

不同酱醅层挥发性物质组成的差异

赵谋明¹, 林涵玉¹, 周朝晖², 卢丽玲², 陈子杰¹, 冯云子¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510641)

(2. 广东珠江桥生物科技股份有限公司, 广东中山 528415)

摘要: 在高盐稀态酱油生产工艺中, 采用大型发酵罐替代传统发酵池是酱油工业现代化的重要趋势, 然而发酵池酿造酱油比发酵罐酿造酱油酱香更为浓郁, 推测这与不同酱醅接触光照、空气的表面积差异有关。因此, 本研究对比了不同酱醅层的香气物质组成和浓度。结果发现, 发酵池酱油部分优势的关键香气活性物质, 如 2-甲基丙醇, 3-甲基丁醇, 2-甲基丁醇, 苯乙醇, 苯乙醛, 3-甲基丁酸, 2-甲基丁酸, 4-乙基苯酚, 4-乙基愈创木酚和愈创木酚在表层酱醅含量高于下层酱醅, 而发酵罐酱油的优势香气物质 1-辛烯-3-醇和 3-甲硫基丙醛在下层酱醅含量高于表层酱醅, 这些物质差异的一致性表明酱醅表面积会影响酱油香气物质形成, 而表层酱醅美拉德反应程度更强烈、下层酱醅酵母菌和乳酸菌更加活跃是引起表层酱醅和下层酱醅香气物质差异的重要原因。

关键词: 高盐稀态酱油; 发酵罐; 发酵池; 酱醅层; 香气活性化合物

文章编号: 1673-9078(2019)02-7-16

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.2.002

Differences in Volatile Profiles of Different Soy Sauce Mashes

ZHAO Mou-ming¹, LIN Han-yu¹, ZHOU Chao-hui², LU Li-ling², CHEN Zi-jie¹, FENG Yun-zi¹

(1. School of Food Science and Engineering South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

(2. Pearl River Bridge Biological Polytron Technology Company, Zhongshan 528415, China)

Abstract: The use large-scale fermenters in the place of the traditional fermentation ponds in the production of high-salt liquid-state fermented soy sauce represents an important step in the modernization of the soy sauce industry. However, the soy sauce from the fermentation pond (FPSS) tended to have more intense soy sauce flavor than the soy sauce from the large-scale fermenters (LFSS), which might be associated with the differences in the surface area of soy sauce mashes in contact with light and air. Therefore, in this study, the composition and concentrations of volatile compounds in these two kinds of soy sauce mashes were compared. The obtained results showed that some key aroma-active compounds in FPSS, such as 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, phenylethyl alcohol, phenylacetaldehyde, 3-methylbutanoic acid, 2-methylbutanoic acid, 4-ethylphenol, 4-ethyl-2-methoxy-phenol and 2-methoxyphenol, were more abundant in the top mash than in the bottom mash of soy sauce. Whereas, the key aroma-active compounds in LFSS, such as 1-octen-3-ol and methional, were more abundant in the bottom mash than in the top mash. The consistency of such differences in these compounds indicated that the formation of key aroma-active compounds in soy sauce was affected by the surface area of soy sauce mashes. Greater Maillard reaction occurring in the top soy sauce mash while yeast and lactic acid bacteria being more active in the bottom soy sauce mash could be the significant causes of the differences in the aroma-active compounds between the top and bottom mashes.

Key words: high-salt liquid fermentation soy sauce; fermentation tank; fermentation pond; soy sauce mash; volatile compounds

酱油起源于中国, 是东亚和东南亚地区的传统调味品, 主要是以大豆、豆粕和面粉作为原料, 经过微生物等作用酿造而成^[1]。目前, 采用大型发酵罐替代传统发酵池是酱油工业现代化趋势之一, 发酵罐的罐体一般能高达 5~6 m 甚至 10 m, 容积可达 40~50 m³,
收稿日期: 2018-07-22

基金项目: 国家重点研发计划重点专项项目 (2018YFD0400405); 广东省自然科学基金项目 (A2017030310027)

作者简介: 赵谋明 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术
通讯作者: 冯云子 (1987-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品生物技术

发酵体系密闭且配备自动控温系统, 不易滋生微生物, 而传统发酵池占地面积大、酱醅层堆积浅、发酵体系与外界环境直接接触, 因此采用发酵罐生产具有节省厂房面积、大量生产、温度控制、防止污染等多重优势, 但相比于传统发酵池酱油 (FPSS), 发酵罐酱油 (FTSS) 香气品质有所不足, 特别是酱香不够浓郁。同时, 在高盐稀态酱油生产过程中, 表层酱醅与外界直接接触, 生产发现表层酱醅比下层酱醅色泽更深、酱香更浓郁, 所以推测不同酱醅层接触光照、空气的表面积不同会造成 FPSS 和 FTSS 的香气差异。此外, 有研究表明, 不同深度的发酵样品感官差异显著, 如

清香型汾酒研究中发现,上层酒体香气好、口感清爽,而下层酒体香气带腻、酒体噪杂,酒体的香气差异可能与微生物在下层酒醅的活性更高有关^[2]。酱香型原酒也分上层、中层和下层酒三种类型,上层酒醅产的酒酱香突出,微带曲香,风格好;中层酒醅产的酒,浓香中略带酱香,入口绵甜;下层酒醅产的酒,窖香浓郁,有明显的酱香^[3]。

因此,本文对比研究了酱油表层酱醅和下层酱醅之间挥发性物质组成,以确定不同酱醅层的香气物质差异,通过理化指标的测定和发酵过程中微生物的变化以探究香气形成差异的原因。所以本研究主要是基于发酵罐和发酵池两种酱油酿造工艺,探讨酱醅深度对酱油香气形成的主要影响,为酱油发酵罐的应用、酱油工业的现代化进程提供技术支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

取自广东珠江桥生物科技有限公司,样品为发酵90 d取自3个发酵罐和3个发酵池的酱醅表层(酱醅层顶部)和下层(距离表层40~50 cm处),即发酵池表层酱醅(FP-1)、发酵池下层酱醅(FP-2)、发酵罐表层酱醅(FT-1)、发酵罐下层酱醅(FT-2),样品取自2017年6月。

1.1.1 试剂

硫酸铜、硫酸钾、硫酸、硼酸、甲基红指示剂、溴甲酚绿指示剂、亚甲基蓝指示剂、氢氧化钠、乙醇、甲醛溶液、盐酸、酒石酸钾钠、乙酸锌、冰乙酸、亚铁氰化钾等试剂购于国药集团;2-甲基-3-庚酮购于Sigma(上海)有限公司。

PCA培养基(g/L):胰蛋白胨5.0,酵母膏粉2.5,葡萄糖1.0,琼脂15.0, pH 7.0±0.2;

MRS培养基(g/L):蛋白胨10.0,牛肉膏粉5.0,酵母膏粉4.0,葡萄糖20.0,吐温-80 1.0,磷酸氢二钾2.0,乙酸钠5.0,柠檬酸三铵2.0,硫酸镁(MgSO₄·7H₂O)0.2,硫酸锰(MnSO₄·7H₂O)0.05,琼脂15.0, pH 6.2±0.2;

PDA培养基(g/L):马铃薯(从中提取浸出粉)300.0,葡萄糖20.0,琼脂15.0,氯霉素0.1;

孟加拉红培养基(g/L):蛋白胨5.0,葡萄糖10.0,磷酸氢二钾1.0,硫酸镁0.5,琼脂15.0,孟加拉红0.033,氯霉素0.1。

1.1.2 设备

气相色谱-质谱联仪,美国Thermo公司;KND-2C定氮仪,上海新嘉电子有限公司;KND-40消化炉,

上海新嘉电子有限公司;LDZX-30KBS立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;恒温培养箱,上海恒科技仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 固相微萃取(SPME)法收集和浓缩香气物质^[4]

取8 g样品加入20 mL顶空进样瓶中,添加20 μL内标(1.74 mg/L的2-甲基-3-庚酮甲醇溶液),调整氯化钠浓度至270 g/L,用PTFE-silicone瓶盖密封。45 °C下保持平衡20 min后,插入CAR/PDMS萃取头在45 °C萃取30 min,萃取过程中保持震荡,萃取结束后在GC进样口(250 °C)解析3 min。萃取头首次使用,在270 °C老化1 h。连续做样过程中,两个样品之间萃取头在270 °C老化10 min,以防止样品间的相互污染。

1.2.2 GC-MS分析^[5]

样品分别通过TR-5 ms弹性石英毛细色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)进行分离;程序升温条件为起始温度40 °C,以5 °C/min升到120 °C/min,保持2 min,再以7 °C/min升至220 °C/min,保持5 min;载气为高纯氮气(1.0 mL/min);分流比10:1。

质谱条件:电子轰击电离(EI)离子源,电子能量70 eV;电子倍增器电压350 V;离子源温度230 °C;传输线温度250 °C;质量范围35~350 m/z;扫描速度3.00 scans/s。

1.2.3 理化指标分析

理化指标的测定按照GB 18186-2000(酿造酱油)进行,其中总氮采用凯氏定氮法,氨基酸态氮采用甲醛滴定法,利用滴定仪自动滴定。还原糖的测定参考GB 5009.7-2016,直接滴定法。

1.2.4 微生物计数

微生物变化情况主要是通过平板计数法测定,取2.5 g酱醅样品加入22.5 mL无菌生理盐水混匀,取0.1 mL混匀的酱醅液于0.9 mL生理盐水稀释10倍,依次稀释到10⁶。选取合适梯度的稀释液100 μL分别于PCA、MRS、PDA培养基中对总菌落、乳酸菌、酵母菌计数,其中对总菌落和乳酸菌计数培养基中加入0.1%的制霉菌素,总菌落和乳酸菌置于37 °C培养2~3 d,酵母菌置于28 °C培养5 d后计数。每个样品取3个梯度,每个梯度取2个平行。

1.2.5 数据分析

采用Excel 2017进行数据处理和图表绘制,数据表示为平均值±标准差。分析采用SPSS 17.0软件(IBM公司)进行ANOVA差异性分析($p < 0.05$)。

表 1 发酵池/罐表层和下层酱醅中挥发性化合物 (GC-MS)

Table 1 Volatile compounds of FP-1, FP-2, FT-1 and FT-2 identified by GC-MS analysis

RI ¹	化合物名称	m/z	内标相对含量 ²				百分比含量/%			
			发酵池表层(FP-1)	发酵池下层(FP-2)	发酵罐表层(FT-1)	发酵罐下层(FT-2)	发酵池表层	发酵池下层	发酵罐表层	发酵罐下层
醇类										
<600	乙醇	45	38.17±5.10 ^b	82.74±6.87 ^a	19.63±3.74 ^b	101.15±22.54 ^a	3.59	15.22	2.35	11.91
<600	2-甲基丙醇	43	6.66±1.39 ^a	3.65±0.27 ^{ab}	3.52±1.93 ^{ab}	1.18±1.67 ^b	0.64	0.67	0.40	0.18
714	3-甲基-3-丁烯-1-醇	41	0.09±0.07	0.00±0.00	0.12±0.14	0.00±0.00	0.01	0.00	0.02	0.00
715	3-甲基丁醇	55	53.75±15.27	14.59±0.99	47.96±31.05	9.47±1.65	5.21	2.69	5.40	1.19
716	2-甲基丁醇	57	23.8±5.84 ^a	4.49±0.07 ^b	14.9±8.75 ^{ab}	3.28±1.15 ^b	2.30	0.83	1.69	0.42
737	2,3-丁二醇	45	0.00±0.00	12.15±2.26	0.00±0.00	12.59±16.49	0.00	2.21	0.00	1.22
742	2,3-丁二醇	45	0.00±0.00	18.8±4.64	0.00±0.00	13.43±17.36	0.00	3.56	0.00	1.31
880	1-辛烯-3-醇	57	5.29±0.16 ^b	7.74±0.27 ^a	4.42±1.01 ^b	8.87±0.55 ^a	0.50	1.43	0.53	1.09
1025	苯乙醇	91	14.48±0.13 ^a	1.47±0.04 ^c	7.94±0.70 ^b	0.25±0.08 ^d	1.37	0.27	0.96	0.03
	总和		142.24±17.49	145.62±5.91	98.48±47.04	150.23±51.29	13.64	26.89	11.35	17.34
醛类										
<600	2-甲基丙醛	43	7.99±2.22 ^{bc}	5.09±0.77 ^c	14.82±3.62 ^{ab}	22.89±4.35 ^a	0.77	0.93	1.87	2.88
<600	3-甲基丁醛	44	28.53±11.77 ^{bc}	18.43±2.59 ^c	41.4±5.48 ^b	63.14±4.19 ^a	2.79	3.37	5.16	7.78
<600	2-甲基丁醛	57	19.29±7.38 ^b	10.77±1.06 ^b	30.24±3.61 ^b	63.85±22.57 ^a	1.88	1.98	3.76	8.22
<600	戊醛	44	2.27±0.25	2.48±0.67	3.20±1.12	4.22±1.07	0.22	0.47	0.37	0.49
740	3-甲基-2-丁烯醛	84	1.00±0.29	1.27±0.03	0.72±0.40	1.74±0.82	0.09	0.23	0.08	0.20
747	己醛	44	2.55±0.06 ^{ab}	0.67±0.12 ^c	3.27±1.25 ^a	1.36±0.38 ^{bc}	0.24	0.12	0.38	0.17
857	(E)-2-庚烯醛	41	0.33±0.01	0.32±0.06	0.40±0.11	0.23±0.09	0.03	0.06	0.05	0.03
863	苯甲醛	105	6.68±1.17	9.65±10.85	8.14±1.40	4.51±0.01	0.64	1.60	0.98	0.55
951	苯乙醛	91	22.44±0.03 ^a	12.33±0.61 ^b	16.49±5.82 ^{ab}	16.2±3.47 ^{ab}	2.13	2.30	1.93	1.91
965	(E)-2-辛烯醛	57	0.64±0.03 ^b	0.00±0.00 ^c	0.75±0.03 ^a	0.00±0.00 ^c	0.06	0.00	0.09	0.00
1012	壬醛	57	0.80±0.13 ^a	0.15±0.08 ^{ab}	0.7±0.44 ^{ab}	0.11±0.03 ^b	0.08	0.03	0.08	0.01
1181	2-苯基-2-丁烯醛	115	0.19±0.00	0.07±0.00	0.19±0.08	0.10±0.06	0.02	0.01	0.02	0.01
	总和		93.40±22.20 ^{bc}	61.21±14.15 ^c	120.80±1.84 ^b	179.21±25.85 ^a	8.97	11.11	14.78	22.26
酸类										
<600	乙酸	60	20.56±20.26 ^b	142.76±54.24 ^{ab}	12.85±5.51 ^b	418.76±244.95 ^a	2.09	25.54	1.66	46.38
<600	丙酸	74	0.72±1.02	0.32±0.02	0.90±0.52	0.36±0.21	0.08	0.06	0.10	0.04

转下页

接上页

726	2-甲基丙酸	73	12.08±2.26 ^a	8.2±0.67 ^{ab}	10.86±6.04 ^a	1.25±0.21 ^b	1.13	1.53	1.24	0.16
739	丁酸	60	0.00±0.00	0.57±0.12	0.00±0.00	0.83±0.75	0.00	0.10	0.00	0.09
783	3-甲基丁酸	60	398.89±151.69 ^a	38.29±4.77 ^b	324.95±116.62 ^a	6.09±0.29 ^b	36.84	7.02	38.03	0.75
789	2-甲基丁酸	74	195.77±58.19 ^a	11.77±0.57 ^b	130.77±30.73 ^a	2.81±0.56 ^b	18.20	2.17	15.56	0.35
822	(E)-2-甲基-2-丁烯酸	100	0.14±0.00	0.13±0.02	0.06±0.08	0.06±0.03	0.01	0.02	0.01	0.01
848	4-甲基戊酸	57	0.11±0.00 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	0.20±0.13 ^a	0.00±0.00 ^b	0.01	0.00	0.02	0.00
876	己酸	60	0.32±0.04	0.31±0.03	0.56±0.08	0.41±0.18	0.03	0.06	0.07	0.05
	总和		628.59±190.91	202.35±59.00	481.14±148.69	430.58±245.06	58.40	36.50	56.69	47.82
酯类										
<600	乙酸甲酯	43	33.38±14.56 ^a	10.98±0.20 ^b	15.64±0.64 ^{ab}	5.32±1.95 ^b	3.27	2.04	1.93	0.61
<600	乙酸乙酯	61	0.62±0.33 ^c	4.27±1.03 ^b	3.11±0.95 ^b	12.11±0.42 ^a	0.06	0.77	0.40	1.49
<600	丙酸甲酯	57	2.99±2.89	0.50±0.03	2.01±1.43	0.54±0.03	0.30	0.09	0.22	0.07
<600	2-甲基丙酸甲酯	71	5.20±0.06 ^a	0.3±0.12 ^b	2.97±2.81 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	0.49	0.06	0.32	0.00
705	丙酸乙酯	57	0.00±0.00 ^c	0.55±0.12 ^b	0.00±0.00 ^c	0.84±0.11 ^a	0.00	0.10	0.00	0.11
710	丁酸甲酯	74	0.60±0.04	0.44±0.06	0.51±0.14	0.43±0.02	0.06	0.08	0.06	0.05
713	2-氧丙酸甲酯	43	0.54±0.12 ^b	1.75±0.27 ^a	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.05	0.33	0.00	0.00
718	2-羟基丙酸甲酯	45	1.92±1.52	1.85±0.14	0.00±0.00	1.24±0.87	0.17	0.35	0.00	0.13
727	2-甲基丙酸乙酯	88	0.56±0.26 ^b	3.21±0.39 ^a	0.17±0.23 ^b	0.83±0.35 ^b	0.05	0.60	0.02	0.11
735	异戊酸甲酯	74	19.22±9.27 ^a	0.00±0.00 ^b	9.33±7.36 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	1.76	0.00	1.03	0.00
736	2-甲基丁酸甲酯	88	0.00±0.00 ^b	0.69±0.16 ^a	0.00±0.00 ^b	0.24±0.06 ^b	0.00	0.13	0.00	0.03
748	丁酸乙酯	71	0.00±0.00 ^c	0.43±0.01 ^b	0.35±0.14 ^b	0.99±0.13 ^a	0.00	0.08	0.04	0.12
754	乳酸乙酯	45	0.00±0.00 ^c	27.91±1.50 ^a	0.00±0.00 ^c	16.58±3.52 ^b	0.00	5.20	0.00	1.95
755	乙酸丁酯	56	0.13±0.01 ^b	0.00±0.00 ^c	0.27±0.02 ^a	0.00±0.00 ^c	0.01	0.00	0.03	0.00
774	2-甲基丁酸乙酯	57	6.28±2.34 ^{ab}	8.76±1.82 ^a	1.48±0.42 ^c	2.68±1.2 ^{bc}	0.58	1.59	0.18	0.35
775	3-甲基丁酸乙酯	88	2.73±0.96 ^a	2.05±0.54 ^{ab}	0.71±0.31 ^b	0.81±0.22 ^b	0.25	0.37	0.08	0.10
788	乙酸异戊酯	70	0.49±0.05	0.26±0.03	0.32±0.21	0.21±0.04	0.05	0.05	0.04	0.03
789	乙酸2-甲基丁酸酯	70	0.37±0.11	0.12±0.01	0.20±0.18	0.12±0.02	0.04	0.02	0.02	0.02
814	异丁酸异丁酯	71	0.48±0.36	0.00±0.00	0.10±0.14	0.00±0.00	0.04	0.00	0.01	0.00
825	己酸乙酯	74	1.54±0.00 ^a	0.40±0.24 ^b	1.35±0.46 ^a	0.21±0.11 ^b	0.15	0.08	0.16	0.02
899	己酸乙酯	88	0.03±0.01 ^b	0.24±0.03 ^a	0.05±0.00 ^b	0.33±0.07 ^a	0.00	0.04	0.01	0.04
903	2-甲基丁酸异丁酯	57	0.65±0.25 ^a	0.00±0.00 ^b	0.31±0.24 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	0.06	0.00	0.03	0.00

转下页

接上页

907	异戊酸异丁酯	85	0.32±0.09	0.00±0.00	0.25±0.22	0.00±0.00	0.03	0.00	0.03	0.00
914	异丁酸异戊酯	70	0.78±0.37	0.04±0.01	0.53±0.54	0.00±0.00	0.07	0.01	0.06	0.00
918	2-甲基异丁酸丁酯	71	0.54±0.35	0.00±0.00	0.28±0.29	0.00±0.00	0.05	0.00	0.03	0.00
965	2-羟基-4-甲基戊酸乙酯	69	0.00±0.00 ^b	0.51±0.04 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00	0.09	0.00	0.00
1007	苯甲酸甲酯	105	1.22±0.41	0.53±0.04	0.81±0.72	0.26±0.09	0.11	0.10	0.09	0.03
1008	2-甲基丁酸异戊酯	70	0.69±0.25	0.00±0.00	0.59±0.44	0.00±0.00	0.06	0.00	0.07	0.00
1015	2-甲基异戊酸丁酯	85	0.19±0.05	0.00±0.00	0.25±0.24	0.00±0.00	0.02	0.00	0.03	0.00
1030	辛酸甲酯	74	1.00±0.09 ^a	0.60±0.22 ^{ab}	0.58±0.19 ^{ab}	0.18±0.13 ^b	0.09	0.11	0.07	0.02
1079	苯甲酸乙酯	105	0.15±0.01 ^c	3.08±0.02 ^a	0.12±0.00 ^c	1.06±0.62 ^b	0.01	0.57	0.01	0.12
1084	苯乙酸甲酯	91	6.32±2.00 ^a	0.38±0.11 ^b	6.61±3.48 ^a	0.06±0.02 ^b	0.61	0.07	0.86	0.01
1125	壬酸甲酯	74	0.34±0.06 ^a	0.09±0.03 ^b	0.11±0.04 ^b	0.00±0.00 ^b	0.03	0.02	0.01	0.00
1151	苯乙酸乙酯	91	0.33±0.01 ^b	3.99±1.12 ^a	0.24±0.05 ^b	0.44±0.24 ^b	0.03	0.72	0.03	0.05
1299	棕榈酸乙酯	74	0.20±0.08 ^a	0.12±0.03 ^{ab}	0.05±0.01 ^b	0.00±0.00 ^b	0.02	0.02	0.01	0.00
	总和		89.81±3.17 ^a	74.05±1.14 ^a	49.31±11.37 ^b	45.47±5.05 ^b	8.56	13.71	5.87	5.45

酮类

<600	丙酮	58	2.25±0.34	1.82±0.03	2.66±0.67	3.49±0.99	0.21	0.34	0.32	0.41
<600	2,3-丁二酮	86	2.00±0.86	1.24±0.06	0.98±0.02	1.08±0.56	0.18	0.23	0.12	0.12
<600	2-丁酮	72	4.86±0.18 ^b	3.96±0.02 ^c	5.40±0.07 ^{ab}	5.87±0.54 ^a	0.46	0.74	0.66	0.71
<600	2-戊酮	86	0.50±0.07 ^b	0.49±0.07 ^b	0.49±0.02 ^b	0.79±0.17 ^a	0.05	0.09	0.06	0.09
<600	3-戊酮	86	0.51±0.09	0.44±0.09	0.50±0.12	0.40±0.07	0.05	0.08	0.06	0.05
705	3-羟基-2-丁酮	45	0.71±0.12 ^{ab}	1.69±0.21 ^{ab}	0.53±0.04 ^b	3.27±1.90 ^a	0.07	0.32	0.07	0.36
742	2-己酮	58	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.10±0.02 ^{ab}	0.28±0.13 ^a	0.00	0.00	0.01	0.04
795	2-庚酮	43	1.26±0.35	0.13±0.02	1.30±0.50	1.20±0.59	0.12	0.02	0.15	0.16
837	3-辛酮	43	1.69±0.36 ^a	0.30±0.07 ^b	2.07±0.00 ^a	0.32±0.10 ^b	0.16	0.05	0.25	0.04
887	苯乙酮	105	0.32±0.05 ^b	0.00±0.00 ^c	0.99±0.13 ^a	0.00±0.00 ^c	0.03	0.00	0.12	0.00
978	1,2-二羟基-1-苯乙醇酮	105	0.67±0.20 ^a	0.22±0.06 ^b	0.49±0.14 ^{ab}	0.74±0.02 ^a	0.07	0.04	0.06	0.09
	总和		14.77±0.85 ^{ab}	10.30±0.31 ^b	15.50±1.36 ^{ab}	17.44±3.59 ^a	1.40	1.91	1.88	2.06

酚类

1001	愈创木酚	109	0.79±0.13 ^a	0.00±0.00 ^c	0.25±0.08 ^b	0.00±0.00 ^c	0.08	0.00	0.03	0.00
1071	4-乙基苯酚	107	18.00±1.00 ^a	16.57±8.30 ^a	16.02±5.47 ^a	0.68±0.84 ^b	1.70	2.93	1.88	0.07
1187	4-乙基愈创木酚	137	61.39±6.59 ^a	27.78±12.83 ^{bc}	30.58±14.91 ^b	0.30±0.27 ^c	5.79	4.93	3.52	0.03

转下页

1205	4-乙烯基愈创木酚	135	0.36±0.04 ^b	1.31±0.54 ^a	0.21±0.02 ^b	1.88±0.25 ^a	0.03	0.25	0.03	0.23
	总和		80.55±7.51 ^a	45.65±20.6 ^a	47.06±20.48 ^a	2.86±0.86 ^b	7.60	8.11	5.45	0.33
吡嗪类										
762	甲基吡嗪	94	0.34±0.07 ^b	0.00±0.00 ^c	0.92±0.13 ^a	0.00±0.00 ^c	0.03	0.00	0.11	0.00
813	2,5-二甲基吡嗪	108	0.75±0.23	0.00±0.00	5.81±7.10	0.00±0.00	0.07	0.00	0.82	0.00
817	2,6-二甲基吡嗪	108	0.95±0.12	0.00±0.00	3.52±2.51	0.00±0.00	0.09	0.00	0.47	0.00
904	2-乙基-5-甲基吡嗪	121	0.40±0.01 ^b	0.00±0.00 ^c	0.68±0.01 ^a	0.00±0.00 ^c	0.04	0.00	0.08	0.00
906	2-乙基-6-甲基吡嗪	121	0.13±0.02 ^b	0.00±0.00 ^c	0.48±0.08 ^a	0.00±0.00 ^c	0.01	0.00	0.06	0.00
908	2, 3, 5-三甲基吡嗪	122	0.62±0.27	0.00±0.00	1.52±1.23	0.00±0.00	0.06	0.00	0.21	0.00
922	2-乙基-6-乙烯基吡嗪	120	0.35±0.05 ^a	0.00±0.00 ^b	0.46±0.09 ^a	0.00±0.00 ^b	0.03	0.00	0.06	0.00
992	3-乙基-2,5 二甲基吡嗪	136	0.06±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.13±0.05 ^a	0.00±0.00 ^b	0.01	0.00	0.02	0.00
1001	2-乙基-3,5 二甲基吡嗪	136	0.11±0.10	0.00±0.00	0.19±0.12	0.00±0.00	0.01	0.00	0.02	0.00
	总和		3.70±0.71	0.00±0.00	13.70±11.32	0.00±0.00	0.36	0.00	1.85	0.00
呋喃类										
<600	2,5-二甲基呋喃	96	0.59±0.06 ^b	0.03±0.00 ^c	0.96±0.22 ^a	0.18±0.02 ^c	0.06	0.00	0.11	0.02
765	糠醛	96	0.74±0.21 ^{ab}	0.20±0.02 ^c	1.41±0.32 ^{bc}	2.3±0.59 ^a	0.07	0.04	0.18	0.27
777	2-糠醇	98	0.16±0.03 ^c	0.93±0.03 ^b	0.11±0.03 ^c	1.47±0.26 ^a	0.01	0.17	0.01	0.17
816	丁内酯	42	0.00±0.00	0.87±0.31	0.00±0.00	1.73±1.24	0.00	0.16	0.00	0.19
892	2-戊基呋喃	81	3.61±0.26 ^{ab}	0.31±0.06 ^c	4.93±1.59 ^a	1.67±0.46 ^{bc}	0.34	0.06	0.58	0.19
1042	HEMF	142	0.01±0.00 ^b	0.07±0.04 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00	0.01	0.00	0.00
1047	HEMF	142	0.01±0.01 ^b	0.13±0.07 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00	0.02	0.00	0.00
1120	2,3-二氢苯并呋喃	120	0.07±0.00 ^b	0.29±0.16 ^{ab}	0.08±0.01 ^b	0.85±0.49 ^a	0.01	0.06	0.01	0.09
	总和		5.19±0.04 ^{ab}	2.82±0.08 ^b	7.49±1.54 ^{ab}	8.20±3.06 ^a	0.49	0.52	0.89	0.94
吡喃类										
1024	麦芽酚	126	0.76±0.17	1.04±0.16	2.64±2.94	1.65±1.01	0.07	0.19	0.37	0.18
1099	3-甲氧基-2-甲基-4H-吡喃-4-酮	140	0.18±0.05	0.17±0.01	0.13±0.05	0.08±0.06	0.02	0.03	0.02	0.01
	总和		0.95±0.22	1.21±0.17	2.77±2.98	1.73±1.08	0.09	0.22	0.39	0.19
吡咯类										
969	2-乙酰基吡咯	94	0.46±0.05 ^{ab}	0.10±0.01 ^b	0.74±0.40 ^a	0.24±0.04 ^{ab}	0.04	0.02	0.08	0.03
	总和		0.46±0.05 ^{ab}	0.10±0.01 ^b	0.74±0.40 ^a	0.24±0.04 ^{ab}	0.04	0.02	0.08	0.03

接上页

含硫化合物										
<600	甲硫醇	47	0.48±0.03 ^b	0.48±0.03 ^b	0.36±0.15 ^b	1.09±0.18 ^a	0.05	0.09	0.04	0.13
720	二甲基二硫	94	0.40±0.05 ^{ab}	0.08±0.00 ^b	0.68±0.28 ^a	0.76±0.14 ^a	0.04	0.01	0.08	0.10
806	3-甲硫基丙醛	48	2.84±0.19 ^c	4.47±0.13 ^b	1.35±0.60 ^c	7.06±0.97 ^a	0.27	0.83	0.16	0.84
881	3-甲硫基丙醇	106	0.33±0.06 ^a	0.31±0.06 ^a	0.14±0.11 ^{ab}	0.05±0.00 ^b	0.03	0.06	0.02	0.01
	总和		4.07±0.21 ^{bc}	5.34±0.21 ^b	2.53±1.14 ^c	8.96±1.01 ^a	0.38	0.99	0.29	1.07
其他										
710	2-甲基丁腈	55	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	3.29±3.08	0.00	0.00	0.00	0.46
712	3-甲基丁腈	43	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	1.26±0.51 ^{ab}	14.89±10.32 ^a	0.00	0.00	0.16	2.01
796	苯乙烯	104	0.84±0.04	0.07±0.01	2.25±1.99	0.20±0.00	0.08	0.01	0.31	0.02
	总和		0.84±0.04	0.07±0.01	3.52±2.50	18.38±13.40	0.08	0.01	0.47	2.50

注: ¹TR-5ms 弹性石英毛细色谱柱的保留指数; ²化合物峰面积与内标峰面积的比值。

表 2 SPME-GC-MS 检测各大类挥发性化合物百分比含量

Table 2 Relative percentage of volatiles families in different samples extracted by SPME-GC-MS

分类	发酵池表层/%	发酵池下层/%	发酵罐表层/%	发酵罐下层/%
醇类化合物	13.64±3.64 ^b	26.89±3.87 ^a	11.35±2.71 ^b	17.34±0.49 ^b
醛类化合物	8.97±3.43	11.11±0.54	14.78±3.98	22.26±10.04
酸类化合物	58.40±9.38	36.50±4.04	56.69±3.30	47.82±13.36
酯类化合物	8.56±1.55 ^b	13.71±2.31 ^a	5.87±0.14 ^b	5.45±1.13 ^b
酮类化合物	1.40±0.13	1.91±0.41	1.88±0.31	2.06±0.23
酚类化合物	7.60±0.41 ^a	8.11±2.26 ^a	5.45±1.05 ^a	0.33±0.00 ^b
吡嗪类化合物	0.36±0.12	0.00±0.00	1.85±1.81	0.00±0.00
呋喃类化合物	0.49±0.07 ^b	0.52±0.08 ^b	0.89±0.04 ^a	0.94±0.06 ^a
吡喃类化合物	0.09±0.01	0.22±0.01	0.39±0.45	0.19±0.06
吡咯类化合物	0.04±0.00 ^b	0.02±0.01 ^b	0.08±0.03 ^a	0.03±0.00 ^b
含硫化合物	0.38±0.04 ^b	0.99±0.14 ^a	0.29±0.06 ^b	1.07±0.22 ^a
其他	0.08±0.01	0.01±0.00	0.47±0.42	2.50±2.34

注：表中数据为平均值±标准差，同一行中标注不同字母 a、b、c 的数值表示具有显著性差异 ($p < 0.05$)。下表同。

2 结果与讨论

2.1 GC-MS 结果分析

通过固相微萃取 (SPME) 技术检测不同酱醅的挥发性化合物结果如表 1 所示,在酱醅中共检测出 107 种挥发性化合物。对照冯云子^[1]对 56 篇酱油研究文献中的挥发性化合物的总结列表,发现本研究中大部分化合物都有被报道,但其中 2-氧丙酸甲酯、2-羟基丙酸甲酯、乙酸 2-甲基丁酸酯、2-甲基丁酸异丁酯、2-甲基丁酸异戊酯、2-甲基异戊酸丁酯和 1,2-二羟基-1-苯乙醇酮是首次在酱油体系中被检测到。在发酵池和发酵罐酱醅中分别检测到 104 和 102 种化合物,表层酱醅和下层酱醅分别检测到 97 和 83 种化合物,这些化合物主要为醇类化合物 (9 种)、醛类化合物 (12 种)、酸类化合物 (9 种)、酯类化合物 (35 种)、酮类化合物 (11 种)、酚类化合物 (4 种)、吡嗪类化合物 (9 种)、呋喃类化合物 (8 种)、吡喃类化合物 (2 种)、吡咯类化合物 (1 种)、含硫化合物 (4 种) 和其他化合物 (3 种),其中酯类化合物检测到的种类最多,其次是醛类化合物和酮类化合物。

各大类挥发性化合物在酱醅壳中的百分比含量如表 2 所示。结果表明,酸类化合物在酱醅占比最高,分别占发酵池表层和下层酱醅的 58.40%和 36.50%,发酵罐表层和下层酱醅的 56.69%和 47.82%,醇类、醛类、酯类、酚类化合物也是酱醅中挥发性化合物的重要组成。其中醇类、醛类、酮类、呋喃类和含硫化合物在下层酱醅的占比高于表层酱醅,而酸类、吡嗪类和吡咯类化合物在表层酱醅占比更高,值得注意的

是,吡嗪类化合物仅在表层酱醅中被检测到。

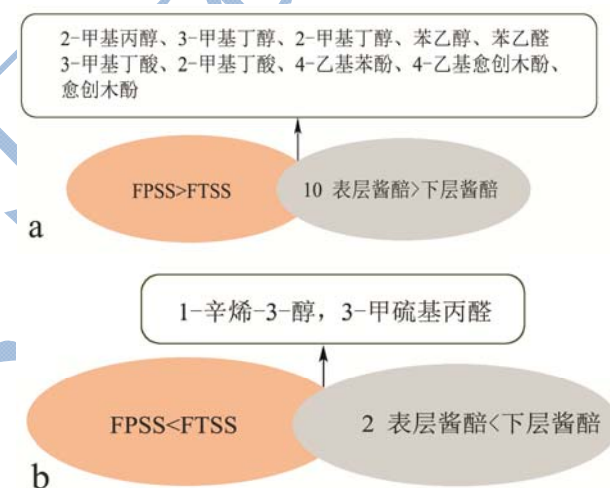


图 1 不同酱油和酱醅层关键香气化合物的分布规律

Fig.1 Volatile compounds classified by content in different soy sauce and mashes

基于本团队前期工作基础^[1],本研究针对酱油中关键香气活性物质进行分析,酱油和酱醅层间关键香气化合物的分布规律如图 1 所示。如图 1a 所示,其中 10 种在 FPSS 含量较高的化合物 (如 2-甲基丙醇, 3-甲基丁醇, 2-甲基丁醇, 苯乙醇, 苯乙醛, 3-甲基丁酸, 2-甲基丁酸, 4-乙基苯酚, 4-乙基愈创木酚和愈创木酚,) 在表层酱醅中含量高于下层酱醅; 而在图 1b 中发现,在 FTSS 中含量较高的 2 种香气化合物 (1-辛烯-3-醇和 3-甲硫基丙醛) 在下层酱醅含量高于表层酱醅。由此分布规律可以推测,酱醅的比表面积会显著影响酱油关键香气物质的形成,发酵池与外界光照、氧气接触的比表面积显著大于发酵罐,这可能是引起 FPSS 和 FTSS 风味差异的重要原因。

醇类化合物在下层酱醅的总含量高于表层酱醅，与乙醇含量在下层酱醅中比较高密切相关，下层酱醅中乙醇含量分别为表层酱醅的2.17倍(发酵池)和5.15倍(发酵罐)，乙醇是酵母菌的代谢产物^[7]，表明酵母菌在下层酱醅代谢更加活跃，这与甄攀^[2]对不同深度酒醅的研究结果吻合。另外，2,3-丁二醇仅在下层酱醅中检测到，表层酱醅未检测到，1-辛烯-3-醇也在下层酱醅中含量更高，该物质主要来源于制曲阶段，在酱醅发酵过程中不断降低^[1]，因此表层酱醅中1-辛烯-3-醇含量较少，可能与该类物质在表层降解更多有关。而3-甲基丁醇、2-甲基丁醇和苯乙醇在表层酱醅中含量更高，这几种物质被认为是酱醅发酵过程中亮氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸的降解产物^[6]，这与表层酱醅氨基酸降解程度更深有关。而3-甲基丁醛、2-甲基丁醛、苯乙醛是表层酱醅和下层酱醅中的主要醛类化合物，其中苯乙醛在表层酱醅含量高于下层酱醅。

酸类化合物是酱醅中含量最高的化合物，其中3-甲基丁酸和2-甲基丁酸在表层酱醅的含量显著($p<0.05$)高于下层，而乙酸在下层酱醅中含量更高，这种分布差异与其产生来源不同有关，其中3/2-甲基丁酸主要是通过氨基酸降解、转化而来，而乙酸主要是乳酸菌的代谢产物^[8]，说明表层酱醅和下层酱醅的氨基酸降解程度和微生物分布可能不同。

酯类化合物是数量最多的一类，表层酱醅的酯类物质主要是甲酯类化合物，而下层酱醅的酯类物质主要是乙酯类化合物，如乙酸乙酯、丙酸乙酯、2-甲基丙酸乙酯、丁酸乙酯、乳酸乙酯、苯甲酸乙酯和苯乙酸乙酯，其中乳酸乙酯是下层酱醅含量最高的酯类物质，且在上层酱醅未检测到该物质。有研究表明乙酯类化合物是酱油风味的重要组成，主要来源于酵母菌利用高级醇代谢合成或者通过乙醇与脂肪酸的酯化反应^[9]，这表明酵母菌在下层酱醅代谢更加活跃。

除4-乙基愈创木酚外，其他3种酚类物质(愈创木酚、4-乙基苯酚和4-乙基愈创木酚)均在表层酱醅中含量高于下层酱醅，其中愈创木酚仅在表层酱醅中检测到。这几种酚类化合物是呈现烟熏香、培根香或焦香的香气活性化合物，其中4-乙基愈创木酚在酱香型白酒中的含量比其他香型白酒更高^[3]，因此该化合物的差异可能是导致表层酱醅酱香更浓郁的原因。

值得关注的是，9种吡嗪类化合物均只在表层酱醅中检测到，该类化合物主要是支链氨基酸经微生物作用或发酵阶段醛酮物质与氨基酸缩合作用产生^[10]，这表明表层酱醅美拉德反应程度可能更加强烈。3-甲硫基丙醛在下层酱醅的含量显著高于表层酱醅($p<0.05$)，该物质主要是甲硫氨酸的降解产物，与发

酵过程中蛋白质的降解有关^[11]。2-乙酰基吡咯在表层酱醅含量高于下层酱醅，该物质被认为是日式酱油中的关键香气活性物质，呈现烧烤和爆米花香气，研究表明其在酱油加热过程中含量会上升^[12]，可能是表层酱醅日晒程度更强烈所导致。

2.2 理化指标和微生物分析

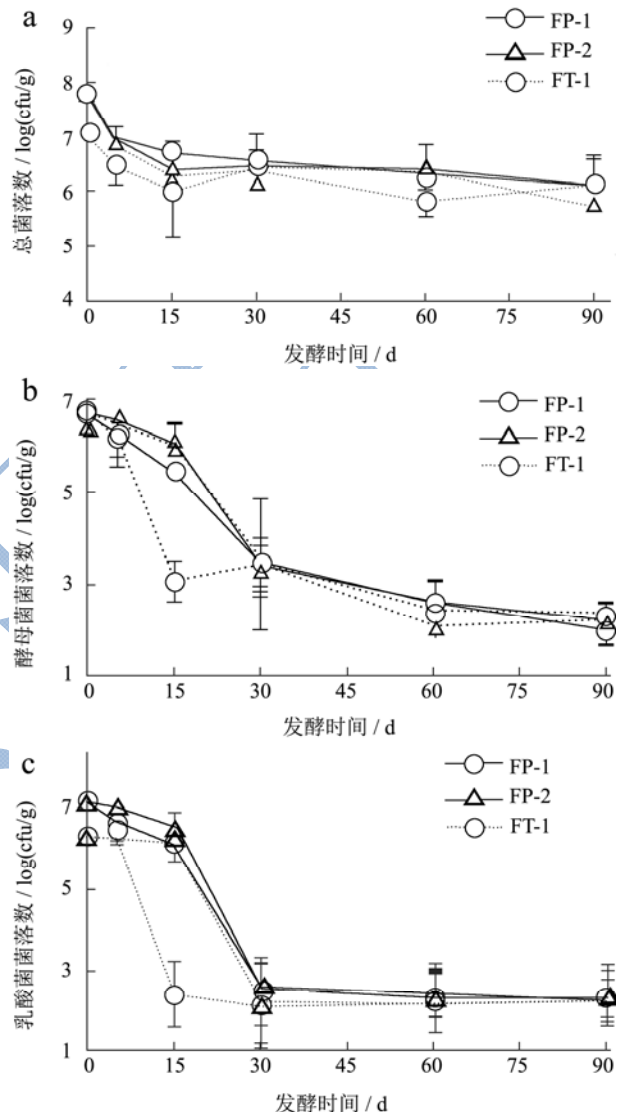


图2 不同酱醅层在发酵过程中微生物菌落数的变化

Fig.2 The changes of microbial numbers of different soy sauce mashes during fermentation

注: a: 细菌总数, b: 酵母菌, c: 乳酸菌。

不同酱醅层的理化指标结果如表3所示，总氮在表层酱醅含量显著($p<0.05$)高于下层，而氨基酸态氮和还原糖在下层酱醅含量均显著高于($p<0.05$)表层酱醅。表层酱醅的氨基酸态氮和还原糖的大量消耗，表明表层酱醅的美拉德反应程度比下层酱醅更为强烈，美拉德反应不仅赋予酱油红褐色的色泽和浓郁的焦糖香^[13]，同时有利于吡嗪类化合物的形成^[14]，这与

表2吡嗪类化合物的分布结果相符合。因此,理化指标的结果进一步证明,美拉德反应程度的不同是导致不同酱醅层香气活性物质差异的重要原因之一。

不同酱醅层在发酵过程中微生物菌落数的变化如图2所示,不同酱醅层的总菌落数在发酵过程中无明显差异,但发酵罐表层酱醅的酵母菌和乳酸菌均在发酵15 d出现急剧下降,导致在发酵前期下层酱醅其含

量明显高于表层酱醅。研究表明,酵母菌有利于乙醇以及一些酯类物质的形成,乳酸菌主要与乙酸等有机酸的生成有关^[7],这与前面的香气化合物结果一致,即乙醇、乙酯类化合物和乙酸在下层酱醅含量高于表层酱醅。这表明不同酱醅层发酵前期酵母菌和乳酸菌含量差异是导致香气活性物质差异的原因之一。

表3 不同酱醅层理化指标的比较

Table 3 Comparison of physicochemical indexes of different samples

项目	发酵池表层 (FP-1)	发酵池下层 (FP-2)	发酵罐表层 (FT-1)	发酵罐下层 (FT-2)
总氮 (g/100 g 干重)	3.92±0.09 ^b	3.79±0.02 ^c	4.11±0.17 ^a	3.45±0.06 ^d
氨基酸态氮 (g/100 g 干重)	1.89±0.06 ^b	2.23±0.07 ^a	1.56±0.24 ^c	1.71±0.21 ^{ab}
还原糖 (g/100 g 干重)	1.23±0.07 ^c	2.11±0.04 ^b	1.03±0.28 ^d	5.56±0.1 ^a

3 结论

3.1 通过 SPME-GC-MS,在酱醅中检测到107种化合物,下层酱醅的醇类、醛类、酮类、呋喃类和含硫化合物占比更高,而表层酱醅的酸类、吡嗪类和吡咯类化合物占比更高,其中吡嗪类化合物仅在表层酱醅中检测到。

3.2 发酵池酱油中部分优势的关键香气活性物质(如2-甲基丙醇,3-甲基丁醇,2-甲基丁醇,苯乙醇,苯乙醛,3-甲基丁酸,2-甲基丁酸,4-乙基苯酚,4-乙基愈创木酚和愈创木酚)在表层酱醅的含量高于下层酱醅,而发酵罐中部分优势的香气活性物质(1-辛烯-3-醇和3-甲硫基丙醛)在下层酱醅的含量高于表层酱醅,表明酱醅层的比表面积会影响酱油的香气物质形成。

3.3 表层酱醅美拉德反应程度更强烈,发酵前期下层酱醅酵母菌和乳酸菌更加活跃是导致表层酱醅和下层酱醅香气活性物质差异的重要原因。

参考文献

- [1] 冯云子.高盐稀态酱油关键香气物质的变化规律及形成机理的研究[D].广州:华南理工大学,2015
FENG Yun-zi. The evolution and formation mechanism of key aroma compounds during the process of high-salt liquid fermentation soy sauce [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015
- [2] 甄攀.不同深度汾酒酒醅酿酒特性研究[J].酿酒,2013,40(5): 43-47
ZHEN Pan. Study on the characteristics of fermented mash of Fenjiu liquor at different depths [J]. Liquor Making, 2013, 40(5): 43-47
- [3] 范文来,徐岩.酱香型白酒中呈酱香物质研究的回顾与展望[J].酿酒,2012,39(3):8-15

FAN Wen-lai, XU Yan. Current practice and future trends of key aroma compounds in Chinese soy sauce aroma type liquor [J]. Liquor Making, 2012, 39(3): 8-15

- [4] Feng Y, Su G, Sun D, et al. Optimization of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) for analyzing soy sauce aroma compounds via coupling with direct GC-olfactometry (D-GC-O) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [J]. Food Analytical Methods, 2017, 10: 713-726
- [5] Gao X, Zhao H, Feng Y, et al. A comparative study on physicochemical properties of Chinese-type soy sauces prepared using pure koji and mixed kojis [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9: 6740-6747
- [6] Feng Y, Cui C, Zhao H, et al. Effect of koji fermentation on generation of volatile compounds in soy sauce production [J]. Food Science and Technology, 2012, 48: 609-619
- [7] Song Y, Jeong D, Baik S. Monitoring of yeast communities and volatile flavor changes during traditional Korean soy sauce fermentation [J]. Journal of Food Science, 2015, 80(9): 2005-2014
- [8] Chung H, Fung P, Kim J. Aroma impact components in commercial plain sufu [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 1684-1691
- [9] Mo X, Fan W, Yan X. Changes in volatile compounds of Chinese rice wine wheat Qu during fermentation and storage [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2009, 115(4): 300-307
- [10] Lee S, Seo B, Kim Y. Volatile compounds in fermented and acid hydrolyzed soy sauces [J]. Journal of Food Science, 2006, 71: 146-156
- [11] Sun S, Jiang W, Zhao Y. Profile of volatile compounds in 12 Chinese soy sauces produced by a high-salt-diluted state

-
- fermentation [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2010, 116(3): 316-328
- [12] Steinhaus P, Schieberle P. Characterization of the key aroma compounds in soy sauce using approaches of molecular sensory science [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 6262-6269
- [13] Wang H, Qian H, Yao W. Melanoidins produced by the maillard reaction: structure and biological activity [J]. Food Chemistry, 2011, 128(3): 573-584
- [14] 周一鸣,贺利庆,蒿婷凤,等.金华火腿加工过程中美拉德反应产物的形成与初探[J].现代食品科技,2016,32(7):170-175
- ZHOU Yi-ming, HE Li-qing, HAO Ting-feng, et al. Formation and exploration of maillard reaction products during Jinhua ham production [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(7): 170-175

现代食品科技