

黄豆豆渣发酵产物中挥发性风味化合物成分分析

宋昊^{1,2,3}, 郑玉芝^{2,*}

(1.北京一轻控股有限责任公司博士后工作站, 北京 100022; 2.北京一轻研究院食品工业研究所, 北京 101111;
3.中国科学院过程工程研究所博士后流动站, 北京 100190)

摘要:采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术,对黄豆豆渣的阿舒假囊酵母固态发酵产物的挥发性风味成分进行分析,研究不同型号萃取头、萃取温度、萃取时间和样品量对挥发性成分萃取效果的影响,确定适宜的萃取条件。结果表明,7.5 g发酵产物在60 °C恒温条件下用50/30 μm二乙基苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷型萃取头萃取30 min,获得的挥发性成分数量和响应强度较高,风味化合物信息较为全面。豆渣经发酵后挥发性成分发生很大变化,发酵产物共鉴定出57个化合物,其关键风味物质为醇类、萜类和酸类化合物,其中苯乙醇、香茅醇、香叶醇、3-甲基丁酸对发酵产物风味的形成贡献较大。

关键词:固相微萃取;挥发性物质;黄豆豆渣;微生物发酵

Analysis of Volatile Components in Metabolites from Okara Fermentation

SONG Hao^{1,2,3}, ZHENG Yuzhi^{2,*}

(1. Postdoctoral Programme, Beijing YIQING Holding Co. Ltd., Beijing 100022, China;
2. Beijing Industrial Technology Research Institution, Beijing 101111, China;
3. Postdoctoral Program, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: The volatile components of the solid state fermented okara by *Eremothecium ashbyi* Guilierm were analyzed by headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS). The effects of different fibers, extraction temperature, extraction time and sample mass on the extraction efficiency were investigated by single factor methods. The optimal extraction conditions were determined by addition of 7.5 g fermented okara and extraction proceeded for 30 min using 50/30 μm DVB/CAR/PDMS fiber at 60 °C. Apparent changes in the kinds and amounts of volatile constituents were found during the fermentation. A total of 57 volatile compounds were identified in the fermented okara. Alcohols, acids and terpenoids were the key flavor compounds. Phenylethyl alcohol, citronellol, geraniol and 3-methyl butanoic acid made greater contributions to the flavor.

Key words: headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME); volatile compounds; okara; microbial fermentation

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201610030

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2016)10-0176-07

引文格式:

宋昊, 郑玉芝. 黄豆豆渣发酵产物中挥发性风味化合物成分分析[J]. 食品科学, 2016, 37(10): 176-182. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201610030. <http://www.spkx.net.cn>

SONG Hao, ZHENG Yuzhi. Analysis of volatile components in metabolites from okara fermentation[J]. Food Science, 2016, 37(10): 176-182. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201610030. <http://www.spkx.net.cn>

黄豆富含多种人体必需的营养成分,如蛋白质、碳水化合物、维生素、脂肪和氨基酸等,还含有异黄酮、卵磷脂、低聚糖、豆甾醇等多种生理保健功能性物质^[1],一直以来是我国人民的主要食品之一。将黄豆制成豆浆、豆奶或豆腐的过程中,会产生大量去除可溶性蛋白的豆渣

副产品,豆渣中含有25%左右的粗蛋白、10%左右的脂肪、40%以上的不溶性纤维、13%左右的可溶性纤维和5%左右的可溶性碳水化合物^[2],直接丢弃或作为粗制饲料都会造成资源浪费和环境污染。随着人们对环境保护的日益重视以及生物质资源综合利用研究的蓬勃发展,

收稿日期: 2015-09-17

基金项目: 朝阳区博士后工作经费资助项目(2015ZZ-017)

作者简介: 宋昊(1979—),女,助理研究员,博士,研究方向为食品与微生物发酵。E-mail: lyfd2002@163.com

*通信作者: 郑玉芝(1965—),女,教授级高级工程师,博士,研究方向为食品科学。E-mail: zhengyuzhi@bitri.cn

近年来,豆渣的综合开发利用也得到了很大的发展^[3-5]。通过微生物将豆渣中的纤维素等低值生物质酶解转化为各种高效能生物质,可有效提高其营养价值和保健功能,实现豆渣的高值化综合利用^[6-9]。

在豆类原料的微生物发酵过程中,往往会产生非常丰富的挥发性物质,构成豆类发酵产品特殊的风味,这是因为发酵过程中菌体会释放出多种胞内酶,如蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶、淀粉酶等,而各种风味物质的形成与这些酶有直接关系,豆类中的蛋白、脂肪、多糖等营养物质在这些酶的作用下被降解成各类多肽、氨基酸、脂肪酸、低聚糖、单糖等,而这些小分子物质可作为挥发性风味物质的前体,经氧化、醇化、酯化、分解以及Maillard反应等各种复杂的生物活性过程,合成多种风味化合物,形成豆类发酵产物的特征风味。顶空固相微萃取(headspace solid-phase microextraction, HS-SPME)结合气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用技术可以有效的对挥发性化合物进行分析鉴定,是目前应用较为广泛的食品风味物质分析方法。研究人员已使用该方法对多种传统黄豆发酵制品如腐乳^[10]、豆豉^[11-12]、酱油^[13]、纳豆^[14]等的风味成分进行了详细分析。

本研究采用新鲜黄豆豆渣为原料,利用阿舒假囊酵母进行固态发酵,发酵产物具有其独特的特征风味,同时富含以VB₂为主的多种B族维生素、VA、VE,以及大量人体所必需的氨基酸、微量元素和2种重要的辅酶黄素腺嘌呤单核苷酸和黄素腺嘌呤二核苷酸,是一种具有丰富营养成分的复合营养强化剂^[15-17],可广泛应用于各种食品和饮料,如各类饼干、面包、营养强化面粉面条以及新型维生素功能饮料等,可有效增加B族维生素的摄入,提高人体健康水平;同时对于健胃养胃,预防消化道炎症、口腔炎症等具有积极效果^[18-19]。本实验采用HS-SPME方法结合GC-MS联用技术,研究不同型号萃取头、萃取温度、萃取时间、样品量对挥发性成分萃取效果的影响,优化HS-SPME条件,分析发酵前后挥发性风味物质成分及相对含量变化,可为阿舒假囊酵母固态发酵复杂代谢途径的研究提供基础依据,同时也可建立良好的固态发酵风味控制工艺提供借鉴。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

阿舒假囊酵母(*Eremothecium ashbyi* Guillierm)中国普通微生物菌种保藏管理中心;新鲜东北黄豆敦化市德立粮贸有限责任公司。

1.2 仪器与设备

7890A-5975C GC-MS联用仪 美国安捷伦科技有限公司;SPME手动进样器、HS-SPME萃取头(50/30 μm

二甲基苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷(divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane, DVB/CAR/PDMS)、75 μm CAR/PDMS、65 μm PDMS/DVB、100 μm) PDMS 美国Supelco公司。

1.3 方法

1.3.1 黄豆豆渣固态发酵工艺

参考文献[20]工艺,选取市售新鲜黄豆→烘烤→热水浸泡1 h→去皮→制渣(豆渣含水量50%~60%)→豆渣灭菌→接种10%阿舒假囊酵母菌液→28~30 °C避光发酵10 d→80 °C烘干粉粹→取样测定其挥发性风味成分。

1.3.2 SPME

根据实验需要,取适量黄豆豆渣发酵产物,置于15 mL顶空样品瓶中,加盖密封,在实验温度条件下平衡30 min。将预先进行高温老化(240 °C, 30 min)后的SPME针头插入顶空样品瓶,推出萃取纤维头,在实验温度条件下顶空萃取,最后将萃取头插入色谱进样口,在240 °C解吸5 min,进行GC-MS分析^[21-22]。

1.3.3 色谱条件

色谱柱:DB-WAX(30 m×0.32 mm, 0.25 μm);进样口温度240 °C;载气He;流速1.5 mL/min;不分流进样;升温程序:40 °C保持3 min,5 °C/min升温至120 °C,保持4 min,8 °C/min升温至200 °C,保持8 min,10 °C/min升至240 °C,保持10 min。

MS条件:电子电离源;电子能量70 eV;传输线温度240 °C;离子源温度230 °C;母离子 m/z 285;激活电压1.5 V;质量扫描范围 m/z 30.00~500.00。

1.3.4 SPME条件优化

选择不同型号的SPME纤维头、萃取温度、萃取时间、样品量作为可能影响挥发性风味物质分析的主要因素,以GC-MS检出的化合物出峰数量及主体风味物质的峰面积为评价指标,进行单因素试验,优化SPME条件。

在优化所得的最适萃取条件下,分析未接种时的豆渣培养基的挥发性风味化合物,作为空白对照。

1.3.5 单因素试验

1.3.5.1 SPME纤维头选择

7.5 g黄豆豆渣发酵产物,60 °C条件下在顶空瓶中平衡30 min备用。分别选取4种不同的SPME纤维头:75 μm CAR/PDMS、65 μm PDMS/DVB、100 μm PDMS、50/30 μm DVB/CAR/PDMS,在60 °C条件下萃取30 min,每种萃取头做3次重复试验。

1.3.5.2 萃取温度选择

7.5 g黄豆豆渣发酵产物,分别在25(实验室恒定室温)、40、60、80 °C条件下在顶空瓶中平衡30 min备用。选用50/30 μm DVB/CAR/PDMS萃取头,分别在上述相应温度条件下萃取30 min,在每种温度条件下做3次重复试验。

1.3.5.3 萃取时间选择

7.5 g 黄豆豆渣发酵产物, 60 °C 条件下在顶空瓶中平衡 30 min 备用。选用 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头, 在 60 °C 条件下, 分别萃取 20、30、40 min, 每种萃取时间做 3 次重复试验。

1.3.5.4 样品量选择

分别将 2.5、5.0、7.5、10.0 g 黄豆豆渣发酵产物在顶空瓶中平衡 30 min 备用。选用 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头, 在 60 °C 的条件下萃取 30 min。每种样品量做 3 次重复试验。

2 结果与分析

2.1 黄豆豆渣发酵产物挥发性风味成分萃取条件的优化

2.1.1 SPME 纤维头的选择

SPME 纤维头采用的固定相或吸附剂一般由非极性的 PDMS、弱极性的 DVB 和 CAR 几种材料复合而成, 以针对用以吸附不同类型的挥发性化合物。选择 4 种常见的具有不同固定相或吸附剂涂层的 SPME 纤维头, 分别为 100 μm PDMS、75 μm CAR/PDMS、65 μm PDMS/DVB、50/30 μm DVB/CAR/PDMS。型号为 100 μm PDMS 的萃取头 (红色) 一般用于小分子挥发性非极性物质的萃取, 75 μm CAR/PDMS 型萃取头 (黑色) 常用于痕量挥发性有机物的检测, 65 μm PDMS/DVB 型萃取头 (蓝色) 则用于弱极性挥发性物质的检测, 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 型萃取头 (灰色) 复合了这几种固定相材料, 适应性更为广泛, 适用于 C₃~C₂₀ 的大范围挥发性物质分析。

表 1 不同萃取头萃取黄豆发酵产物的挥发性风味成分及其相对含量比较
Table 1 Comparison of the composition and relative contents of volatile components in fermented okara extracted by using different fibers

种类	75 μm CAR/PDMS		50/30 μm DVB/CAR/PDMS	
	化合物数量	相对含量/%	化合物数量	相对含量/%
芳香醇类	4	23.30	3	22.91
脂肪醇类	7	8.95	6	4.12
吡嗪类	11	15.28	14	7.89
萜类	11	13.14	10	35.25
醛类	1	2.08	1	1.18
酮类	1	2.93	2	1.18
酸类	6	25.76	3	17.22
酯类	5	2.14	4	5.49
杂环类	8	2.82	10	2.93
其他	7	3.60	4	1.84
合计	61		57	

结果表明, 在 100 μm PDMS、75 μm CAR/PDMS、65 μm PDMS/DVB、50/30 μm DVB/CAR/PDMS 这 4 种萃取头的萃取物中, 分别检出了 20、61、46、57 种化合物, 其中 100 μm PDMS 与 65 μm PDMS/DVB 型的萃取

头对于黄豆豆渣发酵产物挥发性物质的萃取效率明显较低。详细分析 75 μm CAR/PDMS 和 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 2 种萃取头的萃取化合物类型及其所占相对含量, 如表 1 所示。

2 种不同材质萃取头萃取得到的黄豆发酵产物的主要挥发性风味成分类型基本是一致的, 其风味成分由以下几类化合物构成: 苯乙醇为主的芳香醇类化合物; 以香茅醇、香叶醇为代表的萜类化合物; 以 3-甲基丁酸为主的酸类化合物; 吡嗪类化合物。比较 2 种萃取头萃取的化合物数量和相对含量, 可以看出由于 75 μm CAR/PDMS 型萃取头适宜于痕量化合物的萃取, 萃取物数量略多于 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 型萃取头, 但检出出的这些痕量化合物如 2-苯氧乙醇、山梨醇、8-甲基-6-壬烯酸、3-甲基-2-丁烯酸、2-乙基己酸、葡萄糖、辛糖、苯酚等, 所占相对含量都非常低, 75 μm CAR/PDMS 型萃取头检出而 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 型萃取头未能检出的这些痕量挥发性化合物的相对含量之和仅为 2.19%, 非发酵产物的主体风味物质。而 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头对萜类化合物的萃取能力远高于 75 μm CAR/PDMS 型萃取头, 黄豆的阿舒假囊酵母固态发酵过程中所产生的特殊风味其主要成分即为萜类化合物, 所以选用 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 型萃取头进行萃取较为适宜。豆类发酵产品的香气成分非常丰富, 挥发性化合物极性分布广泛, 采用广谱性的 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头与以往的相关研究^[23-25]相吻合。

2.1.2 萃取温度对 SPME 的影响

表 2 不同萃取温度条件下 SPME 发酵产物挥发性风味成分数量比较
Table 2 Comparison of the composition of volatile components of fermented okara extracted at different temperatures

种类	萃取温度/°C			
	25	40	60	80
芳香醇类	1	1	3	3
脂肪醇类	3	3	6	2
吡嗪类	11	11	14	7
萜类	8	8	10	11
醛类	1	1	1	4
酮类	4	3	2	2
酸类	3	3	3	8
酯类	5	5	4	8
杂环类	1	2	10	7
其他	2	3	4	8
合计	39	40	57	60

分别在 25、40、60、80 °C 恒温条件下进行 SPME, 检测发酵产物的挥发性风味化合物, 如表 2 所示。当萃取温度偏低时, 挥发性物质在顶空瓶中的挥发效率不佳, 萃取不完全。萃取温度的升高有利于挥发性物质从固相中溢出, 使得其在顶空瓶气相中含量增加, 萃取头达到吸附平衡时则能够吸附更多的挥发性化合物。但同时, 当萃取温度偏高时, 会加剧某些挥发性物质的流失, 可以看出, 当萃取温度提高至 80 °C, 吡嗪类化合物和脂肪醇数量明显下降, 对于这些化合物而言, 持续升高萃

取温度反而会使得其萃取效率下降。另外，在80℃的SPME得到的挥发性化合物中，检测到其他温度条件下未检出的几种长链脂肪酸（酯），沸点较高，出峰时间靠后，如：豆蔻酸、棕榈酸（酯）、硬脂酸（酯）、油酸、亚油酸等，但其相对含量较低，总体仅占检出挥发性成分相对含量的3.41%，不是发酵产品的主体风味物质。

同时，从萃取得到的挥发性化合物中筛选出几种占香气成分中主体地位的代表性物质：苯乙醇、香叶醇、香茅醇及3-甲基丁酸，总结其谱图峰面积随萃取温度变化的趋势，从化合物响应强度上比较不同萃取温度的差异，如图1所示，当萃取温度在60℃以下时，苯乙醇、香叶醇、香茅醇和3-甲基丁酸的峰面积随温度升高逐渐增大，但当温度继续提升至80℃后，峰面积反而开始减小，说明这些物质在萃取头上的吸附稳定性不强，高温易致使这些挥发性成分从萃取头上发生解吸，出现部分流失。

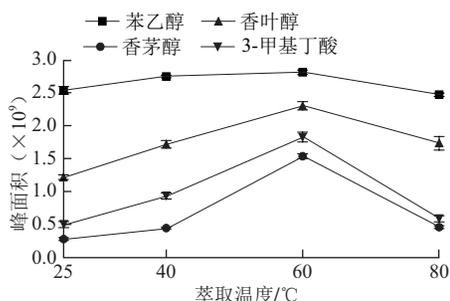


图1 不同萃取温度条件下SPME发酵产物主要挥发性风味成分的峰面积比较

Fig. 1 Comparison of peak areas of key volatile components of fermented okara extracted at different temperature

综上，SPME萃取得到的挥发性化合物数量随萃取温度的升高而增加，但当萃取温度提高至60℃以上时，萃取得到的挥发性化合物数量总量变化较小，且在高温条件下溢出的微量风味化合物并非发酵产品的主体风味物质。同时，香气体系中占主体地位的几种风味化合物随着萃取温度提升至60℃以上后，均出现不同程度的流失。因此，选择60℃作为最佳萃取温度较为适宜。

2.1.3 萃取时间对SPME的影响

表3 萃取时间对SPME发酵产物挥发性风味成分数量的影响
Table 3 Comparison of the composition of volatile components of fermented okara at different extraction times

种类	萃取时间/min		
	20	30	40
芳香醇类	3	3	3
脂肪醇类	5	6	5
吡嗪类	9	14	13
萜类	9	10	10
醛类	3	1	2
酮类	2	2	2
酸类	3	3	3
酯类	4	4	4
杂环类	8	10	9
其他	6	4	5
合计	52	57	56

从表3可以看出，萃取时间分别为20、30、40 min时，能够萃取得到的挥发性风味化合物数量分别为52、57、56种，挥发性化合物总数量相近，且各种不同类型的化合物在不同萃取时间条件下数量变化也较小。

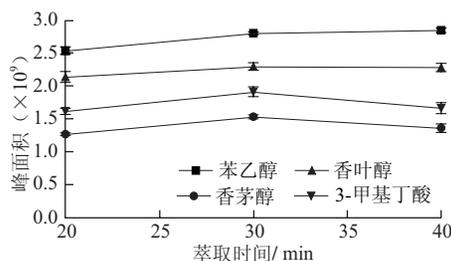


图2 不同萃取时间条件下SPME发酵产物主要挥发性风味成分的峰面积比较

Fig. 2 Comparison of peak areas of volatile components of fermented okara at different extraction times

如图2所示，萃取时间为20 min时，萃取动态平衡可能尚未达到，所以萃取效率未达到最佳。随着萃取时间的延长，几种主要的挥发性风味化合物的峰面积都有一定程度的增加。但当萃取时间从30 min提升至40 min时，它们的峰面积变化不明显，或有小幅的下降趋势，这可能是由于萃取时间较长而造成的解吸所致。综上，萃取时间对SPME效率的影响较小，综合考虑SPME得到的挥发性风味化合物数量及其相应响应强度，选择30 min作为最佳萃取时间。

2.1.4 样品量对SPME的影响

表4 不同样品量对SPME挥发性风味成分数量的影响
Table 4 Comparison of the composition of volatile components of fermented okara at different sample masses

种类	样品量/g			
	2.5	5.0	7.5	10.0
芳香醇类	3	2	3	3
脂肪醇类	3	5	6	6
吡嗪类	8	11	14	14
萜类	8	10	10	10
醛类	3	3	1	2
酮类	2	4	2	2
酸类	3	3	3	3
酯类	2	4	4	3
杂环类	7	9	10	9
其他	3	5	4	6
合计	42	56	57	58

如表4所示，当样品量为2.5、5.0、7.5、10.0 g时，可检出的挥发性物质出峰数量分别为42、56、57、58种。可以看出，随着样品量增多，得到的挥发性物质总量增多。但当样品量大于5.0 g时，挥发性物质的种类、数量和响应强度变化并不明显，尤其对于发酵产品的主体风味物质如芳香醇类、萜类、酸类和吡嗪类化合物，在样

品量为7.5 g和10.0 g条件下,挥发性成分的数量变化表现出了非常好的时。这是由于在15 mL的顶空瓶中,样品量大于7.5 g时瓶内气氛在达到萃取平衡时饱和度较好,各种挥发性化合物均得到了充分的释放和吸附。值得注意的是,当样品量大于7.5 g后,样品在15 mL样品瓶中所占空间较大,在进行SPME各种操作时易造成萃取头的污染。因此,本实验中最佳样品量定为7.5 g。

2.1.5 SPME重复实验误差分析

采用由上述单因素试验所确定的最适萃取条件,考察SPME方法在萃取黄豆发酵产物时的重复性。分别以发酵产物的主要挥发性成分类别的相对含量为指标进行重复性的考察,结果见表5。

表5 黄豆发酵产物挥发性成分SPME实验重复性分析结果

Table 5 Experimental reproducibility analysis of volatile components of fermented okara based on optimized HS-SPME

挥发性物质	数量	相对含量/%	RSD/%
芳香醇类	3	22.91±0.09	0.39
脂肪醇类	6	4.12±0.01	0.24
吡嗪类	14	7.89±0.21	2.66
萜类	10	35.25±0.53	1.50
醛类	1	1.18±0.03	2.54
酮类	2	1.18±0.02	1.69
酸类	3	17.22±0.45	2.61
酯类	4	5.49±0.07	1.28
杂环类	10	2.93±0.07	2.39
其他	4	1.84±0.07	3.80
总峰面积		1.26×10 ¹⁰ ±1.67×10 ⁸	1.33

经计算,黄豆发酵产物各类挥发性成分相对含量的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)最大值为3.80%,最小值为0.24%,平均值为1.91%;GS-MS检测其总峰面积的RSD为1.33%。其中主要的几种挥发性风味物质成分的相对含量分别为苯乙醇22.37%、*cis-*, *trans-*香叶醇18.05%、3-甲基丁酸15.28%、香茅醇11.96%,其RSD分别为0.40%、1.33%、3.21%和1.09%。说明SPME方法萃取黄豆发酵产物中的挥发性成分分析的重复性良好。

2.2 最适萃取条件下黄豆豆渣发酵产物中的主要挥发性风味化合物

表6 黄豆豆渣固态发酵过程中挥发性风味物质的变化

Table 6 Identified volatile components and their relative contents in fresh and fermented okara

发酵前豆渣			发酵产物		
序号	物质名称	相对含量/%	序号	物质名称	相对含量/%
芳香醇类			芳香醇类		
1	苯乙醇	1.26	1	苯乙醇	22.37
			2	2-甲氧基- α -甲基苯乙醇	0.33
			3	4-羟基苯乙醇	0.21
脂肪醇类			脂肪醇类		
2	己醇	1.18	4	3-甲基丁醇	0.27

续表6

发酵前豆渣			发酵产物		
序号	物质名称	相对含量/%	序号	物质名称	相对含量/%
3	1-辛烯-3-醇	13.60	5	(R)-2,3-丁二醇	2.19
4	2,10-二甲基-十一碳烯醇	0.75	6	(S)-2,3-丁二醇	0.65
			7	3-壬烯-1-醇	0.56
			8	柏木二醇	0.15
			9	1,2,3-丁三醇	0.29
吡嗪类			吡嗪类		
5	甲基吡嗪	2.45	10	甲基吡嗪	0.60
6	2,5-二甲基吡嗪	7.43	11	2,5-二甲基吡嗪	0.43
7	2,6-二甲基吡嗪	1.21	12	2,6-二甲基吡嗪	0.27
8	乙基吡嗪	1.16	13	乙基吡嗪	0.31
9	2-乙基-5-甲基吡嗪	6.57	14	2,3-二甲基吡嗪	0.18
10	三甲基吡嗪	3.36	15	2-乙基-5-甲基吡嗪	0.56
11	3-乙基-2,5-二甲基吡嗪	5.12	16	三甲基吡嗪	0.52
12	2-乙基-6-甲基吡嗪	0.31	17	2,6-二乙基吡嗪	0.46
13	3,5-二乙基-2-甲基吡嗪	1.67	18	3-乙基-2,5-二甲基吡嗪	0.16
			19	2,5-二乙基吡嗪	1.10
			20	2,3-二甲基-5-乙基吡嗪	2.20
			21	四甲基吡嗪	0.63
			22	2,3,5-三甲基-6-乙基吡嗪	0.28
			23	2-异戊基-6-甲基吡嗪	0.19
萜类			萜类		
14	D-柠檬烯	20.24	24	柠檬醛	0.15
15	γ -萜烯	1.37	25	香茅醇	11.96
16	3,4-二氢紫罗兰酮	0.22	26	3-亚甲基-7-甲基-6-辛烯醇	0.44
			27	<i>cis</i> -香叶醇	9.27
			28	<i>cis</i> -异香叶醇	1.33
			29	<i>trans</i> -异香叶醇	1.94
			30	<i>trans</i> -香叶醇	8.78
			31	异戊酸香叶草酯	0.14
			32	香茅醛	0.94
			33	香叶酸	0.29
醛类			醛类		
17	苯甲醛	4.23	34	苯甲醛	1.18
18	2-壬烯醛	0.17			
19	4-羟基苯乙二醛	0.63	酮类		
酮类			35	6-甲基-5-庚烯-2-酮	0.93
20	2-辛酮	0.19	36	2-十三酮	0.26
21	甲基环戊烯醇酮	0.41	酸类		
酸类			37	2-甲基丙酸	1.80
22	豆蔻酸	0.71	38	3-甲基丁酸	15.28
23	硬脂酸	0.28	39	2,4,6-三甲基扁桃酸	0.14
24	棕榈酸	1.09	酯类		
25	棕榈油酸	0.48	40	丁酸丁酯	1.76
酯类			41	2-甲基丙酸-3-羟基-2,4,4-三甲基戊酯	1.99
26	10-甲基-11-十三烯醇丙酯	0.70	42	3-甲基丁酸-2-苯乙酯	1.56
27	丁酸丁酯	1.24	43	4-乙氧基苯甲酸甲酯	0.18
28	2-甲基丙酸-3-羟基-2,4,4-三甲基戊酯	3.52	杂环类		
29	4-乙氧基苯甲酸乙酯	0.52	31	1-戊基吡咯	0.25
30	邻苯二甲酸二甲酯	0.31	32	2-呋喃醇	1.25
杂环类			33	麦芽酚	5.14
31	1-戊基吡咯	0.25	34	2-乙酰吡咯	0.46
32	2-呋喃醇	1.25			
33	麦芽酚	5.14			
34	2-乙酰吡咯	0.46			

续表6

发酵前豆渣			发酵产物		
序号	物质名称	相对含量/%	序号	物质名称	相对含量/%
35	2-醛基吡咯	0.45	48	麦芽酚	0.43
36	二苯并呋喃	0.62	49	2-乙酰基吡咯	0.23
37	香豆酮	0.71	50	2-甲氧基-4,5,6-三甲基嘧啶	0.24
			51	5-戊基呋喃酮	0.43
			52	4,4-二甲基呋喃酮	0.15
			53	5-己基呋喃酮	0.29
芳香族			芳香族		
38	1,3-二氯苯	2.43	54	1,3-二氯苯	1.13
39	甲氧基苯基酚	0.70	55	3,5-二甲氧基甲苯	0.26
40	2-甲氧基苯酚	1.08			
41	1,4-二甲基萘	0.35			
42	苯酚	0.21			
43	2-乙烯基萘	0.78			
44	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	1.94			
45	1,2,3-三甲基-4-丙烯基萘	0.13			
46	芴	0.51			
47	9-亚甲基芴	0.25			
烷烃类			烷烃类		
48	6-甲基十八烷	0.36	56	十四烷	0.17
其他			其他		
			57	乙酰胺	0.28

由表6可知, 未经发酵的黄豆豆渣其主要挥发性成分为吡嗪类化合物、柠檬烯和1-辛烯-3-醇, 其中柠檬烯和1-辛烯-3-醇随着发酵的进行消失, 而发酵前豆渣中吡嗪类化合物的响应强度(峰面积为 1.54×10^9)大于豆渣经发酵后培养物中的响应强度(峰面积为 9.88×10^8), 因此认为虽然随着发酵的进行产生了几种发酵前未检出的吡嗪类化合物, 但作为豆类及坚果类食品主体风味物质的吡嗪类化合物并不是阿舒假囊酵母发酵产物的关键呈味物质。

经过阿舒假囊酵母的生长代谢过程, 黄豆豆渣在发酵前后成分发生了很大变化, 同时产生了大量新的挥发性成分, 形成了发酵产物独特的风味。发酵前后挥发性成分总数、种类及相对含量的变化, 说明微生物发酵过程对挥发性成分的产生有决定性的作用。在发酵产物的挥发性成分中相对含量较高的是以香茅醇、香叶醇为代表的萜类化合物、苯乙醇及3-甲基丁酸等, 其中香茅醇、香叶醇、异香叶醇、香茅醛、香叶酸等萜类化合物在未经发酵的豆渣培养基中并未检出, 而在发酵产物中大量出现, 占挥发性成分总量的35%以上, 为发酵产物的主体风味物质。此外, 苯乙醇在发酵前仅占1.26%, 响应强度(峰面积为 6.61×10^7), 发酵过后, 苯乙醇相对含量明显增加, 占挥发性成分总量的22.37%, 响应强度达到(峰面积为 2.80×10^9)。在酵母细胞中, 苯乙醇可通过莽草酸途径形成的苯丙酮酸脱羧脱氢形成, 也可由苯丙氨酸经Ehrlich途径直接转化^[26]。

该黄豆发酵产物的可检出挥发性物质成分非常丰富, 主要有芳香醇、脂肪醇、吡嗪类、萜类、醛类、酮

类、酸类、酯类、杂环类九大类。经过发酵, 芳香醇、脂肪醇、吡嗪类、萜类、杂环类挥发性物质的数量均有明显增加, 而未发酵豆渣中存在的多种芳香族苯环化合物在发酵产物中消失。值得注意的是, 发酵前豆渣中的几种不饱和长链脂肪酸在发酵结束后未被检出, 而具有辛辣气味和酸味的3-甲基丁酸则在发酵产物中大量存在, 占挥发性物质成分总量的15.28%。

综上, 在最优SPME条件下, 阿舒假囊酵母的黄豆发酵产物中的主要挥发性风味物质成分包括: 苯乙醇(22.37%)、*cis-*, *trans-*香叶醇(18.05%)、*cis-*, *trans-*异香叶醇(3.27%)、3-甲基丁酸(15.28%)、香茅醇(11.96%)、吡嗪类化合物(7.89%)。

3 结论

SPME方法对样品的预处理简便, 环境友好, 是一种准确率高, 操作简单的挥发性化合物成分分析方法。受不同型号萃取头、萃取温度、萃取时间、样品量等环境因素的影响, SPME方法萃取得到的挥发性物质成分及其响应强度也会产生较大差异。本实验研究上述4种因素对萃取效果的影响, 通过单因素试验, 阶段性选择最优条件, 得到适宜于黄豆的阿舒假囊酵母发酵产物的萃取条件为采用50/30 μm DVB/CAR/PDMS型萃取头、萃取温度60 $^{\circ}\text{C}$ 、萃取时间30 min、样品量7.5 g。在此条件下, 检出发酵产物中挥发性化合物成分57个。其中具有新鲜面包味和玫瑰花香的苯乙醇, 具有玫瑰甜香的萜类物质香茅醇、香叶醇以及具有辛辣味、酸味以及尖刺的奶酪味的3-甲基丁酸对发酵产物的风味形成贡献较大。这些挥发性化合物互相融合, 共同形成了发酵产物非常独特的风味。

相关文献[27-29]表明, 萃取头和萃取温度的选择对SPME效果影响较大。而样品量和萃取时间等因素则有一个最适值, 小于该值时, 萃取效果不佳, 高于该值后, 则不再有明显影响, 这是由于萃取头对挥发性成分的吸附和解吸是一个动态的平衡过程, 当顶空瓶内达到饱和状态后, 萃取效率也趋于稳定, 这与本研究结果是一致的。在此研究基础上, 其他类型的萃取头匹配不同的萃取温度是否会得到更多挥发性成分, 这几种影响因素之间的交互作用是否会对萃取效果产生复杂影响还需要进一步验证分析。

发酵产物的风味是由各种挥发性化合物成分综合而成, 发酵工艺中的各种因素如温度、含水量、发酵时间等都会对发酵过程有很大影响, 而在发酵过程中产生的各种复杂代谢产物则是风味成分的主要来源, 因此发酵工艺与发酵产物的风味有着直接关系。在本研究的基础上, 可探索通过优化发酵工艺, 对发酵产物进行增香,

或抑制其不良气味的产生, 更好地进行发酵产品的品质控制。此外, 发酵过程中主要挥发性副产物的检出, 也为进一步探索固态发酵途径及微生物代谢机理提供了基础依据。

参考文献:

- [1] GIRI S S K, MANGAR A J S. Processing influences on composition and quality attributes of soymilk and its powder[J]. *Food Engineering Reviews*, 2012, 4(3): 149-164. DOI:10.1007/s12393-012-9053-0.
- [2] 李里特. 大豆加工与利用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 384-414.
- [3] 吴占威, 胡志和. 大豆豆渣的生理功能及其在食品中的应用[J]. *食品科学*, 2012, 33(19): 358-362.
- [4] REDONDO-CUENCA A, VILLANUEVA-SUAMÁJOSE M A, MATEOS-APARICIO I. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods[J]. *Food Chemistry*, 2008, 108(3): 1099-1105. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.11.061.
- [5] 毕韬韬, 吴广辉, 高愿军. 豆渣深加工研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(6): 149-152. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2011.06.044.
- [6] 朱运平, 李秀婷, 刘瑞山, 等. 不同菌种发酵豆渣的营养及抗氧化特性研究[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(9): 20-27.
- [7] ZHU Yunping, YAMAKI K, YOSHIHASHI T, et al. Purification and identification of 1-deoxynojirimycin (DNJ) in okara fermented by *Bacillus subtilis* B2 from Chinese traditional food (Meitaoza)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(7): 4097-4103. DOI:10.1021/jf9032377.
- [8] FUJITA T, FUNAKO T, HAYASHI H. 8-Hydroxydaidzein, an aldose reductase inhibitor from okara fermented with *Aspergillus* sp. HK-388[J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2004, 68(7): 1588-1590. DOI:10.1271/bbb.68.1588.
- [9] 叶俊, 李静, 范亚苇, 等. 粗壮脉纹孢菌发酵豆渣过程中营养成分的变化研究[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(12): 217-221.
- [10] 卢靖, 刘平, 张丽珠, 等. 腐乳发酵过程挥发性风味成分的变化[J]. *食品科学*, 2014, 35(16): 175-179. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201416034.
- [11] CHEN Qingchan, XU Yongxia, WU Peng, et al. Aroma impact compounds in Liuyang douchi, a Chinese traditional fermented soya bean product[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 46(9): 1823-1829. DOI:10.1111/j.1365-2621.2011.02687.x.
- [12] 秦礼康, 丁霄霖. 传统陈窖豆豉和霉菌型豆豉挥发性风味化合物研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(8): 275-280. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2005.08.067.
- [13] 严留俊, 张艳芳, 陶文沂, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法快速测定酱油中的挥发性风味成分[J]. *色谱*, 2008, 26(3): 285-291. DOI:10.3321/j.issn:1000-8713.2008.03.004.
- [14] LEEJEERAJUMNEAN A, DUCKHAM S C, OWENS J D, et al. Volatile compounds in *Bacillus*-fermented soybeans[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2001, 81(5): 525-529. DOI:10.1002/jsfa.843.
- [15] 李艳萍. 维酶素的研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2002, 17(6): 140-141. DOI:10.3969/j.issn.1004-2407.2002.03.026.
- [16] 张鑫, 王章存, 刘卫东. 提高豆渣固态发酵核黄素产率的研究[J]. *微生物学通报*, 1995, 22(2): 80-82.
- [17] 宋德贵, 卫军, 杨生玉. 利用豆渣黄浆水发酵生产核黄素的研究[J]. *广西工学院学报*, 2005, 16(4): 73-77. DOI:10.3969/j.issn.1004-6410.2005.04.018.
- [18] 仪宏, 朱文众, 张华峰. 核黄素的产业现状及其对策[J]. *中国食品添加剂*, 2003(3): 10-12. DOI:10.3969/j.issn.1006-2513.2003.03.006.
- [19] 赵永贵, 韩恒芬, 翟丽莉, 等. 维酶素的研制及应用[J]. *河南农业科学*, 1996(12): 31.
- [20] 王润芝, 王秉栋, 吴刚, 等. *Eremothecium ashbyii*菌产生维酶素发酵条件的研究[J]. *生物技术*, 1991(1): 29-33.
- [21] 赵建新, 顾小红, 刘杨岷, 等. 传统豆酱挥发性风味化合物的研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(12): 684-687. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2006.12.177.
- [22] 黄红霞, 孟鹭, 康旭, 等. 顶空固相微萃取-气质联用技术分析传统豆豉中的挥发性成分[J]. *农产品加工(学刊)*, 2010(9): 25-29.
- [23] 陈清婵, 徐永霞, 吴鹏, 等. 同时蒸馏萃取与顶空固相微萃取法分析豆豉挥发性成分[J]. *食品科学*, 2009, 30(20): 327-330.
- [24] 卢晓丹, 张敏, 苗菁. 不同来源生熟北京豆汁的风味物质和感官评价比较[J]. *食品科学*, 2015, 26(6): 103-108. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201506019.
- [25] 乔鑫, 付雯, 李冬生, 等. 不同黄豆对黄豆酱挥发性成分形成的影响研究[J]. *中国调味品*, 2011, 36(6): 46-53. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2011.06.010.
- [26] 赵爽, 张毅斌, 张弦, 等. 酒醅微量挥发性成分的HS-SPME和GC-MS分析[J]. *食品科学*, 2013, 34(4): 118-124.
- [27] 周永妍, 李亚, 余爱农. 顶空固相微萃取法萃取Maillard反应体系中吡嗪类化合物的条件优化[J]. *食品科学*, 2015, 36(6): 119-123. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201506022.
- [28] 林家永, 高艳娜, 吴胜芳, 等. 顶空固相微萃取-气质联用分析稻谷挥发性成分[J]. *食品科学*, 2009, 30(20): 277-282.
- [29] 刘晓慧, 张丽霞, 王日为, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法分析黄茶香气成分[J]. *食品科学*, 2010, 31(16): 239-243.