

酸面团发酵过程中蛋白质分解及多肽形成的变化规律

王金水, 杨森, 贾峰, 周晓配, 冯景丽

(河南工业大学生物工程学院, 河南郑州 450000)

摘要: 本文以小麦粉, 酵母菌和植物乳酸菌 M616 (*Lactobacillus plantarum* M616) 为原料制备酸面团, 酵母发酵面团以及乳酸菌发酵面团, 研究酸面团发酵过程中蛋白的分解及肽的形成规律, 采用 SDS-PAGE 分析酸面团发酵过程中蛋白质的组成变化, 利用 Bradford 法分析蛋白质含量的变化, 并通过 HPLC 研究蛋白组分降解形成多肽的含量变化。结果表明, 酵母菌对面团中蛋白质几乎没有降解作用, 植物乳酸菌 M616 在面团发酵过程中对面团蛋白具有较强的降解作用, 表现为各蛋白含量随发酵时间的进行逐步减少, 且在 4~10 h 之间变化最为显著。其中可溶性蛋白和中分子量麦谷蛋白的降解最为明显, 醇溶蛋白含量在 0~10 h 之间逐渐增加后逐渐减少。对发酵前后多肽含量变化分析发现植物乳酸菌可以明显促进面团中多肽的形成和含量的增加。

关键词: 酸面团; 发酵; 蛋白质; 多肽

文章编号: 1673-9078(2015)10-69-73

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.012

Patterns of Protein Degradation and Peptide Formation during Sourdough Fermentation

WANG Jin-shui, YANG Sen, JIA Feng, ZHOU Xiao-pei, FENG Jing-li

(School of Biotechnology Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Sourdough, yeast-fermented dough, and *Lactobacillus*-fermented dough were prepared with wheat flour, yeast, and *Lactobacillus plantarum* M616 and the protein degradation and the peptide formation patterns were studied via by SDS-PAGE, the changes in protein content were analyzed by Bradford method, and the formed peptide content was measured using HPLC. The results showed that yeast had almost no effect on the degradation of proteins in the dough. *Lactobacillus plantarum* M616 played a relatively important role in protein degraded during fermentation, demonstrated by the gradual decrease in the content of proteins during fermentation, which was the most obvious at 4~10 h. Additionally, the degradation of soluble proteins and of those with medium molecular weight was the most obvious. The content of gliadins increased first and then decreased at 0-10 h. The analysis of the content of peptides before and after fermentation indicted that *L. plantarum* M616 could promote the formation and accumulation of peptides in the dough.

Key words: sourdough; fermentation; protein; peptide

酸面团发酵是将面粉通过乳酸菌和酵母菌混合发酵后得到的一种营养价值高, 有特殊香味的面团, 是食品烘焙技术中重要的工艺方法。利用酸面团生产的面制食品具有体积大, 质地松软, 有弹性, 美味可口, 营养价值高等优点^[1-2], 酸面团发酵食品越来越受到人们的欢迎。

近年来, 随着人们生活水平的提高, 对食品风味, 色泽以及营养价值的需求日趋增高。面制品作为我国主要的食品来源, 越来越受到人们的重视, 国内外相

收稿日期: 2014-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071496); 郑州市科技创新团队项目 (121PCXTD518)

作者简介: 王金水(1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术

关的研究也日趋增多。

近年来的研究表明酸面团发酵可以通过微生物代谢降解面团中的糖类, 蛋白质等合成多聚糖, 多肽, 氨基酸以及多种风味物质, 增加面制品的色泽, 风味及营养价值^[3]。乳酸菌在酸面团发酵过程中分解面团中的糖类合成胞外多糖 (EPS) 可以提高面团的劲度以及面包的结构品质^[4]。Jussi 在对大分子量麦谷蛋白的研究中发现乳酸菌可以降解部分麦谷蛋白形成小分子肽和游离氨基酸, 从而改善食品的加工和食用品质^[5]。在对酸面团中乳酸菌代谢途径的研究中发现, 大部分乳酸菌不能独立合成至少有一种氨基酸, 且必须通过吸收多肽来补充^[6]。乳酸菌发酵可以合成乙酸苯酯, 苯乳酸, 苯乙醇等芳香化合物, 乳酸菌还可以将

丙酮酸通过乳酸脱氢酶合成 α -乙酰乳酸, 并通过酶促反应进一步合成面制品中重要的香味化合物双乙酰^[7]。另外, 酸面团发酵会改善面团的流变特性, 降低面团硬度, 形成质地松软, 可口的面制食品^[8]。

酸面团作为提高面制食品价值的主要工艺方法, 具有其它面团所不能比拟的优势。然而, 由于其复杂的微生物菌群而无法进行大规模的工业化标准生产, 主要原因在于发酵过程可控性差, 其中蛋白质降解的不确定性及其复杂性是主要原因。本研究通过对植物乳酸菌 M616 在酸面团发酵过程中对蛋白质的降解规律进行研究, 为酸面团的工业化大规模标准生产提供理论依据。

1 材料方法

1.1 仪器与设备

Thermo2877 水浴摇床: 美国热电科技公司; 722S 分光光度计: 上海精密仪器科学有限公司; HPLC-1260: 配紫外检测器, 美国安捷伦公司; Pico 17/21 微量离心机: 美国热电科技公司; ELITE 300 PLUS 电泳仪: 美国威泰克公司。

1.2 材料与试剂

面粉: 金苑精制粉(郑州金苑面业有限公司); 酵母: 安琪高活性干酵母(湖北安琪酵母股份有限公司); 低分子量蛋白 mark: 大连 TaKaRa 公司; 乳酸菌: 植物乳酸菌 M616 (老酵头中提取鉴定得来), 甲醇(色谱纯), 乙腈(色谱纯)。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌的活化及酸面团的制备

在无菌条件下取植物乳酸菌 M616 于液体培养基 37 °C 培养 16 h, 以 2% 的接种量转接到 75 mL 的 MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 8 h 后取 50 mL 培养基 3000×g 离心并用 50 mL 0.9% 生理盐水悬浮洗涤(重复离心洗涤一次后备用, 此时菌体密度 9.0 log cfu/mL)。称取 5.5 g 酵母与以上乳酸菌菌悬液混合制成 250 g 菌液并与 500 g 面粉混合成酸面团。此时植物乳酸菌的加入量为 8.0 lg cfu/g 面粉; 用 250 g 含有 5.5 g 酵母的水与 500 g 面粉混合制备酵母发酵面团; 取 500 g 面粉与 250 g 乳酸菌菌悬液混合制备乳酸菌面团(乳酸菌含量为 8.0 lg cfu/g)。混匀后切块放入醒发箱 30 °C 发酵, 每隔两小时取样放入冰箱冷冻 12 h 后进行冷冻干燥, 磨粉备用。

1.3.2 SDS-PAGE 电泳

取 50 mg 不同发酵时间的样品于 2 mL 的离心管中, 加入由 0.08 mol/L Tris-HCl, 5% (V/V) β -巯基乙醇, 2% (m/V) SDS 和 10% 甘油组成的样品缓冲液, 放入沸水中煮沸 3-5 min, 使样品溶解, 冷却至室温后参照 Schagger 和 Von Jagow^[9]的方法进行电泳分析。

1.3.3 蛋白质分离及含量的测定

取 1 g 不同发酵时间的样品室温下溶于 5 mL 1 M NaCl 和 50 mM Tris-HCl (pH=8) 缓冲液中, 震荡 60 min, 1.1×10⁵ g 10 min, 上清液即为清蛋白和白蛋白; 将沉淀用超纯水离心洗涤两次, 用 55% 1-丙醇在 50 °C 震荡 30 min, 1.1×10⁵ g 10 min, 上清液即为醇溶蛋白; 沉淀经过两次离心洗涤, 溶于 5 mL 含有 1% DTT 的样品缓冲液 50 °C 震荡 30 min, 1.1×10⁵ g 10 min 上清液即为麦谷蛋白。将上述样品进行冷冻干燥后, 参照 Bradford 法测定蛋白含量^[10]。

1.3.4 高效液相色谱分析多肽含量

(1) 取 0.5 g 不同发酵时间的样品, 用含有 10 mL 0.1% TFA 水溶液 40 °C 溶解 12 h, 溶液在 5 °C 1.7×10⁵ g 离心 10 min, 5 °C) 用 3000 kDa 的半透膜透析, 透析液过 0.45 μ m 滤膜滤去沾染的大颗粒杂质^[11]。

(2) 色谱柱: C18; 流动相: A: 0.1% TFA 乙腈, B: 0.1% TFA 水; 梯度洗脱: 在 0~25 min, B 从 2%~20%; 25~40 min, B 从 20%~80%; 流速: 1.0 mL/min; 进样量 10 μ L。

1.3.5 数据分析

文章中的数据都是经过三次平行实验计算得出的平均值, 并分别使用 Origin8.5.1 和 SAS 进行数据处理和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 面团发酵过程中全蛋白 SDS-PAGE 图谱变化

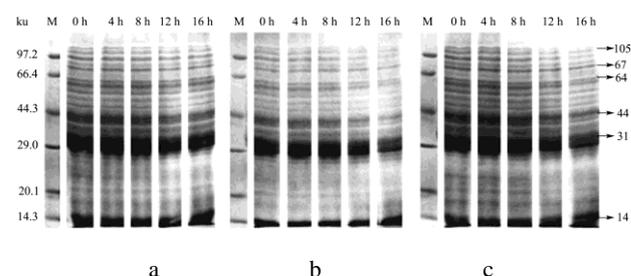


图1 总蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE profiles of whole wheat proteins

注: a: 酵母发酵面团; b: 乳酸菌发酵面团; c: 混合发酵面团。

图 1a、b、c 分别表示酵母发酵面团, 乳酸菌发酵面团, 酸面团, 三种发酵面团在发酵过程中总蛋白的变化规律。由图 1a 可知在整个酵母菌发酵过程中各蛋白质条带无明显变化, 表明酵母菌在面团发酵过程中对蛋白几乎没有降解作用。与图 1a 相比, 图 1b 和图 1c 的变化较为明显, 部分大分子蛋白以及中分子量蛋白条带明显变浅, 特别是 M_w 大于 67 ku 的高分子量蛋白和分子量在 30 ku~44 ku 的中分子量蛋白。表明乳酸菌发酵和混合发酵对面团蛋白质有较强的降解作用, 且降解作用主要由植物乳酸菌完成。

图 1b、c 对比, 乳酸菌发酵面团的蛋白条带整体变化较酸面团明显, 特别是 44 ku 和 67 ku 两个条带在乳酸菌发酵面团中几乎消失。由此可以推测, 在酸面团发酵过程中酵母菌对面团中蛋白质不仅没有降解作用还可能会抑制植物乳酸菌对蛋白的降解作用, 这可能是由于酵母菌对酵母菌生长对乳酸菌生长的抑制作用。总之, 酸面团发酵过程中蛋白的降解作用主要由植物乳酸菌完成, 且降解作用主要集中在中分子量和高分子量蛋白。植物乳酸菌发酵酸面团对蛋白质的降解作用, 有助于促进人体对面团蛋白质的吸收利用, 提高面制食品的营养价值。

2.2 蛋白质各组分含量的变化

为了对发酵过程中面团蛋白降解规律的进一步研究, 通过 Bradford 法对面团中个蛋白组分进行测定。如表 1、表 2、表 3 分别表示可溶性蛋白, 醇溶蛋白, 麦谷蛋白在发酵过程中的变化。

表 1 发酵过程中面团可溶性蛋白含量的变化

Table 1 Changes in soluble protein content of dough during fermentation

| 发酵时间/h | 可溶性蛋白含量/(mg/g) | | |
|--------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| | 酵母发酵面团 | 酸面团 | 乳酸菌发酵面团 |
| 0 | 0.95±0.09 ^a | 0.95±0.013 ^a | 0.96±0.09 ^a |
| 2 | 0.95±0.11 ^a | 0.95±0.011 ^a | 0.94±0.14 ^a |
| 4 | 0.95±0.08 ^a | 0.87±0.08 ^b | 0.71±0.11 ^a |
| 6 | 0.95±0.14 ^a | 0.72±0.10 ^b | 0.57±0.07 ^b |
| 8 | 0.96±0.06 ^a | 0.57±0.11 ^b | 0.44±0.12 ^a |
| 10 | 0.96±0.10 ^a | 0.49±0.13 ^c | 0.39±0.09 ^b |
| 12 | 0.93±0.09 ^a | 0.41±0.09 ^b | 0.30±0.08 ^c |
| 14 | 0.92±0.14 ^a | 0.32±0.11 ^a | 0.19±0.10 ^c |
| 16 | 0.93±0.11 ^a | 0.30±0.07 ^c | 0.18±0.11 ^c |

注: 表中同一列数据不同上标字母代表显著性差异 ($P<0.05$); 每个参数测 3 次取平均值, $X\pm S$, 下同。

由表 1 可知, 乳酸菌发酵和混合发酵对面团中水溶性蛋白含量随着发酵的进行差异显著, 经过 16 h 的

发酵, 80%的水溶性蛋白被降解, 进一步分析发现, 植物乳酸菌对面团中可溶性蛋白的降解主要集中在 4~10 h。结果表明植物乳酸菌在发酵过程中对面团中可溶性蛋白具有极强的降解作用, 相反酵母菌发酵面团中的水溶性蛋白含量没有差异, 酵母菌对可溶性蛋白没有降解作用。

表 2 发酵过程中面团醇溶性蛋白含量的变化

Table 2 Changes in gliadin content of dough during fermentation

| 发酵时间/h | 醇溶蛋白含量/(mg/g) | | |
|--------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 酵母菌发酵面团 | 酸面团 | 乳酸菌发酵面团 |
| 0 | 2.34±0.12 ^a | 2.33±0.19 ⁱ | 2.34±0.19 ^g |
| 2 | 2.35±0.09 ^a | 2.44±0.13 ^h | 2.40±0.13 ^f |
| 4 | 2.34±0.13 ^a | 2.49±0.15 ^g | 2.64±0.16 ^e |
| 6 | 2.34±0.10 ^a | 2.57±0.17 ^f | 2.70±0.07 ^d |
| 8 | 2.33±0.12 ^a | 2.95±0.11 ^d | 3.43±0.19 ^b |
| 10 | 2.31±0.14 ^a | 3.16±0.13 ^a | 3.54±0.18 ^a |
| 12 | 2.33±0.09 ^a | 3.09±0.11 ^b | 3.40±0.12 ^b |
| 14 | 2.30±0.13 ^a | 2.98±0.09 ^c | 3.22±0.13 ^c |
| 16 | 2.31±0.11 ^a | 2.79±0.14 ^e | 3.16±0.15 ^c |

与水溶性蛋白相比, 表 2 中醇溶蛋白的含量在混合发酵和乳酸菌发酵过程中呈现出先增加后减少的趋势, 且发酵前后各组差异显著, 酵母发酵面团中没有差异性。在发酵初 10 h, 乳酸菌发酵和混合发酵面团中醇溶蛋白的含量呈明显的增加趋势, 增加量分别为 50%、33%。10~16 h 醇溶蛋白的含量逐渐减少, 该变化可能是由于乳酸菌发酵促进了面团中不溶性蛋白的溶解从而导致醇溶蛋白含量的增加。另外, 醇溶蛋白的变化可能对面团的延伸性具有较大的影响^[12]。

表 3 发酵过程中面团麦谷蛋白含量的变化

Table 3 Changes in glutenin content of dough during fermentation

| 发酵时间/h | 麦谷蛋白含量/(mg/g) | | |
|--------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 酵母菌发酵面团 | 酸面团 | 乳酸菌发酵面团 |
| 0 | 3.13±0.13 ^a | 3.20±0.17 ^a | 3.22±0.14 ^a |
| 2 | 3.20±0.09 ^a | 2.90±0.11 ^b | 2.58±0.09 ^b |
| 4 | 3.08±0.17 ^a | 2.31±0.14 ^c | 1.92±0.11 ^c |
| 6 | 3.22±0.11 ^a | 1.51±0.09 ^d | 1.52±0.08 ^d |
| 8 | 3.22±0.14 ^a | 1.13±0.07 ^e | 1.32±0.14 ^c |
| 10 | 3.20±0.10 ^a | 0.90±0.15 ^f | 1.14±0.16 ^f |
| 12 | 3.23±0.09 ^a | 0.71±0.13 ^g | 0.96±0.06 ^g |
| 14 | 3.24±0.15 ^a | 0.60±0.16 ^h | 0.82±0.09 ^h |
| 16 | 3.25±0.11 ^a | 0.52±0.11 ⁱ | 0.64±0.11 ⁱ |

麦谷蛋白是面粉中蛋白的主要组成成分。如表 3 中, 随着发酵时间的延长, 酸面团和乳酸菌发酵面团

中, 麦谷蛋白的含量呈明显的降低趋势, 且发酵前后差异显著, 而酵母发酵面团麦谷蛋白基本没有变化。0~6 h 间乳酸菌发酵面团对麦谷蛋白的降解速率略高于酸面团发酵, 之后逐渐减小, 在 16 h 分别达到 0.516 mg/g 和 0.642 mg/g。通过分析表明, 面团中乳酸菌的生长繁殖对面团中麦谷蛋白具有很强的降解作用, 对面团的劲度, 韧性有较大的影响。

2.3 发酵对面团中多肽含量的影响

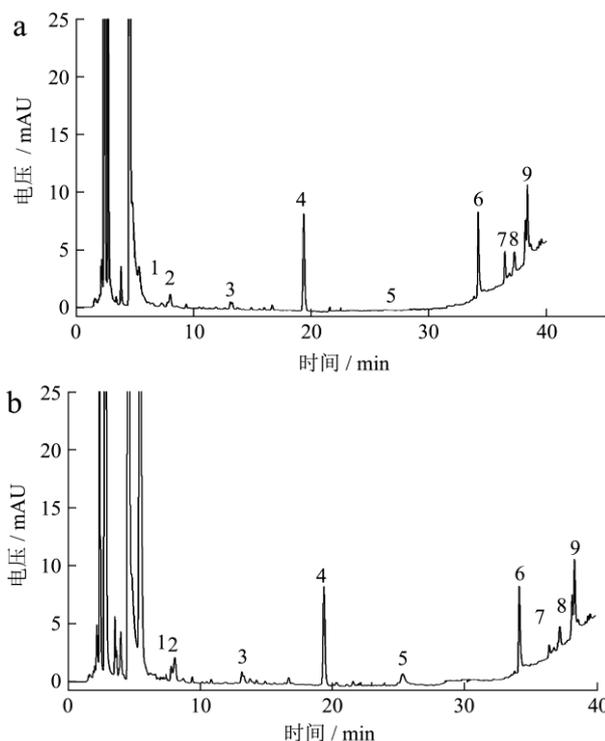


图2 酵母菌发酵面团中多肽含量的变化

Fig.2 Changes in peptide content of yeast-fermented dough

注: a: 酵母菌发酵 0 h, b: 酵母菌发酵 16 h。

为了进一步研究酸面团发酵过程中蛋白的降解, 通过 HPLC 对不同面团发酵前后多肽含量的变化进行分析。

酵母菌发酵面团在发酵前后, 面团中各多肽的含量如图 2a、b 所示, 共检测出 9 种多肽。通过对比分析发现: 通过发酵, 除了 1、2、5 号多肽外, 其余大部分多肽基本没有变化。其中 1 号多肽经过发酵后消失, 5 号是新出现的肽峰, 2 号肽的峰面积从 16.9 增加到 26, 增加了 53.8%。可能是由于酵母菌消耗了 1 号多肽, 而在代谢过程中合成了 2、5 号多肽。这表明在发酵过程中, 酵母菌可以利用面团中的小分子多肽, 但对面团中整体多肽含量的影响极小。

发酵前后, 乳酸菌发酵面团中多肽的变化如图 3a、b。发酵后, 除 1 号多肽逐渐消失外, 其余大部分

多肽的峰面积呈增加趋势, 其中 2、3、4、6 的分别增加了 23.3%、11.9%、17.3%、27.1%; 5 号多肽是发酵后新合成的多肽。而 1 号多肽消失可能是由于乳酸菌为 1 号多肽所含的氨基酸的营养缺陷型菌株, 只能以吸收多肽的形式补充利用该氨基酸^[13]。与酵母发酵面团相比, 乳酸菌发酵面团的多肽变化相对明显, 表明乳酸菌发酵面团可以通过降解蛋白质来合成多肽, 这不仅可以提高面团蛋白质的利用率, 而且对面团的营养价值的提高具有重要意义。

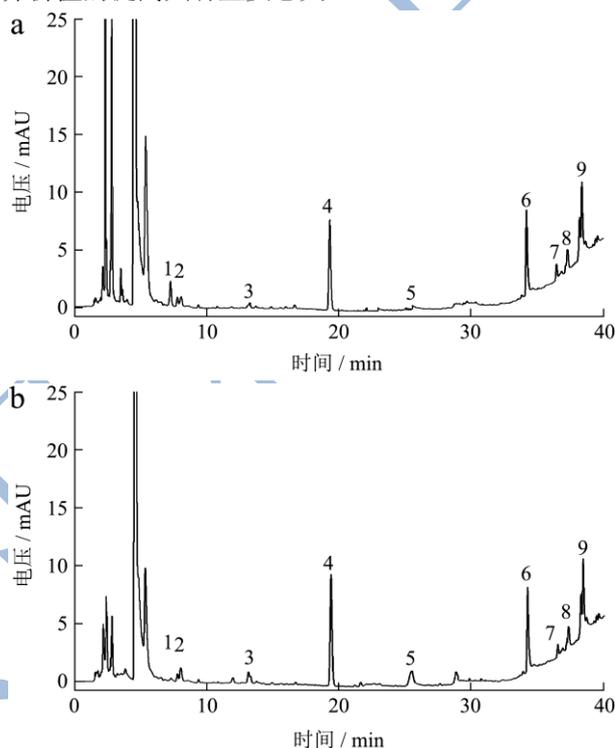


图3 乳酸菌发酵面团多肽含量的变化

Fig.3 Changes in peptide content of *Lactobacillus plantarum*-fermented dough

注: a: 乳酸菌发酵 0 h, b: 乳酸菌发酵 16 h。

酸面团发酵是提高面制品口感, 营养价值的主要方式。通过对酸面团发酵前后, 面团中多肽含量的变化进行分析得图 4a、b。图中明显可以看出, 酸面团发酵后除 2 号多肽没有明显变化外, 其它大部分多肽的含量成明显增加趋势, 其中 1、6、8、9 号多肽的含量尤为明显, 分别增 47.6%、165.1%、71.3%、102.3%, 表明混合发酵可以在面团中积累更多的多肽; 3、7 号呈明显的减少趋势, 可能是由于混合发酵改变了乳酸菌的代谢途径, 进而导致 3、7 号多肽替代 1 号多肽成为乳酸菌生长代谢的优先氮源。结果表明, 酸面团发酵可以更大的提高面团中多肽的含量, 对提高面团中蛋白质的利用率以及面制品营养价值具有积极意义。

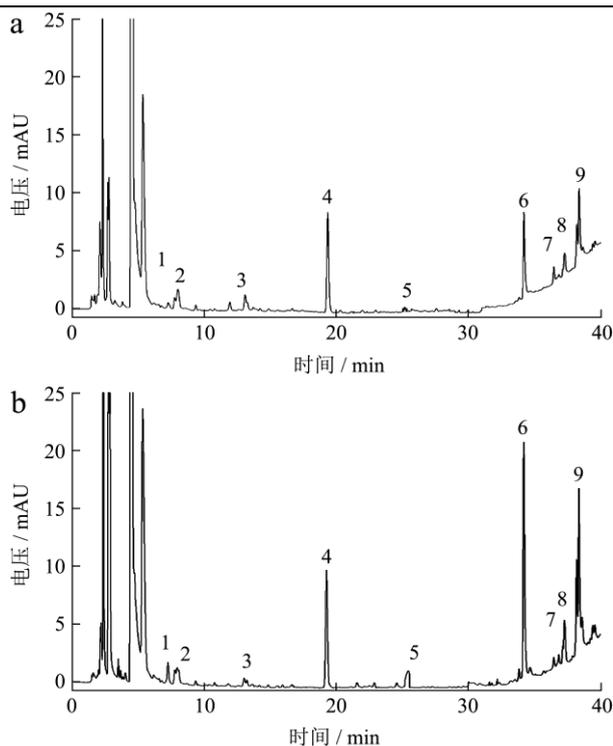


图4 酸面团发酵中多肽含量的变化

Fig.4 Changes in the peptide content of sourdough during fermentation

注: a: 混合发酵 0 h, b: 混合发酵 16 h.

3 结论

3.1 通过对三种面团发酵过程中总蛋白以及各蛋白含量的测定,发现乳酸菌在面团发酵过程中对面粉中蛋白质的降解起主导作用,其中对可溶性蛋白和中分子量麦谷蛋白有极强的降解作用;酵母菌不仅没有降解作用,而且会在一定程度上抑制植物乳酸菌对面团中蛋白降解的进行。

3.2 在对三种面团发酵前后多肽含量进行分析测定后,酵母发酵面面对多肽含量几乎没有影响,酸面团发酵却可以大幅度增加面团中多肽的含量,表明植物乳酸菌发酵酸面团可以促进大分子量蛋白降解为小分子蛋白和多肽,进而提高面制食品中蛋白质的利用率,增加面制食品的营养价值。

参考文献

- [1] Cauvain S. Bread making: an overview. In bread making improving quality [M]. Woodhead Publication Ltd. 2003, 14-16
- [2] Chavan R S, Jana A. Frozen dough for bread making - a review [J]. International Journal of Food Science. 2008, 2:9-27
- [3] Michael G Gänzle, Nicline V. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough [J]. Food Microbiology, 2007, 24: 128-138
- [4] Decock P, Capelle S. Bread technology and sourdough technology [J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16: 113-120
- [5] Jussi L, Markku M, Kati K. Degradation of HMW glutenins during wheat sourdough fermentations [J]. Cereal Chemistry. 2004,81 (1): 87-93
- [6] Thiele C, Gänzle M G. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor [J]. Cereal Chemistry, 2002, 79: 45-51
- [7] Hugenholtz J, Sysbesma W. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 82: 217-235
- [8] Anika W, Anna S H, Emanuele Z. Impact of sourdough fermented with *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 on baking and sensory properties of gluten-free breads [J]. European Food Research and Technology, 2012, 1: 1-12
- [9] Schagger H, Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 166: 368-37
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254
- [11] Andrea M D, Micaela P, Graciela F D V. Fermentation of quinoa and wheat slurries by *Lactobacillus plantarum* CRL778: proteolytic activity [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 3129-3140
- [12] Pomeranz Y. Advanced in cereal science and technology [M]. AACC. St. Paul. Minn. 1976:158 236
- [13] Vermeulen N, Pavlovic M, Ehrmann M A. Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T [J]. Applied Environment Microbiology. 2005, 71: 6260-6266