

直投式菌种和母液发酵白酸汤的品质比较

赵承鑫¹, 杨小云¹, 李艾蒙¹, 段飞霞¹, 田其明², 钟定江², 贾利蓉^{1*}

(1. 四川大学轻工科学与工程学院, 四川成都 610065) (2. 麻江县明洋食品有限公司, 贵州凯里 556000)

摘要: 白酸汤作为贵州凯里特色调味品, 深受人们喜欢, 但存在产量低、品质不稳定等问题。以直投式菌粉(干酪乳杆菌、植物乳杆菌)和白酸汤母液作为复合发酵剂接种发酵白酸汤, 以单一母液发酵白酸汤作为对比, 研究白酸汤发酵过程中理化、微生物指标及感官品质的变化规律; 利用液相色谱-质谱及全二维气相色谱-飞行时间质谱技术, 对比分析2组白酸汤风味物质的差异。结果表明, 发酵结束时, 接种发酵组(Inoculated Fermentation-7d, IF-7)的总酸及乳酸菌总数均高于自然发酵组(Natural Fermentation-7d, NF-7), pH值及酵母菌总数则低于NF-7组; IF-7组的感官评分在色泽、风味、滋味和总分方面均高于NF-7组, 流动性无显著性差异; 在对非挥发性风味物质的研究中, IF-7组共有21种具有显著差异的代谢物高于NF-7组, 6种代谢物低于NF-7组; 在对挥发性风味物质的研究中, IF-7组和NF-7组分别检测出248种和246种成分, 主要为醇(以丙醇、乙醇等为主)、酸(以乙酸、丙酸等为主)及酯类物质(以乙酸丙酯、丙酸丙酯、乙酸乙酯等为主), IF-7组酯类物质含量略低于NF-7组, 其他方面差异较小。以上结果表明, 以直投式菌粉和白酸汤母液作为发酵剂接种发酵白酸汤能明显缩短生产时间, 提升产品品质及营养价值。

关键词: 白酸汤; 接种发酵; 理化指标; 微生物指标; 风味物质

文章编号: 1673-9078(2024)02-120-130

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.2.0031

Comparison of the Quality of Rice Sour (Baisuan) Soup Prepared with Direct-Vat-Set Strain and Fermented Soup Mother Liquor

ZHAO Chengxin¹, YANG Xiaoyun¹, LI Aimeng¹, DUAN Feixia¹, TIAN Qiming², ZHONG Dingjiang², JIA Lirong^{1*}

(1. College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

(2. Majiang Mingyang Food Co. Ltd., Kaili 556000, China)

Abstract: As a special seasoning of Kaili, Guizhou, rice sour soup (RSS) is highly popular, but there are problems such as low yield and unstable quality. Direct-Vat-Set strain powder (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*) and mother fermentation liquor of RSS were used as the compound starter culture to be inoculated for fermenting RSS. Compared with the traditional fermented RSS prepared using singly the soup mother liquor, the change trends of the physico-chemical indexes, microbial indexes and sensory quality of RSS over the fermentation process were studied. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and two-dimensional gas chromatography-time of flight mass spectrometry (GC×GC-TOF/MS) were used to compare and analyze the differences in the flavor substances of the two groups of RSS. The results showed

引文格式:

赵承鑫, 杨小云, 李艾蒙, 等. 直投式菌种和母液发酵白酸汤的品质比较[J]. 现代食品科技, 2024, 40(2): 120-130.

ZHAO Chengxin, YANG Xiaoyun, LI Aimeng, et al. Comparison of the quality of rice sour (Baisuan) soup prepared with direct-vat-set strain and fermented soup mother liquor [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(2): 120-130.

收稿日期: 2023-01-09

基金项目: 贵州省科技支撑计划项目(2020MA6DLJLK320422)

作者简介: 赵承鑫(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与营养健康, E-mail: zhaochengxin.scu@qq.com

通讯作者: 贾利蓉(1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工, E-mail: 771441479@qq.com

that at the end of fermentation, the total acid content and total number of lactic acid bacteria in the Inoculated Fermentation-7d group (IF-7) were significantly higher than those in the Natural Fermentation-7d group (NF-7). The pH value and total number of yeast of the IF-7 were lower than those in NF-7 group. The sensory scores of IF-7 group were higher than those of NF-7 group in color, flavor, taste and total score, though there was insignificant difference in flowability. As for the non-volatile flavor substances, the IF-7 group had a total of 21 significant differential metabolites that were higher than those in the NF-7 group, and a total of 6 metabolites that were lower than those in the NF-7 group. As for the volatile flavor substances, 248 and 246 components were detected in the IF-7 group and the NF-7 group, respectively, which were primarily alcohols (mainly propanol, ethanol, etc.), acids (mainly acetic acid, propionic acid, etc.), and esters (mainly propyl acetate, propyl propionate, ethyl acetate, etc.). The content of esters in the IF-7 group was slightly lower than that in the NF-7 group, though little difference was detected in other aspects. The above results showed that the fermentation of RSS by inoculating Direct-Vat-Set strain powder along with fermented soup mother liquor as the starter culture can significantly shorten the production time and improve the product quality and nutritional value.

Key words: rice sour soup; inoculated fermentation; physical and chemical indexes; microbial indexes; flavour-compounds

白酸汤是贵州地区一种以大米或面粉为主要原料, 经过自然发酵 7~15 d 或在母液酸汤的基础上补充原料再发酵 3~5 d 而制得的一种苗族侗族特有的传统民族调味品。白酸汤中含有丰富的有机酸、氨基酸等营养物质, 以及以乳酸菌为代表的益生菌, 具有清热解暑、促进消化以及调节肠胃菌群平衡等生理功能^[1], 并且滋味爽口, 因此越来越受到广大消费者的喜爱。

目前, 国内外对白酸汤的主要研究大多侧重于其营养成分、风味特征、微生物多样性及工艺优化等方面, 对筛选特征菌株进行人工接种方面的研究较少, 特别在使用直投式菌种接种发酵白酸汤方面尚未有报道。Liu 等^[2]使用高通量测序技术对发酵结束的白酸汤的微生物群落进行分析, 发现优势细菌属为乳杆菌属、醋杆菌属和普雷沃氏菌属, 优势真菌属为诺莫维氏菌属、毕赤酵母属、假丝酵母属和酵母菌属。Liu 等^[1]在不同温度发酵白酸汤的研究中发现, 发酵温度对产品风味有着重要影响, 低温发酵的白酸汤中乙酸乙酯等风味物质更多, γ -氨基丁酸等营养成分更高。Liu 等^[3]在研究接种发酵白酸汤中发现, *L. paracasei* H4-11 和 *K. marxianus* L1-1 协同接种发酵白酸汤, 有助于促进其风味物质的累积。

近几年来, 酸汤知名度不断地提升, 酸汤产业发展迅速^[4], 但同时存在许多限制企业工业化生产的问题。传统的白酸汤发酵工艺是采用基于大量酸汤母液的自然发酵, 每轮发酵结束后仅 40% 的发酵液被制成产品, 剩余 60% 的发酵液作为母液参与下一轮发酵, 致使白酸汤的产量较低。此外, 在实际生产中白酸汤发酵微生物主要来源于原料本

身及环境微生物, 产品品质不稳定, 难以实现规模化生产^[5]。

在本课题组前期的研究中, 已经分离鉴定凯里白酸汤中的优势乳酸菌为副干酪乳杆菌、干酪乳杆菌和植物乳杆菌, 进一步研究发现副干酪乳杆菌和干酪乳杆菌的产酸能力相近^[6], 但直投式副干酪乳杆菌的价格高于直投式干酪乳杆菌, 为利于企业实际生产、帮助企业节约原料成本, 本实验选择干酪乳杆菌和植物乳杆菌作为强化菌进行复合发酵。值得注意的是, 由于白酸汤作为一种地域性较强的发酵制品, 其微生物群落结构组成复杂, 若仅用乳酸菌接种发酵而不使用母液, 则其风味远不如自然发酵, 这在本课题组先前的研究中已被证实。因此本实验选择以直投式菌粉和白酸汤母液作为复合发酵剂接种发酵白酸汤, 以期加快白酸汤发酵速度并稳定产品品质, 为白酸汤的复合接种发酵奠定了理论基础, 有助于推动白酸汤产业化发展。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验材料

白酸汤, 贵州明洋食品有限公司; 直投式干酪乳杆菌粉、直投式植物乳杆菌, 西安欣禄生物科技有限公司。

1.1.2 试验试剂

MRS 培养基 (生物试剂)、马铃薯葡萄糖琼脂 (生物试剂), 青岛海博生物技术有限公司; 氯化钠

(分析纯), 天津市天大化学试剂厂; 葡萄糖标准溶液、DNS 显色剂, 福州飞净生物科技股份有限公司; 一次性培养皿, 上海泰坦科技股份有限公司; 甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯), 赛默飞世尔科技公司; 甲酸(色谱纯), 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 2-氯苯丙氨酸(分析纯), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 甲酸铵(色谱纯), 默克(Sigma)科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

电热压力蒸汽灭菌锅, 浙江新丰医疗器械有限公司; SPX-150BIII 生化培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; DW-2 菌落计数器, 杭州大微生物技术有限公司; PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器有限公司; UV-1800PC 型紫外可见光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 气相色谱仪 -7890A, 安捷伦科技有限公司; 质谱仪 -Pegasus 4D, 美资力可(LECO)仪器(上海)有限公司; 液相色谱仪 -Vanquish, 质谱仪 -QE Focus, 赛默飞世尔科技公司。

1.3 试验方法

1.3.1 白酸汤样品制备方法

NF-7 组(对照组)白酸汤的制作方式与传统白酸汤自然发酵方法相同, 首先, 将浸泡 6 h 的大米进行胶体磨浆, 米和水的比例为 1:24, 将浆液加热煮沸使其糊化, 冷却后加入白酸汤母液作为发酵起始剂, 母液用量为 60%。IF-7 组(实验组)是在 NF-7 组的基础上添加直投式干酪乳杆菌和植物乳杆菌(1:1, 活菌数均为 1×10^{10} CFU/g 左右)进行接种发酵, 接种方案参考 Xiong 等^[7]的方法, 并进行一定修改, 控制接种后乳酸菌数量为 2×10^7 CFU/mL 左右。

1.3.2 理化指标及微生物指标的测定

白酸汤可滴定酸的测定方法参考测定参考 GB12456-2021; pH 值的测定方法参考 GB 5009.237-2016; 乳酸菌总数的测定参考 GB 4789.35-2016 平板计数法, 结果以 CFU/mL 表示; 酵母菌总数的测定参考 GB 4789.15-2016 中霉菌和酵母平板计数法, 结果以 CFU/mL 表示。

1.3.3 感官评价

参考 Li 等^[8]的方法并稍作修改, 由多年从事白酸汤生产及检验的人员, 分别对白酸汤发酵液中的

色泽、风味、滋味和质地进行评价, 采取百分制, 详细的白酸汤感官评价标准见表 1。

表 1 白酸汤感官评价指标

Table 1 Sensory evaluation index of rice sour soup

项目	评分标准	分数/分
色泽 (20分)	米白色, 清亮, 色泽均一, 有光泽	15~20
	米白色或淡黄色, 略有光泽	10~15
	白色或灰色, 无光泽	0~10
风味 (30分)	米香、乳酸香味丰富, 且融洽协调	25~30
	米香、乳酸香味丰富, 但不太融洽协调	20~25
	米香或乳酸香味其一过重, 香味不协调	10~20
滋味 (30分)	无香味, 有难闻气味	0~10
	酸爽适口, 回味浓, 口感好, 无异味	20~30
	酸爽适口, 有一定回味, 口感较好, 无异味	10~20
质地 (20分)	酸味过度或不足, 口感差, 有异味	0~10
	流动呈液体, 均匀无沉淀、无分层	15~20
	流动性较差, 有沉淀及悬浮物, 分层明显	0~10

1.3.4 非挥发性风味物质的测定

非挥发性风味物质的测定参考先前报道的方法^[9,10]并稍作修改, 使用的仪器为液相色谱仪 -Vanquish, 质谱仪 -QE Focus, 赛默飞世尔科技公司。梯度洗脱程序参考庄一民^[11]的方法。定性定量方法: 根据物质的精确分子量及 MS/MS 模式得到的碎片信息, 在 HMDB 数据库、Metlin 数据库、Massbank 数据库、Lipid Maps 数据库、Mzcloud 数据库及帕诺米克自建标准品数据库进行对照查找。为使不同量级的数据能够进行比较, 对数据进行峰面积的内标归一化, 各物质成分的相对百分含量使用峰面积归一化计算。

1.3.5 挥发性风味物质的测定

挥发性风味物质的测定参考冯玉超等^[12]的方法, 并稍作修改, 使用的仪器为气相色谱仪 -7890A, 安捷伦科技有限公司; 质谱仪 -Pegasus 4D, 美资力可(LECO)仪器(上海)有限公司。定性定量方法: 根据每种挥发物质的保留时间及质谱图在 NIST 数据库及 Wiley Registry 代谢数据库进行对照查找, 以相似度大于 800 作为基准, 并比对相关文献进行挥发性物质的定性。对数据进行峰面积的内标归一化, 各挥发性成分的相对百分含量使用峰面积归一化计算。

1.4 数据分析

实验结果以平均值 ± 标准差表示, 并采用 SPSS 22.0 数据软件、Origin Pro 2021、R 语言、Metabo Analyst 5.0、SIMCA-P 软件等进行统计分析和作图。

2 结果与讨论

2.1 白酸汤发酵过程中总酸及pH值的变化

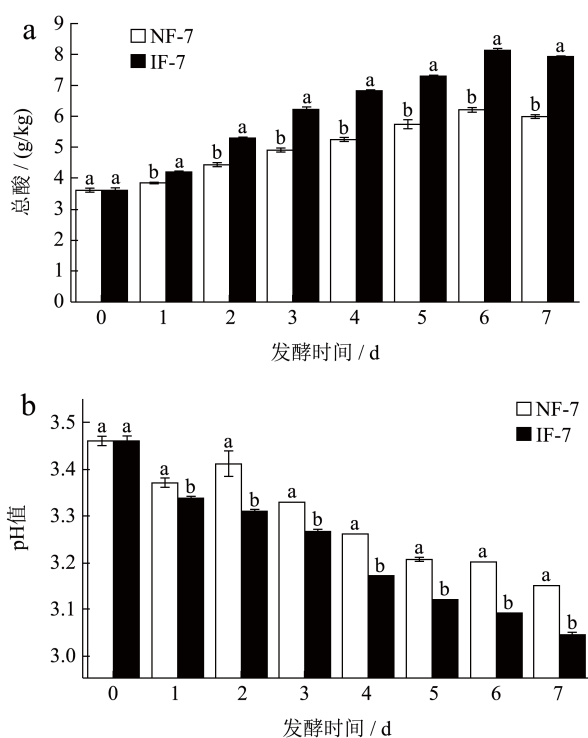


图 1 白酸汤发酵过程中的总酸含量及 pH 值的变化

Fig.1 Changes of total acid content and pH value during fermentation of rice sour soup

注:(a) 总酸;(b) pH 值。柱上“a~b”表示同一发酵时间两组别的差异性水平 ($P < 0.05$)。图 2 同。

总酸和 pH 值是判定白酸汤产品质量的重要理化指标, 对白酸汤的感官品质有着极大的影响。由图 1a 可知, 白酸汤总酸含量的变化整体呈现先缓慢增长, 再显著增长, 随后趋于稳定。由于上一轮发酵物的存在, 白酸汤的初始总酸含量较高, 为 3.62 g/kg, 随着发酵的进行, 产生大量有机酸, 使总酸含量均不断增加, 发酵第 7 天时, NF-7 组和 IF-7 组总酸含量存在显著性差异 ($P < 0.05$), 分别为 5.98、7.88 g/kg, 总酸含量差异高达 1.90 g/kg, 增长率为 31.77%, 发酵 3 d 的 IF-7 组的总酸含量便高于 NF-7 组发酵 7 d 的总酸含量, 这说明通过添加干酪乳杆菌和植物乳杆菌作为发酵剂, 能明显加速白酸汤发酵速率。由图 1b 可知, 白酸汤发酵过程中

pH 值的变化整体呈现下降趋势, 白酸汤起始 pH 值较低, 为 3.46。当发酵到第 7 天时, 2 组酸汤的 pH 值存在显著性差异 ($P < 0.05$), 分别为 3.15、3.05, 发酵 5 d 的 IF-7 组的 pH 值便低于 NF-7 组发酵 7 d 的 pH 值。结合白酸汤发酵过程中总酸的变化情况可以得出, 通过复合接种干酪乳杆菌和植物乳杆菌, 能显著加速白酸汤发酵的进行, 缩短生产周期, 这主要是由于乳酸菌总量较高, 快速利用发酵液中的营养物质, 代谢产生乳酸等酸性物质, 使 pH 值快速下降^[13]。Li 等^[14]在以干酪乳杆菌接种发酵红酸汤的研究中也发现, 接菌组的总酸升高速率及 pH 值下降速率均高于自然发酵组。

2.2 白酸汤发酵过程中乳酸菌及酵母菌的变化

由图 2a 可知, 发酵开始时乳酸菌总数便较高, NF-7 组为 6.99 lg CFU/mL, 这是由于母液本身带入了较多的乳酸菌, IF-7 组则为 7.36 lg CFU/mL。发酵第 7 天时, NF-7 组乳酸菌总数为 7.69 lg CFU/mL, 而 IF-7 组乳酸菌数为 7.89 lg CFU/mL。随着发酵的进行, 白酸汤中的乳酸菌总数整体呈现先上升后下降趋势, 由于开始时营养物质充足, 乳酸菌数量呈快速上升趋势, 随着白酸汤中的营养物质被消耗殆尽以及自身代谢产物的累积, 乳酸菌数量开始逐渐下降。由于直投式接种组中乳酸菌数量多, 致使营养物质消耗速率更快, 因此在第 3 天时, 乳酸菌总数便达到最大值, 为 8.08 lg CFU/mL。发酵第 1 天时, 2 个组别的酸汤乳酸菌总数差异整体较小 ($P < 0.05$); 随着发酵的进行, 2 个组别的酸汤乳酸菌数量差异整体逐渐增大, 发酵结束时, 2 个组别的酸汤乳酸菌数量均存在显著差异 ($P < 0.05$)。乳酸菌是白酸汤中的核心菌群, 乳酸菌通过自身的发酵产生乳酸等有机酸及氨基酸等代谢产物, 赋予了白酸汤独特的风味, 乳酸菌数量的在一定范围内的增加, 能有效促进白酸汤的发酵速率, 提升产品风味。另外, 乳酸菌的总数的增加, 能通过竞争关系有效的抑制其他杂菌的生长, 提供产品安全性。Wang 等^[15]的实验表明, 通过添加不同的发酵剂(发酵乳杆菌、植物乳杆菌、酿酒酵母)加速发酵米粉, 会使其微生物多样性显著减低, 较少了杂菌对发酵过程的影响, 因此提高了产品的安全性。

由图 2b 可知, 随着白酸汤发酵的进行, 酵母菌总数整体呈现先上升后下降再上升。发酵初期, 营养物质充足, 酸度适宜, 因此酵母菌数量快速增长; 随后, 由于发酵导致环境 pH 值的降低, 以及

大量乳酸菌生长消耗营养物质均对酵母菌的生长有抑制作用,致使酵母菌总数降低;再随后,pH值进一步降低及乳酸菌自身代谢产物的累计,此时环境对乳酸菌的抑制作用大于对酵母菌的抑制,因此酵母菌总数再次增高。发酵第1~3天时,2个组别的酵母菌总数接近($P>0.05$);发酵第4天时,IF-7组酵母菌数量快速上升,值得注意的是,IF-7组乳酸菌在发酵第4天时快速下降,因此表明酵母菌和乳酸菌在白酸汤发酵过程中存在明显的相互影响作用;当发酵至第7天时,2组酵母菌总数存在显著差异($P<0.05$),且对照组酵母菌总数高于实验组,这说明乳酸菌数量在一定范围内的增多,会抑制酵母菌的生长繁殖。在许多发酵型谷物食品中,都存在酵母菌和乳酸菌共同作用,乳酸菌生长使环境pH值减低会促进酵母菌生长,而酵母菌代谢产生的维生素以及含氮有机物等能促进乳酸菌等细菌的生长^[16]。乳酸菌和酵母菌的协同或竞争作用,有助于促进白酸汤风味的形成,提升酸汤品质^[17]。值得注意的是,白酸汤发酵过程中伴随着许多微生物,不仅是干酪乳杆菌、植物乳杆菌起关键作用,两个菌种可能还与群落微生物存在相互作用,进而影响白酸汤发酵。本试验未考虑到群落微生物的影响,在下一步的试验中应增加对直投式发酵白酸汤微生物群落结构变化的研究。

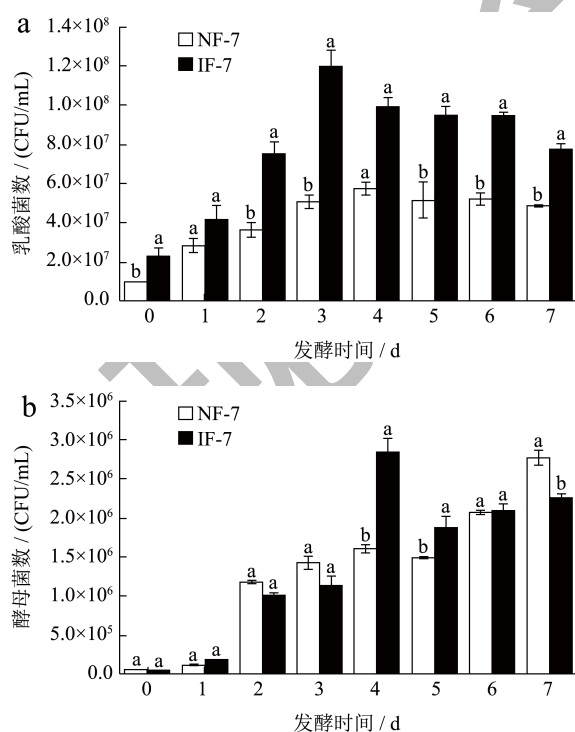


图2 白酸汤发酵过程中乳酸菌及酵母菌的变化

Fig.2 Changes of lactic acid bacteria and yeast during fermentation of rice sour soup

2.3 感官评价

从色泽、风味、滋味及质地四个方面对NF-7组和IF-7组酸汤进行感官评价,将每一项得分分值与该项满分相除,绘制雷达图(图3),由图3可知,与NF-7组相比,IF-7组白酸汤样品色泽更加清亮有光泽,气味整体协调性好,且滋味爽口回味浓郁,NF-7组和IF-7组酸汤总分分别为68.70分、81.70分,表明通过接种乳酸菌发酵白酸汤,能显著提升产品品质。

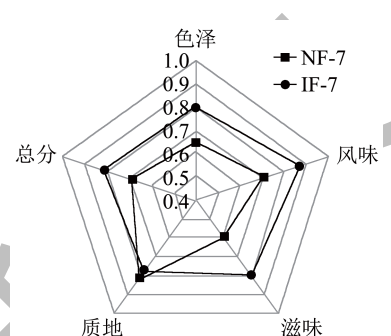


图3 自然发酵和直投式发酵白酸汤的感官评定

Fig.3 The sensory evaluation of rice sour soup by natural fermentation and direct vat set fermentation

2.4 基于液相色谱-质谱技术对直投式接种发酵白酸汤的差异代谢物分析

2.4.1 不同发酵方式白酸汤差异代谢物的鉴定

通过采用PCA、PLS-DA及OPLS-DA等多元统计分析方法对样品进行分析。如PCA主成分得分图(图4a)所示,IF-7组和NF-7组样本整体表现为组内聚集和组间离散,因此可得出两组间样品具有差异;进一步通过PLS-DA偏最小二乘法-判别分析,由图4b可知,IF-7组和NF-7组间离散更加明显,表明两组之间的代谢物具有较大差异;PLS-DA置换检验图可对PLS-DA模型的可靠性进行检验,其检验标准为所有Q2的点均低于最右侧Q2点或回归线与Y轴的交点小于等于0,从图3d可看出,PLS-DA模型是可靠的;OPLS-DA能增强模型的解释能力,从而最大程度查看组间差异,由图4c可得出,IF-7组和NF-7组能很好的区分开,组内关联度高,再次表明直投式接种发酵白酸汤与自然发酵白酸汤的代谢产物存在明显差异。通过对代谢物进行筛选,寻找差异代谢物,选择筛选标准为 $P\text{-value} \leq 0.05$ 且 $VIP \geq 1$,与NF-7组相比,IF-7组发酵液中共筛选出584个上调代谢产物及281个下调代谢产物。

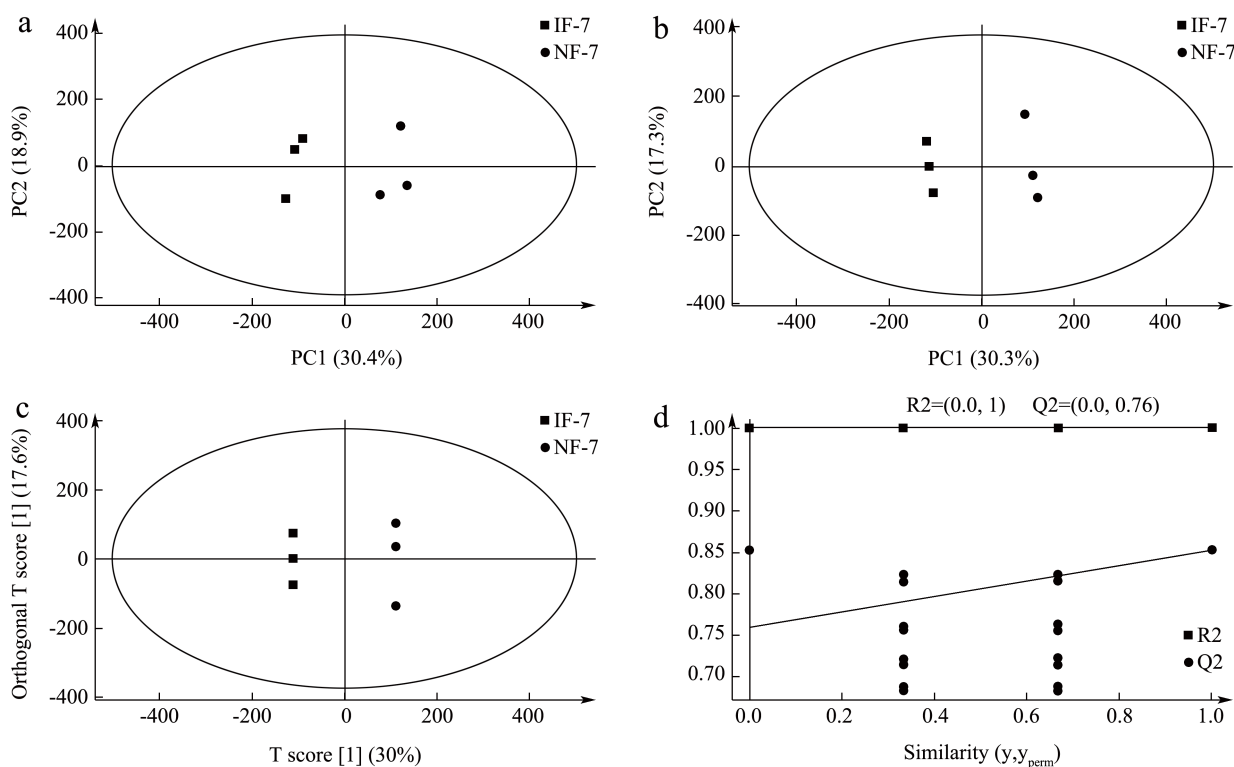


图4 发酵白酸汤代谢物的多元统计分析

Fig.4 Multivariate statistical analysis of metabolites of fermented rice sour soup

注: (a) PCA 得分图; (b) PLS-DA 得分图; (c) PLAS-DA 得分图; (d) PLS-DA 置换检验图。

2.4.2 不同发酵方式白酸汤差异代谢物分析

先确认代谢物精确分子量, 后根据 MS/MS 模式所得碎片信息在数据库中匹配注释获得代谢物准确信息, 最终得出 27 个具有显著差异和准确信息的代谢物 (表 2)。通过采用凝聚层次聚类, 得到代谢物相对定量值层次聚类图 (图 5), 图中相对含量的大小通过颜色的不同来显示, 列表代表样本, 行代表代谢物。由表 2 和图 5 可看出, IF-7 组和 NF-7 组的差异代谢物主要为有机酸、氨基酸、脂肪酸和糖类物质。IF-7 组共有 21 种代谢物高于 NF-7 组, 吡咯啉羟基羧酸、L- 乳酸、丁二酸、D-1- 哌啶-2- 羧酸等有机酸以及赖氨酸等氨基酸类在 IF-7 组发酵液中的含量明显高于 NF-7 组; IF-7 组共有 6 种代谢物低于 NF-7 组, 分别为葫芦巴碱、N- 乙酰腐胺、(Z)-12,13- 二羟基十八碳-9- 烯酸、3- 甲基-3- 羟基戊二酸、甲基麦芽酚和磷酸。

2.4.2.1 有机酸

从表 2 及图 5 中可得出, 两组有机酸的差异代谢物主要是吡咯啉羟基羧酸、L- 乳酸、丁二酸、3- 甲基-3- 羟基戊二酸。IF-7 组中吡咯啉羟基羧酸的含量的 NF-7 组的 4.08 倍, 吡咯啉羟基羧酸是吡咯啉羧酸在羟脯氨酸氧化酶的作用下氧化生成的物

质^[18], 而吡咯啉羧酸是一种维生素 B6 的拮抗剂^[19], IF-7 组中吡咯啉羟基羧酸含量更高, 可能更利于人体对维生素 B6 的消化利用。IF-7 组中的 L- 乳酸是 NF-7 组的 3.45 倍, L- 乳酸能中和乙酸等有刺激性的酸, 使白酸汤口感更加柔和。丁二酸 (琥珀酸) 是三羧酸循环产生的中间产物, 有助于肠道蠕动及调节肠道 pH 值^[20], 具有特殊鲜味, 被广泛应用于各类食品之中。有趣的是, 在 Li 等^[14]利用干酪乳杆菌接种发酵红酸汤的研究中, 同样发现了发酵结束时接菌组的乳酸及琥珀酸含量均高于自然发酵组。3- 甲基-3- 羟基戊二酸在 IF-7 组的含量少于 NF-7 组, 其是一种呈酸味又呈甜味的有机酸^[21]。不难发现, 这些有机酸的增多, 能直接或间接提升产品风味或营养成分。

2.4.2.2 氨基酸

结合表 2 及图 5 中可得出, 两组中氨基酸类差异代谢物有 Nalpha- 甲基组氨酸、N6- 乙酰-L- 赖氨酸、哌啶酸和赖氨酸, IF-7 组中的含量分别是 NF-7 组中 3.95、2.90、1.47、1.20 倍, IF-7 组中具有更高的氨基酸含量。其中, 赖氨酸是一种必需氨基酸, 能增加食品的营养价值并提升产品风味, 由于谷物食品中赖氨酸含量低且易在加工中被破坏, 因此被

称为谷类食品的第一限制氨基酸, 其具有促进机体发育、增强免疫力等作用^[22], IF-7 组中赖氨酸含量的增高, 能一定程度上使白酸汤的氨基酸模式更适合人体的消化利用, Nalwoga^[23]的研究也发现植物乳杆菌发酵的大米饮料中的赖氨酸含量增高, 这表明通过乳酸菌发酵大米制品能一定程度的改善米制品中赖氨酸匮乏的问题。

2.4.2.3 脂肪酸

两组酸汤中脂肪酸差异代谢物主要为亚油酸和 (Z)-12,13- 二羟基十八碳 -9- 烯酸。在 IF-7 组中, 人体必要的多不饱和脂肪酸 (亚油酸) 的含量显著高于 NF-7 组, 是 NF-7 组的 6.19 倍, 亚油酸不仅能为人体提供能量, 更具有抗氧化、降低胆固醇及一

定的抗癌作用^[24]。二羟基十八碳 -9- 烯酸是 IF-7 组中含量少于 NF-7 组的物质, 其具有果实香气, 是赤霞珠果实中主要的香气物质^[25]。

2.4.2.4 其他相关类物质

由表 2 及图 5 可以看出, 烟酰胺及烟酰胺核糖等维生素及维生素衍生物, 在 IF-7 组中的含量均高于 NF-7 组, 烟酰胺别名维生素 B3, 具有抗炎和延缓衰老等方面作用, 对维持机体正常的生命活动中发挥重要作用。并且, 醇类及酯类物质在 IF-7 组中的含量也均高于 NF-7 组, 醇类物质与乳酸菌等微生物代谢产生的有机酸在酯酶的作用下生成酯类物质, 酯类物质具有低阈值的特点, 是产品重要的风味物质。

表 2 差异显著的差异代谢物 ($P \leq 0.05 + VIP \geq 1$) [按照 $\log_2(FC_{IF/NF})$ 大小排序]

Table 2 Significantly different metabolites ($P \leq 0.05 + VIP \geq 1$) [The order according to the score of $\log_2(FC_{IF/NF})$]

名称	分类	倍性变化	$\log_2(FC_{IF/NF})$	VIP	P
1- 蔗糖三糖	糖类	5 036.80	12.30	1.39	8.51E-05
蜜二糖	糖类	528.68	9.05	3.00	7.44E-05
麦芽三糖	糖类	180.66	7.50	7.88	2.61E-06
N- 苯甲酰 -4- 甲氧基邻氨基苯甲酸酯	酯类	51.36	5.68	2.59	3.22E-04
纤维二糖	糖类	39.89	5.32	14.70	2.03E-07
山梨糖醇	糖类	16.34	4.03	2.59	3.87E-05
O- 乙酰肉碱	季铵盐类	15.83	3.98	2.53	1.31E-05
亚油酸	脂肪酸类	6.19	2.63	2.40	6.73E-04
N- 乙酰氨基葡萄糖	糖类	5.14	2.36	3.60	9.08E-05
烟酰胺	辅因子与维生素	4.90	2.29	1.48	1.91E-04
吡咯啉羧基羧酸	有机酸类	4.08	2.03	1.34	2.32E-02
Nalpha- 甲基组氨酸	氨基酸类	3.94	1.98	1.21	6.50E-03
L- 乳酸	有机酸类	3.45	1.79	1.30	3.06E-02
N6- 乙酰 -L- 赖氨酸	氨基酸类	2.90	1.54	2.56	2.07E-04
葡萄糖内酯	酯类	2.88	1.53	2.06	3.43E-03
2,3- 丁二醇	醇类	2.51	1.33	1.97	1.11E-02
丁二酸	有机酸类	2.20	1.14	1.89	2.99E-02
D-1- 吡啶 -2- 羧酸	有机杂环化合物	2.15	1.10	1.26	3.18E-03
烟酰胺核糖	辅因子与维生素	1.58	0.66	1.66	3.24E-03
吡啶酸	氨基酸类	1.47	0.55	1.30	6.12E-03
赖氨酸	氨基酸类	1.20	0.27	1.21	4.64E-02
葫芦巴碱	生物碱类	0.79	-0.35	1.06	9.30E-03
N- 乙酰腐胺	腐胺衍生物类	0.75	-0.41	2.09	1.18E-02
(Z) -12,13- 二羟基十八碳 -9- 烯酸	脂肪酸类	0.63	-0.66	1.12	2.16E-02
3- 甲基 -3- 羟基戊二酸	有机酸类	0.41	-1.29	1.76	3.38E-02
麦芽酚	酚类	0.40	-1.34	2.05	7.51E-03
磷酸	无机酸类	0.35	-1.53	4.38	2.78E-04

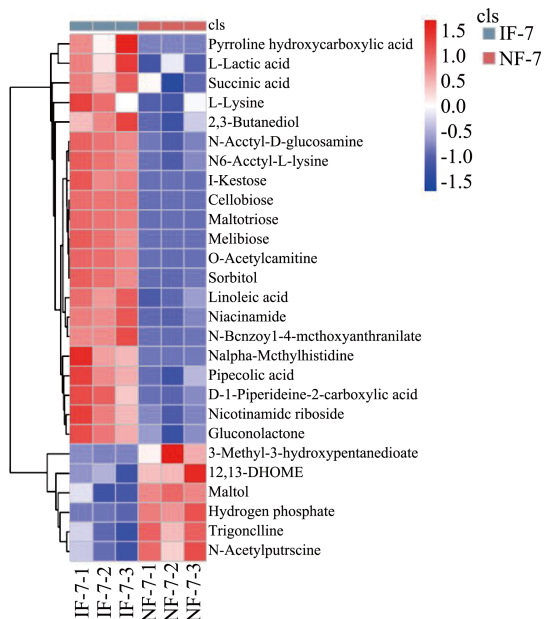


图5 不同发酵方式白酸汤差异代谢物热图

Fig.5 Thermogram of different metabolites in rice acid soup with different fermentation methods

葫芦巴碱、N-乙酰腐胺、甲基麦芽酚和磷酸在IF-7组中的含量均小于NF-7组。葫芦巴碱是中国药典用来治疗肾脏虚冷的药物，现代医学认为其具有抗肿瘤、降血糖等作用^[26]，其存在于白酸汤原料水稻之中^[27]，是维生素B3的前体物质^[28]，接种发酵可能影响了维生素B3代谢或转化为葫芦巴碱的过程，这在前文对比2组别维生素B3含量的分析中可得到印证；N-乙酰腐胺是一种腐胺衍生物类物质，是由氨基酸去羧化产生的，这类物质可引起人体心率及血压升高^[29]，腐胺类物质在发酵类产品中通常是由杂菌所产生的^[30]，由于IF-7组中乳酸菌迅速称为优势菌并在发酵过程中一直保持较高数量，因此抑制了杂菌的生长，从而减少腐胺类物质，提升产品安全性；甲基麦芽酚是一种具有焦香味的风味物质，被广泛应用于各类食品中，但过量摄入会引起肝肾功能疾病^[31]。

另外，差异代谢物中含量差异最大的几种物质为糖类，这主要是由于IF-7组在接种发酵时，菌剂包埋物（低聚麦芽糖、低聚果糖和低聚葡萄糖等糖类物质）带入产生的差异，另一方面则是由于微生物的代谢所产生的影响。

2.5 基于全二维气相色谱-飞行时间质谱技术对直投式接种发酵白酸汤挥发性成分的分析

2.5.1 不同发酵方式白酸汤挥发性成分的鉴定

挥发性成分是构成白酸汤风味物质的主要成

分，对白酸汤的风味有着极为重要的影响。相比于一维的GC-MS技术，全二维的GC×GC-MS技术，分辨力大大提升，峰容量从一两百飞跃到上万，灵敏度也显著提高，实现了高通量的广谱分析。通过采用GC×GC-TOFMS法分别对IF-7组和NF-7组样本的风味物质进行分析检测，其三维图谱如图7所示。以相似度不小于800作为基准，从IF-7组中共鉴定出248种香气成分，从NF-7组中共鉴定出246种香气成分，两组的主要风味物质均为醇类、酸类及酯类等物质。

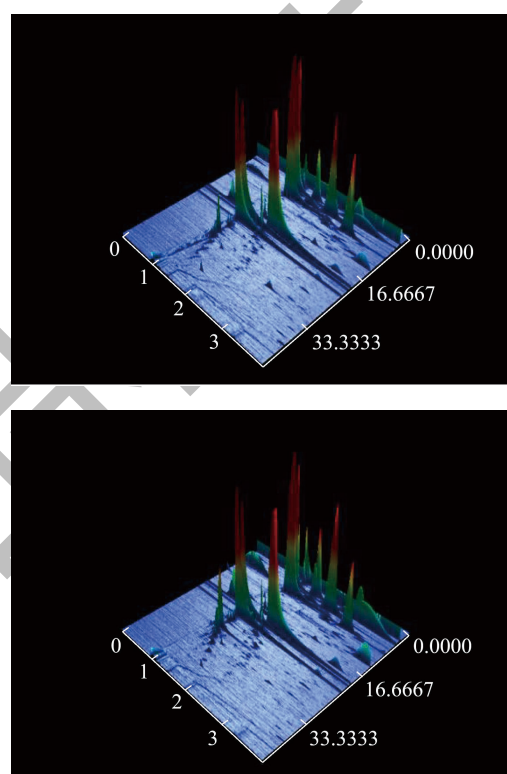


图6 不同发酵方式白酸汤挥发性成分的3D色谱图

Fig.6 The 3D chromatogram of volatile components of rice sour soup with different fermentation methods

注：(a) IF-7；(b) NF-7。

2.5.2 不同发酵方式白酸汤挥发性成分的分析

白酸汤的发酵可分为三个阶段，第一阶段为淀粉糖化，第二阶段为以酵母菌等微生物为主的酒精发酵阶段，第三阶段为以乳酸菌、醋酸菌等微生物为主的乳酸、醋酸发酵阶段，在此过程中产生的醇类、酸类在酯化酶的作用下发生反应生成酯类化合物。

由图7可知，IF-7组中的主要挥发性风味物质为醇类（45.31%）、酸类（19.50%）、酯类（8.35%）、烷烃类（8.22%）、醛类（2.18%）；NF-7组中的主要挥发性风味物质与IF-7组相似，分别为醇类

(43.04%)、酸类(19.38%)、酯类(13.29%)、烷烃类(9.72%)、醛类(2.58%)。IF-7组和NF-7组风味成分的差别主要为醇类、酸类和酯类。IF-7组醇类物质、酸类物质均高于NF-7组,两组含量相差分别为2.28%、0.12%,而在酯类物质含量方面,IF-7组低于NF-7组,两组含量相差为4.95%。

IF-7组醇类物质共有65种,其中含量较多(大于1%)的为丙醇(17.29%)、乙醇(10.60%)、(*R**, *R**)- α -1-氨基乙基苯甲醇(3.55%)、2-庚醇(2.71%)、异丙醇(1.48%)、2-氯-1-丙醇(1.31%)、2-十一醇(1.30%)、赤式-3-溴-2-戊醇(1.07%);NF-7组醇类物质共有66种,其中含量较多的为丙醇(17.57%)、乙醇(8.26%)、2-十一醇(3.52%)、(*R**, *R**)- α -1-氨基乙基苯甲醇(2.74%)、四甘醇(1.90%)、2-庚醇(1.45%)、赤式-3-溴-2-戊醇(1.22%)。不难发现,IF-7组和NF-7组在醇类风味物质的差异较小,主要均为丙醇和乙醇且含量相近。Wang等^[15]在研究添加不同发酵剂(发酵乳杆菌、植物乳杆菌、酿酒酵母)加速米粉发酵中也得出了发酵剂对醇类香味物质的影响较小的结论。

IF-7组中共同26种酸类风味物质,其中含量较多的为乙酸(8.35%)、丙酸(7.05%)、乙基丙二酸(1.93%);NF-7组中共同25种酸类风味物质,其中含量较多的为乙酸(9.51%)、丙酸(7.17%)。与醇类物质的差异相似,酸类风味物质在两种之间的差异仍然较小,主要均为乙酸和丙酸且含量相近,因此可得出直投式乳酸菌接菌发酵对白酸汤酸类、醇类风味物质的影响较小。

酯类物质虽为白酸汤中含量第三多的风味物质,但由于酯类物质的气味阈值相对较低且气味活度较高,因此其对白酸汤的风味贡献较大。两组白酸汤中的酯类主要为乙酯及丙酯,这些短链酯类物质具有令人愉悦的花果香气^[32]。IF-7组中共有酯类物质27种(共占比8.35%),主要(大于等于0.10%)为乙酸丙酯(3.81%)、丙酸丙酯(2.10%)、乙酸乙酯(1.26%)、丙酸乙酯(0.82%)、2-硝基乙醇丙酸酯(0.10%);NF-7组中也共有酯类物质27种(共占比13.29%),主要为乙酸丙酯(6.78%)、乙酸乙酯(2.13%)、丙酸丙酯(1.99%)、2-硝基乙醇丙酸酯(1.02%)、丙酸乙酯(0.56%)、磷酸乙烯基二甲酯(0.36%)、乙二醇二乙酸酯(0.15%)。IF-7组中乙酸丙酯、乙酸乙酯、2-硝基乙醇丙酸酯的含量仅分别为NF-7组的56.12%、59.19%和10.07%,但丙酸丙酯、丙酸乙酯含量分别是NF-7

组的105.5%和146.78%。整体而言,IF-7组中的主要酯类风味物质在含量和数量方面均少于NF-7组。Liu等^[2]的研究也表明,乳酸杆菌与乙酸乙酯、乙酸丙酯等酯类物质的相关性较小,而克鲁维酵母菌、酿酒酵母与酯类(乙酸乙酯、丙酸乙酯、乙酸丙酯等)呈现显著正相关($P < 0.05$)。在Liu等^[5]的另一项研究中也表明酵母菌协同发酵的白酸汤风味强于单一乳酸菌强化发酵。从白酸汤发酵过程中乳酸菌及酵母菌总数的变化中可以发现,IF-7组发酵结束时乳酸菌总数含量显著高于NF-7组($P < 0.05$),而酵母菌总数显著低于NF-7组($P < 0.05$),因此IF-7组的酯类物质含量及数量低于NF-7组,在后续为进一步实验中,可考虑通过添加酵母菌的形式,促进酸汤中酯类物质的形成。但值得注意的是,并非所以米类发酵制品的酯类物质都与乳酸菌呈负相关或相关性较小,在Wang等^[33]的研究中则发现乳球菌与乙酸戊酯及2-甲基丙酸甲酯呈正相关,这表明不同类型的大米发酵制品其风味物质与微生物的相关性具有差异,因此酵母菌协同发酵是否能促进白酸汤的风味物质的形成还需要进一步的研究。

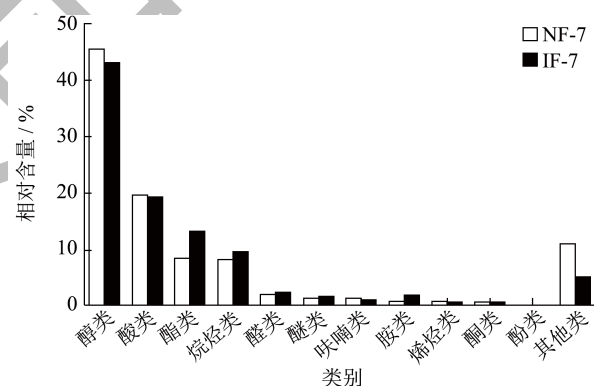


图7 不同发酵方式白酸汤挥发性成分含量

Fig.7 Content of volatile components in rice sour soup with different fermentation methods

烷烃类、醛类、醚类、呋喃类、胺类、烯炔类、酮类和酚类在IF-7组和NF-7组中含量相近;其他类中主要为腈类化合物和脲类化合物,除甲氧基苯基脲在两组中含量差异较大外(IF-7组中含量为7.39%,NF-7组中含量为3.53%),其他物质含量差异较小。甲氧基苯基脲是一种风味物质,有关该物质的报道较少,但在竹笋^[34]中有发现该物质。

2组白酸汤在风味物质的差异,主要是由于微生物区系结构改变所引起的,通过接种乳酸菌发酵的方式,增强了发酵过程中乳酸菌发酵过程,减弱了酵母菌发酵过程,导致酸类等与乳酸菌呈正相关

的物质增多,而与酵母菌呈正相关的醇类、酯类物质降低,酯类作为白酸汤最关键的风味物质,其相对含量的降低可能致使 IF-7 组白酸汤的风味略弱于 NF-7 组, Xiong 等^[7]的研究中也发现了仅使用单一乳酸菌接种发酵红酸汤,虽能加快发酵速度但不利于其风味物质的形成。

3 结论

本试验选用直投式菌剂与母液混合接种发酵白酸汤,并与自然发酵的白酸汤进行对比分析。结果表明,发酵相同时间的乳酸菌强化发酵的白酸汤与自然发酵的白酸汤相比,具有更高的总酸含量、乳酸菌数量及更好的感官评价,L-乳酸、赖氨酸等物质的含量也更高,这些代谢物具有特殊有益的生物活性,提高了白酸汤的营养保健价值,而N-乙酰腐胺等不利于产品品质的代谢物在 IF-7 组中含量更少,提升了白酸汤的安全性,在对挥发性风味物质的研究中,IF-7 组在酸类物质(特征酸类为:乙酸、丙酸等)含量方面优于 NF-7 组,但在醇类(特征醇类为:丙醇、乙醇等)、酯类物质(特征酯类为:乙酸丙酯、丙酸丙酯、乙酸乙酯等)含量方面少于 NF-7 组,接种发酵可获得与天然发酵相似的风味,本文仅研究了相对含量,后续将对 OAV 值进一步研究。综上所述,采用混合接种植物乳杆菌和干酪乳杆菌的方式能有效的加速白酸汤发酵速率,缩短生产时间,提升产品品质,保证产品风味。酵母菌是白酸汤中的另一核心微生物,在后续的研究中,可通过复合添加直投式乳酸菌及酵母菌的方式,进一步提升产品风味。

参考文献

- [1] LIU N, QIN L K, PAN J H, et al. Characteristics of traditional Chinese acidic rice soup (rice-acid) prepared with different fermentation methods [J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(2): 277-288.
- [2] LIU N, PAN J H, MIAO S, et al. Microbial community in Chinese traditional fermented acid rice soup (rice-acid) and its correlations with key organic acids and volatile compounds [J]. Food Research International, 2020, 137: 109672.
- [3] LIU N, QIN L K, MAZHAR M, et al. Integrative transcriptomic-proteomic analysis revealed the flavor formation mechanism and antioxidant activity in rice-acid inoculated with *Lactobacillus paracasei* and *Kluyveromyces marxianus* [J]. Journal of Proteomics, 2021, 238: 104158.
- [4] LIN L J, WU J Y, CHEN X, et al. The role of the bacterial community in producing a peculiar smell in Chinese fermented sour soup [J]. Microorganisms, 2020, 8(9): 1270.
- [5] LIU N, MIAO S, QIN L K, et al. Screening and application of lactic acid bacteria and yeasts with l-lactic acid-producing and antioxidant capacity in traditional fermented rice acid [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(11): 6095-6111.
- [6] 赵承鑫,李艾蒙,杨小云,等.凯里白酸汤乳酸菌的分离鉴定及菌种性能测定[J].中国调味品,2022,47(12):32-36.
- [7] XIONG K X, HAN F, WANG Z H, et al. Screening of dominant strains in red sour soup from Miao nationality and the optimization of inoculating fermentation conditions [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 9(1): 261-271.
- [8] LI D F, DUAN F X, TIAN Q M, et al. Physicochemical, microbiological and flavor characteristics of traditional Chinese fermented food Kaili red sour soup [J]. LWT, 2021, 142: 110933.
- [9] ABDELHAFEZ O H, OTHMAN E M, FAHIM J R, et al. Metabolomics analysis and biological investigation of three Malvaceae plants [J]. Phytochemical Analysis, 2020, 31(2): 204-214.
- [10] DEMURTAS A, PESCIANA S, NICOLI S, et al. Validation of a HPLC-UV method for the quantification of budesonide in skin layers [J]. Journal of Chromatography B-analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2021, 1164: 122512.
- [11] 庄一民. β -羟基丁酸对山羊羔羊瘤胃上皮基因表达与代谢的影响[D].北京:中国农业科学院,2021.
- [12] 冯玉超,王长远,李雪,等.黑龙江省不同产地水稻的 GC-MS代谢物差异分析[J].食品科学,2019,40(2):208-214.
- [13] 郝明玉.直投式发酵泡菜与自然发酵泡菜的比较研究[D].南昌:南昌大学,2013.
- [14] LI J, WANG X Y, WU W Y, et al. Comparison of fermentation behaviors and characteristics of tomato sour soup between natural fermentation and dominant bacteria-enhanced fermentation [J]. Microorganisms, 2022, 10(3): 640.
- [15] XIONG K X, HAN F, WANG Z H, et al. Edible qualities, microbial compositions and volatile compounds in fresh fermented rice noodles fermented with different starter cultures [J]. Food Research International, 2022, 156: 111184.
- [16] MESTRES C, MUNANGA B, GRABULOS J, et al. Modeling mixed fermentation of gowé using selected *Lactobacillus plantarum* and *Pichia kluyveri* strains [J]. Food Microbiology, 2019, 84: 103242.
- [17] 刘娜.乳酸菌与酵母菌协同发酵米酸特征风味形成机理研究[D].贵阳:贵州大学,2021.
- [18] 韩红祥,宋凤瑞,舒振波,等.非靶向尿液代谢组学方法研究五味子治疗糖尿病并发症作用机制[J].分析化学, 2017,45(3):389-396.

- [19] FARRANT R D, WALKER V, MILLS G A, et al. Pyridoxal phosphate de-activation by pyrroline-5-carboxylic acid: Increased risk of vitamin B6 deficiency and seizures in hyperprolinemia type II [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(18): 15107-15116.
- [20] PICARD C, FIORAMONTI J, FRANCOIS A, et al. Review article: bifidobacteria as probiotic agents-physiological effects and clinical benefits [J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2005, 22(6): 495-512.
- [21] 范文来.白酒及其发酵过程中内源产生的不挥发性有机化合物综述[J].*酿酒*,2020,47(6):4-14.
- [22] WAN J H, LIU H Y, CHU J, et al. Functions and mechanisms of lysine crotonylation [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23(11): 7163-7169.
- [23] NALWOGA M.淀粉乳酸菌发酵的大米饮料潜在功能性质的研究[D].无锡:江南大学,2013.
- [24] LI J, GUASCH-FERRÉ M, LI Y P, et al. Dietary intake and biomarkers of linoleic acid and mortality: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2020, 112(1): 150-167.
- [25] 胡博然.宁夏“贺兰山东麓”葡萄酒香味物质变化规律研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2004.
- [26] MARZOUK M, SOLIMAN A M, OMAR T Y. Hypoglycemic and antioxidative effects of fenugreek and termis seeds powder in streptozotocin-diabetic rats [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2013, 17(4): 559-565.
- [27] 王文升.水稻代谢组学的生物信息学分析及遗传基础的研究[D].武汉:华中农业大学,2017.
- [28] 邵金良,刘兴勇,杨东顺,等.咖啡及咖啡制品中葫芦巴碱、绿原酸和咖啡因含量比较分析[J].*山西农业科学*, 2016,44(2):158-163.
- [29] LIN L J, DU F M, ZENG J, et al. Deep insights into fungal diversity in traditional Chinese sour soup by Illumina MiSeq sequencing [J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109439.
- [30] 王光强,俞剑癸,胡健,等.食品中生物胺的研究进展[J].*食品科学*,2016,37(1):269-278.
- [31] ZHANG X T, NIU J H, YANG Y X, et al. Fe₃O₄ nanoparticles as the adsorbent of magnetic solid-phase extraction for clean and preconcentration of maltol and ethyl maltol in food samples followed by HPLC analysis [J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2017, 40(16): 832-838.
- [32] HU K, JIN G J, MEI W C, et al. Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed *H. uvarum* / *S. cerevisiae* fermentation leads to wine fruity aroma enhancement [J]. *Food Chemistry*, 2018, 239: 495-501.
- [33] WANG A X, YI C P, XIAO T Z, et al. Volatile compounds, bacteria compositions and physicochemical properties of 10 fresh fermented rice noodles from southern China [J]. *Food Research International*, 2021, 150(PA): 110787.
- [34] ZHEN J, ZHAN F S, ZHOU C H, et al. Comparison of flavor compounds in fresh and pickled bamboo shoots by GC-MS and GC-olfactometry [J]. *Food Science and Technology Research*, 2014, 20(1): 129-138.