

文章编号:1673-2383(2018)01-0021-05

网络出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1378.N.20180209.1423.008.html>

网络出版时间:2018-2-9 14:24:21

# 速冻和缓冻处理对冷冻酸面团中乳酸菌活力的影响

陈 迪,张 滨,王金水\*

(河南工业大学 生物工程学院,河南 郑州 450001)

**摘要:**酸面团是我国传统面制食品发酵剂,由于其组分复杂难以实现商品化生产。食品冷冻技术为酸面团的保存提供了新的研究思路,但低温会影响乳酸菌的活力。为了找到适合于酸面团的冷冻保藏方法,比较了速冻(-80℃冷冻 18 min)和缓冻(-20℃冷冻 1 h)处理对冷冻酸面团中乳酸菌在冻藏期间(-20℃,28 d)活力的影响,结果表明:随着冻藏时间的延长,乳酸菌的存活率和产酸能力显著下降;相同冻藏时间下,速冻组的存活率高于缓冻组;在冻藏 28 d 后,速冻组乳酸菌的存活率是缓冻组的 1.2 倍。在冻藏前期(0~7 d),两种处理条件下乳酸菌的产酸能力没有显著变化;在冻藏中后期(14~28 d),速冻组酸面团的 pH 显著低于缓冻组,而总酸度值显著高于缓冻组,说明在冻藏中后期速冻组乳酸菌的产酸能力高于缓冻组。总体而言,在冻藏期间速冻处理比缓冻处理更好地保持了酸面团中乳酸菌的活力,研究结果可为实现酸面团的商品化生产提供技术支撑。

**关键词:**冷冻酸面团;速冻;缓冻;存活率;产酸能力

**中图分类号:**TS211.4

**文献标志码:**B

## 0 引言

酸面团是由面粉和水混合、在微生物作用下形成的传统面制食品(面包、馒头等)发酵剂。酸面团中微生物种类繁多,乳酸菌是其中典型且重要的一类微生物。乳酸菌在面团发酵过程中代谢旺盛,其通过降解蛋白质、糖类等成分,产生肽类、氨基酸、乳酸等多种化合物,改善面团的特性,赋予面团新的风味,提高面制品营养价值<sup>[1-7]</sup>。然而,由于乳酸菌代谢的活跃性和酸面团组成成分的复杂性,使酸面团在保存过程中难以实现稳定的品质控制,制约了其商品化生产。

食品冷冻技术是延长食品保存期限的有效方法,通过冷冻冻藏工艺制备冷冻酸面团,为实现酸面团的稳定保存提供了新的研究思路,但低温会

影响乳酸菌的生理活性。在酸面团冷冻过程中,乳酸菌细胞内外水分冻结成冰,冰晶生长产生的机械应力会破坏细胞膜结构,同时,细胞内水分含量的变化会造成胞内外电解质发生浓缩,从而影响细胞的生理、代谢功能<sup>[8-9]</sup>。因此,控制冷冻酸面团中冰晶形成和水分变化成为保持其中乳酸菌活力的重要手段。有研究表明,冻结速率是影响冷冻食品体系中冰晶形成和水分变化的关键因素<sup>[10]</sup>。慢速冻结条件下,冰晶先在细胞外形成,胞内水分在渗透压差作用下向外渗透,导致细胞脱水。快速冻结条件下,冰晶形成的速率大于水分迁移的速率,细胞内外几乎同时形成数量多而体积小冰晶,对细胞损伤小<sup>[11-13]</sup>。

目前国内外关于冷冻酸面团的报道,主要是通过添加抗冻剂的方法保持乳酸菌的活力,但使用添加剂可能会影响酸面团制品的风味,同时提高了生产成本。而从冷冻酸面团体系(冰/水-乳酸菌-小麦粉)自身出发,通过控制冻结速率以保持乳酸菌活力的研究并不多见。因此,作者拟通过比较速冻和缓冻两种处理方法对冷冻酸面团中乳酸菌活力的影响,找到更适合酸面团的冷冻保藏条件,为实现冷冻酸面团的商品化生产提供技术参考。

收稿日期:2017-04-20

基金项目:国家自然科学基金项目(31571780);河南省高等学校重点科研项目(18A550002);河南工业大学高层次人才科研启动基金项目(31401078);河南工业大学校基金(2017QNJH11)

作者简介:陈迪(1986—),女,河南洛阳人,博士,讲师,研究方向为食品生物技术。

\*通信作者:王金水,教授,E-mail:jinshuiw@163.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

乳酸菌: 植物乳杆菌 M616, 按照 2% 接种量 (V/V) 接种于 MRS 液体培养基培养 12~16 h, 充分活化到最佳状态。

MRS 液体培养基: 蛋白胨 1.0 g, 酵母膏 0.5 g, 葡萄糖 2.0 g,  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.058 g, 牛肉膏 1.0 g, 柠檬酸氢二胺 0.2 g, 吐温-80 0.1 mL,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.025 g, 蒸馏水 100 mL, 调节 pH 6.2~6.6<sup>[14]</sup>。

MRS 固体培养基: 在 MRS 液体培养基的基础上加入琼脂 15 g/L, 调节 pH 6.2~6.6。

### 1.2 仪器与设备

Forma 88000 超低温冰箱: 美国 Thermo 公司; BCD-227CHT 冰箱: 河南新飞电器有限公司; SW-CJ-1F 超净工作台: 苏州净化设备有限公司; SPX-150BS-II 生化培养箱: 上海新苗医疗器械制造有限公司; FE20 pH 计: 梅特勒-托利仪器(上海)有限公司; X1 台式离心机: 美国 Thermo 公司; K 型热电偶: 深圳市源恒通科技有限公司。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 冷冻酸面团制备

在无菌条件下取已活化培养 16 h 的乳酸菌 2% 接种到 75 mL 的 MRS 液体培养基中, 于 37 °C 培养 8 h 后取 50 mL 培养基以 3 000 g 离心洗涤 2 次, 备用。取 200 g 面粉和 100 g 乳酸菌菌悬液混合制备乳酸菌面团(植物乳酸菌的加入量为 8.0 lg cfu/g)<sup>[15]</sup>。将制备好的面团分块置于 37 °C 培养箱内发酵 24 h。发酵结束后, 对酸面团进行冷冻处理, 第一组样品置于 -80 °C 下速冻 18 min, 第二组样本置于 -20 °C 缓冻 1 h, 至面团中心温度降到 -18 °C, 将两组样品均置于 -20 °C 条件下冻藏 28 d。每隔 7 d 测定两组酸面团中乳酸菌存活率和产酸能力。

#### 1.3.2 乳酸菌存活率的测定

按照 GB 4789.2—2010 方法测定活菌数。

乳酸菌存活率=(冻藏后乳酸菌的活菌数/冻藏前乳酸菌的活菌数)×100%。

#### 1.3.3 pH 及总酸度的测定

取出 -20 °C 冻藏的酸面团置于 30 °C 下解冻 5 min, 取 1.0 g 酸面团接入 150 mL MRS 液体培养基, 测定 36 h 内培养液 pH 值变化, 以时间为横坐标, pH 值为纵坐标绘制菌体 pH 曲线。同时, 以酚酞为指示剂, 用 0.1 mol/L NaOH 滴定培养液 pH 至 8.5, 以时间为横坐标, NaOH 消耗的体积为纵坐标绘制菌体 TTA 曲线。

#### 1.3.4 数据分析

数据均为 3 次平行试验计算得出的平均值, 用 SPSS 17.0 及 Origin 8.5.1 进行数据处理及绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 速冻和缓冻条件下酸面团中心温度变化

将 K 型热电偶的探头插入制备好的酸面团的中心位置, 放入冰箱中冻藏, 记录面团中心温度的数据变化, 绘制酸面团冻结温度曲线, 如图 1 所示。

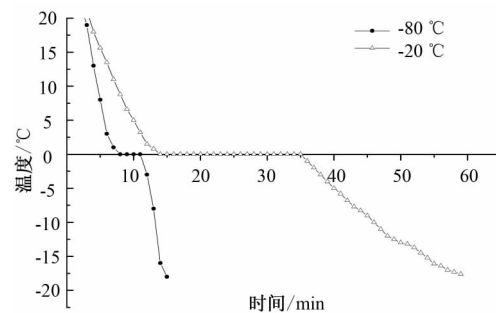


图 1 不同冻结速率下酸面团冻结温度曲线

Fig.1 Freezing temperature curve of sourdough at different freezing rates

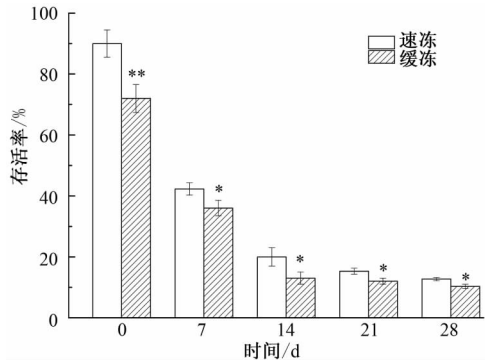
食品的冻结曲线分为 3 个阶段: 第 1 阶段, 当食品刚被冷却时, 温度下降较快, 但降至某一温度时, 水分冻结成冰, 该温度为食品冻结点, 此阶段曲线斜率大; 第 2 阶段, 当食品继续冷却, 冷量主要来自于水分冻结成冰释放的大量潜热, 食品温度基本恒定, 该阶段曲线平坦, 这段温度区间通常在 -1~-5 °C, 称为最大冰晶生成带; 此后, 食品温度又快速下降, 直到冻结结束<sup>[16-17]</sup>。

由图 1 可知, 速冻和缓冻条件下酸面团的冻结温度曲线明显不同。速冻处理使酸面团中心温度下降至冻结点的速率高于 -20 °C。速冻和缓冻两种处理条件下酸面团中心温度从 -1 °C 降到 -5 °C 的时间分别为 4 min 和 30 min, 速冻处理使酸面团通过最大冰晶生成带的时间显著小于缓冻条件。在此温度带中, 食品内部 80% 以上水分冻结成冰, 快速通过该区段, 冰晶的成核作用大于晶体生长作用, 形成的冰晶体数量多, 体积小, 对组织细胞的损伤小<sup>[18]</sup>。由此可知, 与缓冻相比速冻处理对酸面团的组织结构影响可能较小。

### 2.2 速冻和缓冻处理条件对酸面团中乳酸菌存活率的影响

在食品冻结过程中, 冰晶生长所造成的“机械损伤”以及水分变化引起的“溶质效应”都会造成

乳酸菌细胞膜损伤,从而影响乳酸菌的存活数。为了比较速冻和缓冻处理对酸面团中乳酸菌在冻藏期间存活率的影响,将酸面团分别经过速冻和缓冻处理后,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏 28 d,每 7 d 采用平板涂布法测定 1 次存活率,结果如图 2 所示。



注:\*\*表示差异极显著( $P<0.01$ ),\*表示差异显著( $P<0.05$ )。

图 2 冻藏期间酸面团中乳酸菌存活率的变化

Fig.2 Changes in survival rate of lactic acid bacteria of sourdough during frozen storage

速冻组和缓冻组的乳酸菌初始存活率分别是 90%、72%。随着冻藏时间的延长,乳酸菌存活率逐渐下降,在冻藏 28 d 后,两组乳酸菌存活率仅为 12.6%和 10.3%。相同冻藏时间下,速冻组的存活率高于缓冻组。在食品冻藏期间,外界温度的微小波动会引起冰晶的重结晶,加剧对细胞膜结构的损伤,同时,由于酸面团中未添加任何抗冻剂,因而随着冻藏时间的延长,乳酸菌存活率显著下降。此外,速冻组的存活率高于缓冻组的原因可能是因为速冻条件下,乳酸菌细胞内外产生的冰晶数量多且细小均匀,对细胞损伤少,蛋白质变性程度也低。由此可知,相对于缓冻处理,速冻更有利于保持冷冻酸面团中乳酸菌的存活率。

### 2.3 速冻和缓冻处理条件对酸面团中乳酸菌产酸能力的影响

酸面团发酵过程中乳酸菌会产生大量乳酸等有机酸,这些酸类物质会改变面团的 pH,影响内源酶活性,从而增加了面团的风味,改善面团流变学特性及提升面制品营养价值<sup>[19-20]</sup>。因此,保证冷冻酸面团中乳酸菌的产酸能力对于实现酸面团的工业化生产具有重要研究价值。

为了比较速冻和缓冻处理对酸面团中乳酸菌在冻藏期间产酸能力的影响,将酸面团分别经过速冻和缓冻处理后,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏 28 d,每 7 d 取酸面团样品接种于培养基中,监测乳酸菌的产酸能力变化,结果如图 3 所示。

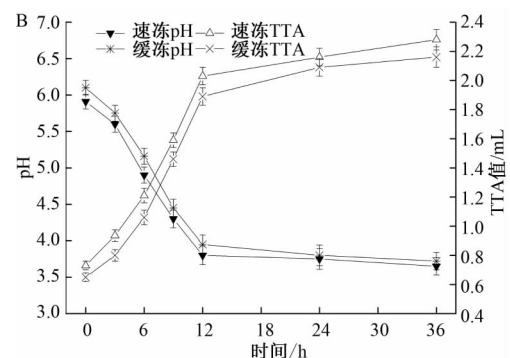
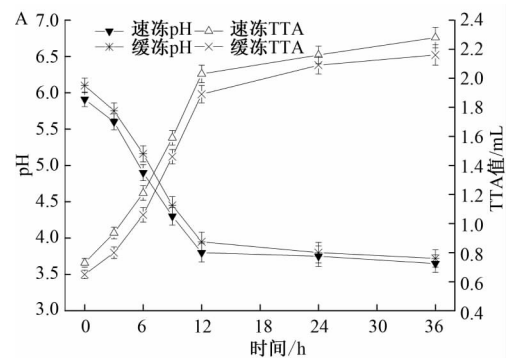
冻藏前期(0~7 d),pH 值及 TTA 曲线在 0~12

h 内迅速下降和上升,说明在此冻藏期乳酸菌的快速产酸阶段集中在 0~12 h;同时,速冻组和缓冻组之间曲线的斜率没有显著差别,说明在冻藏前期乳酸菌的产酸能力没有显著变化。

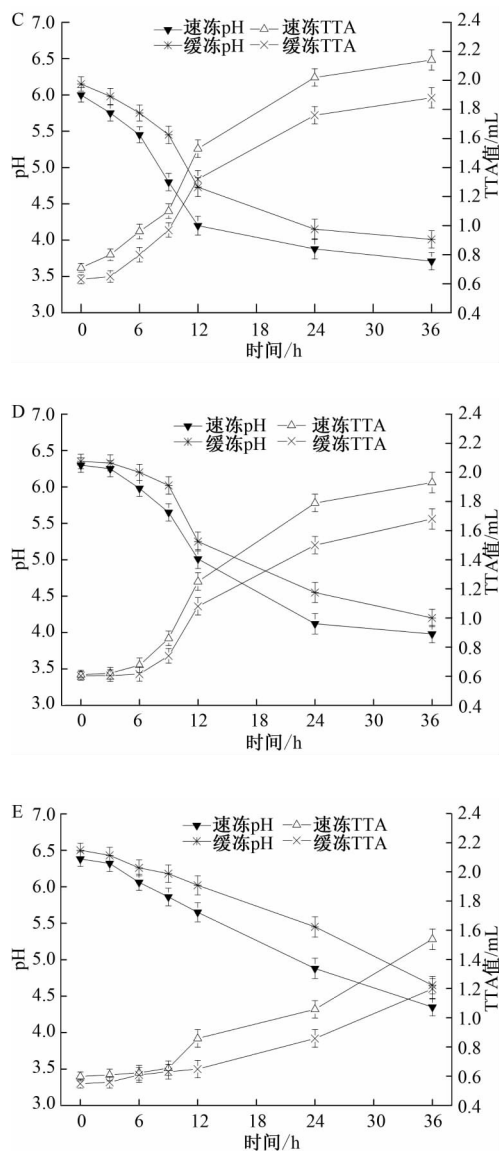
冻藏中期(14~21 d),pH 值及 TTA 曲线在 9~24 h 内迅速下降和上升,说明在此冻藏期乳酸菌的快速产酸阶段集中在 9~24 h。相对冻藏前期,乳酸菌的产酸出现延滞现象,说明随着冻藏时间的延长,乳酸菌的产酸能力在下降;同时,在相同培养时间下,速冻组的 pH 值低于缓冻组,而 TTA 值高于缓冻组,说明速冻处理条件有利于保持乳酸菌的产酸能力。

冻藏后期(28 d),pH 值及 TTA 曲线的变化趋势明显放缓,在 12~36 h 内显著下降和上升。相对冻藏前中期,乳酸菌的产酸出现明显延滞,说明在此冻藏阶段,乳酸菌的产酸能力显著下降;同时,相同培养时间下,速冻组的 pH 值显著低于缓冻组,而 TTA 值显著高于缓冻组。

总体而言,随着冻藏时间的延长,酸面团中乳酸菌的集中产酸时间逐渐延迟,说明乳酸菌的产酸能力逐渐下降。这可能是因为冻藏期间温度波动引起冰晶重结晶,造成胞内外水分不断流失,影响了细胞内正常的生理、代谢功能。在冻藏中后期(14~28 d),相同冻藏时间下,速冻组乳酸菌的产酸能力高于缓冻组。这可能是因为快速冻结条件下,体系中冰层推进的速度大于水分迁移的速度,较好地保持了细胞内外冰晶和水分的分布状态,从而保持了乳酸菌的产酸能力。







注: A:0 d; B:7 d; C:14 d; D:21 d; E:28 d。

图 3 冻藏期间乳酸菌产酸的 pH 值及 TTA 曲线

Fig.3 The pH and TTA curve of lactic acid bacteria during frozen storage

### 3 结论

速冻和缓冻处理条件显著影响了冷冻酸面团中乳酸菌的活力。随着冻藏时间的延长,酸面团中乳酸菌的存活率和产酸能力逐渐下降。在冻藏 28 d 后,速冻和缓冻处理条件下乳酸菌的存活率仅为 12.6% 和 10.3%。相同冻藏时间下,速冻组的存活率高于缓冻组。在冻藏中后期(14~28 d),同一培养时间内速冻组酸面团的 pH 值显著低于缓冻组,而 TTA 值显著高于缓冻组,说明速冻组乳酸菌的产酸能力高于缓冻组。总体而言,在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻藏 28 d 条件下,与缓冻处理相比,速冻处理更好地保持

了酸面团中乳酸菌的活力。本试验结果可以为酸面团的稳定保存提供新的研究思路,为实现传统酸面团的商业化生产提供技术支撑。

### 参考文献:

- [1] 姚国强,李慧,高鹏飞,等.乳酸菌在发酵酸面团中的研究与应用[J].中国食品学报,2013,13(3):163-170.
- [2] KOPE A, PYSZ M, BORCZAK B, et al. Effects of sourdough and dietary fibers on the nutritional quality of breads produced by bake-off technology [J]. Journal of Cereal Science, 2011, 54(3): 499-505.
- [3] RIZZELLO C G, CODA R, MAZZACANE F, et al. Micronized by-products from debranned durum wheat and sourdough fermentation enhanced the nutritional, textural and sensory features of bread [J]. Food Research International, 2012, 46(1): 304-313.
- [4] GOBBETTI M, RIZZELLO C G, DI CAGNO R, et al. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods [J]. Food Microbiology, 2014, 37: 30-40.
- [5] KARILUOTO S, AITTAMAA M, KORHOLA M, et al. Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 106(2): 137-143.
- [6] GUJSKA E, MICHALAK J, KLEPACKA J. Folic acid stability in two types of rye breads during processing and frozen storage [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2009, 64(2): 129-134.
- [7] 段立,黄卫宁,堵国成.提高冷冻酸面团中乳酸菌抗冻性的研究[J].食品科学,2006,27(10):151-154.
- [8] ANGELIS M D, GOBBETTI M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review [J]. Proteomics, 2004, 4(1): 106-122.
- [9] 朱琳,刘宁,张英华,等.乳酸菌细胞膜的冻干损伤[J].食品科学,2006,27(2):266-269.
- [10] 阮征,李汴生,朱志伟,等.不同冻结速率对脆肉鲩鱼片冻结特性的影响研究[J].农业工程学报,2008,24(2):250-254.
- [11] ACKER J P, MCGANN L E. Protective effect of intracellular ice during freezing [J]. Cry-

- obiology, 2003, 46(2):197-202.
- [12] BOSMANS G M, LAGRAIN B, DELEU L J, et al. Assignments of proton populations in dough and bread using NMR relaxometry of starch, gluten, and flour model systems [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(21): 5461-5470.
- [13] LUCUS T, MARIETTE F, DOMINIAWSYK S, et al. Water, ice and sucrose behavior in frozen sucrose-protein solutions as studied by <sup>1</sup>H NMR [J]. Food Chemistry, 2004, 84(1): 77-89.
- [14] 刘变芳, 雒丹, 石磊. 乳酸菌的分离筛选及其微生态制剂的制备[J]. 中国酿造, 2011, 30(10): 91-94.
- [15] 王金水, 杨森, 尹艳丽, 等. 植物乳酸菌 M616 对发酵酸面团发酵特性的影响[J]. 现代食品科技, 2015(4): 83-87.
- [16] 马长伟, 曾名勇. 食品工艺学导论[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2004: 89-91.
- [17] 冯志哲, 沈月新. 食品冷藏学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 48-58.
- [18] 岳宗阳. 冷冻面团在冻结及贮藏期间品质变化机理研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
- [19] RUSSO P, CAPOZZI V, ARENA M P, et al. Riboflavin-overproducing strains of *Lactobacillus fermentum* for riboflavin-enriched bread [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(8): 3691-3700.
- [20] RODRÍGUEZ-PAZO N, VÁZQUEZ-ARAÚJO L, PÉREZ-RODRÍGUEZ N, et al. Cell-free supernatants obtained from fermentation of cheese whey hydrolyzates and phenylpyruvic acid by *Lactobacillus plantarum* as a source of antimicrobial compounds, bacteriocins, and natural aromas [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171(4): 1042-1060.

## EFFECTS OF QUICK-FREEZING AND SLOW-FREEZING ON ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA IN FROZEN SOURDOUGH

CHEN Di, ZHANG Bin, WANG Jinshui

(School of Biotechnology Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** Sourdough is a starter culture of traditional flour products, but it is difficult to realize commercial production due to its complicated components. Food freezing technology is an effective method to control quality stability of sourdough, however, low temperature will affect the activity of lactic acid bacteria. In order to find a freezing preservation method for sourdough, the activity of lactic acid bacteria in frozen sourdough which was treated with quick-freezing (freezing for 18 min at -80 °C) and slow-freezing (freezing for 1 h at -20 °C) during storage (stored for 28 d at -20 °C) was investigated. The results showed that the survival rate and acid-producing capacity of lactic acid bacteria decreased significantly with storage time; the survival rate of lactic acid bacteria in quick-freezing group was higher than that in slow-freezing group at the same storage period; the survival rate of lactic acid bacteria in quick-freezing group was 1.2 times that in the slow-freezing group after freezing storage for 28 days; the acid-producing capacity of lactic acid bacteria in the two groups had no significant differences at the beginning of storage (0 to 7 days); and the pH of sourdough in quick-freezing group was significantly lower than that in slow-freezing group at the middle and later stage of storage (14 to 28 days), but the total acid value of sourdough in quick-freezing group was significantly higher than that in the slow-freezing group, which indicated that the acid-producing capacity of lactic acid bacteria in quick-freezing group was higher than that in slow-freezing group at the middle and later stage of storage. In general, quick-freezing treatment is superior to the slow-freezing treatment in keeping the activity of lactic acid bacteria in sourdough during freezing storage. The results of this experiment would provide technical supports for the commercial production of sourdough.

**Key words:** frozen sourdough; quick-freezing; slow-freezing; survival rate; acid-producing capacity