

乳酸菌协同外源酶对全麦粉营养品质及抗氧化活性的影响

张书庆, 郑学玲*, 洪静

(河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450001)

摘要: 为了提高全麦粉营养品质, 采用发酵和酶的协同作用探究对全麦粉品质的改善。通过对比短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*, *Lbr*) 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*, *Lac*) 和/或戊聚糖酶和纤维素酶 (Cellulase/Pentosanase, Cel/Pn) 处理发现二者在改善全麦粉时存在一定的协同关系。通过对不同发酵时间面粉基本组分的变化规律分析, 发现 *Lbr* 具有更强的产酸能力。乳酸菌与酶协同处理对膳食纤维和戊聚糖影响显著, 在发酵 12 h 后与 *Lac* 的总膳食纤维为 11.09%, 而 *Lac*-Cel/Pn 降低到 9.71%, 与 *Lbr* 相比, *Lbr*-Cel/Pn 可溶性膳食纤维增加 26.28%。*Lac*-Cel/Pn 的水溶性戊聚糖含量比 *Lac* 增加 56.19%。在 *Lac*-Cel/Pn 处理中植酸含量从 2.97 mg/g 降低到 0.87 mg/g, 植酸酶的活性增强, 表明二者在降低植酸含量有显著的协同作用。通过对总酚含量和相应的抗氧化性分析表明, 可检测到的游离酚含量通过 12 h 发酵, *Lac* 的含量为 99 mg/100 g, 而 *Lac*-Cel/Pn 达到了 116.9 mg/100 g, 铁离子还原能力和 DPPH 清除能力也表明协同处理增强其抗氧化性更明显。综合结果表明乳酸菌协同酶作用显著改善全麦粉的品质。

关键词: 全麦粉; 乳酸菌; 酶处理; 膳食纤维; 抗氧化性

文章编号: 1673-9078(2022)06-96-104

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.0978

Effects of Lactic Acid Bacteria Combined with Exogenous Enzymes on Nutritional Quality and Antioxidant Activity of Whole Wheat Flour

ZHANG Shuqing, ZHENG Xueling*, HONG Jing

(College of Grain, Oil and Food, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to improve the nutritional quality of whole wheat flour, the synergistic effect of fermentation and enzyme was used to explore the improvement of whole wheat flour quality. By comparing *Lactobacillus brevis* (*Lbr*) with *Lactobacillus plantarum* (*Lac*) and/or pentosanase and cellulase (Cel/Pn), it was found that there was a certain synergistic relationship between lactic acid bacteria and enzymes. By analyzing the change rule of basic components of flour at different fermentation time, it was found that *Lbr* had stronger acid-producing ability. The synergistic treatment of lactic acid bacteria and enzymes had a significant effect on dietary fiber and pentosan. The total dietary fiber of *Lac*-Cel/Pn decreased to 11.09%, while the total dietary fiber of *Lac*-Cel/Pn decreased to 9.71%. Compared with the treatment of *Lbr*, the soluble dietary fiber of *Lbr*-Cel/Pn increased by 26.28%. Compared with the treatment of *Lac*, the content of water-soluble pentosan in *Lac*-Cel/Pn increased by 56.19%. In *Lac*-Cel/Pn treatment, phytic acid content decreased from 2.97 mg/g to 0.87 mg/g, which indicated that there was a significant synergistic effect between them. The analysis of total phenol content and antioxidant activity showed that the free phenol content of *Lac* is 99 mg/100 g and the free phenol content of *Lac*-Cel/Pn is 116.9 mg/100 g after 12 h fermentation. The iron ion reducing ability

引文格式:

张书庆, 郑学玲, 洪静. 乳酸菌协同外源酶对全麦粉营养品质及抗氧化活性的影响[J]. 现代食品科技, 2022, 38(6): 96-104, +144

ZHANG Shuqing, ZHENG Xueling, HONG Jing. Effects of lactic acid bacteria combined with exogenous enzymes on nutritional quality and antioxidant activity of whole wheat flour [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 96-104, +144

收稿日期: 2021-08-31

基金项目: 河南省高等学校重点科研计划项目 (21A550004); 河南工业大学高层次人才科研启动基金项目 (2018BS082); 河南工业大学自然科学创新基金一般项目基金项目 (2020ZKJ12)

作者简介: 张书庆 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 淀粉加工理论技术, E-mail: 1484237402@qq.com

通讯作者: 郑学玲 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 淀粉加工理论技术, E-mail: xlzhenghaut@126.com; 共同通讯作者: 洪静 (1989-), 女, 博士, 研究方向: 淀粉加工理论技术, E-mail: jing.hong@haut.edu.cn

and DPPH scavenging ability showed an increasing trend, which indicated that *Lactic acid bacteria* could obviously improve the quality of whole wheat flour by synergistic enzyme action.

Key words: whole wheat flour; lactic acid bacteria; enzyme treatment; dietary fiber; antioxidant activity

随着膳食纤维在饮食结构的作用越来越清晰,人们开始注重膳食纤维的摄入以期达到健康饮食的标准^[1,2]。小麦是主要的谷类作物之一,其皮层和胚芽含有大量植物活性成分,如膳食纤维、酚类化合物、木质素、维生素和矿物质等^[3]。小麦中的麸皮和胚芽是酚类等抗氧化剂的良好来源。膳食纤维主要由不溶性的木质素、纤维素、半纤维素和一些可溶性阿拉伯木聚糖和 β -葡聚糖组成^[4]。虽然膳食纤维是一种有益成分,但同时高膳食纤维会对产品加工产生不利影响,如植酸会降低金属离子利用率^[5],一些膳食纤维与面筋相互作用降低面团稳定性^[6,7],膳食纤维的表层绒毛会降低面团发酵能力^[8],鉴于此,可通过机械处理、酶处理、生物发酵、蒸汽爆破、热处理等手段提高富含麸皮产品其营养特性和加工品质^[9,10]。

酸面团发酵是一种重要的技术,在烘焙食品中应用广泛,对发酵食品的感官品质、组织结构、营养和货架期等特性有很大影响^[11]。发酵是一个极其复杂的生化反应过程,酸面团中乳酸菌和酵母菌代谢产生的变化,如乳酸发酵、酸化、蛋白水解以及一些风味化合物的合成,很大程度上会对制品营养、功能和感官特性产生影响^[12]。在发酵过程中通过环境变化激活多种内源酶,如植酸酶、淀粉酶等,降低植酸对金属离子的螯合^[13,14],增加淀粉的浸出和溶出,并释放一些酚类和黄酮类物质,是一种良好的加工处理手段。

全麦粉品质改良中常见的酶制剂包括戊聚糖酶、纤维素酶、葡萄糖氧化酶、谷氨酰胺转化酶等,这些酶制剂有着不同的作用底物,在全麦粉处理中发挥着不同的作用。戊聚糖酶能切断戊聚糖主链,生成小分子组分^[15],降低持水能力并释放水分,使得面筋网络更好的水合,增强面筋网络的强度,同时促进戊聚糖增溶,增加水溶性戊聚糖含量,降低不溶性戊聚糖对面团的不利影响^[16,17]。纤维素酶主要作用于细胞壁,促进细胞壁的溶解,改变纤维素的结晶结构,并产生部分可溶性的微结晶^[18],同时因为其结构变化导致生理功能性质产生变化,增加其保水能力、持油能力等^[19]。虽然人们对单一乳酸菌发酵对全麦面团营养特性或酶处理对全麦面团的影响有了较多研究,但对于其协同作用还鲜有报道。

本实验主要探究乳酸菌协同外源酶对全麦粉中膳食纤维的影响,同时探究其对阿拉伯戊聚糖的溶解性,以及对内源植酸酶的激活效应,旨在通过这种结合处

理手段探究对全麦粉营养品质的影响,同时对不同发酵类型乳酸菌进行比较,并对发酵全麦制品的营养品质变化做出一定的解释。

1 材料与方法

1.1 材料

全麦粉来自于河南农科院,新麦 26 全籽粒粉碎,过 60 目筛,后熟两周备用。纤维素酶、戊聚糖酶,购于诺维信生物技术有限公司。

本实验所用乳酸菌均购于中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*): CICC 20269;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*): CICC 22133。

试剂:标准品:标准木糖,麦克林;植酸标准品,麦克林;没食子酸,麦克林;Trolox,麦克林;磷酸二氢钾,阿拉丁。膳食纤维试剂盒,美国 sigma 公司;其他所用试剂均为分析纯或色谱纯。

1.2 主要仪器与设备

JFXM110 锤式旋风磨,杭州其伟光电科技有限公司;UV762 紫外可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;SPX 型生化培养箱,北京永光明;LXJ-IIB 型低速大容量离心机,上海安亭科学仪器厂;立式压力蒸汽灭菌锅,上海博讯医疗生物股份有限公司;pHS-3C pH 计,上海仪电科学仪器;SHZ-B 型水浴振荡器,上海博讯医疗生物股份有限公司;SP-18S 醒发箱,江苏三麦食品机械有限公司;SW-CJ-1D 超净工作台,苏州净化;漩涡振荡器,艾卡公司;WZZ-3 自动旋光仪,上海仪电物理光学仪器有限公司;SD matic 肖邦破损淀粉仪,法国肖邦仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌的活化及生长曲线

MRS 液体培养基(g/100 mL):酪蛋白胨 1.0,牛肉膏 1.0,酵母粉 0.5,葡萄糖 0.5,乙酸钠 0.5,柠檬酸二铵 0.2, Tween 80 0.1, K_2HPO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.005,调节 pH 6.8。

两种乳酸菌冻干粉均使用 CICC 推荐的方法活化

培养,并在初代活化后,接种到 MRS 液体培养基进行培养。培养基按前述配方进行配置,在添加各成分之后,加入 90 mL 水,用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值为 6.8,之后再加入 10 mL 水。在 121 °C 灭菌 15 min 后备用接种。在接种后用接种环挑取单菌落接种至 MRS 液体培养基活化培养,然后将乳酸菌按 2% (V/V) 的接种量再重新接种培养,然后每 2 h 取培养液在 600 nm 处测定 OD 值,并绘制生长曲线。

1.3.2 发酵面团冻干粉的制备

取培养到对数后期的菌悬液以 5000 r/min 的速度离心 10 min,弃去上层的培养液,下层的菌泥沉淀用 0.85% 的生理盐水 20 mL 洗涤再离心沉淀两次。将下层沉淀重新悬浮于去离子水中并与全麦粉混合。其中菌悬液:全麦粉=20 mL:100 g,加水量为全麦粉的 65% (m/m)。本实验中不同的处理方式包括植物乳杆菌 (*Lac*)、植物乳杆菌+纤维素酶+戊聚糖酶 (*Lac-cel/Pn*)、短乳杆菌 (*Lbr*)、短乳杆菌+纤维素酶+戊聚糖酶 (*Lbr-cel/Pn*)、纤维素酶+戊聚糖酶 (*cel/Pn*) 五种处理方式,并选取发酵时间为 0、3、6、9、12 h 的样品。发酵条件为温度 35 °C,湿度 85%。取不同发酵时间的面团在 -18 °C 冰箱冷冻后进行真空冷冻干燥,研磨过 60 目筛后得到不同发酵时间的面团冻干粉备用。

1.3.3 面粉基本指标的测定

粗蛋白含量的测定:使用全自动定氮仪法,参照 GB/T 5009.5,蛋白质的换算系数 6.25。

粗淀粉含量:参照 GB/T 5009.9-1985,使用 1% 盐酸旋光仪法。

水分含量:参照 GB/T 14608-85,进行 130 °C 定温定时烘干法。

灰分含量:参照 GB/T 5009.4-2003,采用 550 °C 灼烧法。

破损淀粉含量使用 SD matic 肖邦破损淀粉仪进行测定,将 1 g 面粉样品放入仪器样品斗中,在反应杯中加入 3 g 硼酸和 3 g 碘化钾以及 130 mL 蒸馏水,放入仪器卡槽中,上机测试,等待大约 10 min 中仪器自动显示出测定结果。

膳食纤维含量:参考国标 GB 5009.55-2014。采用膳食纤维测定试剂盒测定,按照试剂盒的操作说明进行实验以测定可溶性膳食纤维 (Soluble Dietary Fiber, SDF) 和不溶性膳食纤维 (Insoluble Dietary Fiber, IDF),二者之和为总膳食纤维 (Total Dietary Fiber, TDF)。测试盒购于 sigma 试剂公司。

戊聚糖含量的测定参考高杨等^[20]的方法并做出一定改进。取 10 mg 样品加入 2 mL 水,加 10 mL 显

色液 (2 g 间苯三酚, 10 mL 无水乙醇, 110 mL 冰醋酸, 2 mL 盐酸, 1 mL 葡萄糖 (1.75 g/100 mL))。沸水浴 25 min 后,置于冰水中冷却 3 min,迅速在 552 nm 和 510 nm 处测定吸光度,以吸光度差值在标准曲线中查到相应的标准木糖浓度。以标准木糖为标准品,以吸光度差值和木糖浓度作标准曲线得 $y=1.6193x+0.0873$, ($r^2=0.9962$)。

$$\text{戊聚糖含量} / \% = \frac{C \times 0.88}{m \times 1000} \times 100\%$$

式中:

C——标准曲线查到的木糖含量;

m——样品质量;

0.88——戊聚糖与木糖的比例系数。

1.3.4 面团 pH 值和总可滴定酸度 (TTA) 的测定

根据 AACC 方法 (2000) 02-52 测定 pH 和 TTA。将 10 g 样品放于装有 90 g 去离子水的烧杯中,高速均质 2 min,静置 10 min,用 pH 计测定 pH。然后用 0.1 mol/L NaOH 溶液滴定至 pH=8.6,消耗的 NaOH 体积为 TTA,即总酸度。

1.3.5 植酸含量和植酸酶活性的测定

1.3.5.1 植酸含量的测定

植酸含量测定参考张成龙^[21]的方法并做出修改。称取全麦粉 2.000 g 加入 40 mL 1.2% HCl·10% Na₂SO₄ 溶液,旋涡振荡 30 s,超声提取 1 h,超声后以 4000 r/min 的速度离心 10 min,上清液即为植酸提取液,置于 4 °C 冰箱保存待用。取植酸提取液 2 mL 加入 2 mL 15% TCA 静置 1 h,然后以 4000 r/min 的速度离心 10 min,取上清液 3 mL 加入 1 mL 0.03% FeCl₃·6H₂O 0.3% 磺基水杨酸试剂,混匀后于 500 nm 测定吸光值。以标准植酸为标准品绘制标准曲线,标准曲线方程为 $y=-3.3018x+1.5842$ ($r^2=0.9913$)。

1.3.5.2 植酸酶活性测定

参考 GB/T 18634-2009 测定植酸酶活性。样品 (标准品) 测定为:称取全麦粉 5 g 加入 50 mL 乙酸缓冲溶液 I (20.52 g 无水乙酸钠, 0.5 g 曲拉通 X-100, 0.5 g 牛血清白蛋白,加入 900 mL 水,调节 pH 值为 5.50 后定容至 1000 mL),超声 15 min,再回流振荡 30 min,以 4000 r/min 的速度离心 10 min 得上清液。取 10 mL 试管,加入上清液 0.2 mL,乙酸缓冲溶液 II (20.52 g 无水乙酸钠溶于 900 mL 水,调节 pH 值为 5.50 后定容至 1000 mL) 1.8 mL,混匀后在 37 °C 水中预热 5 min,加入底物溶液 (0.690 g 植酸钠溶于 90 mL 乙酸缓冲溶液 II,调节 pH 值为 5.50 后定容至 100 mL) 4 mL,于 37 °C 下反应 30 min 后,加入终止液 (2

mL 硝酸(硝酸:水=1:2)+1 mL 钼酸铵(100 g/L)+1 mL 偏钒酸铵(2.35 g/L)4 mL。若有沉淀可以在 4000 r/min 的速度离心 10 min。在 415 nm 处测定吸光度 A。

样品(标准品)空白测定为:取 10 mL 试管,加入上述上清液 0.2 mL,乙酸缓冲溶液 II 1.8 mL,混匀后在 37 °C 水中预热 5 min,先加入终止液 4 mL,于 37 °C 下反应 30 min 后加入底物溶液 4 mL。在 415 nm 处测定吸光度 A₀。

在样品测定中先加入底物溶液是为了让提取液中的植酸酶分解植酸,在酸性条件下能与钼钒酸铵发生显色反应,后加入终止液以终止植酸酶活性并显色;在样品空白中先加入终止液是使提取液中植酸酶灭活,再加入底物溶液作为空白对照。

其中以磷酸二氢钾为标准品。标准曲线为 $y=0.036x+0.0124$ ($r^2=0.9971$), 样品液的稀释倍数为 1 倍。计算公式如下:

$$X = \frac{Y}{m \times t} \times n$$

式中:

X—酶活性, U/g(温度为 37 °C, pH 值为 5.50 条件下,每分钟从 5.0 mmol/L 植酸钠溶液中释放 1 μmol 无机磷定义为一个酶活性);

Y—实测吸光度 (A-A₀) 由标准曲线计算的无机磷含量, μmol;

m—试样的质量, g。

t—酶解时间, min;

n—试样的稀释倍数。

1.3.6 总酚含量的测定

参照 Folin-Ciocalteu 法测定总酚含量并稍作改进。取 1 g 全麦粉加入 25 mL 80% 甲醇, 超声辅助提取 1 h, 回流振荡 1 h, 以 5000 r/min 的速度离心 20 min 得上清液即为甲醇提取物。取 10 mL 刻度试管, 加入 1 mL 甲醇提取物, 加水 4 mL, 福林-酚试剂 1 mL 及质量分数为 12% 的碳酸钠溶液 4 mL, 在室温下避光反应 2 h, 在 765 nm 波长处测定样品的吸光度, 试剂空白为参比。以不同浓度梯度的没食子酸标准品制作标准曲线, 标准曲线为 $y=47.859x-3.5568$ ($r^2=0.9954$) 其中 x 轴为没食子酸浓度 (μg/mL), y 轴为吸光度。

1.3.7 抗氧化性的测定

1.3.7.1 DPPH 清除率的测定

参考 Fenglin 等^[22]方法进行测定并稍加改动。配制不同浓度的 Trolox/甲醇标准溶液, 取不同浓度的 Trolox/甲醇标准溶液 2 mL, 加入 0.25 mmol/L DPPH 溶液 2 mL, 避光振荡反应 30 min, 517 nm 出测定吸光值。以标准溶液中 Trolox 的浓度(mg/mL)为 x 轴, 吸光度为 y 轴绘制标准曲线并得出回归方程为 $y=0.8895x+3.0106$ ($r^2=0.9933$)。取 1.3.6 甲醇提取液 2 mL 加 0.25 mmol/L DPPH 溶液 2 mL, 避光反应 30 min, 在 517 nm 出测定吸光值。在标准曲线中计算相应的 DPPH 清除能力。最终结果用 mg troloxeq/100 g dry weight 表示, 简称为 mgTE/100 g DW。

1.3.7.2 铁离子还原能力

参考袁佐云^[23]的方法并做出调整。配制不同浓度的 Trolox/甲醇标准溶液, 取不同浓度的 Trolox/甲醇标准溶液 0.5 mL, 加入 2.5 mL 0.2 mol/L PB 缓冲液, 加入 2.5 mL 铁氰化钾溶液 (1%, m/V) 混匀, 于 50 °C 水浴中保温 20 min。之后加入 2.5 mL 三氯乙酸 (TCA, 10%, m/V) 以终止反应。4000 r/min 离心 10 min 后取上清液 2.5 mL, 加入 1 mL 蒸馏水, 0.5 mL 三氯化铁溶液 (0.1%, m/V), 700 nm 下测定其吸光度值。以标准溶液中 Trolox 的含量 (mg/mL) 为 x 轴, 吸光值为 y 轴制作回归方程 $y=2.3683x+0.0105$ ($r^2=0.9987$)。最终结果用 mg troloxeq/100 g dry weight 表示, 简称为 mg TE/100 g DW。样品测定: 取 0.5 mL 1.3.6 中甲醇提取液按相同的步骤测定得到吸光度, 由标准曲线计算样品的铁离子还原能力。

1.3.8 数据处理

所有数据重复两次并取其平均值作为实验结果, 用 SPSS 25 和 Excel 2013 对实验数据进行处理和差异性分析, 并用 Origin 2018 进行制图。

2 结果与讨论

2.1 全麦粉基本指标

由全籽粒粉碎制取的全麦粉其破损淀粉含量较高, 能满足发酵过程中所需的淀粉。

表 1 面粉的基本指标

Table 1 Basic indicators of flour (%)

蛋白含量	膳食纤维	水分	灰分	粗淀粉	破损淀粉
14.01±0.23	14.25±0.54	12.57±0.11	1.74±0.09	65.15±0.98	19.05±0.15

2.2 菌种的生长曲线

菌种生长曲线是判定菌种生长状态和确定最佳培养时间的重要参数。图 1 是在 37 °C 下测定的 *Lac* 和 *Lbr* 生长曲线。经过 2 h 的延滞期后快速到达对数期，分别在 10 h（菌体密度达到 10⁸ CFU/mL）和 8 h（菌体密度达到 10⁹ CFU/mL）到达对数后期，因此在 *Lac* 和 *Lbr* 分别选发酵至 10 h 和 8 h 的菌液制作发酵面团。

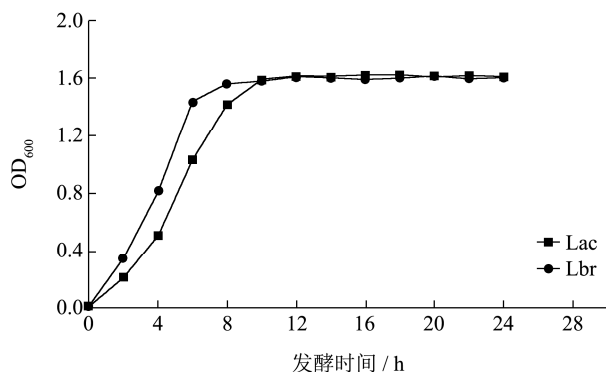


图 1 菌种生长曲线

Fig.1 The growth curve of the strains

2.3 发酵过程中 pH 和 TTA 值的变化

在面团发酵过程中，pH 值是评判微生物发酵能力的一个重要指标，图 2 是发酵过程中面团 pH 值和 TTA 变化情况。由图 2 可以观察到随着发酵时间增加，面团的 pH 值显著降低 ($p < 0.05$)，尤其是在 0~6 h 下降的更剧烈，这是因为在初始阶段乳酸菌的生长环境较为适合并且营养物质丰富，使得乳酸菌快速生长繁殖代谢，导致 pH 值的迅速下降，在发酵后期由于环境变化和代谢产物的积累，导致乳酸菌发酵活力降低，代谢繁殖缓慢^[24]。由图 2 可以看出，在发酵 12 h 后面团的 pH 值分别从 6.88 降低到 5.88、4.23、4.07、3.64、3.83，即下降程度为 $cel/Pn < Lac < Lac-cel/Pn < Lbr-cel/Pn < Lbr$ 。植物乳杆菌是同型发酵乳酸菌，主要的代谢产物是乳酸，短乳杆菌是异型发酵，其代谢产物是乳酸、乙酸和一些其他化合物。以上的结果显示异型乳酸发酵有更强更快的产酸能力。这与卫娟等^[24]的研究一致，他们报道了异型发酵有更强的产酸能力。图 2 中 TTA 值也验证出 *Lbr* 具有更强的产酸能力。同时通过对比发现，*Lbr* 和酶的共同作用会延缓面团 pH 值的迅速下降，这两种酸度分布的差异可能是由于全麦面团系统中存在某些具有一定缓冲能力的化合物^[25]。但是 *Lac* 和酶作用没有观察到这种协同作用，显示出协同作用的 pH 值降低更多，这可能是代谢物质中存在某些能与 H⁺ 反应的物质，降低了

可检测到的 H⁺ 浓度。

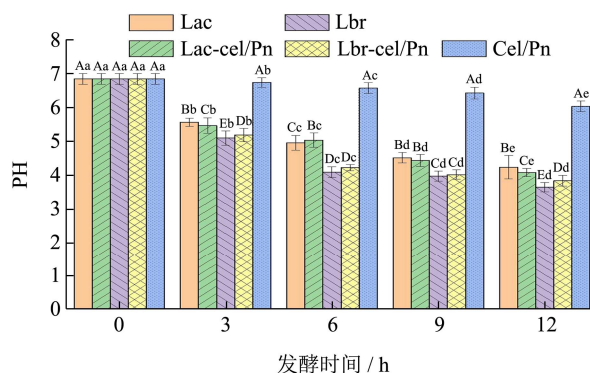


图 2 不同发酵时间 pH 值的变化

Fig.2 pH value of different fermentation time

注：同列小写字母不同字母代表发酵时间上含量的差异，同行不同大写字母代表种类之间含量的差异 ($p < 0.05$)。下同。

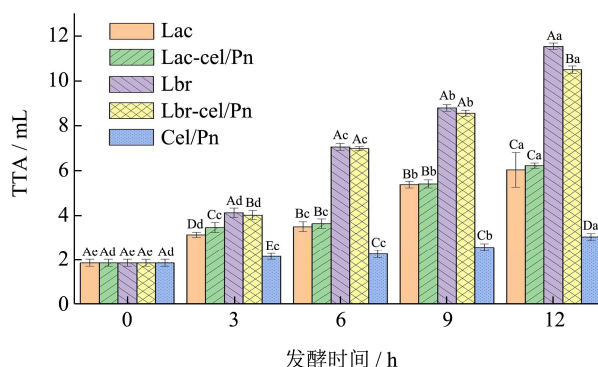


图 3 不同发酵时间 TTA 的变化

Fig.3 TTA value of different fermentation time

2.4 发酵过程膳食纤维含量变化

膳食纤维含量的变化如表 2 所示，可以观察到 *Lac/Lbr-Cel/Pn* 处理将 TDF 含量从 14.61% 降低至 9.86% 和 9.70%，而在发酵 12 h 后 *Lac* 和 *Lbr* 的膳食纤维含量分别为 11.09% 和 11.12%，本研究中的处理方法均发生了膳食纤维的降解，并且在酶的作用下降解更显著，但是在不同发酵类型的 *Lac* 和 *Lbr* 发酵后，全麦粉中的 TDF 含量没有显著变化，这说明同型或异型的发酵途径对 TDF 的降解没有显著影响，一部分是酸水解非淀粉多糖的作用，更多的是激活内源酶产生的作用^[26]。在单独的酶作用时，发酵 12 h 后其 SDF 的含量为 2.45%，要明显小于 *Lac-Cel/Pn* 和 *Lbr-Cel/Pn* 的 2.72% 和 3.22%，这表明在对膳食纤维进行降解时，乳酸菌和酶有很明显的协同作用，单纯的酶处理效果远小于酶和乳酸菌的共同作用，这可能是单一酶的环境 pH 值较高，纤维素酶和戊聚糖酶最适 pH 在 4.5~5.5 之间，起初 pH 值过高导致酶不能很好的作用，随着发酵时间的延长达到最适环境，降解速度加快，从表 2 单一酶处理中膳食纤维含量变化

可以看到,随着时间延长,导致 IDF 降解速度和 SDF 升高速度加快。而且 *Lac*-Cel/Pn 和 *Lbr*-Cel/Pn 两种处理方法也观察到在相似现象。Zhao 等^[28]在用保加利

亚乳杆菌和嗜热链球菌发酵麸皮也发现可溶性膳食纤维的增加,他认为是乳酸菌激活内源酶或产生一些水解酶导致大分子的膳食纤维被降解。

表 2 不同发酵时间的膳食纤维含量

Table 2 Dietary fiber content at different fermentation time

时间/h	<i>Lac</i>		<i>Lac</i> -Cel/Pn		<i>Lbr</i>		<i>Lbr</i> -Cel/Pn		Cel/Pn	
	IDF/%	SDF/%	IDF/%	SDF/%	IDF/%	SDF/%	IDF/%	SDF/%	IDF/%	SDF/%
0	13.12±0.12 ^{aA}	1.49±0.07 ^{eA}	13.12±0.12 ^{aA}	1.49±0.07 ^{eA}	13.12±0.12 ^{aA}	1.49±0.07 ^{eA}	13.12±0.12 ^{aA}	1.49±0.07 ^{eA}	13.12±0.12 ^{aA}	1.49±0.07 ^{eA}
3	11.05±0.04 ^{bA}	1.47±0.06 ^{dD}	10.66±0.04 ^{bB}	1.88±0.05 ^{dB}	11.05±0.02 ^{bA}	1.64±0.07 ^{dC}	10.25±0.01 ^{bD}	2.26±0.03 ^{dA}	10.42±0.01 ^{bC}	1.46±0.03 ^{cD}
6	9.95±0.06 ^{cB}	1.95±0.06 ^{cC}	9.65±0.02 ^{cC}	2.35±0.06 ^{cB}	10.29±0.06 ^{cA}	1.83±0.06 ^{cD}	9.21±0.00 ^{cE}	2.54±0.02 ^{cA}	9.55±0.04 ^{cD}	1.54±0.05 ^{cE}
9	9.47±0.05 ^{dA}	2.20±0.04 ^{bC}	8.02±0.02 ^{dB}	2.59±0.03 ^{bB}	9.46±0.07 ^{dA}	2.19±0.06 ^{bC}	7.87±0.04 ^{dC}	2.97±0.04 ^{bA}	7.91±0.04 ^{dC}	1.97±0.02 ^{bD}
12	8.72±0.02 ^{eA}	2.37±0.07 ^{aD}	6.99±0.05 ^{eC}	2.72±0.04 ^{aB}	8.57±0.10 ^{eB}	2.55±0.07 ^{aC}	6.84±0.04 ^{eD}	3.22±0.08 ^{aA}	7.04±0.06 ^{eC}	2.49±0.06 ^{aC}

注:“±”代表标准偏差;同列不同小写字母代表发酵时间上含量的差异,同行不同大写字母代表种类之间含量的差异($p<0.05$)。下表同。

表 3 不同发酵时间的戊聚糖含量

Table 3 Pentosan content at different fermentation times

时间/h	<i>Lac</i>		<i>Lac</i> -Cel/Pn		<i>Lbr</i>		<i>Lbr</i> -Cel/Pn		Cel/Pn	
	SAX/%	TAX/%	SAX/%	TAX/%	SAX/%	TAX/%	SAX/%	TAX/%	SAX/%	TAX/%
0	1.93±0.12 ^{dA}	8.82±0.07 ^{aA}	1.93±0.12 ^{eA}	8.82±0.07 ^{aA}	1.93±0.12 ^{eA}	8.82±0.07 ^{aA}	1.93±0.12 ^{eA}	8.82±0.07 ^{aA}	1.93±0.12 ^{eA}	8.82±0.07 ^{aA}
3	2.56±0.04 ^{cC}	8.60±0.06 ^{bA}	3.10±0.04 ^{dA}	8.43±0.05 ^{bB}	2.41±0.02 ^{dD}	8.60±0.07 ^{bA}	2.98±0.01 ^{dB}	8.26±0.03 ^{bC}	2.22±0.03 ^{dE}	8.47±0.01 ^{bB}
6	2.73±0.06 ^{bD}	8.57±0.06 ^{cA}	3.88±0.02 ^{cA}	7.94±0.06 ^{cD}	2.63±0.06 ^{eE}	8.36±0.06 ^{cB}	3.69±0.00 ^{cB}	8.03±0.02 ^{cC}	3.50±0.05 ^{cC}	8.05±0.04 ^{cC}
9	2.90±0.05 ^{aD}	8.47±0.04 ^{dA}	4.17±0.02 ^{bA}	7.89±0.03 ^{cB}	2.99±0.07 ^{bC}	7.90±0.06 ^{dB}	4.11±0.04 ^{bAB}	7.76±0.04 ^{dD}	4.08±0.02 ^{bB}	7.87±0.04 ^{dC}
12	2.99±0.02 ^{aD}	8.43±0.07 ^{dA}	4.67±0.05 ^{aA}	7.48±0.04 ^{dC}	3.21±0.10 ^{aC}	7.84±0.07 ^B	4.53±0.04 ^{aB}	7.20±0.08 ^{dD}	4.56±0.01 ^{aB}	7.54±0.06 ^{cC}

2.5 发酵过程戊聚糖含量的变化

戊聚糖是细胞壁的重要组成成分,能通过阿魏酸共价链接形成戊聚糖聚合物,具有很强的吸水能力。是面团的重要组成体系,而且由于全麦粉含有大量的外果皮导致其在全麦体系中含量很高。根据溶解性可分为水溶戊聚糖(SAX)和水不溶戊聚糖(IAX)^[3]。水溶性戊聚糖主要作用于面团气室液膜,能增强液膜的刚性和稳定性,同时也能增加面团水相的黏度,增强面团的稳定性。不溶性的戊聚糖是很好的益生元成分,能调节肠道功能,AX 可以被特定的酶部分降解,如内切戊聚糖酶,它在内部水解 AX 的戊聚糖骨架,并强烈影响其分子量、水提取性和一些功能特性^[26,27]。表 3 中数据显示出,在不添加外源酶的情况下,*Lac* 总戊聚糖从 8.82%降低到 8.43%,而 *Lbr* 从 8.82%降低到 7.84%,这表明在单一乳酸菌发酵的情况时 *Lac* 对戊聚糖的降解作用不明显。而 *Lbr* 发酵则显著降低,事实上在乳酸发酵过程中,葡萄糖在葡萄糖酶作用下会沿着 6-磷酸葡萄糖途径进行发酵生成乳酸和乙酸盐,这说明只有异型发酵乳酸菌才能代谢戊聚糖^[28]。而在 *Lac* 发酵中这种轻微的降解更多是短链的戊聚糖被酸分解。发现在单独使用乳酸菌发酵后

IAX 含量都有明显的增加,这表明无论是何种发酵途径都能产生戊聚糖的增溶现象。可能是降解产生的一些酶降解了高分子的不溶性戊聚糖,成为可溶性小分子的戊聚糖。添加 Cel/Pn 的三种发酵方式 *Lbr*-Cel/Pn、*Lac*-Cel/Pn、Cel/Pn,其总戊聚糖含量分别为 7.20%、7.48%、7.54%,这表明乳酸菌和外源酶在降解戊聚糖时有协同作用。这可能是在发酵过程中乳酸菌发酵的产物能更快的激活酶的活性增强酶活力,并且在异型发酵途径有更明显的作用效果。

2.6 植酸含量和植酸酶活性

植酸(磷酸或肌醇六磷酸)可以螯合沉淀多价阳离子矿物质,并且会降低钙、镁以及微量元素如铁和锌的利用度^[29]。全谷物小麦中矿物质的生物利用率可以通过植酸酶的作用来提高,植酸酶是一种能够将磷酸水解为游离无机磷酸盐和肌醇磷酸酯的磷酸单酯酶。由图 4 可知,在发酵时间为 6 h 的时候,植酸酶的活性显示出最高值,有研究表明,植物植酸酶的最适 pH 值为 4.8~5.5,当 pH 值偏离最佳值时,植酸酶的活性会显著降低^[30]。本研究在后续的乳酸菌发酵中 pH 值降低导致植酸酶活性降低证实了这一观点。并且发现 *Lac* 的植酸酶活性要更高,这与前人研

究一致，只有淀粉乳杆菌和植物乳杆菌被报道产生显著的胞外植酸酶活性^[31]。在图5的植酸含量变化中可以发现，植酸含量降低也主要发生在3~9 h，其中Lac和Lac-Cel/Pn发酵引起的变化更显著，分别从2.92 mg/g下降到1.38 mg/g和1.03 mg/g。在乳酸菌发酵过程中发现植酸含量的降低可能是由于内源植物植酸酶的活化或发酵过程中pH值下降导致的肌醇六磷酸和蛋白质的共沉淀^[32]，这是两个影响植酸含量变化的主要因素。而在单独酶处理12 h没有发现植酸含量的明显变化 ($p>0.05$)，其含量从2.97 mg/g下降到2.91 mg/g，这也表明在较高的pH值下，肌醇六磷酸的降解轻微，环境对植酸降解影响显著。在图4中发现Lac-Cel/Pn和Lbr-Cel/Pn的植酸酶活性要远高于Cel/Pn，在发酵到6 h后分别高达3.71倍和2.71倍，这说明单一的酶处理对于植酸含量的影响是很小的，更多的是乳酸菌发酵改变环境激活植酸酶导致植酸的降解。

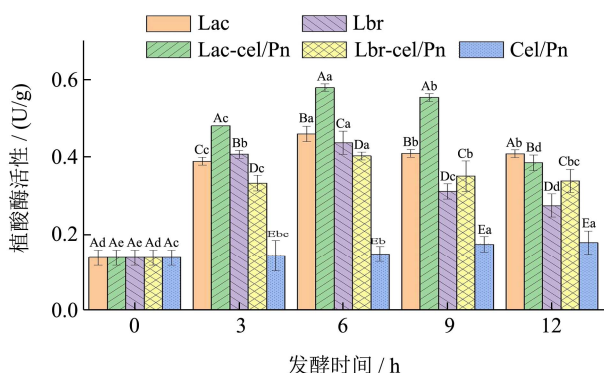


图4 不同发酵时间的植酸酶活性

Fig.4 Phytase activity at different fermentation times

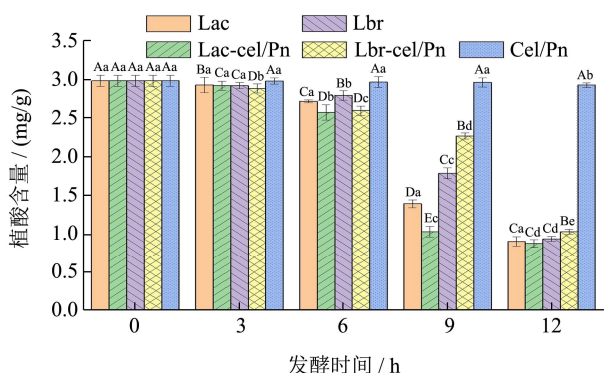


图5 不同发酵时间的植酸含量

Fig.5 Phytic acid content at different fermentation times

2.7 总游离酚含量变化

酚类物质分为游离酚和结合酚，在全麦粉中酚类物质主要以结合酚的形式存在^[33]。但是已经证实，人体内的酶不能消化结合酚类物质，食品中的结合酚主要是在小肠中通过微生物发酵被释放出^[34]，但是

在小肠中的消化利用率较低，所以可以通过适当处理全麦粉达到释放酚类物质的目的。由图6可以看出乳酸菌发酵能明显增加甲醇提取液中酚类物质的含量，并且随着乳酸菌发酵的进行，对于结合酚类物质的释放有明显的促进作用。经过不同的处理方式对比，发现Lac-Cel/Pn和Lbr-Cel/Pn的总游离酚含量分别增加110.55%和95.94%。而Lac和Lbr单独处理中，检测到的酚类物质含量分别增加96.79%和89.88%。这说明两者具有协同作用能快速增加酚类物质含量。应该是酶和乳酸菌的协同作用破坏了细胞壁的完整性，果皮种皮和糊粉层中的结合酚被释放，导致可检测到酚类物质含量增加。另外发酵导致高分子酚的转化和解聚，微生物酶水解酚苷并释放具有抗氧化活性的苷元也是提高抗氧化性的重要手段^[36]。对于Cel/Pn处理的样品从3 h的50.79 mg/g增加到12 h的69.77 mg/g，含量增加的原因更多是pH值降低导致的，促进了一系列的反应导致酚类物质的释放。

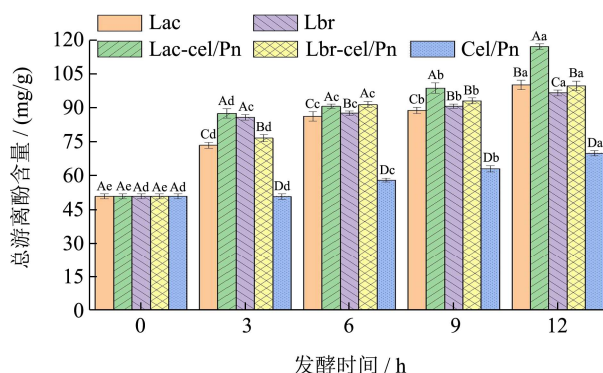


图6 不同发酵时间总游离酚含量

Fig.6 Total free phenol content at different fermentation times

2.8 抗氧化特性分析

在图7和图8中可以发现随着发酵时间的增加，全麦粉的抗氧化性有不同程度的增加在图7中可以看到Lac-Cel/Pn在发酵12 h后DPPH清除能力最高达到了52.59 mg TE/100 g DW，而在其次是Lbr-Cel/Pn和Lac交替增加，分别为50.29 mg TE/100 g DW和48.13 mg TE/100 g DW，所有的处理方法中Cel/Pn的增加幅度是最小的，从27.50 mg TE/100 g DW增加到42.24 mg TE/100 g DW。这表明单独的乳酸菌发酵对全麦粉抗氧化效果的影响要大于单独的酶处理，但是酶和乳酸菌发酵有协同作用。主要是因为乳酸菌代谢过程的多种生物化学变化和酶的水解作用能破碎糊粉层和皮层的细胞壁，最终使得与多糖、蛋白质、纤维素共价结合的抗氧化性物质释放^[37]。图8表明铁离子还原能力随着发酵时间增加而增加。在Lac-Cel/Pn和Lac的处理中，两者的还原能力是交替增加的，并不

是 *Lac-Cel/Pn* 一直最高。这说明抗氧化性与游离酚含量存在相关性，但并不是强烈的正相关关系。如在发酵 12 h 的时候 *Lac-Cel/Pn* 和 *Lac* 的处理方式其酚含量分别为 116.9 mg/100 g 和 99.95 mg/100 g，但是其铁离子还原能力分别为 246.46 和 255.17 mg TE/100 g DW。这可能是：一方面，抗氧化性由不同的物质组成。如多酚、黄酮、花青素；另一方面，不同的抗氧化物之间的作用使得抗氧化性不只是与其含量相关，也与抗氧化物质结构和之间相互作用有关^[38]。

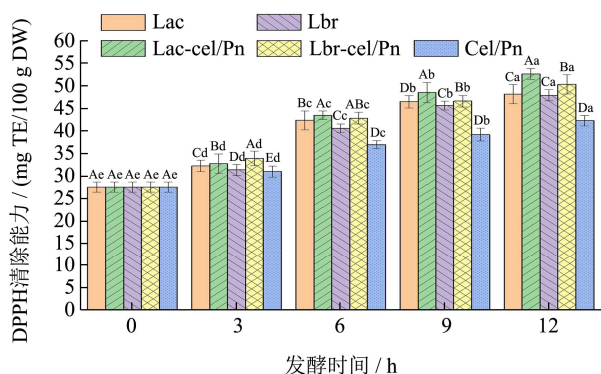


图7 不同发酵时间 DPPH 清除能力

Fig.7 DPPH scavenging ability at different fermentation times

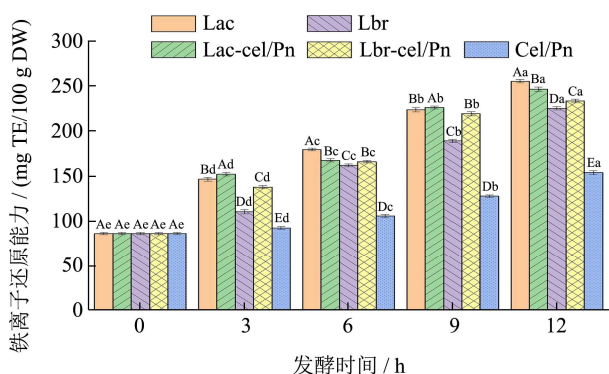


图8 不同发酵时间铁离子还原能力

Fig.8 Iron reduction capacity at different fermentation times

3 结论

在本实验中探究乳酸菌和酶处理对全麦粉营养品质的影响。结果表明，酶和乳酸菌发酵在改善全麦粉营养品质上有明显的协同作用，经过发酵后，全麦粉的植酸酶活性有了一定的提高，植酸被降解，增加了矿物质的利用程度。此外乳酸菌协同酶处理增加了可溶性膳食纤维和可溶性戊聚糖的成分，改善了面团的加工性能。在研究中发现乳酸菌和酶能协同释放酚类物质，提高全麦粉的抗氧化性，乳酸菌和酶处理在改善全麦粉营养品质上有着明显作用，为全麦制品的加工提供一种良好的途径。

参考文献

- [1] Macagnan F T, Da Silva L P, Hecktheuer L H. Dietary fibre: the scientific search for an ideal definition and methodology of analysis, and its physiological importance as a carrier of bioactive compounds [J]. Food Res Int, 2016, 85: 144-154
- [2] Saa D T, Di Silvestro R, Nissen L, et al. Effect of sourdough fermentation and baking process severity on bioactive fiber compounds in immature and ripe wheat flour bread [J]. LWT - Food Science and Technology, 2018, 89: 322-328
- [3] Ragaee S, Guzar I, Dhull N, et al. Effects of fiber addition on antioxidant capacity and nutritional quality of wheat bread [J]. LWT - Food Science and Technology, 2011, 44(10): 2147-2153
- [4] Messia M C, Reale A, Maiuro L, et al. Effects of pre-fermented wheat bran on dough and bread characteristics [J]. Journal of Cereal Science, 2016, 69: 138-144
- [5] Yildirim R M, Arici M. Effect of the fermentation temperature on the degradation of phytic acid in whole-wheat sourdough bread [J]. LWT - Food Science and Technology, 2019, 112: 108224
- [6] Han W, Ma S, Li L, et al. Gluten aggregation behavior in gluten and gluten-starch doughs after wheat bran dietary fiber addition [J]. LWT - Food Science and Technology, 2019, 106: 1-6
- [7] Zhou Y, Dhital S, Zhao C, et al. Dietary fiber-gluten protein interaction in wheat flour dough: analysis, consequences and proposed mechanisms [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111: 106203
- [8] Ma S, Wang Z, Liu N, et al. Effect of wheat bran dietary fibre on the rheological properties of dough during fermentation and Chinese steamed bread quality [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2020, 56(4): 1623-1630
- [9] Zhang H, Wang H, Cao X, et al. Preparation and modification of high dietary fiber flour: a review [J]. Food Res Int, 2018, 113: 24-35
- [10] Hu Y, Wang L, Li Z. Superheated steam treatment on wheat bran: enzymes inactivation and nutritional attributes retention [J]. LWT - Food Science and Technology, 2018, 91: 446-452
- [11] Gobbetti M, Rizzello C G, Cagno R D, et al. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods [J]. Food Microbiology, 2014, 37: 30-40
- [12] Zhang G, Zhang W, Sadiq F A, et al. Microbiota succession and metabolite changes during the traditional sourdough fermentation of Chinese steamed bread [J]. Cyta Journal of Food, 2019, 17(1): 172-179
- [13] Reale A, Konietzny U, Coppola R, et al. The importance of

- lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2007, 55(8): 2993
- [14] Gupta R K, Gangoliya S S, Singh N K. Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains [J]. *Journal of Food Science Technology*, 2015, 52(2): 676-84
- [15] Courtin C M, Delcour J A. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making [J]. *Journal of Cereal Science*, 2002, 35(3): 225-243
- [16] Barron C, Bar-L'hegouac'h C, Champ M, et al. Arabinoxylan content and grain tissue distribution are good predictors of the dietary fibre content and their nutritional properties in wheat products [J]. *Food Chemistry*, 2020, 328: 127111
- [17] Shivhare G G U S, Banerjee U C. Effect of xylanase on quality attributes of whole-wheat bread [J]. *Journal of Food Quality*, 2013, 36(3): 172-180
- [18] 蔺艳君. 复合酶处理对全麦馒头品质的改良作用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016
- LIN Yanjun. Quality improvement of whole wheat Chinese steamed bread with compound enzyme [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016
- [19] 张俊, 许超, 张宇, 等. 纤维素酶降解机理的研究进展[J]. 华南理工大学学报, 2019, 396(9): 127-136
- ZHANG Jun, XU Chao, ZHANG Yu, et al. Research progress on cellulase biodegradation mechanism [J]. *Journal of South China University of Technology*, 2019, 396(9): 127-136
- [20] 高杨. 阿拉伯木聚糖对小麦淀粉、蛋白分离的影响[D]. 郑州: 河南工业大学, 2012
- GAO Yang. Effect of arabinoxylan on the isolation of gluten and starches [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2012
- [21] 张成龙. 全麦粉品质改良研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2013
- ZHANG Chenglong. Study on quality improvement of whole wheat flour [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2013
- [22] Hu F, Lu R, Bao H, et al. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants [J]. *Fitoterapia*, 2004, 75(1): 14-23
- [23] 袁佐云. 全麦粉抗氧化特性及全麦馒头品质改良研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016
- YUAN Zuoyun. Study on antioxidant activity of whole wheat flour and quality improvement of whole wheat Chinese steamed bread [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016
- [24] 闫征, 王昌禄, 顾晓波. pH 值对乳酸菌生长和乳酸产量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(6): 35-38
- YAN Zheng, WANG Changlu, GU Xiaobo. Influence of pH on the growth of *Lactobacillus casei* G-7 and lactic acid production [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2003, 29(6): 35-38
- [25] 卫娟, 洪静, 郑学玲. 酸面团发酵过程中面团流变及面筋蛋白降解变化研究[J]. 食品科技, 2021, 46(3): 129-134
- WEI Juan, HONG Jing, ZHENG Xueling. Study on dough rheology and gluten degradation changes during sourdough fermentation [J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(3): 129-134
- [26] Kim Y, Huang W, Zhu H, et al. Spontaneous sourdough processing of Chinese northern-style steamed breads and their volatile compounds [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(2): 685-692
- [27] Costa R D S, De Almeida S S, Cavalcanti E D C, et al. Enzymes produced by solid state fermentation of agro-industrial by-products release ferulic acid in bioprocessed whole-wheat breads [J]. *Food Research International*, 2021, 140: 109843
- [28] Zhao H M, Guo X N, Zhu K X. Impact of solid state fermentation on nutritional, physical and flavor properties of wheat bran [J]. *Food Chemistry*, 2017, 217: 28-36
- [29] Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1983, 49(3): 209-224
- [30] Fanny, Leenhardt, Marie-Anne, et al. Moderate decrease of pH by sourdough fermentation is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through endogenous phytase activity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(1): 98-102
- [31] M, Türk, et al. Phytate degradation during breadmaking: effect of phytase addition [J]. *Journal of Cereal Science*, 1992, 15(3): 281-294
- [32] Sreeramulu G, Srinivasa D S, Nand K, et al. *Lactobacillus amylovorus* as a phytase producer in submerged culture [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 23(6): 385-388
- [33] Reale A, Konietzny U, Coppola R, et al. The importance of lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(8): 2993
- [34] Rui H L J J O C E. Whole grain phytochemicals and health [J]. *Journal of Cereal Science*, 2007, 46(3): 732-737