选进行分离。MRS 琼脂培养基,添加还原剂(L-半胱氨酸盐酸盐 0.1%,W/V),灭过菌后倾注平板前加入无菌放线菌酮稀释液(0.01%,W/V)抑制酵母菌的生长<sup>[4-5]</sup>,5% CO<sub>2</sub>,30℃,培养 72h<sup>[6]</sup>。分离菌株根据以下筛选标准确定:形态观察、革兰氏反应、过氧化氢酶反应,同型或异型发酵,15~45℃ 的生长情况。杆菌或球菌、革兰氏阳性(紫)、过氧化氢酶阴性(无气泡)为乳酸菌<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.4 菌种的复筛

1.2.4.1 酵母菌的复筛 发酵性能:采用杜氏管发酵法,将分离纯化后的酵母菌接种于麦芽汁培养基中,置于 28℃ 恒温培养箱中培养 24h,测定酵母菌株产气泡的快慢、在规定时间内产气泡的多少及产生气味的浓度和类型,初步比较各株酵母菌的起酵能力、发酵能力及产香能力,初筛出性能优良的酵母菌<sup>[3]</sup>。菌株特性:进行耐酸能力实验,将酵母接入麦芽汁培养基中,将麦芽汁培养基的 pH 用 1mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 调 pH 分别为 3.2、4.2、5.2 和 6.2;灭菌后,按 2% 接种量接入活化好的酵母菌,28℃ 培养 10h,于波长 660nm 处测 OD 值,确定其耐酸能力<sup>[3]</sup>。

1.2.4.2 乳酸菌的复筛 乳酸菌产酸、产味实验:向含有 5% 面粉的无菌溶液中接入 1% 过夜培养的乳酸菌培养液,30℃ 培养 24h,用 pH 计测酸度<sup>[5]</sup>,同时检查其产味情况。

#### 1.2.5 混合发酵实验

1.2.5.1 菌种和老面团制备 取新鲜培养酵母菌种和乳酸菌的斜面菌种一环,分别接种到装有 20mL 无菌麦芽汁和 MRS 液体培养基,28℃ 和 30℃ 培养 24h。然后接种到装有 100mL 上述培养基的三角瓶,同上培养 24h 后,于 4℃、5000 × g 离心 15min,除去上清液,获得微生物的细胞溶于无菌生理盐水,用于馒头实验。

2000mL 大烧杯中 600g 水,400g 面粉混合,LAB 和/或酵母的接种量为 10<sup>5</sup> ~ 10<sup>6</sup> cfu/g,24℃,发酵 12h<sup>[7]</sup>。

1.2.5.2 发酵馒头及评价 采用软式主食馒头发酵方法:按面团的 20% 添加酸面团,同时添加面包酵母 0.5%<sup>[7-8]</sup>。50g 酸面团,20mL 水,0.5g 燕子牌即发干酵母,70g 馒头专用粉,用手混匀后,形成光滑完整的面团。将面团置于温度为 32 ± 2℃、相对湿度为 85% 的醒发箱中发酵 40min。取出添加 10g 面粉揉成半圆型面团,同以上发酵条件醒发 20min。采用 Φ33cm 的不锈钢锅,加入 1800mL 水,加热至沸腾后将馒头坯放在蒸篦上,盖严,沸水汽蒸 20min,停火 2min 后,

取出馒头。20min 后对其体积、外表状况、内部组织结构、香味、口感进行感官评价<sup>[9]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微生物计数

由于地理位置及存储时间的不同,不同样品的活菌数不同,酵母菌的活菌数 10<sup>6</sup>~10<sup>9</sup> cfu/g 不等,乳酸菌的活菌数为 10<sup>5</sup>~10<sup>8</sup> cfu/g。

### 2.2 酵母菌和乳酸菌的初步分离和筛选结果

主要根据菌株的外形特征及生化特性对 14 个样品中的微生物进行初步分离和筛选,分别挑选出菌落特征明显且生长良好的酵母菌和乳酸菌单菌落分别为 56 个和 67 个。一般形态特征为细胞呈球形、卵圆形或椭圆形,单细胞,有核,无鞭毛;菌落呈圆形或椭圆形,凸起,表面光滑湿润的为酵母菌。杆菌或球菌、革兰氏阳性(紫)、过氧化氢酶阴性(无气泡)的为乳酸菌。酵母菌和乳酸菌分别进行美兰染色,革兰氏染色后进行显微镜观察的照片如图 1、图 2 所示。

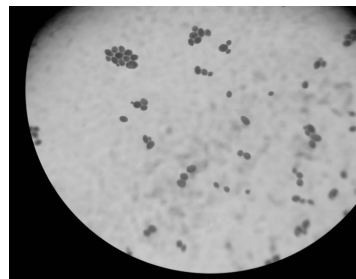


图 1 酵母菌

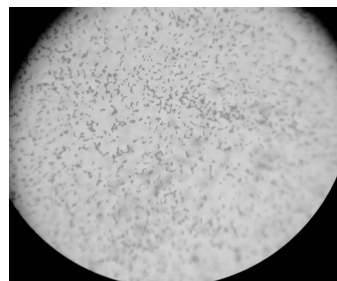


图 2 乳酸菌

传统主食发酵剂属于自然杂菌混合发酵,其主要优势菌群为酵母菌和乳酸菌,酵母菌起发酵面团作用,乳酸菌酸化面团从而影响面团及终产品的特性。丁长河等<sup>[4]</sup>曾对传统起子-酵头中的微生物进行分析,根据碳水化合物的发酵和吸收从 12 个传统酵头样品中分离出 4 种细菌和 3 种酵母菌,经生物梅里埃的 Vitek-32 系统自动鉴定,分离得到的 3 株酵母菌都为酿酒酵母,3 株细菌分别为蜡样芽孢杆菌、鲁氏不动杆菌和短小芽孢杆菌。Hulya Gul 等<sup>[5]</sup>从面包酸面团中筛选的酵母菌为 *Saccharomyces cerevisiae*, *S.delbrueckii*, *Torulopsis holmii* and *T.unisporus*;乳酸菌有 *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *P.acidilactici*和 *Tetragenococcus halophilus*。

### 2.3 复筛

本研究的目的是从传统的馒头发酵剂中筛选性能优良的酵母菌和乳酸菌,并且适于纯菌接种混合

表1 酵母菌的分离与筛选

编号	镜检	产气(h)			产味量	产味类型	耐酸能力 pH			
		开始产气	杜氏管满	产气结束			3.2	4.2	5.2	6.2
Sq2-2	圆,椭圆	8	16	20	+++	甜	0.279	0.427	0.302	0.440
Sq4-3	圆,椭圆	8	16	23	++	甜	0.554	0.585	0.528	0.286
Sq6-4	椭圆	8	14	20	+++	甜	0.824	0.263	0.274	0.468
Sq7-2	圆,椭圆	8	15	23	+++	香甜	0.242	0.258	0.242	0.576
Sq8-1	椭圆	8	14	23	+++	香	0.297	0.304	0.237	0.372
Sq9-1	圆,椭圆	8	18	23	+++	香甜	0.276	0.201	0.369	0.268
Sq9-2	圆,椭圆	8	15	19	+++	甜	0.483	0.467	0.472	0.548
Sq9-4	圆,椭圆	8	16	23	+++	香	0.435	0.207	0.246	0.652
Sq9-5	圆,椭圆	8	18	22	++	香甜	0.544	0.251	0.199	0.381
Sq10-1	圆,椭圆	8	14	21	++	香	0.370	0.282	0.512	0.612
Sq10-4	圆,椭圆	8	14	20	++	香	0.521	0.391	0.668	0.579
JZ1-2	圆,椭圆	8	16	23	++	香	0.233	0.236	0.319	0.211
JZ1-4	圆,椭圆	8	15	23	+++	香甜	0.494	0.123	0.466	0.512
JZ3-2	圆,椭圆	8	16	21	++	甜	0.281	0.180	0.322	0.198
JZ3-4	圆,椭圆	8	14	17	+++	香	0.284	0.480	0.578	0.638

注:产气表示包括开始产气的时间,杜氏小管体积达到1的时间,产气结束的时间;“+”越多表示味道越浓。

表3 菌种组合及评价结果

编号	菌种组合	外表状况(10)	内部状况(10)	香味(10)	滋味(10)	平均
1	对照	7.00	7.50	7.00	7.25	7.19
2	Sq2.2, Sq4-3	8.75	7.25	6.75	7.50	7.56
3	Sq8.1, Sq4-3	6.75	7.75	7.25	6.75	7.13
4	Sq6.3, Sq4-3	8.00	8.25	6.75	6.75	7.44
5	Sq3.1, Sq4-3	8.00	7.25	7.25	7.50	7.50
6	Sq4.5, Sq4-3	7.50	8.00	6.75	7.00	7.31
7	JZ1.4, Sq4-3	7.25	7.00	6.75	6.75	6.94
8	Sq4-3	6.00	6.75	6.75	7.00	6.63

发酵生产具有特殊风味或特定功能馒头的菌种。在面团发酵过程中酵母菌起发酵面团的作用,在混合发酵过程中,乳酸菌会产酸使面团的 pH 降低。所以对酵母菌主要根据其发酵性能、耐酸能力来进行复筛,经复筛挑选出 15 株,其编号及筛选结果如表 1,尤其 Sq4-3、Sq7-2、Sq9-2、Sq9-4、JZ1-4 的性能较好。

酵母菌和乳酸菌混合发酵过程中,若乳酸菌产酸能力太强, pH 太低不仅会抑制酵母菌的生长,进而影响面团发酵性能,而且酸味过重影响产品风味,导致终产品不被消费者所接受。同时考虑到乳酸菌起影响风味的作用,所以乳酸菌复筛过程中主要根据其产酸产味特性筛出 15 株,其编号及筛选结果如表 2。

### 2.4 混合发酵

筛选性能优良的酵母菌和乳酸菌是首要任务,但纯菌接种混合发酵是今后研究的方向和重点。基于这一要求,挑选出一株优良的酵母菌和 5 株产酸能力不同的代表性乳酸菌进行馒头混合发酵实验,菌种组合及评价结果见表 3。

由表 3 可以看出,添加乳酸菌的酸面团发酵的馒头其感官总体评分要比只添加酵母菌的要高,而不同乳酸菌与酵母菌混合发酵对馒头品质的影响也不同,添加乳酸菌 Sq2.2 的酸面团发酵的馒头其总体感官评分最高为 7.56 分,其次为 Sq3.1、Sq6.3 和 Sq4.5。

表2 乳酸菌的分离与筛选

编号	革兰氏染色	镜检	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 酶反应	产酸	产味
Sq2.2	+	短杆	-	4.85	++
Sq8.1	+	杆	-	4.76	+++
Sq3'	+	短小杆	-	4.56	+++
Sq6.3	+	杆	-	4.39	+++
Sq5.1	+	杆	-	4.36	++
Sq3.1	+	短小杆	-	4.25	++
Sq10.1	+	杆	-	4.18	++
JZ2.2	+	杆	-	4.14	+++
Sq1.5	+	短杆	-	4.10	++
Sq5.4	+	短小杆	-	4.07	++
Sq4.5	+	短小杆	-	4.05	+++
Sq9.2	+	球菌	-	4.71	++
JZ1.2	+	球菌	-	4.78	+++
JZ1.4	+	球菌	-	4.47	+++
JZ3.2	+	球菌	-	4.88	+++

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性,“+++”表示产生量的多少。

### 3 结论

根据菌株的外形特征及生化特性进行初步分离和筛选,再结合面团发酵过程中酵母菌和乳酸菌各自起的作用确定复筛标准经过复筛,其中酵母菌中 Sq4-3、Sq7-2、Sq9-2、Sq9-4 和 JZ1-4 的发酵性能较好。最后挑选酵母菌 Sq4-3 与 5 株代表性乳酸菌进行混合发酵实验,发现不同乳酸菌与酵母菌混合发

(下转第 337 页)

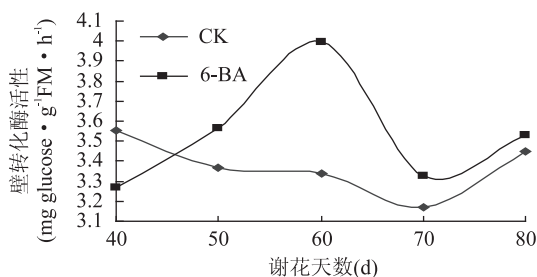


图5 6-BA对芒果果实壁转化酶的影响

### 3 讨论

在众多果实品质指标中,糖分是一个重要指标。果实品质在很大程度上取决于糖的种类和数量,因而糖积累就成为果实品质形成的关键。芒果属淀粉转化型果实,叶片光合产物输入果实后,除了用于果实生长发育与呼吸消耗外,多余部分主要以淀粉形式积累于果实中直至果实成熟,采后再经后熟将淀粉转化为可溶性糖<sup>[9]</sup>,果实可溶性糖的主要成分为蔗糖、葡萄糖和果糖。芒果在成熟过程中总糖及还原糖的含量都逐渐升高,在谢花后第60d芒果含糖量最高,说明这时芒果果实糖代谢最活跃,是果实快速生长期,这个时期一定要注意水肥的供应。谢花后60d含糖量开始下降,说明果实从快速生长期进入稳定积累期。

6-BA涂抹过的芒果蔗糖分解能力很强,具有加快糖代谢速率的作用,6-BA通过影响芒果体内转化酶的活性促进蔗糖的转化。6-BA涂抹的芒果酸性转化酶的活性极高,使芒果液泡中发生反应:蔗糖+水→葡萄糖+果糖<sup>[10]</sup>,导致芒果液泡中还原糖含量升高,验证了酸性转化酶主要功能是蔗糖的转化。6-BA处理后的中性转化酶的活性降低,减缓细胞质中蔗糖的水解,使得细胞质中还原糖的含量很低,使蔗糖用于细胞能量的代谢。6-BA处理后的壁转化酶的活性提高,加速了细胞壁中蔗糖的水解,从而使芒果细胞壁中还原糖的含量较高,主要使蔗糖用于淀粉的转化,进行糖的积累;但6-BA处理组还原糖含量降低,表明芒果细胞中的还原糖主要来源于细胞质。

6-BA是细胞分裂素,它的主要作用是促进细胞

分裂和细胞体积扩大,而不是伸长生长,它可增加细胞壁的可塑性,但不改变其伸缩性<sup>[11]</sup>。6-BA在芒果果实成熟时延迟果皮退绿,推迟着色,能使细胞膨大时期延长。关于6-BA提高酸性转化酶和壁转化酶的活性,促使蔗糖降解成葡萄糖和果糖在本实验中得到了验证。6-BA处理幼果,增强了果实调运碳水化合物化合物的能力。至于6-BA能否提高芒果品质有待进一步的讨论。

### 参考文献

[1] 刁俊明. 6-BA对沙柚果实品质和耐藏力的影响[J]. 嘉应大学学报(自然科学), 1997, 60: 142-148.  
 [2] Ho L C. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink in korgans in relation to sink strength[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1988, 40: 341-346.  
 [3] Sung S J, Su DP, Black CC. Identification of actively filling sucrose sinks[J]. Plant Physiol, 1989, 25: 120-127.  
 [4] Farrar J F. Sink strength: what is it and how do we measure it [J]. Plant Cell and Enbiron, 1993, 15: 479-483.  
 [5] 吕英民, 张大鹏. 果实发育过程中糖的积累[J]. 植物生理学通讯, 2000(10): 324-330.  
 [6] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2002: 101-103.  
 [7] Miron D, Schaffer A A. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and invertase activities in developing fruit of Lycopersicon esculentum Mill. And the sucrose accumulating Lycopersicon hirsutum Hub. and Bonp. l [J]. Plant Physiol, 1991, 95: 623-627.  
 [8] Stommel J R, Simon P W. Multiple forms of invertase from Daucus carota cell cultures [J]. Phytochemistry, 1990, 47(2): 633-636.  
 [9] 魏长宾. 芒果成熟过程中糖分积累及芳香物质组成研究[D]. 华南热带农业大学优秀硕士论文, 2006, 42: 320-326.  
 [10] Davis C, Robinson S P. Sugar accumulation in grape berries [J]. Plant Physiol, 1996, 20: 230-238.  
 [11] 李华, 张子德, 刘孟纯, 等. 不同浓度6-BA处理对鲜切芦笋保鲜效果的影响[J]. 保鲜与加工, 2008, 59: 223-228.

(上接第205页)

酵对馒头品质的影响也不同,其中添加乳酸菌Sq2.2的酸面团发酵的馒头总体感官评分最高为7.56分,其次为Sq3.1、Sq6.3和Sq4.5。

### 参考文献

[1] 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.  
 [2] Rehman S, Paterson A, R. piggott J. Flavour in sourdough breads; a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2006, (17): 557-566.  
 [3] 苏东海. 馒头酵母的分离与筛选[J]. 农产品加工, 2008(7): 82-84.  
 [4] 丁长河, 戚光册, 张建华, 等. 传统起子(酵头)的微生物分析及其对馒头品质的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 69-74.

[5] Gul H, Qzcelik S, Saodic O, et al. Sourdough bread production with lactobacilli and S.cerevisiae isolated from sourdoughs [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 691-697.  
 [6] Haggman M, Salovaara H. Microbial re-inoculation reveals differences in the leavening power of Sourdough yeasts trains[J]. LWT, 2008, 41: 14-154.  
 [7] Katina K, Heinio R.-L, Autio K, et al. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread [J]. LWT, 2006, 39: 1189-1202.  
 [8] Paramithiotis S, Chouliaras Y, Tsakalidou E, et al. Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 2813-2819.  
 [9] 苏东民. 中国馒头分类及主食馒头品质评价研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.