



邸子清,齐贺,洪青平,等. 黄米黏豆包优良乳酸菌发酵剂的筛选与应用[J]. 轻工学报,2025,40(2):41-50.
DI Z Q, QI H, HONG Q P, et al. Screening and application of lactic acid bacteria starter from proso millet
Niandoubao[J]. Journal of Light Industry, 2025, 40(2):41-50. DOI:10. 12187/2025. 02. 005

黄米黏豆包优良乳酸菌发酵剂的筛选与应用

邸子清^{1,2}, 齐贺^{1,2}, 洪青平^{1,2}, 杜新蕊^{1,2}, 李洪飞¹, 孙大庆^{1,2,3}

1. 黑龙江八一农垦大学 国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319;
2. 黑龙江八一农垦大学 食品学院, 黑龙江 大庆 163319;
3. 黑龙江八一农垦大学 黑龙江省农产品加工与质量安全重点实验室, 黑龙江 大庆 163319

摘要:为改善黄米黏豆包的品质,以287株乳酸菌为研究对象,考查其生长能力、产酸能力、抗氧化活性及胞外多糖合成能力,并结合原位发酵实验筛选优良的黄米黏豆包乳酸菌发酵剂。结果表明:有9株乳酸菌同时具备良好的生长能力、产酸能力、抗氧化活性及胞外多糖合成能力,且在黄米酸面团中具有优良的发酵特性。与自然发酵制作的黏豆包相比,这9株乳酸菌均可显著改善黄米黏豆包的质构、亮度和感官品质,其中菌株2P01、22P07发酵制作的黄米黏豆包的质构特性最佳,菌株24M07发酵制作的黄米黏豆包的亮度最好(L^* 为66.82),菌株2P01发酵制作的黄米黏豆包的消费者接受度最高(感官评分为85.17分)。菌株2P01不仅具有较好的生长能力、产酸能力和抗氧化活性,且所制作的黄米黏豆包具有适中的硬度、黏度、咀嚼性及较高的感官评分,是制作黄米黏豆包的最佳发酵剂菌株。

关键词:黄米黏豆包;乳酸菌;发酵剂;原位发酵;抗氧化活性;胞外多糖

中图分类号:TS201.3 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2025)02-0041-10

0 引言

黏豆包俗称“豆包”,是我国东北地区一种历史悠久的传统特色美食^[1-2]。传统黏豆包通常以糯性黄米作为面团原料,红芸豆作为馅料,面团经自然发酵后,手工包馅成型,最后蒸制而成^[3],深受消费者的喜爱^[4-5]。黏豆包虽在我国东北地区的产量较大,但其生产主要集中在春节前的农村家庭中^[6],生产规模小,商品化率很低。此外,黏豆包普遍采用自然发酵、手工成型等传统生产工艺,产品易受

到来源于原料、环境、生产者等的不良微生物污染^[7]。因此,黏豆包传统生产工艺存在的品质和安全性问题亟待解决和完善^[8]。乳酸菌发酵剂作为控制和改善发酵食品品质与安全的有效手段,已广泛应用于面包、馒头、酸奶、奶酪、泡菜等发酵食品的制作中。因此,针对黄米酸面团开发优良的乳酸菌发酵剂,有望改善黏豆包的产品品质^[9],促进黏豆包的产业化发展进程。

目前,国内外对小麦酸面团发酵微生物已开展了较广泛且深入的研究^[10],但对黄米酸面团微生物

收稿日期:2024-07-13;修回日期:2024-11-01;出版日期:2025-04-15

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFE0206300);黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2022-Y51);黑龙江八一农垦大学基础培育计划项目(ZRCPY202005)

作者简介:邸子清(1997—),女,黑龙江省齐齐哈尔市人,黑龙江八一农垦大学硕士研究生,主要研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail:2987345025@qq.com

通信作者:孙大庆(1979—),男,黑龙江省大庆市人,黑龙江八一农垦大学副研究员,博士,主要研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail:sundaqing1979@163.com

的研究报道仍较少。现有研究主要采用平板培养法和聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术对黄米酸面团进行微生物群落组成和多样性分析^[11-14]。例如,韩雨茜^[15]结合PCR-DGGE和扩增子测序技术研究了4种面粉原料对黄米酸面团真菌群落和流变特性的影响,发现原料组成不同会造成黄米酸面团中真菌组成差异,但该研究中黄米酸面团样品数量很少($n=4$),且未对细菌群落特征进行分析。

本课题组^[16]结合平板培养和高通量测序技术对我国北方6个省份采集的28个自然发酵黄米酸面团的微生物组成进行了研究,较全面地揭示了自然发酵黄米酸面团细菌和真菌群落的组成和多样性,并成功分离和鉴定了513株细菌和24株真菌。基于此,本文拟以287株乳酸菌为对象,研究其生长能力、产酸能力、抗氧化活性及胞外多糖合成能力,通过黄米面团原位发酵实验进一步评价初筛菌株的发酵特征,并综合评价所筛选菌株制作黄米黏豆包的应用潜力,以期改善黄米黏豆包产品品质及其规模化、标准化和安全化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

实验所用菌株,为黑龙江八一农垦大学实验室前期从28个自然发酵黄米酸面团样品中分离和鉴

定的287株乳酸菌^[16],菌株具体信息见图1;黄米粉,河北泥河湾农业发展股份有限公司;MRS肉汤培养基,青岛海博生物技术有限公司;牛胆盐(纯度90%)、1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(DPPH,纯度>97%)、维生素C(纯度99%),上海源叶生物科技有限公司;二甲苯(纯度99%),北京索莱宝科技有限公司;2,2'-联氮-双-3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸(ABTS,纯度99%)、三吡啶三吡嗪(TPTZ,纯度99%),上海易恩化学技术有限公司。

1.2 主要仪器与设备

SHP-250F型生化培养箱,上海森信实验仪器有限公司;Sorvall Legend Micro 21型高速离心机、88882010型数字涡旋混匀器,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;SPECTROstar型全波长酶标仪,BMG科技(中国)有限公司;BSC-1360 II A2型生物安全柜,北京东联哈尔仪器制造有限公司;FE28-Standard型便捷式pH计,梅特勒-托利多国际有限公司;CR-410型色度仪,柯尼卡美能达(中国)投资有限公司;T35型海氏蒸汽烤箱,青岛汉尚电器有限公司;TA-TOUCH型质构仪,上海保圣实业发展有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株活化培养 从-80℃冰箱中取出保藏的菌株,融化后,取10 μL菌液,接种到1 mL MRS肉汤培养基中,于30℃条件下培养18 h;取100 μL培养液,接种到20 mL MRS肉汤培养基中,于30℃条件下继续培养18 h,即得活化菌液。

分离菌株物种	<i>Weissella viridescens</i>	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	10	0	5	0	0	14	5	0	0	0	0	6	11	11	0	
	<i>Weissella confusa</i>	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	<i>Weissella cibaria</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	1	0	0	0	0
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	13	4	0	14	13	0	6	0	1	0	0	3	1	1	1	0	0	7	6	0	11	7	15	3	3	5	2
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	6	2	0	0	0	0	0	0	12	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Leuconostoc fallax</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Latilactobacillus sakei</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	16	0	7	0	0	0	0	1	4	0	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
		黄米酸面团样品																											

图1 287株乳酸菌的样品来源和物种分类

Fig. 1 Sample source and species classification of 287 strains of lactic acid bacteria

1.3.2 菌株生长和产酸能力测定 取活化菌液,按 1%接种量接种到 MRS 肉汤培养基中,于 30 ℃ 条件下培养至 24 h、48 h 和 72 h,分别取 1 mL 培养液,于 620 nm 波长处测其吸光度,用于评价菌株的生长能力;同时,分别取 3 mL 培养液进行 pH 值测定。以未接种活化菌液的 MRS 肉汤培养基作为空白对照^[17-18]。

1.3.3 菌株代谢物抗氧化活性测定 取 1 mL 1.3.2 中培养 48 h 的菌液,于 10 000 r/min 条件下离心 10 min,取 0.5 mL 上清液,加入 3 mL 新配制的 0.2 mmol/L DPPH 溶液中,避光条件下反应 30 min 后,测定 517 nm 波长处的吸光度^[19]。DPPH 自由基清除率按下式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

式中, A_0 为无水乙醇替代样品的吸光度, A_1 为样品的吸光度。

1.3.4 菌株胞外多糖合成能力测定 取 1.3.2 中培养 48 h 的菌液,在 MRS 固体培养基上划线,于 30 ℃ 条件下培养 48 h,挑取单菌落,观察其拉丝现象,以表征菌株的胞外多糖合成能力^[20-23]。

1.3.5 黄米酸面团和黏豆包制作 将活化菌液于 10 000 r/min 条件下离心 10 min,收集菌体,用无菌水调整菌体细胞浓度为 1×10^8 CFU/mL,即得菌悬液。取 200 g 黄米粉,加入 140 mL 菌悬液,混合均匀后揉制成黄米面团,于 30 ℃ 条件下发酵 20 h,即得黄米酸面团。取 34 g 黄米酸面团,添加 10 g 红豆馅,搓成圆球形;另取 34 g 黄米酸面团,不添加红豆馅,搓成圆球形;将两组圆形面团置于蒸箱中,于 100 ℃ 条件下蒸制 20 min^[24]。对无馅黄米黏豆包进行质构特性和色度测定,对有馅黄米黏豆包进行感官评价。以自然发酵制作的黄米黏豆包作为对照。

1.3.6 黄米酸面团乳酸菌活菌计数 取 1 g 黄米酸面团,加入 9 mL 无菌生理盐水,充分混匀后进行 10 倍梯度稀释,取 100 μ L 适当稀释梯度的稀释液,涂在 MRS 固体培养基上,于 30 ℃ 条件下培养 48 h 后,进行乳酸菌活菌计数^[25],结果以 log CFU/g(每

克黄米酸面团的菌落形成单位)表示。黄米面团接种菌株时的初始活菌数为 7.61 log CFU/g。

1.3.7 黄米酸面团 pH 值和总滴定酸度测定 取不同培养时间(0 h、4 h、8 h 和 20 h)的黄米酸面团各 1 g,分别与 9 mL 蒸馏水混合,在摇床中混匀 10 min,用 pH 计测定悬浊液的 pH 值;用 0.1 mol/L NaOH 溶液滴定悬浊液至 pH 值为 8.3。总滴定酸度(TTA)结果表示为滴定 1 g 黄米酸面团所消耗的 0.1 mol/L NaOH 溶液的体积(μ L)^[26]。

1.3.8 黄米酸面团抗氧化活性测定 取 1 g 黄米酸面团,加入 30 mL 体积分数为 80%的乙醇溶液,超声波提取 2 h 后,于 10 000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液,参照 D. O. Kim 等^[27-29]的方法测定黄米酸面团的抗氧化活性,其中,黄米酸面团的 DPPH 和 ABTS⁺自由基的清除能力分别以 1 mg/mL 维生素 C 的 DPPH 和 ABTS⁺自由基的清除能力作为对照。

1.3.9 黄米黏豆包质构特性测定 质构仪选用 P/50 探头,下压率为 50%,测前速度为 3.00 mm/s,测中和测后速度均为 1.00 mm/s,触发力为 5.00 g,测定无馅黄米黏豆包的硬度、弹性、内聚性、黏性、咀嚼性和复原性^[30]。

1.3.10 黄米黏豆包色度测定 将无馅黄米黏豆包切成 1.5 cm 厚度的面片,使用色度仪 D65 光源测定其 L^* (亮度值)、 a^* (红绿值)、 b^* (黄蓝值),其中, a^* 越大,样品越偏向红色,反之越偏向绿色; b^* 越大,样品越偏向黄色,反之越偏向蓝色^[31]。

1.3.11 黄米黏豆包感官评价 参照代任等^[32-33]的方法,并略微修改。挑选 6 名具有黄米黏豆包感官评定经验的评定人员(男女比例 1:1)对有馅黄米黏豆包的颜色、形态、气味、口感和外观 5 个感官指标进行评价打分。黄米黏豆包感官评分标准见表 1。

1.4 数据统计分析

所有实验均重复 3 次,数据结果以(平均值 \pm 标准差)表示。使用 SPSS 26 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 被认为差异显著。采用 Origin 2024 或 Graphpad Prism 9 绘图。

2 结果与分析

2.1 菌株发酵能力分析

2.1.1 菌株生长和产酸能力 287株乳酸菌的生长和产酸能力如图2所示。由图2a)可知,大多数菌株在培养48h时,细胞浓度达到最大值,此时吸光度的平均值为3.55,因此,本研究以吸光度为4.0作为评价乳酸菌生长能力的标准。当培养24h、48h和72h时,分别有64株、126株和115株乳酸菌的吸光度>4.0;同时,分别有17株、80株和47株乳酸菌的吸光度达到最大值。由图2b)可知,不同培养时间下,所有菌株pH值的平均值都在4.0左右,因此,本研究以pH值为4.0作为乳酸菌产酸能力的评价基准。当培养24h、48h和72h时,分别有74株、91株和122株乳酸菌的pH值<4.0;同时,分别有43株、8株和90株乳酸菌的pH值达到最小值。综上可知,当培养24h时,吸光度>4.0且达到最大值、pH值<4.0且达到最小值的乳酸菌分别有17株和43株,这些菌株均具有较强的生长和产酸能力。

2.1.2 菌株代谢产物抗氧化活性 研究^[34]显示,乳酸菌可合成多种抗氧化物质,这些抗氧化物质在清除自由基、减缓氧化应激带来的损伤、保护机体等方面具有重要作用。287株乳酸菌的DPPH自由

基清除率及物种分布如图3所示。由图3可知,从菌株个体而言,相同物种不同菌株之间的DPPH自由基清除率差异明显,表明菌株的抗氧化活性具有明显的菌株特异性。61株乳酸菌的DPPH自由基清除率超过了60.00%,其中3株乳酸菌的DPPH自由基清除率超过了70.00%,分别为*L. reuteri* 16M01、*P. pentosaceus* 2P01和*Leu. mesenteroides* 18P05。从物种角度而言,*L. reuteri*的平均DPPH自由基清除率最高(67.73%),表明其具有更好的抗氧化活性。

2.1.3 菌株胞外多糖合成能力 胞外多糖是微生物细胞向外分泌的一类水溶性大分子多糖类化合物,当产胞外多糖微生物形成菌落时,由于胞外多糖在菌落周围不断累积,通常会明显增加菌体的黏稠性,而典型表现为拉丝现象^[35]。287株乳酸菌的

表1 黄米黏豆包感官评分标准

Table 1 Sensory evaluation criteria of proso millet Niandoubao

指标	评分标准	得分/分
颜色	颜色自然、纯正,无杂色	16~20
	颜色基本纯正,稍有杂色	11~15
	颜色暗淡,有杂色	5~10
形态	形态规则,无塌陷	16~20
	形态基本规则,有轻微塌陷	11~15
	形态不规则,有塌陷	5~10
气味	气味纯正怡人,稍有酸味	16~20
	气味平淡,酸味可接受	11~15
	酸味过重,掩盖原有气味	5~10
口感	黏度适中,有轻微黏牙感	16~20
	黏度过大,黏牙感强	11~15
	黏度过小,偏硬且不黏牙	5~10
外观	光滑,明亮,无裂纹	16~20
	光滑,不太明亮,有轻微裂纹	11~15
	粗糙,暗淡,有明显裂纹	5~10

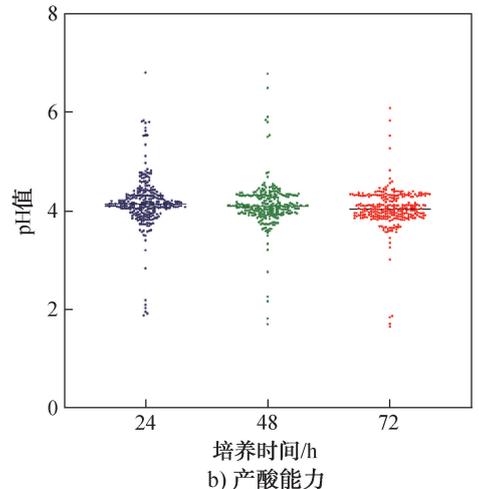
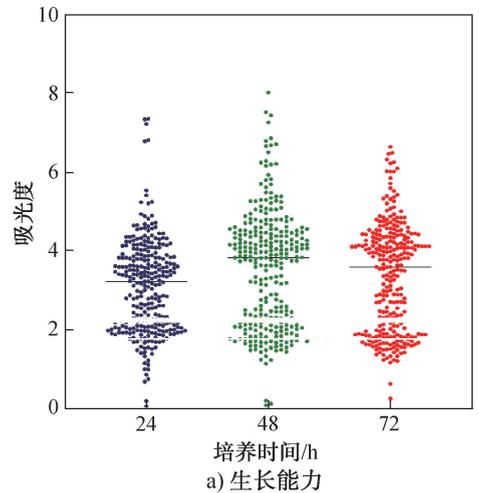


图2 287株乳酸菌的生长和产酸能力
Fig. 2 Growth and acid-producing capacity of 287 strains of lactic acid bacteria

单菌落拉丝现象见表2。由表2可知,只有61株乳酸菌的单菌落可观察到不同程度的拉丝现象;根据拉丝长短,46株乳酸菌为低产胞外多糖菌株,13株乳酸菌为中产胞外多糖菌株,2株乳酸菌(*Leu. mesenteroides* 10M09和*P. pentosaceus* 8P07)为高产胞外多糖菌株。根据拉丝现象的出现比例,*P. pentosaceus*、*P. acidilactici*、*Leu. mesenteroides*和*Latil. sakei*这4个物种拉丝现象的出现比例高于10%,表明这4个物种的胞外多糖合成能力较强。其中,*P. pentosaceus*不同菌株之间的拉丝现象差异明显,表明菌株个体胞外多糖合成能力也存在明显的特异性。

2.1.4 菌株基本发酵特性综合评价 287株乳酸菌的Veen图、9株乳酸菌的发酵特性和功能特性分

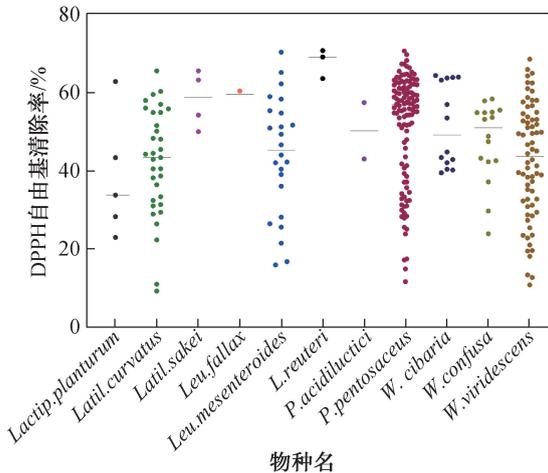


图3 287株乳酸菌的DPPH自由基清除率及物种分布

Fig. 3 DPPH radical scavenging rate and species distribution of 287 strains of lactic acid bacteria

表2 287株乳酸菌的单菌落拉丝现象

Table 2 Single colony drawing phenomenon of 287 strains of lactic acid bacteria

物种名	—	+	++	+++	出现比例/%
<i>W. viridescens</i>	66	2	0	0	3
<i>W. confusa</i>	15	1	0	0	6
<i>W. cibaria</i>	13	1	0	0	7
<i>P. pentosaceus</i>	69	35	12	1	41
<i>P. acidilactici</i>	1	1	0	0	50
<i>Leu. mesenteroides</i>	20	3	0	1	17
<i>Leu. fallax</i>	1	0	0	0	0
<i>L. reuteri</i>	3	0	0	0	0
<i>Latil. sakei</i>	3	1	0	0	25
<i>Latil. curvatus</i>	30	2	1	0	9
<i>Lactip. plantarum</i>	5	0	0	0	0

注:—表示无拉丝现象;+表示拉丝长度0.5 cm左右;++表示拉丝长度1.0 cm左右;+++表示拉丝长度≥2.0 cm,下同。

别如图4和表3所示。由图4和表3可知,41株乳酸菌表现出良好的生长(吸光度>4.0)和产酸(pH值<4.0)能力;其中9株乳酸菌还同时表现出良好的抗氧化活性(DPPH自由基清除率>60.00%)和胞外多糖合成能力(菌落拉丝)。这表明在287株乳酸菌中,77株乳酸菌具有良好的发酵特性,9株乳酸菌还表现出良好的功能特性,其中8株乳酸菌(2P01、2P03、22M02、22M07、22P07、24M06、24M07、24P09)属于*P. pentosaceus*,1株乳酸菌(26M07)属于*W. viridescens*。因此,选择这9株乳酸菌进行后续黄米面团原位发酵实验。

2.2 筛选菌株的黄米面团原位发酵能力分析

2.2.1 原位生长能力 9株乳酸菌原位发酵黄米

酸面团的乳酸菌活菌数如图5所示。由图5可知,与黄米面团接种菌株时的初始乳酸菌活菌数(7.61 log CFU/g)和自然发酵黄米酸面团乳酸菌活菌数(7.42 log CFU/g)相比,9株乳酸菌原位发酵

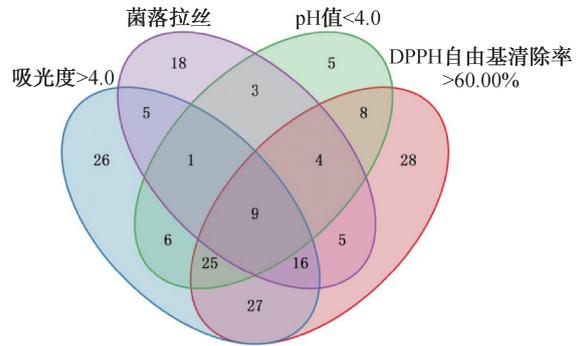


图4 287株乳酸菌的Veen图

Fig. 4 Veen diagram of 287 strains of lactic acid bacteria

表3 9株乳酸菌的发酵特性和功能特性

Table 3 Fermentation properties and functional characteristics of 9 strains of lactic acid bacteria

物种名	菌株	吸光度	pH值	菌落拉丝	DPPH 自由基清除率/%
<i>P. pentosaceus</i>	22M02	4.65 ^b	3.98 ^a	+++	63.53 ^{abc}
	22M07	4.46 ^{ab}	3.97 ^b	+++	60.92 ^c
	22P07	4.07 ^c	3.99 ^a	+	67.22 ^{abc}
	24M06	4.22 ^{ab}	3.66 ^c	++	62.82 ^{bc}
	24M07	4.34 ^{ab}	3.66 ^c	++	60.40 ^c
	24P09	4.45 ^{ab}	3.92 ^c	++	61.03 ^c
	2P01	4.45 ^{ab}	3.99 ^a	++	70.57 ^a
	2P03	4.35 ^{ab}	3.97 ^b	++	69.61 ^{ab}
<i>W. viridescens</i>	26M07	5.29 ^a	3.87 ^d	++	64.89 ^{abc}

注:每列不同字母代表组间有显著性差异(P<0.05),下同。

黄米酸面团的乳酸菌活菌数均有所增加,表明它们可在黄米酸面团中正常生长。而在发酵 20 h 时,菌株 2P01、26M07 原位发酵黄米酸面团的乳酸菌活菌数最高,分别达到 9.13 log CFU/g 和 8.42 log CFU/g,表明二者在黄米酸面团中的生长能力更好。

2.2.2 原位产酸能力 9 株乳酸菌原位发酵黄米酸面团的 pH 值和 TTA 如图 6 所示。由图 6 可知,发酵 8 h 时,9 株乳酸菌原位发酵黄米酸面团的 pH 值和 TTA 分别为 4.25~4.37(平均值 4.32)和 900~1120 μL/g(平均值 1014 μL/g),此时黄米酸面团的 pH 值均低于以往研究中成熟黄米酸面团的 pH 值(4.62)^[16],表明所产生的乳酸和乙酸能降低面团的 pH 值,使黄米酸面团快速发酵成熟,其中,菌株 26M07 原位发酵黄米酸面团的 pH 值最低(4.25)且 TTA 较高(1100 μL/g),表明该菌株在黄米面团中具有较佳的产酸能力;而自然发酵黄米酸面团的 pH 值和 TTA 分别为 6.28 和 370 μL/g,与发酵 0 h 相比几乎没有变化。发酵 20 h 时,9 株乳酸菌原位发酵黄米酸面团的 pH 值和 TTA 分别为 3.88~4.02(平均值 3.91)和 1420~1880 μL/g(平均值 1634 μL/g),此时自然发酵黄米面团的 pH 值和 TTA 分别为 4.36 和 1750 μL/g。这表明与自然发酵相比,9 株乳酸菌均可促进黄米面团体系酸化和成熟。

2.2.3 原位发酵抗氧化活性 9 株乳酸菌原位发酵黄米酸面团的抗氧化活性如图 7 所示,其中不同字母代表数据之间具有显著性差异($P<0.05$)。由

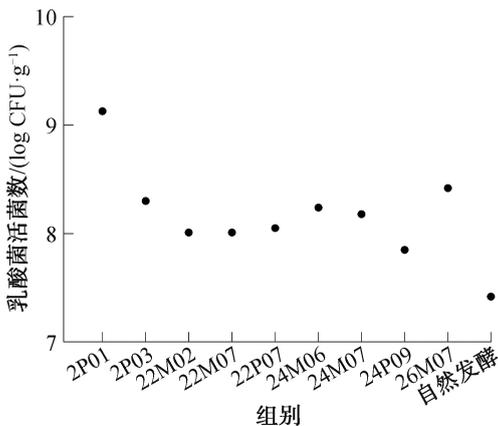


图 5 9 株乳酸菌原位发酵黄米酸面团的乳酸菌活菌数
Fig. 5 Viable counts of lactic acid bacteria of 9 strains of lactic acid bacteria in situ fermentation of proso millet sourdough

图 7 可知,与自然发酵黄米酸面团相比,9 株乳酸菌产生的抗氧化肽均能显著提高黄米酸面团的 DPPH、ABTS⁺ 自由基清除能力和铁离子还原能力 (FRAP) ($P<0.05$),但不同菌株对 3 种底物的抗氧化活性表现出较明显的特异性,其中菌株 2P03 清除 DPPH、ABTS⁺ 自由基的能力最强,分别为 (0.64±0.02) mg/mL 和 (0.79±0.01) mg/mL,24M06 清除 ABTS⁺ 自由基的能力也较强 ((0.78±0.02) mg/mL),菌株 22P07 的 FRAP 最强 ((1.83±0.03) μmol/g)。结合表 3 可知,菌株 2P03 不仅具有较强的胞外多糖合成能力,且在 MRS 纯培养条件下具有较高的 DPPH 自由基清除率(69.61%),这可能是由合成的胞外多糖所致^[36-37];类似地,菌株 22P07 较高的抗氧化活性也可能是由合成的胞外多糖所致;但菌株 24M06 除具有较强的胞外多糖合成能力之外,还具有较强的酸性代谢产物合成能力(pH 值为 3.66),这可能是由合成的胞外多糖和有机酸共同决定的^[38-39]。

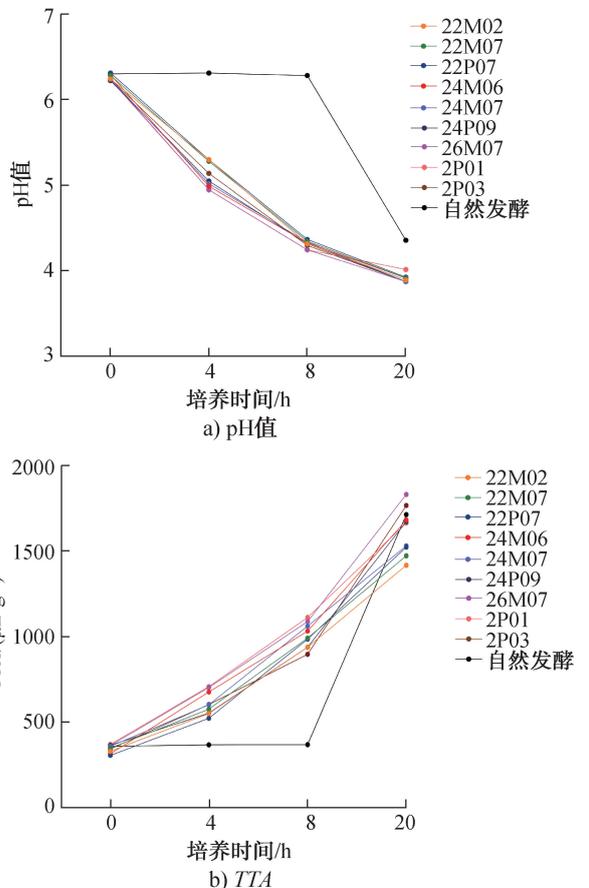


图 6 9 株乳酸菌原位发酵黄米酸面团的 pH 值和 TTA
Fig. 6 pH value and TTA of 9 strains of lactic acid bacteria in situ fermentation of proso millet sourdough

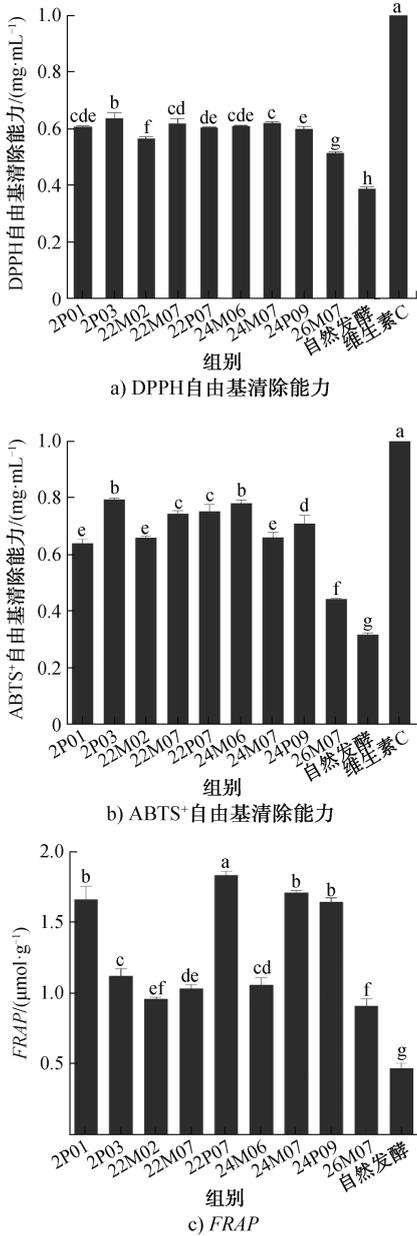


图 7 9 株乳酸菌原位发酵黄米酸面团的抗氧化活性
Fig. 7 Antioxidant activity of 9 strains of lactic acid bacteria in situ fermentation of proso millet sourdough

表 4 9 株乳酸菌发酵制作的黄米黏豆包的质构特性

Table 4 Texture characteristics of unfilled proso millet Niandoubao fermented by 9 strains of lactic acid bacteria

组别	硬度/g	弹性	内聚性	黏度	咀嚼性/g	复原性
2P01	711.70±36.19 ^d	0.93±0.01 ^{ab}	0.84±0.02 ^a	602.29±16.33 ^d	563.90±15.18 ^d	0.39±0.02 ^{ab}
2P03	970.76±45.94 ^{bc}	0.92±0.02 ^b	0.81±0.03 ^{ab}	794.48±6.48 ^b	731.98±21.46 ^{bc}	0.37±0.03 ^{ab}
22M02	953.73±99.32 ^{bc}	0.93±0.01 ^{ab}	0.78±0.03 ^b	749.84±43.97 ^{bc}	698.64±45.27 ^{bcd}	0.38±0.01 ^{ab}
22M07	1 052.77±106.81 ^b	0.93±0.01 ^{ab}	0.78±0.03 ^b	825.22±56.09 ^b	770.16±48.27 ^b	0.37±0.02 ^{ab}
22P07	877.80±75.35 ^{bcd}	0.94±0.01 ^a	0.83±0.01 ^{ab}	733.17±51.34 ^{bc}	691.73±49.16 ^{bcd}	0.41±0.01 ^a
24M06	994.05±53.51 ^b	0.93±0.01 ^{ab}	0.79±0.01 ^{ab}	788.84±36.75 ^b	731.60±36.89 ^{bc}	0.35±0.01 ^b
24M07	796.90±57.20 ^{cd}	0.92±0.01 ^b	0.80±0.02 ^{ab}	640.46±30.90 ^{cd}	591.51±33.55 ^{cd}	0.35±0.01 ^b
24P09	968.18±121.73 ^{bc}	0.93±0.01 ^{ab}	0.79±0.04 ^{ab}	769.90±93.25 ^b	719.92±83.56 ^{bc}	0.37±0.04 ^{ab}
26M07	1 020.75±44.41 ^b	0.93±0.01 ^{ab}	0.78±0.02 ^b	798.18±26.12 ^b	748.06±29.37 ^b	0.38±0.02 ^{ab}
自然发酵	1 816.22±187.20 ^a	0.82±0.01 ^c	0.84±0.01 ^a	1 534.55±166.84 ^a	1 487.91±196.18 ^a	0.30±0.01 ^c

2.3 黄米黏豆包品质分析

2.3.1 质构特性 9 株乳酸菌发酵制作的黄米黏豆包的质构特性见表 4。由表 4 可知,与自然发酵制作的黄米黏豆包相比,9 株乳酸菌均可显著降低黄米黏豆包的硬度、黏度和咀嚼性 ($P < 0.05$),并显著提高黄米黏豆包的弹性和复原性 ($P < 0.05$)。研究^[40]表明,硬度、黏度和咀嚼性与黄米黏豆包感官品质呈负相关,弹性、复原性和内聚性与黄米黏豆包感官品质呈正相关。因此,9 株乳酸菌均可改善黄米黏豆包的感官品质,其中菌株 2P01 发酵制作的黄米黏豆包的硬度、黏度和咀嚼性均最低,菌株 22P07 发酵制作的黄米黏豆包的弹性和复原性均最高,表明二者改善黄米黏豆包感官品质的效果较突出。与自然发酵制作的黄米黏豆包相比,菌株 22M02、22M07 和 26M07 发酵制作的黄米黏豆包的内聚性均显著降低,而其他菌株发酵制作的黄米黏豆包的内聚性没有显著变化。

2.3.2 色度 9 株乳酸菌发酵制作的黄米黏豆包的色度见表 5。由表 5 可知,与自然发酵制作的黄米黏豆包相比,9 株乳酸菌可显著提高黄米黏豆包的 L^* 和 a^* ($P < 0.05$),但 b^* 变化不显著。这表明 9 株乳酸菌均可显著提高黄米黏豆包的亮度和红色特征,而黄色特征没有发生显著变化。其中,菌株 24M07 发酵制作的黄米黏豆包的 L^* 最高,菌株 2P01 发酵制作的黏豆包的 a^* 最小,菌株 2P03 发酵制作的黏豆包的 b^* 最大。因此,9 株乳酸菌均可显著改善黄米黏豆包的亮度,其中菌株 24 M07、2P03 发酵制作的黄米黏豆包具有更好的色度特征。

2.3.3 感官评价结果 9 株乳酸菌发酵制作的黄米黏豆包的感官评价结果如图 8 所示。由图 8 可知,大多数乳酸菌发酵制作的黄米黏豆包的感官指

标得分均高于自然发酵制作的黄米黏豆包,其中菌株 22P07 发酵制作的黄米黏豆包的颜色最好 (17.17 ± 0.98 分),菌株 22M02 发酵制作的黄米黏豆包的形态最好 (17.17 ± 0.75 分),菌株 2P03 发酵制作的黄米黏豆包的口感最佳 (17.67 ± 0.52 分),菌株 26M07 发酵制作的黄米黏豆包的气味最受欢迎 (17.17 ± 1.60 分),菌株 2P01 发酵制作的黄米黏豆包的感官评价总分最高 (85.17 ± 3.25 分),这与黄米黏豆包质构特性分析结果一致。这表明 9 株乳酸菌均可显著提高黄米黏豆包的感官品质,其中菌株 2P01 发酵制作的黄米黏豆包具有最佳的消费者接受度。

2.4 优良发酵菌株综合评价结果分析

为了综合评价 9 株乳酸菌作为黄米黏豆包发酵

表 5 9 株乳酸菌发酵制作的黄米黏豆包的色度
Table 5 Color of proso millet Niandoubao fermented by 9 strains of lactic acid bacteria

组别	L^*	a^*	b^*
2P01	65.14 ± 0.37^{cd}	6.68 ± 0.11^d	29.79 ± 0.30^a
2P03	65.69 ± 0.34^{bc}	7.36 ± 0.41^{bc}	33.29 ± 0.83^a
22M02	66.50 ± 0.85^{ab}	7.51 ± 0.36^{abc}	29.44 ± 0.81^a
22M07	65.36 ± 0.65^{cd}	7.23 ± 0.19^e	31.20 ± 0.68^a
22P07	64.69 ± 0.37^d	7.80 ± 0.13^{ab}	30.84 ± 0.85^a
24M06	65.92 ± 0.22^{bc}	7.41 ± 0.42^{bc}	31.89 ± 0.39^a
24M07	66.82 ± 0.41^a	7.44 ± 0.08^{bc}	32.99 ± 0.29^a
24P09	65.11 ± 0.07^{cd}	7.79 ± 0.05^{ab}	31.76 ± 0.32^a
26M07	65.73 ± 0.60^{bc}	7.92 ± 0.22^a	30.29 ± 6.16^a
自然发酵	62.57 ± 0.08^e	5.95 ± 0.12^e	31.40 ± 0.59^a

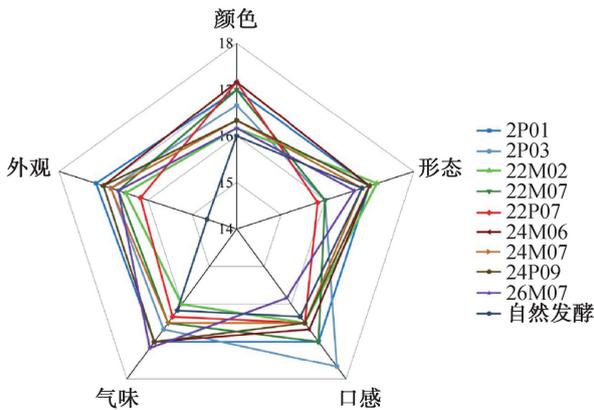


图 8 9 株乳酸菌发酵制作的黄米黏豆包的感官评价结果

Fig. 8 Sensory evaluation results of proso millet Niandoubao fermented by 9 strains of lactic acid bacteria

剂的潜力,对 9 株乳酸菌发酵制作的黄米酸面团的理化特性及黄米黏豆包的品质特性进行了主成分分析,其中所有检测指标均采用平均值进行作图,结果如图 9 所示。由图 9 可知,10 组样品可分为明显不同的 3 组,即自然发酵组、2P01 发酵组和其他 8 株乳酸菌发酵组。与自然发酵组相比,除了色度指标 a^* 和 b^* ,9 株乳酸菌制作的黄米酸面团的理化特性和黄米黏豆包的品质特性均得到了一定程度的改善,其中黄米酸面团的酸度、抗氧化活性及黄米黏豆包的质构特性、 L^* 、感官品质的改善尤为明显。这表明 9 株乳酸菌均可有效改善黄米黏豆包的品质,均可作为黄米黏豆包优良发酵剂的候选菌株。其中,菌株 2P01 制作的黄米酸面团不仅具有更好的生长能力、产酸能力和抗氧化活性,且制作的黄米黏豆包具有适中的硬度、黏度、咀嚼性及较高的感官评分。因此,菌株 2P01 是发酵制作黄米黏豆包的最佳发酵剂菌株。

3 结论

本研究采用综合筛选方法,研究了 287 株乳酸菌的发酵特性和功能特性,得出如下结论:有 9 株乳酸菌同时具有良好的生长能力、产酸能力、抗氧化活性和胞外多糖合成能力,且在原位发酵中的生长、产酸和抗氧化能力均优于自然发酵样品。相较于自然发酵面团的复杂微生物群落,经过筛选的菌株得益于高效性和可控性,能够快速分解面团中的

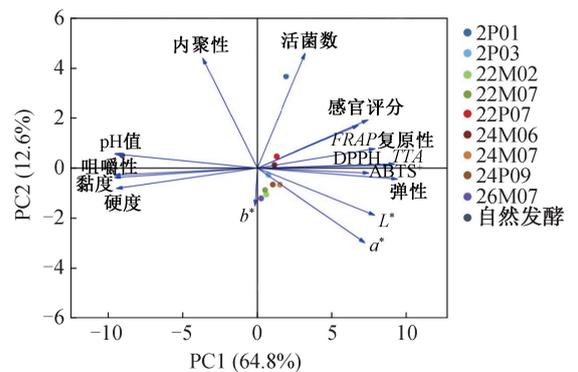


图 9 黄米酸面团理化特性及黄米黏豆包品质特性的主成分分析

Fig. 9 Physical and chemical properties of proso millet sourdough and principal component analysis of quality characteristics of proso millet Niandoubao

碳水化合物,产生乳酸和乙酸,从而快速降低面团的pH值,产生的抗氧化肽可以清除自由基,抑制脂肪氧化,从而提高面团的抗氧化能力。在蒸制成黏豆包后,与自然发酵黏豆包相比,9株乳酸菌均可显著改善黏豆包的质构、亮度和感官品质。其中,菌株2P01不仅具有较好的生长、产酸和抗氧化能力,而且其制作的黏豆包具有适中的硬度、黏度、咀嚼性及较高的感官评分,因此2P01是9个候选菌株中制作黄米黏豆包的最佳发酵剂菌株。为进一步研究和利用菌株2P01,未来将开展该菌株的全基因组测序与分析工作,继续在基因水平探究其发酵特性,同时,优化该菌株发酵制作黄米黏豆包的工艺条件,为该菌株在黄米黏豆包工业化生产中的实际应用提供参考。

参考文献:

- [1] 王丽丽,宝音德力格尔.黏豆包产业化生产[J].农业工程,2015,5(3):53-54.
- [2] 张新杰.东北地区传统黏豆包发酵面团的微生物多样性及其与理化性质的关系[D].哈尔滨:东北农业大学,2017.
- [3] 边鑫,陈镜如,杨杨,等.自然发酵对大黄米加工特性及黏豆包熟面团品质的影响[J].中国酿造,2022,41(2):193-197.
- [4] AKUTKO K, STAWARSKI A. Probiotics, prebiotics and synbiotics in inflammatory bowel diseases[J]. Journal of Clinical Medicine, 2021, 10(11):2466.
- [5] 杨新标,郑明珠,任宇航,等.基于亲水胶体改性和混料设计优化传统黏豆包的配方[J].食品安全质量检测学报,2019,10(20):6837-6842.
- [6] ANAL A K, PERPETUINI G, PETCHKONGKAEW A, et al. Food safety risks in traditional fermented food from South-East Asia[J]. Food Control, 2020, 109:106922.
- [7] KIM Y, HUANG W N, ZHU H Y, et al. Spontaneous sourdough processing of Chinese Northern-style steamed breads and their volatile compounds[J]. Food Chemistry, 2009, 114(2):685-692.
- [8] 董小涵,周茜,牛佳卉,等.营养预制黄米豆包加工工艺研究[J].现代食品科技,2017,33(12):221-227.
- [9] 郭闯.糯米黏豆包纯菌发酵工艺优化与冻藏特性分析[D].哈尔滨:哈尔滨商业大学,2021.
- [10] DE VUYST L, VRANCKEN G, RAVYTS F, et al. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota[J]. Food Microbiology, 2009, 26(7):666-675.
- [11] 赵炬影,苑秀娟,郭鸽,等.传统自然发酵黏豆包面团微生物菌群结构分析[J].食品科学,2018,39(18):67-72.
- [12] 杨健,孙大庆.东北粘豆包发酵面团中细菌多样性研究[J].黑龙江八一农垦大学学报,2015,27(5):78-81.
- [13] 孙大庆,李洪飞,杨健,等.东北黏豆包中一株罗伊氏乳杆菌的分离、鉴定与益生性质研究[J].黑龙江八一农垦大学学报,2015,27(5):106-110,115.
- [14] 姚笛,孙大庆,李洪飞.东北黏豆包酸面团菌群多样性与自制酸面团中菌群变化规律的研究[J].现代食品科技,2015,31(5):90-95.
- [15] 韩雨茜.酪蛋白水解物对江米酸面团的理化性质和细菌菌群结构的影响[D].哈尔滨:东北农业大学,2020.
- [16] SUN D Q, LI H F, QI H, et al. Microbiota diversity, composition and drivers in waxy proso millet sourdoughs of Niandoubao, a traditional fermented cereal food in northeast China[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 180:114699.
- [17] YANG X Z, HU W Z, XIU Z L, et al. Comparison of northeast sauerkraut fermentation between single lactic acid bacteria strains and traditional fermentation[J]. Food Research International, 2020, 137:109553.
- [18] MUJNISA A, NATSIR A. Lactic acid production and the inhibitory capability of lactic acid bacteria isolated from poultry feces[J]. IOP Conference Series (Earth and Environmental Science), 2021, 788(1):012190.
- [19] 罗悦,刘瑞山,王志远,等.不同 β -葡萄糖苷酶活性乳酸菌发酵豆乳特性分析[J].食品科学,2023,44(20):155-164.
- [20] GALLI V, VENTURI M, PINI N, et al. Technological feature assessment of lactic acid bacteria isolated from cricket powder's spontaneous fermentation as potential starters for cricket-wheat bread production[J]. Foods, 2020, 9(9):E1322.
- [21] 杨英歌,黄继翔,马凯,等.抑制黑色素合成的乳酸菌胞外多糖的筛选和性质研究[J].微生物学通报,2017,44(3):583-590.
- [22] 张文平,赵英杰,罗晟,等.高产胞外多糖植物乳杆菌筛选及其发酵工艺优化[J].食品与发酵工业,2019,45(21):38-45.
- [23] 陈靖,周佳豪,毛琪琪,等.产胞外多糖乳酸菌的筛选及鉴定[J].食品与机械,2023,39(4):26-31,169.
- [24] 林江涛,孙灵灵,岳清华.小麦粉在不同粒度下其面团及馒头品质[J].中国粮油学报,2022,37(8):73-79.
- [25] DUAN W H, GUAN Q J, ZHANG H L, et al. Improving flavor, bioactivity, and changing metabolic profiles of goji juice by selected lactic acid bacteria fermentation[J]. Food Chemistry, 2023, 408:135155.
- [26] XING X L, MA J Y, FU Z J, et al. Diversity of bacterial communities in traditional sourdough derived from three terrain conditions (mountain, plain and basin) in Henan

- province, China [J]. *Food Research International*, 2020, 133: 109139.
- [27] KIM D O, LEE K W, LEE H J, et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50 (13): 3713–3717.
- [28] KIM D O, LEE C Y. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004, 44(4): 253–273.
- [29] 张文秀, 陆红佳, 戴媛. 蓝莓酒渣的粒度及添加量对面条品质的影响 [J]. *食品科技*, 2020, 45(11): 167–174.
- [30] 王登宇, 孔垂琴, 王冰, 等. 乳酸菌发酵对混合米粉理化特性及年糕品质的影响 [J]. *中国食品学报*, 2023, 23(3): 229–239.
- [31] 李少辉, 赵巍, 张爱霞, 等. 响应面优化小米馒头工艺及品质特性相关分析 [J]. *食品科技*, 2020, 45(10): 162–168.
- [32] 代任任, 李文钊, 刘亚平, 等. 羟丙基木薯淀粉对糯米混粉特性及年糕品质的影响 [J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(4): 59–64.
- [33] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 粮油检验稻谷、大米蒸煮食用品质感官评价方法: GB/T 15682—2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [34] VOUGIOUKLAKI D, TSIRONI T, TSANTES A G, et al. Probiotic properties and antioxidant activity *in vitro* of lactic acid bacteria [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(5): 1264.
- [35] CIRRINCIONE S, BREUER Y, MANGIAPANE E, et al. ‘Ropy’ phenotype, exopolysaccharides and metabolism; Study on food isolated potential probiotics LAB [J]. *Microbiological Research*, 2018, 214: 137–145.
- [36] RANA S, UPADHYAY L S B. Microbial exopolysaccharides; Synthesis pathways, types and their commercial applications [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 157: 577–583.
- [37] YAN S L, PAN C, YANG X Q, et al. Degradation of *Codium cylindricum* polysaccharides by H₂O₂-Vc-ultrasonic and H₂O₂-Fe²⁺-ultrasonic treatment; Structural characterization and antioxidant activity [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 182: 129–135.
- [38] 李源, 王佳瑶, 刘娇, 等. 乳酸菌发酵对麦芽糯米水解液抗氧化活性及乳酸含量的影响 [J]. *食品科技*, 2022, 47(8): 69–74.
- [39] ZHOU Y, CUI Y H, SUO C, et al. Structure, physicochemical characterization, and antioxidant activity of the highly Arabinose-branched exopolysaccharide EPS-M2 from *Streptococcus thermophilus* CS6 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 192: 716–727.
- [40] YU L, WITT T, RINCON BONILLA M, et al. New insights into cooked rice quality by measuring modulus, adhesion and cohesion at the level of an individual rice grain [J]. *Journal of Food Engineering*, 2019, 240: 21–28.

Screening and application of lactic acid bacteria starter from proso millet Niandoubao

DI Ziqing^{1,2}, QI He^{1,2}, HONG Qingping^{1,2}, DU Xinrui^{1,2}, LI Hongfei¹, SUN Daqing^{1,2,3}

1. National Coarse Cereals Engineering Research Center, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

3. Key Laboratory of Agro-products Processing and Quality Safety of Heilongjiang Province, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

Abstract: In order to improve the quality of proso millet Niaodoubao, 287 strains of lactic acid bacteria were studied as research subjects. Through growth, acid production ability, antioxidant activity, exopolysaccharide synthesis capability, and *in situ* fermentation experiments, excellent lactic acid bacteria fermentation agents were selected for proso millet Niaodoubao. The results showed that 9 strains of lactic acid bacteria had good ability of growth, acid production, antioxidant activity, and extracellular polysaccharide synthesis ability, and had excellent fermentation characteristics in proso millet sourdough. Compared with naturally fermented Niandoubao, all 9 strains of lactic acid bacteria could significantly improve the texture, brightness, and sensory quality of proso millet Niandoubao, among which the texture properties of strains 2P01 and 22P07 were the best, the brightness (L^* 66.82) of strains 24M07 was the highest, and the strain 2P01 has the highest consumer acceptance (sensory score 85.17). Among them, strain 2P01 not only had better growth, acid production ability and antioxidant activity, but also produced proso millet Niandoubao with better hardness, viscosity, chewiness and sensory scores, making it the best starter strain for making proso millet Niandoubao.

Key words: proso millet Niandoubao; lactic acid bacteria; starter; *in situ* fermentation; antioxidant activity; extracellular polysaccharide